



ΕΘΝΙΚΟ ΜΕΤΣΟΒΙΟ ΠΟΛΥΤΕΧΝΕΙΟ
ΣΧΟΛΗ ΧΗΜΙΚΩΝ ΜΗΧΑΝΙΚΩΝ
ΤΟΜΕΑΣ ΧΗΜΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΟΡΓΑΝΙΚΗΣ ΧΗΜΕΙΑΣ

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΣΧΕΔΙΑΣΜΟΣ ΚΑΙ ΣΥΝΘΕΣΗ ΝΕΩΝ ΚΟΥΜΑΡΙΝΙΚΩΝ ΠΑΡΑΓΩΓΩΝ
ΚΑΙ ΝΑΝΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΚΗ ΠΡΟΣΕΓΓΙΣΗ ΓΙΑ ΤΗΝ ΠΙΘΑΝΗ
ΑΞΙΟΠΟΙΗΣΗ ΤΟΥΣ ΣΕ ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΕΣ ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ

ΑΝΝΙΤΑ ΚΑΤΩΠΟΔΗ

ΔΙΠΛΩΜΑΤΟΥΧΟΣ ΧΗΜΙΚΟΣ ΜΗΧΑΝΙΚΟΣ ΕΜΠ

ΑΘΗΝΑ 2023

Το έργο συγχρηματοδοτείται από την Ελλάδα και την Ευρωπαϊκή Ένωση (Ευρωπαϊκό Κοινωνικό Ταμείο) μέσω του Επιχειρησιακού Προγράμματος «Ανάπτυξη Ανθρώπινου Δυναμικού, Εκπαίδευση και Διά Βίου Μάθηση», στο πλαίσιο της Πράξης «Ενίσχυση του ανθρώπινου ερευνητικού δυναμικού μέσω της υλοποίησης διδακτορικής έρευνας – 2^{ος} Κύκλος» (MIS-5000432), που υλοποιεί το Ίδρυμα Κρατικών Υποτροφιών (ΙΚΥ).



**Επιχειρησιακό Πρόγραμμα
Ανάπτυξη Ανθρώπινου Δυναμικού,
Εκπαίδευση και Διά Βίου Μάθηση**
Με τη συγχρηματοδότηση της Ελλάδας και της Ευρωπαϊκής Ένωσης



<Η έγκριση της διδακτορικής διατριβής από την Ανώτατη Σχολή Χημικών Μηχανικών του Ε.Μ.Πολυτεχνείου δεν υποδηλώνει αποδοχή των γνωμών του συγγραφέα. (Ν.5343/1932, Άρθρο 202)>

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΣΧΕΔΙΑΣΜΟΣ ΚΑΙ ΣΥΝΘΕΣΗ ΝΕΩΝ ΚΟΥΜΑΡΙΝΙΚΩΝ ΠΑΡΑΓΩΓΩΝ ΚΑΙ ΝΑΝΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΚΗ ΠΡΟΣΕΓΓΙΣΗ ΓΙΑ ΤΗΝ ΠΙΘΑΝΗ ΑΞΙΟΠΟΙΗΣΗ ΤΟΥΣ ΣΕ ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΕΣ ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

ΑΝΑΣΤΑΣΙΑ ΔΕΤΣΗ (ΕΠΙΒΛΕΠΟΥΣΑ)

ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ

ΣΧΟΛΗ ΧΗΜΙΚΩΝ ΜΗΧΑΝΙΚΩΝ Ε.Μ.Π.

ΤΟΜΕΑΣ ΧΗΜΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ

ΤΣΟΠΕΛΑΣ ΦΩΤΙΟΣ

ΕΠΙΚΟΥΡΟΣ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ

ΣΧΟΛΗ ΧΗΜΙΚΩΝ ΜΗΧΑΝΙΚΩΝ Ε.Μ.Π.

ΤΟΜΕΑΣ ΧΗΜΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ

ΖΕΡΒΟΥ ΜΑΡΙΑ

ΕΡΕΥΝΗΤΡΙΑ Β

ΙΝΣΤΙΤΟΥΤΟ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ, ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΗΣ ΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

ΕΘΝΙΚΟ ΙΔΡΥΜΑ ΕΡΕΥΝΩΝ

ΕΠΤΑΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

ΑΝΑΣΤΑΣΙΑ ΔΕΤΣΗ

ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ

ΣΧΟΛΗ ΧΗΜΙΚΩΝ ΜΗΧΑΝΙΚΩΝ Ε.Μ.Π.

ΤΣΟΠΕΛΑΣ ΦΩΤΙΟΣ

ΕΠΙΚΟΥΡΟΣ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ

ΣΧΟΛΗ ΧΗΜΙΚΩΝ ΜΗΧΑΝΙΚΩΝ Ε.Μ.Π.

ΖΕΡΒΟΥ ΜΑΡΙΑ

ΕΡΕΥΝΗΤΡΙΑ Β

ΙΝΣΤΙΤΟΥΤΟ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ,

ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΗΣ ΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ

ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ Ε.Ι.Ε

ΧΑΜΗΛΑΚΗΣ ΣΤΥΛΙΑΝΟΣ

ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ

ΣΧΟΛΗ ΧΗΜΙΚΩΝ ΜΗΧΑΝΙΚΩΝ Ε.Μ.Π.

ΖΟΥΜΠΟΥΛΑΚΗΣ ΠΑΝΑΓΙΩΤΗΣ

ΑΝΑΠΛΗΡΩΤΗΣ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ,

ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΚΑΙ

ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ, ΠΑ.Δ.Α.

ΧΡΗΣΤΟΣ ΚΟΝΤΟΓΙΩΡΓΗΣ

ΕΠΙΚΟΥΡΟΣ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ

ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ Δ.Π.Θ.

ΠΑΥΛΑΤΟΥ ΕΥΑΓΓΕΛΙΑ

ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ

ΣΧΟΛΗ ΧΗΜΙΚΩΝ ΜΗΧΑΝΙΚΩΝ Ε.Μ.Π.

*Στη γιαγιά μου Γεωργία, που παρόλο που οι συνθήκες δεν της επέτρεψαν
να ολοκληρώσει τη μόρφωσή της, η ίδια δεν έπαψε ποτέ να την αποζητά*

*«Είναι ο χρόνος που αφιέρωσες για το τριαντάφυλλό σου που το κάνει τόσο
σημαντικό»*

Antoine de Saint-Exupéry

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα διδακτορική διατριβή αποτέλεσε ένα μακρύ και κοπιαστικό αλλά συνάμα μοναδικό «ταξίδι», το οποίο απαιτούσε μεγάλη αφοσίωση και επιμονή. Φθάνοντας στο τέλος του οφείλω να ευχαριστήσω τους ανθρώπους που συνέβαλαν ουσιαστικά σε αυτή τη διαδρομή.

Αρχικά, οφείλω να ευχαριστήσω την επιβλέπουσα της παρούσας διδακτορικής διατριβής, Καθηγήτρια Ε.Μ.Π., Αναστασία Δέτση, για τη στήριξή της τόσο σε επιστημονικό όσο και σε προσωπικό επίπεδο. Ειδικότερα, οι επιστημονικές της γνώσεις, οι πολύτιμες συμβουλές, η εύστοχη καθοδήγηση και το αδιάκοπο ενδιαφέρον της οδήγησαν στην εξέλιξη της παρούσας διδακτορικής διατριβής, αλλά και στη δική μου σαν άνθρωπο. Την ευχαριστώ θερμά για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε και για την ανεκτίμητη βοήθεια και στήριξή της.

Ακόμη, ιδιαίτερες ευχαριστίες οφείλω να αποδώσω στα υπόλοιπα μέλη της τριμελούς επιτροπής:

Τον Επίκουρο Καθηγητή Ε.Μ.Π. Φώτιο Τσόπελα τόσο για τη συνεργασία και τη βοήθεια στη διεξαγωγή πειραμάτων όσο και για την προθυμία και άμεση πάντα ανταπόκρισή του.

Και την Ερευνήτρια Β Ε.Ι.Ε., Μαρία Ζερβού, για την εξαιρετική συνεργασία και τη συμβολή της στο πειραματικό μέρος της διδακτορικής διατριβής καθώς και την πολύτιμη βοήθειά της σε οτιδήποτε χρειάστηκε.

Ακόμη, ευχαριστώ τα υπόλοιπα μέλη της επταμελούς επιτροπής:

Τον Επίκουρο Καθηγητή του τμήματος Ιατρικής του Δ.Π.Θ. Χρήστο Κοντογιώργη, για την καθοριστική του βοήθεια μέσω της διεξαγωγής βιολογικών δοκιμών, αλλά και την κριτική ανάγνωση του κειμένου.

Τον Καθηγητή Ε.Μ.Π. Στυλιανό Χαμηλάκη για την κριτική ανάγνωση του κειμένου και τις εύστοχες παρατηρήσεις του.

Τον Αναπληρωτή Καθηγητή ΠΑ.Δ.Α. Παναγιώτη Ζουμπουλάκη, για την εξαιρετική συνεργασία και την κριτική ανάγνωση του κειμένου και τις εύστοχες και καθοριστικές παρατηρήσεις του.

Την Καθηγήτρια Ε.Μ.Π. Ευαγγελία Παυλάτου για το χρόνο που αφιέρωσε στην κριτική ανάγνωση του κειμένου, θέτοντας εύστοχες και καθοριστικές παρατηρήσεις.

Ιδιαίτερες ευχαριστίες οφείλω να αποδώσω στη Δρ Ελένη Καβέτσου, η οποία με παρότρυνε να ξεκινήσω το ταξίδι του διδακτορικού, αλλά και με στήριξε στα πρώτα μου βήματα τόσο επιστημονικά όσο και με τη φιλία της.

Ακόμη, θα ήθελα να ευχαριστήσω από καρδιάς τα μέλη του Ε.Ο.Χ. Ε.Μ.Π. Ειδικότερα, ευχαριστώ τους υποψήφιους διδάκτορες Ιωάννα Πιττερού και

Αλέξανδρο Καλοσπύρο τόσο για τη βοήθεια τους στη διεκπεραίωση πειραμάτων όσο και τη στήριξη και τη σχέση που αναπτύξαμε. Ευχαριστώ ιδιαίτερα τη Δρ Ανδρομάχη Τζάνη, τη Δρ Ιωάννα Κωστοπούλου και τις Υ.Δ. Μαρία Άννα Καραδένδρου και Βασιλική Κακοκέφαλου για την αρμονική συνεργασία και το πάντα ευχάριστο κλίμα που έκανε την καθημερινότητα στο εργαστήριο ακόμη πιο ευχάριστη και αποτελούσε κίνητρο για να συνεχίσεις. Ακόμη, ευχαριστώ τα νεότερα μέλη του εργαστηρίου, τους Υ.Δ. Στυλιανή Καλαφατέλη, Φλώρα Καλογεροπούλου, Ηλία Βάσσο και Σταύρο Νεοφώτιστο για τη συνεργασία και το ευχάριστο κλίμα.

Επιπλέον, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά την Ε.ΔΙ.Π. Ε.Μ.Π. Ζαμπία Κατσανεβάκη που αποτελεί θεμέλιο λίθο του Ε.Ο.Χ. Ε.Μ.Π. και μας στηρίζει όλους καθημερινά.

Ευχαριστώ από καρδιάς τη Δρ Ελένη Αλεξανδράτου, Ε.ΔΙ.Π. Ε.Μ.Π. για την πολύτιμη συνεργασία μας μέσω των πειραμάτων που πραγματοποιήθηκαν στο Εργαστήριο Βιοϊατρικής Οπτικής και Εφαρμοσμένης Βιοφυσικής, για την καθοδήγηση και τις συμβουλές της σε όλα τα επίπεδα, τα οποία με έκαναν να αισθάνομαι μέλος του Εργαστηρίου.

Ακόμη, ευχαριστώ τα μέλη του Εργαστηρίου Βιοϊατρικής Οπτικής και Εφαρμοσμένης Βιοφυσικής Ε.Μ.Π., Ελένη Γεωργιοπούλου, Στάθη Γιαννακόπουλο και Εύη Μαθιουδάκη, με τους οποίους συνεργαστήκαμε άψογα, ανταλλάξαμε γνώσεις και κυρίως δουλέψαμε πολύ ευχάριστα μαζί.

Ευχαριστώ ιδιαίτερα την Καθηγήτρια του Τμήματος Φαρμακευτικής του Α.Π.Θ. Δήμητρα Χατζηπαύλου-Λίτινα, για την καθοριστική της βοήθεια μέσω της διεξαγωγής βιολογικών δοκιμών.

Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά την Επίκουρη Καθηγήτρια του τμήματος Φαρμακευτικής Α.Π.Θ., Ελένη Ποντική, καθώς την Επίκουρη Καθηγήτρια του τμήματος Επιστήμης και Τεχνολογίας Τροφίμων ΠΑ.ΔΑ, Ευτυχία Κρίτση, για τη σημαντική βοήθειά τους στη διεξαγωγή των *in silico* δοκιμών μοριακής πρόσδεσης και την άμεση πάντα ανταπόκρισή τους.

Επιπλέον, ευχαριστώ τον Δρ Μανόλη Ματζαπετάκη, υπεύθυνο της υποδομής φασματοσκοπίας Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού (NMR) του Ε.Ι.Ε. για την αμέριστη προθυμία και βοήθεια στη λήψη φασμάτων NMR, καθώς και στην αποτίμησή τους.

Θα ήθελα να ευχαριστώ τους Τσώτσου Ευαγγελία, Φιλίππα Μαρίνου, Κυριακή Σαφαρή, Γεωργία Ερεσίου, Πολυξένη Πανουσάκη, Κατερίνα Σπανού, Δημήτρη Παπακώστα και Νικόλαο Νικολάου για τη συνεργασία μας στο πλαίσιο της διπλωματικής τους εργασίας και τη συμβολή τους στη διεκπεραίωση του πειραματικού μέρους.

Τέλος, ευχαριστώ από καρδιάς την οικογένεια μου για την αμέριστη και ανεκτίμητη στήριξή της σε κάθε μου βήμα, καθώς και τους φίλους μου για τη στήριξη και την υπομονή τους και ειδικά τον Άλεξ για την κατανόηση, τη στήριξη και τις συμβουλές του που με βοήθησαν να ανταπεξέλθω σε σημαντικές δυσκολίες.

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Οι ετεροκυκλικές ενώσεις αποτελούν τη μεγαλύτερη οικογένεια οργανικών ενώσεων, παρουσιάζοντας τεράστιο ενδιαφέρον στη φαρμακευτική χημεία και βιομηχανία. Οι κουμαρίνες αποτελούν μία σημαντική κατηγορία ετεροκυκλικών ενώσεων, οι οποίες ανήκουν στην οικογένεια των βενζοπυρονών και παρουσιάζουν μεγάλο εύρος βιολογικών δράσεων, συγκεντρώνοντας με αυτό τον τρόπο έντονο ερευνητικό ενδιαφέρον γύρω από τη δομική τροποποίηση του σκελετού τους.

Στην παρούσα διδακτορική διατριβή πραγματοποιήθηκε ο σχεδιασμός και η σύνθεση νέων κουμαρινικών αναλόγων, στηριζόμενοι τόσο σε φυσικά προϊόντα όσο και σε μόρια-οδηγούς που έχουν συντεθεί στο Εργαστήριο Οργανικής Χημείας Ε.Μ.Π. κι έχουν επιδείξει αξιόλογη δράση. Ως αποτέλεσμα, αναπτύχθηκε μία «χημική βιβλιοθήκη» περίπου 100 μορίων, τα οποία στη συνέχεια μελετήθηκαν ως προς τη βιολογική τους δράση.

Το *Πρώτο Κεφάλαιο* αποτελεί βασικό θεωρητικό υπόβαθρο για τις κουμαρίνες, την προέλευση και ταξινόμησή τους, τις βιολογικές τους δράσεις, καθώς και τις κυριότερες μεθόδους σύνθεσής τους.

Στη συνέχεια, κάθε κεφάλαιο που παρουσιάζεται, αποτελεί μία ξεχωριστή μελέτη όπου τα κουμαρινικά ανάλογα που συντέθηκαν έχουν σχεδιαστεί κατάλληλα ανάλογα με την επιθυμητή βιολογική δράση, ενώ παρατίθενται και βασικά θεωρητικά στοιχεία.

Ειδικότερα, στο *Δεύτερο Κεφάλαιο* παρουσιάζεται η σύνθεση δύο Σειρών νέων 3-αρυλο-κουμαρινικών παραγώγων, τα οποία μελετήθηκαν για την αντιοξειδωτική, αντιφλεγμονώδη και κυτταροτοξική τους δράση, εξάγωντας σημαντικά συμπεράσματα σχέσης δομής-δράσης.

Στο *Τρίτο Κεφάλαιο* παρουσιάζεται η σύνθεση δύο νέων Σειρών κουμαρινικών παραγώγων τα οποία αξιολογήθηκαν ως αναστολείς της ακετυλοχολινεστεράσης και της βουτυρυλοχολινεστεράσης, ενζύμων που σχετίζονται με νευροεκφυλιστικές παθήσεις όπως η νόσος του Αλτσχάιμερ, ενώ πραγματοποιήθηκαν και μελέτες μοριακής πρόσδεσης.

Το *Τέταρτο Κεφάλαιο* αφορά τη σύνθεση μίας Σειράς νέων υβριδικών αναλόγων κουμαρινών-χαλκονών, τα οποία μελετήθηκαν για πολλαπλές βιολογικές δράσεις, μεταξύ των οποίων και η φωτοευαισθητοποιητική έναντι καρκινικών δερματικών κυττάρων. Τα υβριδικά μόρια συνδυάζουν δύο ή περισσότερα φαρμακοφόρα τμήματα στη δομή τους, εμφανίζοντας σε πολλές περιπτώσεις βελτιωμένη δράση σε σχέση με τις επιμέρους δομές.

Στο *Πέμπτο Κεφάλαιο* παρουσιάζονται οι 12 αρχές της Πράσινης Χημείας, ενώ πραγματοποιείται η σύνθεση νέων δικουμαρινών και κινολινονικών παραγώγων χρησιμοποιώντας φυσικούς βαθέως ευτηκτικούς διαλύτες. Τα παράγωγα μελετήθηκαν δομικά και μέσω φασματοσκοπίας Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού δύο διαστάσεων (2D NMR).

Στο Έκτο Κεφάλαιο περιγράφεται η σύνθεση νέων 3,6-διυποκατεστημένων κουμαρινικών αναλόγων μέσω αντίδρασης Suzuki-Miyaura παρουσία φυσικών βαθέως ευτηκτικών διαλυτών, καθώς και ο *in situ* σχηματισμός νανοσωματιδίων παλλαδίου.

Στη συνέχεια, μελετήθηκε ο εγκλεισμός επιλεγμένων κουμαρινικών αναλόγων σε λιπιδικά νανοσυστήματα νεότερης γενιάς, με στόχο την τροποποίηση φυσικοχημικών ιδιοτήτων τους, όπως η υδατοδιαλυτότητα, την τροποποιημένη αποδέσμευσή τους από τους νανοφορείς, καθώς και την πιθανή βελτίωση της βιοδραστικότητάς τους.

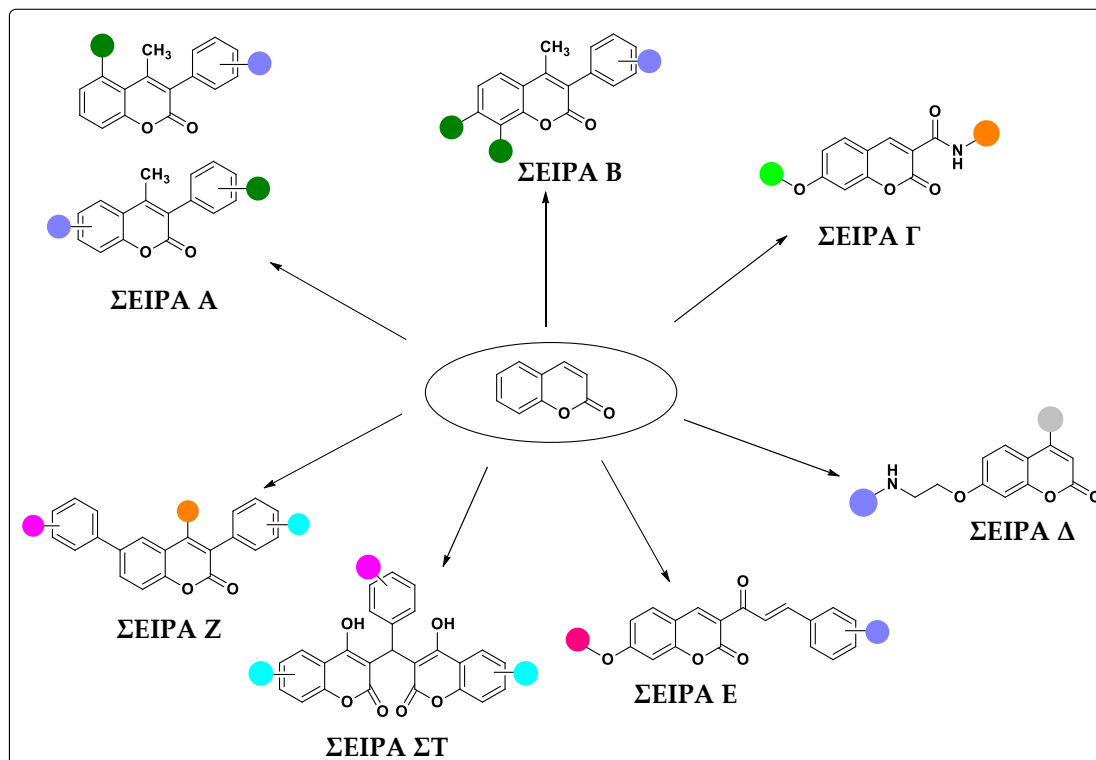
Πιο συγκεκριμένα, στο Έβδομο Κεφάλαιο μελετάται ο εγκλεισμός της φυσικής κουμαρίνης δαφνετίνη, καθώς και ενός συνθετικού αναλόγου της σε νανοσωματίδια στερεών λιπιδίων (SLNs). Πραγματοποιήθηκε πλήρης χαρακτηρισμός των SLNs και μελέτη της αντιοξειδωτικής και φωτοευαισθητοποιητικής τους δράσης.

Στο Όγδοο Κεφάλαιο παρουσιάζεται ο εγκλεισμός της 7,8-διυροξυ-4-φαινυλοκουμαρίνης σε τρία διαφορετικά λιπιδικά νανοσυστήματα νεότερης γενιάς, τα οποία χαρακτηρίστηκαν κατάλληλα και μελετήθηκαν ως προς την αντιοξειδωτική τους δράση.

Τέλος, στο Ένατο Κεφάλαιο παρατίθενται τα κυριότερα συμπεράσματα της παρούσας διδακτορικής διατριβής, καθώς και πιθανές μελλοντικές προτάσεις για συμπληρωματική ή / και νεότερη έρευνα.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Αντικείμενο της παρούσας διδακτορικής διατριβής αποτέλεσε αρχικά ο **σχεδιασμός και η σύνθεση νέων κουμαρινικών αναλόγων** με αξιολογη βιολογική δράση. Για το σκοπό αυτό, συντέθηκαν επτά Σειρές δομικά τροποποιημένων κουμαρινικών παραγώγων (Σειρά Α-Σειρά Ζ), οδηγώντας συνολικά στη σύνθεση περίπου 100 μορίων, τα περισσότερα από τα οποία παρουσιάζονται για πρώτη φορά στη βιβλιογραφία (Σχήμα 1). Ο δομικός χαρακτηρισμός των νέων παραγώγων πραγματοποιήθηκε μέσω φασματοσκοπίας Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού Πρωτονίου (^1H NMR) και Άνθρακα (^{13}C NMR), καθώς και Φασματομετρίας Μάζας Υψηλής Ανάλυσης (HR-MS).

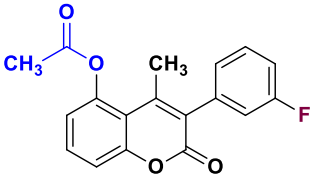
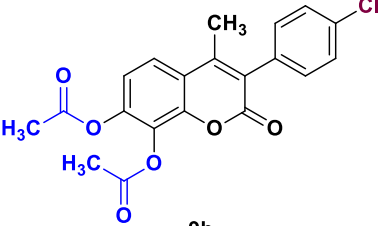


Σχήμα 1. Σχεδιασμός των νέων Σειρών κουμαρινικών αναλόγων.

Σειρές Α και Β: Η σύνθεση των νέων 3-αρυλο-κουμαρινικών παραγώγων των Σειρών Α και Β πραγματοποιήθηκε σε δύο στάδια: αρχικά μέσω μιας τροποποιημένης αντίδρασης Perkin-Oglialoro συντέθηκαν τα ακετυλοξυ ανάλογα (**3a-3o** & **9a-9j**), ενώ στη συνέχεια μέσω αντίδρασης απομάκρυνσης της ακετυλο ομάδας προέκυψαν τα αντίστοιχα υδροξυ κουμαρινικά ανάλογα (**4a-4k** & **10a-10j**). Τα νέα 3-αρυλο-κουμαρινικά παράγωγα αξιολογήθηκαν ως προς την αντιοξειδωτική τους δράση μέσω των δοκιμών δέσμευσης των ελευθέρων ριζών DPPH, ABTS⁺, ·OH και αναστολής της λιπιδικής υπεροξειδωσης, υποκινούμενη από τον εκκινητή ελευθέρων ριζών, AAPH. Ακόμη, μελετήθηκε η ικανότητά τους να αναστέλλουν τη δράση της λιποξυγονάσης (LOX) από σόγια ως ένδειξη αντιφλεγμονώδους δράσης, καθώς και η κυτταροτοξική τους δράση έναντι διαφορετικών καρκινικών σειρών. Η 3-(4-ακετυλοξυφαινυλο)-6,8-διβρωμο-4-μεθυλο-κουμαρίνη (**3k**) και η 4-μεθυλο-5-υδροξυ-3-(3-φθοροφαινυλο)-κουμαρίνη

(4e) που παρουσίασαν την ισχυρότερη ανασταλτική δράση έναντι της LOX (IC₅₀ 8.7 και 4.1 μM, αντίστοιχα), εξετάστηκαν μέσω *in silico* δοκιμών μοριακής πρόσδεσης στη LOX από σόγια, οι οποίες υπέδειξαν αλλοστερική δέσμευση. Επιλεγμένα παράγωγα της Σειράς Β αξιολογήθηκαν επιπλέον ως προς την ικανότητα αλληλεπίδρασης τους με το DNA θύμου αδένος (ctDNA), ενώ για τα παράγωγα της Σειράς Α πραγματοποιήθηκε εκτίμηση βασικών φαρμακοκινητικών ιδιοτήτων (απορρόφηση από το στόμα και σύνδεση με τις πρωτεΐνες του πλάσματος) μέσω βιομιμητικής χρωματογραφίας. Τα παράγωγα **3e** και **9b** τα οποία παρουσίασαν συνδυασμένη βιολογική δράση παρουσιάζονται στον Πίνακα 1.

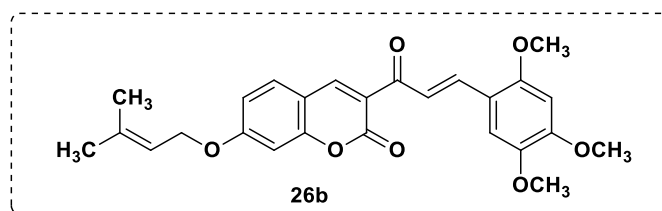
Πίνακας 1. Βιολογική δράση κουμαρινικών αναλόγων **3e** και **9b**.

Δομή:		
Αναστολή της LOX (IC ₅₀):	11.4 μM	100 μM
Αντιοξειδωτική δράση:	Δέσμευση ·OH (100 μM): 85.2%	Αναστολή της λιπιδικής υπεροξειδωσης (100 μM): 95.3%
Κυτταροτοξικότητα έναντι των σειρών:	A375 (100 μM): 60.7%	A431 (100 μM): 45.9%
Σταθερά σύνδεσης με το ctDNA:	-	K _b = 10.2 10 ³ M ⁻¹

Σειρές Γ και Δ: Πραγματοποιήθηκε η σύνθεση πέντε νέων κουμαρινικών καρβοξαμιδίων (**17a-17e**, Σειρά Γ) και τριών νέα αμινοαιθοξυ-κουμαρινικών παραγώγων (**22a-22c**, Σειρά Δ), τα οποία στη συνέχεια αξιολογήθηκαν ως προς την ικανότητά τους να αναστέλλουν τη δράση των ενζύμων ακετυλοχολινεστεράση (AChE) και βουτυρυλοχολινεστεράση (BuChE) ως ένδειξη νευροπροστατευτικής δράσης. Τα εξεταζόμενα κουμαρινικά ανάλογα παρουσίασαν αξιόλογη δράση έναντι των δύο ενζύμων με τιμές IC₅₀ 34.9-94.2 μM και 10-100 μM, αντίστοιχα. Επιπρόσθετα, πραγματοποιήθηκε μελέτη μοριακής πρόσδεσης των κουμαρινικών αναλόγων που παρουσίασαν την ισχυρότερη δράση, στο ενεργό κέντρο της ακετυλοχολινεστεράσης, η οποία υπέδειξε σημαντικές αλληλεπιδράσεις με κρίσιμα για την πρόσδεση, αμινοξέα του ενζύμου.

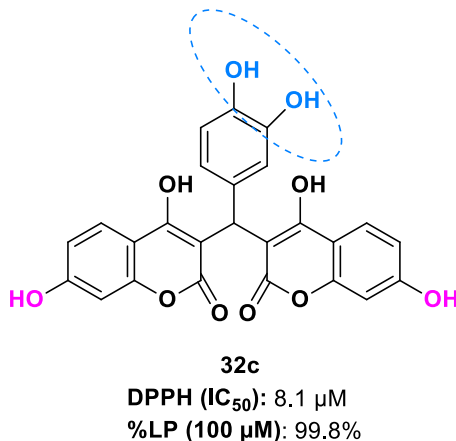
Σειρά Ε: Πραγματοποιήθηκε η σύνθεση τεσσάρων νέων υβριδικών μορίων κουμαρινών-χαλκονών (**26a-26d**), τα οποία αξιολογήθηκαν ως προς την ικανότητα αναστολής της λιπιδικής υπεροξειδωσης (16-94%) και της δράσης της λιποξυγονάσης από σόγια (IC₅₀ 32.5-100 μM), καθώς και την κυτταροτοξικότητά τους έναντι της καρκινικής σειράς προστάτη LNCaP (IC₅₀ 59-130 μM). Επιπλέον, μελετήθηκαν οι φωτοφυσικές τους ιδιότητες καθώς και η ικανότητά τους να παράγουν δραστικές μορφές οξυγόνου *in vitro*, αλλά και η φωτοτοξική τους δράση

έναντι της ανθρώπινης σειράς επιδερμικού καρκινώματος A431, με το παράγωγο **26b** να μειώνει, έπειτα από ακτινοβολήση, τη βιωσιμότητα στο 26% (Σχήμα 2).



Σχήμα 2. Χημική δομή αναλόγου **26b**.

Σειρά ΣΤ: Πραγματοποιήθηκε η σύνθεση δέκα νέων δικουμαρινικών αναλόγων (**32a-32j**) και τριών βενζοπυρανοκουμαρινών (**33a-33c**), μέσω αντίδρασης Domino Michael-Knoevenagel, καθώς και δύο νέων κινολινονών (**34a**, **34b**) χρησιμοποιώντας το φυσικό βαθέως ευτηκτικό διαλύτη L-προλίνη/γαλακτικό οξύ = 1:2. Είναι αξιοσημείωτο ότι η σύνθεση των κινολινονικών αναλόγων, μέσω της συγκεκριμένης μεθόδου, αναφέρεται για πρώτη φορά στη βιβλιογραφία. Η ταυτοποίηση της δομής της κινολινονής **34a** και της βενζοπυρανοκουμαρίνης **33b** πραγματοποιήθηκε μέσω φασματοσκοπίας NMR δύο διαστάσεων (2D NMR). Τα νέα παράγωγα αξιολογήθηκαν ως προς την αντιοξειδωτική τους δράση μέσω της δοκιμής δέσμευσης της ελεύθερης ρίζας DPPH και της ικανότητάς τους να αναστέλλουν τη λιπιδική υπεροξειδωση (LP). Τα δικουμαρινικά ανάλογα παρουσίασαν σημαντική αντιοξειδωτική δράση, με ισχυρότερο αντιοξειδωτικό παράγοντα την **32c** (Σχήμα 3).

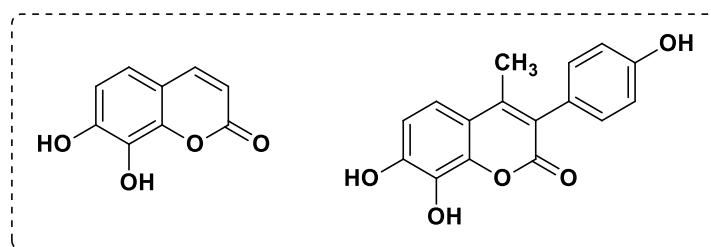


Σχήμα 3. Χημική δομή κουμαρινικού αναλόγου **32c** που παρουσίασε την ισχυρότερη αντιοξειδωτική δράση.

Σειρά Ζ: Η σύνθεση των δέκα νέων 3,6-διυποκατεστημένων κουμαρινικών αναλόγων (**35a-35j**) της Σειράς Ζ πραγματοποιήθηκε μέσω αντίδρασης Suzuki-Miyaura με τη χρήση του φυσικού βαθέως ευτηκτικού διαλύτη χλωριούχος χολίνη/γλυκερόλη = 1:2, ενώ σημαντική παρατήρηση αποτέλεσε το γεγονός ότι κατά τη διάρκεια της αντίδρασης φαίνεται να σχηματίζονται νανοσωματίδια παλλαδίου τα οποία συμβάλλουν στην αντίδραση. Τα νέα κουμαρινικά ανάλογα εξετάστηκαν ως προς την κυτταροτοξικότητά τους έναντι της καρκινικής σειράς

A431, με την πλειοψηφία των νέων κουμαρινικών αναλόγων να παρουσιάζει αξιόλογη δράση (40-60% κυτταροτοξικότητα στη συγκέντρωση των 100 μM).

Τελικό σκοπό της διατριβής αποτέλεσε η **μελέτη εγκλεισμού** επιλεγμένων κουμαρινικών αναλόγων σε **λιπιδικά νανοσυστήματα νεότερης γενιάς**. Σε αυτό το πλαίσιο, πραγματοποιήθηκε η ανάπτυξη της διεργασίας εγκλεισμού του φυσικού προϊόντος, δαφνετίνη (7,8-διυδροξυ-κουμαρίνη), και του συνθετικού αναλόγου της, 7,8-διυδροξυ-3-(4-υδροξυφαινυλο)-4-μεθυλο-κουμαρίνη (Σχήμα 4), σε νανοσωματίδια στερεών λιπιδίων (SLNs). Τα νανοσωματίδια στερεών λιπιδίων που παρασκευάστηκαν, χαρακτηρίστηκαν κατάλληλα, ενώ μελετήθηκαν ως προς το προφίλ απελευθέρωσής τους σε διαφορετικές συνθήκες. Ακολούθησε η μελέτη της αντιοξειδωτικής τους δράσης, με τα νανοσυστήματα των κουμαρινικών αναλόγων να παρουσιάζουν **βελτιωμένη δράση** σε σχέση με τις καθαρές ενώσεις. Οι μελέτες χωρικού εντοπισμού σε κύτταρα A431 υπέδειξαν βελτιωμένη κυτταρική διαπερατότητα στην περίπτωση των SLNs σε σχέση με τις καθαρές ενώσεις. Ακόμη, μελετήθηκε η ικανότητά τους να δράουν ως φωτοευαίσθητοποιητές έναντι της καρκινικής σειράς επιδερμικών κυττάρων A431, με την 7,8-διυδροξυ-3-(4-υδροξυφαινυλο)-4-μεθυλο-κουμαρίνη να επιδεικνύει αξιόλογη φωτοτοξική δράση τόσο σε ελεύθερη όσο και σε εγκλεισμένη μορφή (11% βιωσιμότητα έπειτα από ακτινοβολήση με 12 mW/cm^2 για 3 min).



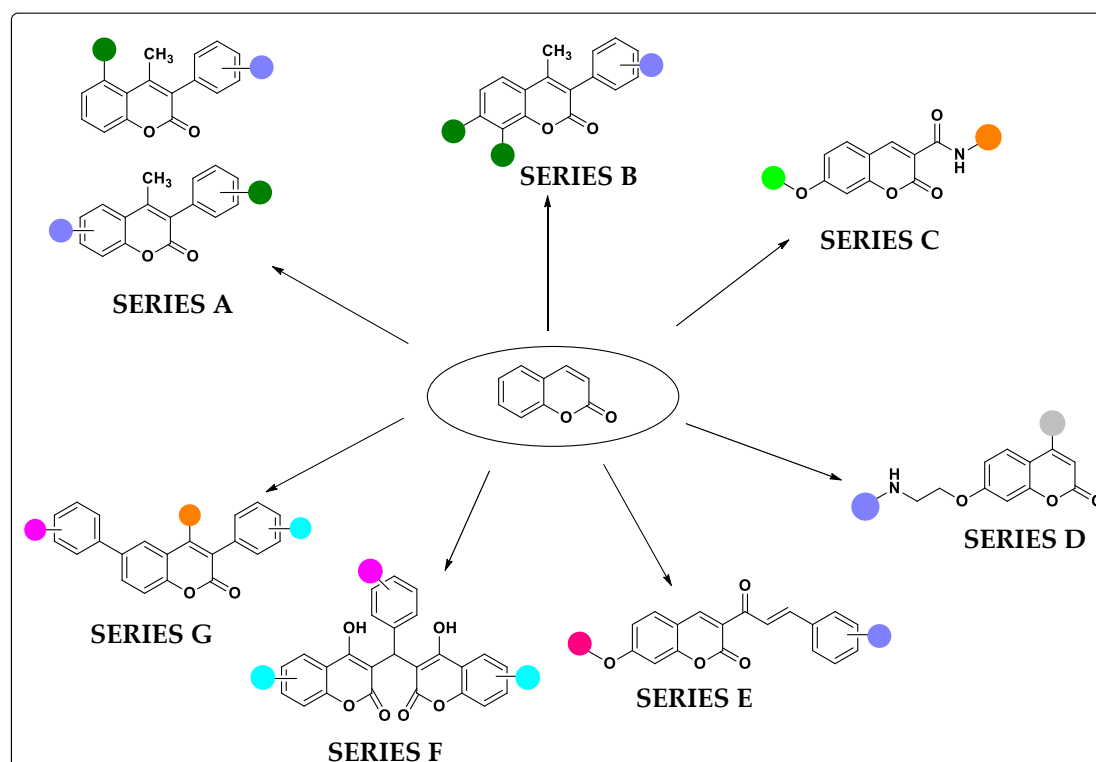
Σχήμα 4. Χημική δομή δαφνετίνης (αριστερά) και 7,8-διυδροξυ-3-(4-υδροξυφαινυλο)-4-μεθυλο-κουμαρίνης (δεξιά).

Τέλος, πραγματοποιήθηκε ο **εγκλεισμός** της 7,8-διυδροξυ-4-φαινυλο-κουμαρίνης σε τρεις διαφορετικούς λιπιδικούς φορείς: νανοσωματίδια στερεών λιπιδίων (SLNs), νανοδομημένους λιπιδικούς φορείς (NLCs) και νιοσώματα. Ακολούθησε χαρακτηρισμός των λιπιδικών νανοσυστημάτων μέσω φασματοσκοπίας FT-IR και θερμοσταθμικής ανάλυσης (TGA), καθώς και μελέτη αποδέσμευσης της κουμαρίνης από τα διαφορετικά νανοσυστήματα, ενώ πραγματοποιήθηκε και μελέτη της αντιοξειδωτικής τους δράσης μέσω της ικανότητάς τους να δεσμεύουν την ελεύθερη ρίζα DPPH. Τα NLCs φαίνεται να διατήρησαν καλύτερα την αντιοξειδωτική δράση του κουμαρινικού αναλόγου, ενώ παρουσίασαν και την υψηλότερη απόδοση εγκλεισμού (84%).

Λέξεις κλειδιά: Φαρμακευτική Χημεία, Κουμαρίνες, Υβριδικά μόρια, Φυσικά Προϊόντα, Πράσινη Χημεία, Αντιοξειδωτική δράση, Λιποξυγονάσες, Κυτταροτοξικότητα, Ακετυλοχολινεστεράση, Φωτοδυναμική Θεραπεία, Νανοτεχνολογία, Λιπιδικά νανοσυστήματα

ABSTRACT

The aim of the present doctoral research is the **design and synthesis of novel coumarin analogues** with significant biological activity. Seven series of structurally modified coumarin derivatives (Series A-Series G) were synthesized, containing 100 molecules, the majority of which is presented in the literature for the first time (Scheme 1). The novel analogues were characterized using Nuclear Magnetic Resonance spectroscopy (^1H and ^{13}C NMR) as well as High Resolution Mass Spectrometry (HR-MS).

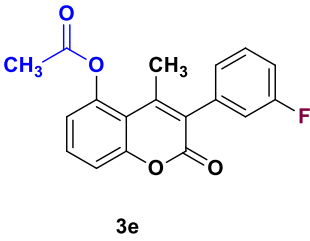
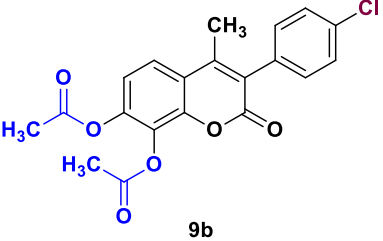


Scheme 1. Design of the novel Series of coumarin analogues.

Series A and B: The synthesis of the novel 3-aryl-coumarin derivatives of Series A and B was accomplished in two stages: the acetyloxy coumarin analogues were synthesized first using a modified Perkin-Oglialoro reaction (**3a-3o** & **9a-9j**), while the removal of the acetyl group led to the synthesis of the corresponding hydroxy coumarin analogues (**4a-4k** & **10a-10j**). The novel 3-aryl-coumarin analogues were examined for their antioxidant activity using the DPPH, ABTS⁺ and $\cdot\text{OH}$ radical scavenging assays, as well as by testing their ability to inhibit lipid peroxidation induced by AAPH. Moreover, their soybean lipoxygenase (LOX) inhibitory activity was evaluated as an indication of their anti-inflammatory activity, along with their cytotoxic activity against various cancer cell lines. Molecular docking studies of compounds 3-(4-acetyloxyphenyl)-6,8-dibromo-4-methyl-coumarin (**3k**) and 4-methyl-5-hydroxy-3-(3-fluorophenyl)-coumarin (**4e**) which were the strongest LOX inhibitors (IC_{50} 8.7 and 4.1 μM , respectively) were performed, indicating allosteric interactions with the enzyme. In addition, the calf thymus DNA (ctDNA) binding ability of selected coumarin derivatives of Series B was assessed, while the human oral

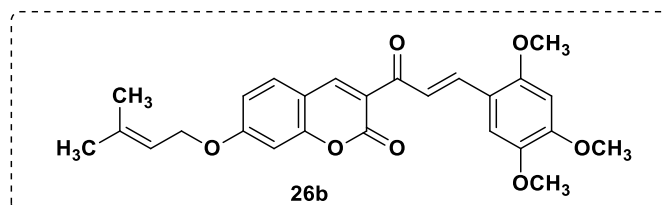
absorption and plasma protein binding properties of compounds of Series A were estimated using biomimetic chromatography. Coumarins **3e** and **9b** presented combined biological activities and the results are presented in Table 1.

Table 1. Biological activities of compounds **3e** and **9b**.

Structure:	 3e	 9b
LOX inhibition (IC ₅₀):	11.4 μM	100 μM
Antioxidant activity:	·OH scavenging (100 μM): 85.2%	Inhibition of lipid peroxidation (100 μM): 95.3%
Cytotoxicity against cancer cell lines:	A375 (100 μM): 60.7%	A431 (100 μM): 45.9%
ctDNA binding constant:	-	K _b = 10.2 10 ³ M ⁻¹

Series C and D: Five novel coumarin carboxamide derivatives (**17a-17e**, Series C) and three novel aminoethoxy-coumarin derivatives (**22a-22c**, Series D) were synthesized and evaluated for their acetylcholinesterase (AChE) and butyrylcholinesterase (BuChE) inhibitory activity as an indication of their neuroprotective ability. The compounds presented IC₅₀ values of 34.9-94.2 μM and 10-100 μM, respectively. Moreover, molecular docking studies of the coumarin derivatives that exhibited significant anti-AChE activity were performed, indicating interactions with key amino acid residues of the enzyme.

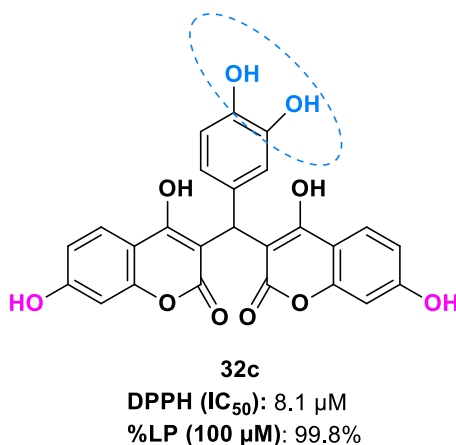
Series E: Four novel coumarin-chalcone hybrids (**26a-26d**) were synthesized and evaluated for their lipid peroxidation (16-94%) and soybean LOX inhibitory ability (IC₅₀ 32.5-100 μM), as well as cytotoxicity against prostate cancer cell line LNCaP (IC₅₀ 59-130 μM). Their photophysical properties were examined, along with their ability to generate reactive oxygen species *in vitro*, while they also exhibited significant phototoxicity against squamous carcinoma A431 cell line, with compound **26b** reducing the cell viability to 26% (Scheme 2).



Scheme 2. Chemical structure of compound **26b**.

Series F: This series of compounds is composed of ten novel biscoumarins (**32a-32j**), three fused benzopyranocoumarins (**33a-33c**) and two novel quinolinones (**34a, 34b**),

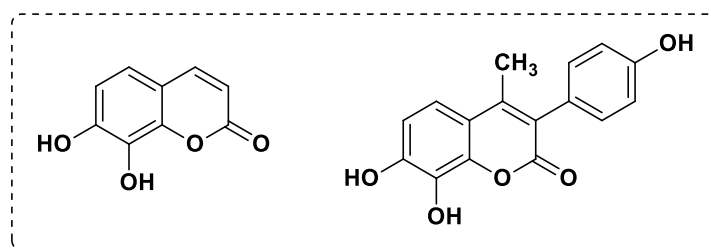
synthesized using the natural deep eutectic solvent L-proline/lactic acid = 1:2. It is noteworthy that the synthesis of the quinolinone analogues using this method is reported for the first time. Two-dimensional Nuclear Magnetic Resonance spectroscopy (2D NMR) was used for the complete characterization and structure identification of fused benzopyranocoumarin **33b** and quinolinone **34a**. Moreover, the antioxidant activity of the compounds was examined using the DPPH radical scavenging and lipid peroxidation (LP) inhibition assays. All the biscoumarin analogues presented significant antioxidant activity, while compound **32c** is the most potent antioxidant agent (Scheme 3).



Scheme 3. Chemical structure of compound **32c** which presented the strongest antioxidant activity.

Series G: The Suzuki-Miyaura coupling was used for the synthesis of ten novel 3,6-disubstituted coumarin analogues of Series G (**35a-35j**) using the natural deep eutectic solvent choline chloride/glycerol = 1:2, while it was observed that palladium nanoparticles were formed during the reaction, which play an important role for its success. The novel coumarin derivatives were examined for their cytotoxic activity against A431 cell line, while the majority of the compounds presented significant cytotoxicity (40-60% at the concentration of 100 μM).

Moreover, the **encapsulation** of selected coumarin analogues in **next generation lipid nanosystems** was achieved. In this context, the natural coumarin daphnetin (7,8-dihydroxy-coumarin) and its synthetic analogue, 7,8-dihydroxy-3-(4-hydroxyphenyl)-4-methyl-coumarin (Scheme 4), were encapsulated in Solid Lipid Nanoparticles (SLNs). The SLNs were characterized using several methods, while their release profile was examined under different conditions. The antioxidant activity of the coumarin analogues and their SLNs was also assessed and it was observed that the SLNs of the coumarins exhibited higher antioxidant activity than the free compounds. Intracellular localization studies indicated the enhanced cellular uptake of the coumarin analogues when loaded in the SLNs. In addition, the photosensitizing properties of the coumarins and their SLNs were studied, indicating that 7,8-dihydroxy-3-(4-hydroxyphenyl)-4-methyl-coumarin is a very promising photosensitizer both in free and encapsulated form, reducing the cell viability to 11% (after irradiation with 12 mW/cm² for 3 min).



Scheme 4. Chemical structure of daphnetin (left) and 7,8-dihydroxy-3-(4-hydroxyphenyl)-4-methyl-coumarin (right).

Finally, 7,8-dihydroxy-4-phenyl-4-methyl-coumarin was encapsulated in three different latest generation lipid nanosystems: Solid Lipid Nanoparticles (SLNs), Nanostructured Lipid Carriers (NLCs) and niosomes. The lipid nanosystems were characterized using FT-IR spectroscopy and thermogravimetric analysis (TGA), while their release profile and their DPPH radical scavenging activity were also assessed. The NLCs formulation presented the highest encapsulation efficiency (84%), while it also better preserved the antioxidant activity of the compound.

Keywords: Pharmaceutical Chemistry, Coumarins, Hybrid molecules, Natural products, Green Chemistry, Antioxidant activity, Lipoxygenases, Cytotoxicity, Acetylcholinesterase, Photodynamic Therapy, Nanotechnology, Lipid nanosystems

ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ

AAPH	2,2'-Azobis(2-amidinopropane) dihydrochloride	διϋδροχλωρικό άλας του 2,2'-αζοδιςσ-(2-αμιδινοπροπανίου)
ABTS	2,2'-Azinobis-(3-Ethylbenzthiazolin-6-Sulfonic Acid)	2,2-αζινο-δις(3-αιθυλβενζοθειαζολινο-6-σουλφονικό οξύ
AChE	Acetylcholinesterase	Ακετυλοχολινεστεράση
ALA	Alanine	Αλανίνη
ARG	Arginine	Αργινίνη
ATCI	Acetylthiocholine Iodide	Ιωδιούχος Ακετυλοθειοχολίνη
BF₃.Et₂O	Boron trifluoride diethyl etherate complex	Σύμπλοκο τριφθοριούχο βορίου διαιθυλαθέρα
BTCI	Butyrylthiocholine iodide	Ιωδιούχος Βουτυρυλοθειοχολίνη
BuChE	Butyrylcholinesterase	Βουτυρυλοχολινεστεράση
CDCl₃	Deuterated chloroform	Δευτεριωμένο χλωροφόρμιο
ctDNA	Calf thymus DNA	DNA θύμου αδένα μόσχου
DAPH	Daphnetin	Δαφνετίνη
DCFDA	2',7'-dichlorofluorescein diacetate	Οξική 2',7'-διχλωρο-φλουορεσκεΐνη διοξική
DCM	Dichloromethane	Διχλωρομεθάνιο
DES	Deep Eutectic Solvent	Βαθέως Ευτηκτικός Διαλύτης
DHC	7,8-dihydroxy-3-(4-hydroxyphenyl)-4-methyl-coumarin	7,8-διυδροξυ-4-μεθυλο-3-4-υδροξυφαινυλο)-κουμαρίνη
DLS	Dynamic Light Scattering	Δυναμική Σκέδαση Φωτός
DMSO	Dimethyl sulfoxide	Διμεθυλο σουλφοξειδίο
DMSO-d₆	Deuterated Dimethyl sulfoxide	Δευτεριωμένο Διμεθυλο σουλφοξειδίο
DPPH	1,1-diphenyl-2-picryl-hydrazyl	2,2-διφαινυλ-1-πικρυλυδραζύλιο
DTNB	(5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoic) acid	5,5'-διθειο-2-νιτροβενζοϊκό οξύ
Et₃N	triethylamine	Τριαιθυλαμίνη
Et₂O	Diethyl ether	Διαιθυλαιθέρας

EtOAc	Ethyl acetate	Οξικός αιθυλεστέρας
EtOH	Ethanol	Αιθανόλη
FT-IR	Fourier Transform Infrared Spectroscopy	Φασματοσκοπία Υπερύθρου Μετασχηματισμού Fourier
GLU	Glutamic acid	Γλουταμινικό οξύ
GLY	Glycine	Γλυκίνη
HBA	Hydrogen Bond acceptor	Δέκτης δεσμού υδρογόνου
HBD	Hydrogen Bond Donor	Δότης δεσμού υδρογόνου
HIS	Histidine	Ιστιδίνη
HMBC	Heteronuclear Multiple Bond Correlation	-
HR-MS	High Resolution Mass Spectrometry	Φασματομετρία Μάζας Υψηλής Ανάλυσης
HSQC	Hetero-nuclear Single Quantum Coherence	-
IC₅₀	Half maximal Inhibitory Concentration	Μισή μέγιστη ανασταλτική συγκέντρωση (συγκέντρωση όπου αναστέλλεται το 50% της δράσης)
LOX	Lipoxygenase	Λιποξυγονάση
LYS	Lysine	Λυσίνη
MeOH	Methanol	Μεθανόλη
MIC	Minimum Inhibitory Concentration	Ελάχιστη ανασταλτική συγκέντρωση
MTT	3-[4,5-dimethylthiazole-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide	(3-(4,5-διμεθυλοθιαζολ-2-υλ) - 2,5-διφαινυλτετραζόλιο βρωμίδιο
NaDES	Natural Deep Eutectic Solvent	Φυσικός Βαθέως Ευτηκτικός Διαλύτης
NDGA	Nordihydroguaiaretic acid	Νορδιϋδρογουαιαρετικό οξύ
NLCs	Nanostructured Lipid Carriers	Νανοδομημένοι Λιπιδικοί Φορείς

NMR	Nuclear Magnetic Resonance	Πυρηνικός Μαγνητικός Συντονισμός
NOESY	Nuclear Overhauser enhancement spectroscopy	-
PAS	Peripheral Anionic Site	Περιφερειακό Ανιονικό Κέντρο
PBS	Phosphate Buffer Saline	Φωσφορικό Ρυθμιστικό Διάλυμα Αλάτων
PDI	Polydispersity Index	Δείκτης Πολυδιασποράς
PdNPs	Palladium Nanoparticles	Νανοσωματίδια Παλλαδίου
PDT	Photodynamic Therapy	Φωτοδυναμική Θεραπεία
PHE	Phenylalanine	Φαινυλαλανίνη
PE	Petroleum ether	Πετρελαϊκός αιθέρας
PSA	Polar Surface Area	Εμβαδόν πολικής επιφάνειας
PUFAs	Polyunsaturated Fatty Acids	Πολυακόρεστα λιπαρά οξέα
ROS	Reactive Oxygen Species	Δραστικές Μορφές Οξυγόνου
SER	Serine	Σερίνη
SLNs	Solid Lipid Nanoparticles	Νανοσωματίδια Στερεών Λιπιδίων
TEM	Transmission Electron Microscopy	Ηλεκτρονική Μικροσκοπία Διερχόμενης Δέσμης
TGA	Thermo Gravimetric Analysis	Θερμοβαρυσμετρική Ανάλυση
TLC	Thin Layer Chromatography	Χρωματογραφία Λεπτής Στιβάδας
TOCSY	Total Correlation Spectroscopy	-
TRP	Tryptophan	Τρυπτοφάνη
TYR	Tyrosine	Τυροσίνη
UV-Vis	Ultraviolet-visible spectroscopy	Φασματοσκοπία υπεριώδους - ορατού
VAL	Valine	Βαλίνη
IY	Ionic Liquids	Ιοντικά Υγρά

ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ	xi
ΕΙΣΑΓΩΓΗ	xv
ΠΕΡΙΛΗΨΗ	xvii
ABSTRACT	xxi
1. ΒΑΣΙΚΟ ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΥΠΟΒΑΘΡΟ	1
1.1 Ετεροκυκλική Χημεία	2
1.2 Κουμαρίνες	3
1.3 Χημική δομή και ταξινόμηση κουμαρινών.....	4
1.4 Φαρμακευτικές δράσεις των κουμαρινών	6
1.4.1 Αντιμικροβιακή δράση.....	6
1.4.2 Αντιμυκητιασική δράση.....	9
1.4.3 Αντιοξειδωτική δράση.....	10
1.4.5 Αντικαρκινική δράση	14
1.4.6 Νευροπροστατευτική δράση.....	16
1.4.7 Αντική δράση	17
1.5 Σύνθεση των κουμαρινικών αναλόγων	19
1.6 ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	26
2. ΣΧΕΔΙΑΣΜΟΣ ΚΑΙ ΣΥΝΘΕΣΗ ΝΕΩΝ 3-ΑΡΥΛΟ-ΚΟΥΜΑΡΙΝΙΚΩΝ ΑΝΑΛΟΓΩΝ ΚΑΙ ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΤΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΚΗΣ ΤΟΥΣ ΔΡΑΣΗΣ	33
2.1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ	34
2.1.1 Οξειδωτικό στρες.....	34
2.1.2 Μέθοδοι αξιολόγησης της αντιοξειδωτικής δράσης	34
2.1.3 Φλεγμονή και Οξειδωτικό Στρες	39
2.1.4 Λιποξυγονάσεις.....	39
2.1.5 Φλεγμονή και Καρκίνος.....	41
2.1.6 Το DNA ως φαρμακολογικός στόχος	43
2.2 ΣΚΟΠΟΣ	45
2.3 ΣΧΕΔΙΑΣΜΟΣ ΚΑΙ ΣΥΝΘΕΣΗ ΤΩΝ ΝΕΩΝ ΚΟΥΜΑΡΙΝΙΚΩΝ ΑΝΑΛΟΓΩΝ	46
2.4 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ-ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	50
2.4.1 Σύνθεση των νέων κουμαρινικών αναλόγων των σειρών A και B.....	50

2.4.2 Φασματοσκοπική μελέτη των νέων κουμαρινικών αναλόγων	52
2.4.3 Αξιολόγηση της βιολογικής δράσης των κουμαρινικών αναλόγων της Σειράς Α	56
2.4.4 Αξιολόγηση βιολογικής δράσης των νέων κουμαρινών της Σειράς Β ...	73
2.4.5. Πρόβλεψη φαρμακολογικών ιδιοτήτων των νέων κουμαρινών της Σειράς Β	84
2.5 ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	89
2.5.1 Σύνθεση των ακετυλοξυ- και υδροξυ- 3-αρυλο-κουμαρινικών αναλόγων	89
2.5.2 Αξιολόγηση της βιοδραστικότητας <i>in vitro</i> για τα κουμαρινικά ανάλογα της Σειράς Α	108
2.5.3 Αξιολόγηση της βιοδραστικότητας <i>in vitro</i> για τα κουμαρινικά ανάλογα της Σειράς Β.....	112
2.6 ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	115
2.7 ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	118
3. ΣΧΕΔΙΑΣΜΟΣ ΚΑΙ ΣΥΝΘΕΣΗ ΝΕΩΝ ΚΟΥΜΑΡΙΝΙΚΩΝ ΑΝΑΛΟΓΩΝ ΩΣ ΑΝΑΣΤΟΛΕΙΣ ΤΗΣ ΑΚΕΤΥΛΟΧΟΛΙΝΕΣΤΕΡΑΣΗΣ.....	128
3.1 ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΥΠΟΒΑΘΡΟ	129
3.1.1 Νόσος του Αλτσχάιμερ	129
3.1.2 Χολινεργική υπόθεση.....	129
3.1.3 Ακετυλοχολινεστεράση.....	130
3.1.4 Βουτυρυλοχολινεστεράση.....	132
3.1.5 Κουμαρίνες ως αναστολείς της ακετυλοχολινεστεράσης και της βουτυρυλοχολινεστεράσης.....	133
3.1.6 Μέθοδος του Ellman.....	135
3.2 ΣΚΟΠΟΣ.....	136
3.3 ΣΧΕΔΙΑΣΜΟΣ ΚΑΙ ΣΥΝΘΕΣΗ ΤΩΝ ΝΕΩΝ ΚΟΥΜΑΡΙΝΙΚΩΝ ΑΝΑΛΟΓΩΝ	138
3.4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ-ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	141
3.4.1 Σύνθεση των νέων κουμαρινικών αναλόγων	141
3.4.2 Φασματοσκοπική μελέτη των νέων κουμαρινικών αναλόγων	141
3.4.3 Αξιολόγηση της ικανότητας των νέων κουμαρινικών αναλόγων να αναστέλλουν τη δράση των ενζύμων ακετυλοχολινεστεράση (AChE) και βουτυρυλοχολινεστεράση (BuChE).....	146

3.4.4 Πρόβλεψη φυσικοχημικών ιδιοτήτων.....	152
3.4.5 Μελέτη μοριακής πρόσδεσης των κουμαρινικών αναλόγων στο ένζυμο hAChE.....	158
3.5 ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	167
3.5.1 Σύνθεση των νέων κουμαρινικών αναλόγων της Σειράς Γ.....	167
3.5.2 Σύνθεση των νέων κουμαρινικών αναλόγων της Σειράς Δ.....	170
3.5.3 Δοκιμή αναστολής της δράσης του ενζύμου ακετυλοχολινεστεράση .	173
3.5.4 Δοκιμή αναστολής της δράσης του ενζύμου βουτυρυλοχολινεστεράση	174
3.5.5 Υπολογιστική μελέτη μοριακής πρόσδεσης.....	174
3.6 ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	176
3.7 ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	178
4. ΣΧΕΔΙΑΣΜΟΣ ΚΑΙ ΣΥΝΘΕΣΗ ΝΕΩΝ ΥΒΡΙΔΙΚΩΝ ΜΟΡΙΩΝ ΚΟΥΜΑΡΙΝΩΝ-ΧΑΛΚΟΝΩΝ ΚΑΙ ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΤΗΣ ΒΙΟΔΡΑΣΤΙΚΟΤΗΤΑΣ ΤΟΥΣ.....	186
4.1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ	187
4.1.1 Υβριδικά μόρια.....	187
4.1.2 Υβριδικά μόρια κουμαρινών-χαλκονών	188
4.1.3 Φωτοδυναμική Θεραπεία (Photodynamic Therapy, PDT).....	190
4.1.4 Κουμαρίνες και χαλκόνες στη Φωτοδυναμική Θεραπεία.....	192
4.2 ΣΚΟΠΟΣ	194
4.3 ΣΧΕΔΙΑΣΜΟΣ ΚΑΙ ΣΥΝΘΕΣΗ ΤΩΝ ΝΕΩΝ ΚΟΥΜΑΡΙΝΙΚΩΝ ΑΝΑΛΟΓΩΝ	195
4.4 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	197
4.4.1 Σύνθεση των νέων κουμαρινικών και υβριδικών αναλόγων της Σειράς E	197
4.4.2 Φασματοσκοπική μελέτη	197
4.4.3 Αξιολόγηση της βιολογικής δράσης των νέων αναλόγων της Σειράς E	200
4.4.4 Μελέτη φωτοφυσικών ιδιοτήτων.....	203
4.4.5 Φωτοδυναμική Θεραπεία	209
4.5 ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	212
4.5.1 Σύνθεση των κουμαρινικών αναλόγων	212
4.5.2 Προσδιορισμός της αναστολής της λιπιδικής υπεροξειδωσης (AAPH).....	216

4.5.3 Προσδιορισμός της <i>in vitro</i> ικανότητας αναστολής της φυτικής λιποξυγονάσης (LOX)	216
4.5.4 Φωτοφυσικές ιδιότητες	216
4.5.5 Παραγωγή δραστικών μορφών οξυγόνου (ROS)	217
4.5.6 Μελέτη κυτταροτοξικότητας και φωτοτοξικότητας	218
4.6 ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	220
4.7 ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	222
5. ΣΧΕΔΙΑΣΜΟΣ ΚΑΙ ΣΥΝΘΕΣΗ ΝΕΩΝ ΔΙΚΟΥΜΑΡΙΝΙΚΩΝ ΑΝΑΛΟΓΩΝ ΜΕ ΧΡΗΣΗ ΒΑΘΕΩΣ ΕΥΤΗΚΤΙΚΩΝ ΔΙΑΛΥΤΩΝ	229
5.1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ	230
5.1.1 Πράσινες προσεγγίσεις στην οργανική σύνθεση	230
5.1.2 Ιοντικά υγρά (ΙΥ)	231
5.1.3 Βαθέως Ευτηκτικοί Διαλύτες (DES)	232
5.1.4 Φαρμακευτικό προφίλ δικουμαρινών	235
5.2 ΣΚΟΠΟΣ	237
5.3 ΣΧΕΔΙΑΣΜΟΣ ΤΩΝ ΝΕΩΝ ΚΟΥΜΑΡΙΝΙΚΩΝ ΑΝΑΛΟΓΩΝ	238
5.4 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ-ΣΥΖΗΤΗΣΗ	242
5.4.1 Σύνθεση των νέων δικουμαρινικών αναλόγων	242
5.4.2 Φασματοσκοπική μελέτη των νέων δικουμαρινικών και κινολινονικών αναλόγων	242
5.4.3 Ανάκτηση και επαναχρησιμοποίηση του NaDES	258
5.4.4 Αξιολόγηση της αντιοξειδωτικής δράσης των νέων αναλόγων της Σειράς ΣΤ	259
5.5 ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	269
5.5.1 Παρασκευή του φυσικού βαθέως ευτηκτικού διαλύτη (NaDES)	269
5.5.2 Σύνθεση των νέων αναλόγων της Σειράς ΣΤ	269
5.5.3 Φασματοσκοπία NMR δύο διαστάσεων (2D NMR)	276
5.5.4 Ανακύκλωση και επαναχρησιμοποίηση του NaDES	277
5.5.5 Δοκιμή δέσμησης της ελεύθερης ρίζας DPPH	277
5.5.6 Δοκιμή αναστολής της οξείδωσης του λινολεϊκού οξέους μέσω του εκκινητή ελευθέρων ριζών AAPH	277
5.6 ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	279

5.7 ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	281
6. ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΝΕΑΣ ΠΡΑΣΙΝΗΣ ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑΣ ΓΙΑ ΤΗ ΣΥΝΘΕΣΗ ΚΟΥΜΑΡΙΝΙΚΩΝ ΑΝΑΛΟΓΩΝ ΜΕΣΩ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗΣ SUZUKI-MIYAURA..	287
6.1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ	288
6.1.1 Αντιδράσεις σχηματισμού δεσμού άνθρακα άνθρακα.....	288
6.1.2 Αντίδραση Suzuki-Miyaura	288
6.1.3 Πράσινες προσεγγίσεις στην αντίδραση Suzuki-Miyaura	289
6.1.4 Αντίδραση Suzuki-Miyaura για τη σύνθεση κουμαρινών	291
6.2 ΣΚΟΠΟΣ	292
6.3 ΣΧΕΔΙΑΣΜΟΣ ΚΑΙ ΣΥΝΘΕΣΗ ΤΩΝ ΝΕΩΝ ΚΟΥΜΑΡΙΝΙΚΩΝ ΑΝΑΛΟΓΩΝ	293
6.4 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ-ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	295
6.4.1 Σύνθεση των νέων κουμαρινικών αναλόγων	295
6.4.2 Δυναμική Σκέδαση Φωτός νανοσωματιδίων παλλαδίου	297
6.4.3 Ηλεκτρονική Μικροσκοπία Διερχόμενης Δέσμης (TEM)	300
6.4.4 Μελέτη αντίδρασης απακετυλίωσης	300
6.4.5 Φασματοσκοπική μελέτη των νέων κουμαρινικών αναλόγων	301
6.4.6 Αξιολόγηση της κυτταροτοξικότητας των νέων αναλόγων της Σειράς Z	306
6.5 ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	309
6.5.1 Παρασκευή των NaDES	309
6.5.2 Σύνθεση των νέων κουμαρινικών αναλόγων της Σειράς Z	309
6.5.3 Φασματοσκοπία NMR δύο διαστάσεων (2D NMR)	314
6.5.4 Υδροδυναμική διάμετρος, δείκτης πολυδιασποράς (PDI) και ζ-δυναμικό.....	314
6.5.5 Ηλεκτρονική Μικροσκοπία Διερχόμενης Δέσμης (TEM)	314
6.5.6 Δοκιμή κυτταροτοξικότητας στην καρκινική σειρά A431	315
6.6 ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	316
6.7 ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	317
7. ΕΓΚΛΕΙΣΜΟΣ ΤΗΣ ΦΥΣΙΚΗΣ ΚΟΥΜΑΡΙΝΗΣ ΔΑΦΝΕΤΙΝΗ ΚΑΙ ΤΟΥ ΣΥΝΘΕΤΙΚΟΥ ΑΝΑΛΟΓΟΥ ΤΗΣ ΣΕ ΝΑΝΟΣΩΜΑΤΙΔΙΑ ΣΤΕΡΩΝ ΛΙΠΙΔΙΩΝ ΚΑΙ ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΤΗΣ ΒΙΟΔΡΑΣΤΙΚΟΤΗΤΑΣ ΤΟΥΣ.....	323
7.1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ	324

7.1.1	Νανοτεχνολογία	324
7.1.2	Λιπιδικά νανοσυστήματα.....	324
7.1.3	Εφαρμογή της νανοτεχνολογίας στη φωτοδυναμική θεραπεία	329
7.1.4	Αποδέσμευση βιοδραστικών ουσιών	330
7.1.5	Κινητική μοντελοποίηση αποδέσμευσης.....	330
7.2	ΣΚΟΠΟΣ	334
7.3	ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	336
7.3.1	Σύνθεση και φασματοσκοπική μελέτη των κουμαρινικών αναλόγων	336
7.3.2	Μέση υδροδυναμική διάμετρος, δείκτης πολυδιασποράς (PDI), ζ-δυναμικό, Απόδοση Διεργασίας και Απόδοση Εγκλεισμού.....	339
7.3.3	Φασματοσκοπία FT-IR.....	344
7.3.4	Θερμοσταθμική Ανάλυση (TGA).....	346
7.3.5	Ηλεκτρονική Μικροσκοπία Διερχόμενης Δέσμης (TEM)	347
7.3.6	Μελέτη σταθερότητας	347
7.3.7	Μελέτη αποδέσμευσης και κινητική μοντελοποίηση	348
7.3.8	Αντιοξειδωτική δράση.....	350
7.3.9	Φωτοφυσικές ιδιότητες	352
7.3.10	Παραγωγή Δραστικών Μορφών Οξυγόνου (ROS).....	353
7.3.11	Μελέτες χωρικού εντοπισμού	355
7.4	ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟΣ ΜΕΡΟΣ.....	360
7.4.1	Σύνθεση των κουμαρινικών αναλόγων	360
7.4.2	Απομόνωση της τριμυριστίνης από μοσχοκάρυδο	361
7.4.3	Παρασκευή των νανοσωματιδίων στερεών λιπιδίων (SLNs)	362
7.4.4	Απόδοση διεργασίας.....	362
7.4.5	Απόδοση εγκλεισμού.....	363
7.4.6	Υδροδυναμική διάμετρος, δείκτης πολυδιασποράς (PDI) και ζ-δυναμικό	363
7.4.7	Μελέτη σταθερότητας υδατικών διασκορών	363
7.4.8	Υπέρυθρη Φασματομετρία (FT-IR).....	364
7.4.9	Θερμοσταθμική ανάλυση (TGA)	364
7.4.10	Ηλεκτρονική Μικροσκοπία Διερχόμενης Δέσμης (TEM)	364

7.4.11 Μελέτη αποδέσμευσης των κουμαρινικών αναλόγων από τα SLNs και κινητική μοντελοποίηση.....	365
7.4.12 Μελέτη αντιοξειδωτικής δράσης	365
7.4.13 Μέτρηση οπτικών ιδιοτήτων.....	366
7.4.14 Παραγωγή ελευθέρων ριζών.....	366
7.4.15 Δοκιμασία κυτταρικής βιωσιμότητας – ΜΤΤ	367
7.4.16 Μελέτες χωρικού εντοπισμού	368
7.5 ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	369
7.6 ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	371
8. ΕΓΚΛΕΙΣΜΟΣ ΤΗΣ 7,8-ΔΙΥΔΡΟΞΥ-4-ΜΕΘΥΛΟ-ΚΟΥΜΑΡΙΝΗΣ ΣΕ ΛΙΠΙΔΙΚΑ ΝΑΝΟΣΥΣΤΗΜΑ ΝΕΟΤΕΡΗΣ ΓΕΝΙΑΣ ΚΑΙ ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΗΣ ΤΟΥΣ ΔΡΑΣΗΣ	381
8.1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ	382
8.1.1 Νανοδομημένοι λιπιδικοί φορείς λιπιδίων (NLCs).....	382
8.1.2 Νιοσώματα	384
8.2 ΣΚΟΠΟΣ	388
8.3 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ-ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	389
8.3.1 Σύνθεση και φασματοσκοπική μελέτη της 7,8-διυδροξυ-4-φαινυλοκουμαρίνης (40).....	389
8.3.2 Μέση υδροδυναμική διάμετρος, δείκτης πολυδιασποράς (PDI), ζ-δυναμικό, Απόδοση Διεργασίας και Απόδοση Εγκλεισμού.....	390
8.3.3 Φασματοσκοπία FT-IR.....	392
8.3.4 Θερμοσταθμική ανάλυση (TGA)	394
8.3.5 Μελέτη αποδέσμευσης και κινητική μοντελοποίηση	396
8.3.6 Δέσμευση της ελεύθερης ρίζας DPPH.....	401
8.4 ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	402
8.4.1 Σύνθεση της 7,8-διυδροξυ-4-φαινυλο-κουμαρίνης (40).....	402
8.4.2 Παρασκευή των νανοσυστημάτων	402
8.4.3 Απόδοση διεργασίας.....	404
8.4.4 Απόδοση εγκλεισμού.....	404
8.4.5 Μέση υδροδυναμική διάμετρος, δείκτης πολυδιασποράς (PDI) και ζ-δυναμικό.....	405
8.4.6 Μελέτη Υπέρουθρης Φασματομετρίας (FT-IR).....	405

8.4.7 Θερμοσταθμική ανάλυση (TGA).....	405
8.4.8 Μελέτη αποδέσμευσης των κουμαρινικών αναλόγων από τα SLNs και κινητική μοντελοποίηση.....	405
8.4.9 Δέσμευση της ελεύθερης ρίζας DPPH.....	406
8.5 ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	407
8.6 ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	409
9. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΠΡΟΤΑΣΕΙΣ ΓΙΑ ΜΕΛΛΟΝΤΙΚΗ ΕΡΕΥΝΑ	415
9.1 ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	416
9.2 ΜΕΛΛΟΝΤΙΚΕΣ ΠΡΟΤΑΣΕΙΣ	430

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΣΧΗΜΑΤΩΝ

Σχήμα 1.1 Ορισμένες από τις κυριότερες κατηγορίες ετεροκυκλικών φυσικών προϊόντων.....	2
Σχήμα 1.2 <i>Dipteryx odorata</i> (tonka beans) και δομή κουμαρινικού σκελετού.....	3
Σχήμα 1.3 Χημική δομή a : βενζο-α-πυρονών και b : βενζο-γ-πυρονών.....	4
Σχήμα 1.4 Χημική δομή: a : ουμπελιφερόνης, b : εσκουλετίνης και c : δαφνετίνης..	5
Σχήμα 1.5 Χημική δομή a : ψωραλενίου και b : αγγελικίνης.	5
Σχήμα 1.6 Χημική δομή a : ξανθυλετίνης και b : σεσελίνης.	5
Σχήμα 1.7 Χημική δομή βαρφαρίνης.....	6
Σχήμα 1.8 Χημική δομή Novobiocin και Clorobiocin.....	7
Σχήμα 1.9 Χημική δομή a : ostruthin, b : ammorestinol, c : anthogenol, d : grandivittin, e : agasyllin, f : aegelinol benzoate, g : osthole.....	8
Σχήμα 1.10 Γενική δομή υβριδικών μορίων κουμαρινών-1,2,3-τριαζολίων.	9
Σχήμα 1.11 Χημική δομή της σκοπολετίνης.	9
Σχήμα 1.12 Χημική δομή 7-πεντυλοξυ-κουμαρίνης.....	10
Σχήμα 1.13 Γενική δομή υβριδικών μορίων κουμαρινών-οξαδιαζολίων (αριστερά) και χημική δομή των αναλόγων που παρουσίασαν την καλύτερη δράση (δεξιά).	11
Σχήμα 1.14 Γενική δομή νέων κουμαρινικών παραγώγων με αξιόλογη αντιοξειδωτική δράση.....	12
Σχήμα 1.15 Επίδραση υποκατάστασης με μεθυλο-ομάδα στη θέση 4 του κουμαρινικού σκελετού στη δράση έναντι της LOX.....	13
Σχήμα 1.16 Γενική δομή αναλόγων της 4-μεθυλο-ουμπελιφερόνης με αντιφλεγμονώδη δράση.....	13
Σχήμα 1.17 Γενική δομή πυρανοκουμαρινών και υβριδικών μορίων κουμαρινών-σουλφοναμιδίων.....	14
Σχήμα 1.18 Πρενυλοξυ-κουμαρινικά ανάλογα με κυτταροτοξική δράση έναντι των κυττάρων HeLa.....	15
Σχήμα 1.19 Γενική δομή νέων υβριδικών μορίων κουμαρινών-τριαζολίων (αριστερά) και χημική δομή του μορίου που παρουσίασε την ισχυρότερη δράση (δεξιά).	16
Σχήμα 1.20 Χημική δομή κουμαρινικών αναλόγων με αξιόλογη νευροπροστατευτική δράση.....	17
Σχήμα 1.21 Χημική δομή κουμαρινικών αναλόγων φυσικής προέλευσης με αντι-HIV δράση.....	18
Σχήμα 1.22 Χημική δομή αγγελικίνης (αριστερά) και συνθετικού αναλόγου της με αξιόλογη αντικική δράση (δεξιά).....	19
Σχήμα 1.23 Χημική δομή: a : rutamarin και b : kellerin.....	19
Σχήμα 1.24 Προτεινόμενος μηχανισμός συμπίκνωσης Pechmann.....	20
Σχήμα 1.25 Μηχανισμός αντίδρασης Perkin.	22

Σχήμα 1.26 Μηχανισμός αντίδρασης Knoevenagel.....	23
Σχήμα 1.27 Προτεινόμενος μηχανισμός αντίδρασης Wittig.....	24
Σχήμα 1.28 Μηχανισμός αντίδρασης Reformatsky.....	25
Σχήμα 2.1 Χημική δομή της σταθερής ελεύθερης ρίζας DPPH.....	34
Σχήμα 2.2 Αναγωγή της ελεύθερης ρίζας DPPH.....	35
Σχήμα 2.3 Χημική δομή του εκκινητή ελευθέρων ριζών AAPH.....	36
Σχήμα 2.4 Χημική δομή του ABTS.....	38
Σχήμα 2.5 Αναγωγή της ελεύθερης ρίζας ABTS ^{•+}	38
Σχήμα 2.6 Χημική δομή 3-αρυλο-κουμαρινικών αναλόγων με ισχυρή ανασταλτική δράση έναντι της LOX.....	40
Σχήμα 2.7 Χημική δομή 3-αρυλο-κουμαρινικών αναλόγων με συνδυασμένη κυτταροτοξική και ανασταλτική δράση έναντι της LOX.....	42
Σχήμα 2.8 Αναγωγή του άλατος τετραζολίου MTT σε φορμαζάνη.....	42
Σχήμα 2.9 Σχεδιασμός των νέων 3-αρυλο-κουμαρινικών αναλόγων των Σειρών A και B.....	45
Σχήμα 2.10 Συνθετική πορεία ακετυλοξυ-κουμαρινών (3a-3o) και υδροξυ-κουμαρινών (4a-4k) της Σειράς A χρησιμοποιώντας: (i) [(CH ₃ CO) ₂ O], Et ₃ N, 120 °C, 3 h, (ii) NH ₂ NH ₂ ·H ₂ O, MeOH, 42 °C, 1-2 h.....	46
Σχήμα 2.11 Μηχανισμός τροποποιημένης αντίδρασης Perkin-Ogialoro.....	47
Σχήμα 2.12 Σύνθεση 2,3,4-τριυδροξυακετοφαινόνης (7) – Μέθοδος A.....	47
Σχήμα 2.13 Σύνθεση 2,3,4-τριυδροξυακετοφαινόνης (7) – Μέθοδος B.....	48
Σχήμα 2.14 Μηχανισμός σύνθεσης της 2,3,4-τριυδροξυακετοφαινόνης (7).....	48
Σχήμα 2.15 Αναδιάταξη Fries.....	48
Σχήμα 2.16 Συνθετική πορεία ακετυλοξυ-κουμαρινών (9a-9j) και υδροξυ-κουμαρινών (10a-10j) της Σειράς B χρησιμοποιώντας: (i) [(CH ₃ CO) ₂ O], Et ₃ N, 120 °C, 3 h, (ii) NH ₂ NH ₂ ·H ₂ O, MeOH, 42 °C, 1-2 h.....	49
Σχήμα 2.17 Επίδραση της θέσης υποκατάστασης της υδροξυλομάδας στην ικανότητα αναγωγής της ρίζας ABTS ^{•+}	59
Σχήμα 2.18 Χημική δομή των ενώσεων 4i, 4j και 4k, οι οποίες εμφάνισαν 100% ικανότητα δέσμευσης ριζών υδροξυλίου.....	60
Σχήμα 2.19 Χημική δομή των ενώσεων 3m και 4k που αποτελούν τους ικανότερους αναστολείς της λιπιδικής υπεροξειδωσης μεταξύ των μορίων της Σειράς A.....	60
Σχήμα 2.20 Επίδραση της παρουσίας ομάδας φθορίου στη θέση 3' του 3-φαινολικού δακτυλίου στην ικανότητα αναστολής της φυτικής LOX.....	65
Σχήμα 2.21 Χημική δομή των ενώσεων 9b και 9g που επέδειξαν την ισχυρότερη δράση στη δοκιμή αναστολής της λιπιδικής υπεροξειδωσης.....	76
Σχήμα 2.22 Χημική δομή των ενώσεων 9e και 9i που αποτελούν τους ικανότερους αναστολείς της φυτικής LOX μεταξύ των μορίων της Σειράς B.....	77
Σχήμα 2.23 Επίδραση της υποκατάστασης στις θέσεις 3' και 4' του 3-φαινολικού δακτυλίου στην ικανότητα αναστολής της λιποξυγονάσης από σόγια.....	77

Σχήμα 2.24 Χημική δομή και κυτταροτοξική δράση των ενώσεων 9b , 9d και 10c .	81
Σχήμα 2.25 Ικανότεροι αναστολείς της λιποξυγονάσης από τη Σειρά Α.	115
Σχήμα 2.26 Ικανότεροι αναστολείς της λιποξυγονάσης από τη Σειρά Β.	116
Σχήμα 2.27 Χημική δομή κουμαρινικών αναλόγων 9b και 9d , τα οποία παρουσίασαν τις υψηλότερες τιμές σταθεράς σύνδεσης με το ctDNA.	117
Σχήμα 3.1 Υδρόλυση της ακετυλοχολίνης από την AChE.	130
Σχήμα 3.2 Χημική δομή: a : δεκουρσινόλης και b : ενσακουλίνης.	133
Σχήμα 3.3 Γενική δομή υβριδικών μορίων κουμαρινών-θειαζολίων (αριστερά) και χημική δομή του αναλόγου που παρουσίασαν την καλύτερη δράση (δεξιά).	134
Σχήμα 3.4 Γενική δομή από 3-(4-αμινοφαινυλο)-κουμαρινικών παραγώγων (αριστερά) και χημική δομή του πλέον δραστικού αναλόγου (δεξιά).	134
Σχήμα 3.5 Υδρόλυση της ακετυλοθειοχολίνης και παραγωγή του 5-θειο-2-νιτροβενζοϊκού οξέος (TNB).	135
Σχήμα 3.6 Χημική δομή υποστρώματος (ακετυλοχολίνη) και εγκεκριμένων φαρμάκων – αναστολέων της AChE (γαλανταμίνη, δονεπεζίλη, ριβαστιγμίνη).	136
Σχήμα 3.7 Σχεδιασμός των νέων κουμαρινικών αναλόγων των Σειρών Γ και Δ [56,57].	136
Σχήμα 3.8 Συνθετική πορεία 3-μεθοξυ-καρβονυλο-7-υδροξυ-κουμαρίνης και των 7-υποκατεστημένων αναλόγων της.	138
Σχήμα 3.9 Συνθετική πορεία των νέων κουμαρινικών καρβοξαμιδίων 17a-17e	138
Σχήμα 3.10 Συνθετική πορεία 4-υποκατεστημένων-7-υδροξυ-κουμαρινικών παραγώγων και των 7-βρωμοαιθοξυ-κουμαρινικών αναλόγων.	139
Σχήμα 3.11 Συνθετική πορεία των νέων αμινοαιθοξυ-κουμαρινικών παραγώγων.	139
Σχήμα 3.12 Χημική δομή των ενώσεων 17a και 17c που αποτελούν τους καλύτερους αναστολείς της AChE μεταξύ των μορίων της Σειράς Γ.	150
Σχήμα 3.13 Χημική δομή των ενώσεων 17b και 17d , οι οποίες εμφάνισαν χαμηλή ικανότητα αναστολής της δράσης της AChE.	150
Σχήμα 3.14 Χημική δομή του ισχυρότερου αναστολέα της BuChE, μεταξύ των μορίων της Σειράς Γ, 17d	151
Σχήμα 3.15 Χημική δομή ενώσεων 22a , 22b και 22c	151
Σχήμα 3.16 Επίδραση της παρουσίας 4-φαινυλο ομάδας καθώς και αμινομάδας στην ανασταλτική δράση έναντι της BuChE.	152
Σχήμα 3.17 Χημική δομή καλύτερων αναστολέων της BuChE, 17d και 22c	152
Σχήμα 3.18 Χημική δομή των ισχυρότερων αναστολέων των AChE και BuChE.	176
Σχήμα 4.1 Χημική δομή της 1,3-διφαινυλο-2-προπεν-1-όνης.	189
Σχήμα 4.2 Γενική δομή υβριδικών μορίων κουμαρινών-χαλκονών με αντιοξειδωτική και αντιμικροβιακή δράση.	189

Σχήμα 4.3 Γενική δομή υβριδικών μορίων κουμαρινών-χαλκονών (αριστερά) και δομή του παραγώγου που αποτέλεσε καλύτερο αναστολέα της MAO-B (δεξιά).	190
Σχήμα 4.4 Γενική δομή υβριδικών μορίων κουμαρινών-χαλκονών (αριστερά) και δομή των παραγώγων που αποτέλεσαν καλύτερους αναστολείς της α-γλυκοσιδάσης (δεξιά).	190
Σχήμα 4.5 Χημική δομή κουμαρινών με φωτοευαισθητοποιητική δράση.	192
Σχήμα 4.6 Χημική δομή 2-υδροξυ-χαλκόνης.	193
Σχήμα 4.7 Χημική δομή νέων σειρών υβριδικών μορίων κουμαρινών-χαλκονών με ισχυρή φωτοτοξική δράση.	193
Σχήμα 4.8 Γενική δομή υβριδικών μορίων κουμαρινών-χαλκονών (δεξιά) και αναλόγου που παρουσίασε την ισχυρότερη φωτοευαισθητοποιητική δράση (δεξιά).	193
Σχήμα 4.9 Σχεδιασμός υβριδικών μορίων κουμαρινών-χαλκονών Σειράς E [53–55].	194
Σχήμα 4.10 Συνθετική πορεία της 3-ακετυλο-7-υδροξυ-κουμαρίνης (23) και των 7-αλκοξυ (24a & 24b) και βενζυλοξυ (24c) παραγώγων της.	195
Σχήμα 4.11 Συνθετική πορεία νέων υβριδικών μορίων κουμαρινών-χαλκονών (26a-26d).	195
Σχήμα 4.12 Μηχανισμός καταλυόμενης από πιπεριδίνη αλδολικής συμπύκνωσης.	196
Σχήμα 4.13 Μηχανισμός αφυδάτωσης του προϊόντος αλδολικής συμπύκνωσης.	196
Σχήμα 4.14 Επίδραση του αριθμού μεθοξυ-υποκαταστατών στην ικανότητα αναστολής της λιπιδικής υπεροξειδωσης των πρενυλοξυ-υβριδικών μορίων κουμαρινών-χαλκονών.	202
Σχήμα 4.15 Επίδραση του αριθμού μεθοξυ-υποκαταστατών στην κυτταροτοξική δράση των πρενυλοξυ-υβριδικών μορίων κουμαρινών-χαλκονών.	202
Σχήμα 4.16 Ικανότεροι αναστολείς της λιποξυγονάσης της Σειράς E.	220
Σχήμα 4.17 Ισχυρότεροι φωτοευαισθητοποιητικοί παράγοντες.	221
Σχήμα 5.1 Συχνά χρησιμοποιούμενα συστατικά φυσικής προέλευσης για τους NaDES.	233
Σχήμα 5.2 Αντίδραση μοντέλο για τη συμπύκνωση Pechmann με τη χρήση DES.	234
Σχήμα 5.3 Αντίδραση μοντέλο για την αντίδραση Knoevenagel με τη χρήση DES.	234
Σχήμα 5.4 Χημική δομή δικουμαρόλης.	235
Σχήμα 5.5 Γενική δομή δικουμαρινικών αναλόγων με αντιοξειδωτική δράση και ικανότητα αναστολής της λιποξυγονάσης.	235

Σχήμα 5.6 Χημική δομή δικουμαρινικών αναλόγων με αξιόλογη αντιμικροβιακή και κυτταροτοξική δράση.	236
Σχήμα 5.7 Σχεδιασμός κουμαρινικών αναλόγων Σειράς ΣΤ.	237
Σχήμα 5.8 Συνθετική πορεία 4,7-διυδροξυ-κουμαρίνης (28).	238
Σχήμα 5.9 Συνθετική πορεία των 6-υποκατεστημένων-4-υδροξυ-κουμαρινών 30a-30b.	238
Σχήμα 5.10 Σύνθεση των νέων κουμαρινικών και κινολινονικών αναλόγων της Σειράς ΣΤ.	239
Σχήμα 5.11 Μηχανισμός Domino Knoevenagel-Michael για τη σύνθεση των δικουμαρινικών αναλόγων.	240
Σχήμα 5.12 Μηχανισμός Domino Knoevenagel-Michael για τη σύνθεση των βενζοπυρανοκουμαρινών.	240
Σχήμα 5.13 Μηχανισμός σύνθεσης κινολινονών.	241
Σχήμα 5.14 Αντίδραση-μοντέλο.	258
Σχήμα 5.15 Χημική δομή των ενώσεων 32c και 32e.	265
Σχήμα 5.16 Χημική δομή των ενώσεων 32d, 32f και 32i.	266
Σχήμα 5.17 Χημική δομή των κουμαρινικών αναλόγων 28, 30a και 30b.	267
Σχήμα 5.18 Χημική δομή των αναλόγων που παρουσίασαν υψηλότερη ικανότητα αναστολής της λιπιδικής υπεροξειδωσης.	267
Σχήμα 5.19 Χημική δομή κινολινονών 34a και 34b.	268
Σχήμα 5.20 Χημική δομή του δικουμαρινικού αναλόγου 32c που επέδειξε την καλύτερη αντιοξειδωτική δράση.	279
Σχήμα 6.1 Σύνθεση υποκατεστημένων διφαινυλίων.	290
Σχήμα 6.2 Σύνθεση 3,6-διαρυλο-κουμαρινικών αναλόγων μέσω αντίδρασης Suzuki-Miyaura.	291
Σχήμα 6.3 Σύνθεση 4-αρυλο-κουμαρινικών αναλόγων μέσω αντίδρασης Suzuki-Miyaura.	291
Σχήμα 6.4 Σχεδιασμός νέας Σειράς κουμαρινικών αναλόγων (Σειρά Ζ).	292
Σχήμα 6.5 Συνθετική πορεία των νέων κουμαρινικών αναλόγων της Σειράς Ζ.	293
Σχήμα 6.6 Μηχανισμός αντίδρασης Suzuki-Miyaura.	294
Σχήμα 6.7 Πρότυπη αντίδραση για τη μελέτη της αντίδρασης Suzuki-Miyaura.	295
Σχήμα 6.8 Σχηματισμός PdNPs στο NaDES Χλωριούχος χολίνη/Γλυκερόλη = 1:2.	297
Σχήμα 6.9 Αντίδραση απακετυλίωσης με NaDES ή γλυκερόλη.	301
Σχήμα 6.10 Σύγκριση κυτταροτοξικής δράσης των 35d, 35e και 35g.	307
Σχήμα 6.11 Σύγκριση κυτταροτοξικότητας 35b και 35c.	308
Σχήμα 6.12 Χημική δομή κουμαρινικών αναλόγων ανάλογα 35a, 35i και 35j με αξιόλογη κυτταροτοξική δράση.	308

Σχήμα 6.13 Χημική δομή των αναλόγων 35a , 35b , 35g , 3i και 35j που παρουσίασαν την ισχυρότερη κυτταροτοξικότητα έναντι της καρκινικής κυτταρικής σειράς A431.....	316
Σχήμα 7.1 Χημική δομή της δαφνετίνης (DAPH) και της 7,8-διυδροξυ-3-(4-υδροξυφαινυλο)- 4-μεθυλο-κουμαρίνης (DHC).....	334
Σχήμα 7.2 Εγκλεισμός των DAPH και DHC σε SLNs, χαρακτηρισμός και μελέτη της βιολογικής δράσης των SLNs.	335
Σχήμα 7.3 Συνθετική πορεία δαφνετίνης (37).....	336
Σχήμα 7.4 Συνθετική πορεία 7,8-διυδροξυ-4-μεθυλο-3-(4-υδροξυφαινυλο)-κουμαρίνης (39), χρησιμοποιώντας: (i) BF ₃ .Et ₂ O, 90-100 °C, 5 h (ii) [(CH ₃ CO) ₂ O], Et ₃ N, 120 °C, 3 h και (iii) NH ₂ NH ₂ .H ₂ O, MeOH, 42 °C, 1.5 h.....	336
Σχήμα 7.5 Μετατροπή των DAPH και DHC στις αντίστοιχες ο-κινόνες.	351
Σχήμα 8.1 Εγκλεισμός της 7,8-διυδροξυ-4-φαινυλο-κουμαρίνης (40) σε νέα λιπιδικά νανοσυστήματα και μελέτη της αντιοξειδωτικής τους δράσης.	388
Σχήμα 8.2 Συνθετική πορεία της 7,8-διυδροξυ-4-φαινυλο-κουμαρίνης (40).....	389
Σχήμα 8.3 Μέθοδος σχηματισμού των SLNs.....	403
Σχήμα 8.4 Μέθοδος σχηματισμού των νιοσωμάτων.	404
Σχήμα 9.1 Γενική δομή κουμαρινικών αναλόγων Σειρών Α και Β.	416
Σχήμα 9.2 Επίδραση της θέσης υποκατάστασης της υδροξυλομάδας στην ικανότητα αναγωγής της ρίζας ABTS ^{•+}	417
Σχήμα 9.3 Ικανότεροι αναστολείς της λιποξυγονάσης από τη Σειρά Α.	417
Σχήμα 9.4 Ικανότεροι αναστολείς της λιποξυγονάσης από τη Σειρά Β.....	418
Σχήμα 9.5 Χημική δομή κουμαρινικών αναλόγων 9b και 9d , τα οποία παρουσίασαν τις υψηλότερες τιμές σταθεράς σύνδεσης με το ctDNA.....	418
Σχήμα 9.6 Γενική δομή κουμαρινικών αναλόγων Σειρών Γ και Δ.....	419
Σχήμα 9.7 Χημική δομή των ισχυρότερων αναστολέων των AChE και BuChE..	420
Σχήμα 9.8 Συνθετική πορεία υβριδικών μορίων κουμαρινών-χαλκόνων.....	421
Σχήμα 9.9 Ικανότεροι αναστολείς της λιποξυγονάσης της Σειράς Ε.	421
Σχήμα 9.10 Ισχυρότεροι φωτοευαισθητοποιητικοί παράγοντες.....	422
Σχήμα 9.11 Σύνθεση δικουμαρινικών και κινολινονικών αναλόγων Σειράς ΣΤ.	423
Σχήμα 9.12 Χημική δομή του δικουμαρινικού αναλόγου 32c που επέδειξε την καλύτερη αντιοξειδωτική δράση.	424
Σχήμα 9.13 Σχηματισμός PdNPs στο NaDES Χλωριούχος χολίνη/Γλυκερόλη = 1:2.	424
Σχήμα 9.14 Χημική δομή των αναλόγων 35a , 35b , 35g , 35i και 35j που παρουσίασαν την ισχυρότερη κυτταροτοξικότητα έναντι της καρκινικής κυτταρικής σειράς A431.....	426
Σχήμα 9.15 Προτεινόμενες δομικές τροποποιήσεις του κουμαρινικού σκελετού για την αναστολή της AChE.....	430

Σχήμα 9.16 Προτεινόμενες δομικές τροποποιήσεις του κουμαρινικού σκελετού για την αναστολή των AChE και BuChE.....	431
--	-----

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΕΙΚΟΝΩΝ

Εικόνα 1.1 Φυσικές πηγές απομόνωσης κουμαρινών: a : κανέλα, b : μύρτιλλο και c : λεβάντα.	3
Εικόνα 1.2 Βιολογικές δράσεις κουμαρινών [10].	6
Εικόνα 1.3 Αντικαρκινικοί μηχανισμοί δράσης κουμαρινικών αναλόγων [38]. ...	15
Εικόνα 1.4 Μηχανισμοί δράσης των κουμαρινών έναντι του HIV [50].	18
Εικόνα 1.5 Κυριότερες αντιδράσεις σύνθεσης κουμαρινών [54].	20
Εικόνα 1.6 Εφαρμογές αντίδρασης Knoevenagel [62].	23
Εικόνα 2.1 Μηχανισμός λιπιδικής υπεροξειδωσης [16].	37
Εικόνα 2.2 Προϊόντα οξειδωσης του αραχιδονικού και λινελαϊκού οξέος από διάφορες LOX [41].	40
Εικόνα 2.3 Τρόποι μη ομοιοπολικής πρόσδεσης ενώσεων στο DNA [68].	44
Εικόνα 2.4 Φάσμα ^1H NMR της 3-(4-ακετυλοξυφαινυλο)-6,8-διβρωμο-4-μεθυλοχρωμεν-2-όνης (3k).	52
Εικόνα 2.5 Φάσμα ^{13}C NMR της 3-(4-ακετυλοξυφαινυλο)-6,8-διβρωμο-4-μεθυλοχρωμεν-2-όνης (3k).	53
Εικόνα 2.6 Φάσμα ^1H NMR της 7,8-διυδροξυ-3-(4-μεθοξυφαινυλο)-4-μεθυλοχρωμεν-2-όνης (10j).	54
Εικόνα 2.7 Φάσμα ^{13}C NMR της 7,8-διυδροξυ-3-(4-μεθοξυφαινυλο)-4-μεθυλοχρωμεν-2-όνης (10j).	55
Εικόνα 2.8 Προτεινόμενη διαμόρφωση πρόσδεσης της 4e (απεικονιζόμενη μωβ δομή) στη λιποξυγονάση από σόγια (LOX-1).	66
Εικόνα 2.9 Προτεινόμενη διαμόρφωση πρόσδεσης της 3k (απεικονιζόμενη γαλάζια δομή) στη λιποξυγονάση από σόγια (LOX-1).	66
Εικόνα 2.10 Φάσματα απορρόφησης των ενώσεων για διάφορες συγκεντρώσεις ctDNA.	82
Εικόνα 3.1 Δομή ακετυλοχολινεστεράσης.	131
Εικόνα 3.2 Τριδιάστατη δομή: A : της ανθρώπινης AChE (PDB: 4EY4) και B : της ανθρώπινης BuChE (PDB: 1P0I) παρουσία ακετυλοχολίνης και βουτυρυλοχολίνης ως προσδέτη, αντίστοιχα [36].	132
Εικόνα 3.3 Φάσμα ^1H NMR N-(2-υδροξυαιθυλο)-7-((3-μεθυλοβουτ-2-εν-1-υλ)οξυ)-2-οξο-2H-χρωμεν-3-καρβοξαμιδίου (17a).	141
Εικόνα 3.4 Φάσμα ^{13}C NMR N-(2-υδροξυαιθυλο)-7-((3-μεθυλοβουτ-2-εν-1-υλ)οξυ)-2-οξο-2H-χρωμεν-3-καρβοξαμιδίου (17a).	142
Εικόνα 3.5 Φάσμα ^1H NMR N-(4-αμινοφαινυλο)-7-(βενζυλοξυ)-2-οξο-2H-χρωμεν-3-καρβοξαμιδίου (17e).	143
Εικόνα 3.6 Φάσμα ^1H NMR 7-(2-((2-υδροξυαιθυλ)αμινο)αιθοξυ)-4-μεθυλο-2H-χρωμεν-2-όνη (22a).	144
Εικόνα 3.7 Φάσμα ^{13}C NMR 7-(2-((2-υδροξυαιθυλ)αμινο)αιθοξυ)-4-μεθυλο-2H-χρωμεν-2-όνη (22a).	145

Εικόνα 3.8 Μέθοδος BOILED-Egg.....	155
Εικόνα 3.9 Σύγκριση επιλεγμένων αλληλουχιών των hAChE και eeAChE.	158
Εικόνα 3.10 Υπέρθωση της διαμόρφωσης της γαλανταμίνης όπως εξήχθη από την κρυσταλλική δομή του συμπλόκου με την AChE (με πράσινο χρώμα) και της διαμόρφωσης που προκύπτει από την μοριακή πρόσδεση στο καταλυτικό κέντρο του ενζύμου (με πορτοκαλί χρώμα) μετά την εφαρμογή του αλγορίθμου πρόσδεσης: (Α) : SP, (Β) : XP και (Γ) : IFD.....	159
Εικόνα 3.11 Διδιάστατη (αριστερά) και τριδιάστατη (δεξιά) απεικόνιση της πρόσδεσης της 17a (πράσινο χρώμα) στο ενεργό κέντρο της AChE.	161
Εικόνα 3.12 Διδιάστατη (αριστερά) και τριδιάστατη (δεξιά) απεικόνιση της πρόσδεσης της 17c (πράσινο χρώμα) στο ενεργό κέντρο της AChE.	162
Εικόνα 3.13 Διδιάστατη (αριστερά) και τριδιάστατη (δεξιά) απεικόνιση της πρόσδεσης της 22a (πράσινο χρώμα) στο ενεργό κέντρο της AChE.	163
Εικόνα 3.14 Διδιάστατη (αριστερά) και τριδιάστατη (δεξιά) απεικόνιση της πρόσδεσης της 22b (πράσινο χρώμα) στο ενεργό κέντρο της AChE.....	164
Εικόνα 3.15 Διδιάστατη (αριστερά) και τριδιάστατη (δεξιά) απεικόνιση της πρόσδεσης της 22c (πράσινο χρώμα) στο ενεργό κέντρο της AChE.	165
Εικόνα 4.1 Κατηγοριοποίηση υβριδικών μορίων [7].....	187
Εικόνα 4.2 Μηχανισμοί δράσης φωτοευαίσθητοποιητών [34].....	191
Εικόνα 4.3 Φάσμα ¹ H NMR της 7-υδροξυ-3-(3-(2,4,5,-τριμεθοξυφαινυλ)ακρυλοϋλ)-2H-χρωμεν-2-όνης (26a).	197
Εικόνα 4.4 Φάσμα ¹³ C NMR της 7-υδροξυ-3-(3-(2,4,5,-τριμεθοξυφαινυλ)ακρυλοϋλ)-2H-χρωμεν-2-όνης (26a).	198
Εικόνα 4.5 Φάσμα ¹ H NMR της 3-(3-(2-μεθοξυφαινυλ)ακρυλοϋλ)-7-πρενυλοξυ-2H-χρωμεν-2-όνης (26d).	199
Εικόνα 4.6 Φάσμα ¹³ C NMR της 3-(3-(2-μεθοξυφαινυλ)ακρυλοϋλ)-7-πρενυλοξυ-2H-χρωμεν-2-όνης (26d).	200
Εικόνα 4.7 Φάσματα απορρόφησης των ενώσεων: 23 (50μM), 24a (50μM), 24b (30μM), 24c (30μM), 26a (50μM), 26b (50μM), 26c (30μM) και 26d (50μM) σε DMSO.	203
Εικόνα 4.8 Φάσματα απορρόφησης των εξεταζόμενων ενώσεων σε DMSO (συνεχής γραμμή), αιθανόλη (τελείες) και PBS (διακεκομμένη γραμμή).	205
Εικόνα 4.9 Φάσματα φθορισμού των ενώσεων: 23 ($\lambda_{excitation}=420nm$, 20nM), 24a ($\lambda_{excitation}=369nm$, 5μM), 24b ($\lambda_{excitation}=413nm$, 10nM), 24c ($\lambda_{excitation}=356nm$, 5μM), 26a ($\lambda_{excitation}=451nm$, 5μM), 26b ($\lambda_{excitation}=400nm$, 5μM), 26c ($\lambda_{excitation}=390nm$, 5μM) και 26d ($\lambda_{excitation}=380nm$, 5μM) σε PBS.	206
Εικόνα 4.10 Κανονικοποιημένη ένταση μέγιστου φθορισμού των εξεταζόμενων ενώσεων έπειτα από ακτινοβολία με 13 mW cm ⁻²	207
Εικόνα 4.11 Φάσματα φθορισμού της 24a κατά τη διάρκεια της ακτινοβολίας.	208

Εικόνα 4.12 Κανονικοποιημένη απορρόφηση του NADH στα 340 nm σε σχέση με το χρόνο ακτινοβολήσης για ισχύ 12.5 mW cm ⁻² και συγκέντρωση των ενώσεων 50 μM.....	208
Εικόνα 4.13 Κανονικοποιημένος φθορισμός στα 520 nm σε σχέση με το χρόνο ακτινοβολήσης για ισχύ 12.5 mW cm ⁻² και συγκέντρωση των ενώσεων 10 nM...	209
Εικόνα 4.14 Επίδραση διαφορετικών συγκεντρώσεων των νέων κουμαρινικών αναλόγων της Σειράς E στη βιωσιμότητα των κυττάρων A431 απουσία φωτός, *p<0.5 ως προς control, ***p<0.001 ως προς control.	210
Εικόνα 4.15 Επίδραση της ακτινοβολήσης με 15 mW cm ⁻² για 3 min έπειτα από επώαση με συγκέντρωση 20 μM των εξεταζόμενων ενώσεων στην κυτταρική βιωσιμότητα, ***p<0.001 ως προς control.....	211
Εικόνα 5.1 Διάγραμμα φάσεων για το ευτηκτικό μίγμα χλωριούχου χολίνης/ουρίας = 1:2 [29].	232
Εικόνα 5.2 Φάσμα ¹ H NMR της 3,3'-(4-υδροξυ-5-μεθοξυ-φαινυλομεθυλενο)-δι-(4-υδροξυ-6-χλωρο-2H-βενζοπυραν-2-όνης) (32f).....	243
Εικόνα 5.3 Φάσμα ¹³ C NMR της 3,3'-(4-υδροξυ-5-μεθοξυ-φαινυλομεθυλενο)-δι-(4-υδροξυ-6-χλωρο-2H-βενζοπυραν-2-όνης) (32f).....	244
Εικόνα 5.4 Φάσμα ¹ H NMR της 10-υδροξυ-7-(4-υδροξυ-2-οξο-2H-χρωμεν-3-υλ)χρωμενο[4,3- <i>b</i>]χρωμεν-6(7H)-όνης (33b).	245
Εικόνα 5.5 Φάσμα ¹³ C NMR της 3,3'-(4-υδροξυ-5-μεθοξυ-φαινυλομεθυλενο)-δι-(4-υδροξυ-6-χλωρο-2H-βενζοπυραν-2-όνης) (33b).....	246
Εικόνα 5.6 Φάσμα HRMS (ESI) του μορίου 33b	247
Εικόνα 5.7 Φάσμα 2D ¹ H- ¹ H NOESY NMR της 3,3'-(4-υδροξυ-5-μεθοξυ-φαινυλομεθυλενο)-δι-(4-υδροξυ-6-χλωρο-2H-βενζοπυραν-2-όνης) (33b).	248
Εικόνα 5.8 Απόδοση των κορυφών στο φάσμα ¹ H NMR της 3,3'-(4-υδροξυ-5-μεθοξυ-φαινυλομεθυλενο)-δι-(4-υδροξυ-6-χλωρο-2H-βενζοπυραν-2-όνης) (33b).	249
Εικόνα 5.9 Φάσμα 2D ¹ H- ¹ H TOCSY NMR της 3,3'-(4-υδροξυ-5-μεθοξυ-φαινυλομεθυλενο)-δι-(4-υδροξυ-6-χλωρο-2H-βενζοπυραν-2-όνης) (33b).	250
Εικόνα 5.10 Φάσμα ¹ H- ¹³ C HSQC NMR της 3,3'-(4-υδροξυ-5-μεθοξυ-φαινυλομεθυλενο)-δι-(4-υδροξυ-6-χλωρο-2H-βενζοπυραν-2-όνης) (33b).	251
Εικόνα 5.11 Φάσμα ¹ H- ¹³ C HMBC NMR της 3,3'-(4-υδροξυ-5-μεθοξυ-φαινυλομεθυλενο)-δι-(4-υδροξυ-6-χλωρο-2H-βενζοπυραν-2-όνης) (33b).	252
Εικόνα 5.12 Φάσμα ¹ H NMR της 3-(2,4-διυδροξυβενζοϋλ)κινολινόνης (34a).....	253
Εικόνα 5.13 Φάσμα ¹³ C NMR της 3-(2,4-διυδροξυβενζοϋλ)κινολινόνης (34a).....	254
Εικόνα 5.14 Απόδοση των κορυφών στο φάσμα ¹ H NMR της NMR της 3-(2,4-διυδροξυβενζοϋλ)κινολινόνης (34a).....	255
Εικόνα 5.15 Φάσμα TOCSY NMR της 3-(2,4-διυδροξυβενζοϋλ)κινολινόνης (34a).	255

Εικόνα 5.16 Φάσμα ^1H - ^{13}C HSQC NMR της 3-(2,4-διυδροξυβενζοΐλ)κινολινόνης (34a).....	256
Εικόνα 5.17 Φάσμα ^1H - ^{13}C HMBC NMR της 3-(2,4-διυδροξυβενζοΐλ)κινολινόνης (34a).....	257
Εικόνα 5.18 Ανακυκλωσιμότητα και επαναχρησιμοποίηση του NaDES.....	258
Εικόνα 5.19 (%)Δέσμευση της ελεύθερης ρίζας DPPH των ενώσεων 32c και 32e.	265
Εικόνα 5.20 (%)Δέσμευση της ελεύθερης ρίζας DPPH των ενώσεων 32d, 32f και 32i.....	266
Εικόνα 6.1 Περισσότερο χρησιμοποιούμενες αντιδράσεις οργανικής σύνθεσης σε επιστημονικές δημοσιεύσεις του 1984 και 2014 [8].....	288
Εικόνα 6.2 Χημικές δομές φαρμακευτικών ενώσεων που συντίθενται μέσω της μεθόδου Suzuki-Miyaura.....	289
Εικόνα 6.3 Μεταβολή χρώματος της αντίδρασης.....	297
Εικόνα 6.4 Ενδεικτικά διαγράμματα κατανομής μεγέθους των PdNPs σε: (A): NaDES χλωριούχος χολίνη/γλυκερόλη = 1:2, (B): NaDES βεταΐνη/γλυκερόλη = 1:2, (Γ): NaDES L-προλίνη/γλυκερόλη = 1:2 και (Δ): Γλυκερόλη.....	299
Εικόνα 6.5 Εικόνες TEM των PdNPs.....	300
Εικόνα 6.6 Φάσμα ^1H NMR της 6-(2-μεθοξυπυριμιδιν-5-υλ)-4-μεθυλο-3-(4-υδροξυφαινυλο)-2H-χρωμεν-2-όνης (35h).....	302
Εικόνα 6.7 Φάσμα ^1H NMR της 6-(4-μεθοξυφαινυλο)-4-μεθυλο-3-(4-υδροξυφαινυλο)-2H-χρωμεν-2-όνης (35c).....	303
Εικόνα 6.8 Φάσμα ^{13}C NMR της 6-(4-μεθοξυφαινυλο)-4-μεθυλο-3-(4-υδροξυφαινυλο)-2H-χρωμεν-2-όνης (35c).....	304
Εικόνα 6.9 Φάσμα ^1H - ^{13}C HSQC NMR της 6-(4-μεθοξυφαινυλο)-4-μεθυλο-3-(4-υδροξυφαινυλο)-2H-χρωμεν-2-όνης (35c).....	305
Εικόνα 7.1 Δομή λιποσωμάτων.....	325
Εικόνα 7.2 Μοντέλα ενσωμάτωσης της βιοδραστικής ένωσης στα SLNs [16]. ...	328
Εικόνα 7.3 Ικανότητα των SLNs να διαπερνούν το φραγμό του δέρματος [45]..	329
Εικόνα 7.4 Φορείς που έχουν χρησιμοποιηθεί για PDT: A: πολυμερή, B: NLCs, C: SLNs, D: νανοσωματίδια χρυσού, E: λιποσώματα, F: υδρογέλες, G: δενδριμερή και H: κυκλοδεξτρίνες [57].....	330
Εικόνα 7.5 Φάσμα ^1H NMR της 7,8-διυδροξυ-κουμαρίνης (37).	337
Εικόνα 7.6 Φάσμα ^1H NMR της 7,8-διυδροξυ-4-μεθυλο-3-(4-υδροξυφαινυλο)-κουμαρίνης (39).....	338
Εικόνα 7.7 Φάσμα ^{13}C NMR της 7,8-διυδροξυ-4-μεθυλο-3-(4-υδροξυφαινυλο)-κουμαρίνης (39).....	339
Εικόνα 7.8 Ενδεικτικό διάγραμμα κατανομής μεγέθους για τα DHC-SLNs (πειράμα 11) με τη μέθοδο DLS.....	341

Εικόνα 7.9 Ενδεικτικό διάγραμμα κατανομής μεγέθους για τα DAPH-SLNs (πείραμα 10) με τη μέθοδο DLS.....	342
Εικόνα 7.10 Συγκριτικό φάσμα FT-IR των: (Α) : τριμυριστίνη, blank SLNs, DHC και DHC-SLNs και (Β) : τριμυριστίνη, blank SLNs, DAPH και DAPH-SLNs.....	344
Εικόνα 7.11 Συγκριτικά γραφήματα TG των: (Α) : τριμυριστίνη, DHC, blank-SLNs και DHC-SLNs και (Β) : τριμυριστίνη, DAPH, blank-SLNs και DAPH-SLNs.	346
Εικόνα 7.12 Εικόνες TEM των blank-SLNs.....	347
Εικόνα 7.13 Προφίλ αποδέσμευσης των κουμαρινικών αναλόγων από τα SLNs, σε διαφορετικές συνθήκες (37 °C, pH 7.4 και 35 °C, pH 5.5).....	349
Εικόνα 7.14 Φάσματα απορρόφησης των: (Α) : DAPH και (Β) : DHC σε αιθανόλη (70 μM) και φάσματα φθορισμού των: (Γ) : DAPH και (Δ) : DHC σε PBS (50 μM).....	352
Εικόνα 7.15 (%) Κανονικοποιημένος φθορισμός των κουμαρινικών αναλόγων σε ελεύθερη και εγκλεισμένη μορφή σε σχέση με το χρόνο ακτινοβολήσης.	353
Εικόνα 7.16 (%) Κανονικοποιημένος φθορισμός στα 520 nm σε σχέση με το χρόνο ακτινοβολήσης για τα: (Α) : DAPH και DAPH-SLNs (10μM) και (Β) : DHC και DHC-SLNs (10 nM).....	354
Εικόνα 7.17 Μικροσκοπία A431 κυττάρων. Αριστερά: εικόνες των κυττάρων από οπτικό μικροσκόπιο έπειτα από επώαση με: (Α) : DAPH και (Γ) : DAPH-SLNs, Δεξιά: εικόνες μικροσκοπίας φθορισμού των κυττάρων έπειτα από επώαση με: (Β) : DAPH και (Δ) : DAPH-SLNs.....	355
Εικόνα 7.18 Μικροσκοπία A431 κυττάρων. Αριστερά: εικόνες των κυττάρων από οπτικό μικροσκόπιο έπειτα από επώαση με: (Α) : DHC και (Γ) : DHC-SLNs, Δεξιά: εικόνες μικροσκοπίας φθορισμού των κυττάρων έπειτα από επώαση με: (Β) : DHC και (Δ) : DHC-SLNs.	355
Εικόνα 7.19 Επίδραση διαφορετικών συγκεντρώσεων των DAPH και DHC στη βιωσιμότητα της καρκινικής σειράς A431, *p < 0.05 ως προς τα control.....	356
Εικόνα 7.20 Φωτοευαισθητοποιητική δράση της DAPH υπό διαφορετικές συνθήκες ακτινοβολήσης (9 και 12 mW/cm ²), *p < 0.05 ως προς τα control.	357
Εικόνα 7.21 Φωτοευαισθητοποιητική δράση της DHC υπό διαφορετικές συνθήκες ακτινοβολήσης (9 και 12 mW/cm ²), *p < 0.05, **p < 0.005 ως προς τα control.....	358
Εικόνα 8.1 Μοντέλα ενσωμάτωσης της βιοδραστικής ένωσης στα NLCs [7].....	382
Εικόνα 8.2 Εφαρμογή των NLCs για τη μεταφορά φαρμακευτικών μορίων.	383
Εικόνα 8.3 Δομή νιοσωμάτων.	384
Εικόνα 8.4 Κατηγοριοποίηση νιοσωμάτων ανάλογα με τη δομή τους [39].	385
Εικόνα 8.5 Μέθοδος λεπτού φιλμ-ενυδάτωσης [29].....	386
Εικόνα 8.6 Μέθοδος έγχυσης αιθέρα [39].....	387
Εικόνα 8.7 Τεχνική εξάτμισης αντίστροφης φάσης [39].	387
Εικόνα 8.8 Φάσμα ¹ H NMR της 7,8-διυδροξυ-4-φαινυλο-χρωμεν-2-όνης (40).	389
Εικόνα 8.9 Ενδεικτικό διάγραμμα κατανομής μεγέθους για τα βέλτιστα νιοσώματα σύμφωνα με τη μέθοδο DLS.....	392

Εικόνα 8.10 Συγκριτικά φάσματα FT-IR των: (Α) : κενών SLNs, κουμαρίνης, SLNs, (Β) : κενών NLCs, κουμαρίνης, NLCs και (Γ) : κενών νιοσωμάτων, κουμαρίνης, νιοσωμάτων.....	393
Εικόνα 8.11 Συγκριτικά γραφήματα TG των: (Α) : κενών SLNs, κουμαρίνης, SLNs, (Β) : κενών NLCs, κουμαρίνης, NLCs και (Γ) : κενών νιοσωμάτων, κουμαρίνης, νιοσωμάτων.....	395
Εικόνα 8.12 Προφίλ αποδέσμευσης του κουμαρινικού αναλόγου από τα λιπιδικά νανοσυστήματα στους 37 °C και pH 7.4.	397
Εικόνα 8.13 Γραφική παράσταση του κινητικού μοντέλου Higuchi για τη μελέτη απελευθέρωσης της 7,8-διυδροξυ-4-φαινυλο-κουμαρίνης από τα: (Α) : SLNs, (Β) NLCs και (Γ) : νιοσώματα.	399
Εικόνα 8.14 Γραφική παράσταση του κινητικού μοντέλου Korsmeyer-Peppas για τη μελέτη απελευθέρωσης της 7,8-διυδροξυ-4-φαινυλο-κουμαρίνης από τα: (Α) : SLNs, (Β) : NLCs και (Γ) : νιοσώματα.	400
Εικόνα 9.1 Τριδιάστατη απεικόνιση της πρόσδεσης της 17a στο ενεργό κέντρο της AChE ανθρώπινης προέλευσης.	420
Εικόνα 9.2 Εικόνες TEM των PdNPs.	425
Εικόνα 9.3 Εικόνες TEM των blank SLNs.	427
Εικόνα 9.4 Μικροσκοπία φθορισμού των κυττάρων A431 έπειτα από επώαση με τα κουμαρινικά ανάλογα σε εγκλεισμένη και ελεύθερη μορφή.....	428

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ

Πίνακας 2.1 Μελέτη εναλλακτικών συνθηκών αντίδρασης σύνθεσης της 2,3,4-τριυδροξυακετοφαινόνης (7).....	49
Πίνακας 2.2 Κουμαρινικά ανάλογα της Σειράς A	50
Πίνακας 2.3 Κουμαρινικά ανάλογα της Σειράς B.	51
Πίνακας 2.4 Αξιολόγηση της αντιοξειδωτικής δράσης των κουμαρινικών αναλόγων της Σειράς A σε συγκέντρωση 100 μM	56
Πίνακας 2.5 Αξιολόγηση της ικανότητας των νέων κουμαρινών της Σειράς A να αναστέλλουν τη δράση της φυτικής λιποξυγονάσης (LOX).	62
Πίνακας 2.6 (%) Βιωσιμότητα κυττάρων HaCaT και (%) κυτταροτοξική δράση έναντι των σειρών A549 και A375, έπειτα από επίδραση των κουμαρινικών αναλόγων της Σειράς A σε συγκέντρωση 100 μM	67
Πίνακας 2.7 Φυσικοχημικές ιδιότητες, χρωματογραφικοί δείκτες και εκτιμώμενες τιμές απορρόφησης από το στόμα ((%)HOA).	71
Πίνακας 2.8 Τιμές παράγοντα κατακράτησης στη στήλη HSA (\log_{10}) και εκτιμώμενες τιμές της πρόσδεσης στις πρωτεΐνες του πλάσματος ((%) PBB).....	72
Πίνακας 2.9 Αξιολόγηση αντιοξειδωτικής δράσης, ικανότητας αναστολής του ενζύμου της λιποξυγονάσης από σόγια και εκτιμώμενος συντελεστής λιποφιλίας των νέων κουμαρινών της Σειράς B.....	73
Πίνακας 2.10 (%) Κυτταροτοξικότητα των κουμαρινών της Σειράς B σε συγκεντρώσεις 10 μM και 100 μM έναντι των κυττάρων της καρκινικής σειράς A431.....	78
Πίνακας 2.11 Σταθερά σύνδεσης (Kb) των επιλεγμένων κουμαρινικών αναλόγων με το ctDNA.....	83
Πίνακας 2.12 Εκτιμώμενες φυσικοχημικές ιδιότητες ενώσεων της Σειράς B.	85
Πίνακας 2.13 Βιολογική δράση κουμαρινικών αναλόγων 3e και 9b	117
Πίνακας 3.1 Αξιολόγηση της ικανότητας των κουμαρινικών αναλόγων των Σειρών Γ και Δ να αναστέλλουν τη δράση των ενζύμων AChE και BuChE (%) σε συγκέντρωση 100 μM και IC ₅₀ (μM).....	147
Πίνακας 3.2 Εκτιμώμενες φυσικοχημικές ιδιότητες ενώσεων των σειρών Γ και Δ.	153
Πίνακας 3.3 Πρόβλεψη εγκεφαλικής διαπερατότητας ενώσεων των Σειρών Γ και Δ.	155
Πίνακας 3.4 Ενέργεια πρόσδεσης γαλανταμίνης στην AChE για κάθε αλγόριθμο.	159
Πίνακας 3.5 Αποτελέσματα μοριακής πρόσδεσης της 17a στο ενεργό κέντρο της AChE.	161
Πίνακας 3.6 Αποτελέσματα μοριακής πρόσδεσης της 17c στο ενεργό κέντρο της AChE.	162

Πίνακας 3.7 Αποτελέσματα μοριακής πρόσδεσης της 22a στο ενεργό κέντρο της AChE.	163
Πίνακας 3.8 Αποτελέσματα μοριακής πρόσδεσης της 22b στο ενεργό κέντρο της AChE.	164
Πίνακας 3.9 Αποτελέσματα μοριακής πρόσδεσης της 22c στο ενεργό κέντρο της AChE.	165
Πίνακας 4.1 (%) Ικανότητα αναστολής της λιπιδικής υπεροξειδωσής (100 μΜ), ικανότητα αναστολής της δράσης της λιποξυγονάσης από σόγια (IC ₅₀ (μΜ)) και κυτταροτοξικότητα έναντι της καρκινικής σειράς LNCaP (IC ₅₀ (μΜ)).	201
Πίνακας 4.2 Μήκος κύματος μέγιστης απορρόφησης των εξεταζόμενων ενώσεων σε διαφορετικούς διαλύτες (DMSO, EtOH and PBS).	205
Πίνακας 5.1 Οι 12 Αρχές της Πράσινης Χημείας.	230
Πίνακας 5.2 Μελέτη εναλλακτικών συνθηκών αντίδρασης σύνθεσης της 4,7-διυδροξυ-κουμαρίνης (28).	238
Πίνακας 5.3 Ταυτοποίηση ατόμων πρωτονίου και άνθρακα της ένωσης 33b	251
Πίνακας 5.4 Ταυτοποίηση ατόμων πρωτονίου και άνθρακα της ένωσης 34a	256
Πίνακας 5.5 Αξιολόγηση της αντιοξειδωτικής δράσης των νέων αναλόγων της Σειράς ΣΤ.	260
Πίνακας 6.1 Συνθήκες σύνθεσης υποκατεστημένων διφαινυλίων μέσω πράσινων προσεγγίσεων.	290
Πίνακας 6.2 Συνθήκες που μελετήθηκαν στην αντίδραση-μοντέλο και αποδόσεις. Χρόνος αντίδρασης: 24 h, Θερμοκρασία: 90 °C.	295
Πίνακας 6.3 Μέγεθος PdNPs στους διαφορετικούς διαλύτες και απόδοση αντίδρασης.	299
Πίνακας 6.4 Εξεταζόμενες συνθήκες της αντίδρασης απακετυλίωσης.	301
Πίνακας 6.5 Ταυτοποίηση ατόμων πρωτονίου και άνθρακα της ένωσης 35c	304
Πίνακας 6.6 Αποτελέσματα κυτταροτοξικότητας των αναλόγων της Σειράς Ζ.	306
Πίνακας 7.1 Χαρακτηριστικά λιπίδια που χρησιμοποιούνται για την παρασκευή των SLNs.	326
Πίνακας 7.2 Συχνά χρησιμοποιούμενοι επιφανειοδραστικοί παράγοντες για την παρασκευή των SLNs.	327
Πίνακας 7.3 Τιμές εκθέτη κινητικού μοντέλου Korsmeyer-Peppas.	333
Πίνακας 7.4 Ποσότητες των συστατικών, μέση υδροδυναμική διάμετρος, δείκτης πολυδιασποράς (PDI) και ζ-δυναμικό των DHC-SLNs, απόδοση διεργασίας και απόδοση εγκλεισμού κάθε πειράματος.	340
Πίνακας 7.5 Μέση υδροδυναμική διάμετρος, δείκτης πολυδιασποράς (PDI) και ζ-δυναμικό, απόδοση διεργασίας και απόδοση εγκλεισμού των DAPH-SLNs και Blank-SLNs.	342

Πίνακας 7.6 Αποτελέσματα μεθόδου DLS, απόδοσης διεργασίας και απόδοσης εγκλεισμού των DHC-SLNs για τη μέθοδο γαλακτωματοποίησης και εξάτμισης του διαλύτη με ομογενοποίηση υψηλών στροφών.....	343
Πίνακας 7.7 Χαρακτηριστικές δονήσεις των: τριμυριστίνη, DHC, DAPH, blank SLNs, DHC-SLNs και DAPH-SLNs.....	345
Πίνακας 7.8 Μέση υδροδυναμική διάμετρος, δείκτης πολυδιασποράς (PDI), ζ-δυναμικό και απόδοση απόδοση εγκλεισμού των SLNs μετά από αποθήκευση για έναν και έξι μήνες.....	348
Πίνακας 7.9 Αποτελέσματα κινητικής μοντελοποίησης.....	349
Πίνακας 7.10 Αποτελέσματα δέσμησης της ελεύθερης ρίζας DPPH.....	350
Πίνακας 7.11 Αποτελέσματα αναστολής της λιπιδικής υπεροξειδωσής.....	351
Πίνακας 7.12 Ενέργεια, συνολικός αριθμός φωτονίων και πυκνότητα φωτονιακής ροής για τις διαφορετικές συνθήκες ακτινοβολήσης.....	359
Πίνακας 8.1 Μέση υδροδυναμική διάμετρος, δείκτης πολυδιασποράς (PDI), ζ-δυναμικό απόδοση διεργασίας και απόδοση εγκλεισμού των παρασκευαζόμενων SLNs και NLCs.	390
Πίνακας 8.2 Ποσότητες των συστατικών, μέση υδροδυναμική διάμετρος, δείκτης πολυδιασποράς (PDI), ζ-δυναμικό, απόδοση διεργασίας και απόδοση εγκλεισμού των παρασκευαζόμενων νιοσωμάτων.....	391
Πίνακας 8.3 Χαρακτηριστικές δονήσεις του κουμαρινικού αναλόγου σε ελεύθερη και εγκλεισμένη μορφή, καθώς και των κενών νανοσυστημάτων.	393
Πίνακας 8.4 Συγκριτικά αποτελέσματα θερμοσταθμικής ανάλυσης (TGA): (A): κενών SLNs, κουμαρίνης, SLNs, (B): κενών NLCs, κουμαρίνης, NLCs και (Γ): κενών νιοσωμάτων, κουμαρίνης, νιοσωμάτων.....	396
Πίνακας 8.5 Αποτελέσματα κινητικής μοντελοποίησης.....	397
Πίνακας 8.6 Ικανότητα δέσμησης της ελεύθερης ρίζας DPPH.	401
Πίνακας 9.1 Συνδυασμένη βιολογική δράση κουμαρινικών αναλόγων 3e και 9b	419
Πίνακας 9.2 Μέγεθος PdNPs στους διαφορετικούς διαλύτες και απόδοση αντίδρασης.....	425
Πίνακας 9.3 Εξεταζόμενες συνθήκες της αντίδρασης απακετυλίωσης.	426
Πίνακας 9.4 Μέση υδροδυναμική διάμετρος, δείκτης πολυδιασποράς (PDI) και ζ-δυναμικό, απόδοση διεργασίας και απόδοση εγκλεισμού των SLNs.	427
Πίνακας 9.5 Μέση υδροδυναμική διάμετρος, δείκτης πολυδιασποράς (PDI) και ζ-δυναμικό, απόδοση διεργασίας και απόδοση εγκλεισμού των SLNs, NLCs και νιοσωμάτων.....	429

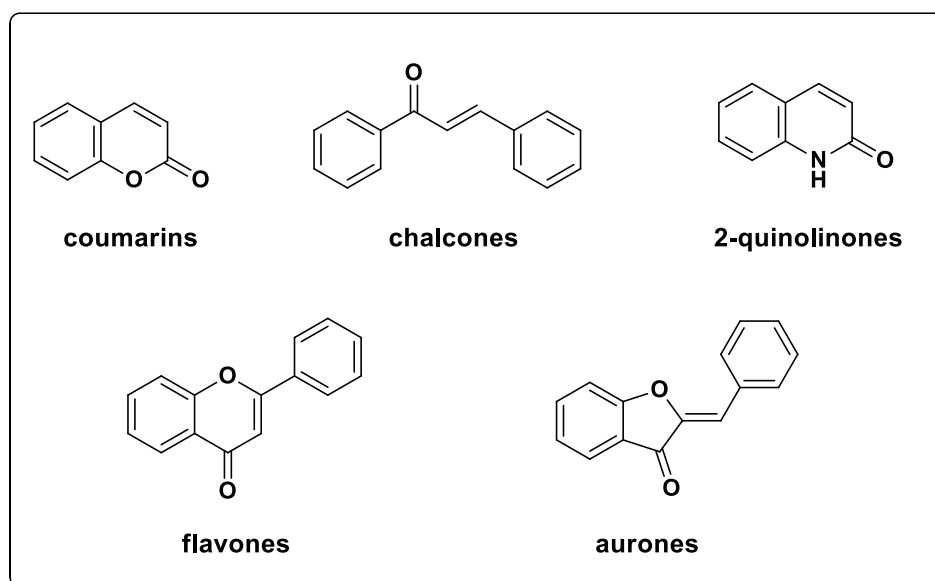
Κεφάλαιο 1ο

ΒΑΣΙΚΟ ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΥΠΟΒΑΘΡΟ

1.1 Ετεροκυκλική Χημεία

Ετεροκυκλικές ενώσεις ονομάζονται οι κυκλικές ενώσεις οι οποίες περιέχουν τουλάχιστον ένα ετεροάτομο (άτομο διαφορετικό του άνθρακα) στη δομή τους. Οι ετεροκυκλικές ενώσεις αποτελούν τη μεγαλύτερη οικογένεια οργανικών ενώσεων, ενώ παρουσιάζουν τεράστιο ενδιαφέρον στη φαρμακευτική χημεία και βιομηχανία [1]. Στην πραγματικότητα, η πλειοψηφία των δραστικών ουσιών περιέχει τουλάχιστον έναν ετεροκυκλικό δακτύλιο και για αυτό οι έρευνες για την ανάπτυξη νέων φαρμακευτικών μορίων εστιάζουν στη μελέτη των ετεροκυκλικών ενώσεων [2].

Πολλά φυσικά προϊόντα ανήκουν στην κατηγορία των ετεροκυκλικών ενώσεων όπως βιταμίνες, ορμόνες κ.α., ενώ είναι αξιοσημείωτο ότι οι δομικοί λίθοι για τη ζωή, DNA και RNA αποτελούνται από βάσεις (θυμίνη, αδενίνη, γουανίνη, κυτοσίνη, ουρακίλη), οι οποίες είναι ετεροκυκλικές ενώσεις [3]. Ορισμένες από τις πιο γνωστές κατηγορίες ετεροκυκλικών ενώσεων φυσικής προέλευσης είναι οι κουμαρίνες, χαλκόνες, κινολινόνες, ωρόνες, τα φλαβονοειδή κ.α. (Σχήμα 1.1). Τα φυσικά προϊόντα είναι δευτερογενείς μεταβολίτες που παρουσιάζουν μεγάλο εύρος βιολογικών δράσεων όπως αντιοξειδωτική, αντιμικροβιακή, νευροπροστατευτική και αντικαρκινική, καθιστώντας την έρευνα γύρω από τη δομική τροποποίησή του σκελετού τους και τη σύνθεση νέων ετεροκυκλικών αναλόγων ιδιαίτερα σημαντική [4].



Σχήμα 1.1 Ορισμένες από τις κυριότερες κατηγορίες ετεροκυκλικών φυσικών προϊόντων.

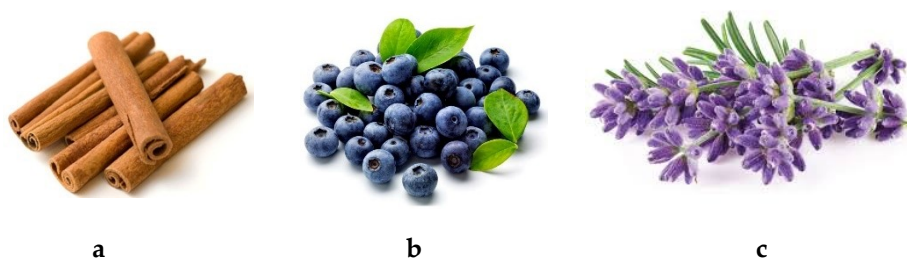
1.2 Κουμαρίνες

Οι κουμαρίνες αποτελούν ετεροκυκλικές ενώσεις που ανήκουν στην οικογένεια των βενζοπυρονών και η ονομασία τους προέρχεται από το φυτικό είδος *Coumarouna Odorata*. Παρόλο που η πρώτη ένωση κουμαρίνης απομονώθηκε το 1820 από τους καρπούς (tonka beans) του φυτού *Dipteryx odorata* Willd (Σχήμα 1.2) από τον Vogel, ενδιαφέρον σχετικά με τις κουμαρίνες αλλά και τις παράγωγες ενώσεις τους αναπτύχθηκε σχεδόν έναν αιώνα μετά όταν ανακαλύφθηκαν κάποιες από τις ευεργετικές τους ιδιότητες [5]. Ειδικότερα, οι κουμαρίνες παρουσιάζουν ένα ευρύ φάσμα βιολογικών δράσεων, μεταξύ των οποίων αντιοξειδωτική, αντιφλεγμονώδη, αντιμικροβιακή, αντικαρκινική κ.α. [6]



Σχήμα 1.2 *Dipteryx odorata* (tonka beans) και δομή κουμαρινικού σκελετού.

Κουμαρίνες απαντώνται σε πολλά είδη φυτών είτε σε ελεύθερη μορφή είτε υπό μορφή γλυκοζιτών, στις ρίζες, στα φύλλα, στα κλαδιά, αλλά και στα αιθέρια έλαιά τους όπως στο λάδι από φλοιό κανέλας καθώς και στο λάδι λεβάντας [7] (Εικόνα 1.1). Επιπλέον, απαντώνται σε φρούτα όπως το μύρτιλλο, αλλά και στο πράσινο τσάι και στα ραδίκια, ενώ χάρη στο ευχάριστο άρωμά τους, χρησιμοποιούνται συχνά σαν πρόσθετες αρωματικές ενώσεις σε καλλυντικά σκευάσματα [8].



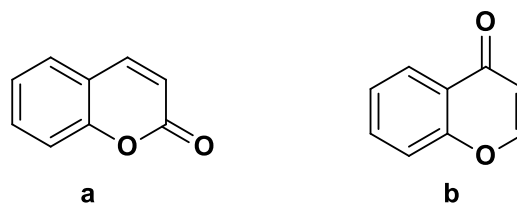
Εικόνα 1.1 Φυσικές πηγές απομόνωσης κουμαρινών: **a:** κανέλα, **b:** μύρτιλλο και **c:** λεβάντα.

Μέχρι στιγμής, πάνω από χίλιες παράγωγες ενώσεις κουμαρινών έχουν ανακαλυφθεί, οι οποίες ποικίλουν από απλές κουμαρίνες με αλκυλο- ή υδροξυ-υποκαταστάτες μέχρι και πιο σύνθετες με βενζολικούς, αλκυλοφωσφορικούς και

άλλους υποκαταστάτες [9]. Απλές παράγωγες ενώσεις των κουμαρινών έχουν βρεθεί σε φυτά είτε σε ελεύθερη κατάσταση είτε ως γλυκοζίτες. Συχνά, βρίσκονται 5-10 διαφορετικές κουμαρίνες σ' ένα φυτό. Κουμαρίνες έχουν απομονωθεί από περισσότερα από 150 διαφορετικά φυτά τα οποία ανήκουν σε περίπου 30 διαφορετικές οικογένειες, με κυριότερες τις *Apiaceae*, *Oleaceae*, *Rutaceae*, και *Umbelliferae* [10]. Επιπλέον, η περιεχόμενη ποσότητα εξαρτάται και από το στάδιο ανάπτυξης του φυτού. Σε ορισμένα φυτά βρίσκονται σε μεγάλες ποσότητες κατά τη βλάστησή τους, ενώ συνήθως περιέχονται σε μεγαλύτερη ποσότητα σε νεότερα φύλλα φυτών απ' ότι σε παλαιότερα [5]. Ο ρόλος τους δεν έχει διευκρινιστεί πλήρως· πιθανώς εμποδίζουν τη βλάστηση και την ανάπτυξη ή διευκολύνουν την ωρίμανση των σπόρων, καθώς και βοηθούν στην προστασία των φυτών ενάντια σε ορισμένες ασθένειες. Κουμαρίνες έχουν επίσης απομονωθεί από πληθώρα μικροοργανισμών.

1.3 Χημική δομή και ταξινόμηση κουμαρινών

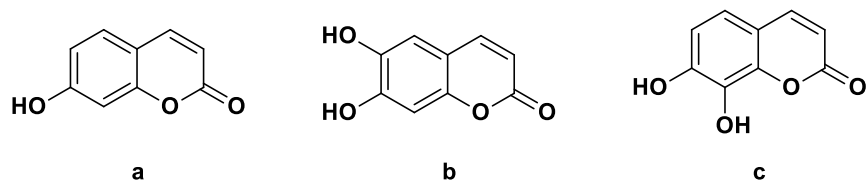
Οι κουμαρίνες (*2H-Chromen-2-one*) ανήκουν στην οικογένεια των βενζοπυρονών, οι οποίες αποτελούνται από ένα βενζολικό δακτύλιο συνδεδεμένο με μία ομάδα πυρόνης [6]. Οι βενζοπυρόνες διακρίνονται στις βενζο- α -πυρόνες (Σχήμα 1.3), στις οποίες ανήκουν κι οι κουμαρίνες και στις βενζο- γ -πυρόνες, στις οποίες ανήκουν άλλες ομάδες όπως τα φλαβονοειδή.



Σχήμα 1.3 Χημική δομή **a**: βενζο- α -πυρονών και **b**: βενζο- γ -πυρονών.

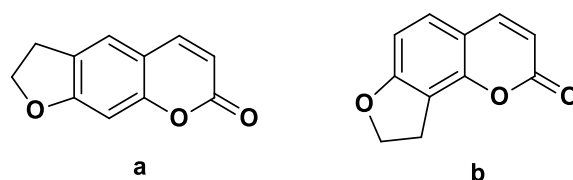
Ο κουμαρινικός σκελετός αποτελεί κατάλληλο δομικό υπόβαθρο για πληθώρα δομικών τροποποιήσεων, οδηγώντας στη σύνθεση πολλών διαφορετικών αναλόγων. Οι κουμαρίνες διακρίνονται σε τέσσερις βασικές υποκατηγορίες, ανάλογα με τη δομή τους [11–13].

- i. Απλές κουμαρίνες: Η κατηγορία αυτή αποτελείται από τα υδροξυ-, αλκοξυ- και αλκυλο- υποκατεστημένα στον αρωματικό δακτύλιο παράγωγα της κουμαρίνης, καθώς και τους αντίστοιχους γλυκοζίτες. Χαρακτηριστικές κουμαρίνες της κατηγορίας αυτής, γνωστές για τις πολλαπλές βιολογικές τους δράσεις είναι η ουμπελιφερόνη (7-υδροξυ-κουμαρίνη), εσκουλετίνη (6,7-διυδροξυ-κουμαρίνη) και δαφνετίνη (7,8-διυδροξυ-κουμαρίνη) (Σχήμα 1.4).



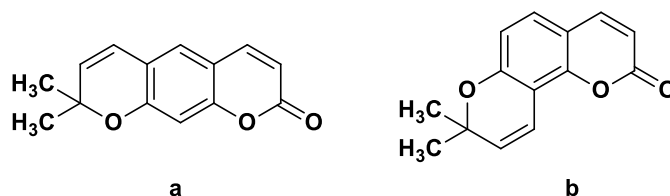
Σχήμα 1.4 Χημική δομή: **a**: ουμπελιφερόνης, **b**: εσκουλετίνης και **c**: δαφνετίνης.

- ii. Φουρανοκουμαρίνες: Οι φουρανοκουμαρίνες αποτελούνται από ένα πενταμελή φουρανικό δακτύλιο συνδεδεμένο με τον αρωματικό δακτύλιο της κουμαρίνης, είτε γραμμικά είτε υπό γωνία. Σε κάθε περίπτωση μένουν δύο θέσεις προς υποκατάσταση στον αρωματικό δακτύλιο. Τα δύο πιο γνωστά παράγωγα είναι το μόριο του ψωραλενίου (psoralen) και της αγγελικίνης (angelicin) (Σχήμα 1.5)



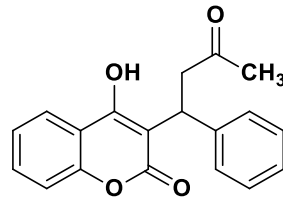
Σχήμα 1.5 Χημική δομή **a**: ψωραλενίου και **b**: αγγελικίνης.

- iii. Πυρανοκουμαρίνες: Οι πυρανοκουμαρίνες είναι παρόμοιες δομικά με τις φουρανοκουμαρίνες, με τη διαφορά ότι αποτελούνται από έναν εξαμελή πυρανικό δακτύλιο συνδεδεμένο με τον αρωματικό δακτύλιο μίας κουμαρίνης. Χαρακτηριστικά παραδείγματα αποτελούν η ξανθυλετίνη (xanthyletin) και η σεσελίνη (seselin) (Σχήμα 1.6).



Σχήμα 1.6 Χημική δομή **a**: ξανθυλετίνης και **b**: σεσελίνης.

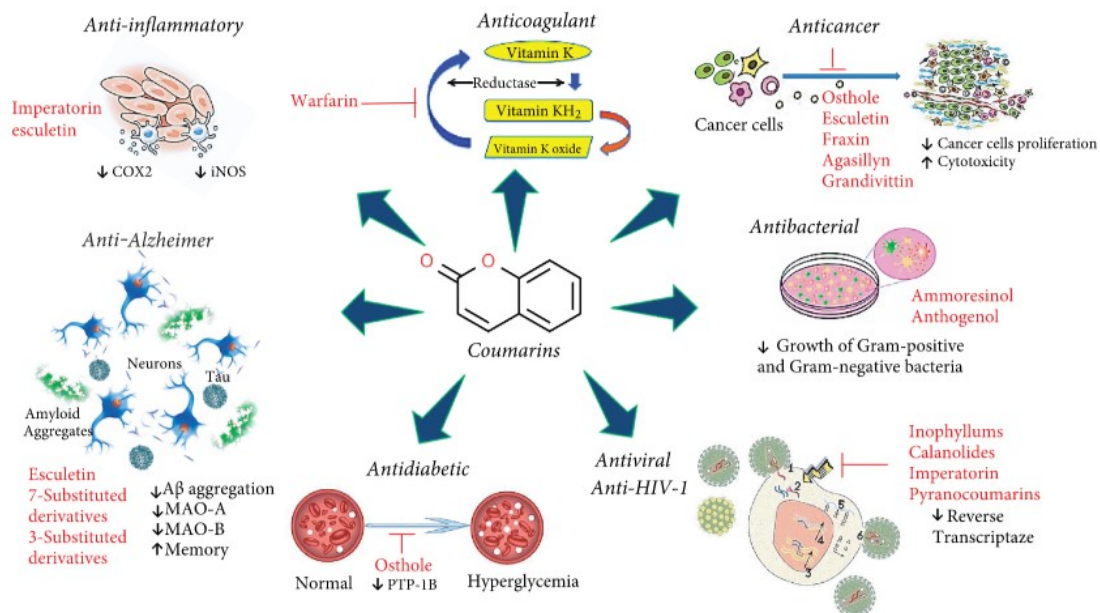
- iv. Κουμαρίνες υποκατεστημένες στον πυρονικό δακτύλιο: Περιλαμβάνονται οι υποκατεστημένες κουμαρίνες στη θέση 3- ή 4- ή και στις δύο θέσεις του δακτυλίου, καθώς και οι 3,4-συμπυκνωμένες κουμαρίνες. Μία από τις πιο σημαντικές κουμαρίνες αυτής της κατηγορίας είναι η βαρφαρίνη (warfarin) η παρουσιάζει ισχυρή αντιπηκτική δράση και χρησιμοποιείται σε αντίστοιχα εμπορικά σκευάσματα (Σχήμα 1.7).



Σχήμα 1.7 Χημική δομή βαρφαρίνης.

1.4 Φαρμακευτικές δράσεις των κουμαρινών

Οι κουμαρίνες και τα παράγωγά τους είναι βιολογικά και φαρμακευτικά ενεργές ενώσεις με ένα ευρύ φάσμα ιδιοτήτων όπως αντιμικροβιακή, αντιμυκητιασική, αντιφλεγμονώδης, αντιακή, αντικαρκινική, αντιπηκτική και αντιοξειδωτική (Εικόνα 1.2).

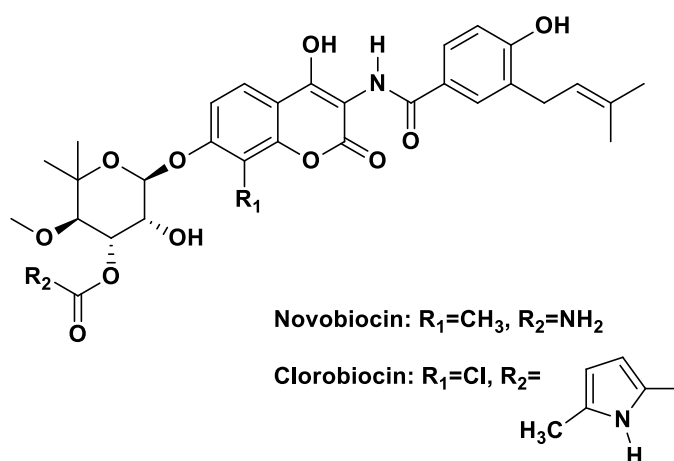


Εικόνα 1.2 Βιολογικές δράσεις κουμαρινών [10].

1.4.1 Αντιμικροβιακή δράση

Η συνεχής δημιουργία στελεχών βακτηρίων ανθεκτικών στα κλασσικά αντιβιοτικά αποτελεί παγκόσμια ανησυχία για την υγεία. Σύμφωνα με τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας (World Health Organization, WHO) περίπου 50000 άνθρωποι χάνουν τη ζωή τους από μικροβιακή μόλυνση κάθε μέρα. Το ποσοστό αυτό μειώνεται με την πάροδο του χρόνου, ωστόσο μειώνεται με αργούς ρυθμούς λόγω του υπερπληθυσμού και της μικροβιακής αντοχής. Συνιστώμενη λύση αποτελεί η ανακάλυψη και ανάπτυξη νέων ενώσεων που φέρουν αυξημένη αντιμικροβιακή δράση, μειωμένη τοξικότητα και κυρίως δρουν έναντι ανθεκτικών μικροβίων [14].

Η απλή κουμαρίνη έχει χαμηλή αντιμικροβιακή δράση. Ωστόσο, ορισμένα παράγωγά της εμφανίζουν ισχυρότερη δράση, ενώ είναι σημαντικό ότι δρουν με πολλούς διαφορετικούς μηχανισμούς. Συγκεκριμένα, το novobiocin, που απομονώθηκε ως μεταβολίτης από τους μύκητες *Streptomyces niveus* και *Streptomyces Spheroides* και το ανάλογό του, clorobiocin το οποίο έχει απομονωθεί επίσης από στελέχη του *Streptomyces* αποτελούν κουμαρινικά αντιβιοτικά τα οποία δρουν ως αναστολείς της DNA γυράσης [15] (Σχήμα 1.8). Το novobiocin και το clorobiocin δρουν τόσο έναντι αρνητικών όσο και έναντι θετικών κατά gram βακτηρίων, με μέγιστη δράση έναντι θετικών κατά gram βακτηρίων, όπως ο *Staphylococcus aureus*. Μερικοί ακόμα μικροοργανισμοί είναι οι *Neisseria* spp., *Haemophilus* spp. και *Brucella* spp. Μάλιστα, το novobiocin χρησιμοποιείται ως εναλλακτικό της πενικιλίνης σε ανθεκτικά στελέχη *Staphylococcus aureus*, ενώ έχει συνεργιστική δράση με τετρακυκλίνες έναντι ανθεκτικών μικροοργανισμών [16].



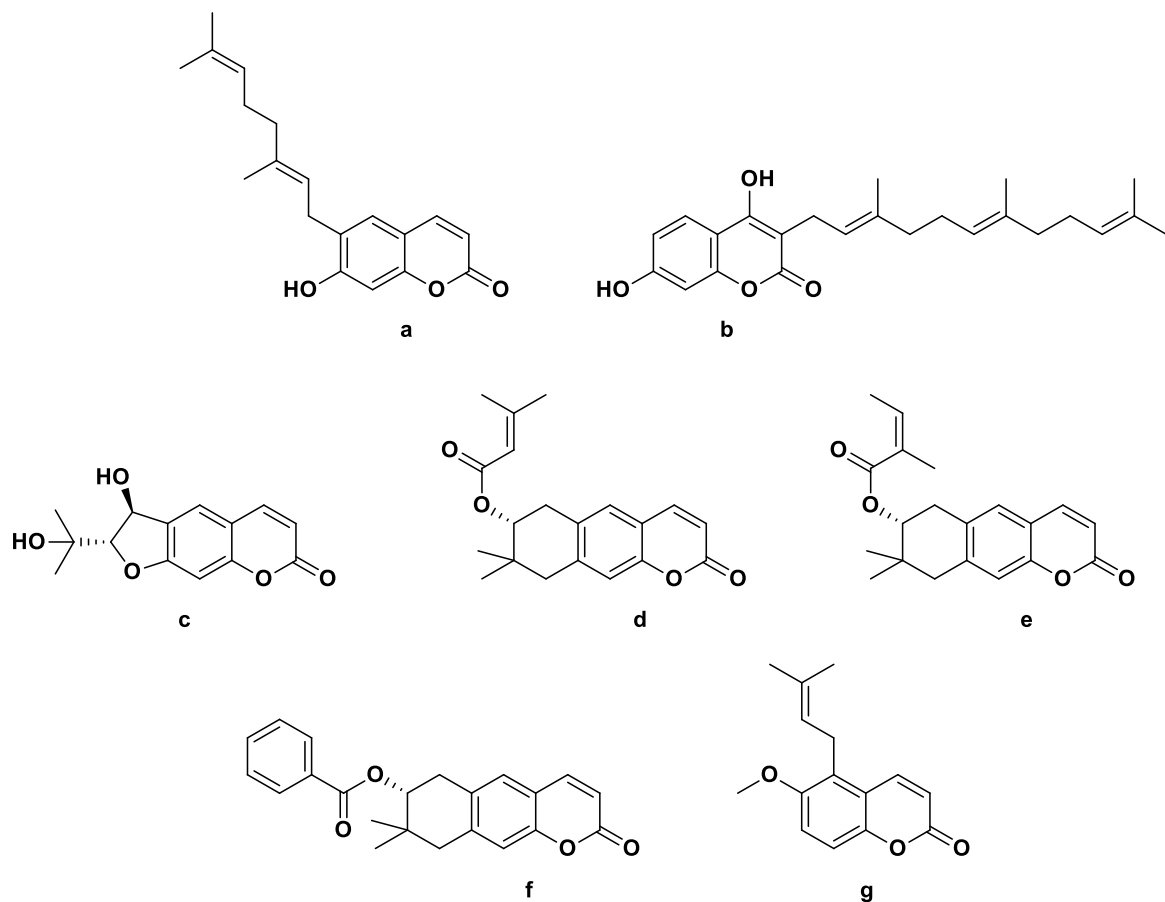
Σχήμα 1.8 Χημική δομή Novobiocin και Clorobiocin.

Ωστόσο, προβλήματα όπως η χαμηλή υδατοδιαλυτότητα, η τοξικότητα, αλλά και η εμφάνιση ανθεκτικότητας των βακτηρίων έναντι των Novobiocin και Clorobiocin, έχουν οδηγήσει στη σύνθεση νέων συνθετικών αναλόγων τους. Ειδικότερα, η σύνθεση πραγματοποιήθηκε με τη χρήση της μοριακής βιολογίας και σχεδιασμένες αλλαγές στο επίπεδο των γονιδίων (mutasynthesis) με στόχο την ανάπτυξη νέων κουμαρινικών αναλόγων αναστολέων της βακτηριακής DNA γυράσης [17].

Άλλες φυσικές κουμαρίνες που έχουν επιδείξει αξιόλογη αντιμικροβιακή δράση αποτελούν η συμπελιφερόνη (7-υδροξυ-κουμαρίνη), η εσκουλετίνη (6,7-διυδροξυ-κουμαρίνη) και η δαφνετίνη (7,8-διυδροξυ-κουμαρίνη), οι οποίες εξετάστηκαν έναντι του βακτηρίου *Ralstonia solanacearum* και παρουσίασαν τιμές ελάχιστης ανασταλτικής συγκέντρωσης (Minimum Inhibitory concentrations, MICs) 256, 192 και 64 mg/L, αντίστοιχα. Βρέθηκε επομένως άμεση συσχέτιση της δομής τους με την αντιβακτηριακή δράση και συγκεκριμένα, η παρουσία δύο υδροξυλομάδων στον κουμαρινικό σκελετό ενίσχυσε τη δράση, με τη δαφνετίνη να επιδεικνύει την υψηλότερη βιοδραστικότητα. Επιπλέον, ο μηχανισμός της δράσης της

εσκουλετίνης και της δαφνετίνης βρέθηκε ότι έγκειται στην καταστροφή της μεμβράνης του βακτηρίου [18].

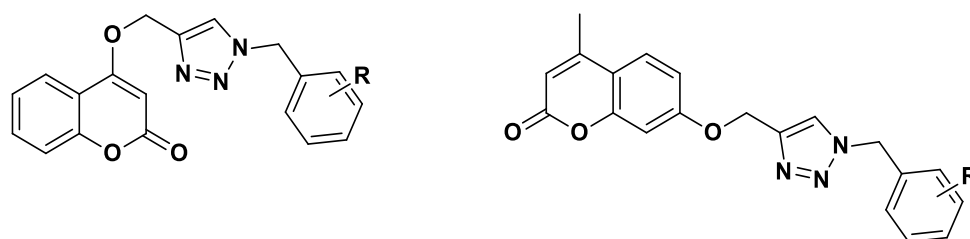
Ακόμη, τα φυσικά παράγωγα της ουμπελιφερόνης 6-γερανυλο-7-υδροξυ-κουμαρίνη (ostruthin) και 4,7-διυδροξυ-3-φαρνεσυλο-κουμαρίνη (ammoresinol) έχουν βρεθεί δραστικά έναντι μεγάλου εύρους βακτηρίων, έναντι θετικών κατά Gram βακτηρίων, όπως *Bacillus megaterium*, *Micrococcus luteus*, *Micrococcus lysodeikticus* και *Staphylococcus aureus*. Η ανθογενόλη (anthogenol), απομονωμένη από πράσινα φρούτα του *Aegle marmelos* έχει παρουσιάσει αντιμικροβιακή δράση έναντι του *Enterococcus*. Ακόμη, οι grandivittin, agasyllin, aegelinol benzoate και οσθόλη (osthole), απομονωμένες από τις ρίζες του *Ferulago campestris* (Apiaceae) παρουσίασαν αντιβακτηριακή δράση έναντι πλήθους θετικών και αρνητικών κατά Gram βακτηρίων, όπως *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhi*, *Enterobacter cloacae* και *Enterobacter aerogenes* [19] (Σχήμα 1.9).



Σχήμα 1.9 Χημική δομή **a**: ostruthin, **b**: ammoresinol, **c**: anthogenol, **d**: grandivittin, **e**: agasyllin, **f**: aegelinol benzoate, **g**: osthole.

Ακόμη, την τελευταία δεκαετία, έχει συντεθεί πλήθος κουμαρινικών αναλόγων με αξιόλογη αντιμικροβιακή δράση. Πιο συγκεκριμένα, οι Shaikh et al. [20] συνέθεσαν υβριδικά μόρια κουμαρινών-1,2,3-τριαζολίων με γενικές δομές που φαίνονται στο Σχήμα 1.10. Τα συντιθέμενα μόρια παρουσίασαν τιμές MIC μεταξύ 2 και 128 $\mu\text{g/mL}$, έναντι θετικών κατά Gram βακτηρίων όπως *Staphylococcus aureus*, *Micrococcus luteus* και *Bacillus cereus* και αρνητικών κατά Gram βακτηρίων όπως

Escherichia coli, *Pseudomonas fluorescens* και *Flavobacterium devorans*. Σε ορισμένες περιπτώσεις μάλιστα τα υβριδικά μόρια ξεπέρασαν την αντιμικροβιακή δράση των φαρμάκων που εξετάστηκαν ως πρότυπα. Ακόμη, γενική παρατήρηση σχέσης δομής-δράσης (Structure-Activity Relationship, SAR) αποτέλεσε ότι η υποκατάσταση σε παρα θέση οδήγησε σε ισχυρότερους αντιμικροβιακούς παράγοντες σε σχέση με την υποκατάσταση σε ορθο θέση, ενώ τα ανάλογα υποκατεστημένα με νιτρο-ομάδα παρουσίασαν τη μέγιστη δράση.

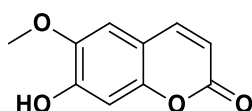


Σχήμα 1.10 Γενική δομή υβριδικών μορίων κουμαρινών-1,2,3-τριαζολίων.

1.4.2 Αντιμυκητιασική δράση

Οι ολοένα και αυξανόμενες μυκητιακές μολύνσεις που παρατηρούνται στις μέρες μας, η δημιουργία μυκήτων ανθεκτικών στα υπάρχοντα φάρμακα, καθώς και η τοξικότητα και το υψηλό κόστος των φαρμάκων, καθιστούν απαραίτητη την ενίσχυση της έρευνας για φυσικά προϊόντα με αντιμυκητιασική δράση [21]. Ανάμεσα σ' αυτά συγκαταλέγονται και οι κουμαρίνες, με την οσθόλη (7-μεθοξυ-8-πρενυλο-κουμαρίνη) να χρησιμοποιείται παραδοσιακά μέσω βοτάνων εδώ και πολλά χρόνια στην Κίνα, εναντίον φυτοπαθογόνων μυκήτων, όπως ο *Rhizoctonia solani* [22].

Σε πρόσφατη έρευνα των Lemos et al. [23], βρέθηκε ότι η σκοπολετίνη (6-μεθοξυ-7-υδροξυ-κουμαρίνη) (Σχήμα 1.11) παρουσιάζει αξιόλογη αντιμυκητιασική δράση έναντι του *Candida tropicalis* με τιμή MIC 50 μg/L, ενώ η φαρμακευτική ουσία φλουκοναζόλη που χρησιμοποιήθηκε ως πρότυπο παρουσίασε τιμή MIC πέντε φορές υψηλότερη (250 μg/L). Τέλος, η αντιμυκητιασική δράση της σκοπολετίνης φαίνεται να σχετίζεται με την ικανότητα της να επιδρά στη μεμβράνη των κυττάρων.

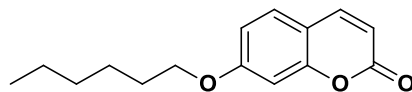


Σχήμα 1.11 Χημική δομή της σκοπολετίνης.

Σε μελέτη των He et al. [24], εξετάστηκε η αντιμυκητιασική δράση εκχυλισμάτων από τα φρούτα του φυτού *Cnidium monnieri*, πέντε κουμαρινών που απομονώθηκαν από τα εκχυλίσματα καθώς και δομικά τροποποιημένων αναλόγων τους. Ειδικότερα, βρέθηκε ότι η 4-μεθοξυ-κουμαρίνη παρουσίασε την ισχυρότερη αντιμυκητιασική δράση έναντι πέντε διαφορετικών μυκήτων, μεταξύ

όλων των εξεταζόμενων κουμαρινών, συμπεριλαμβανομένης και της οσθόλης. Υψηλότερη δράση παρουσίασε έναντι του *Rhizoctonia solani* με τιμή μισής μέγιστης αποτελεσματικής συγκέντρωσης, EC₅₀ (Half maximal effective concentration), 21 μg mL⁻¹. Επιπλέον μελέτες έδειξαν ότι η ισχυρή δράση της έγκειται σε μία πληθώρα διαφορετικών μηχανισμών όπως αναστολή της β-οξειδωσης λιπαρών οξέων, ενώ επιφέρει και μιτοχονδριακή δυσλειτουργία. Η αντιμυκητιασική δράση της 4-μεθοξυ-κουμαρίνης επιβεβαιώθηκε και *in vivo*. Τέλος, είναι σημαντικό ότι μεταξύ των διαφορετικών εξεταζόμενων εκχυλισμάτων, καλύτερη δράση εμφάνισε το εκχύλισμα ακετόνης το οποίο περιείχε και τα υψηλότερα ποσοστά κουμαρινών.

Ακόμη, σε πρόσφατη μελέτη των Ferreira et al. [25], πραγματοποιήθηκε ο σχεδιασμός και η σύνθεση νέων κουμαρινικών αναλόγων τα οποία εξετάστηκαν έναντι διαφορετικών στελεχών του μύκητα *Candida*. Το κουμαρινικό παράγωγο 7-πεντυλοξυ-κουμαρίνη που φαίνεται στο Σχήμα 1.12 παρουσίασε το καλύτερο προφίλ αντιμυκητιασικής δράσης. Ειδικότερα παρουσίασε στατιστικά σημαντική μείωση της ικανότητας σχηματισμού βιοφιλμ του στελέχους *C. tropicalis* ATCC 13803 στη συγκέντρωση των 0.268 μmol/mL. Στη συνέχεια μελετήθηκε ο μηχανισμός δράσης και βρέθηκε ότι σχετίζεται με την καταστροφή της κυτταρικής μεμβράνης, ενώ οι μελέτες μοριακής μοντελοποίησης υπέδειξαν ότι ενδεχομένως η 7-πεντυλοξυ-κουμαρίνη να επηρεάζει την οξειδοαναγωγική ισορροπία των κυττάρων.



Σχήμα 1.12 Χημική δομή 7-πεντυλοξυ-κουμαρίνης.

1.4.3 Αντιοξειδωτική δράση

Οι ελεύθερες ρίζες είναι άτομα, μόρια ή ιόντα που διαθέτουν μονήρη ηλεκτρόνια κι είναι πολύ δραστικές καθώς εύκολα αντιδρούν με άλλα χημικά είδη οδηγώντας στη δημιουργία αλυσιδωτών αντιδράσεων. Στα βιολογικά συστήματα, συνήθως προέρχονται από μόρια που περιέχουν άζωτο, οξυγόνο και θείο και ονομάζονται δραστικές μορφές οξυγόνου (Reactive Oxygen Species, ROS), δραστικές μορφές αζώτου (Reactive Nitrogen Species, RNS) και δραστικές μορφές θείου (Reactive Sulphur Species, RSS), αντίστοιχα. Παραδείγματα ελευθέρων ριζών που ανήκουν στις ROS αποτελούν το ανιόν του υπεροξειδίου O₂⁻, η ρίζα υδροξυλίου HO·, αλλά και το υπεροξείδιο του υδρογόνου (H₂O₂). Οι ελεύθερες ρίζες παράγονται κατά τη διάρκεια του κυτταρικού μεταβολισμού και όταν βρίσκονται σε φυσιολογικά επίπεδα συντελούν σε διάφορες λειτουργίες του ανθρώπινου οργανισμού, όπως στην αντιμετώπιση παθογόνων μικροοργανισμών [26]. Ωστόσο, εάν οι συγκεντρώσεις τους αυξηθούν σημαντικά μπορεί να έχουν αρνητικές επιδράσεις σε πολλά μόρια, όπως σε πρωτεΐνες, λιπίδια, μόρια DNA ή RNA, παρεμποδίζοντας τη λειτουργία τους, καθώς είναι μικρά και πολύ δραστικά μόρια. Ακόμη, δημιουργείται ανισορροπία στις οξειδοαναγωγικές αντιδράσεις του κυττάρου με

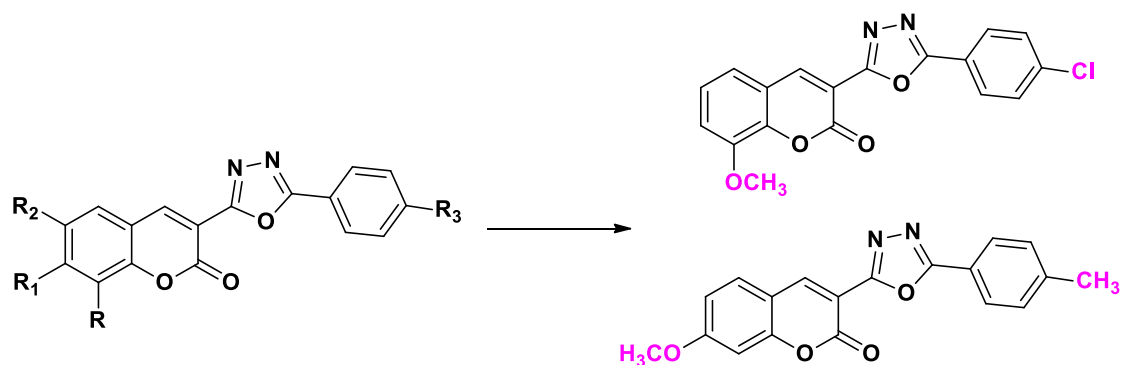
αποτέλεσμα τη δημιουργία οξειδωτικού στρες, το οποίο σχετίζεται με πολλές παθήσεις, ακόμη και με τη γήρανση [27].

Με στόχο τη μείωση ή και την αποφυγή τέτοιων επιπτώσεων, τόσο ο ανθρώπινος οργανισμός όσο και άλλοι οργανισμοί έχουν αναπτύξει ένα αντιοξειδωτικό σύστημα που εξουδετερώνει αυτές τις ρίζες.

Τα αντιοξειδωτικά μπορεί να είναι ενζυμικής φύσης ή και όχι και ρόλος τους είναι να εξουδετερώνουν τις ελεύθερες ρίζες, καθώς αποδέχονται ή προσφέρουν ηλεκτρόνια ώστε να εξαλείψουν την ύπαρξη μονήρων ηλεκτρονίων. Όταν αντιδρούν απευθείας με τις ελεύθερες ρίζες, μετατρέπονται τα ίδια σε ελεύθερες ρίζες, που είναι όμως λιγότερο δραστικές κι επικίνδυνες και οι οποίες στη συνέχεια εξουδετερώνονται από νέα αντιοξειδωτικά [28].

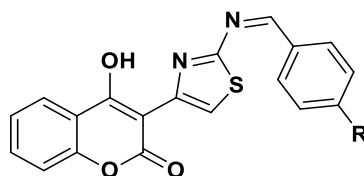
Στις μέρες μας υπάρχει ολοένα κι αυξανόμενο ενδιαφέρον για τα αντιοξειδωτικά, είτε αυτά αποσκοπούν στο να αποτρέψουν πιθανές τοξικές επιδράσεις των ελεύθερων ριζών στο ανθρώπινο σώμα είτε αποτρέπουν την οξείδωση των λιπαρών κι άλλων συστατικών των τροφίμων. Επιπλέον, έρευνες έχουν δείξει ότι τα αντιοξειδωτικά μειώνουν τον κίνδυνο εμφάνισης χρόνιων ασθενειών όπως είναι ο καρκίνος ή καρδιακά νοσήματα, ενώ υπάρχει μία προτίμηση για αντιοξειδωτικά που προέρχονται από φυσικές πηγές. Κυριότερες φυσικές πηγές αντιοξειδωτικών αποτελούν τα δημητριακά ολικής άλεσης, τα φρούτα και τα λαχανικά. Επομένως, τα περισσότερα αντιοξειδωτικά σε μία τυπική διατροφή είναι φυτικής προέλευσης και ανήκουν σε πολλές διαφορετικές οικογένειες ενώσεων. Οι κουμαρίνες αποτελούν χημικές ενώσεις που διαθέτουν ποικίλες φαρμακευτικές δράσεις, μεταξύ των οποίων και αντιοξειδωτική [29].

Σε έρευνα των Basappa et al. [30], συντέθηκαν νέα υβριδικά μόρια κουμαρινών-οξαδιαζολίων (Σχήμα 1.13) τα οποία εξετάστηκαν ως προς την αντιοξειδωτική τους δράση μέσω της δοκιμής δέσμευσης της ελεύθερης ρίζας DPPH (2,2-διφαινυλ-1-πικρυλδραζυλ) και της δέσμευσης ριζών υδροξυλίου HO[•]. Οι συντιθέμενες ενώσεις παρουσίασαν αξιόλογη αντιοξειδωτική δράση, σε ορισμένες περιπτώσεις υψηλότερη και από των προτύπων, ενώ τρία από τα εξεταζόμενα ανάλογα εμφάνισαν συνδυαστική δράση και μπορούν να χρησιμοποιηθούν για το σχεδιασμό νέων αντιοξειδωτικών παραγόντων.



Σχήμα 1.13 Γενική δομή υβριδικών μορίων κουμαρινών-οξαδιαζολίων (αριστερά) και χημική δομή των αναλόγων που παρουσίασαν την καλύτερη δράση (δεξιά).

Επιπλέον, η ερευνητική ομάδα του Benssalah και των συνεργατών του [31] συνέθεσε νέα κουμαρινικά παράγωγα με τη γενική δομή που φαίνεται στο Σχήμα 1.14, τα οποία εξετάστηκαν ως προς την ικανότητά τους να δεσμεύουν την ελεύθερη ρίζα DPPH στη συγκέντρωση των 100 μM . Τα παράγωγα που παρουσίασαν την υψηλότερη δράση διαθέτουν μεθυλο ή νιτρο ή και καθόλου υποκατάσταση ενώ η παρουσία μεθοξυ ή υδροξυ ομάδων μείωσε τη δράση.



Σχήμα 1.14 Γενική δομή νέων κουμαρινικών παραγώγων με αξιολογημένη αντιοξειδωτική δράση.

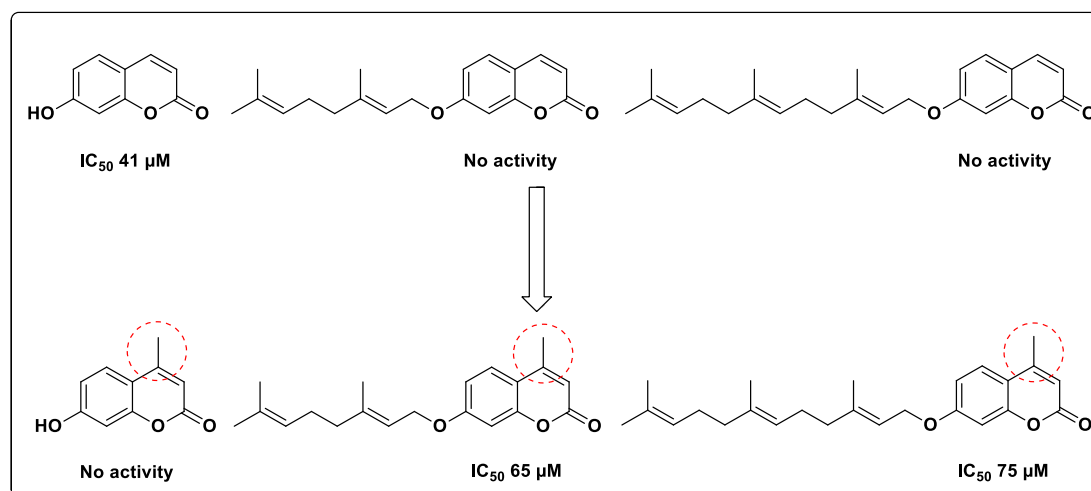
1.4.4 Αντιφλεγμονώδης δράση

Η φλεγμονή αποτελεί μία αντίδραση αυτό-προστασίας του οργανισμού που περιλαμβάνει φυσικές αναπροσαρμογές με στόχο τη μείωση της βλάβης του ιστού. Μπορεί να προκληθεί από πολλούς διαφορετικούς παράγοντες, όπως μολύνσεις και τραυματισμούς. Ανεξάρτητα από το αίτιο από το οποίο προκαλείται, τα συμπτώματα περιλαμβάνουν άλγος, τοπικά αυξημένη θερμοότητα και ερυθρότητα και οίδημα. Ακόμη, η φλεγμονή μπορεί να συνοδεύεται από πυρετό, αρθραλγίες, μυαλγίες και καταβολή δυνάμεων. Συνεπώς, η ικανότητα δημιουργίας φλεγμονώδους αντίδρασης στον ανθρώπινο οργανισμό είναι απαραίτητη για την αντιμετώπιση παθογόνων μικροοργανισμών και τραυματισμών. Ωστόσο, σε ορισμένες περιπτώσεις η αντίδραση αυτή μπορεί να είναι συνεχής και σε υπερβολικό βαθμό χωρίς εμφανές όφελος και να επιφέρει σοβαρές δυσμενείς επιπτώσεις [32,33].

Οι κουμαρίνες, τόσο φυσικής όσο και συνθετικής προέλευσης, έχουν επιδείξει αξιολογημένη αντιφλεγμονώδη δράση που έγκειται σε πληθώρα μηχανισμών. Αρχικά, ακόμη και η ίδια η κουμαρίνη έχει χρησιμοποιηθεί για την αντιμετώπιση του οιδήματος. Ακόμη, μεταξύ των φυσικών κουμαρινών, η εσκουλετίνη, η φραζετίνη (7,8-διυδροξυ-6-μεθοξυ-κουμαρίνη) και η δαφνετίνη έχουν διακριθεί για την αντιφλεγμονώδη δράση τους καθώς αποτελούν αναστολείς της λιποξυγονάσης και της κυκλοξυγονάσης, ενζύμων που σχετίζονται με τη φλεγμονή, αλλά μειώνουν και την παραγωγή ελευθέρων ριζών ανιόντων υπεροξειδίου από ουδετερόφιλα κύτταρα, τα οποία αποτελούν τον μεγαλύτερο πληθυσμό των λευκών αιμοσφαιρίων στα θηλαστικά και διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στον ανοσοποιητικό μηχανισμό του οργανισμού [34].

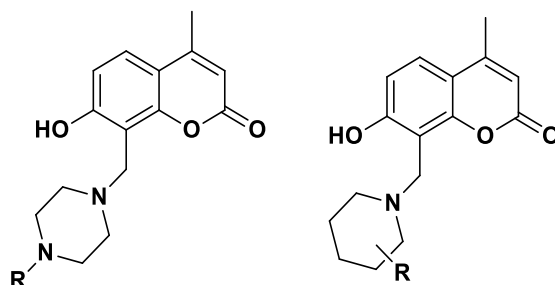
Ακόμη, σε έρευνα των Kavetsou et al. [35], μελετήθηκαν τόσο φυσικές κουμαρίνες όπως η ουμπελιφερόνη, 4-μεθυλο-ουμπελιφερόνη, ωραπτίνη (7-γερανυλοξυ-κουμαρίνη) και ουμπελιπρενίνη (7-φαρνεσυλοξυ-κουμαρίνη), όσο και συνθετικά ανάλογά τους ως προς την ικανότητά τους να αναστέλλουν τη λιποξυγονάση (LOX) από σόγια ως ένδειξη αντιφλεγμονώδους δράσης. Υψηλότερη ικανότητα

αναστολής της LOX επέδειξαν η ουμπελιφερόνη, η 4-μεθυλο-ωραπτίνη και η 4-μεθυλο-ουμπελιπρενίνη με τιμές IC_{50} , δηλαδή συγκέντρωσης στην οποία αναστέλλεται το 50% της δράσης του ενζύμου, 41, 65 και 75 μM , αντίστοιχα. Είναι αξιοσημείωτο ότι η παρουσία μεθυλο-ομάδας στη θέση του κουμαρινικού σκελετού αυξάνει σημαντικά τη δράση στην περίπτωση της ωραπτίνης και ουμπελιπρενίνης, ενώ για την ουμπελιφερόνη οδήγησε σε απώλεια της δράσης (Σχήμα 1.15).



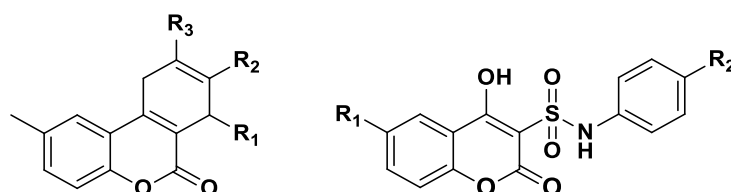
Σχήμα 1.15 Επίδραση υποκατάστασης με μεθυλο-ομάδα στη θέση 4 του κουμαρινικού σκελετού στη δράση έναντι της LOX.

Επιπλέον, πρόσφατα (2021), η ερευνητική ομάδα των Buran και των συνεργατών του [36], συνέθεσε κουμαρινικά ανάλογα της 4-μεθυλο-ουμπελιφερόνης με ομάδες πιπεραζίνης και πιπεριδίνης στη θέση 8 του κουμαρινικού σκελετού με γενική δομή όπως στο Σχήμα 1.16, τα οποία εξετάστηκαν στη συνέχεια ως προς την αντιφλεγμονώδη δράση τους μέσω της δοκιμής αναστολής παραγωγής ιόντων NO_2^- (nitrite inhibition assay). Τα κουμαρινικά ανάλογα που συντέθηκαν μελετήθηκαν σε συγκεντρώσεις 25-100 μM και παρουσίασαν αξιόλογη βιολογική δράση, ενώ παρατηρήθηκε ότι η υποκατάσταση του δακτυλίου πιπεριδίνης σε παρα θέση ευνόησε τη δράση. Αντίθετα, η υποκατάσταση με ομάδες δότες ή δέκτες ηλεκτρονίων, δεν έδωσε σταθερά αποτελέσματα ως προς την ικανότητα μείωσης των επιπέδων NO_2^- .



Σχήμα 1.16 Γενική δομή αναλόγων της 4-μεθυλο-ουμπελιφερόνης με αντιφλεγμονώδη δράση.

Μία ακόμη πρόσφατη μελέτη σχετικά με την αντιφλεγμονώδη δράση των κουμαρινών αποτελεί η μελέτη των Alshibl και των συνεργατών του [37], όπου συντέθηκαν τόσο πυρανοκουμαρίνες όσο και νέα υβριδικά μόρια κουμαρινών-σουλφοναμιδίων (Σχήμα 1.17) και εξετάστηκαν ως προς την ικανότητά τους να αναστέλλουν τη δράση πρωτεασών, ενζύμων που σχετίζονται με τη φλεγμονή και κυρίως με αρθρίτιδα. Σε αυτό το πλαίσιο, παρατηρήθηκε ότι οι πυρανοκουμαρίνες παρουσίασαν καλύτερη δράση σε σχέση με τα υβριδικά μόρια κουμαρινών-σουλφοναμιδίων. Τα μόρια που επέδειξαν υψηλότερη ανασταλτική δράση, εξετάστηκαν στη συνέχεια και ως προς την ικανότητά τους να αναστέλλουν τη δράση κυκλοξυγονασών (COX-1 και COX-2), ενώ η αντιφλεγμονώδης δράση τους επιβεβαιώθηκε και *in vivo*.

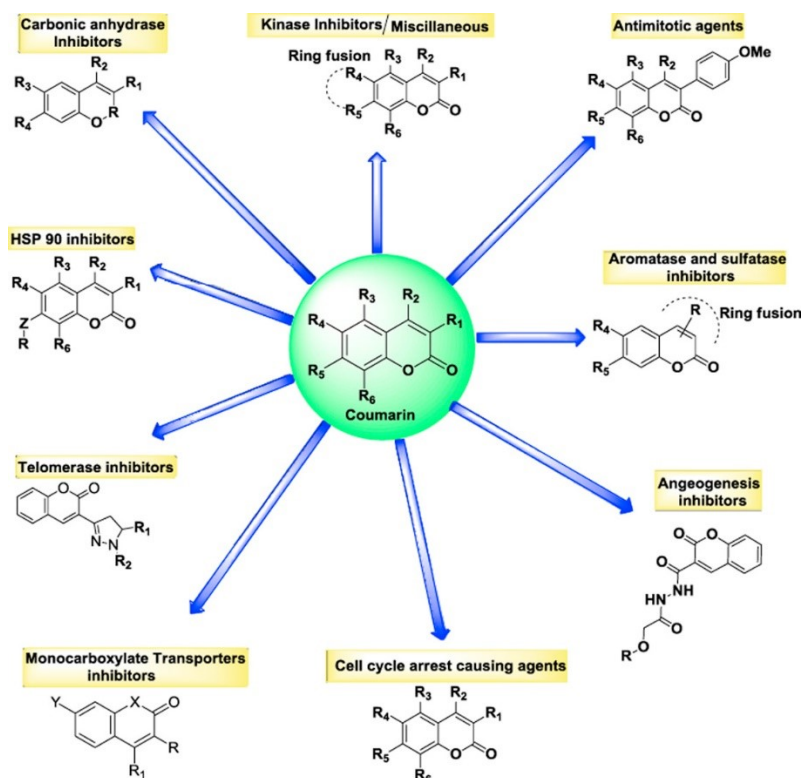


Σχήμα 1.17 Γενική δομή πυρανοκουμαρινών και υβριδικών μορίων κουμαρινών-σουλφοναμιδίων.

1.4.5 Αντικαρκινική δράση

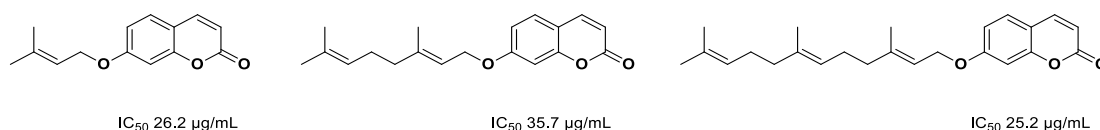
Είναι γνωστό ότι ακόμη και στις μέρες μας, ο καρκίνος εξακολουθεί να αποτελεί μία από τις κυριότερες αιτίες θανάτου παγκοσμίως (αφορά περίπου το 1/6 των θανάτων). Ο καρκίνος οδηγεί στη διαταραχή της λειτουργίας των κυττάρων και στον ανεξέλεγκτο πολλαπλασιασμό τους, ενώ προσβάλλει διάφορα κύτταρα και κατά συνέπεια όργανα, όπως τον πνεύμονα, το στήθος και τον προστάτη. Μάλιστα ο καρκίνος του στήθους αποτελεί τον πιο συχνά εμφανιζόμενο καρκίνο στις γυναίκες, προσβάλλοντας περίπου 1 στις 4 γυναίκες. Στις μέρες μας, εφαρμόζονται πολλές διαφορετικές μέθοδοι που αποσκοπούν στην ίαση του, όπως χημειοθεραπεία, χειρουργεία, ακτινοθεραπεία κ.α. χωρίς ωστόσο να χαρακτηρίζονται από πλήρη επιτυχία [38]. Το γεγονός αυτό έχει οδηγήσει σε έρευνες τόσο για την εύρεση νεότερων μεθόδων αντιμετώπισης (π.χ. εξατομικευμένη ιατρική) όσο και νέων φαρμάκων με αυξημένη αποτελεσματικότητα και μειωμένη τοξικότητα για τα υγιή κύτταρα.

Οι κουμαρίνες έχουν μελετηθεί ευρέως και έχουν επιδείξει αξιόλογη αντικαρκινική δράση, η οποία στηρίζεται σε ένα πλήθος διαφορετικών μηχανισμών. Ειδικότερα, διάφορα κουμαρινικά παράγωγα έχουν παρουσιάσει κυτταροτοξική δράση έναντι πολλών καρκινικών σειρών, αλλά και αναστολή της δράσης πρωτεϊνών οι οποίες σχετίζονται με τον καρκίνο, όπως οι τελομεράσες και καρβονικές ανυδράσες κ.α. Στην Εικόνα 1.3 που ακολουθεί παρουσιάζονται οι διαφορετικοί αντικαρκινικοί μηχανισμοί με τους οποίους δρουν οι κουμαρίνες, καθώς και χαρακτηριστικά παραδείγματα δομών σε κάθε περίπτωση.



Εικόνα 1.3 Αντικαρκινικοί μηχανισμοί δράσης κουμαρινικών αναλόγων [38].

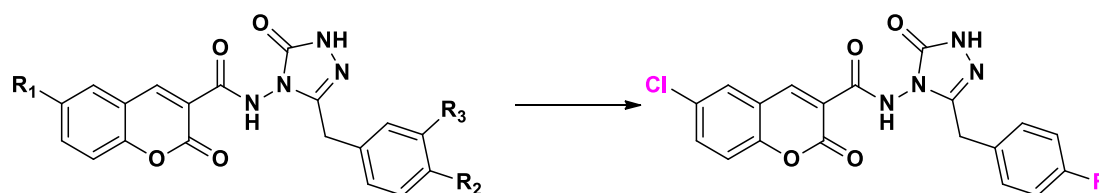
Ειδικότερα, σε έρευνα των Maleki et al. [39], εξετάστηκε η κυτταροτοξική δράση διαφορετικών πρενυλοξυ-κουμαρινικών αναλόγων υποκατεστημένων τόσο με ισοπεντενυλοξυ (C5), όσο και με γερανυλοξυ (C10) και φαρνεσυλοξυ (C15) αλυσίδες σε διάφορες θέσεις του κουμαρινικού σκελετού έναντι της καρκινικής σειράς ανθρώπινου αδενοκαρκινώματος HeLa. Η μελέτη έδειξε ότι η παρουσία πρενυλοξυ αλυσίδας στη θέση 6 του κουμαρινικού σκελετού ενίσχυσε σημαντικά τη δράση, ενώ είναι σημαντικό κανένα από τα συγκεκριμένα παράγωγα δεν παρουσίασε τοξικότητα έναντι των επιδερμικών ινοβλαστών HDF (Σχήμα 1.18). Τέλος, και τα τρία 6-πρενυλοξυ-παράγωγα που εξετάστηκαν φαίνεται να επιφέρουν κυτταροτοξικότητα μέσω απόπτωσης.



Σχήμα 1.18 Πρενυλοξυ-κουμαρινικά ανάλογα με κυτταροτοξική δράση έναντι των κυττάρων HeLa.

Ένα ακόμη παράδειγμα αποτελεί η ερευνητική εργασία των Mentese et al. [40], στην οποία συντέθηκαν νέα υβριδικά μόρια κουμαρινών-τριαζολίων και εξετάστηκαν έναντι διαφορετικών καρκινικών σειρών. Πιο συγκεκριμένα εξετάστηκαν έναντι καρκινικών κυττάρων πνεύμονα (CRL5807, HTB177), στήθους (MDA-MB231), προστάτη (PC-3), παγκρέατος (PANC-1) και δέρματος (CRL5826), αλλά και υγιών κυττάρων πνεύμονα (CCD34Lu). Τα περισσότερα από τα εξεταζόμενα μόρια παρουσίασαν υψηλή κυτταροτοξικότητα έναντι των καρκινικών σειρών, συγκρίσιμη ακόμα και με της δοξουβικίνης που

χρησιμοποιήθηκε ως πρότυπο. Τέλος, οι *in silico* μελέτες μοριακής μοντελοποίησης υπέδειξαν ότι πιθανώς τα μόρια να δρουν ως αναστολείς της τοποϊσομεράσης ΙΙα. Η γενική δομή των κουμαρινικών αναλόγων καθώς και η δομή του ικανότερου κυτταροτοξικού παράγοντα παρουσιάζονται στο Σχήμα 1.19.



Σχήμα 1.19 Γενική δομή νέων υβριδικών μορίων κουμαρινών-τριαζολίων (αριστερά) και χημική δομή του μορίου που παρουσίασε την ισχυρότερη δράση (δεξιά).

1.4.6 Νευροπροστατευτική δράση

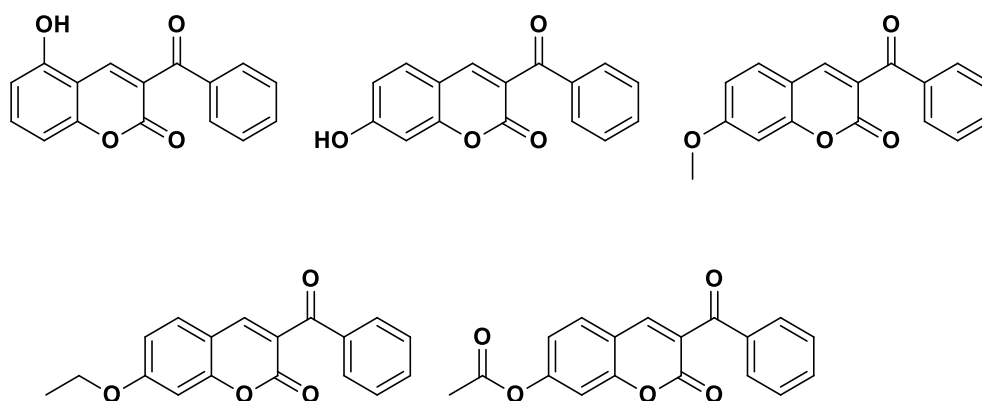
Οι νευροεκφυλιστικές παθήσεις αποτελούν μια ετερογενή ομάδα διαταραχών οι οποίες χαρακτηρίζονται από την προοδευτική εκφύλιση της δομής και λειτουργίας του κεντρικού (ΚΝΣ) και περιφερικού νευρικού συστήματος (ΠΝΣ). Οι παθήσεις αυτές αφορούν μεγάλο μέρος του πληθυσμού παγκοσμίως και επηρεάζουν περισσότερους από 10 εκατομμύρια ασθενείς κάθε χρόνο, με συχνότερα εμφανιζόμενες τις νόσους Αλτσχάιμερ (Alzheimer's Disease, AD) και Πάρκινσον (Parkinson Disease, PD). Οι νευροεκφυλιστικές νόσοι χαρακτηρίζονται από διαφορετικές παθοφυσιολογίες, με ορισμένες να προκαλούν νοητικές διαταραχές ή βλάβες στη μνήμη, ενώ άλλες επηρεάζουν την ικανότητα του ατόμου να κινηθεί, να μιλήσει ή και να αναπνεύσει [41,42].

Υπάρχουν αρκετοί παράγοντες που επηρεάζουν την εμφάνιση των νευροεκφυλιστικών ασθενειών, όπως γενετικοί ή περιβαλλοντικοί, με κυριότερο την ηλικία. Καθώς λοιπόν τα τελευταία χρόνια το προσδόκιμο ζωής και ο πληθυσμός άνω των 65 έχουν αυξηθεί σημαντικά, έχει αυξηθεί και η συχνότητα εμφάνισης νευροεκφυλιστικών ασθενειών, ενώ έρευνες εκτιμούν πως ο αριθμός τους θα αυξηθεί σημαντικά μέσα στις επόμενες δεκαετίες [43]. Ωστόσο, ενώ τα φάρμακα που έχουν αναπτυχθεί μέχρι σήμερα προσφέρουν μερική ανακούφιση των συμπτωμάτων και σε ορισμένες περιπτώσεις επιβράδυνση της εξέλιξης της νόσου, η χρόνια λήψη τους δεν επιτρέπει την πλήρη ίαση και συχνά επιφέρει παρενέργειες. Συνεπώς, καθίσταται επιτακτική η ανάγκη έρευνας και ανάπτυξης νέων φαρμάκων για την αντιμετώπισή τους.

Σε αυτό το πλαίσιο, νεότερες έρευνες έχουν δείξει ότι οι κουμαρίνες έχουν παρουσιάσει αξιολογημένη νευροπροστατευτική δράση. Παραδείγματος χάριν, η ερευνητική ομάδα του Wu και των συνεργατών του [44] απομόνωσε τριάντα δύο κουμαρινικά ανάλογα από εκχύλισμα του *Gerbera anandria* (Linn.) Sch.-Bip. και στη συνέχεια αξιολόγησε τη νευροπροστατευτική τους δράση σε νευρικά κύτταρα PC12 στα οποία αφότου χορηγήθηκαν οι εξεταζόμενες ενώσεις, προκλήθηκε κατάλληλη βλάβη με τη χρήση σκοπολαμίνης. Πιο συγκεκριμένα, η σκοπολαμίνη

προκαλεί διαταραχές της χολινεργικής μεταβίβασης και προκαλεί αυξημένη παραγωγή ελευθέρων ριζών [45]. Σε αυτό το πλαίσιο, βρέθηκε ότι η χορήγηση των κουμαρινικών αναλόγων πριν από τη σκοπολαμίνη, οδήγησε σε μειωμένη παραγωγή ελευθέρων ριζών και αυξημένη λειτουργία του αντιοξειδωτικού ενζύμου δισμουτάση του υπεροξειδίου του υδρογόνου (Superoxide dismutase, SOD).

Ακόμη, η ερευνητική ομάδα των Lin et al. [46], μελέτησε τη νευροπροστατευτική δράση επιλεγμένων κουμαρινικών αναλόγων τα οποία επέδειξαν αξιολογη δράση μέσω πολλών μηχανισμών (Σχήμα 1.20). Ειδικότερα, βρέθηκε ότι τα εξεταζόμενα παράγωγα μείωσαν τη συσσώρευση της πρωτεΐνης ταυ (tau), η οποία σχετίζεται με την άνοια και τη νόσο του Αλτσχάιμερ, αλλά και την παραγωγή δραστικών μορφών οξυγόνου (ROS). Ακόμη, παρουσίασαν ικανοποιητική ανασταλτική δράση έναντι των κασπασών 1, 3 και 6, που αποτελούν ένζυμα που σχετίζονται με φλεγμονή και νευροπάθεια.



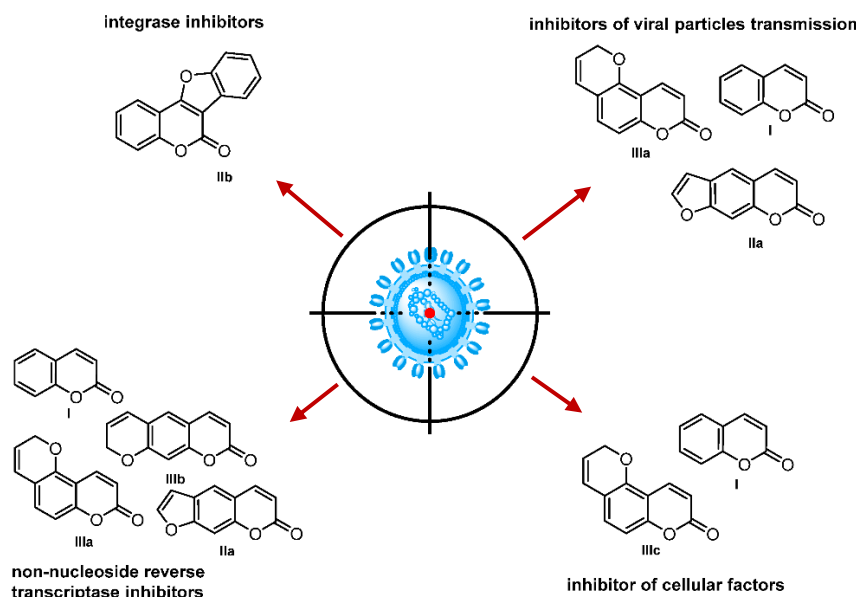
Σχήμα 1.20 Χημική δομή κουμαρινικών αναλόγων με αξιολογη νευροπροστατευτική δράση.

1.4.7 Αντιική δράση

Πολλά φυσικά προϊόντα έχουν επιδείξει αξιολογη αντιική δράση, μεταξύ των οποίων και οι κουμαρίνες. Οι κουμαρίνες διακρίνονται για την αντιική τους δράση λόγω της πληθώρας μηχανισμών μέσω των οποίων δρουν έναντι ιών, όπως ο ιός ανθρώπινης ανοσοανεπάρκειας (Human Immunodeficiency Virus, HIV), οι ιοί ηπατίτιδας Β και C (Hepatitis B and C Viruses, HBV και HCV, αντίστοιχα), η γρίπη (εποχιακή, πανδημία), η ευλογιά κ.α. [47]. Ακόμη, *in silico* μελέτης μοριακής μοντελοποίησης έναντι πρωτεϊνών του SARS-CoV-2, καθιστούν τις κουμαρίνες ως αρκετά υποσχόμενες δομές [48,49].

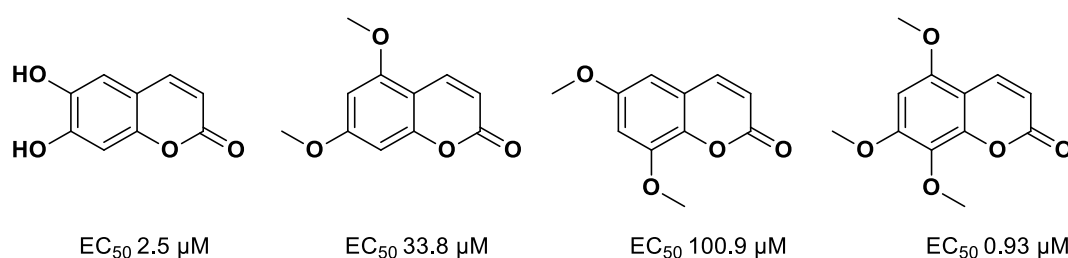
Τα κουμαρινικά παράγωγα έχουν μελετηθεί ευρέως για τη δράση τους έναντι του HIV. Είναι αξιοσημείωτο ότι οι κουμαρίνες δρουν μέσω πολλών μονοπατιών, όπως αναστολή της ιντεγκράσης (ένζυμο απαραίτητο για τη σύνδεση του ιού με τον ξενιστή), αναστέλλοντας παράγοντες όπως ο NF-κΒ ή αποτρέποντας την είσοδο σωματιδίων του ιού από τα μολυσμένα μακροφάγα κύτταρα σε υγιή. Οι

μηχανισμοί συνοψίζονται στην Εικόνα 1.4, ενώ για ορισμένα παράγωγα δεν έχει εξακριβωθεί ο μηχανισμός δράσης τους [50].



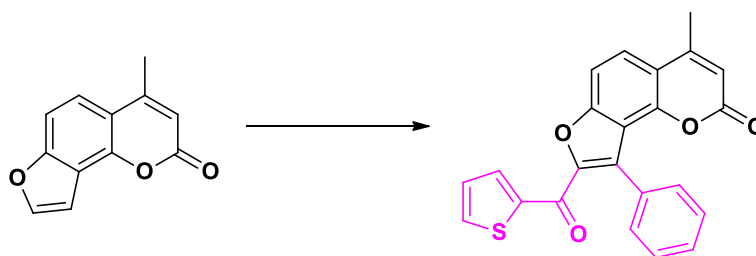
Εικόνα 1.4 Μηχανισμοί δράσης των κουμαρινών έναντι του HIV [50].

Ακόμη, είναι σημαντικό ότι κουμαρίνες φυσικής προέλευσης όπως η 6,7-διυδροξυκουμαρίνη (εσκουλετίνη), η 5,7-διμεθοξυκουμαρίνη (citropten), η 6,8-διμεθοξυκουμαρίνη και η 5,7,8-τριμεθοξυκουμαρίνη, όλες απομονωμένες από φυτά, παρουσίασαν σημαντική δράση έναντι του HIV (Σχήμα 1.21). Ειδικότερα, η 5,7,8-τριμεθοξυκουμαρίνη, η οποία απομονώθηκε από φυτά του είδους *Zapota ailanthoides*, παρουσίασε τιμή EC_{50} 0.93 μ M.



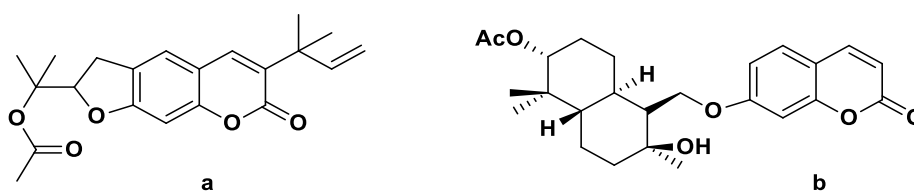
Σχήμα 1.21 Χημική δομή κουμαρινικών αναλόγων φυσικής προέλευσης με αντι-HIV δράση.

Επιπλέον, σε μελέτη των Yeh et al. [51], βρέθηκε με τη χρήση κατάλληλων υπολογιστικών εργαλείων ότι ανάλογα της αγγελικίνης δρουν έναντι της γρίπης τύπου A (H1N1). Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκαν ενδεδειγμένες μελέτες σχέσης δομής-δράσης, σύμφωνα με τις οποίες συντέθηκε το παράγωγο του Σχήματος 1.22, το οποίο παρουσιάζει αξιόλογη δράση έναντι των H₁N₁, H₃N₂ και γρίπης τύπου B, συγκρίσιμη μάλιστα με τη δράση της ζαναμιβίρης, εγκεκριμένου αντικού φαρμάκου.



Σχήμα 1.22 Χημική δομή αγγελικίνης (αριστερά) και συνθετικού αναλόγου της με αξιόλογη αντική δράση (δεξιά).

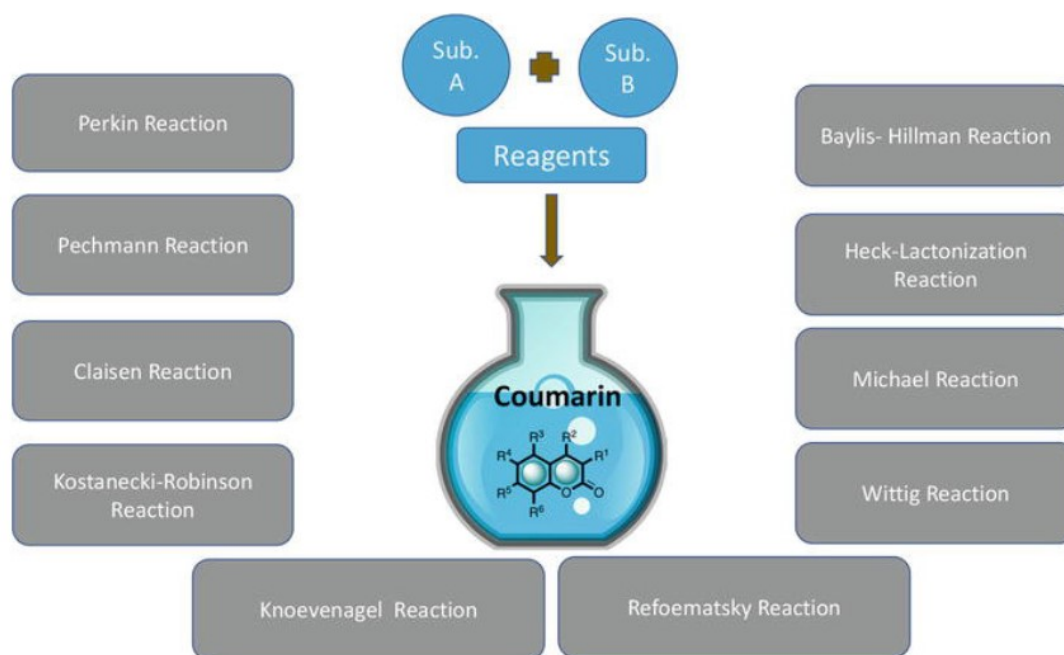
Τέλος, οι κουμαρίνες έχουν παρουσιάσει σημαντική δράση έναντι διαφορετικών στελεχών ερπητοϊού (Herpes Simplex Virus, HSV). Ειδικότερα, η ερευνητική ομάδα των Xu et al. [52], μελέτησε την αντική δράση της ρουταμαρίνης, η οποία αποτελεί μία φυσική φουρανοκουμαρίνη απομονωμένη από το φυτό *Ruta graveolens* L, με δομή που φαίνεται στο Σχήμα 1.23. Η routamarin παρουσίασε ισχυρή ανασταλτική ικανότητα της σύνθεσης του ιικού DNA και της αναπαραγωγής του ερπητοϊού με τιμή EC_{50} 1.62 μ M. Ακόμη, σε μελέτη των Ghannadi et al., η kellerin (Σχήμα 1.23), η οποία απομονώθηκε από τη ρητίνη του φυτού *Ferula asafoetida* παρουσίασε ικανοποιητική ανασταλτική δράση έναντι του ερπητοϊού τύπου 1 (HSV-1) με τιμή EC_{50} 38 μ g/mL [53].



Σχήμα 1.23 Χημική δομή: **a**: rutamarin και **b**: kellerin.

1.5 Σύνθεση των κουμαρινικών αναλόγων

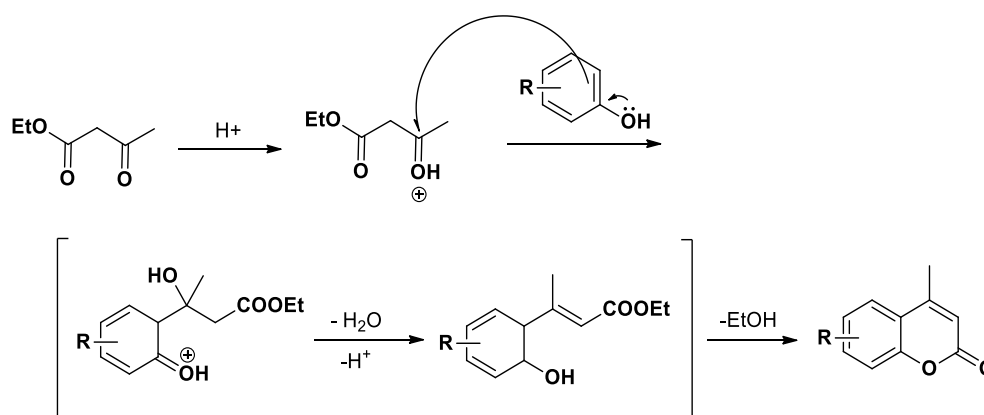
Οι πολλαπλές φαρμακευτικές δράσεις των κουμαρινικών αναλόγων έχουν οδηγήσει στην εντατική μελέτη ανάπτυξης νέων μεθοδολογιών για την αποδοτική σύνθεσή τους. Οι τεχνικές που έχουν αναπτυχθεί σε αυτό τον ενάμιση αιώνα χημικής σύνθεσης κουμαρινών είναι πολυπληθείς και περιλαμβάνουν ποικίλους μηχανισμούς. Οι κυριότερες μέθοδοι χημικής σύνθεσης κουμαρινών, είναι η αντίδραση Perkin, η συμπύκνωση Pechmann και οι αντιδράσεις Knoevenagel, Reformatsky και Wittig (Εικόνα 1.5) [54].



Εικόνα 1.5 Κυριότερες αντιδράσεις σύνθεσης κουμαρινών [54].

1.5.1 Συμπύκνωση Pechmann

Η αντίδραση Pechmann είναι η πιο ευρέως διαδεδομένη μέθοδος σύνθεσης κουμαρινών καθώς περιλαμβάνει τη συμπύκνωση φαινολών με β-κετο-εστέρες σε εξαιρετικές αποδόσεις. Η αντίδραση απαιτεί όξινο περιβάλλον και για το σκοπό αυτό έχει χρησιμοποιηθεί πλήθος όξινων καταλυτών όπως θειϊκό οξύ, τριφθοροξικό οξύ, πεντοξειδίο του φωσφόρου, τετραχλωριούχο τιτάριο (TiCl_4) και τετραχλωριούχο ζirkόνιο (ZrCl_4). Ένας πιθανός μηχανισμός της αντίδρασης παρουσιάζεται στο Σχήμα 1.24. Η αντίδραση ξεκινάει με ηλεκτρονιόφιλη αρωματική υποκατάσταση στη φαινόλη και συγκεκριμένα σε *o*-θέση ως προς το υδροξύλιο, από τον άνθρακα της καρβονυλικής ομάδας του β-κετο-εστέρα, προς σχηματισμό των ενδιάμεσων. Ακολουθεί λακτονοποίηση με απόσπαση νερού και αιθανόλης, για το σχηματισμό του κουμαρινικού προϊόντος [55].

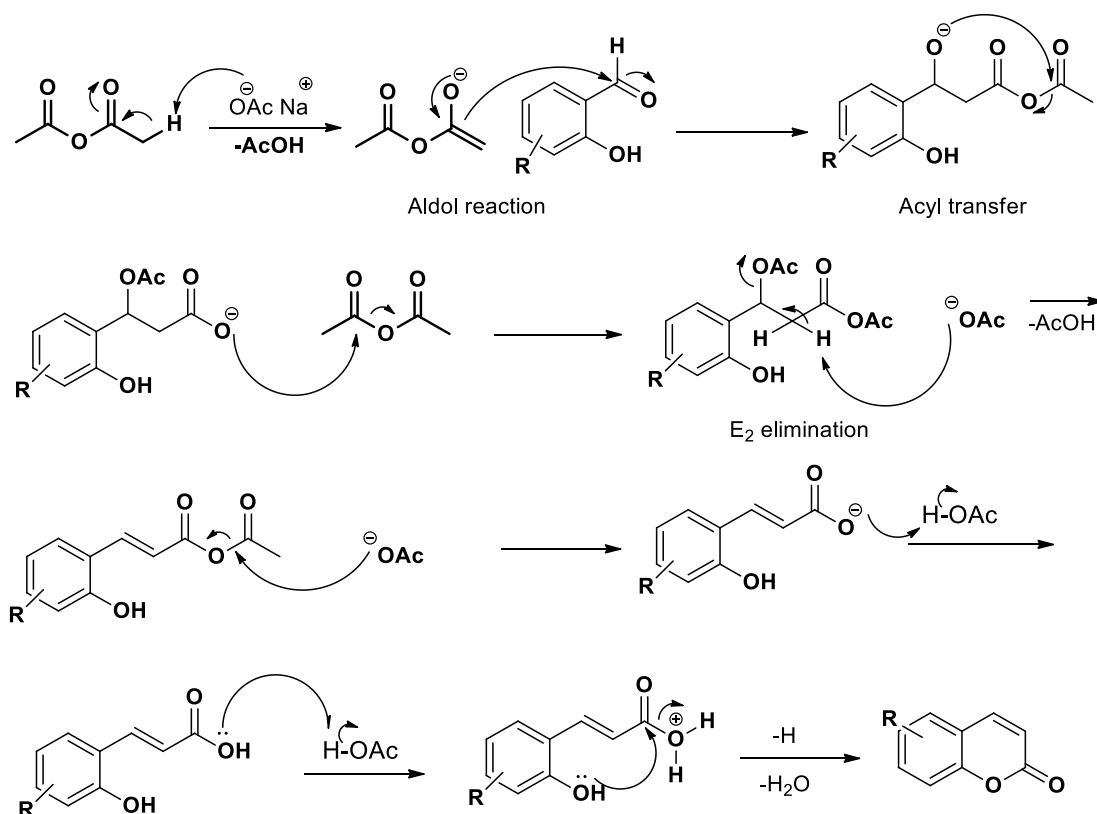


Σχήμα 1.24 Προτεινόμενος μηχανισμός συμπύκνωσης Pechmann.

Πλεονέκτημα της μεθόδου είναι οι απλές πρώτες ύλες που χρησιμοποιούνται και γι' αυτό το λόγο χρησιμοποιείται αρκετά συχνά μέχρι και σήμερα. Μειονεκτήματα αποτελούν ο αυξημένος χρόνος που απαιτείται για την αντίδραση, η επικινδυνότητα των χρησιμοποιούμενων όξινων καταλυτών ή και διαλυτών και τέλος η πιθανή δημιουργία παραπροϊόντων (π.χ. ισομερή, χρωμόνες κ.α.) και αλάτων που προκαλεί η εξουδετέρωση των οξέων μετά το πέρας της αντίδρασης [56]. Για το σκοπό αυτό, στις μέρες μας έχουν ερευνηθεί και χρησιμοποιούνται νεότεροι καταλύτες περισσότερο φιλικόι προς το περιβάλλον, όπως ετερογενείς καταλύτες στερεάς μορφής οι οποίοι μπορούν να επαναχρησιμοποιηθούν και οι οποίοι χρησιμοποιούνται απουσία διαλύτη, π.χ. τριχλωριούχος σίδηρος (FeCl_3) ή τριχλωριούχο αργίλιο (AlCl_3). Ακόμη είναι αξιοσημείωτο ότι οι συγκεκριμένοι καταλύτες μπορούν να χρησιμοποιηθούν απουσία διαλύτη καθώς και σε συνδυασμό με τεχνικές υψηλής ενέργειας όπως υπερηχητική ή μικροκυματική ακτινοβολία, αυξάνοντας με αυτό τον τρόπο σημαντικά την απόδοση της αντίδρασης [54,57]. Επιπλέον, έχουν αναπτυχθεί διάφοροι νανο-καταλύτες όπως μαγνητικά σωματίδια επιτεταρτοξειδίου του σιδήρου (Fe_3O_4) τα οποία μπορούν εύκολα να ανακτηθούν και να επαναχρησιμοποιηθούν [58]. Τέλος, σε έρευνα των Shararou και των συνεργατών του [59] πρόσφατα (2022), μελετήθηκε η πραγματοποίηση της αντίδρασης μέσω μηχανοχημικών μεθόδων, και συγκεκριμένα μέσω περιστροφής σκληρών σφαιρών με μεγάλη ταχύτητα, οι οποίες βρίσκονται σε επαφή με τα αντιδρώντα (μέθοδος ball milling). Οι μηχανοχημικές μέθοδοι πραγματοποιούνται συνήθως απουσία διαλύτη και σε συνθήκες περιβάλλοντος, οδηγώντας συχνά σε υψηλότερες αποδόσεις και στερεοεκλεκτικότητα.

1.5.2 Αντίδραση Perkin

Η αντίδραση Perkin ανακαλύφθηκε το 1968 από τον Perkin και περιλαμβάνει την αντίδραση σαλικυλαλδεϋδών με οξικό ανυδρίτη, παρουσία οξικού νατρίου ή και άλλων ασθενών βάσεων όπως τριαιθυλαμίνη. Η αντίδραση λαμβάνει χώρα διαμέσου πολλών σταδίων. Αρχικά, η αρωματική αλδεϋδη αντιδρά ως ηλεκτρονιόφιλο με το ενολικό ανιόν που προκύπτει από τον ανυδρίτη για να δώσει αλκοξείδιο του ανυδρίτη, το οποίο μέσω διαμοριακής ακυλίωσης σχηματίζει ακετυλοξυ καρβοξυλικά ιόντα. Ακολουθεί απόσπαση E_2 που καταλήγει στο σχηματισμό ενός α,β -ακόρεστου οξέος (κινναμωμικό οξύ), ενώ στο τέλος μέσω ενδομοριακής κυκλοποίησης παραλαμβάνουμε το τελικό προϊόν. Στο Σχήμα 1.25 παρουσιάζεται αναλυτικά ο μηχανισμός της αντίδρασης [60].



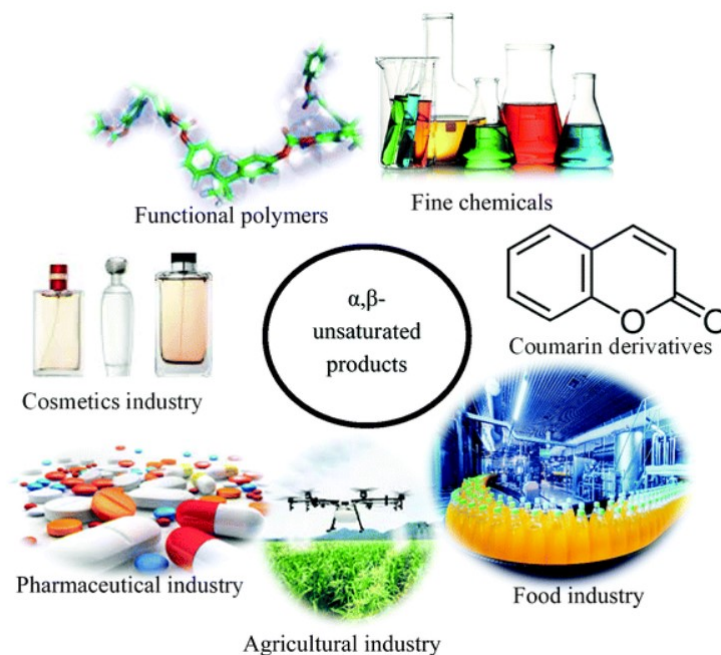
Σχήμα 1.25 Μηχανισμός αντίδρασης Perkin.

Μειονέκτημα της αντίδρασης Perkin αποτελεί ότι μέσω της συγκεκριμένης μεθόδου μπορούν να παραχθούν μόνο κουμαρίνες υποκατεστημένες στο βενζολικό και όχι τον πυρονικό δακτύλιο. Για την παραλαβή υποκατεστημένων κουμαρινών στις θέσεις του βενζολικού δακτυλίου απαιτείται η χρήση κατάλληλα υποκατεστημένων βενζαλδεϋδών, ενώ η υποκατάσταση του πυρονικού δακτυλίου μπορεί να πραγματοποιηθεί μόνο με προσθήκη των υποκαταστατών μετά τη σύνθεση του κουμαρινικού σκελετού μέσω κατάλληλων μεθόδων. Ακόμη, οι δραστικές συνθήκες που απαιτούνται (παρατεταμένη θέρμανση στους 150-200 °C) οδηγούν στο σχηματισμό ρητινωδών προϊόντων και σε ορισμένες περιπτώσεις σε σχηματισμό κουμαρικών οξέων αντί για κουμαρινών. Ωστόσο, πλεονέκτημα αποτελεί το γεγονός ότι δεν υπάρχει δυνατότητα σχηματισμού ισομερών προϊόντων [61].

1.5.3 Μέθοδος Knoevenagel

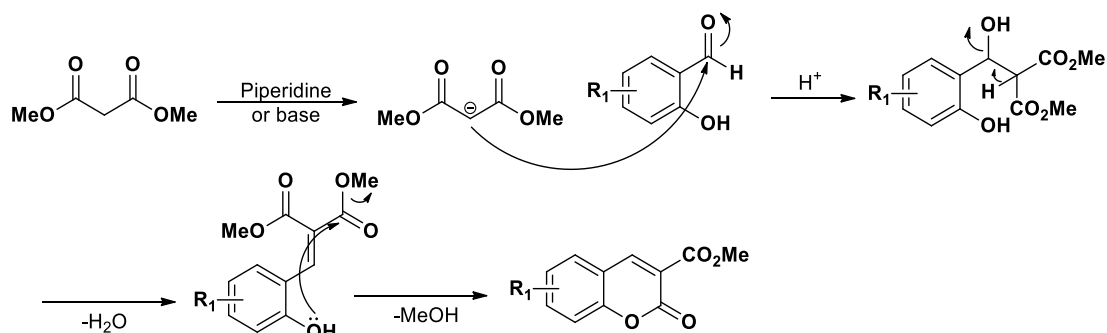
Η αντίδραση Knoevenagel αποτελεί μία από τις πιο γνωστές μεθόδους σύνθεσης στην Οργανική και Φαρμακευτική Χημεία που οδηγεί στο σχηματισμό δεσμού άνθρακα-άνθρακα (C-C) προς α,β-ακόρεστα προϊόντα. Αποτελεί μία αντίδραση συμπύκνωσης μεταξύ αλδεϋδών ή κετονών και ενώσεων που έχουν ενεργή μεθυλενική ομάδα (μηλονικούς εστέρες, κυανοξικούς εστέρες, μηλονονιτρίλια) παρουσία βάσης όπως, πυριδίνη, πιπεριδίνη κ.α. Μέσω της αντίδρασης Knoevenagel μπορεί να συντεθεί πλήθος οργανικών ενώσεων, μεταξύ των οποίων

και οι κουμαρίνες, με εφαρμογή σε πολλούς τομείς, όπως στη φαρμακευτική ή γεωργική βιομηχανία (Εικόνα 1.6) [62].



Εικόνα 1.6 Εφαρμογές αντίδρασης Knoevenagel [62].

Ο μηχανισμός της αντίδρασης περιλαμβάνει αρχικά πυρηνόφιλη προσθήκη της ένωσης με ενεργή μεθυλενική ομάδα στο καρβονύλιο της αλδεΐδης ή κετόνης, ενώ ακολουθεί απόσπαση νερού και μεθανόλης, για το σχηματισμό του κουμαρινικού προϊόντος μέσω λακτονοποίησης. Στην πραγματικότητα θεωρείται μία τροποποίηση της αλδολικής συμπύκνωσης. Στο Σχήμα 1.26 παρουσιάζεται ο μηχανισμός της αντίδρασης Knoevenagel για αντίδραση μεταξύ μίας σαλικυλαλδεΐδης και του μεθονικού διμεθυλεστέρα [63].

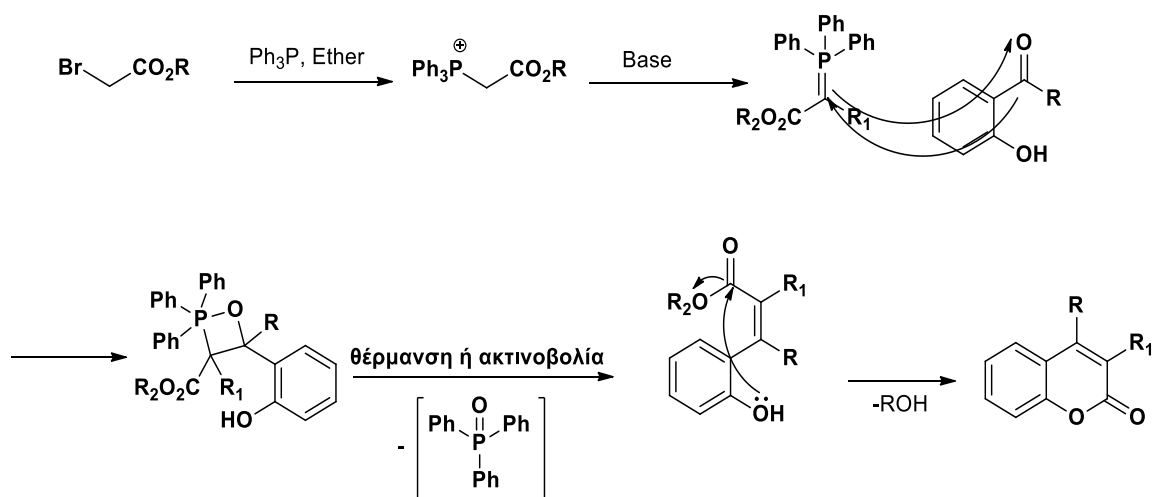


Σχήμα 1.26 Μηχανισμός αντίδρασης Knoevenagel.

Πλεονεκτήματα της μεθόδου περιλαμβάνουν την πραγματοποίησή της σε ήπιες συνθήκες, την εύκολη ανακλιμάκωσή της, τη δυνατότητα χρήσης πολλών υποστρωμάτων καθώς και την καλή οικονομία ατόμου [63].

1.5.4 Αντίδραση Wittig

Η αντίδραση Wittig ανακαλύφθηκε από το Γερμανό χημικό Georg Wittig, ο οποίος έλαβε βραβείο Νόμπελ Χημείας το 1979 για την ανακάλυψη αυτή. Η αντίδραση αυτή επιτρέπει την παρασκευή εξαιρετικά σημαντικών φυσικών προϊόντων καθώς και φαρμάκων. Οι *ο*-υδροξυβενζαλδεΐδες (σαλικυλαλδεΐδες) ή *ο*-υδροξυαρυλοκετόνες αντιδρούν με εστέρες του φωσφορανίου ($\text{Ph}_3\text{P}=\text{C}(\text{R}^1)\text{COOR}$) προς σχηματισμό κουμαρινικών παραγώγων. Αρχικά σχηματίζεται ο *trans*-*ο*-υδροξυκινναμωμικός εστέρας και στη συνέχεια ισομεριώνεται θερμικά ή φωτοχημικά προς το *cis*-ισομερές για να λακτονοποιηθεί τέλος προς κουμαρίνη (Σχήμα 1.27) [54].

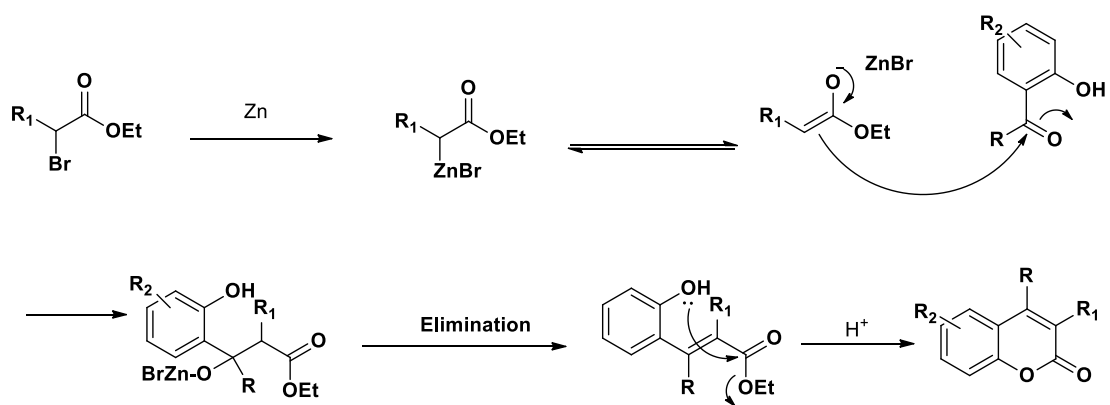


Σχήμα 1.27 Προτεινόμενος μηχανισμός αντίδρασης Wittig.

Πλεονεκτήματα της μεθόδου είναι οι ήπιες συνθήκες αντίδρασης, η απλή κατεργασία, οι υψηλές αποδόσεις και η έλλειψη παραπροϊόντων. Ως μειονέκτημα θεωρείται η δυσκολία παρασκευής των υποκατεστημένων *ο*-υδροξυβενζαλδεΐδων.

1.5.5 Αντίδραση Reformatsky

Η αντίδραση Reformatsky πραγματοποιείται μεταξύ α -βρωμο-εστέρων και ενώσεων που φέρουν καρβονύλιο, όπως αλδεΐδες, κετόνες και εστέρες παρουσία ψευδαργύρου. Ειδικότερα, αρχικά σχηματίζεται ένα αλκυλαλογονίδιο ψευδαργύρου, ενώ στη συνέχεια πραγματοποιείται 1,2 προσθήκη στο καρβονύλιο της ένωσης. Στη συνέχεια, σχηματίζονται ακόρεστοι κινναμωμικοί εστέρες, οι οποίοι μετασχηματίζονται σε υποκατεστημένες κουμαρίνες, όταν κατεργάζονται με οξύ (Σχήμα 1.28) [54,64].



Σχήμα 1.28 Μηχανισμός αντίδρασης Reformatsky.

1.6 ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- [1] P. Mathur, S. Misra, Metal-carbonyl promoted multicomponent coupling of alkynes for the synthesis of heterocyclic compounds, *Adv. Organomet. Chem.* 73 (2020) 253–304.
<https://doi.org/10.1016/BS.ADO MC.2019.09.001>.
- [2] M. D’Auria, A. Guarnaccio, R. Racioppi, S. Stoia, L. Emanuele, Photochemical synthesis of heterocyclic compounds, *Photochem. Heterocycles.* (2023) 1–89.
<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-823745-8.00006-6>.
- [3] E. Kabir, M. Uzzaman, A review on biological and medicinal impact of heterocyclic compounds, *Results Chem.* 4 (2022) 100606.
<https://doi.org/10.1016/J.RECHE M.2022.100606>.
- [4] M. Eymery, V.K. Tran-Nguyen, A. Boumendjel, Diversity-Oriented Synthesis: Amino Acetophenones as Building Blocks for the Synthesis of Natural Product Analogs, *Pharmaceuticals.* 14 (2021).
<https://doi.org/10.3390/PH14111127>.
- [5] Â.G. Batista, J.K. da Silva-Maia, M.R. Maróstica, Generation and alterations of bioactive organosulfur and phenolic compounds, *Chem. Chang. Dur. Process. Storage Foods Implic. Food Qual. Hum. Heal.* (2021) 537–577.
<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-817380-0.00011-7>.
- [6] A. Detsi, C. Kontogiorgis, D. Hadjipavlou-Litina, Coumarin derivatives: an updated patent review (2015-2016), *Expert Opin. Ther. Pat.* 27 (2017) 1201–1226.
<https://doi.org/10.1080/13543776.2017.1360284>.
- [7] H. Ullah, M. Daglia, Phytonutrients in the management of glucose metabolism, *Role Phytonutrients Metab. Disord.* (2022) 163–193.
<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-824356-5.00011-4>.
- [8] D.G. Zhao, A.Y. Zhou, Z. Du, Y. Zhang, K. Zhang, Y.Y. Ma, Coumarins with α -glucosidase and α -amylase inhibitory activities from the flower of *Edgeworthia gardneri*, *Fitoterapia.* 107 (2015) 122–127.
<https://doi.org/10.1016/J.FITOTE.2015.10.012>.
- [9] W. Eggleston, Coumarins, *Ref. Modul. Biomed. Sci.* (2023).
<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-824315-2.00541-8>.
- [10] J. Sharifi-Rad, N. Cruz-Martins, P. López-Jornet, E.P.F. Lopez, N. Harun, B. Yeskaliyeva, A. Beyatli, O. Sytar, S. Shaheen, F. Sharopov, Y. Taheri, A.O. Docea, D. Calina, W.C. Cho, Natural Coumarins: Exploring the Pharmacological Complexity and Underlying Molecular Mechanisms, *Oxid. Med. Cell. Longev.* 2021 (2021).
<https://doi.org/10.1155/2021/6492346>.
- [11] A. Carneiro, M.J. Matos, E.

- Uriarte, L. Santana, Trending topics on coumarin and its derivatives in 2020, *Molecules*. 26 (2021) 501. <https://doi.org/10.3390/molecules26020501>.
- [12] S. V. Bhat, B.A. Nagasampagi, M. Sivakumar, *Chemistry of natural products*, Springer, 2005.
- [13] S.S. Garg, J. Gupta, S. Sharma, D. Sahu, An insight into the therapeutic applications of coumarin compounds and their mechanisms of action, *Eur. J. Pharm. Sci.* 152 (2020) 105424. <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2020.105424>.
- [14] R.S. Cheke, H.M. Patel, V.M. Patil, I.A. Ansari, J.P. Ambhore, S.D. Shinde, A. Kadri, M. Snoussi, M. Adnan, P.S. Kharkar, V.R. Pasupuleti, P.K. Deshmukh, Molecular Insights into Coumarin Analogues as Antimicrobial Agents: Recent Developments in Drug Discovery, *Antibiot.* 11 (2022) 566. <https://doi.org/10.3390/ANTIBIOTICS11050566>.
- [15] M. Steffensky, A. Mühlenweg, Z.X. Wang, S.M. Li, L. Heide, Identification of the Novobiocin Biosynthetic Gene Cluster of *Streptomyces spheroides* NCIB 11891, *Antimicrob. Agents Chemother.* 44 (2000) 1214. <https://doi.org/10.1128/AAC.44.5.1214-1222.2000>.
- [16] Practical Antimicrobial Therapeutics, *Vet. Med.* (2017) 153–174. <https://doi.org/10.1016/B978-0-7020-5246-0.00006-1>.
- [17] U. Galm, S. Heller, S. Shapiro, M. Page, S.M. Li, L. Heide, Antimicrobial and DNA Gyrase-Inhibitory Activities of Novel Clorobiocin Derivatives Produced by Mutasynthesis, *Antimicrob. Agents Chemother.* 48 (2004) 1307. <https://doi.org/10.1128/AAC.48.4.1307-1312.2004>.
- [18] L. Yang, W. Ding, Y. Xu, D. Wu, S. Li, J. Chen, B. Guo, New Insights into the Antibacterial Activity of Hydroxycoumarins against *Ralstonia solanacearum*, *Mol.* 21 (2016) 468. <https://doi.org/10.3390/MOLECULES21040468>.
- [19] K.N. Venugopala, V. Rashmi, B. Odhav, Review on natural coumarin lead compounds for their pharmacological activity, *Biomed Res. Int.* 2013 (2013). <https://doi.org/10.1155/2013/963248>.
- [20] D. Feng, A. Zhang, Y. Yang, P. Yang, Coumarin-containing hybrids and their antibacterial activities, *Arch. Pharm. (Weinheim)*. 353 (2020) 1900380. <https://doi.org/10.1002/ARDP.201900380>.
- [21] R.S.A. de Araújo, F.Q.S. Guerra, E. de O. Lima, C.A. de Simone, J.F. Tavares, L. Scotti, M.T. Scotti, T.M. de Aquino, R.O. de Moura, F.J.B. Mendonça, J.M. Barbosa-Filho, Synthesis, Structure-Activity Relationships (SAR) and in Silico Studies of Coumarin Derivatives with Antifungal Activity, *Int. J. Mol. Sci.* 14 (2013) 1293–1309. <https://doi.org/10.3390/IJMS140>

- 11293.
- [22] M.Z. Zhang, Y. Zhang, J.Q. Wang, W.H. Zhang, Design, Synthesis and Antifungal Activity of Coumarin Ring-Opening Derivatives, *Molecules*. 21 (2016). <https://doi.org/10.3390/MOLECULES21101387>.
- [23] A.S.O. Lemos, J.R. Florêncio, N.C.C. Pinto, L.M. Campos, T.P. Silva, R.M. Grazul, P.F. Pinto, G.D. Tavares, E. Scio, A.C.M. Apolônio, R.C.N. Melo, R.L. Fabri, Antifungal Activity of the Natural Coumarin Scopoletin Against Planktonic Cells and Biofilms From a Multidrug-Resistant *Candida tropicalis* Strain, *Front. Microbiol.* 11 (2020). <https://doi.org/10.3389/FMICB.2020.01525>.
- [24] Y.H. He, X.F. Shang, H.X. Li, A.P. Li, C. Tang, B.Q. Zhang, Z.J. Zhang, R. Wang, Y. Ma, S.S. Du, Y.M. Hu, T.L. Wu, W. Bin Zhao, C.J. Yang, Y.Q. Liu, Antifungal Activity and Action Mechanism Study of Coumarins from *Cnidium monnieri* Fruit and Structurally Related Compounds, *Chem. Biodivers.* 18 (2021) e2100633. <https://doi.org/10.1002/CBDV.202100633>.
- [25] A.R. Ferreira, D. da N. Alves, R.D. de Castro, Y. Perez-Castillo, D.P. de Sousa, Synthesis of Coumarin and Homoisoflavonoid Derivatives and Analogs: The Search for New Antifungal Agents, *Pharmaceuticals*. 15 (2022) 712. <https://doi.org/10.3390/PH15060712/S1>.
- [26] V. Lobo, A. Patil, A. Phatak, N. Chandra, Free radicals, antioxidants and functional foods: Impact on human health, *Pharmacogn. Rev.* 4 (2010) 118. <https://doi.org/10.4103/0973-7847.70902>.
- [27] M. Valko, D. Leibfritz, J. Moncol, M.T.D. Cronin, M. Mazur, J. Telser, Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease, *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 39 (2007) 44–84. <https://doi.org/10.1016/J.BIOCELL.2006.07.001>.
- [28] J.M. Lü, P.H. Lin, Q. Yao, C. Chen, Chemical and molecular mechanisms of antioxidants: experimental approaches and model systems, *J. Cell. Mol. Med.* 14 (2010) 840–860. <https://doi.org/10.1111/J.1582-4934.2009.00897.X>.
- [29] A.S. Al-Ayed, Synthesis of New Substituted Chromen[4,3-c]pyrazol-4-ones and Their Antioxidant Activities, *Molecules*. 16 (2011) 10292. <https://doi.org/10.3390/MOLECULES161210292>.
- [30] V.C. Basappa, S. Penubolu, D.K. Achutha, A.K. Kariyappa, Synthesis, characterization and antioxidant activity studies of new coumarin tethered 1,3,4-oxadiazole analogues, *J. Chem. Sci.* 133 (2021) 1–8. <https://doi.org/10.1007/S12039-021-01914-5>.
- [31] D. Bensalah, A. Mnasri, A.

- Chakchouk-Mtibaa, L. Mansour, L. Mellouli, N. Hamdi, Synthesis and antioxidant properties of some new thiazolyl coumarin derivatives, [Http://Mc.Manuscriptcentral.Com/Tgcl](http://Mc.Manuscriptcentral.Com/Tgcl). 13 (2020) 155–163. <https://doi.org/10.1080/17518253.2020.1762935>.
- [32] D. Furman, J. Campisi, E. Verdin, P. Carrera-Bastos, S. Targ, C. Franceschi, L. Ferrucci, D.W. Gilroy, A. Fasano, G.W. Miller, A.H. Miller, A. Mantovani, C.M. Weyand, N. Barzilai, J.J. Goronzy, T.A. Rando, R.B. Effros, A. Lucia, N. Kleinstreuer, G.M. Slavich, Chronic inflammation in the etiology of disease across the life span, *Nat. Med.* 2019 2512. 25 (2019) 1822–1832. <https://doi.org/10.1038/s41591-019-0675-0>.
- [33] J. Leiba, R. Özbilgiç, L. Hernández, M. Demou, G. Lutfalla, L. Yatime, M. Nguyen-Chi, Molecular Actors of Inflammation and Their Signaling Pathways: Mechanistic Insights from Zebrafish, *Biol.* 12 (2023) 153. <https://doi.org/10.3390/BIOLOGY12020153>.
- [34] C.A.K. and, D.J. Hadjipavlou-Litina*, Synthesis and Antiinflammatory Activity of Coumarin Derivatives†,‡, *J. Med. Chem.* 48 (2005) 6400–6408. <https://doi.org/10.1021/JM0580149>.
- [35] E. Kavetsou, L. Gkionis, G. Galani, C. Gkolfinopoulou, L. Argyri, E. Pontiki, A. Chroni, D. Hadjipavlou-Litina, A. Detsi, Synthesis of prenyloxy coumarin analogues and evaluation of their antioxidant, lipoxygenase (LOX) inhibitory and cytotoxic activity, *Med. Chem. Res.* 26 (2017) 856–866. <https://doi.org/10.1007/s00044-017-1800-6>.
- [36] K. Buran, R. Reis, H. Sipahi, F.E. Önen Bayram, Piperazine and piperidine-substituted 7-hydroxy coumarins for the development of anti-inflammatory agents, *Arch. Pharm. (Weinheim)*. 354 (2021) 2000354. <https://doi.org/10.1002/ARDP.202000354>.
- [37] H.M. Alshibl, E.S. Al-Abdullah, M.E. Haiba, H.M. Alkahtani, G.E.A. Awad, A.H. Mahmoud, B.M.M. Ibrahim, A. Bari, A. Villinger, Synthesis and Evaluation of New Coumarin Derivatives as Antioxidant, Antimicrobial, and Anti-Inflammatory Agents, *Mol.* 25 (2020) 3251. <https://doi.org/10.3390/MOLECULES25143251>.
- [38] A. Thakur, R. Singla, V. Jaitak, Coumarins as anticancer agents: A review on synthetic strategies, mechanism of action and SAR studies, *Eur. J. Med. Chem.* 101 (2015) 476–495. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2015.07.010>.
- [39] E.H. Maleki, A.R. Bahrami, H. Sadeghian, M.M. Matin, Discovering the structure–activity relationships of different O-prenylated coumarin

- derivatives as effective anticancer agents in human cervical cancer cells, *Toxicol. Vitr.* 63 (2020) 104745. <https://doi.org/10.1016/J.TIV.2019.104745>.
- [40] E. Menteşe, A. Güner, E. Polatlı, M. Emirik, H. Bektaş, B. Kahveci, Synthesis and anticancer activities of some new coumarin derivatives including the triazole ring and their in silico molecular docking studies, *Arch. Pharm. (Weinheim)*. 354 (2021) 2000284. <https://doi.org/10.1002/ARDP.202000284>.
- [41] A.D. Gitler, P. Dhillon, J. Shorter, Neurodegenerative disease: Models, mechanisms, and a new hope, *DMM Dis. Model. Mech.* 10 (2017) 499–502. <https://doi.org/10.1242/dmm.030205>.
- [42] A. Tosun, S. Khan, Antioxidant Actions of Spices and Their Phytochemicals on Age-Related Diseases, in: *Bioact. Nutraceuticals Diet. Suppl. Neurol. Brain Dis. Prev. Ther.*, Elsevier Inc., 2015: 311–318. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-411462-3.00032-1>.
- [43] X. Castillo, S. Castro-Obregón, B. Gutiérrez-Becker, G. Gutiérrez-Ospina, N. Karalis, A.A. Khalil, J.S. Lopez-Noguerola, L.L. Rodríguez, E. Martínez-Martínez, C. Perez-Cruz, J. Pérez-Velázquez, A.L. Piña, K. Rubio, H.P.S. García, T. Syeda, A. Vanoye-Carlo, A. Villringer, K. Winek, M. Zille, Re-thinking the etiological framework of neurodegeneration, *Front. Neurosci.* 13 (2019) 728. <https://doi.org/10.3389/FNINS.2019.00728>.
- [44] Z. li Wu, P. li Huang, Q. Wang, J. yu Li, Z. shi Sun, H. liang Li, W. dong Zhang, Coumarin-monoterpenes from *Gerbera anandria* (Linn.) Sch.-Bip and their neuroprotective activity, *Bioorg. Chem.* 124 (2022) 105826. <https://doi.org/10.1016/J.BIOORG.2022.105826>.
- [45] Z. Bao, P. Zhang, J. Chen, J. Gao, S. Lin, N. Sun, Egg yolk phospholipids reverse scopolamine-induced spatial memory deficits in mice by attenuating cholinergic damage, *J. Funct. Foods.* 69 (2020) 103948. <https://doi.org/10.1016/J.JFF.2020.103948>.
- [46] T.H. Lin, K.H. Chang, Y.J. Chiu, Z.K. Weng, Y.C. Sun, W. Lin, G.J. Lee-Chen, C.M. Chen, Neuroprotective Action of Coumarin Derivatives through Activation of TRKB-CREB-BDNF Pathway and Reduction of Caspase Activity in Neuronal Cells Expressing Pro-Aggregated Tau Protein, *Int. J. Mol. Sci.* 23 (2022) 12734. <https://doi.org/10.3390/IJMS23112734>.
- [47] M.Z. Hassan, H. Osman, M.A. Ali, M.J. Ahsan, Therapeutic potential of coumarins as antiviral agents, *Eur. J. Med. Chem.* 123 (2016) 236. <https://doi.org/10.1016/J.EJMECH.2016.07.056>.
- [48] S. Katuwal, S.R. Upadhyaya, R. Marahatha, A. Shrestha, B.P.

- Regmi, K. Khadayat, S. Basnet, R.C. Basnyat, N. Parajuli, In Silico Study of Coumarins: Wedelolactone as a Potential Inhibitor of the Spike Protein of the SARS-CoV-2 Variants, *J. Trop. Med.* 2023 (2023) 1–19. <https://doi.org/10.1155/2023/4771745>.
- [49] U.R. Abdelmohsen, A. Albohy, B.S. Abdulrazik, S.A.L. Bayoumi, L.G. Malak, I.S.A. Khallaf, G. Bringmann, S.F. Farag, Natural coumarins as potential anti-SARS-CoV-2 agents supported by docking analysis, *RSC Adv.* 11 (2021) 16970. <https://doi.org/10.1039/D1RA01989A>.
- [50] A.D. Sharapov, R.F. Fatykhov, I.A. Khalymbadzha, G. V. Zyryanov, O.N. Chupakhin, M. V. Tsurkan, Plant Coumarins with Anti-HIV Activity: Isolation and Mechanisms of Action, *Int. J. Mol. Sci.* 24 (2023) 2839. <https://doi.org/10.3390/IJMS24032839>.
- [51] J.Y. Yeh, M.S. Coumar, J.T. Horng, H.Y. Shiao, F.M. Kuo, H.L. Lee, I.C. Chen, C.W. Chang, W.F. Tang, S.N. Tseng, C.J. Chen, S.R. Shih, J.T.A. Hsu, C.C. Liao, Y.S. Chao, H.P. Hsieh, Anti-influenza drug discovery: Structure-activity relationship and mechanistic insight into novel angelicin derivatives, *J. Med. Chem.* 53 (2010) 1519–1533. <https://doi.org/10.1021/JM901570X/>.
- [52] B. Xu, L. Wang, L. González-Molleda, Y. Wang, J. Xu, Y. Yuan, Antiviral Activity of (+)-Rutamarin against Kaposi's Sarcoma-Associated Herpesvirus by Inhibition of the Catalytic Activity of Human Topoisomerase II, *Antimicrob. Agents Chemother.* 58 (2014) 563. <https://doi.org/10.1128/AAC.01259-13>.
- [53] A. Ghannadi, K. Fattahian, Y. Shokoohinia, M. Behbahani, A. Shahnoush, Anti-Viral Evaluation of Sesquiterpene Coumarins from *Ferula assafoetida* against HSV-1, *Iran. J. Pharm. Res. IJPR.* 13 (2014) 523..
- [54] D. Sharma, V. Dhayalan, C. Manikandan, R. Dandela, Recent Methods for Synthesis of Coumarin Derivatives and Their New Applications, *IntechOpen.* (2022). <https://doi.org/10.5772/INTECHOPEN.108563>.
- [55] A. Amoozadeh, M. Ahmadzadeh, E. Kolvari, Easy access to coumarin derivatives using alumina sulfuric acid as an efficient and reusable catalyst under solvent-free conditions, *J. Chem.* (2013). <https://doi.org/10.1155/2013/767825>.
- [56] S. Gulati, R. Singh, S. Sangwan, A review on convenient synthesis of substituted coumarins using reusable solid acid catalysts, *RSC Adv.* 11 (2021) 29130–29155. <https://doi.org/10.1039/D1RA04887B>.
- [57] K.C. Prousis, N. Avlonitis, G.A.

- Heropoulos, T. Calogeropoulou, FeCl₃-catalysed ultrasonic-assisted, solvent-free synthesis of 4-substituted coumarins. A useful complement to the Pechmann reaction, *Ultrason. Sonochem.* 21 (2014) 937–942. <https://doi.org/10.1016/j.ultrasonch.2013.10.018>.
- [58] G.A. Gonçalves, V.L. Eifler-Lima, Coumarin synthesis via Pechmann condensation: toward a greener era (microreview), *Chem. Heterocycl. Compd.* 57 (2021) 734–736. <https://doi.org/10.1007/S10593-021-02975-7>.
- [59] A.D. Sharapov, R.F. Fatykhov, I.A. Khalymbadzha, V. V. Sharutin, S. Santra, G. V. Zyryanov, O.N. Chupakhin, B.C. Ranu, Mechanochemical synthesis of coumarins via Pechmann condensation under solvent-free conditions: an easy access to coumarins and annulated pyrano[2,3-*f*] and [3,2-*f*]indoles, *Green Chem.* 24 (2022) 2429–2437. <https://doi.org/10.1039/D1GC04564D>.
- [60] J.J. Li, Name reactions: a collection of detailed reaction mechanisms, (2009) 424.
- [61] Y.F. Mustafa, M. Bashir, M.K. Oglah, Original and Innovative Advances in the Synthetic Schemes of Coumarin-Based Derivatives: A Review The Physico-Chemical Properties of Bovine and Buffalo Whey Proteins Milk by Using Ultrafiltration Membrane Technology View project. <https://doi.org/10.31838/srp.2020.6.90>.
- [62] J.N. Appaturi, R. Ratti, B.L. Phoon, S.M. Batagarawa, I.U. Din, M. Selvaraj, R.J. Ramalingam, A review of the recent progress on heterogeneous catalysts for Knoevenagel condensation, *Dalt. Trans.* 50 (2021) 4445–4469. <https://doi.org/10.1039/D1DT00456E>.
- [63] M.M. Heravi, F. Janati, V. Zadsirjan, Applications of Knoevenagel condensation reaction in the total synthesis of natural products, *Monatshefte Fur Chemie.* 151 (2020) 439–482. <https://doi.org/10.1007/S00706-020-02586-6>.
- [64] R.L. Shriner, The Reformatsky Reaction, *Org. React.* (2011) 1–37. <https://doi.org/10.1002/0471264180.OR001.01>.

Κεφάλαιο 2ο

ΣΧΕΔΙΑΣΜΟΣ ΚΑΙ ΣΥΝΘΕΣΗ ΝΕΩΝ 3-ΑΡΥΛΟ-
ΚΟΥΜΑΡΙΝΙΚΩΝ ΑΝΑΛΟΓΩΝ ΚΑΙ ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ
ΤΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΚΗΣ ΤΟΥΣ ΔΡΑΣΗΣ

2.1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ

2.1.1 Οξειδωτικό στρες

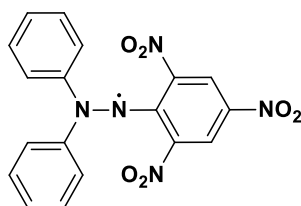
Το οξειδωτικό στρες αποτελεί μια διαταραχή της ισορροπίας μεταξύ της παραγωγής δραστικών μορφών οξυγόνου και της και της ικανότητας ενός βιολογικού συστήματος να αδρανοποιεί τα τοξικά αυτά μόρια και να επισκευάζει τις βλάβες που προκαλούν σε κύτταρα και ιστούς, ενώ σχετίζεται με πλήθος ασθενειών όπως νευροεκφυλιστικές διαταραχές και καρκίνο [1–3].

Τα αντιοξειδωτικά, ενδογενή ή εξωγενή, ενζυμικά ή μη ενζυμικά, αποτελούν βασικό αμυντικό μηχανισμό των κυττάρων, είτε αποτρέποντας το σχηματισμό των ROS είτε εξουδετερώνοντας τις και επιδιορθώνοντας πιθανές βλάβες που προκλήθηκαν [4]. Οι κουμαρίνες όπως έχει ήδη αναφερθεί διαθέτουν αξιολογημένη αντιοξειδωτική δράση μέσω πληθώρας διαφορετικών μηχανισμών όπως δεσμεύοντας ελεύθερες ρίζες ή ενισχύοντας τη δράση αντιοξειδωτικών ενζύμων [5]. Ο πολυπαραγοντικός χαρακτήρας του οξειδωτικού στρες [6], ωστόσο, απαιτεί την εξέταση της αντιοξειδωτικής δράσης μίας ένωσης με πολλούς διαφορετικούς τρόπους [7,8]. Ενδεικτικά, αναφέρονται ορισμένες βασικές μέθοδοι εκτίμησης της αντιοξειδωτικής δράσης οι οποίες θα χρησιμοποιηθούν στα πλαίσια της παρούσας διατριβής.

2.1.2 Μέθοδοι αξιολόγησης της αντιοξειδωτικής δράσης

2.1.2.1 Ικανότητα δέσμευσης της σταθερής ελεύθερης ρίζας DPPH

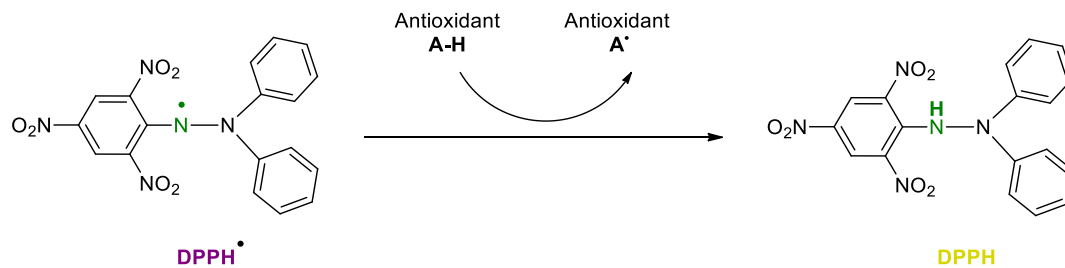
Η μέθοδος DPPH (1,1-diphenyl-2-picryl-hydrazyl, DPPH) σχεδιάστηκε το 1958 από τον Marseden S. Blois, ως μία απλή δοκιμή αντιοξειδωτικής δράσης χρησιμοποιώντας τη σταθερή ελεύθερη ρίζα 2,2-διφαινυλ-1-πικρυλυδραζύλιο (Σχήμα 2.1). Η ρίζα DPPH είναι μία από τις λίγες σταθερές και εμπορικά διαθέσιμες οργανικές ρίζες αζώτου, καθώς δεν αποσυντίθεται, δε διμερίζεται και δεν αντιδρά με το μοριακό οξυγόνο [9].



Σχήμα 2.1 Χημική δομή της σταθερής ελεύθερης ρίζας DPPH.

Η μέθοδος στηρίζεται στο γεγονός ότι η ελεύθερη ρίζα DPPH λόγω του μονήρους ηλεκτρονίου που διαθέτει, παρουσιάζει ένα έντονο πορφυρό χρώμα σε μορφή διαλύματος, το οποίο απορροφά στα 515 nm. Ωστόσο, όταν στο περιβάλλον της βρεθούν ενώσεις ικανές να μεταφέρουν ή να δώσουν ένα πρωτόνιο, η ρίζα DPPH ανάγεται σε υδραζίνη η οποία φέρει υποκίτρινο χρώμα, με αποτέλεσμα να μειώνεται η απορρόφηση του διαλύματος στα 515 nm [10]. Η μεταβολή της

έντασης απορρόφησης χρησιμοποιείται ως ένδειξη της ικανότητας των ενώσεων να δρουν ως δεσμευτές ελευθέρων ριζών και κατ' επέκταση της αντιοξειδωτικής τους δράσης (Σχήμα 2.2).



Σχήμα 2.2 Αναγωγή της ελεύθερης ρίζας DPPH.

Αποτελεί μία απλή, γρήγορη και οικονομική δοκιμή που χρησιμοποιείται για την αξιολόγηση καθαρών ενώσεων, εκχυλισμάτων ή ακόμη και τροφίμων ως αντιοξειδωτικούς παράγοντες και γι' αυτό χρησιμοποιείται ευρέως. Ειδικότερα, έχει χρησιμοποιηθεί για τη μελέτη της αντιοξειδωτικής δράσης ελαιόλαδου, φρούτων, λαχανικών, κρασιού αλλά και καθαρών ενώσεων όπως η κυστεΐνη, η γλουταθειόνη, το ασκορβικό οξύ, η τοκοφερόλη και διάφορες φαινολικές και ετεροκυκλικές ενώσεις [11].

Σημαντικά πλεονεκτήματά της μεθόδου αποτελούν η υψηλή επαναληψιμότητα, η διεξαγωγή της σε θερμοκρασία περιβάλλοντος που την καθιστά κατάλληλη για μόρια ευαίσθητα σε υψηλές θερμοκρασίες, καθώς και το γεγονός ότι πραγματοποιείται σε αιθανολικό ή μεθανολικό συνήθως περιβάλλον, οπότε είναι ιδανική για μόρια που παρουσιάζουν πολύ χαμηλή υδατοδιαλυτότητα, π.χ. αιθέρια έλαια [11].

Ωστόσο, η χρήση της ενέχει κάποιους περιορισμούς. Συγκεκριμένα, η ρίζα που εντοπίζεται στο κέντρο της δομής, είναι προσβάσιμη κυρίως από μικρά μόρια ενώ τα μεγαλύτερα μόρια παρουσιάζουν περιορισμένη πρόσβαση, λόγω στερεοχημικής παρεμπόδισης [12]. Επιπλέον, ορισμένες ενώσεις όπως τα καρτενοειδή απορροφούν ισχυρά στο ίδιο μήκος κύματος με την ρίζα DPPH, επικαλύπτοντας την απορρόφηση της ρίζας [13,14]. Για τις ενώσεις οι οποίες δεν περιέχουν ομάδες-δότες υδρογόνου δε μπορεί να προσδιοριστεί η αντιοξειδωτική τους δράση μέσω αυτής της μεθόδου. Ακόμη, η ρίζα είναι φωτοευαίσθητη και απαιτείται ιδιαίτερη προσοχή κατά τη χρήση της.

Τέλος, είναι σημαντικό να αναφερθεί ότι γίνονται δοκιμές για την πραγματοποίηση της δοκιμής σε υδατικά διαλύματα μέσω της συμπλοκοποίησης της ρίζας DPPH με κυκλοδεξτρίνες, κυκλικούς ολιγοσακχαρίτες οι οποίοι έχουν υδρόφοβη εσωτερική κοιλότητα και υδρόφιλη εξωτερική επιφάνεια, σχηματίζοντας με αυτό τον τρόπο σύμπλοκα εγκλεισμού με πλήθος υδρόφοβων ενώσεων. Το σύμπλοκο της ρίζας DPPH με β-κυκλοδεξτρίνη έχει βρεθεί ότι είναι αρκετά σταθερό, αποφεύγοντας έτσι τη χρήση οργανικών διαλυτών, αλλά δίνοντας και τη δυνατότητα πραγματοποίησης της δοκιμής σε ρυθμιστικά διαλύματα με συγκεκριμένα pH για δείγματα για τα οποία απαιτείται (π.χ.

βιολογικά δείγματα, καθώς οι πρωτεΐνες καταβυθίζονται σε αλκοολικά διαλύματα) [10,15].

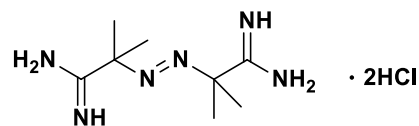
2.1.2.2 Ικανότητα αναστολής της λιπιδικής υπεροξειδωσης

Τα λιπίδια αποτελούν απαραίτητα συστατικά των κυτταρικών μεμβρανών που διατηρούν τη δομή και ελέγχουν τη λειτουργία των κυττάρων. Η λιπιδική υπεροξειδωση αναφέρεται στην οξειδωτική φθορά ακόρεστων λιπιδίων, όπως τα ακόρεστα λιπαρά οξέα, φωσφολιπίδια, γλυκολιπίδια, χοληστερόλη και παράγωγά της κ.α. από δραστικές μορφές οξυγόνου (Reactive Oxygen Species, ROS). Τα πολυακόρεστα λιπαρά οξέα (Polyunsaturated fatty acids, PUFAs) αποτελούν κατάλληλα υποστρώματα λόγω των πολλών διπλών δεσμών που φέρουν και καθώς βρίσκονται σε μεγάλο βαθμό στις κυτταρικές μεμβράνες, η λιπιδική υπεροξειδωση λαμβάνει χώρα συχνά εκεί [16].

Η λιπιδική υπεροξειδωση αποτελεί αντικείμενο συνεχούς ενδιαφέροντος για την επιστημονική κοινότητα, καθώς σχετίζεται με πολλές ασθένειες, όπως καρκίνο, διαβήτη, νόσο Αλτσχάιμερ και Πάρκινσον κ.α. [17]. Οι μελέτες που πραγματοποιούνται αφορούν την τόσο κατανόηση των μηχανισμών υπεροξειδωσης των λιπιδίων όσο και την πρόληψη των επιβλαβών επιπτώσεων της.

Η λιπιδική υπεροξειδωση έχει χρησιμοποιηθεί εκτενώς ως ερευνητικό μοντέλο για τον εντοπισμό των φυσικών αντιοξειδωτικών καθώς και για τις μελέτες των μηχανισμών δράσης τους. Πληθώρα φυσικών προϊόντων έχουν επιδείξει αξιόλογη ικανότητα αναστολής της λιπιδικής υπεροξειδωσης, όπως βιταμίνες, φλαβονοειδή, πολυφαινόλες κ.α. Η αντιοξειδωτική δράση των μορίων εξαρτάται σημαντικά από τη δομή τους, τις συνθήκες έναρξης της αντίδρασης και το μικροπεριβάλλον του μέσου αντίδρασης [18].

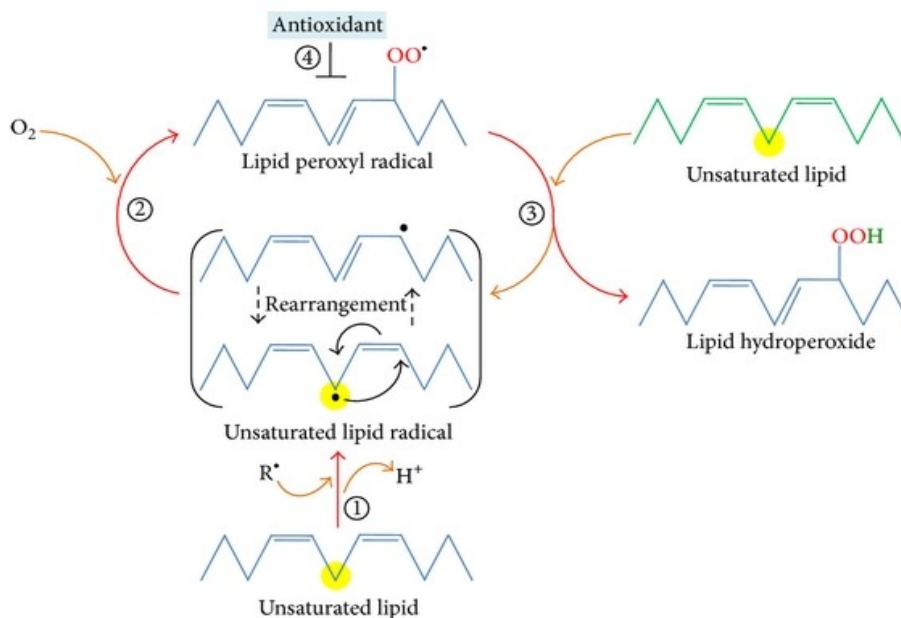
Η *in vitro* υπεροξειδωση των ακόρεστων λιπιδίων, μπορεί να ξεκινήσει είτε θερμικά χρησιμοποιώντας τον υδατοδιαλυτό εκκινητή ελευθέρων ριζών, διϋδροχλωρικό άλας του 2,2'-αζοδις-(2-αμιδινοπροπανίου) (AAPH) (Σχήμα 2.3), είτε με μεταλλικά ιόντα (π.χ. σιδήρου ή χαλκού) με H₂O₂ (αντίδραση Fenton) [19]. Η μέθοδος δοκιμής της ανασταλτικής ικανότητας ενώσεων έναντι της λιπιδικής υπεροξειδωσης υποκινούμενη από τον εκκινητή AAPH αποτελεί μία ευρέως διαδεδομένη μέθοδο, καθώς χαρακτηρίζεται από ευκολία και αξιοπιστία.



Σχήμα 2.3 Χημική δομή του εκκινητή ελευθέρων ριζών AAPH.

Στην περίπτωση θερμικής εκκίνησης της λιπιδικής υπεροξειδωσης, το AAPH αποσυντίθεται σε φυσιολογική θερμοκρασία (37 °C) σε υδατικά διαλύματα για να δημιουργήσει αλκυλική ρίζα (R·), η οποία παρουσία οξυγόνου μετατρέπεται στις αντίστοιχες ρίζες υπεροξειδίου (ROO·). Η συνολική διαδικασία της υπεροξειδωσης

των λιπιδίων αποτελείται από τρία στάδια: έναρξη, διάδοση και τερματισμός (Εικόνα 2.1). Κατά το στάδιο έναρξης, ελεύθερες ρίζες (π.χ. R[•], ROO[•]) αφαιρούν ένα αλλυλικό υδρογόνο από το ακόρεστο λιπίδιο σχηματίζοντας λιπιδικές ρίζες με κέντρο τον άνθρακα (L[•]), οι οποίες σταθεροποιούνται μέσω φαινομένων συντονισμού. Κατά το στάδιο της διάδοσης, οι λιπιδικές ρίζες (L[•]) αντιδρούν γρήγορα με το οξυγόνο σχηματίζοντας λιπιδικές υπεροξειδικές ρίζες (LOO[•]), οι οποίες αφαιρούν ένα υδρογόνο από ένα άλλο λιπιδικό μόριο δημιουργώντας μία νέα ρίζα L[•] και συνεχίζοντας με αυτό τον τρόπο την αλυσιδωτή αντίδραση. Κατά το στάδιο τερματισμού, αντιοξειδωτικά, δωρίζουν ένα άτομο υδρογόνου στη ρίζα LOO[•], οδηγώντας στο σχηματισμό υδροϋπεροξειδίων (LOOH), ενώ τα αντιοξειδωτικά σε μορφή ρίζας πλέον αντιδρούν με τις υπόλοιπες λιπιδικές υπεροξειδικές ρίζες (LOO[•]), σχηματίζοντας μη ριζικά προϊόντα. Τα λιπιδικά υδροϋπεροξειδία συνήθως αποσυντίθενται σχηματίζοντας αλδεΐδες όπως η μηλονική αλδεΐδη, οι οποίες μπορούν να προκαλέσουν δομικές βλάβες σε μόρια όπως πρωτεΐνες, λιπίδια και DNA [16,20].



Εικόνα 2.1 Μηχανισμός λιπιδικής υπεροξειδωσης [16].

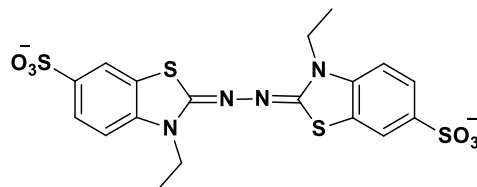
2.1.2.3 Ικανότητα δέσμευσης των ριζών υδροξυλίου ($\cdot OH$)

Η ρίζα υδροξυλίου ($\cdot OH$) είναι εξαιρετικά δραστική και θεωρείται η πιο τοξική ελεύθερη ρίζα καθώς μπορεί να οδηγήσει σε κυτταρική ή πρωτεϊνική βλάβη, καταστροφή κυτταρικών μεμβρανών, ακόμη και κυτταρικό θάνατο σε υψηλές συγκεντρώσεις [21]. Οι ρίζες υδροξυλίου παράγονται κυρίως μέσω της αντίδρασης Haber-Weiss παρουσία ιόντων χαλκού ή σιδήρου. Σύμφωνα με αυτή τη μέθοδο, διάλυμα σιδήρου-EDTA, το οποίο καταλύει την αυτο-οξειδωση του ασκορβικού οξέος, χρησιμοποιείται σαν πηγή ριζών υδροξυλίου. Οι παραγόμενες ρίζες αντιδρούν με το διμεθυλοσουλφοξειδίο που προστίθεται στη συνέχεια οδηγώντας στο σχηματισμό ριζών μεθυλίου και στη συνέχεια φορμαλδεΐδης, η συγκεντρωση

της οποίας μετράται με τη χρήση του αντιδραστηρίου Nash (ακετυλοακετόνη, οξικό οξικό, οξικό αμμώνιο). Η απορρόφηση μετράται στα 412 nm και συγκρίνεται η παραγωγή της φορμαλδεΐδης παρουσία και απουσία του πιθανού αντιοξειδωτικού μέσου [22,23].

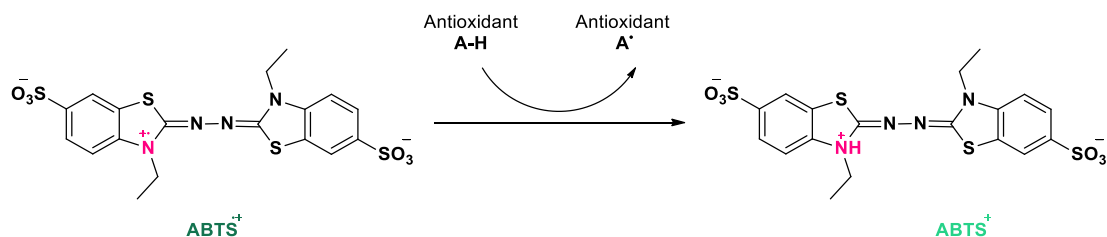
2.1.2.4 Ικανότητα αναγωγής της ρίζας $ABTS^+$ – Μέθοδος $ABTS^+$

Η δοκιμή δέσμησης της κατιοντικής ρίζας $ABTS^+$ (2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid, ABTS) είναι εύκολη, ακριβής και γρήγορη, ενώ ακόμη παρουσιάζει πολλά πλεονεκτήματα, όπως ότι δεν απαιτούνται υψηλές θερμοκρασίες για τη δημιουργία των ριζών $ABTS^+$ (Σχήμα 2.4) και η αντιοξειδωτική δράση μπορεί να μελετηθεί σε ένα ευρύ φάσμα τιμών pH. Η μέθοδος αποκαλείται και τεχνική προσδιορισμού της αντιοξειδωτικής ικανότητας μέσω ισοδυνάμων του Trolox (τεχνική TEAC) και χρησιμοποιείται ευρέως στις βιομηχανίες τροφίμων και διατροφικών προϊόντων για τον προσδιορισμό της αντιοξειδωτικής δράσης τροφίμων, ποτών και θρεπτικών προϊόντων [24,25].



Σχήμα 2.4 Χημική δομή του ABTS.

Η μέθοδος βασίζεται στην ικανότητα των αντιοξειδωτικών να αποχρωματίζουν το κατιόν της ρίζας 2,2'-αζινοδις-3-αιθυλβενζοθειαζολινο-6-σουλφονικού οξέος (Σχήμα), $ABTS^+$, το οποίο σε μορφή διαλύματος έχει μπλε χρώμα και απορροφά στα 734 nm. Το ριζικό κατιόν $ABTS^+$ παράγεται από την αντίδραση του ABTS με ένα οξειδωτικό είδος, όπως διοξείδιο του μαγγανίου ή υπερθειικό κάλιο που είναι και το πιο συχνά χρησιμοποιούμενο μέσο [26]. Σε περίπτωση αναγωγής της ελεύθερης ρίζας από κάποιο αντιοξειδωτικό (συνήθως πολυφαινόλη) η απορρόφηση στα 734 nm μειώνεται, ενώ η διάρκεια της αντίδρασης αποτελεί μία σημαντική παράμετρο για τη συγκεκριμένη μέθοδο που πρέπει να εξετάζεται [27] (Σχήμα 2.5).



Σχήμα 2.5 Αναγωγή της ελεύθερης ρίζας $ABTS^+$.

Σημαντικό πλεονέκτημα αποτελεί το γεγονός ότι η ρίζα είναι υδατοδιαλυτή, ενώ μειονέκτημα είναι ότι δεν υπάρχει σε στερεά μορφή λόγω σταθερότητας αλλά

πρέπει να παραχθεί είτε με χημική ή ακόμη και ηλεκτροχημική μέθοδο πριν τη δοκιμή [28].

2.1.3 Φλεγμονή και Οξειδωτικό Στρες

Η φλεγμονή, η απόκριση δηλαδή του ανοσοποιητικού συστήματος προκειμένου να προστατεύσει τον οργανισμό από επιβλαβή ερεθίσματα διακρίνεται σε οξεία και χρόνια. Η οξεία φλεγμονή προκαλείται από βλάβη των ιστών λόγω τραύματος, μικροβιακής εισβολής, επιβλαβών ενώσεων και άλλων περιβαλλοντικών παραγόντων όπως η διατροφή και τα συμπτώματα μπορεί να διαρκέσουν για μερικές ημέρες. Η χρόνια φλεγμονή είναι ένα επίμονο φαινόμενο που μπορεί να διαρκέσει από μήνες έως χρόνια και παίζει κεντρικό ρόλο σε πολλές παθήσεις [29,30].

Η χρόνια φλεγμονή και το οξειδωτικό στρες αποτελούν δύο συναφείς και αλληλένδετες καταστάσεις που εμπλέκονται στην παθοφυσιολογία ασθενειών όπως ο διαβήτης, οι καρδιαγγειακές και πνευμονικές παθήσεις, ο καρκίνος, ενώ εμπλέκονται και στη γήρανση [31–33]. Σε περιπτώσεις χρόνιας φλεγμονής, παράγονται υψηλές συγκεντρώσεις από δραστικές μορφές οξυγόνου, οι οποίες αντιδρούν με τα λιπίδια και τις πρωτεΐνες των κυττάρων προκαλώντας σοβαρές βλάβες, δημιουργούν οξειδωτική ανισορροπία και μπορούν να προκαλέσουν ακόμα και μεταλλάξεις στο DNA [34,35].

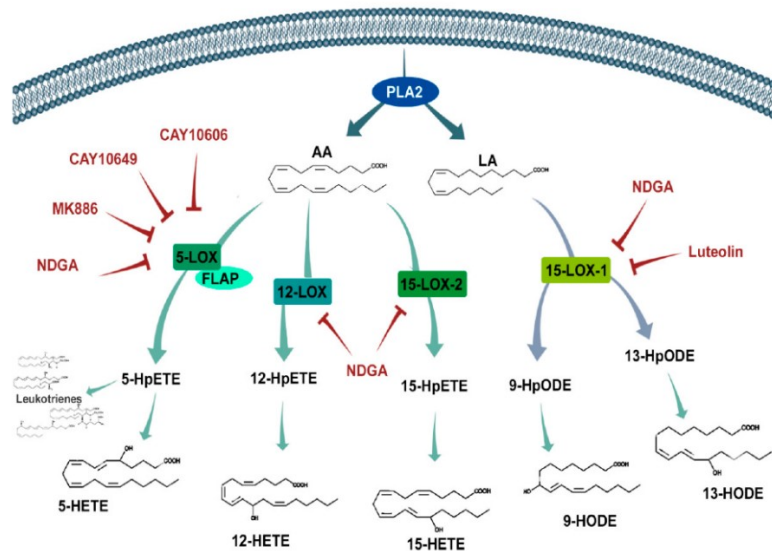
2.1.4 Λιποξυγονάσες

Οι λιποξυγονάσες (LOX) αποτελούν μία οικογένεια ενζύμων, τα οποία περιέχουν ένα “μη τύπου” αίμης άτομο σιδήρου στο ενεργό τους κέντρο ενωμένο με πέντε μόρια ιστιδίνης που εντοπίζονται τόσο σε φυτά και ζώα όσο και σε προκαρυωτικούς οργανισμούς. Παράγονται σε πολλά κύτταρα, όπως επιθηλιακά και ενδοθηλιακά, ενώ ο φυσιολογικός του ρόλος περιλαμβάνει τη ρύθμιση αγγειακών, νεφρικών, γαστρεντερικών και δερματικών λειτουργιών, καθώς και ανοσολογικών αποκρίσεων [36,37].

Οι LOX καταλύουν την οξείδωση πολυακόρεστων λιπαρών οξέων με τουλάχιστον μία ομάδα 1,4-cis-πενταδιενίου στη δομή τους, συμπεριλαμβανομένου του λινελαϊκού οξέος στα φυτά και του αραχιδονικού οξέος στα θηλαστικά, με αποτέλεσμα την παραγωγή υδροϋπεροξειδίων. Αυτά τα οξυγονωμένα PUFAs στη συνέχεια μετατρέπονται σε μια σειρά μεταβολιτών και βιοδραστικών λιπιδικών μεσολαβητών, όπως τα λευκοτριένια και οι λιποξίνες. Με τον τρόπο αυτό, λειτουργούν ως προ- και αντι-φλεγμονώδεις μεσολαβητές και εμπλέκονται στην αναδόμηση μεμβρανών, στην αλληλεπίδραση λιποπρωτεϊνών και στη ρύθμιση της κυτταρικής οξειδοαναγωγικής ισορροπίας [38–40].

Οι κυριότερες λιποξυγονάσες που απαντώνται στα ζωικά κύτταρα είναι οι 5-LOX, 8-LOX, 12-LOX και 15-LOX, η ονομασία των οποίων προέρχεται από το άτομο του

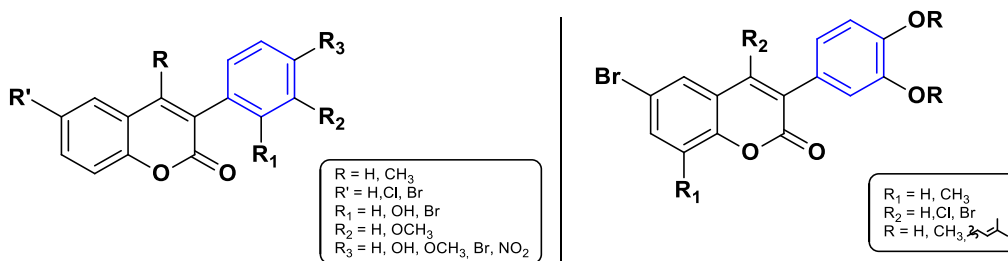
άνθρακα, στο μόριο του αραχιδονικού οξέος, στο οποίο εισάγεται το οξυγόνο και πραγματοποιείται η υπεροξειδωση (οξειδωση ατόμων άνθρακα 5-, 8-, 12- και 15-, αντίστοιχα). Η οξειδωση του αραχιδονικού και λινελαϊκού οξέος από διάφορες LOX προς παραγωγή υδροξυεικοσιτετρανοϊκών οξέων (hydroxyeicosatetraenoic acids, HETEs), υδροξυδεκαοκταδιενοϊκών οξέων (hydroxyoctadecadienoic acids, HODES) και λευκοτριενίων απεικονίζεται στην Εικόνα 2.2 [41,42].



Εικόνα 2.2 Προϊόντα οξειδωσης του αραχιδονικού και λινελαϊκού οξέος από διάφορες LOX [41].

Τα τελευταία χρόνια, οι αναστολείς της δράσης της LOX έχουν προσελκύσει το ερευνητικό ενδιαφέρον ως πιθανά φαρμακομόρια για την αντιμετώπιση ασθενειών όπως το άσθμα, η ψωρίαση, η φλεγμονή και διάφορες αλλεργίες και πρόσφατα για τον καρκίνο [43,44].

Σε αυτό το πλαίσιο, έχει βρεθεί ότι οι κουμαρίνες αποτελούν ισχυρούς αναστολείς της LOX. Για παράδειγμα, σε προηγούμενες ερευνητικές μελέτες του ΕΟΧ ΕΜΠ, βρέθηκε ότι οι 3-αρυλο-κουμαρίνες αποτελούν ισχυρούς αναστολείς της λιποξυγονάσης από σόγια, ενώ ταυτόχρονα αναστέλλουν σημαντικά τη λιπιδική υπεροξειδωση [45,46]. Οι γενικές δομές των εξεταζόμενων μορίων παρουσιάζονται στο Σχήμα 2.6.



Σχήμα 2.6 Χημική δομή 3-αρυλο-κουμαρινικών αναλόγων με ισχυρή ανασταλτική δράση έναντι της LOX.

Πιο συγκεκριμένα, τα κουμαρινικά ανάλογα παρουσίασαν αξιόλογη ικανότητα αναστολής της λιπιδικής υπεροξειδωσης του λινελαϊκού οξέος υποκινούμενη από τον εκκινητή ελευθέρων ριζών AAPH, καθώς και αναστολή της δράσης της λιποξυγονάσης από σόγια. Η παρουσία πρενυλοξυ ομάδων στο φαινολικό δακτύλιο της θέσης 3 του κουμαρινικού σκελετού βρέθηκε ότι βοηθά σημαντικά στη δράση έναντι της LOX από σόγια καθώς τα εξεταζόμενα πρενυλοξυ ανάλογα εμφάνισαν τιμές IC₅₀ 37 και 41 μM, αλλά και ισχυρή ικανότητα αναστολής της λιπιδικής υπεροξειδωσης (>90%).

Η λιποξυγονάση από σόγια (*Glycine max*) LOX-1 είναι μία 15-LOX η οποία συχνά χρησιμοποιείται ως πρότυπο για τη μελέτη δομικών και λειτουργικών ιδιοτήτων των LOX. Η μελέτη κρυσταλλικής δομής της LOX-1 σόγιας και της 15-LOX-1 από κουνέλι έδειξε ομοιότητες με την τρισδιάστατη δομή της ανθρώπινης 5-LOX και οδήγησε στο συμπέρασμα ότι βασικά χαρακτηριστικά του ενζύμου διατηρούνται στις LOX τόσο φυτικής όσο και ζωικής προέλευσης [47].

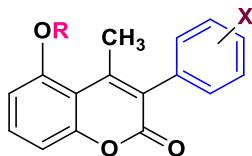
2.1.5 Φλεγμονή και Καρκίνος

Η συμβολή της χρόνιας φλεγμονής στην ανάπτυξη καρκίνου παρατηρήθηκε πρώτη φορά το 1863, χωρίς ωστόσο να είναι γνωστός ο μηχανισμός. Σήμερα, υπάρχουν περισσότερες πληροφορίες που αφορούν τη σχέση μεταξύ καρκίνου και φλεγμονής με αρκετά σημαντικά κυτταρικά μονοπάτια ωστόσο παραμένουν ακόμα άγνωστα [48–50]. Χαρακτηριστικά γνωρίσματα της φλεγμονής που παρουσιάζονται σε καρκινικούς όγκους είναι η παρουσία κυτοκινών, χημειοκινών, αυξητικών παραγόντων κ.α., τα οποία ωστόσο εξαρτώνται σημαντικά από το μικροπεριβάλλον του όγκου [51,52]. Ακόμη, έχει βρεθεί ότι οι φλεγμονές που προκαλούνται από λοιμώξεις εμπλέκονται στην παθογένεση περίπου 20% των ανθρώπινων όγκων. Τέλος, σημαντική παρατήρηση αποτελεί ότι η χορήγηση μη στεροειδών αντιφλεγμονωδών φαρμάκων, π.χ. ασπιρίνη, οδηγεί σε μειωμένες πιθανότητες εμφάνισης καρκίνου και μειωμένη θνησιμότητα [53].

Σε αυτό το πλαίσιο, αρκετές μελέτες υποστηρίζουν τη συσχέτιση μεταξύ της έκφρασης των LOX και της ικανότητας πολλαπλασιασμού, μετανάστευσης και μετάστασης καρκινικών κυττάρων. Ειδικότερα, μελέτες έχουν δείξει πως η αναστολή της δράσης της LOX προκαλεί απόπτωση σε διάφορους τύπους καρκινικών κυττάρων όπως μαστού, παγκρέατος, προστάτη, πνεύμονα κ.α. [54,55]. Συνεπώς, οι αναστολείς της LOX αποτελούν πολλά υποσχόμενους αντικαρκινικούς παράγοντες [56,57].

Αρκετές κουμαρίνες φυσικής προέλευσης όπως η εσκουλετίνη, η σκοπολετίνη και η ουμπελιπρενίνη έχουν παρουσιάσει τόσο ικανότητα αναστολής της δράσης της LOX όσο και αντικαρκινική δράση [58–60]. Ακόμη, σε πρόσφατη ερευνητική μελέτη της ομάδας του EOX ΕΜΠ [61], βρέθηκε ότι τα συνθετικά ανάλογα 3-αρυλο-5-υποκατεστημένων-κουμαρινών με γενική δομή που φαίνεται στο Σχήμα 2.7, παρουσίασαν τόσο ανασταλτική δράση έναντι της LOX όσο και ισχυρή

κυτταροτοξικότητα έναντι καρκινικών κυττάρων ανθρώπινου νευροβλαστώματος (SK-N-SH) και κυττάρων ανθρώπινου επιθηλιοειδούς αδενοκαρκινώματος της μήτρας (HeLa). Μάλιστα η παρουσία ακετυλοξυ ομάδας και υποκαταστάτη βρωμίου στον κουμαρινικό σκελετό οδήγησε σε συνδυασμένη δράση.

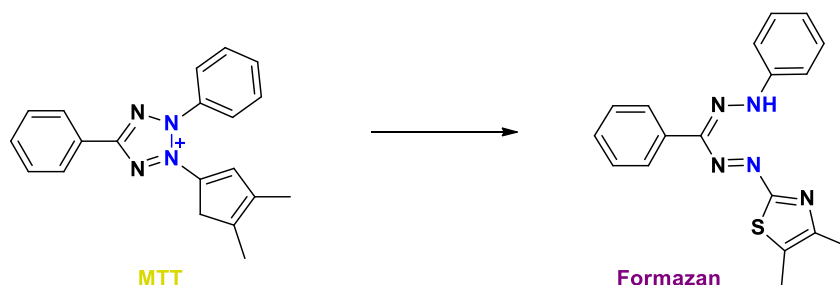


Σχήμα 2.7 Χημική δομή 3-αρυλο-κουμαρινικών αναλόγων με συνδυασμένη κυτταροτοξική και ανασταλτική δράση έναντι της LOX.

Προκύπτει λοιπόν, πως ο σχεδιασμός ενώσεων που στοχεύουν τη λιποξυγονάση, αποτελεί στρατηγική για την ανάπτυξη βιοδραστικών μορίων με πιθανή συνδυασμένη αντιφλεγμονώδη και αντικαρκινική δράση.

2.1.5.1 Προσδιορισμός της κυτταροτοξικότητας μέσω της *in vitro* τεχνικής MTT

Η κυτταροτοξικότητα βιοδραστικών ενώσεων έναντι καρκινικών κυττάρων ελέγχεται συχνά μέσω της δοκιμασίας MTT (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide). Το MTT (3-[4,5-διμεθυλοθειαζολ-2-υλο]-2,5-διφαινυλοτετραζόλιο βρωμίδιο) αποτελεί ένα υδατοδιαλυτό άλας τετραζολίου, κίτρινου χρώματος, το οποίο ανάγεται σε φορμαζάνη, η οποία έχει έντονο πορφυρό χρώμα, παρουσία διαφόρων ενζύμων, κυρίως αφυδρογονάσες (Σχήμα 2.8).



Σχήμα 2.8 Αναγωγή του άλατος τετραζολίου MTT σε φορμαζάνη.

Είναι σημαντικό να σημειωθεί ότι η αναγωγή του MTT σε φορμαζάνη πραγματοποιείται στο εσωτερικό των μιτοχονδρίων υγιών κυττάρων και με αυτό τον τρόπο παρέχονται πληροφορίες σχετικά με την κυτταρική βιωσιμότητα έπειτα από επίδραση κάποιου παράγοντα (π.χ. βιοδραστικό μόριο). Η αρχή της ανάλυσης MTT βασίζεται στο ότι για τα περισσότερα υγιά κύτταρα η μιτοχονδριακή δράση είναι σταθερή, και επομένως, μία αύξηση ή μείωση στον αριθμό των βιώσιμων κυττάρων σχετίζεται γραμμικά με αυτή. Οι κρύσταλλοι φορμαζάνης που παράγονται διαλυτοποιούνται σε κατάλληλο διαλύτη (αλκόολη, διμεθυλοσουλφοξείδιο) και οποιαδήποτε αύξηση ή μείωση στον αριθμό των βιώσιμων κυττάρων μπορεί να ανιχνευθεί μετρώντας τη συγκέντρωση

φορμαζάνης που αντανακλάται στη μέτρηση οπτικής πυκνότητας στα 570 nm [62–64].

2.1.6 Το DNA ως φαρμακολογικός στόχος

Το δεοξυριβονουκλεϊκό οξύ, DNA, αποτελεί το γενετικό υλικό όλων των κυττάρων, ενώ ρόλος του είναι η αποθήκευση της γενετικής πληροφορίας και η διατήρηση και μεταβίβαση της από κύτταρο σε κύτταρο και από οργανισμό σε οργανισμό. Οποιαδήποτε αλλοίωση (μετάλλαξη) στη δομή του DNA έχει ως αποτέλεσμα διαταραχή της κυτταρικής λειτουργίας και οδηγεί σε πρόκληση ασθενειών όπως ο καρκίνος. Επομένως, το DNA αποτελεί σημαντικό φαρμακολογικό στόχο για την αντιμετώπιση διαφόρων ασθενειών και την ανάπτυξη αντικαρκινικών, αντιμικροβιακών, αντιικών κ.α. φαρμάκων [65].

2.1.6.1 Τρόποι σύνδεσης ενώσεων στο DNA

Έχει βρεθεί ότι μεγάλος αριθμός οργανικών και ανόργανων ενώσεων μπορεί να αλληλεπιδράσει με το DNA, και να συνδεθεί είτε ομοιοπολικά είτε μη ομοιοπολικά. Η ομοιοπολική αλληλεπίδραση είναι μη αντιστρεπτή, παρεμποδίζει την ομαλή λειτουργία του κυττάρου και οδηγεί σε απόπτωση. Ορισμένα φάρμακα, κυρίως αντικαρκινικά όπως η σισπλατίνη, ανήκουν στην κατηγορία αυτή [66].

Η μη ομοιοπολική σύνδεση ενώσεων στο DNA μπορεί να γίνει με τρεις τρόπους [65–67](Εικόνα 2.3):

i) Παρεμβολή

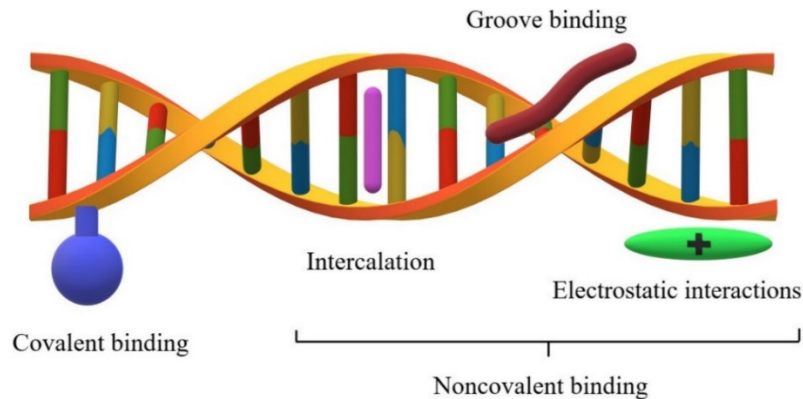
Η παρεμβολή (intercalation) πραγματοποιείται όταν ένα μόριο εισχωρεί μεταξύ γειτονικών ζευγών βάσεων του DNA. Η παρεμβολή στη διπλή έλικα του DNA οδηγεί σε αλλαγές στη στερεοχημική διάταξη του DNA και σε πολλές λειτουργίες του κυττάρου, μεταξύ των οποίων η έκφραση πρωτεϊνών όπως πολυμεράσες και μεταγραφικοί παράγοντες. Χαρακτηριστικά παραδείγματα παρεμβολέων είναι η δοξορουβικίνη και η δαουνορουβικίνη που αποτελούν χημειοθεραπευτικούς παράγοντες καθώς και παράγωγα της ακριδίνης, όπως η προφλαβίνη και η ακριφλαβίνη που χρησιμοποιούνται σε αντισηπτικά καθώς έχουν βακτηριοστατική δράση.

ii) Πρόσδεση στη μείζονα ή ελάσσονα αύλακα

Η διπλή έλικα του DNA διαθέτει δύο άνισες μεταξύ τους, ως προς το μέγεθος, αύλακες: μια μείζονα αύλακα (major groove) και μία ελάσσονα αύλακα (minor groove). Το μεγαλύτερο μέγεθος της μείζονος αύλακας την καθιστά κατάλληλη για τη σύνδεση μακρομορίων όπως είναι οι πρωτεΐνες, ενώ μόρια μικρού μοριακού βάρους συνδέονται στη μικρή αύλακα, με ορισμένες ενώσεις να συνδέονται και στις δύο περιοχές.

iii) Εξωτερική πρόσδεση

Οι εξωτερικοί προσδέτες αλληλεπιδρούν ηλεκτροστατικά με το DNA. Ειδικότερα, οι αλυσίδες του DNA διαθέτουν φωσφορικές ομάδες που καθιστούν το μόριο του DNA αρνητικά φορτισμένο. Έτσι, θετικά φορτισμένα μόρια αλληλεπιδρούν μέσω ηλεκτροστατικών δυνάμεων με το DNA και προσδένονται στην εξωτερική του επιφάνεια. Χαρακτηριστικά παραδείγματα εξωτερικών προσδετών είναι τα μεταλλικά σύμπλοκα.



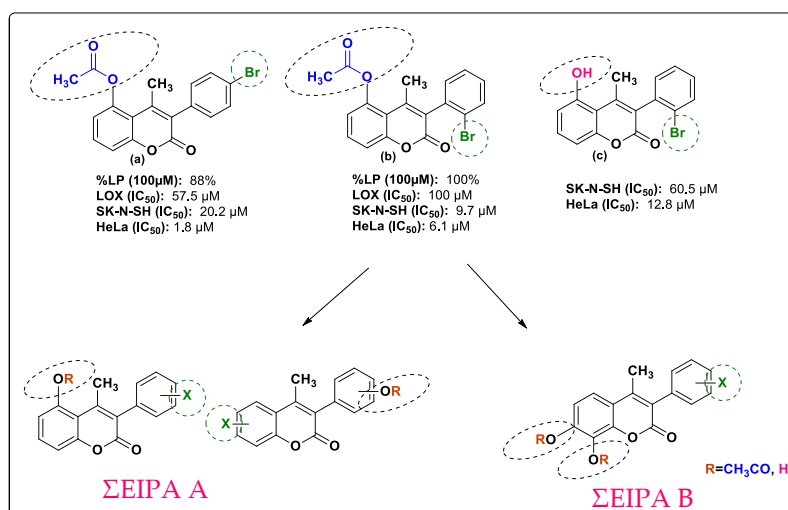
Εικόνα 2.3 Τρόποι μη ομοιοπολικής πρόσδεσης ενώσεων στο DNA [68].

2.1.6.2 Φασματοφωτομετρία Υπεριώδους-Ορατού (UV-VIS) για τη μελέτη αλληλεπίδρασης DNA-βιοδραστικών μορίων

Υπάρχουν αρκετές μέθοδοι μελέτης της αλληλεπίδρασης του DNA με βιοδραστικά μόρια, όπως ηλεκτροχημικές, οπτικές (φασματοσκοπία φθορισμού και φασμαφωτοτομετρία Υπεριώδους-Ορατού) ή ακόμη και με τη χρήση ιξωδομετρίας [68]. Η φασματοφωτομετρική μέθοδος μελέτης αλληλεπίδρασης αποτελεί μία απλή, ευρέως χρησιμοποιούμενη και μία από τις πιο αποτελεσματικές μεθόδους για τη μελέτη της σταθερότητας του DNA, αλλά και της ανίχνευσης της αλληλεπίδρασης μορίων με το DNA. Η μέθοδος στηρίζεται στις αλλαγές του φάσματος απορρόφησης τόσο ως προς την ένταση όσο και ως προς το μήκος κύματος (λ_{max}) έπειτα από επώαση του μορίου με διαφορετικές συγκεντρώσεις DNA. Ειδικότερα, στην περίπτωση παρεμβολής της ένωσης στο DNA παρατηρείται μείωση της απορρόφησης (υποχρωμία), ενώ σε περίπτωση πρόσδεσης της ένωσης στην εξωτερική επιφάνεια του DNA (δέσμευση σε αύλακα ή εξωτερικά), παρατηρείται αύξηση της απορρόφησης (υπερχωμία). Ακόμη, η μετατόπιση του μέγιστου μήκους κύματος απορρόφησης σε μεγαλύτερες τιμές (βαθυχρωμία ή ερυθρή μετατόπιση) υποδεικνύει του DNA λόγω αλληλεπίδρασης, σε αντίθεση με την μετατόπιση προς μικρότερα μήκη κύματος, (υψοχρωμία ή κυανή μετατόπιση), που δείχνει αποσταθεροποίηση της έλικας του DNA [69].

2.2 ΣΚΟΠΟΣ

Σκοπό του παρόντος κεφαλαίου αποτέλεσε ο σχεδιασμός και η σύνθεση νέων 3-αρυλο-κουμαρινικών αναλόγων με συνδυασμένη βιολογική δράση. Ο σχεδιασμός στηρίχθηκε σε μόρια οδηγούς που έχουν συντεθεί στο Εργαστήριο Οργανικής Χημείας της Σχολής Χημικών Μηχανικών ΕΜΠ και έχουν επιδείξει αξιόλογη βιολογική δράση. Πιο συγκεκριμένα, τα 5-ακετυλοξυ κουμαρινικά παράγωγα **(a)** και **(b)** του Σχήματος 2.9, τα οποία διαθέτουν υποκαταστάτη βρωμίου στον αρωματικό δακτύλιο της θέσης 3 του κουμαρινικού σκελετού έχουν παρουσιάσει σημαντική ικανότητα αναστολής της λιπιδικής υπεροξειδωσης (%LP) και της λιποξυγονάσης από σόγια (LOX) καθώς και ισχυρή κυτταροτοξική δράση έναντι στις κυτταρικές σειρές ανθρώπινου επιθηλιοειδούς αδενοκαρκινώματος της μήτρας (HeLa) και ανθρώπινου νευροβλαστώματος (SK-N-SH). Ακόμη, αξιόλογη κυτταροτοξική δράση έναντι στις δύο καρκινικές σειρές έχει επιδείξει και το υδροξυ ανάλογο της **(b)**, η 3-(2-βρωμοφαινυλο)-4-μεθυλο-5-υδροξυ-κουμαρίνη **(c)** [61].

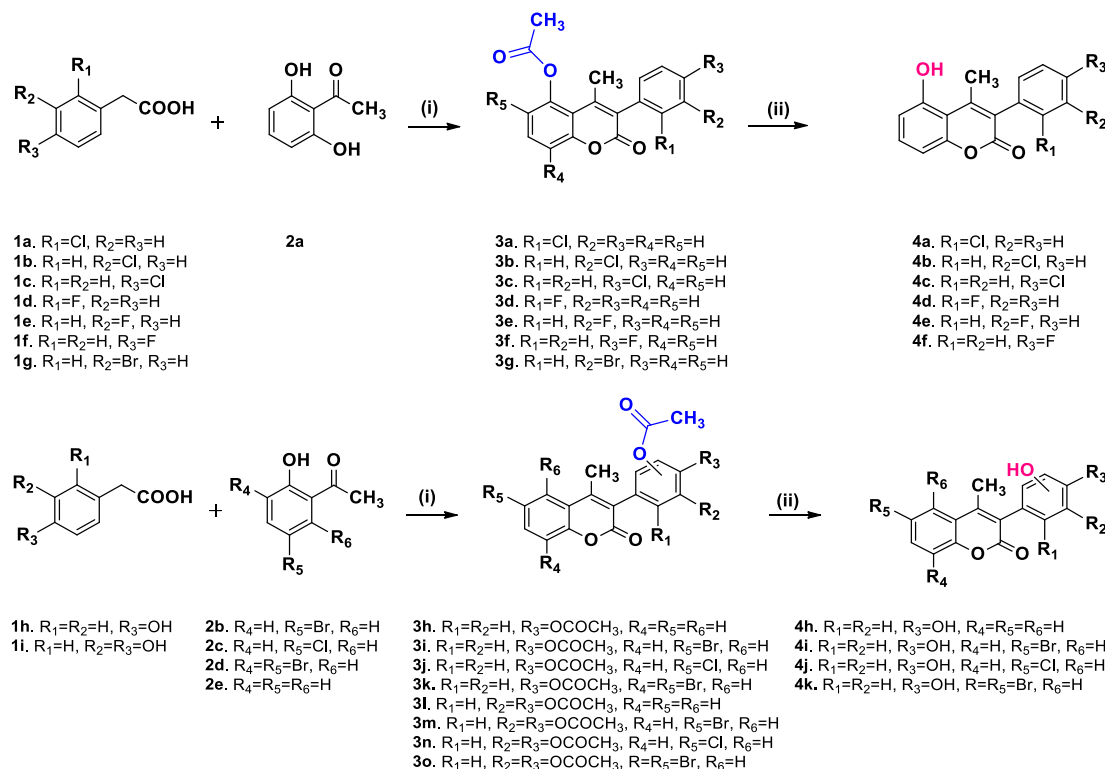


Σχήμα 2.9 Σχεδιασμός των νέων 3-αρυλο-κουμαρινικών αναλόγων των Σειρών A και B.

Στηριζόμενοι στα μόρια-οδηγούς του Σχήματος 2.1 και στην αξιόλογη βιολογική δράση των 3-αρυλο-κουμαρινών σύμφωνα με τη βιβλιογραφία [70], οδηγηθήκαμε στη σύνθεση νέων 3-αρυλο-κουμαρινικών αναλόγων που φέρουν ακετυλοξυ ή υδροξυ ομάδες, καθώς και άλλους υποκαταστάτες, κυρίως αλογόνα, σε διάφορες θέσεις του κουμαρινικού σκελετού (Σειρά A). Επιπλέον, καθώς στην τρέχουσα βιβλιογραφία γίνεται συχνά αναφορά στην επίδραση της 7,8-διακετυλοξυ υποκατάστασης στην κυτταροτοξικότητα [71,72], καθώς και στην ενίσχυση της αντιοξειδωτικής δράσης από την παρουσία ορθο-διυδροξυ ή αλλιώς κατεχολικού συστήματος [73], οδηγηθήκαμε στο σχεδιασμό και τη σύνθεση νέων 7,8-διακετυλοξυ- και διυδροξυ- 3-αρυλο-κουμαρινικών παραγώγων (Σειρά B).

2.3 ΣΧΕΔΙΑΣΜΟΣ ΚΑΙ ΣΥΝΘΕΣΗ ΤΩΝ ΝΕΩΝ ΚΟΥΜΑΡΙΝΙΚΩΝ ΑΝΑΛΟΓΩΝ

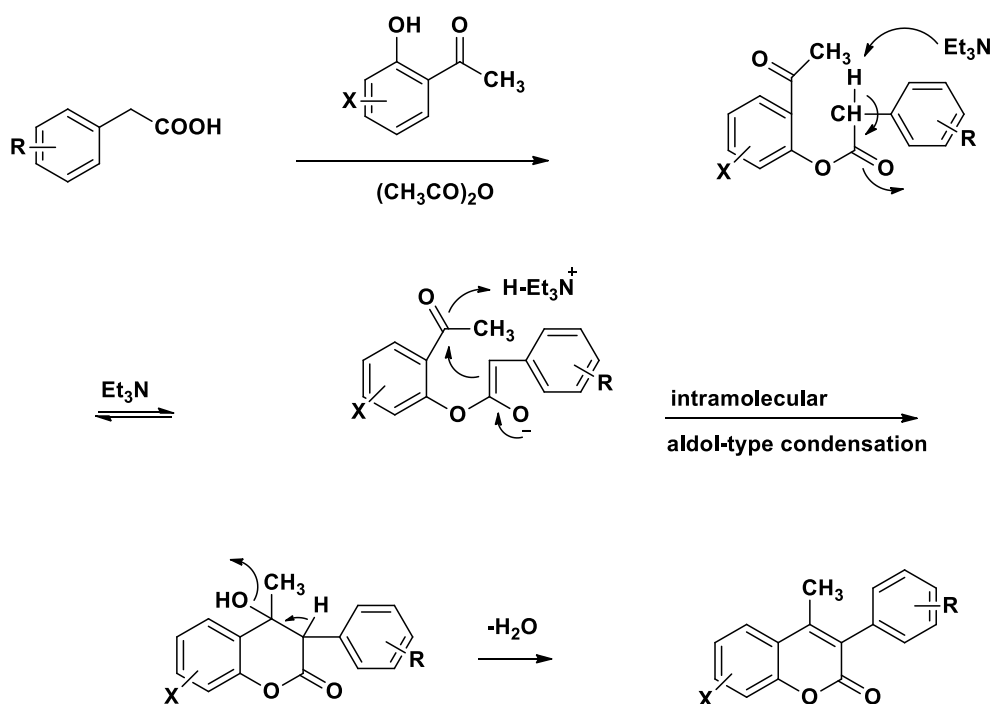
Η σύνθεση των νέων κουμαρινικών παραγώγων της Σειράς Α πραγματοποιήθηκε σε δύο στάδια: αρχικά μέσω μιας τροποποιημένης αντίδρασης Perkin-Ogialoro μεταξύ κατάλληλα υποκατεστημένου φαινυλοξικού οξέος και κατάλληλης ακετοφαινόνης παρουσία οξικού ανυδρίτη $[(\text{CH}_3\text{CO})_2\text{O}]$ και τριαιθυλαμίνης (Et_3N), προκύπτουν τα ακετυλοξυ-ανάλογα **3a-3o**. Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκε αντίδραση απομάκρυνσης της ακετυλο ομάδας παρουσία μονοένυδρης υδραζίνης ($\text{NH}_2\text{NH}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$) και μεθανόλης (MeOH) από την οποία προέκυψαν τα αντίστοιχα υδροξυ-κουμαρινικά ανάλογα (**4a-4k**) (Σχήμα 2.10).



Σχήμα 2.10 Συνθετική πορεία ακετυλοξυ-κουμαρινών (**3a-3o**) και υδροξυ-κουμαρινών (**4a-4k**) της Σειράς Α χρησιμοποιώντας: (i) $[(\text{CH}_3\text{CO})_2\text{O}]$, Et_3N , 120°C , 3 h, (ii) $\text{NH}_2\text{NH}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$, MeOH , 42°C , 1-2 h.

Μηχανισμός σύνθεσης ακετυλοξυ-κουμαρινών

Ο μηχανισμός σύνθεσης ακετυλοξυ-κουμαρινών από κατάλληλα υποκατεστημένες 2-υδροξυ-ακετοφαινόνες, μέσω τροποποιημένης αντίδρασης Perkin-Ogialoro, περιλαμβάνει μία ενδομοριακή αλδολικού τύπου συμπύκνωση της Ο-ακετυλο-ακετοφαινόνης ως ενδιάμεσο στάδιο. Το τελικό προϊόν παραλαμβάνεται μέσω αφυδάτωσης [74] (Σχήμα 2.11).

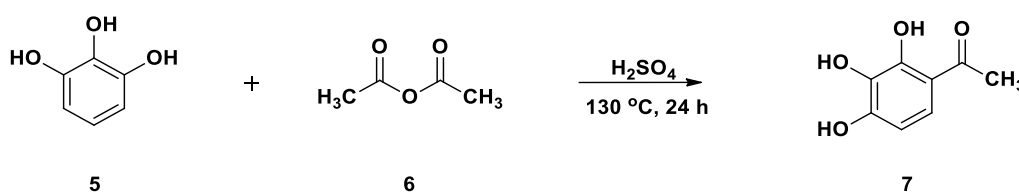


Σχήμα 2.11 Μηχανισμός τροποποιημένης αντίδρασης Perkin-Ogialoro.

Για τη σύνθεση των κουμαρινικών αναλόγων της Σειράς Β, αρχικά πραγματοποιήθηκε η σύνθεση της 2,3,4-τριυδροξυακετοφαινόνης, για την οποία εξετάστηκαν δύο εναλλακτικές πορείες σύνθεσης (Σχήματα 2.12 & 2.13):

Μέθοδος Α

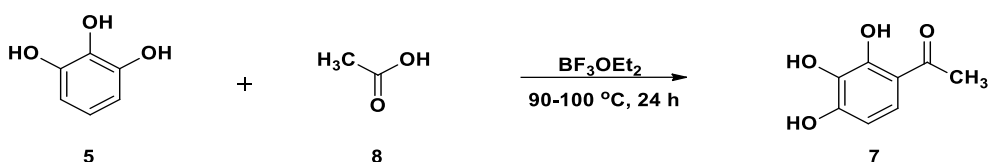
Αντίδραση μεταξύ πυρογαλλόλης και οξικού ανυδρίτη, σε στοιχειομετρία 1:1 στους 130 °C, παρουσία θεικού οξέος.



Σχήμα 2.12 Σύνθεση 2,3,4-τριυδροξυακετοφαινόνης (7) – Μέθοδος Α.

Μέθοδος Β

Αντίδραση μεταξύ πυρογαλλόλης και οξικού οξέος, σε στοιχειομετρία 1:1.1 στους 90-100 °C, παρουσία συμπλόκου τριφθοριούχου βορίου-διαιθυλαιθέρα.

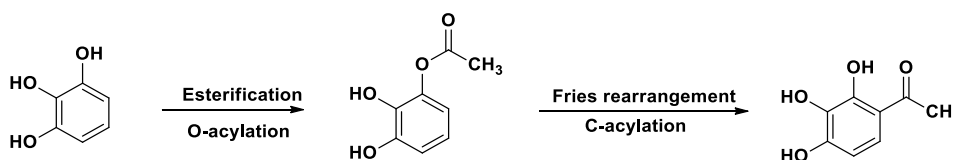


Σχήμα 2.13 Σύνθεση 2,3,4-τριυδροξυακετοφαινόνης (7) – Μέθοδος Β.

Μηχανισμός σύνθεσης 2,3,4-τριυδροξυακετοφαινόνης

Ο μηχανισμός σύνθεσης της 2,3,4-τριυδροξυακετοφαινόνης (7) (Σχήμα 2.14) περιλαμβάνει τα ακόλουθα δύο στάδια:

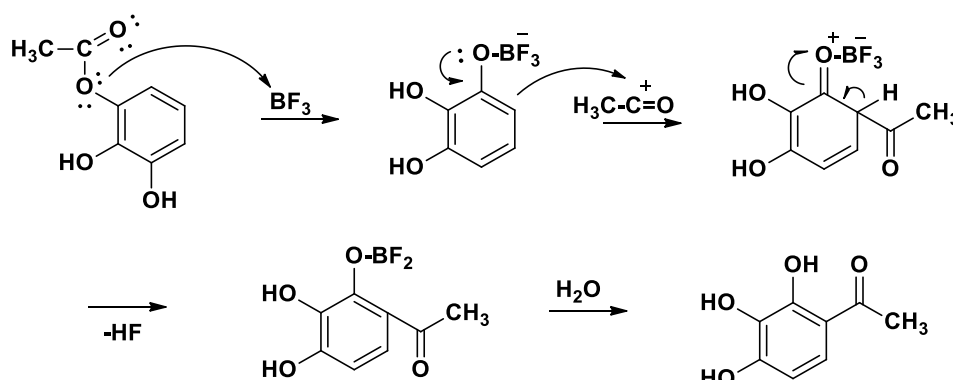
- i) Εστεροποίηση κατά Fischer (O-Ακυλίωση)
- ii) Αναδιάταξη Fries (C-Ακυλίωση)



Σχήμα 2.14 Μηχανισμός σύνθεσης της 2,3,4-τριυδροξυακετοφαινόνης (7).

Αναδιάταξη Fries

Η αναδιάταξη Fries είναι μετατροπή που λαμβάνει χώρα υπό τις συνθήκες της ακυλίωσης κατά Friedel-Crafts (ηλεκτρονιόφιλη υποκατάσταση), με το μηχανισμό να μην είναι επακριβώς γνωστός. Ωστόσο, θεωρείται ότι σχηματίζεται ένα σύμπλοκο μεταξύ του ακυλοβενζολίου, που έχει προκύψει από την εστεροποίηση κατά Fischer της φαινόλης, με το τριφθοριούχο βόριο. Με προσθήκη νερού το σύμπλοκο αυτό υδρολύεται, ελευθερώνοντας την επιθυμητή κετόνη [75] (Σχήμα 2.15).



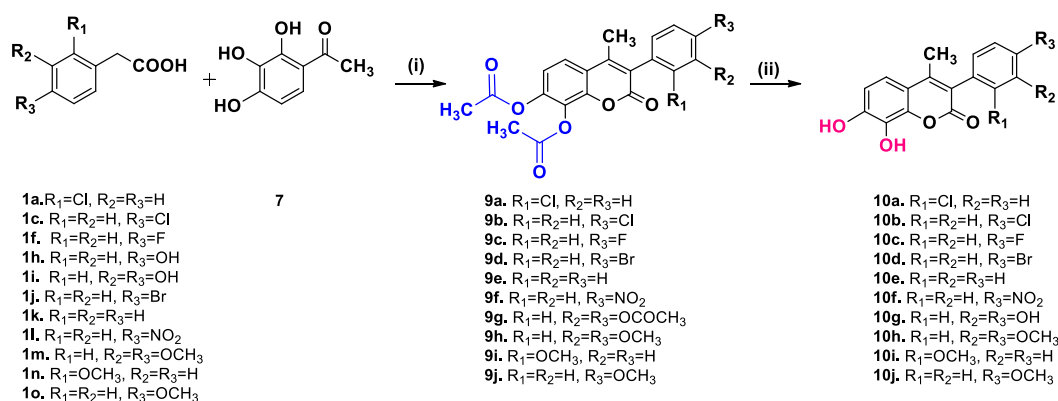
Σχήμα 2.15 Αναδιάταξη Fries.

Μεταξύ των δύο εναλλακτικών πορειών σύνθεσης της 2,3,4-τριυδροξυακετοφαινόνης, επιλέχθηκε η μέθοδος Β καθώς επιτεύχθηκε υψηλότερη απόδοση και συλλέχθηκε προϊόν υψηλής καθαρότητας (Πίνακας 2.1).

Πίνακας 2.1 Μελέτη εναλλακτικών συνθηκών αντίδρασης σύνθεσης της 2,3,4-τριυδροξυακετοφαινόνης (7).

Συνθετική πορεία A	Πυρογαλλόλη (5)	Οξικός ανυδρίτης (6)	Συνθήκες	Απόδοση
		1 eq	1 eq	H ₂ SO ₄ 130 °C, 24 h
Συνθετική πορεία B	Πυρογαλλόλη (5)	Οξικό οξύ (8)	Συνθήκες	Απόδοση
	1 eq	1.1 eq	BF ₃ .Et ₂ O 90-100 °C, 24 h	83%

Στη συνέχεια, ακολούθησε ομοίως η σύνθεση των νέων κουμαρινικών παραγώγων της Σειράς Β μέσω τροποποιημένης αντίδρασης Perkin-Ogialoro για τη σύνθεση των ακετυλοξυ-παραγώγων (9a-9j) και στη συνέχεια αντίδρασης απομάκρυνσης της ακετυλο ομάδας από την οποία προέκυψαν τα αντίστοιχα υδροξυ-κουμαρινικά ανάλογα 10a-10j (Σχήμα 2.16).



Σχήμα 2.16 Συνθετική πορεία ακετυλοξυ-κουμαρινών (9a-9j) και υδροξυ-κουμαρινών (10a-10j) της Σειράς Β χρησιμοποιώντας: (i) [(CH₃CO)₂O], Et₃N, 120 °C, 3 h, (ii) NH₂NH₂.H₂O, MeOH, 42 °C, 1-2 h.

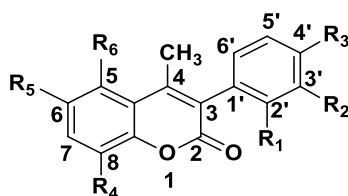
2.4 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ-ΣΥΖΗΤΗΣΗ

2.4.1 Σύνθεση των νέων κουμαρινικών αναλόγων των σειρών A και B

Σύμφωνα με τις μεθόδους που αναφέρθηκαν προηγουμένως συντέθηκαν δεκαπέντε ακετυλοξυ-κουμαρινικά ανάλογα (**3a-3k**) και δέκα υδροξυ- (**4a-4k**) κουμαρινικά ανάλογα που ανήκουν στη Σειρά A και είκοσι διακετυλοξυ- (**9a-9j**) και διυδροξυ- (**10a-10j**) κουμαρινικά ανάλογα που ανήκουν στη Σειρά B, η πλειοψηφία εκ των οποίων παρουσιάζεται για πρώτη φορά στη βιβλιογραφία.

Τα νέα κουμαρινικά ανάλογα παραλήφθηκαν σε υψηλή καθαρότητα μέσω ανακρυστάλλωσης ή καθαρισμού με μεθανόλη σε ικανοποιητικές έως υψηλές αποδόσεις μεταξύ 35-95%. Ακόμη, ταυτοποιήθηκαν και χαρακτηρίστηκαν δομικά μέσω φασματοσκοπίας πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού πρωτονίου και άνθρακα (^1H NMR και ^{13}C NMR), καθώς και φασματομετρίας μάζας υψηλής ανάλυσης (HR-MS).

Ακολουθούν οι Πίνακες 2.2 και 2.3 όπου παρουσιάζονται τα κουμαρινικά ανάλογα των Σειρών A και B.

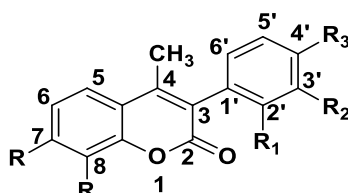


Δομή κουμαρινικού σκελετού

Πίνακας 2.2 Κουμαρινικά ανάλογα της Σειράς A

Ένωση	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅	R ₆
3a	Cl	H	H	H	H	OCOCH ₃
3b	H	Cl	H	H	H	OCOCH ₃
3c	H	H	Cl	H	H	OCOCH ₃
3d	F	H	H	H	H	OCOCH ₃
3e	H	F	H	H	H	OCOCH ₃
3f	H	H	F	H	H	OCOCH ₃
3g	H	Br	H	H	H	OCOCH ₃
3h	H	H	OCOCH ₃	H	H	H
3i	H	H	OCOCH ₃	H	Br	H
3j	H	H	OCOCH ₃	H	Cl	H
3k	H	H	OCOCH ₃	Br	Br	H
3l	H	OCOCH ₃	OCOCH ₃	H	H	H
3m	H	OCOCH ₃	OCOCH ₃	H	Br	H
3n	H	OCOCH ₃	OCOCH ₃	H	Cl	H
3o	H	OCOCH ₃	OCOCH ₃	Br	Br	H
4a	Cl	H	H	H	H	OH
4b	H	Cl	H	H	H	OH
4c	H	H	Cl	H	H	OH

4d	F	H	H	H	H	OH
4e	H	F	H	H	H	OH
4f	H	H	F	H	H	OH
4h	H	H	OH	H	H	H
4i	H	H	OH	H	Br	H
4j	H	H	OH	H	Cl	H
4k	H	H	OH	Br	Br	H



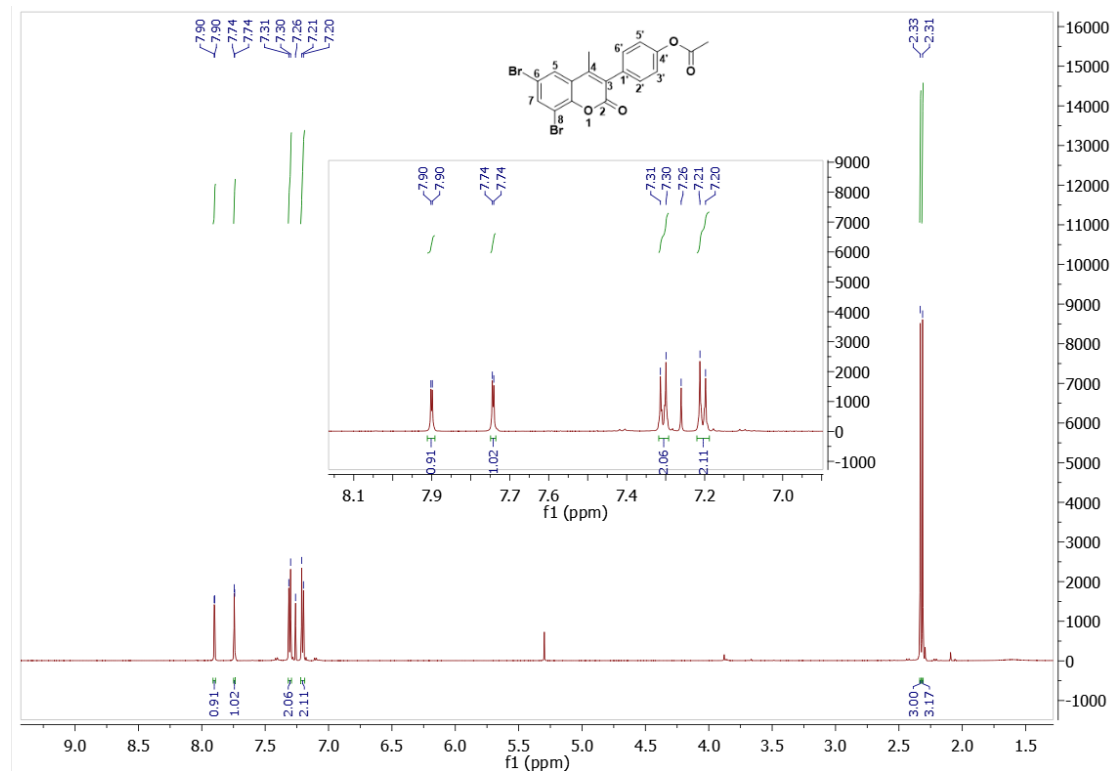
Δομή κουμαρινικού σκελετού

Πίνακας 2.3 Κουμαρινικά ανάλογα της Σειράς Β.

Ένωση	R	R ₁	R ₂	R ₃
9a	OCOCH ₃	Cl	H	H
9b	OCOCH ₃	H	H	Cl
9c	OCOCH ₃	H	H	F
9d	OCOCH ₃	H	H	Br
9e	OCOCH ₃	H	H	H
9f	OCOCH ₃	H	H	NO ₂
9g	OCOCH ₃	H	OCOCH ₃	OCOCH ₃
9h	OCOCH ₃	H	OCH ₃	OCH ₃
9i	OCOCH ₃	OCH ₃	H	H
9j	OCOCH ₃	H	H	OCH ₃
10a	OH	Cl	H	H
10b	OH	H	H	Cl
10c	OH	H	H	F
10d	OH	H	H	Br
10e	OH	H	H	H
10f	OH	H	H	NO ₂
10g	OH	H	OH	OH
10h	OH	H	OCH ₃	OCH ₃
10i	OH	OCH ₃	H	H
10j	OH	H	H	OCH ₃

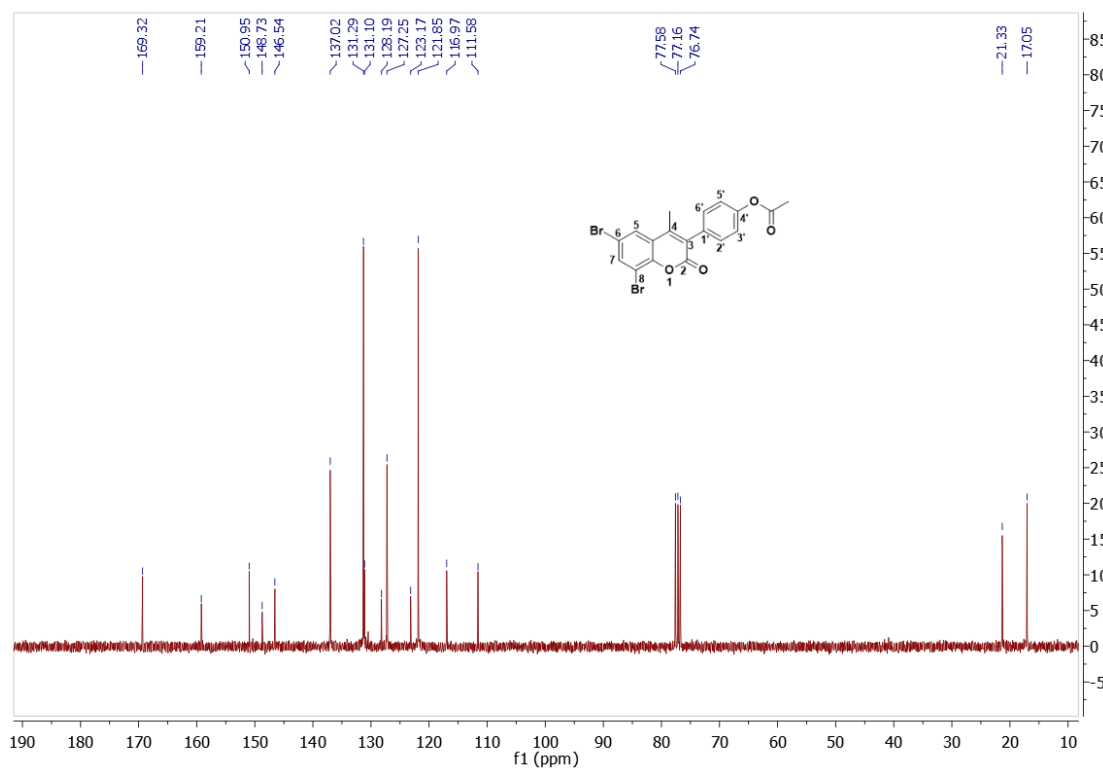
2.4.2 Φασματοσκοπική μελέτη των νέων κουμαρινικών αναλόγων

Ακολουθεί φασματοσκοπική μελέτη πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (NMR) ενός ακετυλοξυ- κι ενός υδροξυ-κουμαρινικού αναλόγου. Πιο συγκεκριμένα, θα αναλυθούν τα φάσματα ^1H και ^{13}C NMR των ενώσεων **3k** και **10j** (Εικόνες 2.4-2.7).



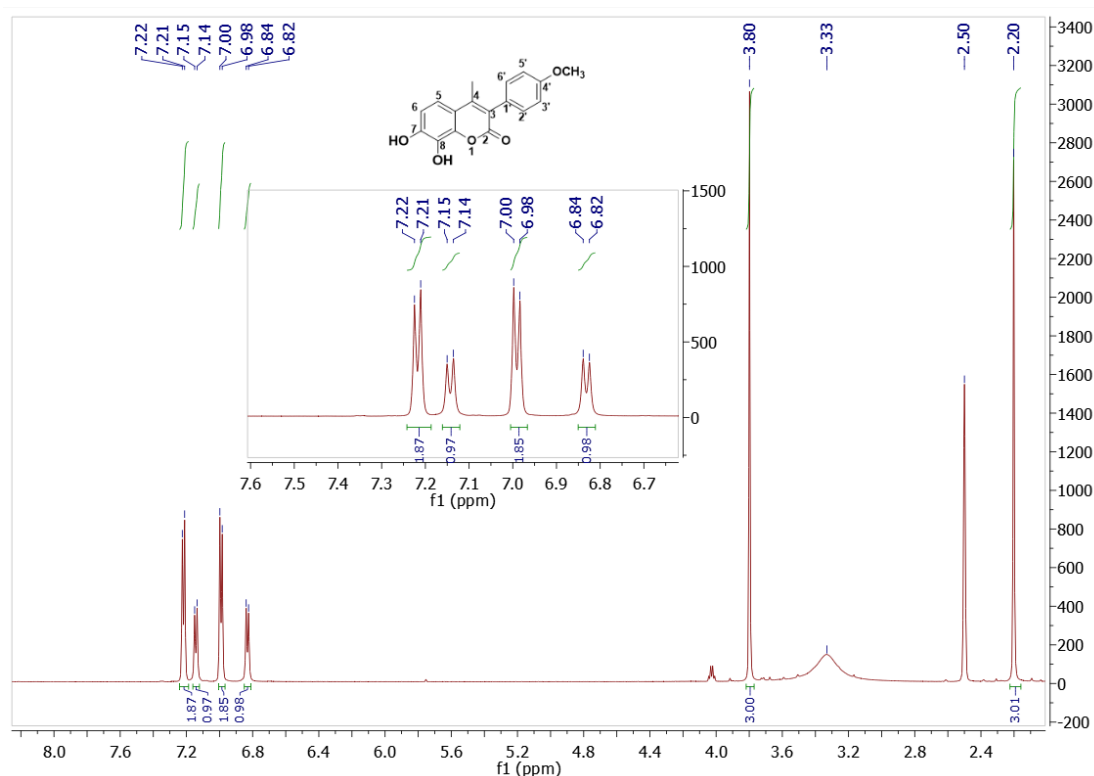
Εικόνα 2.4 Φάσμα ^1H NMR της 3-(4-ακετυλοξυφαινυλο)-6,8-διβρωμο-4-μεθυλοχρωμεν-2-όνης (**3k**).

Στο φάσμα ^1H NMR της 3-(4-ακετυλοξυφαινυλο)-6,8-διβρωμο-4-μεθυλοχρωμεν-2-όνης (**3k**) (Εικόνα 2.4), παρουσιάζεται μία διπλή κορυφή σε δ_H 7.90 ppm που ολοκληρώνεται για ένα πρωτόνιο και αντιστοιχεί στο H-7, λόγω της μετασύζευξης του με το H-5, ενώ ακολουθεί μια διπλή κορυφή σε δ_H 7.74 ppm που ολοκληρώνεται για ένα πρωτόνιο και αντιστοιχεί στο H-5. Στη συνέχεια, παρουσιάζονται δύο διπλές κορυφές που ολοκληρώνονται για δύο πρωτόνια η κάθε μια και αντιστοιχούν στα ισοδύναμα πρωτόνια των θέσεων 2' & 6' και 3' & 5', σε δ_H 7.31 και 7.21 ppm αντίστοιχα. Τέλος, εμφανίζονται δύο απλές κορυφές στα υψηλά πεδία (δ_H 2.33 και 2.31 ppm), κάθε μία εκ των οποίων ολοκληρώνεται για τρία πρωτόνια και αποδίδονται στα ισοδύναμα πρωτόνια της μεθυλο-ομάδας της θέσης 4, καθώς και στα ισοδύναμα πρωτόνια της ακετυλοξυ-ομάδας της θέσης 4'.



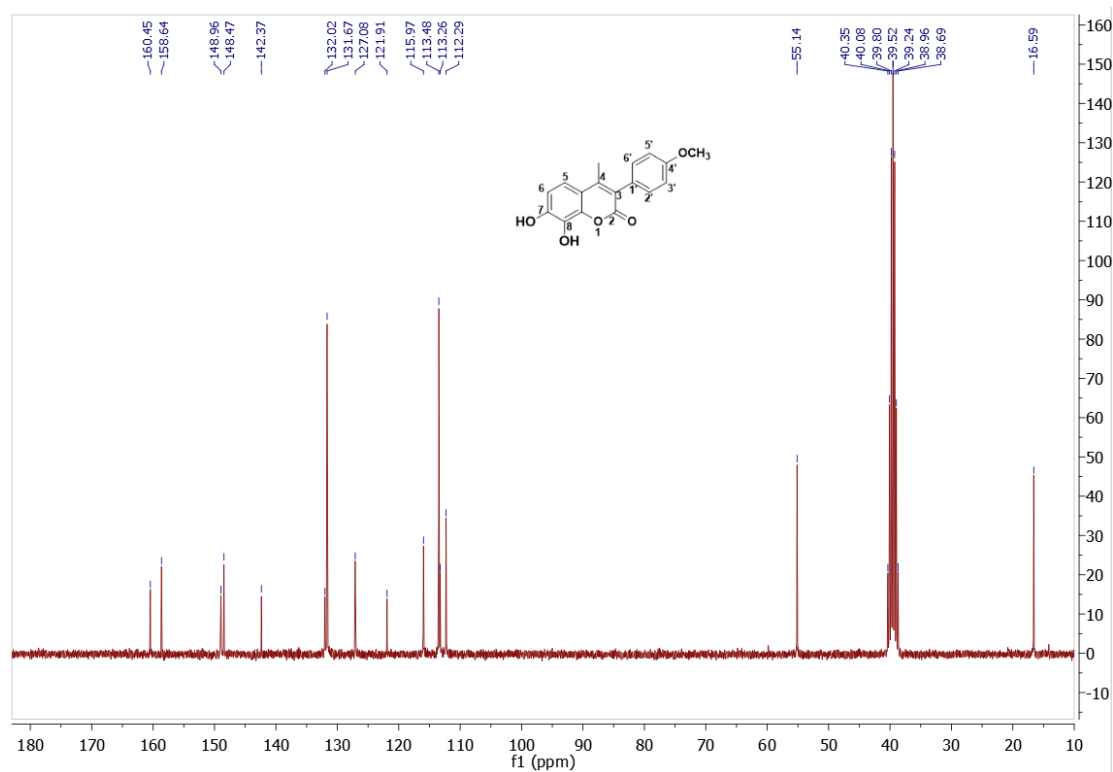
Εικόνα 2.5 Φάσμα ^{13}C NMR της 3-(4-ακετυλοξυφαινυλο)-6,8-διβρωμο-4-μεθυλο-χρωμεν-2-όνης (**3k**).

Στο φάσμα ^{13}C NMR της 3-(4-ακετυλοξυφαινυλο)-6,8-διβρωμο-4-μεθυλο-χρωμεν-2-όνης (**3k**) (Εικόνα 2.5), παρουσιάζεται αρχικά μία κορυφή σε δc 169.32 ppm που αποδίδεται στον καρβονυλικό άνθρακα της ακετυλοξυ-ομάδας, ενώ ακολουθεί στα 159.21 ppm ο άνθρακας του καρβονυλίου της θέσης 2 του κουμαρινικού σκελετού. Στη συνέχεια, μεταξύ 149 και 111 ppm εμφανίζονται οι άνθρακες των υπόλοιπων θέσεων του κουμαρινικού σκελετού με χαρακτηριστικές τις κορυφές σε δc 131.29 ppm και 123.17 ppm που αντιστοιχούν στους ισοδύναμους άνθρακες των θέσεων 2' & 6' και 3' & 5', αντίστοιχα. Τέλος, σε δc 21.33 και 17.05 ppm εμφανίζονται οι κορυφές που αποδίδονται στους άνθρακες της ακετυλοξυ-ομάδας της θέσης 4' και της μεθυλο-ομάδας της θέσης 4.



Εικόνα 2.6 Φάσμα ¹H NMR της 7,8-διυδροξυ-3-(4-μεθοξυφαινυλο)-4-μεθυλοχρωμεν-2-όνης (**10j**).

Στο φάσμα ¹H NMR της 7,8-διυδροξυ-3-(4-μεθοξυφαινυλο)-4-μεθυλοχρωμεν-2-όνης (**10j**) (Εικόνα 2.6) παρουσιάζεται μία διπλή κορυφή σε δ_H 7.22 ppm που ολοκληρώνεται για δύο πρωτόνια και αποδίδεται στα ισοδύναμα πρωτόνια των θέσεων 3' και 5', ενώ ακολουθεί μία διπλή κορυφή σε δ_H 7.15 ppm που αντιστοιχεί στο H-5. Στη συνέχεια, εμφανίζεται σε δ_H 6.99 ppm μία διπλή κορυφή που ολοκληρώνεται για δύο πρωτόνια και αποδίδεται στα ισοδύναμα πρωτόνια των θέσεων 2' και 6', ενώ ακολουθεί μία διπλή κορυφή σε δ_H 6.83 ppm που αντιστοιχεί στο H-6. Σε δ_H 3.80 ppm παρουσιάζεται μία απλή κορυφή που αποδίδεται στα τρία ισοδύναμα πρωτόνια της μεθοξυ-ομάδας της θέσης 4', ενώ σε δ_H 2.20 ppm παρουσιάζεται μία απλή κορυφή που αντιστοιχεί στα τρία ισοδύναμα πρωτόνια της μεθυλο-ομάδας της θέσης 4 του κουμαρινικού σκελετού.



Εικόνα 2.7 Φάσμα ^{13}C NMR της 7,8-διυδροξυ-3-(4-μεθοξυφαινυλο)-4-μεθυλο-χρωμεν-2-όνης (**10j**).

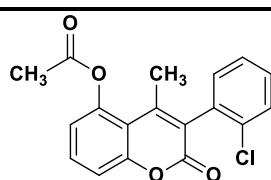
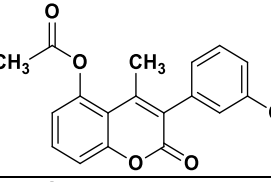
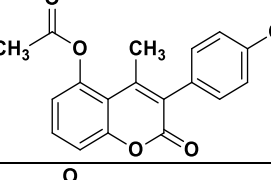
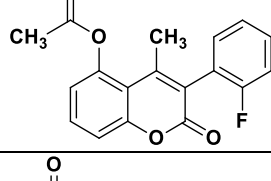
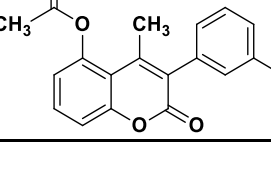
Στο φάσμα ^{13}C NMR της 7,8-διυδροξυ-3-(4-μεθοξυφαινυλο)-4-μεθυλο-χρωμεν-2-όνης (**10j**) (Εικόνα 2.7), εμφανίζονται σε δύο κορυφές σε δc 160.45 ppm και 158.64 ppm, οι οποίες αποδίδονται στον άνθρακα του καρβονυλίου, καθώς και στον άνθρακα της μεθόξυ-ομάδας. Ακολουθούν μεταξύ 148.96 ppm και 112.29 ppm οι κορυφές που αποδίδονται στους υπόλοιπους άνθρακες του κουμαρινικού σκελετού, ενώ σε δc 55.14 ppm εμφανίζεται μία κορυφή που αποδίδεται στον άνθρακα της μεθοξυ-ομάδας. Τέλος, σε δc 16.59 ppm συντονίζεται ο άνθρακας της μεθυλο-ομάδας της θέσης 4 του κουμαρινικού σκελετού.

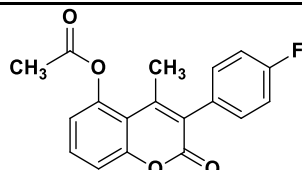
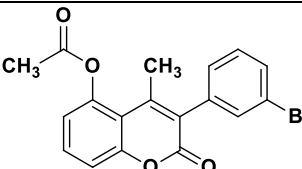
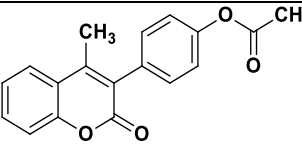
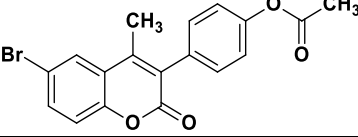
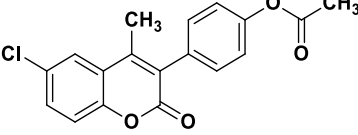
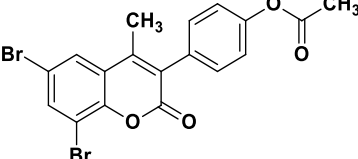
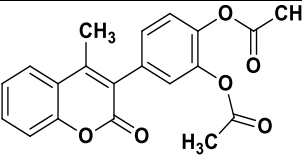
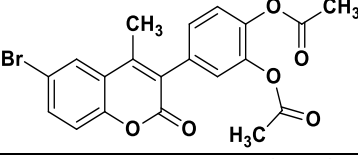
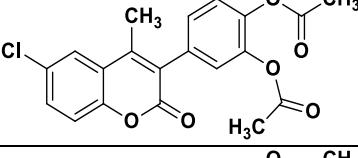
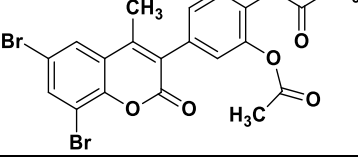
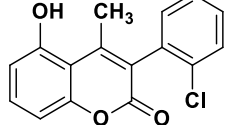
2.4.3 Αξιολόγηση της βιολογικής δράσης των κουμαρινικών αναλόγων της Σειράς Α

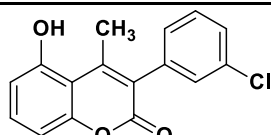
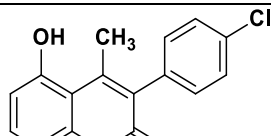
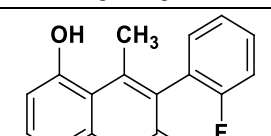
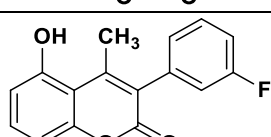
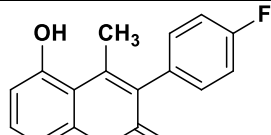
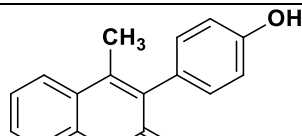
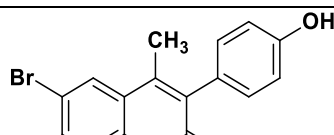
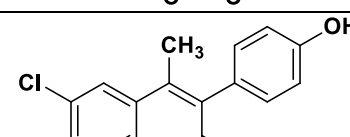
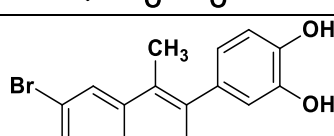
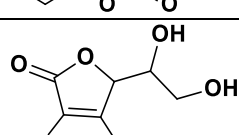
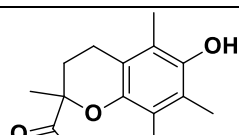
2.4.3.1 Αξιολόγηση αντιοξειδωτικής δράσης

Τα νέα κουμαρινικά παράγωγα **3a-3o** & **4a-4k** που συντέθηκαν, αξιολογήθηκαν ως προς την αντιοξειδωτική τους δράση με τις ακόλουθες *in vitro* δοκιμές: (i) αναγωγή της ελεύθερης ρίζας 2,2-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid (ABTS^{•+}), (ii) ικανότητα δέσμευσης ριζών υδροξυλίου (HO[•]), (iii) αναστολή της λιπιδικής υπεροξειδωσης (LP) του λινολεϊκού οξέος υποκινούμενη από τον εκκινητή ελευθέρων ριζών AAPH, και (iv) δοκιμή 2',7'-διχλωρο-φλουορεσκεινης διοξικής (DCFDA, 2',7'-dichlorofluorescein diacetate) η οποία πραγματοποιήθηκε χρησιμοποιώντας την κυτταρική σειρά ανθρώπινων κερατινοκυττάρων HaCaT. Ως πρότυπα, χρησιμοποιήθηκαν το ασκορβικό οξύ καθώς και το Trolox (2,5,7,8-τετραμεθυλο-6-υδροξυ-χρωμανο-2-καρβοξυλικό οξύ) που είναι ένα υδατοδιαλυτό ανάλογο βιταμίνης E. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στον Πίνακα 2.4.

Πίνακας 2.4 Αξιολόγηση της αντιοξειδωτικής δράσης των κουμαρινικών αναλόγων της Σειράς Α σε συγκέντρωση 100 μΜ.

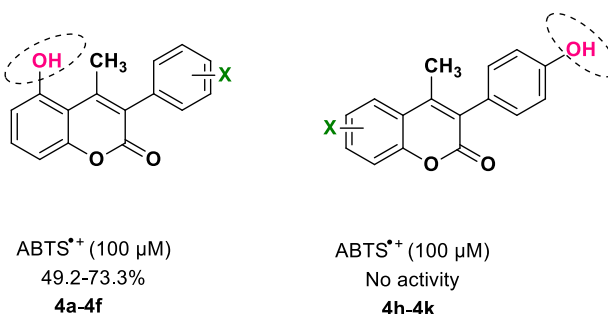
Ένωση	Δομή	(%) ABTS ^{•+} (100 μΜ)	(%) HO [•] (100 μΜ)	LP IC ₅₀ (μΜ) ή (%) σε 100 μΜ	(%) DCFDA (100 μΜ)
3a		no	97.0	71.9 μΜ	33.8
3b		no	96.4	91.5 μΜ	56.9
3c		15.0	30.8	75.1 μΜ	no
3d		no	100	42.6%	22.4
3e		no	85.2	no	no

3f		no	71.6	36.8%	100.0
3g		no	42.0	50.7 μM	45.5
3h		no	100.0	70.7 μM	no
3i		no	64.5	70.7 μM	80.9
3j		no	26.6	no	9.0
3k		no	92.9	no	no
3l		no	10.7	85.5	no
3m		no	46.7	37.1	no
3n		no	65.7	84.3	no
3o		no	52.1	77.2	25.7
4a		56.5	37.3	no	no

4b		49.2	100	no	27.4
4c		65.2	48.5	86.6 μM	no
4d		73.3	21.9	no	no
4e		69.2	100.0	31.0%	no
4f		64.2	99.4	86.8 μM	no
4h		8.6	72.2	no	no
4i		no	100.0	70.7 μM	100.0
4j		no	100.0	36.1%	no
4k		27.8	100.0	36.9 μM	no
Ασκορβικό οξύ		99.1	-	-	87.0
Trolox		92.0	85.0	92.0%	-

No: Η ένωση δεν έδειξε δράση στις συγκεκριμένες πειραματικές συνθήκες

Αρχικά, όσον αφορά την ικανότητα των κουμαρινικών αναλόγων να δεσμεύουν την ελεύθερη ρίζα $ABTS^{*+}$, παρατηρείται ότι κανένα από τα ακετυλοξυ-παράγωγα δεν εμφανίζει αξιόλογη δράση. Ωστόσο, η πλειοψηφία των υδροξυ-αναλόγων (**4a-4f**) εμφανίζει σημαντική αναγωγική ικανότητα (>50%) στη συγκέντρωση των 100 μM . Αυτό μπορεί πιθανώς να αποδοθεί στην ικανότητα των φαινολικών ενώσεων να απελευθερώνουν πρωτόνια από τις υδροξυλομάδες που διαθέτουν, τα οποία αντιδρούν με την ελεύθερη ρίζα $ABTS^{*+}$. Το παράγωγο **4d**, το οποίο διαθέτει φθορο υποκαταστάτη στη θέση 2' του 3-φαινολικού δακτυλίου και ομάδα υδροξυλίου στη θέση 5 του κουμαρινικού σκελετού παρουσίασε την υψηλότερη δράση (73.3%). Ωστόσο, είναι αξιοσημείωτο ότι η υποκατάσταση με υδροξυλομάδα στη θέση 4' του 3-φαινολικού δακτυλίου (**4h-4k**) έναντι της θέσης 5 του κουμαρινικού σκελετού (**4a-4f**), οδηγεί σε μερική ή και ολική απώλεια της αντιοξειδωτικής δράσης, υποδεικνύοντας τη σημασία της παρουσίας της υδροξυλομάδας στη συγκεκριμένη θέση (Σχήμα 2.17).

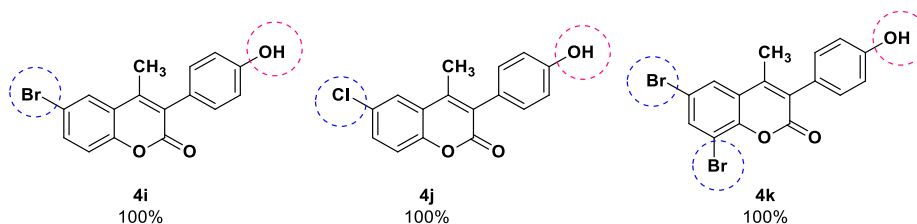


Σχήμα 2.17 Επίδραση της θέσης υποκατάστασης της υδροξυλομάδας στην ικανότητα αναγωγής της ρίζας $ABTS^{*+}$.

Ανάλογες παρατηρήσεις έχουν καταγραφεί από την ερευνητική ομάδα των Li et al. [76], οι οποίοι παρατήρησαν ότι η υποκατάσταση με ομάδα υδροξυλίου στον κουμαρινικό σκελετό ήταν ουσιώδης για την ενίσχυση της αντιοξειδωτικής δράσης των υβριδικών μορίων κουμαρινών-τυροσόλης που συνέθεσαν. Ακόμη, η ομάδα των Zhang et al. [77] υπέδειξε ότι η παρουσία ομάδας υδροξυλίου στον αρωματικό δακτύλιο της θέσης 4 του κουμαρινικού σκελετού, δεν επηρεάζει σημαντικά την αντιοξειδωτική δράση των 7,8-διυδροξυ-4-φαινολο-κουμαρινών που συνέθεσαν.

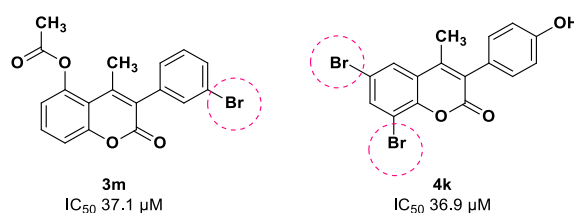
Τα κουμαρινικά παράγωγα εξετάστηκαν για την ικανότητά τους να δεσμεύουν ελεύθερες ρίζες υδροξυλίου. Τα παράγωγα **3d**, **3h**, **4b**, **4i**, **4j**, και **4k** επέδειξαν 100% ικανότητα δέσμευσης. Ενδιαφέρουσα παρατήρηση αποτελεί ότι παρόλο που η ένωση **3h**, η οποία διαθέτει μία ακετυλοξυ-ομάδα στη θέση 4' του 3-αρωματικού δακτυλίου, παρουσίασε 100% δραστηριότητα, η προσθήκη μίας επιπλέον ακετυλοξυ-ομάδας στη θέση 3' του δακτυλίου (**3l**), οδηγεί σε απώλεια της δράσης (10.7%), ενώ το υδροξυ-ανάλογο της, **4h**, παρουσιάζει επίσης αξιόλογη δράση (72.2%). Επιπλέον, οι ενώσεις **4i**, **4j** και **4k**, οι οποίες διαθέτουν βρωμο- και χλωρο-υποκαταστάτες στον κουμαρινικό σκελετό καθώς και ομάδα υδροξυλίου στη θέση 4' του 3-φαινολικού δακτυλίου, εμφάνισαν 100% ικανότητα δέσμευσης ριζών

υδροξυλίου, υποδεικνύοντας την επίδραση αυτού του μοτίβου υποκατάστασης στη συγκεκριμένη δράση (Σχήμα 2.18).



Σχήμα 2.18 Χημική δομή των ενώσεων **4i**, **4j** και **4k**, οι οποίες εμφάνισαν 100% ικανότητα δέσμευσης ριζών υδροξυλίου.

Ακόμη, παρατηρήθηκε ότι η πλειοψηφία των ακετυλοξυ-κουμαρινικών αναλόγων εμφάνισε ικανοποιητική ικανότητα αναστολής της λιπιδικής υπεροξειδωσης. Ειδικότερα, το παράγωγο **3m**, το οποίο διαθέτει βρωμο-υποκαταστάτη στη θέση 6 του κουμαρινικού σκελετού καθώς και δύο ακετυλοξυ-ομάδες στις θέσεις 3' και 4' του 3-φαινολικού δακτυλίου, αποτέλεσε τον ισχυρότερο αναστολέα (IC_{50} 37.1 μ M). Παρατηρήθηκε επίσης ότι η παρουσία φθορο-υποκαταστάτη στον αρωματικό δακτύλιο της θέσης 3 του κουμαρινικού σκελετού οδήγησε σε ανενεργά μόρια (**3d**, **3e** & **3f**). Αναφορικά με τα υδροξυ-κουμαρινικά παράγωγα, η ένωση **4k**, η οποία διαθέτει δύο βρωμο-υποκαταστάτες στον κουμαρινικό σκελετό εμφάνισε την υψηλότερη ικανότητα αναστολής (IC_{50} 36.9 μ M), ενώ το ακετυλοξυ-ανάλογό της, **3k**, ήταν ανενεργό. Ακόμη, το κουμαρινικό παράγωγο **3g**, το οποίο φέρει βρωμο-υποκαταστάτη στη θέση 3' του 3-αρωματικού δακτυλίου αποτελεί επίσης ισχυρό αναστολέα (IC_{50} 50.7 μ M), υποδεικνύοντας ότι η παρουσία ομάδας βρωμίου στον κουμαρινικό σκελετό ενισχύει την ικανότητα αναστολής της λιπιδικής υπεροξειδωσης, με τη θέση υποκατάστασης ωστόσο να παίζει σημαντικό ρόλο όπως έχει αναφερθεί και σε άλλες μελέτες [45,61](Σχήμα 2.19).



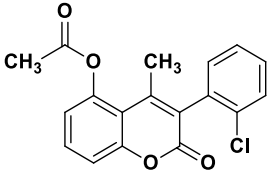
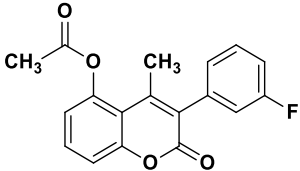
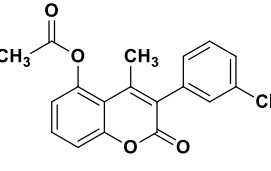
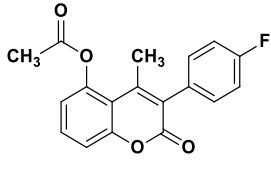
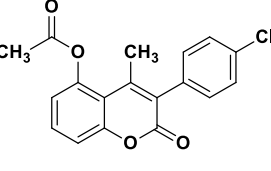
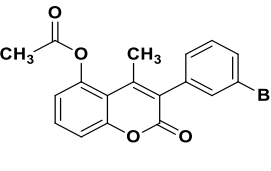
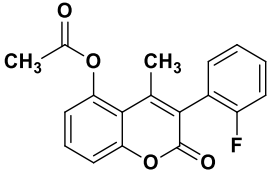
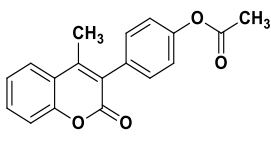
Σχήμα 2.19 Χημική δομή των ενώσεων **3m** και **4k** που αποτελούν τους ικανότερους αναστολείς της λιπιδικής υπεροξειδωσης μεταξύ των μορίων της Σειράς Α.

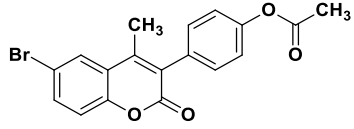
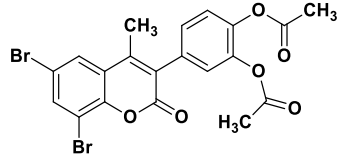
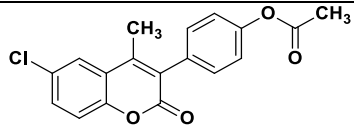
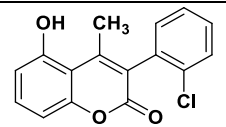
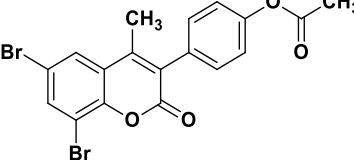
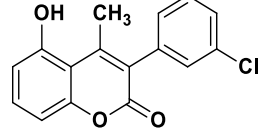
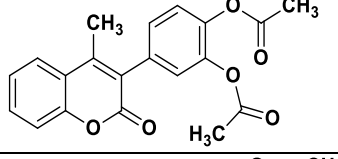
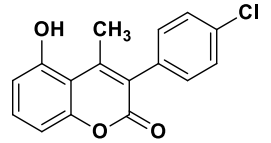
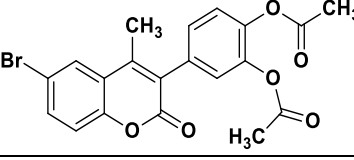
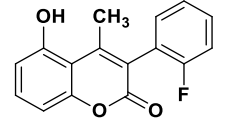
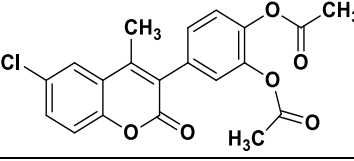
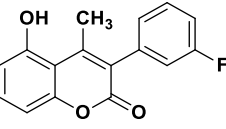
Τέλος, το 4'-φθορο-υποκατεστημένο ανάλογο **3f** (100%) και τα 6-βρωμο υποκατεστημένα παράγωγα **3i** (80.9%) και **4i** (100%) μείωσαν σημαντικά την παρουσία δραστικών μορφών οξυγόνου (ROS) που δημιουργήθηκαν από την επώαση των κυττάρων HaCaT με υπεροξειδίου του υδρογόνου (H_2O_2) μετά από 24 h.

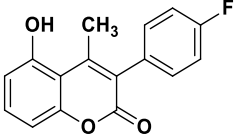
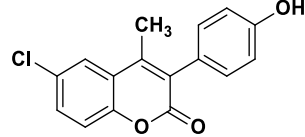
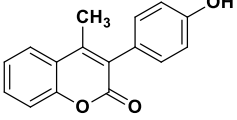
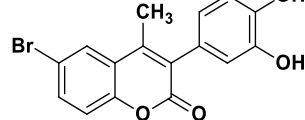
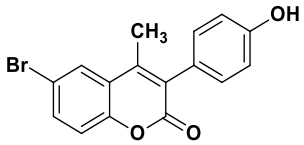
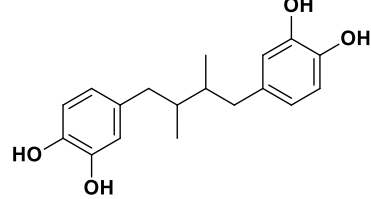
2.4.3.2 Αξιολόγηση ικανότητας αναστολής του ενζύμου της λιποξυγονάσης από σόγια

Τα νέα κουμαρινικά ανάλογα της Σειράς Α αξιολογήθηκαν ως προς την ικανότητα αναστολής της δράσης του ενζύμου της λιποξυγονάσης από σόγια ως ένδειξη αντιφλεγμονώδους δράσης και αποτελέσματα παρουσιάζονται στον Πίνακα 2.5.

Πίνακας 2.5 Αξιολόγηση της ικανότητας των νέων κουμαρινών της Σειράς Α να αναστέλλουν τη δράση της φυτικής λιποξυγονάσης (LOX).

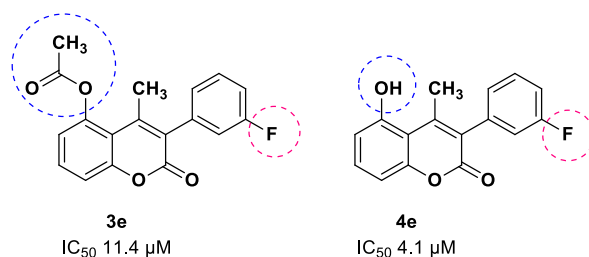
Ένωση	Δομή	Ικανότητα αναστολής της LOX IC ₅₀ (μM) ή (%) σε 100 μM	Ένωση	Δομή	Ικανότητα αναστολής της LOX IC ₅₀ (μM) ή (%) σε 100 μM
3a		17%	3e		11.4 μM
3b		31.6 μM	3f		20.1%
3c		no	3g		40.5 μM
3d		11.6%	3h		33.8%

3i		46.5%	3o		no
3j		49.5 μM	4a		10.0 μM
3k		8.7 μM	4b		47.3%
3l		31.4%	4c		no
3m		48.0%	4d		31.6 μM
3n		56.5 μM	4e		4.1 μM

4f		39.2%	4j		35.0%
4h		27.2%	4k		33.4%
4i		19.3%	NGDA		91.0%

Νο: Η ένωση δεν έδειξε δράση στις συγκεκριμένες πειραματικές συνθήκες

Ανάμεσα στα μόρια της σειράς A, το 5-υδροξυ παράγωγο **4e**, το οποίο φέρει φθόρο-υποκαταστάτη στη θέση 3' του 3-φαινολικού δακτυλίου αποτέλεσε τον ισχυρότερο αναστολέα της λιποξυγονάσης (IC_{50} 4.1 μ M). Είναι αξιοσημείωτο ότι το ακετυλοξυ-ανάλογό του, **3e**, είναι επίσης ισχυρός αναστολέας της LOX με τιμή IC_{50} 11.4 μ M, υποδεικνύοντας την ενίσχυση της δράσης από την παρουσία της ομάδας φθορίου στη συγκεκριμένη θέση (Σχήμα 2.20). Η υποκατάσταση με φθόριο στις θέσεις 2' και 4' οδήγησε σε ανενεργά μόρια για τα ακετυλοξυ-ανάλογα (**3d** & **3f**), ενώ για τα υδροξυ-ανάλογα (**4d** & **4f**), μόνο το 2'-φθορο υποκατεστημένο παράγωγο (**4d**) επέδειξε ανασταλτική δράση (IC_{50} 31.6 μ M).

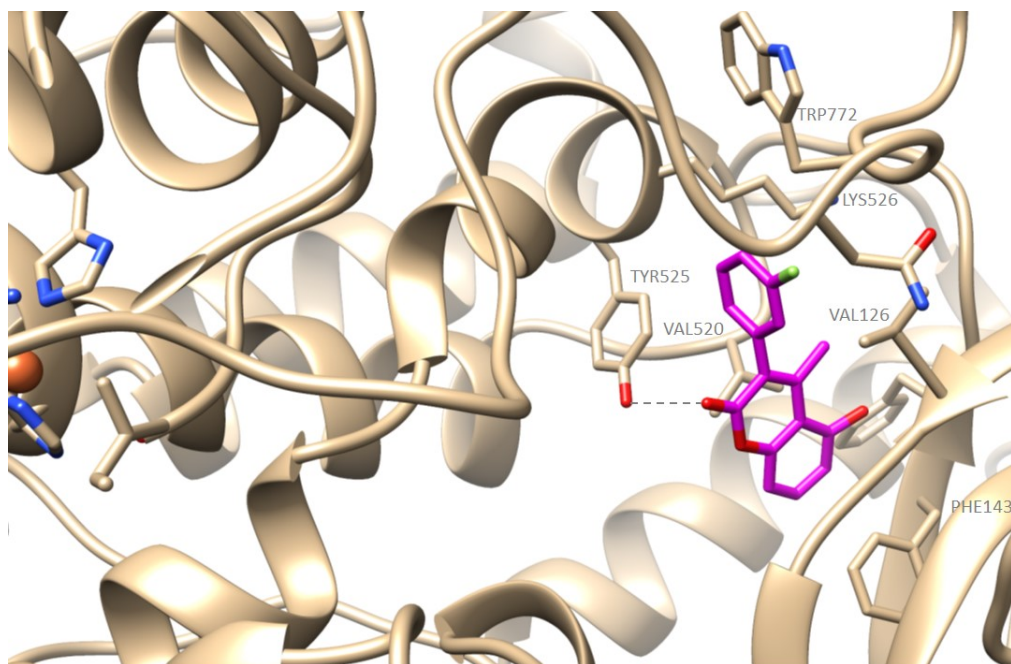


Σχήμα 2.20 Επίδραση της παρουσίας ομάδας φθορίου στη θέση 3' του 3-φαινολικού δακτυλίου στην ικανότητα αναστολής της φυτικής LOX.

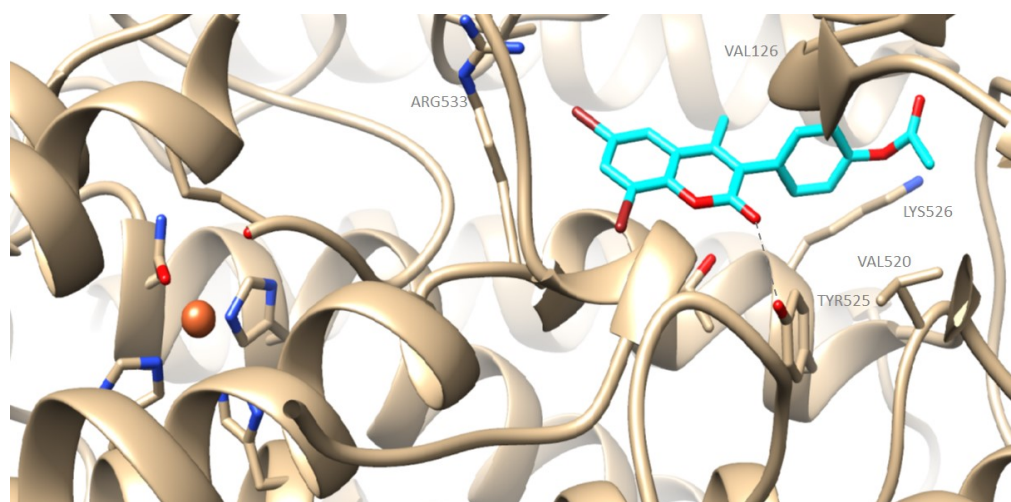
Τέλος, το ακετυλοξυ-κουμαρινικό ανάλογο **3k**, που διαθέτει δύο βρωμο υποκαταστάτες στον κουμαρινικό σκελετό μαζί με το παράγωγο **4a**, το οποίο φέρει μια ομάδα χλωρίου στη θέση 2' του 3-αρωματικού δακτυλίου, παρουσίασαν επίσης σημαντική ικανότητα αναστολής της LOX, με τιμές IC_{50} 8.7 μ M and 10 μ M, αντίστοιχα, σε αντίθεση με τα ανάλογά τους **4k** και **3a**, τα οποία βρέθηκαν ανενεργά.

2.4.3.3 Προσομοίωση της μοριακής πρόσδεσης των ενώσεων **4e** και **3k**, στη φυτική λιποξυγονάση

Οι προτεινόμενες διαμορφώσεις πρόσδεσης στη φυτική λιποξυγονάση LOX (PDB code: 3PZW) των ισχυρότερων αναστολέων της LOX από τα παράγωγα της Σειράς A, **4e** και **3k**, παρουσιάζονται στις Εικόνες 2.8 & 2.9, με AutoDockVina σκορ πρόσδεσης -9.2 kcal/mol και -9.3 kcal/mol, αντίστοιχα.



Εικόνα 2.8 Προτεινόμενη διαμόρφωση πρόσδεσης της **4e** (απεικονιζόμενη μωβ δομή) στη λιποξυγονάση από σόγια (LOX-1).



Εικόνα 2.9 Προτεινόμενη διαμόρφωση πρόσδεσης της **3k** (απεικονιζόμενη γαλάζια δομή) στη λιποξυγονάση από σόγια (LOX-1).

Από τη συγκεκριμένη μελέτη συμπεραίνεται ότι τα νέα μόρια παρουσιάζουν αλλοστερική δέσμευση με το ένζυμο, δηλαδή εκτός του ενεργού κέντρου του ενζύμου. Το παράγωγο **4e** παρουσίασε υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις με τα αμινοξέα VAL126, PHE143, VAL520, TYR525, LYS526, και TRP772, δεσμό υδρογόνου με το αμινοξύ TYR525 και αλληλεπιδράσεις κατιόντος-π με το αμινοξύ LYS526 (Εικόνα 2.8). Το παράγωγο **3k** παρουσίασε υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις με τα αμινοξέα VAL126, VAL520, TYR525, LYS526, και ARG533, καθώς και δεσμό υδρογόνου με το αμινοξύ TYR525 (Εικόνα 2.9). Είναι πιθανό επομένως, η

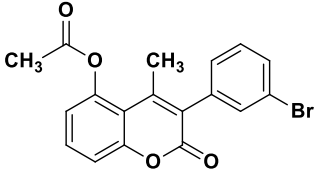
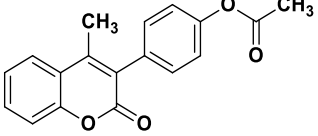
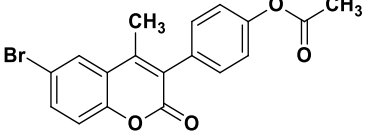
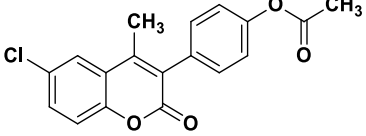
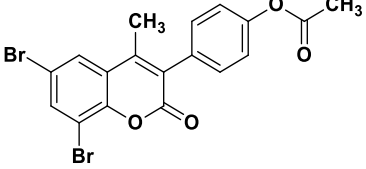
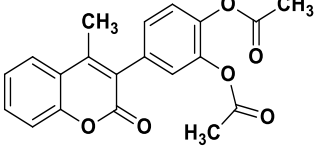
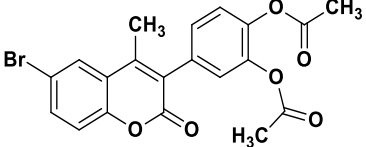
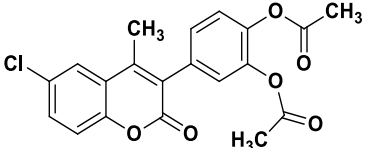
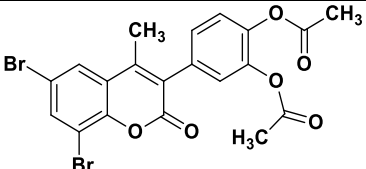
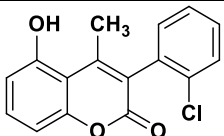
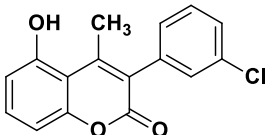
ικανότητα αναστολής των ενώσεων **3k** and **4e** να σχετίζεται με την παρεμπόδιση της εισόδου του υποστρώματος στο ενεργό κέντρο.

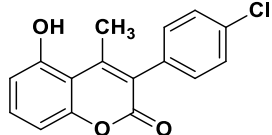
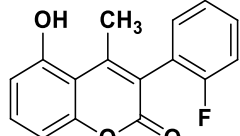
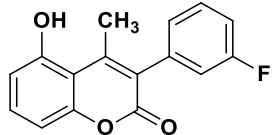
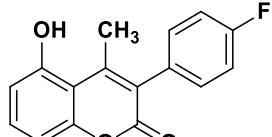
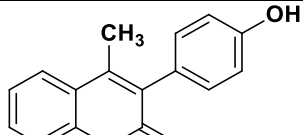
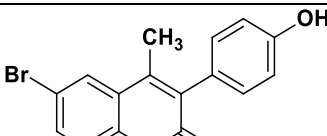
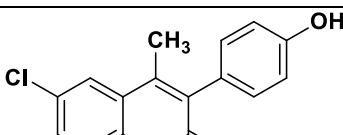
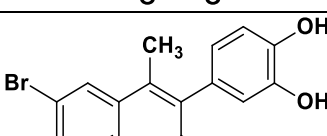
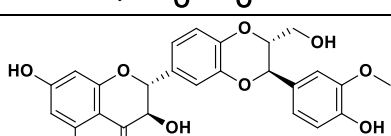
2.3.3.4 Μελέτες βιωσιμότητας σε υγιείς και καρκινικές ανθρώπινες κυτταρικές σειρές

Όλα τα κουμαρινικά παράγωγα της Σειράς A, εξετάστηκαν ως προς την επίδρασή τους ενάντια στις ανθρώπινες καρκινικές σειρές πνεύμονα (A549) και μελανώματος (A375) και στην κυτταρική σειρά ανθρώπινων κερατινοκυττάρων HaCaT σε συγκέντρωση 100 μM και τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στον Πίνακα 2.6.

Πίνακας 2.6 (%) Βιωσιμότητα κυττάρων HaCaT και (%) κυτταροτοξική δράση έναντι των σειρών A549 και A375, έπειτα από επίδραση των κουμαρινικών αναλόγων της Σειράς A σε συγκέντρωση 100 μM .

Ένωση	Δομή	(%) Βιωσιμότητα HaCaT (100 μM)	(%) Κυτταροτοξική δράση έναντι A549 (100 μM)	(%) Κυτταροτοξική δράση έναντι A375 (100 μM)
3a		100.0	no	38.7
3b		100.0	24.6	72.2
3c		100.0	no	24.8
3d		100.0	7.5	28.5
3e		96.5	8.9	60.7
3f		100.0	no	35.8

3g		100.0	no	7.0
3h		96.2	no	43.2
3i		100.0	no	51.0
3j		90.5	no	54.6
3k		100.0	no	28.8
3l		100.0	no	40.4
3m		100.0	no	33.3
3n		100.0	no	11.5
3o		100.0	no	45.6
4a		100.0	64.7	33.1
4b		100.0	no	52.8

4c		63.7	54.5	22.2
4d		100.0	75.7	11.5
4e		92.4	52.3	43.1
4f		100.0	62.5	45.4
4h		100.0	33.7	12.6
4i		100.0	21.7	6.5
4j		73.0	33.5	11.9
4k		100.0	66.5	no
Σιλμπινίνη		35.7	78.3	84.4

No: Η ένωση δεν έδειξε δράση στις συγκεκριμένες πειραματικές συνθήκες

Τα νέα 3-αρυλο-κουμαρινικά παράγωγα επέδειξαν χαμηλή τοξικότητα έναντι στην κυτταρική σειρά ανθρώπινων κερατινοκυττάρων HaCaT, εκτός από τα παράγωγα **4c** και **4j** τα οποία μείωσαν τα επίπεδα βιωσιμότητας στο 63.7% και 73%, αντίστοιχα. Τα παράγωγα αυτά, διαθέτουν χλωρο- και υδροξυ- υποκαταστάτες σε διαφορετικές θέσεις στον κουμαρινικό σκελετό, υποδεικνύοντας πιθανώς ότι ο

συνδυασμός των συγκεκριμένων υποκαταστατών οδηγεί σε αύξηση της τοξικότητας.

Στην περίπτωση της σειράς αδеноκαρκινώματος πνεύμονα (A549), παρατηρήθηκε αυξημένη κυτταροτοξικότητα των υδροξυ-κουμαρινικών αναλόγων σε σχέση με τα ακετυλοξυ-ανάλογά τους. Τα φθορο-υποκατεστημένα ανάλογα **4d** και **4f**, παρουσίασαν τα υψηλότερα ποσοστά τοξικότητας (75.7% and 62.5%, αντίστοιχα), παρόμοια με της σιλμπινίνης (78.3%), ακολουθούμενα από τα παράγωγα **4k** (66.5%) και **4a** (64.7%).

Η πλειοψηφία των κουμαρινικών αναλόγων επέδειξε ικανοποιητική κυτταροτοξικότητα έναντι της καρκινικής σειράς ανθρώπινου μελανώματος A375. Στην περίπτωση αυτή, παρατηρήθηκαν υψηλότερα ποσοστά τοξικότητας για τα ακετυλοξυ-ανάλογα, με τα παράγωγα **3b** (72.2%) και **3e** (60.7%), καθώς και τα παράγωγα **3i** (51.0%) και **3j** (54.6%) να ξεχωρίζουν. Η υψηλότερη κυτταροτοξικότητα των ακετυλοξυ- έναντι των υδροξυ- 3-αρυλο-κουμαρινικών αναλόγων που παρατηρήθηκε στη συγκεκριμένη κυτταρική σειρά, έρχεται σε συμφωνία με τα προηγούμενα ερευνητικά μας αποτελέσματα, που υπέδειξαν τη συμβολή της ακετυλοξυ-ομάδας στην κυτταροτοξικότητα έναντι στις καρκινικές σειρές ανθρώπινου επιθηλιοειδούς αδеноκαρκινώματος της μήτρας (HeLa) και ανθρώπινου νευροβλαστώματος (SK-N-SH) [61].

2.4.3.5 Μελέτη φυσικοχημικών και βιομιμητικών ιδιοτήτων

Οι φαρμακοκινητικές ιδιότητες ενός μορίου όπως η απορρόφηση, η κατανομή, ο μεταβολισμός και η απέκκρισή του αποτελούν κρίσιμους παράγοντες και η έγκαιρη εκτίμησή τους αυξάνει τις πιθανότητες ενός φαρμάκου να εγκριθεί. Η βιομιμητική χρωματογραφία μπορεί να παρέχει μία πρώιμη εκτίμηση για τις ιδιότητες αυτές που συναντώνται με το προσωνύμιο ADME (absorption, distribution, metabolism, elimination) [78–80].

Η εκτίμηση της απορρόφησης από το στόμα (Human Oral Absorption, HOA) και της σύνδεσης με τις πρωτεΐνες του πλάσματος (Plasma Protein Binding, PPB) για τα νέα κουμαρινικά ανάλογα πραγματοποιήθηκε μέσω βιομιμητικής χρωματογραφίας χρησιμοποιώντας δύο διαφορετικές χρωματογραφικές στήλες. Αρχικά, χρησιμοποιήθηκε η χρωματογραφία ακινητοποιημένων τεχνητών μεμβρανών (Immobilized Artificial Membrane, IAM). Η στατική φάση της χρωματογραφικής στήλης IAM αποτελείται από ακινητοποιημένα φωσφολιπίδια (π.χ. φωσφατιδυλοχολίνη) σε πυριτία που φέρουν ομάδες προπυλαμίνης ώστε να προσομοιάσει το λιπιδικό περιβάλλον μιας ρευστής κυτταρικής μεμβράνης, προβλέποντας κατ' αυτό τον τρόπο αλληλεπιδράσεις φαρμάκων-κυτταρικών μεμβρανών. Έχει αποδειχθεί ότι ο χρόνος έκλουσης στη χρωματογραφία IAM σχετίζεται με την ικανότητα των ενώσεων να διαπερνούν κυτταρικές μεμβράνες και μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την εκτίμηση της εντερικής απορρόφησης τους ή αλλιώς της απορρόφησης εκ του στόματος (*per os*) [78]. Οι εκτιμώμενες τιμές απορρόφησης από το στόμα (%HOA) παρουσιάζονται στον Πίνακα 2.7.

Πίνακας 2.7 Φυσικοχημικές ιδιότητες, χρωματογραφικοί δείκτες και εκτιμώμενες τιμές απορρόφησης από το στόμα ((%)HOA).

Ενώση	pH 7.40					(%)HOA
	MW ¹	logP ²	logk _w ³	F ⁺ ⁴	F ⁻	
3a	328.7	4.42	3.58	0.000	0.000	100
3b	328.8	3.86	2.88	0.000	0.000	99.8
3c	328.7	4.42	3.05	0.000	0.000	99.9
3d	312.3	3.34	2.56	0.000	0.000	99.7
3e	312.3	3.34	2.47	0.000	0.000	99.7
3f	312.3	3.96	2.52	0.000	0.000	99.7
3g	373.2	4.08	4.77	0.000	0.000	100.0
3h	294.3	3.43	2.48	0.000	0.000	99.7
3i	373.2	4.59	3.28	0.000	0.000	99.8
3j	328.7	4.42	3.06	0.000	0.000	99.9
3k	452.1	5.36	3.91	0.000	0.000	99.9
3l	350.4	2.97	2.43	0.000	0.000	99.4
3m	431.2	4.20	3.21	0.000	0.000	99.6
3n	386.8	4.03	3.04	0.000	0.000	99.7
3o	510.1	4.96	3.79	0.000	0.000	99.6
4a	286.7	3.79	4.09	0.000	0.102	100
4b	286.7	3.79	3.73	0.000	0.102	99.9
4c	270.3	3.27	4.53	0.000	0.102	100
4d	270.3	3.27	4.69	0.000	0.102	100
4e	270.3	4.05	3.23	0.000	0.102	99.9
4f	252.3	3.07	2.62	0.000	0.007	99.7
4h	331.2	4.68	3.34	0.000	0.007	99.8
4i	286.7	4.51	3.23	0.000	0.007	99.9
4j	410.1	5.45	3.41	0.000	0.007	99.5

¹MW: μοριακό βάρος

²logP: συντελεστής λιποφιλίας

³logk_w: παράγοντας κατακράτησης για συγκέντρωση ακετονιτριλίου 0%

⁴ (F+) κλάσματα θετικά και (F-) αρνητικά φορτισμένων ειδών

Σύμφωνα με το σύστημα βιοφαρμακευτικής ταξινόμησης (BCS) της Υπηρεσίας Τροφίμων και Φαρμάκων των ΗΠΑ (FDA) [81], ένα φάρμακο θεωρείται υψηλά διαπερατό εάν η απορρόφηση μίας χορηγηθείσας δόσης είναι $\geq 85\%$. Σε αυτό το πλαίσιο, οι εξεταζόμενες ενώσεις παρουσίασαν υψηλά ποσοστά απορρόφησης και μπορούν να θεωρηθούν κατάλληλες για φαρμακευτικά σκευάσματα που προορίζονται για χορήγηση εκ του στόματος.

Τα νέα κουμαρινικά ανάλογα μελετήθηκαν στη συνέχεια χρησιμοποιώντας χρωματογραφία ακινητοποιημένης λευκωματίνης του ορού (human serum albumin, HSA) (Πίνακας 2.8). Η συγκεκριμένη χρωματογραφική στήλη παρέχει εκτίμηση για την ικανότητα των εξεταζόμενων ενώσεων να προσδένονται στη λευκωματίνη του ορού ή αλλιώς αλβουμίνη, η οποία είναι η πρωτεΐνη που βρίσκεται σε μεγαλύτερη συγκέντρωση στο πλάσμα και σχετίζεται με την

αποτελεσματικότητα του φαρμάκου, τις φαρμακοκινητικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ φαρμάκων, καθώς και την ασφάλεια του φαρμάκου [80]. Η εκτίμηση της σύνδεσης των εξεταζόμενων ενώσεων με την ακινητοποιημένη λευκωματίνη του ορού μπορεί να θεωρηθεί ότι παρέχει εκτίμηση για την πρόσδεσή τους σε όλες τις πρωτεΐνες του πλάσματος [78].

Πίνακας 2.8 Τιμές παράγοντα κατακράτησης στη στήλη HSA ($\log k_{10}$) και εκτιμώμενες τιμές της πρόσδεσης στις πρωτεΐνες του πλάσματος ((%) PPB).

Ένωση	pH 7.00	
	$\log k_{10}$	(%)PPB
3a	0.57	79.8
3b	0.80	87.2
3c	0.96	90.9
3d	0.73	85.1
3e	0.73	85.1
3f	0.57	79.4
3g	0.83	88.0
3h	0.74	85.5
3i	1.14	94.1
3j	0.97	91.2
3k	1.63	98.7
3l	0.16	59.9
3m	0.89	89.5
3n	0.74	85.5
3o	0.58	79.9
4a	0.79	87.0
4b	0.58	79.9
4c	0.72	84.8
4d	0.72	84.8
4e	1.34	96.6
4f	0.68	83.7
4h	1.38	97.0
4i	1.26	95.7
4j	0.59	80.4

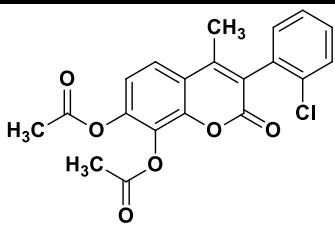
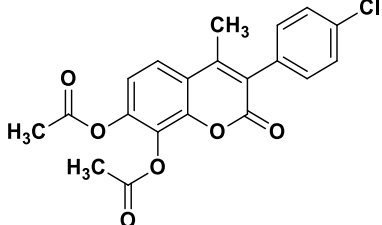
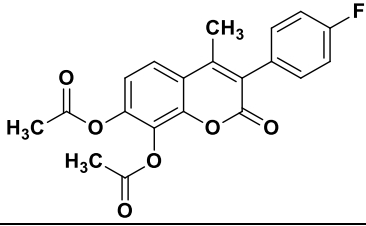
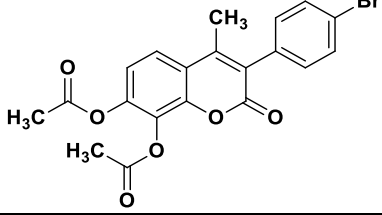
Όπως φαίνεται στον Πίνακα 2.8, οι εξεταζόμενες ενώσεις παρουσιάζουν αρκετά μεγάλα ποσοστά πρωτεϊνικής σύνδεσης. Υψηλή πρωτεϊνική σύνδεση σημαίνει ότι το φάρμακο δεν είναι ευκίνητο να διαχυθεί και να φτάσει σε ιστούς καθώς και ότι μπορεί να αλληλεπιδράσει με άλλα φάρμακα ή ενδογενείς ουσίες, όταν υπάρχει ανταγωνισμός για τα ίδια σημεία σύνδεσης με την πρωτεΐνη. Ενώ η φαρμακολογική του δράση μπορεί να αυξηθεί σε διάρκεια, επιβραδύνεται ο μεταβολισμός και η νεφρική απέκκριση του φαρμάκου, το οποίο μπορεί να οδηγήσει σε εμφάνιση τοξικότητας [82].

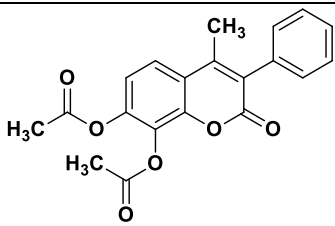
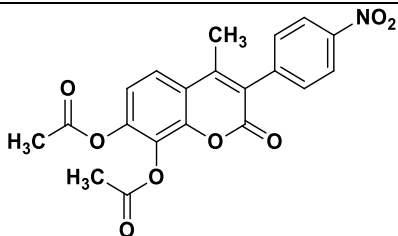
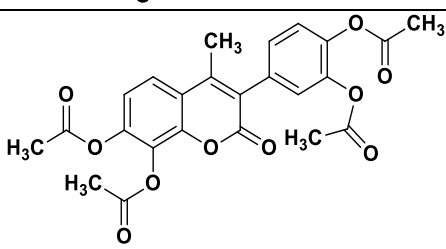
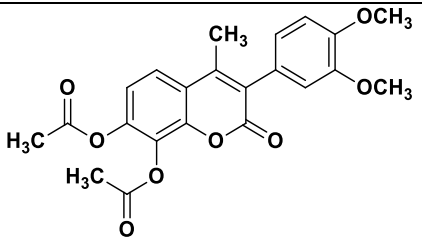
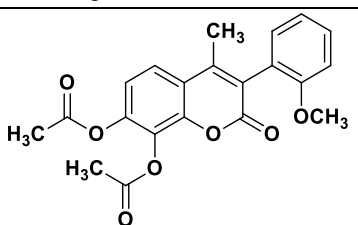
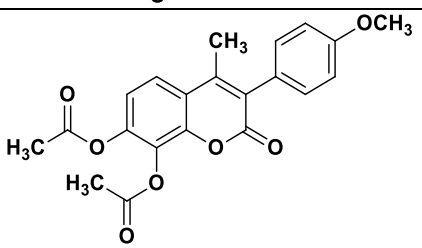
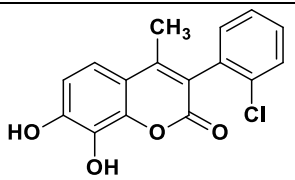
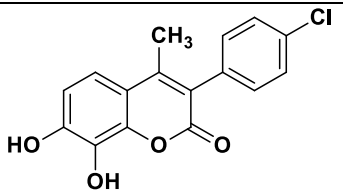
2.4.4 Αξιολόγηση βιολογικής δράσης των νέων κουμαρινών της Σειράς Β

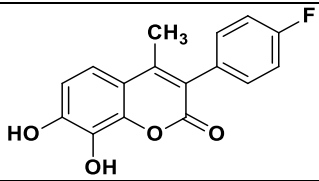
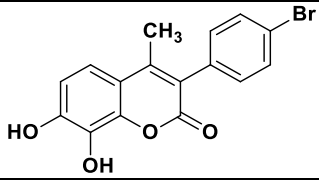
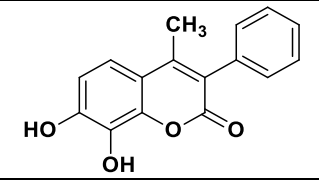
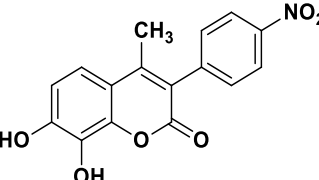
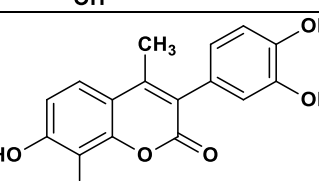
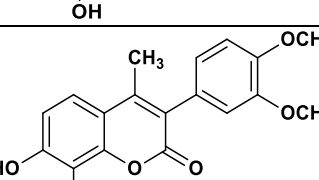
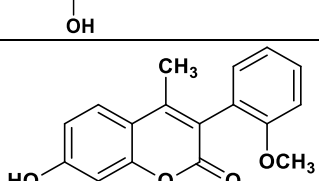
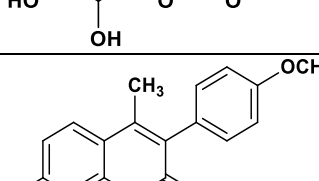
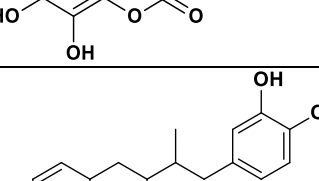
2.4.4.1 Αξιολόγηση αντιοξειδωτικής δράσης και ικανότητας αναστολής του ενζύμου της λιποξυγονάσης από σόγια

Ακολουθεί η μελέτη της ικανότητας των νέων κουμαρινών της Σειράς Β να δεσμεύουν την ελεύθερη ρίζα DPPH και να αναστέλλουν τη λιπιδική υπεροξειδωση (LP) του λινολεϊκού οξέος υποκινούμενη από τον εκκινητή ελευθέρων ριζών AAPH, καθώς και τη δράση του ενζύμου της λιποξυγονάσης από σόγια (LOX). Ακόμη, στον ακόλουθο πίνακα (Πίνακας 2.9) παρουσιάζεται ο εκτιμώμενος συντελεστής λιποφιλίας των εξεταζόμενων ενώσεων μέσω του υπολογιστικού εργαλείου pkCSM (<http://biosig.unimelb.edu.au/pkcsM/>).

Πίνακας 2.9 Αξιολόγηση αντιοξειδωτικής δράσης, ικανότητας αναστολής του ενζύμου της λιποξυγονάσης από σόγια και εκτιμώμενος συντελεστής λιποφιλίας των νέων κουμαρινών της Σειράς Β.

Ένωση	Δομή	(%) DPPH 30 min (100 μM)	(%) DPPH 60 min (100 μM)	(%) Ικανότητα αναστολής της LP (100 μM)	Ικανότητα αναστολής της LOX IC ₅₀ (μM) ή (%) σε 100 μM	LogP
9a		no	no	81.9	no	4.27
9b		no	no	95.3	100.0 μM	4.27
9c		no	no	88.6	67.5 μM	3.76
9d		no	no	45.0	47.3%	4.38

9e		no	no	68.1	19.0 μM	3.62
9f		no	no	90.8	22.0%	3.53
9g		no	no	95.1	56.0 μM	3.47
9h		no	no	88.9	52.5 μM	3.64
9i		no	no	43.7	26.0 μM	3.63
9j		no	no	41.1	46.9%	3.63
10a		88	88	70	87.0 μM	3.83
10b		82	84	no	87.5 μM	3.83

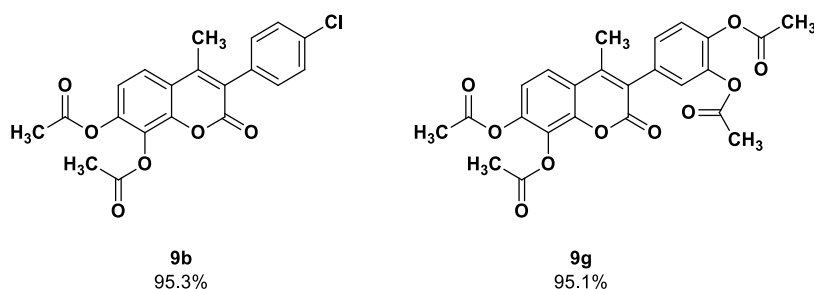
10c		87	88	65.0	42.0%	3.32
10d		59	85	43.0	no	3.94
10e		87	88	78.0	52.0%	3.17
10f		88	89	44.0	40.0%	3.09
10g		81	83	42.0	52.5 μM	2.59
10h		71	88	63.0	85.0 μM	3.20
10i		84	85	53.0	33.0%	3.19
10j		81	83	19.0	18.0%	3.19
NDGA		88.0	93.0	-	93.0%	-

Trolox		83.0	92.0	93.0	-	-
--------	--	------	------	------	---	---

Νο: Η ένωση δεν έδειξε δράση στις συγκεκριμένες πειραματικές συνθήκες

Όσον αφορά την ικανότητα των κουμαρινικών αναλόγων της Σειράς Β να δεσμεύουν την ελεύθερη ρίζα DPPH, τα 7,8-διυδροξυ-κουμαρινικά ανάλογα παρουσίασαν ισχυρή αντιοξειδωτική δράση από τα πρώτα 30 min. Είναι γνωστό ότι η παρουσία κατεχολικού συστήματος στη δομή μίας ένωσης συνεισφέρει στην αντιοξειδωτική της δράση, λόγω της μετατροπής της στην αντίστοιχη ο-κινόνη καθώς και άλλα προϊόντα [83].

Συγκρίνοντας τα αποτελέσματα της μεθόδου AAPH, παρατηρείται ότι η πλειοψηφία των ακετυλοξυ-κουμαρινών παρουσίασε ισχυρή αντιοξειδωτική δράση μεταξύ 68-95%, ενώ τα παράγωγα **9b** και **9g** επέδειξαν την ισχυρότερη δράση (95%), συγκρίσιμη με την ένωση αναφοράς, trolox (93%) (Σχήμα 2.21). Τα μεθοξυ υποκατεστημένα ανάλογα **9i** και **9j**, καθώς και το βρωμο υποκατεστημένο παράγωγο **9d** παρουσίασαν τις χαμηλότερες τιμές αναστολής της λιπιδικής υπεροξειδωσης (40-45%).

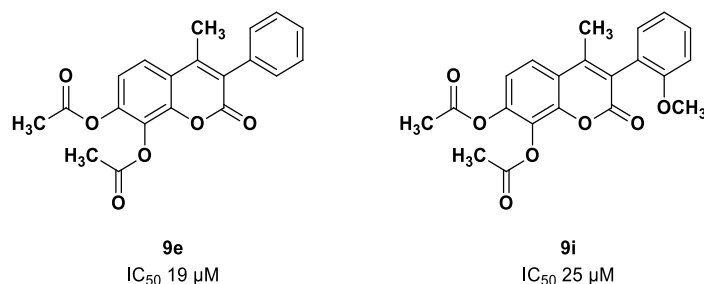


Σχήμα 2.21 Χημική δομή των ενώσεων **9b** και **9g** που επέδειξαν την ισχυρότερη δράση στη δοκιμή αναστολής της λιπιδικής υπεροξειδωσης.

Ανάμεσα στα υδροξυ-κουμαρινικά παράγωγα, ισχυρότερη δράση επέδειξαν οι ενώσεις **10a**, η οποία διαθέτει 2'-χλωρο-υποκατάσταση (70%) και η **10e**, η οποία διαθέτει υποκατάσταση στο φαινολικό δακτύλιο της θέσης 3 του κουμαρινικού σκελετού (78%). Ωστόσο, και τα ακετυλοξυ-ανάλογά τους **9a** και **9e** αποτελούν ικανούς αναστολείς (81.9% και 68%, αντίστοιχα). Η καλύτερη δράση των ακετυλοξυ-έναντι των υδροξυ-κουμαρινών, πιθανώς οφείλεται στην υψηλότερη λιποφιλικότητά τους ($\log P > 3.5$), η οποία φέρεται να συσχετίζεται με την ικανότητα αναστολής της λιπιδικής υπεροξειδωσης [45].

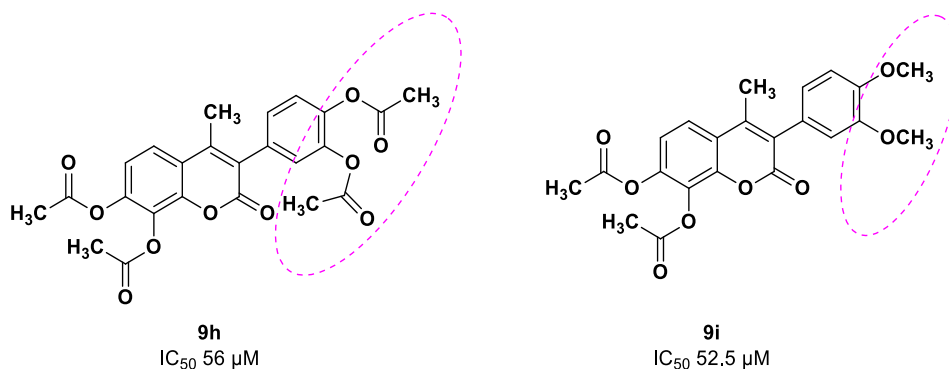
Όσον αφορά την ένδειξη αντιφλεγμονώδους δράσης, παρατηρείται πως ισχυρότερο αναστολέα της λιποξυγονάσης από σόγια αποτελεί το ακετυλοξυ-παράγωγο **9e** (IC_{50} 19 μM) το οποίο δεν διαθέτει υποκαταστάτη στη θέση 3 του φαινολικού δακτυλίου, ενώ αξιόλογο αναστολέα αποτελεί και η ένωση **9i** (IC_{50} 26 μM) με μεθοξυ υποκατάσταση στη θέση 2' του φαινολικού δακτυλίου (Σχήμα

2.22). Ακόμη, είναι αξιοσημείωτο ότι τα υδροξυ-ανάλογά τους, **10e** και **10i**, είναι ανενεργά.



Σχήμα 2.22 Χημική δομή των ενώσεων **9e** και **9i** που αποτελούν τους ικανότερους αναστολείς της φυτικής LOX μεταξύ των μορίων της Σειράς Β.

Σημαντική παρατήρηση αποτελεί επίσης ότι τα παράγωγα **9h** και **9i** τα οποία διαθέτουν διυποκατάσταση είτε με ακετυλοξυ-ομάδες είτε με μεθοξυ-ομάδες στις θέσεις 3' και 4' παρουσίασαν αξιόλογη δράση με τιμές IC₅₀ 56 μM και 52.5 μM, αντίστοιχα (Σχήμα 2.23).



Σχήμα 2.23 Επίδραση της υποκατάστασης στις θέσεις 3' και 4' του 3-φαινολικού δακτυλίου στην ικανότητα αναστολής της λιποξυγονάσης από σόγια.

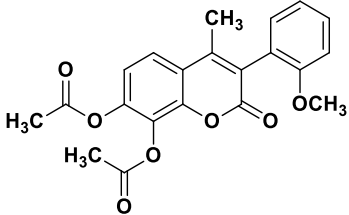
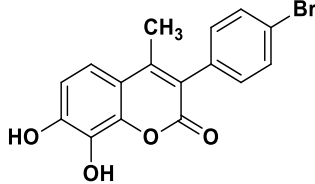
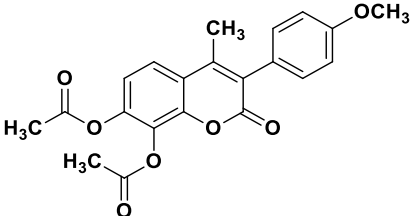
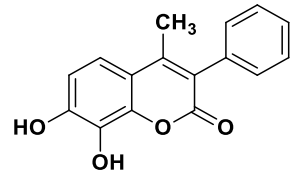
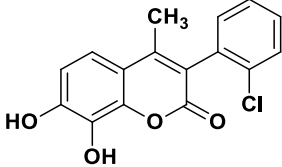
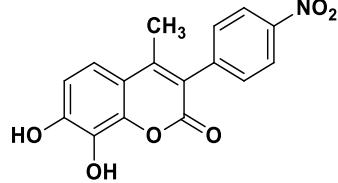
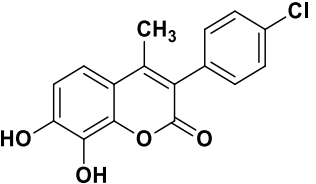
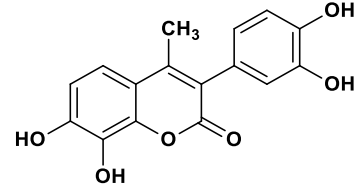
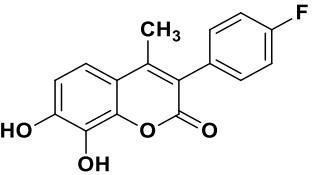
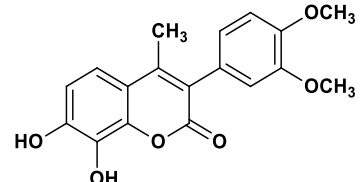
Επιπλέον, σημαντική συμβολή στην ικανότητα αναστολής της λιποξυγονάσης φαίνεται να έχει η παρουσία χλώρο-υποκαταστάσης, όπως στα παράγωγα **9b** (IC₅₀ 100 μM), **10a** (IC₅₀ 87 μM) και **10b** (IC₅₀ 87.5 μM). Τέλος, τα ακετυλοξυ-παράγωγα εμφάνισαν ισχυρότερη ικανότητα αναστολής και της λιποξυγονάσης από σόγια, το οποίο πιθανώς οφείλεται στην υψηλότερη λιποφιλικότητά τους [61].

2.4.4.2 Μελέτη κυτταροτοξικότητας έναντι της σειράς επιδερμικού καρκινώματος A431

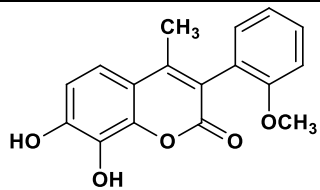
Τα νέα κουμαρινικά ανάλογα της Σειράς Β εξετάστηκαν ως προς την κυτταροτοξικότητά τους έναντι της σειράς επιδερμικού καρκινώματος A431, σε συγκεντρώσεις 10 μM και 100 μM και τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στον Πίνακα 2.10.

Πίνακας 2.10 (%) Κυτταροτοξικότητα των κουμαρινών της Σειράς Β σε συγκεντρώσεις 10 μ M και 100 μ M έναντι των κυττάρων της καρκινικής σειράς A431.

Ένωση	Δομή	(%) Κυτταροτοξικότητα έναντι A431 (10 μ M)	(%) Κυτταροτοξικότητα έναντι A431 (100 μ M)	Ένωση	Δομή	(%) Κυτταροτοξικότητα έναντι A431 (10 μ M)	(%) Κυτταροτοξικότητα έναντι A431 (100 μ M)
9a		17.4 \pm 3.6	13.0 \pm 5.4	9e		no	12.5 \pm 4.3
9b		26.6 \pm 6.4	45.9 \pm 4.1	9f		16.5 \pm 3.1	34.9 \pm 2.9
9c		no	27.0 \pm 5.7	9g		no	26.2 \pm 4.8
9d		no	61.2 \pm 0.4	9h		no	16.6 \pm 5.5

9i		17.4 ± 1.1	39.6 ± 1.7	10d		9.9 ± 2.9	13.6 ± 2.0
9j		23.9 ± 6.4	35.6 ± 6.8	10e		no	30.0 ± 7.7
10a		no	no	10f		no	40.3 ± 6.0
10b		no	17.8 ± 0.5	10g		no	17.1 ± 5.9
10c		14.2 ± 2.3	46.4 ± 5.7	10h		no	no

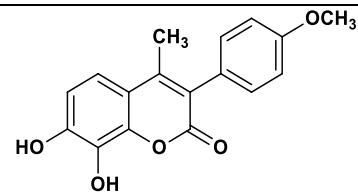
10i



no

 23.0 ± 8.7

10j



no

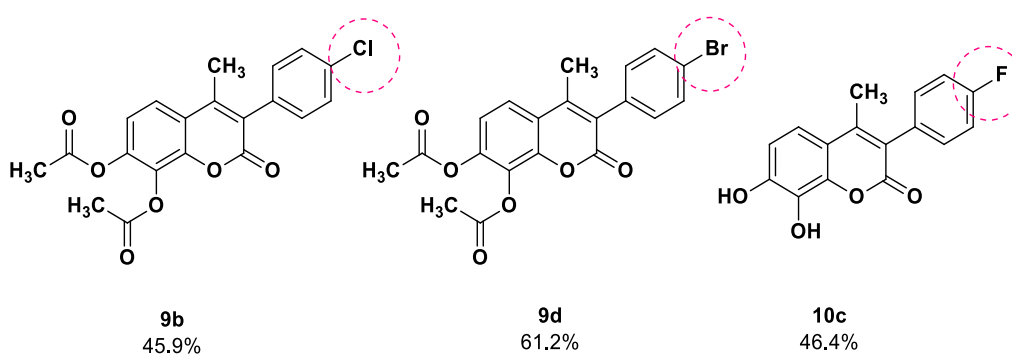
no

No: Η ένωση δεν έδειξε δράση στις συγκεκριμένες πειραματικές συνθήκες

Τα νέα κουμαρινικά ανάλογα **9a-9j** και **10a-10j** αξιολογήθηκαν για την κυτταροτοξική τους δράση έναντι της καρκινικής σειράς ανθρώπινου επιδερμικού καρκινώματος A431 σε συγκεντρώσεις 10 μM και 100 μM . Παρατηρείται ότι όλα τα διακετυλοξυ-παράγωγα επέδειξαν κυτταροτοξική δράση έναντι των καρκινικών κυττάρων A431, καθώς μείωσαν τη βιωσιμότητα από 12 έως 61% σε συγκέντρωση 100 μM . Η σημασία του διακετυλοξυ-δομικού χαρακτηριστικού στην κυτταροτοξικότητα των κουμαρινών έχει επίσης αναφερθεί και από άλλες ερευνητικές ομάδες. Ειδικότερα, σε έρευνα των Musa et al. [71], πραγματοποιήθηκε η σύνθεση μιας σειράς 7,8-διακετυλοξυ-κουμαρινικών αναλόγων, τα οποία παρουσίασαν ικανοποιητική κυτταροτοξικότητα έναντι των καρκινικών σειρών ανθρώπινου προστάτη, PC3, και μαστού, MDA-231, με την 7,8-διακετυλοξυ-3-(4-μεθυλοσουλφονυλο)φαινυλο-κουμαρίνη να επιδεικνύει χαμηλότερη τιμή IC_{50} (26.43 μM) έναντι της σειράς PC3 από το πρότυπο, την ταμοξιφένη (29.97 μM).

Είναι αξιοσημείωτο ότι στη συγκέντρωση των 100 μM , ισχυρότερη δράση (61%) υπέδειξε το 4'-βρωμο-υποκατεστημένο διακετυλοξυ-παράγωγο **9d**. Η παρατήρηση αυτή είναι σύμφωνη με τα αποτελέσματα προηγούμενης έρευνάς μας [61], τα οποία υπέδειξαν την επίδραση της παρουσίας ακετυλοξυ-ομάδας στον κουμαρινικό σκελετό σε συνδυασμό με παρουσία βρωμίου στον φαινολικό δακτύλιο της θέσης 3 στην κυτταροτοξική δράση και οδήγησαν στο σχεδιασμό της Σειράς Β. Ακόμη, το 4'-χλωρο-υποκατεστημένο ανάλογο, **9b**, παρουσίασε ικανοποιητική κυτταροτοξική δράση τόσο στη συγκέντρωση των 100 μM (56%) όσο και στη συγκέντρωση των 10 μM (27%).

Τα υδροξυ-κουμαρινικά ανάλογα μείωσαν τη βιωσιμότητα έως και 46% σε συγκέντρωση 100 μM , ενώ ορισμένα από αυτά δεν επέδειξαν καθόλου κυτταροτοξική δράση (**10a**, **10h** και **10j**). Στην περίπτωση των υδροξυ-αναλόγων, υψηλότερη κυτταροτοξική δράση επέδειξε το 4'-φθορο-υποκατεστημένο παράγωγο **10c**, το οποίο μείωσε τη βιωσιμότητα στο 53.6% (Σχήμα 2.24).

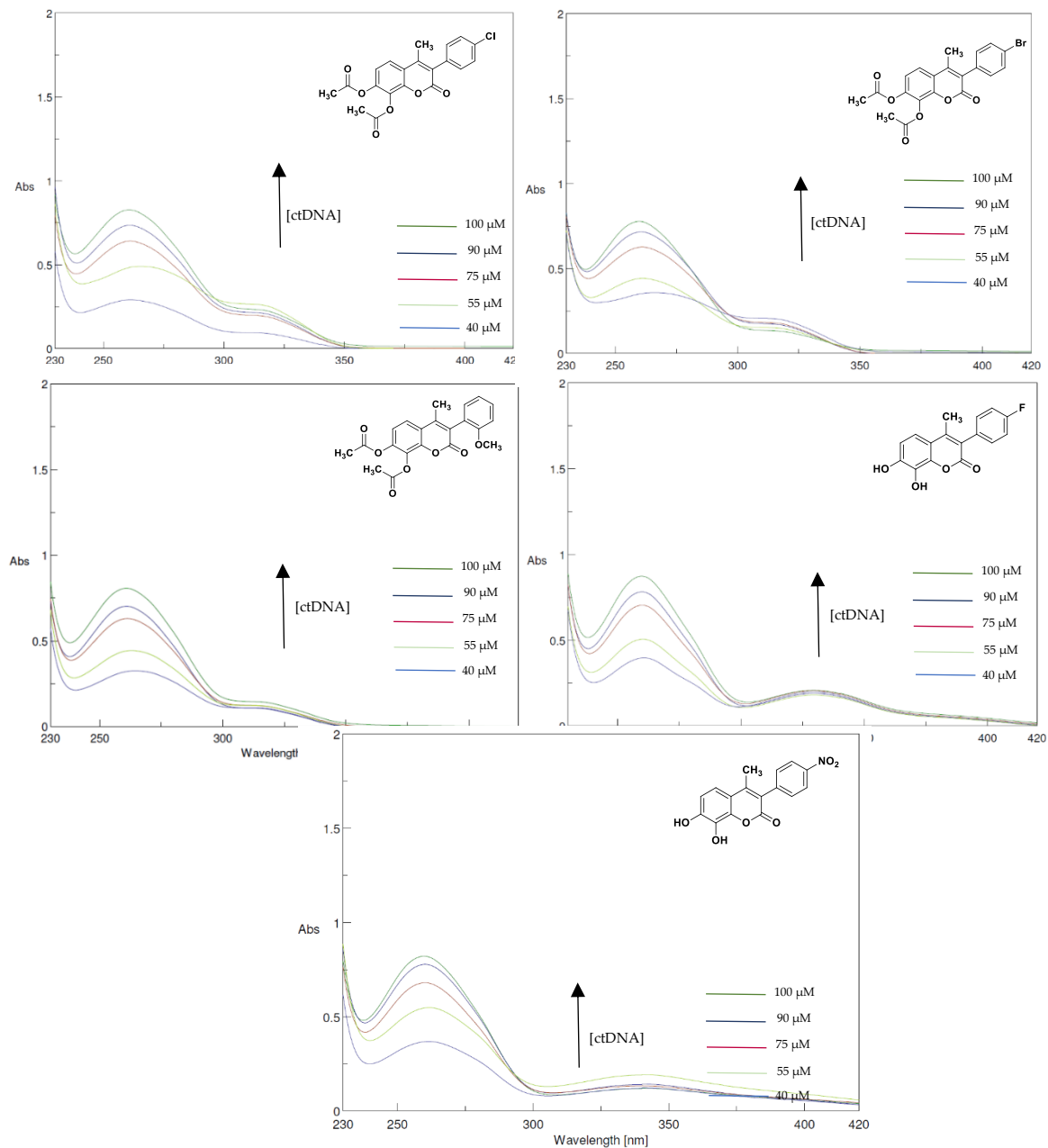


Σχήμα 2.24 Χημική δομή και κυτταροτοξική δράση των ενώσεων **9b**, **9d** και **10c**.

2.4.4.3 Μελέτη αλληλεπίδρασης με το *ctDNA*

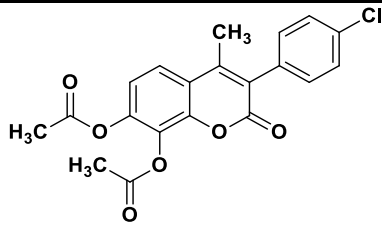
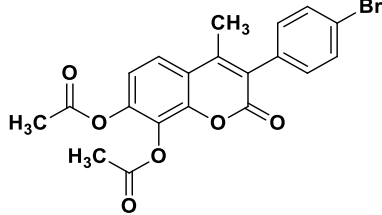
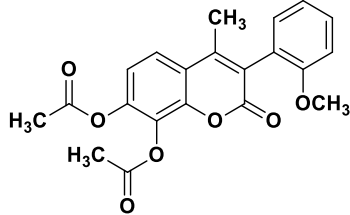
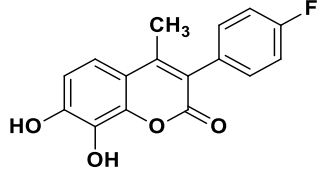
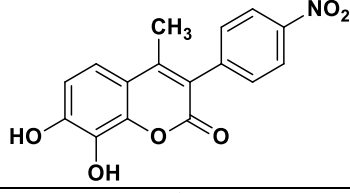
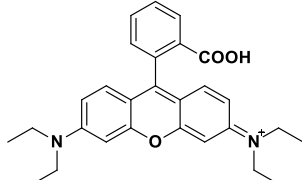
Έπειτα από τη μελέτη κυτταροτοξικότητας των κουμαρινικών αναλόγων της Σειράς Β, τα κουμαρινικά ανάλογα **9b**, **9d**, **9i**, **10c** και **10f** τα οποία παρουσίασαν ισχυρότερη κυτταροτοξική δράση (> 40%) στη συγκέντρωση των 100 μM

επιλέχθηκαν ώστε να μελετηθούν για την ικανότητά τους να αλληλεπιδρούν με το DNA θύμου αδένος μόσχου (ctDNA). Τα φάσματα απορρόφησης που καταγράφονται από τη μελέτη αλληλεπίδρασης των επιλεγμένων κουμαρινικών αναλόγων (10 μM) με διαφορετικές συγκεντρώσεις ctDNA (0-100 μM) παρουσιάζονται στην Εικόνα 2.10. Από τις τιμές της απορρόφησης κατασκευάζεται η εξίσωση Benesi-Hildebrand, μέσω της οποίας υπολογίζεται η σταθερά σύνδεσης των εξεταζόμενων ενώσεων με το ctDNA. Τα αποτελέσματα αλληλεπίδρασης του DNA με τα επιλεγμένα κουμαρινικά παράγωγα παρουσιάζονται στον Πίνακα 2.11.



Εικόνα 2.10 Φάσματα απορρόφησης των ενώσεων για διάφορες συγκεντρώσεις ctDNA.

Πίνακας 2.11 Σταθερά σύνδεσης (Kb) των επιλεγμένων κουμαρινικών αναλόγων με το ctDNA.

Ένωση	Δομή	Kb (10^3 M^{-1})
9b		10.2
9d		5.6
9i		0.1
10c		0.5
10f		0.7
Ροδαμίνη Β		22.1

Αρχικά, από τα φάσματα απορρόφησης παρατηρείται ότι η αύξηση της συγκέντρωσης του DNA, οδηγεί σε αύξηση της απορρόφησης και άρα παρατηρείται το φαινόμενο της υπερχρωμίας το οποίο υποδεικνύει είτε την πρόσδεση των ενώσεων εξωτερικά στη μικρή ή μεγάλη άλυακα του DNA είτε την αλληλεπίδρασή τους με το DNA μέσω ηλεκτροστατικών αλληλεπιδράσεων. Το διακετυλοξυ-κουμαρινικό ανάλογο **9b**, το οποίο φέρει χλωρο ομάδα στη θέση 4' του φαινολικού δακτυλίου της θέσης 3 του κουμαρινικού σκελετού παρουσίασε την υψηλότερη τιμή σταθεράς αλληλεπίδρασης ($10.2 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$) ακολουθούμενο

από το βρωμο-ανάλογό του **9d** ($5.6 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$). Η παρουσία ομάδας χλωρίου φαίνεται να βοηθά στην πρόσδεση των ενώσεων στο ctDNA μέσω ηλεκτροστατικών αλληλεπιδράσεων σύμφωνα και με άλλες μελέτες [84]. Αντίθετα, το 2'-μεθοξυ-κουμαρινικό ανάλογο **9i** διαθέτει τη χαμηλότερη τιμή σταθεράς αλληλεπίδρασης, $0.1 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$. Τα διυδροξυ-κουμαρινικά ανάλογα **10c** και **10f** παρουσίασαν επίσης χαμηλές τιμές αλληλεπίδρασης $0.5 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$ και $0.7 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$, αντίστοιχα. Τέλος, συγκρίνοντας το μέγιστο μήκος κύματος απορρόφησης (λ_{max}) της ένωσης απουσία DNA καθώς και παρουσία της μέγιστης συγκέντρωσης DNA, παρατηρείται ότι η τιμή του λ_{max} μειώνεται και άρα όλες οι ενώσεις αποτελούν αποσταθεροποιητές της διπλής έλικας του DNA (κυανή μετατόπιση). Η ροδαμίνη B που χρησιμοποιήθηκε ως πρότυπο προκαλεί υποχρωμία, δηλαδή παρεμβολή μεταξύ γειτονικών ζευγών βάσεων DNA (intercalation) με σταθερά σύνδεσης $22.1 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$.

2.4.5. Πρόβλεψη φαρμακολογικών ιδιοτήτων των νέων κουμαρινών της Σειράς B

Η χορήγηση από το στόμα (*per os*) αποτελεί την πιο κοινή μέθοδο χορήγησης φαρμάκων, καθώς είναι η πλέον αποδεκτή από τους ασθενείς, ενώ παράλληλα είναι μία απλή, ασφαλής και οικονομική μέθοδος. Εκτιμάται ότι τα φαρμακευτικά σκευάσματα χορήγησης εκ του στόματος αποτελούν περίπου το 90% της παγκόσμιας αγοράς φαρμάκου. Χαρακτηριστικά όπως η διαλυτότητα και η σταθερότητα ενός φαρμάκου επηρεάζουν την απορρόφησή του και για αυτό το λόγο απαιτούνται μελέτες των φυσικοχημικών και άλλων ιδιοτήτων τους [78,85].

Ο Lipinski το 1997 συνόψισε τα έως τότε δεδομένα για την επίδραση των φυσικοχημικών ιδιοτήτων στη διαπερατότητα σε ένα απλό μνημονικό κανόνα πολλαπλασίων του 5 (*rule of five*) [86]. Ο κανόνας αυτός αφορά σε μη ευνοϊκά μοριακά χαρακτηριστικά για την απορρόφηση των φαρμάκων που χορηγούνται *per os*.

Τα μοριακά χαρακτηριστικά που πιθανώς να προσδώσουν στο φαρμακομόριο προβληματική απορρόφηση ή διαπερατότητα είναι:

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

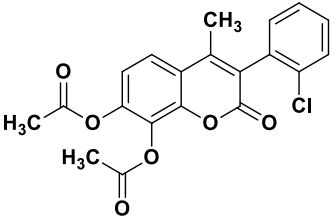
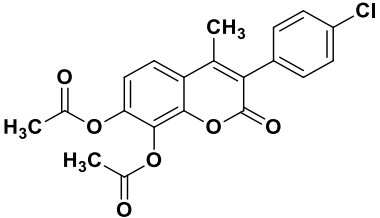
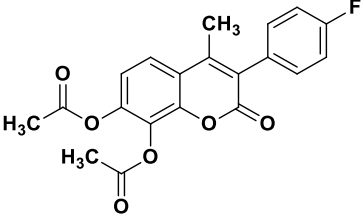
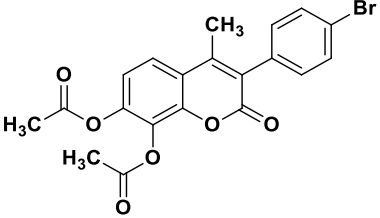
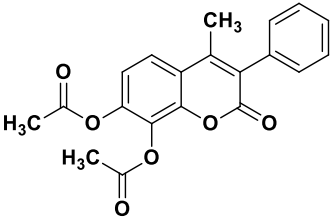
Το 2002, ο Veber [87] επέκτεινε το μνημονικό κανόνα του Lipinski, προσθέτοντας τα ακόλουθα κριτήρια:

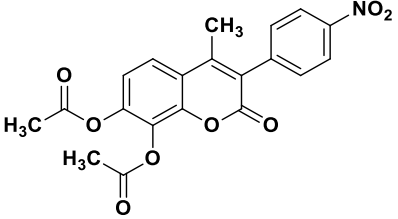
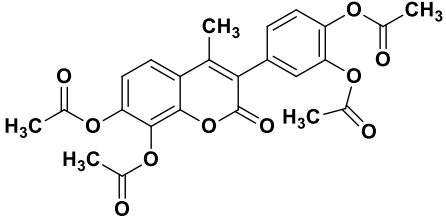
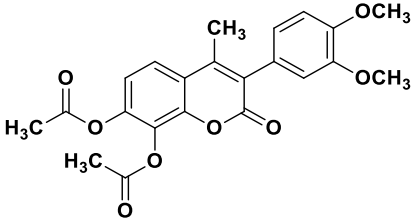
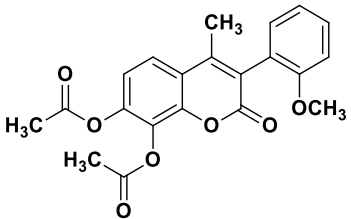
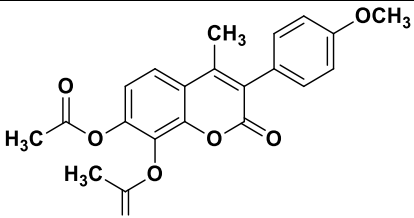
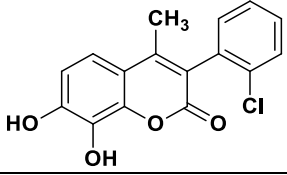
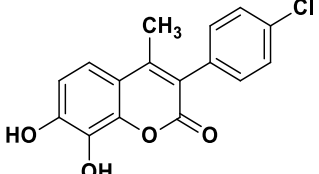
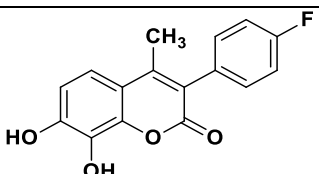
- ενδεδειγμένος αριθμός περιστρεφόμενων δεσμών < 10

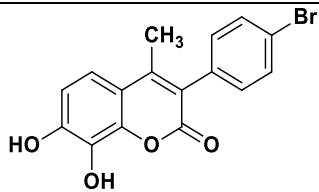
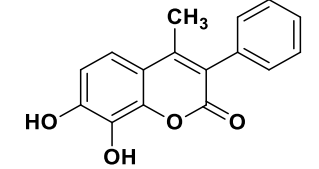
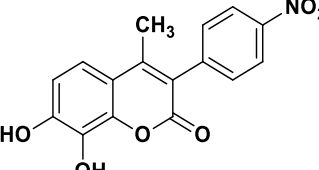
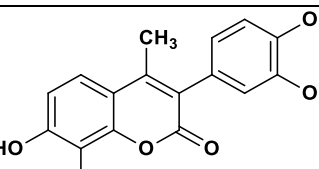
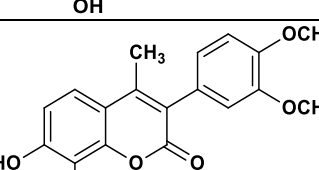
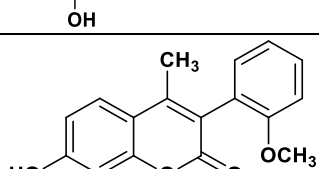
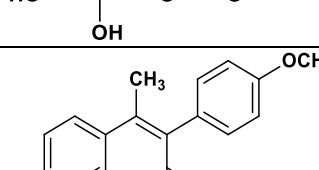
➤ εμβαδόν της πολικής επιφάνειας (polar surface area, PSA) των μορίων <math><140 \text{ \AA}^2</math>

Σε αυτό το πλαίσιο και για την πρόβλεψη των φαρμακολογικών ιδιοτήτων των νέων κουμαρινικών παραγώγων, έγινε χρήση του υπολογιστικού εργαλείου *pkCSM* (<http://biosig.unimelb.edu.au/pkcsml/>). Ειδικότερα, έγινε πρόβλεψη του συντελεστή λιποφιλίας και της δυνατότητας απορρόφησης εκ στόματος (*per os*) βάσει των κανόνων των Lipinski και Veber. Στον ακόλουθο Πίνακα παρατίθενται οι εκτιμώμενες φυσικοχημικές ιδιότητες (Πίνακας 2.12).

Πίνακας 2.12 Εκτιμώμενες φυσικοχημικές ιδιότητες ενώσεων της Σειράς Β.

Ενώση	Δομή	MW ¹ (g/mol)	logP ²	N _{OH,NH} ³	N _{O,N} ⁴	N _{rot,b} ⁵	PSA (Å ²) ⁶
9a		386.79	4.27	0	6	3	158.82
9b		386.79	4.27	0	6	3	158.82
9c		370.33	3.76	0	6	3	152.68
9d		431.24	4.38	0	6	3	162.38
9e		352.34	3.62	0	6	3	148.51

9f		397.34	3.53	0	8	4	163.16
9g		468.41	3.47	0	10	5	192.52
9h		412.39	3.64	0	8	5	171.47
9i		382.37	3.63	0	7	4	159.99
9j		382.37	3.63	0	7	4	159.99
10a		302.71	3.83	2	4	1	124.39
10b		302.71	3.83	2	4	1	124.39
10c		286.26	3.32	2	4	1	118.26

10d		347.16	3.94	2	4	1118.26	127.95
10e		268.27	3.17	2	4	1	114.09
10f		313.27	3.09	2	6	2	128.74
10g		300.27	2.59	4	6	1	123.68
10h		328.32	3.20	2	6	3	137.05
10i		298.29	3.19	2	5	2	125.57
10j		298.29	3.19	2	5	2	125.57

¹MW: Μοριακό βάρος

²logP: Συντελεστής μερισμού, ενδεικτικός της λιποφιλικότητας

³N_{OH,NH}: Θέσεις δοτών σε δεσμό υδρογόνου

⁴N_{O,N}: Θέσεις δεκτών σε δεσμό υδρογόνου

⁵N_{rot,b}: Αριθμός περιστρεφόμενων δεσμών

⁶PSA: Εμβαδόν της πολικής επιφάνειας (polar surface area, PSA)

Σύμφωνα με τα παραπάνω δεδομένα, φαίνεται ότι δεν παραβιάζεται κανένα από τα κριτήρια του μνημονικού κανόνα του 5 του Lipinski για όλες τις εξεταζόμενες ενώσεις. Ωστόσο, το εμβαδόν της πολικής επιφάνειας για τα διακετυλοξυ-

κουμαρινικά παράγωγα ξεπερνά την τιμή των 140 \AA^2 και άρα σύμφωνα με το συμπληρωματικό κανόνα του Veber περιορίζει ενδεχομένως την ικανότητα απορρόφησής τους από το στόμα.

2.5 ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

2.5.1 Σύνθεση των ακετυλοξυ- και υδροξυ- 3-αρυλο-κουμαρινικών αναλόγων

2.5.1.1 Οργανολογία-Υλικά

Όλα τα αντιδραστήρια και οι διαλύτες που χρησιμοποιήθηκαν ήταν υψηλής καθαρότητας και αγοράστηκαν από τις εταιρίες Sigma-Aldrich, Fluka, Acros, TCI και Alfa-Aesar.

Η παρακολούθηση των αντιδράσεων και ο έλεγχος της καθαρότητας των ενώσεων πραγματοποιήθηκε μέσω χρωματογραφίας λεπτής στοιβάδας (TLC) σε πλάκες αλουμινίου, επιστρωμένες με Silica gel F254 της εταιρείας Merck. Οι κηλίδες των χρωματογραφημάτων TLC εμφανίστηκαν με χρήση λάμπας υπεριώδους ακτινοβολίας (UV) στα 254 nm και με εμπλοτισμό των πλακών σε αιθανολικό διάλυμα φωσφομολυβδαινικού οξέος (PMA) 7% w/v.

Οι εξατμίσεις των οργανικών διαλυτών πραγματοποιήθηκαν υπό ελαττωμένη πίεση (μηχανική αντλία κενού Büchi V-710) σε θερμοκρασίες 40-60 °C με χρήση συσκευής ταχείας απόσταξης Büchi Rotavapor R-210. Η ξήρανση των στερεών ενώσεων έγινε σε αντλία υψηλού κενού Edwards (RV-5).

Τα σημεία τήξης (Σ.Τ.) των ενώσεων προσδιορίστηκαν σε ανοικτούς τριχοδιαμετρικούς σωλήνες με χρήση της συσκευής Gallenkamp και δεν έχουν διορθωθεί.

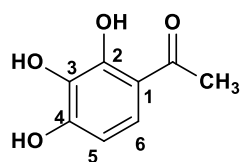
Τα μόρια που συντέθηκαν ταυτοποιήθηκαν δομικά μέσω φασματοσκοπίας πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (NMR), πρωτονίου (¹H NMR) και άνθρακα (¹³C NMR), και φασματομετρίας μάζας υψηλής ανάλυσης (HRMS).

Τα φάσματα NMR καταγράφηκαν με τα όργανα Varian 300 MHz και Varian 600 MHz του Ινστιτούτου Βιολογίας, Φαρμακευτική Χημείας και Βιοτεχνολογίας, του Εθνικού Ιδρύματος Ερευνών. Την ένωση αναφοράς αποτέλεσε το τετραμεθυλοσιλάνιο (TMS) και οι διαλύτες που χρησιμοποιήθηκαν ήταν το δευτεριωμένο χλωροφόρμιο (CDCl₃) και το δευτεριωμένο διμεθυλοσουλφοξείδιο (DMSO-d₆). Οι τιμές των χημικών μετατοπίσεων, δίνονται σε ppm ως προς τη συχνότητα συντονισμού του TMS. Η πολλαπλότητα των σημάτων στα φάσματα ¹H NMR αναφέρεται ως: s (singlet, απλό), d (doublet, διπλό), t (triplet, τριπλό), q (quartet, τετραπλό), m (multiplet, πολλαπλό), br (broad, ευρύ). Οι σταθερές σύζευξης J δίνονται σε Hz.

Τα φάσματα ESI-HRMS καταγράφηκαν με το όργανο UHPLC-MSn Orbitrap Velos-Thermo του Ινστιτούτου Βιολογίας, Φαρμακευτικής Χημείας και Βιοτεχνολογίας του Εθνικού Ιδρύματος Ερευνών. Οι διαλύτες που χρησιμοποιήθηκαν για τη διάλυση των υπό εξέταση ενώσεων ήταν η μεθανόλη (MeOH) και το χλωροφόρμιο (CHCl₃).

2.5.1.2 Σύνθεση των κουμαρινικών αναλόγων

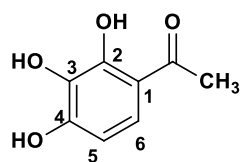
Σύνθεση της 2,3,4-τριυδροξυακετοφαινόνης (7) :

Μέθοδος Α

Σε σφαιρική φιάλη προστίθενται 1.98 mmol (250 mg) πυρογαλλόλης και 1.98 mmol (0.19 mL) οξικού ανυδρίτη, καθώς και 1-2 σταγόνες θειικού οξέος και θερμαίνονται στους 130 °C για 24 h υπό συνεχή ανάδευση, παρουσία κάθετου ψυκτήρα κι υπό αδρανείς συνθήκες. Η πορεία της αντίδρασης

παρακολουθείται μέσω χρωματογραφίας λεπτής στιβάδας (TLC) σε σύστημα διαλυτών πετρελαϊκός αιθέρας (PE)/οξικός αιθυλεστέρας (EtOAc) = 60 : 40. Στη συνέχεια, αφήνεται να έρθει σε θερμοκρασία περιβάλλοντος και προστίθενται 800 μL νερού, 200 μL αιθανόλης και 2-3 σταγόνες υδροχλωρίου. Έπειτα, η αντίδραση θερμαίνεται εκ νέου στους 130 °C για 2 h. Μετά το πέρας της αντίδρασης ακολουθεί εκχύλιση με οξικό αιθυλεστέρα και εξάτμιση υπό ελαττωμένη πίεση για απομάκρυνση του διαλύτη έως ότου παρατηρηθεί εναπόθεση στερεού προϊόντος στα τοιχώματα της σφαιρικής φιάλης. Τέλος, το προϊόν που προκύπτει ανακρυσταλλώνεται με περίσσεια οξικού αιθυλεστέρα και κατάλληλη ποσότητα εξαίνιου και λαμβάνεται με διήθηση υπό κενό με τη μορφή κόκκινου στερεού. Η καθαρότητα του προϊόντος ελέγχεται με φασματοσκοπία ¹H NMR.

Απόδοση: 28%

Μέθοδος Β

Σε σφαιρική φιάλη προστίθενται 3.96 mmol (500 mg) πυρογαλλόλης και 4.40 mmol (0.25 mL) οξικού οξέος, καθώς και 1.5 mL συμπλόκου τριφθοριούχου βορίου-διαιθυλαιθέρα και θερμαίνονται στους 90-100 °C για 5 h υπό συνεχή ανάδευση, παρουσία κάθετου ψυκτήρα κι υπό αδρανείς

συνθήκες. Στη συνέχεια, αφήνονται να έρθουν σε θερμοκρασία περιβάλλοντος, όπου προστίθενται 24 mL οξικού νατρίου 10% και η αντίδραση παραμένει να αναδεύεται όλο το βράδυ. Η πορεία της αντίδρασης παρακολουθείται μέσω χρωματογραφίας λεπτής στιβάδας (TLC) σε σύστημα διαλυτών πετρελαϊκός αιθέρας (PE)/οξικός αιθυλεστέρας (EtOAc) = 60 : 40. Μετά το πέρας της αντίδρασης ακολουθεί εκχύλιση με διαιθυλαιθέρα και εξάτμιση υπό ελαττωμένη πίεση για απομάκρυνση του διαλύτη έως ότου παρατηρηθεί εναπόθεση στερεού προϊόντος στα τοιχώματα της σφαιρικής φιάλης. Τέλος, το προϊόν που προκύπτει ανακρυσταλλώνεται με περίσσεια διχλωρομεθανίου και κατάλληλη ποσότητα μεθανόλης και λαμβάνεται υπό τη μορφή κίτρινου στερεού. Η καθαρότητα του προϊόντος ελέγχεται με φασματοσκοπία ¹H NMR.

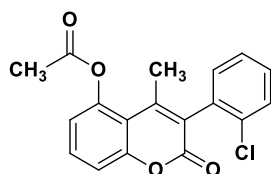
Απόδοση: 83%, **Σ.Τ.:** 167-169 °C (**Σ.Τ. Βιβλιογραφίας:** 171-173 °C [88])

¹H NMR (600 MHz, DMSO-d₆): δ (ppm) 12.59 (s, 1H, OH-2), 10.07 (s, 1H, OH), 8.59 (s, 1H, OH), 7.30 (d, J = 9 Hz, 1H, H-6), 6.40 (d, J = 9 Hz, 1H, H-5), 2.52 (s, 3H, CH₃)

Γενική μέθοδος σύνθεσης ακετυλοξυ- κουμαρινικών αναλόγων (**3a-3o** & **9a-9j**)

Σε σφαιρική φιάλη προστίθεται ποσότητα κατάλληλα υποκατεστημένου φαινυλοξικού οξέος (1 eq) και κατάλληλα υποκατεστημένης 2-υδροξυ-ακετοφαινόνης (1.05 eq) σε οξικό ανυδρίτη [(CH₃CO)₂O] παρουσία τριαιθυλαμίνης (Et₃N) (3.1 eq). Το μίγμα αφήνεται υπό ανάδευση στους 120 °C για περίπου 3 h, παρουσία κάθετου ψυκτήρα, υπό αδρανείς συνθήκες.

Η πορεία της αντίδρασης παρακολουθείται μέσω χρωματογραφίας λεπτής στιβάδας (TLC) σε σύστημα διαλυτών πετρελαϊκός αιθέρας (PE)/οξικός αιθυλεστέρας (EtOAc) = 70 : 30. Μετά το πέρας της αντίδρασης, προστίθεται νερό στο μίγμα και πραγματοποιείται εκχύλιση της υδατικής στιβάδας με διχλωρομεθάνιο, ενώ η οργανική φάση ξηραίνεται με θειϊκό νάτριο (Na₂SO₄) και εξατμίζεται υπό ελαττωμένη πίεση. Ακολουθεί προσθήκη διαιθυλαιθέρα υπό ψύξη και καταβύθιση στερεού, ενώ το τελικό προϊόν παραλαμβάνεται ύστερα από ανακρυστάλλωση από μεθανόλη και διχλωρομεθάνιο. Η καθαρότητα των προϊόντων ελέγχεται με φασματοσκοπία ¹H και ¹³C NMR και φασματομετρία HR-MS.

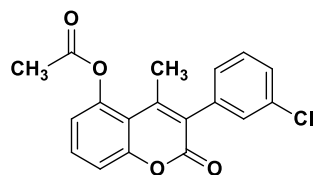
5-ακετυλοξυ-4-μεθυλο-3-(2-χλωροφαινυλο)- 2H-χρωμεν-2-όνη (**3a**):

Με βάση τη γενική μέθοδο σύνθεσης των ακετυλοξυ-κουμαρινών, σε 2.6 mL οξικού ανυδρίτη και 1 mL Et₃N, προστίθενται 2.35 mmol (400 mg) 3-χλωρο-φαινυλοξικού οξέος και 2.46 mmol (375 mg) 2,6-διυδροξυ-ακετοφαινόνης. Παραλαμβάνεται λευκό στερεό.

Απόδοση: 36%, **Σ.Τ.:** 136–137 °C

¹H NMR (600 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 7.54 (t, *J* = 8.4 Hz, 1H, H-7), 7.52–7.50 (m, 1H, H-3'), 7.37–7.36 (m, 2H, H-4', H-5'), 7.32 (dd, *J* = 8.4 Hz, *J* = 1.2 Hz, 1H, H-8), 7.25–7.23 (m, 1H, H-6'), 7.00 (dd, *J* = 8.4 Hz, *J* = 1.2 Hz, 1H, H-8), 2.35 (s, 3H, CH₃), 2.29 (s, 3H, OCOCH₃), ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 169.23, 159.17, 154.11, 148.14, 148.07, 134.25, 133.52, 131.51, 131.21, 130.06, 129.91, 127.25, 126.70, 119.98, 115.44, 114.17, 21.52, 19.89

HRMS calcd for C₁₈H₁₂O₄Cl (M-H)⁻: *m/z*: 327.0502, found: 327.0422

5-ακετυλοξυ-4-μεθυλο-3-(3-χλωροφαινυλο)- 2H-χρωμεν-2-όνη (**3b**):

Με βάση τη γενική μέθοδο σύνθεσης των ακετυλοξυ-κουμαρινών, σε 2.6 mL οξικού ανυδρίτη και 1 mL Et₃N, προστίθενται 2.35 mmol (400 mg) 3-χλωρο-φαινυλοξικού οξέος και 2.46 mmol (375 mg) 2,6-διυδροξυ-ακετοφαινόνης. Παραλαμβάνεται λευκό στερεό.

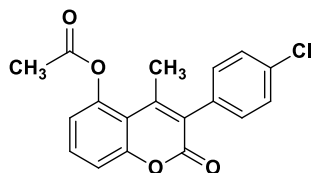
Απόδοση: 52%, **Σ.Τ.:** 150–153 °C

¹H NMR (600 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 7.53 (t, *J* = 8.4 Hz, 1H, H-7), 7.40–7.39 (m, 2H, H-5', H-6'), 7.30 (dd, *J* = 8.4 Hz, *J* = 1.2 Hz, 1H, H-8), 7.27 (br, 1H, H-2'), 7.17–7.15 (m, 1H,

H-4'), 6.99 (dd, $J = 8.4$ Hz, $J = 1.2$ Hz, 1H, H-6), 2.36 (s, 3H, CH₃), 2.36 (s, 3H, OCOCH₃), ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 169.24, 159.76, 153.80, 148.10, 147.12, 136.19, 134.53, 131.22, 130.15, 129.99, 128.67, 128.34, 127.74, 120.05, 115.35, 114.37, 21.50, 20.39

HRMS calcd for C₁₈H₁₂O₄Cl (M-H)⁻: m/z : 327.0502, found: 327.0423

5-ακετυλοξυ-4-μεθυλο-3-(4-χλωροφαινυλο)-2H-χρωμεν-2-όνη (**3c**):



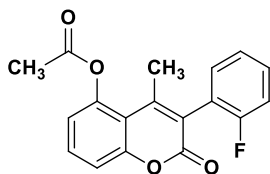
Με βάση τη γενική μέθοδο σύνθεσης των ακετυλοξυκουμαρινών, σε 2.6 mL οξικού ανυδρίτη και 1 mL Et₃N, προστίθενται 2.34 mmol (400 mg) 4-χλωρο-φαινυλοξικού οξέος και 2.46 mmol (375 mg) 2,6-διυδροξυ-ακετοφαινόνης. Παραλαμβάνεται λευκό στερεό.

Απόδοση: 41%, Σ.Τ.: 179–180 °C

¹H NMR (600 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 7.52 (t, $J = 8.4$ Hz, 1H, H-7), 7.43 (d, $J = 8.4$ Hz, 2H, H-2', H-6'), 7.30 (d, $J = 8.4$ Hz, 1H, H-8), 7.21 (d, $J = 8.4$ Hz, 2H, H-3', H-5'), 6.99 (d, $J = 8.4$ Hz, 1H, H-6), 2.36 (s, 3H, CH₃), 2.35 (s, 3H, OCOCH₃)

HRMS calcd for C₁₈H₁₂O₄Cl (M-H)⁻: m/z : 327.0502, found: 327.0423

5-ακετυλοξυ-4-μεθυλο-3-(2-φθοροφαινυλο)-2H-χρωμεν-2-όνη (**3d**):



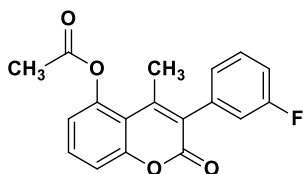
Με βάση τη γενική μέθοδο σύνθεσης των ακετυλοξυκουμαρινών, σε 2.9 mL οξικού ανυδρίτη και 1.1 mL Et₃N, προστίθενται 2.60 mmol (400 mg) 2-φθορο-φαινυλοξικού οξέος και 2.73 mmol (415 mg) 2,6-διυδροξυ-ακετοφαινόνης. Παραλαμβάνεται λευκό στερεό.

Απόδοση: 42%, Σ.Τ.: 158–162 °C

¹H NMR (600 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 7.53 (t, $J = 8.4$ Hz, 1H, H-7), 7.43–7.40 (m, 1H, H-6'), 7.30 (dd, $J = 8.4$ Hz, $J = 1.2$ Hz, 1H, H-8), 7.28 (td, $J = 7.2$ Hz, $J = 1.8$ Hz, 1H, H-4'), 7.24 (t, $J = 7.2$ Hz, 1H, H-5'), 7.17 (t, $J = 8.4$ Hz, 1H, H-3'), 7.00 (dd, $J = 8.4$ Hz, $J = 1.2$ Hz, 1H, H-6), 2.36 (s, 3H, CH₃), 2.36 (s, 3H, OCOCH₃)

HRMS calcd for C₁₈H₁₂O₄F (M-H)⁻: m/z : 311.0798, found: 311.0718.

5-ακετυλοξυ-4-μεθυλο-3-(3-φθοροφαινυλο)-2H-χρωμεν-2-όνη (**3e**):



Με βάση τη γενική μέθοδο σύνθεσης των ακετυλοξυκουμαρινών, σε 2.9 mL οξικού ανυδρίτη και 1.1 mL Et₃N, προστίθενται 2.60 mmol (400 mg) 3-φθορο-φαινυλοξικού οξέος και 2.73 mmol (415 mg) 2,6-διυδροξυ-ακετοφαινόνης. Παραλαμβάνεται υπόλευκο στερεό.

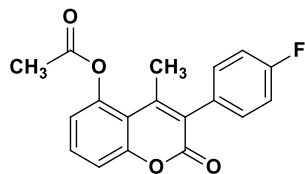
Απόδοση: 32%, Σ.Τ.: 150–152 °C

¹H NMR (600 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 7.53 (t, $J = 7.8$ Hz, 1H, H-7), 7.44–7.41 (m, 1H, H-5'), 7.30 (dd, $J = 7.8$ Hz, $J = 1.2$ Hz, 1H, H-8), 7.11 (td, $J = 8.4$ Hz, $J = 2.4$ Hz, 1H, H-4'),

7.05 (dt, $J = 7.8$ Hz, 1H, H-6'), 6.99 (dd, $J = 7.8$ Hz, $J = 1.2$ Hz, 2H, H-6, H-2'), 2.36 (s, 6H, OCOCH₃, CH₃)

HRMS calcd for C₁₈H₁₂O₄F (M-H)⁻: m/z : 311.0798, found: 311.0718

5-ακετυλοξυ-4-μεθυλο-3-(4-φθοροφαινυλο)-2H-χρωμεν-2-όνη (**3f**):



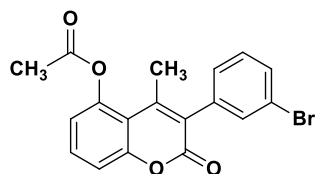
Με βάση τη γενική μέθοδο σύνθεσης των ακετυλοξυκουμαρινών, σε 1.4 mL οξικού ανυδρίτη και 0.5 mL Et₃N, προστίθενται 1.30 mmol (200 mg) 4-φθορο-φαινυλοξικού οξέος και 1.36 mmol (207 mg) 2,6-διυδροξυ-ακετοφαινόνης. Παραλαμβάνεται λευκό στερεό.

Απόδοση: 37%, **Σ.Τ.:** 190–191 °C

¹H NMR (600 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 7.52 (t, $J = 8.4$ Hz, 1H, H-7), 7.30 (d, $J = 8.4$ Hz, 1H, H-8), 7.26 (d, $J = 6$ Hz, 1H, H-6'), 7.24 (d, $J = 5.4$ Hz, 1H, H-2'), 7.15 (pseudotriplet, 2H, H-3', H-5'), 6.99 (d, $J = 7.8$ Hz, 1H, H-6), 2.36 (s, 3H, CH₃), 2.35 (s, 3H, OCOCH₃), ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 169.38, 164.34, 161.05, 153.74, 147.99, 146.83, 132.01, 131.90, 131.09, 130.22, 128.06, 120.02, 115.94, 115.66, 115.39, 114.52, 21.56, 20.42

HRMS calcd for C₁₈H₁₂O₄F (M-H)⁻: m/z : 311.0798, found: 311.0719

5-ακετυλοξυ-3-(3-βρωμοφαινυλο)-4-μεθυλο-2H-χρωμεν-2-όνη (**3g**):



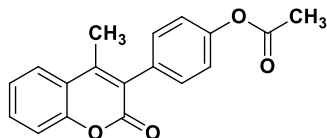
Με βάση τη γενική μέθοδο σύνθεσης των ακετυλοξυκουμαρινών, σε 2.1 mL οξικού ανυδρίτη και 780 μL Et₃N, προστίθενται 1.86 mmol (400 mg) 3-βρωμο-φαινυλοξικού οξέος και 1.95 mmol (297 mg) 2,6-διυδροξυ-ακετοφαινόνης. Παραλαμβάνεται κίτρινο στερεό.

Απόδοση: 39%, **Σ.Τ.:** 133–135 °C

¹H NMR (600 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 7.54–7.51 (m, 2H, H-6', H-7), 7.42 (s, 1H, H-2'), 7.33 (t, $J = 7.8$ Hz, 1H, H-5'), 7.29 (d, $J = 8.4$ Hz, 1H, H-8), 7.21 (d, $J = 7.8$ Hz, 1H, H-4'), 6.99 (d, $J = 8.4$ Hz, 1H, H-6), 2.35 (s, 6H, OCOCH₃, CH₃), ¹³C NMR (150 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 169.26, 159.78, 153.83, 148.11, 147.15, 136.46, 132.98, 131.60, 131.26, 130.26, 128.82, 127.69, 122.66, 120.07, 155.39, 114.37, 21.53, 20.44

HRMS calcd for C₁₈H₁₂O₄Br (M-H)⁻: m/z : 370.9997, found: 370.9916

3-(4-ακετυλοξυφαινυλο)-4-μεθυλο-2H-χρωμεν-2-όνη (**3h**):



Με βάση τη γενική μέθοδο σύνθεσης των ακετυλοξυκουμαρινών, σε 3.0 mL οξικού ανυδρίτη και 1.1 mL Et₃N, προστίθενται 2.66 mmol (400 mg) 4-υδροξυ-φαινυλοξικού οξέος και 1.95 mmol (381 mg) 2,6-διυδροξυ-ακετοφαινόνης. Παραλαμβάνεται κίτρινο

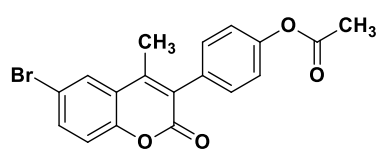
στερεό.

Απόδοση: 41%, **Σ.Τ.:** 180–182 °C

$^1\text{H NMR}$ (300 MHz, CDCl_3): δ (ppm) 7.69 (d, 1H, $J = 7.8$ Hz, H-5), 7.55 (t, 1H, $J = 7.5$ Hz, H-7), 7.39–7.32 (m, 4H, H-6, H-8, H-2', H-6'), 7.19 (d, 2H, $J = 7.8$ Hz, H-3', H-5'), 2.35 (s, 3H, CH_3), 2.33 (s, 3H, OCOCH_3)

HRMS calcd for $\text{C}_{18}\text{H}_{13}\text{O}_4$ (M-H) $^-$: m/z : 293.0892, found: 293.0814

3-(4-ακετυλοξυφαινυλο)-6-βρωμο-4-μεθυλο-2H-χρωμεν-2-όνη (**3i**):



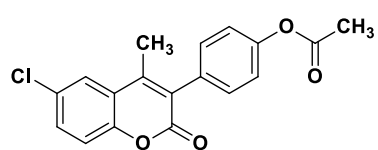
Με βάση τη γενική μέθοδο σύνθεσης των ακετυλοξυ-κουμαρινών, σε 1.5 mL οξικού ανυδρίτη και 0.6 mL Et_3N , προστίθενται 1.33 mmol (200 mg) 4-υδροξυ-φαινυλοξικού οξέος και 1.40 mmol (301 mg) 5-βρωμο-2-υδροξυ-ακετοφαινόνης. Παραλαμβάνεται λευκό στερεό.

Απόδοση: 38%, **Σ.Τ.:** 185–186 °C

$^1\text{H NMR}$ (600 MHz, CDCl_3): δ (ppm) 7.79 (d, $J = 2.4$ Hz, 1H, H-5), 7.63 (dd, $J = 9$ Hz, $J = 2.4$ Hz, 1H, H-7), 7.31 (d, $J = 8.4$ Hz, 2H, H-2', H-6'), 7.26 (d, $J = 9$ Hz, 1H, H-8), 7.20 (d, $J = 8.4$ Hz, 2H, H-3', H-5'), 2.32 (s, 3H, CH_3), 2.32 (s, 3H, OCOCH_3)

HRMS calcd for $\text{C}_{18}\text{H}_{12}\text{O}_4\text{Br}$ (M-H) $^-$: m/z : 370.9997, found: 370.9917

3-(4-ακετυλοξυφαινυλο)-4-μεθυλο-6-χλωρο-2H-χρωμεν-2-όνη (**3j**):



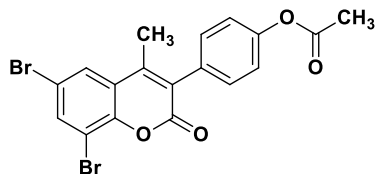
Με βάση τη γενική μέθοδο σύνθεσης των ακετυλοξυ-κουμαρινών, σε 3.7 mL οξικού ανυδρίτη και 1.4 mL Et_3N , προστίθενται 3.33 mmol (500 mg) 4-υδροξυ-φαινυλοξικού οξέος και 3.50 mmol (596 mg) 5-χλωρο-2-υδροξυ-ακετοφαινόνης. Παραλαμβάνεται λευκό στερεό.

Απόδοση: 41%, **Σ.Τ.:** 194–195 °C

$^1\text{H NMR}$ (600 MHz, CDCl_3): δ (ppm) 7.65 (d, $J = 2.4$ Hz, 1H, H-5), 7.49 (dd, $J = 9$ Hz, $J = 2.4$ Hz, 1H, H-7), 7.32 (d, $J = 8.4$ Hz, 3H, H-8, H-2', H-6'), 7.20 (d, $J = 8.4$ Hz, 2H, H-3', H-5'), 2.33 (s, 3H, CH_3), 2.32 (s, 3H, OCOCH_3)

HRMS calcd for $\text{C}_{18}\text{H}_{12}\text{O}_4\text{Cl}$ (M-H) $^-$: m/z : 327.0502, found: 327.0424

3-(4-ακετυλοξυφαινυλο)-6,8-διβρωμο-4-μεθυλο-2H-χρωμεν-2-όνη (**3k**):



Με βάση τη γενική μέθοδο σύνθεσης των ακετυλοξυ-κουμαρινών, σε 3.7 mL οξικού ανυδρίτη και 1.4 mL Et_3N , προστίθενται 3.33 mmol (500 mg) 4-υδροξυ-φαινυλοξικού οξέος και 3.50 mmol (1027 mg) 3,5-διβρωμο-2-υδροξυ-ακετοφαινόνης. Παραλαμβάνεται λευκό στερεό.

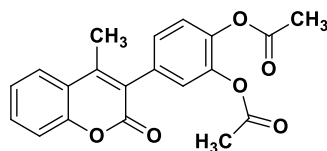
Απόδοση: 60%, **Σ.Τ.:** 240–241 °C

$^1\text{H NMR}$ (600 MHz, CDCl_3): δ (ppm) 7.90 (d, $J = 2.4$ Hz, 1H, H-7), 7.74 (d, $J = 2.4$ Hz, 1H, H-5), 7.31 (d, $J = 8.4$ Hz, 2H, H-2', H-6'), 7.20 (d, $J = 9$ Hz, 2H, H-3', H-5'), 2.33 (s, 3H, CH_3), 2.32 (s, 3H, OCOCH_3), $^{13}\text{C NMR}$ (75 MHz, CDCl_3): δ (ppm) 169.32, 159.21, 150.95,

148.73, 146.54, 137.02, 131.29, 131.10, 128.19, 127.25, 123.17, 232.85, 116.97, 111.58, 21.33, 17.05

HRMS calcd for $C_{18}H_{11}O_4Br_2$ (M-H)⁻: m/z : 448.9102, found: 448.9025

3-(3,4-διακετυλοξυφαινυλο)-4-μεθυλο-2H-χρωμεν-2-όνη (**3l**):



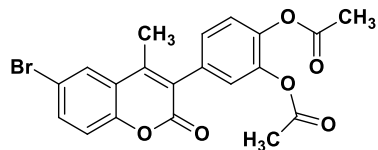
Με βάση τη γενική μέθοδο σύνθεσης των ακετυλοξυ-κουμαρινών, σε 3.3 mL οξικού ανυδρίτη και 1.3 mL Et₃N, προστίθενται 2.97 mmol (500 mg) 3,4-διυδροξυφαινυλοξικού οξέος και 3.12 mmol (376 mg) 2-υδροξυ-ακετοφαινόνης. Παραλαμβάνεται λευκό στερεό.

Απόδοση: 35%, **Σ.Τ.:** 182–184 °C

¹H NMR (600 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 7.69 (d, J = 7.8 Hz, 1H, H-5), 7.55 (t, J = 7.2 Hz, 1H, H-7), 7.37 (d, J = 7.8 Hz, 1H, H-6'), 7.33 (t, J = 7.8 Hz, 1H, H-6), 7.29 (d, J = 8.4 Hz, 1H, H-5'), 7.23 (dd, J = 8.4 Hz, J = 1.8 Hz, 1H, H-8), 7.20 (d, J = 1.2 Hz, 1H, H-2'), 2.39 (s, 3H, CH₃), 2.32 (s, 3H, OCOCH₃), 2.29 (s, 3H, CH₃), ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 168.13, 160.59, 152.76, 148.55, 142.02, 141.91, 132.74, 131.73, 128.54, 125.67, 125.35, 124.48, 123.39, 120.48, 116.97, 20.82, 20.79, 16.87

HRMS calcd for $C_{20}H_{17}O_6$ (M+H)⁺: m/z : 353.0947, found: 353.1027

6-βρωμο-3-(3,4-διακετυλοξυφαινυλο)-4-μεθυλο-2H-χρωμεν-2-όνη (**3m**):



Με βάση τη γενική μέθοδο σύνθεσης των ακετυλοξυ-κουμαρινών, σε 3.3 mL οξικού ανυδρίτη και 1.3 mL Et₃N, προστίθενται 2.97 mmol (500 mg) 3,4-διυδροξυφαινυλοξικού οξέος και 3.12 mmol (671 mg)

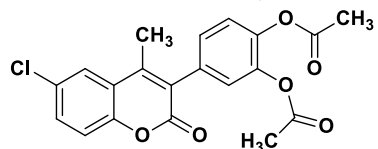
5-βρωμο-2-υδροξυ-ακετοφαινόνης. Παραλαμβάνεται λευκό στερεό.

Απόδοση: 47%, **Σ.Τ.:** 190–191 °C

¹H NMR (600 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 7.80 (d, J = 1.8 Hz, 1H, H-5), 7.64 (dd, J = 8.4 Hz, J = 1.8 Hz, 1H, H-7), 7.29 (d, J = 8.4 Hz, 1H, H-5'), 7.25 (d, J = 7.8 Hz, 1H, H-8), 7.20 (dd, J = 7.8 Hz, J = 1.8 Hz, 1H, H-6'), 7.18 (d, J = 1.8 Hz, 1H, H-2'), 2.36 (s, 3H, CH₃), 2.32 (s, 3H, OCOCH₃), 2.30 (s, 3H, OCOCH₃), ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 168.10, 168.08, 159.93, 151.60, 147.33, 142.20, 141.95, 134.43, 132.20, 128.44, 127.99, 126.61, 125.59, 123.47, 122.17, 118.67, 117.23, 20.81, 20.78, 16.89

HRMS calcd for $C_{20}H_{14}O_6Br$ (M-H)⁻: m/z : 428.0052, found: 428.9970

3-(3,4-διακετυλοξυφαινυλο)-4-μεθυλο-6-χλωρο-2H-χρωμεν-2-όνη (**3n**):



Με βάση τη γενική μέθοδο σύνθεσης των ακετυλοξυ-κουμαρινών, σε 3.3 mL οξικού ανυδρίτη και 1.3 mL Et₃N, προστίθενται 2.97 mmol (500 mg) 3,4-διυδροξυφαινυλοξικού οξέος και 3.12 mmol (533 mg)

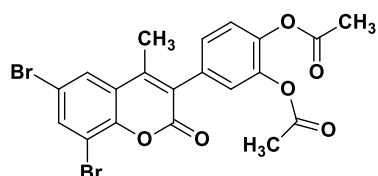
5-χλωρο-2-υδροξυ-ακετοφαινόνης. Παραλαμβάνεται λευκό στερεό.

Απόδοση: 40%, **Σ.Τ.:** 187–189 °C

¹H NMR (600 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 7.65 (s, 1H, H-5), 7.50 (d, *J* = 9 Hz, 1H, H-7), 7.31 (d, *J* = 9.6 Hz, 1H, H-6'), 7.29 (d, *J* = 9 Hz, 1H, H-5'), 7.21 (d, 1H, H-8) 7.19 (s, 1H, H-2'), 2.36 (s, 3H, CH₃), 2.32 (s, 3H, OCOCH₃), 2.30 (s, 3H, OCOCH₃)

HRMS calcd for C₁₈H₁₂O₄Cl (M-H)⁻: *m/z*: 385.0557, found: 385.0476.

3-(3,4-διακετυλοξυφαινυλο)-6,8-διβρωμο-4-μεθυλο-2H-χρωμεν-2-όνη (**3o**):



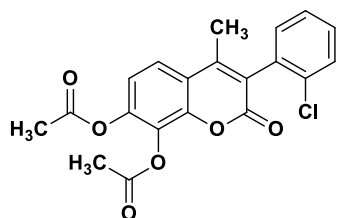
Με βάση τη γενική μέθοδο σύνθεσης των ακετυλοξυ-κουμαρινών, σε 1.8 mL οξικού ανυδρίτη και 0.7 mL Et₃N, προστίθενται 1.61 mmol (270 mg) 3,4-διυδροξυ-φαινυλοξικού οξέος και 1.69 mmol (497 mg) 3,5-διβρωμο-2-υδροξυ-ακετοφαινόνης. Παραλαμβάνεται λευκό στερεό.

Απόδοση: 65%, **Σ.Τ.:** 230–231 °C

¹H NMR (600 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 7.91 (d, *J* = 1.8 Hz, 1H, H-5), 7.74 (d, *J* = 1.2 Hz, 1H, H-7), 7.30 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H, H-5'), 7.20 (dd, *J* = 8.4 Hz, *J* = 1.8 Hz, 1H, H-6'), 7.17 (s, 1H, H-2'), 2.35 (s, 3H, CH₃), 2.32 (s, 3H, OCOCH₃), 2.30 (s, 3H, OCOCH₃), **¹³C NMR** (150 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 168.41, 159.21, 148.95, 147.31, 142.58, 142.22, 137.46, 132.06, 128.69, 127.55, 127.51, 125.84, 123.86, 123.26, 117.31, 111.86, 21.12, 21.11, 17.41

HRMS calcd for C₂₀H₁₃O₆Br₂ (M-H)⁻: *m/z*: 506.9157, found: 506.908

7,8-διακετυλοξυ-3-(2-χλωροφαινυλο)-4-μεθυλο-2H-χρωμεν-2-όνη (**9a**):



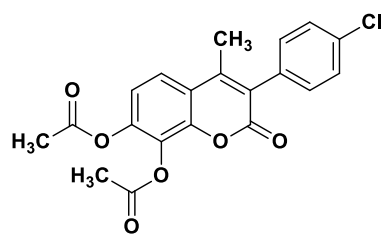
Σύμφωνα με τη γενική μέθοδο σύνθεσης ακετυλοξυ-κουμαρινών, σε 3.8 mL οξικού ανυδρίτη και 1.5 mL Et₃N προστίθενται 3.40 mmol (579.7 mg) 2-χλωροφαινυλοξικού οξέος και 3.57 mmol (600 mg) 2,3,4-τριυδροξυ-ακετοφαινόνης. Παραλαμβάνεται λευκό στερεό.

Απόδοση: 63%, **Σ.Τ.:** 175-178 °C

¹H NMR (600MHz, CDCl₃): δ (ppm) 7.58 (d, *J* = 9 Hz, 1H, H-5), 7.52-7.50 (m, 1H, H-6'), 7.38-7.36 (m, 2H, H-4', H-5'), 7.25-7.23 (m, 1H, H-3'), 7.20 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H, H-6), 2.43 (s, 3H, CH₃), 2.35 (s, 3H, OCOCH₃), 2.22 (s, 3H, OCOCH₃), **¹³C NMR** (150 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 167.93, 167.63, 158.58, 149.10, 146.30, 145.24, 134.29, 133.24, 131.49, 130.41, 130.11, 129.91, 127.17, 125.05, 122.45, 119.20, 118.78, 20.77, 20.45, 16.56

HRMS calcd for C₂₀H₁₆O₆Cl (M+H)⁺: *m/z*: 387.0557, found: 387.0630

7,8-διακετυλοξυ-4-μεθυλο-3-(4-χλωροφαινυλο)-2H-χρωμεν-2-όνη (**9b**):



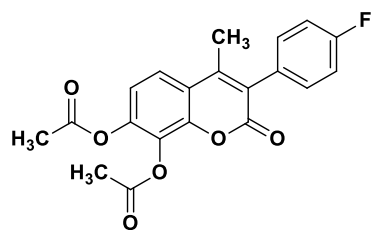
Σύμφωνα με τη γενική μέθοδο σύνθεσης ακετυλοξυ-κουμαρινών, σε 3.1 mL οξικού ανυδρίτη και 1.2 mL Et₃N προστίθενται 2.83 mmol (483.1 mg) 4-χλωρο-φαινυλοξικού οξέος και 2.97 mmol (500 mg) 2,3,4-τριυδροξυ-ακετοφαινόνης. Παραλαμβάνεται λευκό στερεό.

Απόδοση: 57%, **Σ.Τ.:** 220-221 °C

¹H NMR (600 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 7.56 (d, *J* = 9 Hz, 1H, H-5), 7.44 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H, H-2', H-6'), 7.22 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H, H-3', H-5'), 7.19 (d, *J* = 9 Hz, 1H, H-6), 2.42 (s, 3H, CH₃), 2.35 (s, 3H, OCOCH₃), 2.30 (s, 3H, OCOCH₃), ¹³C NMR (150 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 167.87, 167.59, 159.35, 147.69, 145.99, 145.11, 134.56, 132.53, 131.55, 130.33, 128.86, 126.10, 122.43, 119.40, 118.78, 20.74, 20.44, 16.91

HRMS calcd for C₂₀H₁₆O₆Cl (M+H)⁺: *m/z*: 387.0557, found: 387.0629

7,8-διακετυλοξυ-4-μεθυλο-3-(4-φθοροφαινυλο)-2H-χρωμεν-2-όνη (**9c**):



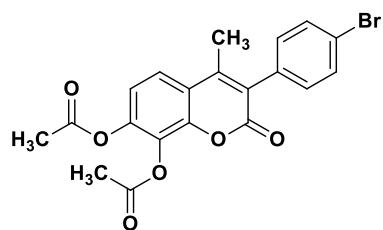
Σύμφωνα με τη γενική μέθοδο σύνθεσης ακετυλοξυ-κουμαρινών, σε 2.8 mL οξικού ανυδρίτη και 1.1 mL Et₃N προστίθενται 2.55 mmol (392.9 mg) 4-φθορο-φαινυλοξικού οξέος και 2.67 mmol (450 mg) 2,3,4-τριυδροξυ-ακετοφαινόνης. Παραλαμβάνεται λευκό στερεό.

Απόδοση: 37%, **Σ.Τ.:** 207-209 °C

¹H NMR (600MHz, CDCl₃): δ (ppm) 7.57 (d, *J* = 9 Hz, 1H, H-5), 7.26 (pseudotriplet, 2H, H-2', H-6'), 7.19 (d, *J* = 9 Hz, 1H, H-6), 7.16 (pseudotriplet, 2H, H-3', H-5'), 2.43 (s, 3H, CH₃), 2.35 (s, 3H, OCOCH₃), 2.30 (s, 3H, OCOCH₃), ¹³C NMR (150 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 167.93, 167.65, 163.56, 161.92, 159.57, 147.63, 145.99, 145.05, 132.02, 131.97, 126.31, 122.42, 119.51, 118.76, 115.78, 115.63, 20.78, 20.48, 16.95

HRMS calcd for C₂₀H₁₆O₆F (M+H)⁺: *m/z*: 371.0853, found: 371.0926

3-(4-βρωμοφαινυλο)-7,8-διακετυλοξυ-4-μεθυλο-2H-χρωμεν-2-όνη (**9d**):



Σύμφωνα με τη γενική μέθοδο σύνθεσης ακετυλοξυ-κουμαρινών, σε 2.5 mL οξικού ανυδρίτη και 980 μL Et₃N προστίθενται 2.26 mmol (487.23 mg) 4-βρωμο-φαινυλοξικού οξέος και 2.38 mmol (400 mg) 2,3,4-τριυδροξυ-ακετοφαινόνης. Παραλαμβάνεται υποκίτρινο στερεό.

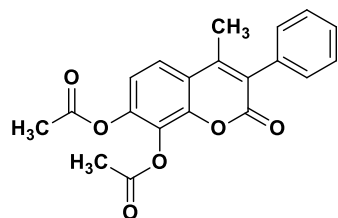
Απόδοση: 62%, **Σ.Τ.:** 208-209 °C

¹H NMR (600 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 7.59 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H, H-3', H-5'), 7.56 (d, *J* = 9 Hz, 1H, H-5), 7.19 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H, H-6), 7.16 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H, H-2', H-6'), 2.42 (s,

3H, CH₃), 2.35 (s, 3H, OCOCH₃) 2.30 (s, 3H, OCOCH₃), ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 167.91, 167.63, 159.32, 147.68, 145.98, 145.13, 133.01, 131.84, 130.34, 126.15, 122.84, 122.44, 119.41, 118.81, 20.78, 20.47, 16.95

HRMS calcd for C₂₀H₁₆O₆Br (M+H)⁺: *m/z*: 431.0052, found: 431.0126

7,8-διακετυλοξυ-4-μεθυλο-3-φαινυλο-2H-χρωμεν-2-όνη (**9e**):

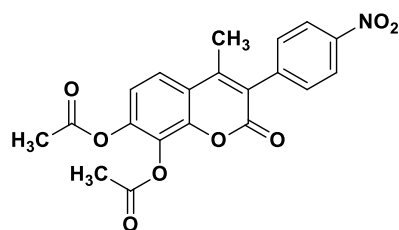


Σύμφωνα με τη γενική μέθοδο σύνθεσης ακετυλοξυ-κουμαρινών, σε 3.1 mL οξικού ανυδρίτη και 1.2 mL Et₃N προστίθενται 2.83 mmol (385.6 mg) φαινυλοξικού οξέος και 2.97 mmol (500 mg) 2,3,4-τριυδροξυ-ακετοφαινόνης. Παραλαμβάνεται λευκό στερεό.

Απόδοση: 35%, **Σ.Τ.:** 218-220 °C (**Σ.Τ. βιβλιογραφίας:** 212 °C [89])

¹H NMR (600 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 7.56 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H, H-5), 7.46-7.44 (m, 2H, H-3', H-5'), 7.41-7.39 (m, 1H, H-4'), 7.27 (d, *J* = 7.8 Hz, 2H, H-2', H-6'), 7.18 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H, H-6), 2.42 (s, 3H, CH₃), 2.34 (s, 3H, OCOCH₃), 2.29 (s, 3H, OCOCH₃)

7,8-διακετυλοξυ-4-μεθυλο-3-(4-νιτροφαινυλο)-2H-χρωμεν-2-όνη (**9f**):



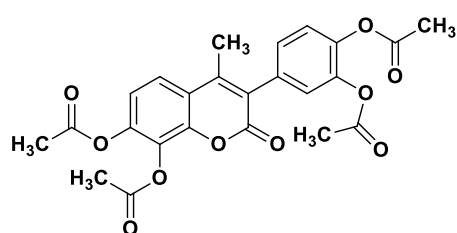
Σύμφωνα με τη γενική μέθοδο σύνθεσης ακετυλοξυ-κουμαρινών, σε 3.14 mL οξικού ανυδρίτη και 1.2 mL Et₃N προστίθενται 2.83 mmol (513 mg) 4-νιτρο-φαινυλοξικού οξέος και 2.97 mmol (500 mg) 2,3,4-τριυδροξυ-ακετοφαινόνης. Παραλαμβάνεται καφέ στερεό.

Απόδοση: 36%, **Σ.Τ.:** 235-238 °C

¹H NMR (600 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 8.33 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H, H-3', H-5') 7.60 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H, H-5), 7.49 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H, H-2', H-6'), 7.23 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H, H-6), 2.43 (s, 3H, CH₃), 2.36 (s, 3H, OCOCH₃), 2.32 (s, 3H, OCOCH₃), ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 167.90, 167.61, 158.90, 148.54, 147.78, 146.10, 145.53, 140.92, 131.45, 130.43, 125.19, 123.81, 122.59, 119.12, 119.01, 20.79, 20.47, 17.03

HRMS calcd for C₂₀H₁₆O₈N (M+H)⁺: *m/z*: 398.0798, found: 398.0872

7,8-διακετυλοξυ-3-(3,4-διακετυλοξυφαινυλο)-4-μεθυλο-2H-χρωμεν-2-όνη (**9g**):



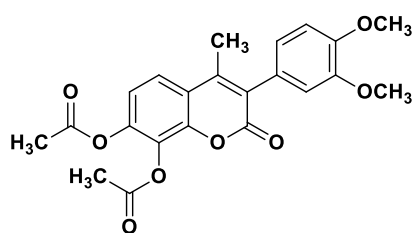
Σύμφωνα με τη γενική μέθοδο σύνθεσης ακετυλοξυ-κουμαρινών, σε 3.1 mL οξικού ανυδρίτη και 1.2 mL Et₃N προστίθενται 2.83 mmol (476.2 mg) 3,4-διυδροξυ-φαινυλοξικού οξέος και 2.97 mmol (500 mg) 2,3,4-τριυδροξυ-ακετοφαινόνης. Παραλαμβάνεται υποκίτρινο στερεό.

Απόδοση: 69%, **Σ.Τ.:** 184-186 °C

¹H NMR (600 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 7.57 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H, H-5), 7.29 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H, H-6'), 7.19 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H, H-5', H-6), 7.15 (s, 1H, H-2'), 2.42 (s, 3H, CH₃), 2.36 (s, 3H, OCOCH₃), 2.34 (s, 3H, OCOCH₃), 2.31 (s, 3H, OCOCH₃), 2.30 (s, 3H, OCOCH₃-7), **¹³C NMR** (75 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 168.11, 167.90, 167.60, 159.14, 148.13, 145.95, 142.13, 141.90, 132.29, 130.25, 128.49, 125.59, 125.47, 123.47, 122.55, 119.40, 118.76, 20.82, 20.78, 20.75, 20.46, 17.09

HRMS calcd for C₂₄H₂₁O₁₀ (M+H)⁺: *m/z*: 469.1056, found: 469.1130

7,8-διακετυλοξυ-3-(3,4-διμεθοξυφαινυλο)-4-μεθυλο-2H-χρωμεν-2-όνη (**9h**):



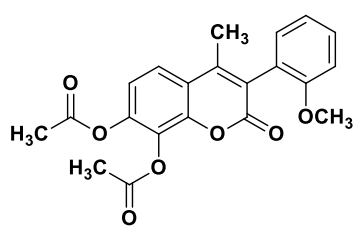
Σύμφωνα με τη γενική μέθοδο σύνθεσης ακετυλοξυ-κουμαρινών, σε 3.1 mL οξικού ανυδρίτη και 1.2 mL Et₃N προστίθενται 2.83 mmol (555.6 mg) 3,4-διμεθοξυ-φαινυλοξικού οξέος και 2.97 mmol (500 mg) 2,3,4-τριυδροξυ-ακετοφαινόνης. Παραλαμβάνεται καφέ στερεό.

Απόδοση: 49%, **Σ.Τ.:** 184-185 °C

¹H NMR (600 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 7.55 (d, *J* = 9 Hz, 1H, H-5), 7.18 (d, *J* = 9 Hz, 1H, H-6'), 6.95 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H, H-5'), 6.83 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H, H-6), 6.80 (s, 1H, H-2'), 3.92 (s, 3H, OCH₃), 3.88 (s, 3H, OCH₃), 2.42 (s, 3H, CH₃), 2.35 (s, 3H, OCOCH₃), 2.32 (s, 3H, OCOCH₃), **¹³C NMR** (75 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 167.96, 167.65, 159.78, 149.12, 148.87, 147.29, 145.84, 144.77, 127.00, 126.51, 122.66, 122.35, 119.66, 118.61, 113.10, 111.11, 56.01, 55.98, 20.76, 20.47, 16.97

HRMS calcd for C₂₂H₂₁O₈ (M+H)⁺: *m/z*: 413.1158, found: 413.1227

7,8-διακετυλοξυ-3-(2-μεθοξυφαινυλο)-4-μεθυλο-2H-χρωμεν-2-όνη (**9i**):



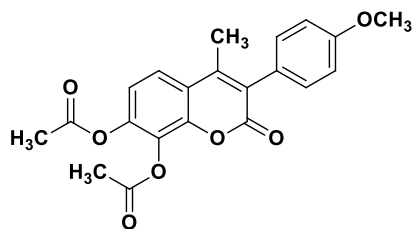
Σύμφωνα με τη γενική μέθοδο σύνθεσης ακετυλοξυ-κουμαρινών, σε 3.1 mL οξικού ανυδρίτη και 1.2 mL Et₃N προστίθενται 2.83 mmol (470.6 mg) 2-μεθοξυ-φαινυλοξικού οξέος και 2.97 mmol (500 mg) 2,3,4-τριυδροξυ-ακετοφαινόνης. Παραλαμβάνεται υποκίτρινο στερεό.

Απόδοση: 32%, **Σ.Τ.:** 159-160 °C

¹H NMR (600 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 7.55 (d, *J* = 9 Hz, 1H, H-5), 7.39 (t, *J* = 7.8 Hz, 1H, H-4'), 7.17 (d, *J* = 9 Hz, 1H, H-6'), 7.15 (d, *J* = 9 Hz, 1H, H-3'), 7.04 (t, *J* = 7.2 Hz, 1H, H-5'), 6.99 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H, H-6), 3.77 (s, 3H, OCH₃), 2.42 (s, 3H, CH₃), 2.34 (s, 3H, OCOCH₃), 2.21 (s, 3H, OCOCH₃)

HRMS calcd for C₂₁H₁₉O₇ (M+H)⁺: *m/z*: 383.1053, found: 383.1121

7,8-διακετυλοξυ-3-(4-μεθοξυφαινυλο)-4-μεθυλο-2H-χρωμεν-2-όνη (**9j**):



Σύμφωνα με τη γενική μέθοδο σύνθεσης ακετυλοξυ-κουμαρινών, σε 2.3 mL οξικού ανυδρίτη και 902 μL Et_3N προστίθενται 2.08 mmol (346.5 mg) 4-μεθοξυ-φαινυλοξικού οξέος και 2.19 mmol (368.1 mg) 2,3,4-τριυδροξυ-ακετοφαινόνης. Παραλαμβάνεται κίτρινο στερεό.

Απόδοση: 36%, **Σ.Τ.:** 180 °C

$^1\text{H NMR}$ (600 MHz, CDCl_3): δ (ppm) 7.55 (d, $J = 9$ Hz, 1H, H-5), 7.21 (d, $J = 9$ Hz, 2H, H-2', H-6'), 7.18 (d, $J = 8.4$ Hz, 1H, H-6), 6.99 (d, $J = 8.4$ Hz, 2H, H-3', H-5'), 3.85 (s, 3H, OCH_3), 2.42 (s, 3H, CH_3), 2.35 (s, 3H, OCOCH_3), 2.31 (s, 3H, OCOCH_3), $^{13}\text{C NMR}$ (75 MHz, CDCl_3): δ (ppm) 167.98, 167.69, 159.85, 159.65, 146.99, 145.89, 144.76, 131.41, 126.96, 126.26, 122.34, 119.79, 118.58, 114.03, 55.42, 20.78, 20.50, 16.98

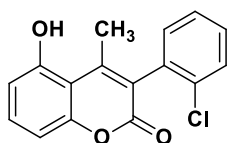
HRMS calcd for $\text{C}_{21}\text{H}_{19}\text{O}_7$ ($\text{M}+\text{H}$)⁺: m/z : 383.1053, found: 383.1122

Γενική μέθοδος απομάκρυνσης ακετυλο ομάδας (**4a-4k** & **10a-10j**)

Σε σφαιρική φιάλη προστίθενται ποσότητα κατάλληλα υποκατεστημένης ακετυλοξυ-κουμαρίνης (1 eq) και μονοένυδρη υδραζίνη ($\text{NH}_2\text{NH}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$) (15 eq ανά ομάδα OH) σε διαλύτη μεθανόλη. Η αντίδραση αφήνεται για 1-2 h στους 42 °C υπό συνεχή ανάδευση, παρουσία κάθετου ψυκτήρα, υπό αδρανείς συνθήκες.

Η εξέλιξη της αντίδρασης παρακολουθείται μέσω υγρής χρωματογραφίας λεπτής στιβάδας (TLC) σε σύστημα διαλυτών πετρελαϊκός αιθέρας (PE) : οξικός αιθυλεστέρας (EtOAc) 70 : 30. Μετά το πέρας της αντίδρασης, προστίθεται νερό στο μίγμα και πραγματοποιείται εκχύλιση της υδατικής στιβάδας με διάλυμα οξικού αιθυλεστέρα, ενώ το εκχύλισμα της οργανικής φάσης ξηραίνεται με θειϊκό νάτριο (Na_2SO_4) και έπειτα εξατμίζεται υπό ελαττωμένη πίεση. Ακολουθεί καθαρισμός του στερεού με ανακρυστάλλωση από διχλωρομεθάνιο και μεθανόλη ή με μικρή ποσότητα μεθανόλης εν θερμώ και παραλαβή του καθαρού προϊόντος με διήθηση υπό κενό. Η καθαρότητα των προϊόντων ελέγχεται με φασματοσκοπία ^1H και ^{13}C NMR και φασματομετρία HR-MS.

4-μεθυλο-5-υδροξυ-3-(2-χλωροφαινυλο)-2H-χρωμεν-2-όνη (**4a**):



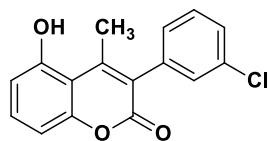
Με βάση τη γενική μέθοδο σύνθεσης των υδροξυ-κουμαρινών, σε σφαιρική φιάλη προστίθενται 0.54 mmol (176.2 mg) 5-ακετυλοξυ-4-μεθυλο-3-(2-χλωροφαινυλο)-κουμαρίνης, 8.04 mmol (380 μL) μονοένυδρης υδραζίνης και 8.7 mL μεθανόλης. Παραλαμβάνεται λευκό στερεό.

Απόδοση: 91%, **Σ.Τ.:** >250 °C

$^1\text{H NMR}$ (600 MHz, DMSO-d_6): δ (ppm) 10.79 (br, 1H, OH-5), 7.59-7.58 (m, 1H, H-6'), 7.45-7.43 (m, 3H, H-7, H-3', H-5'), 7.37-7.36 (m, 1H, H-4'), 6.85 (d, $J = 8.4$ Hz, 1H, H-8), 6.83 (d, $J = 7.8$ Hz, 1H, H-6), 2.33 (s, 3H, CH_3)

HRMS calcd for C₁₆H₁₀O₃Cl (M-H)⁻: *m/z*: 285.0397, found: 285.0315

4-μεθυλο-5-υδροξυ-3-(3-χλωροφαινυλο)-2H-χρωμεν-2-όνη (**4b**):



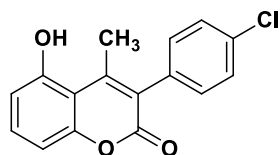
Με βάση τη γενική μέθοδο σύνθεσης των υδροξυκουμαρινών, σε σφαιρική φιάλη προστίθενται 0.64 mmol (209.6 mg) 5-ακετυλοξυ-4-μεθυλο-3-(3-χλωροφαινυλο)-κουμαρίνης, 9.57 mmol (460 μL) μονοένυδρης υδραζίνης και 10.3 mL μεθανόλης. Παραλαμβάνεται λευκό στερεό.

Απόδοση: 90%, **Σ.Τ.:** > 250 °C

¹H NMR (600 MHz, DMSO-d₆): δ (ppm) 10.71 (br, 1H, OH), 7.48 (*J* = 8.4 Hz, 1H, H-7), 7.46-7.44 (m, 1H, H-2'), 7.40-7.38 (m, 2H, H-5', H-6'), 7.24 (*d*, *J* = 6.6 Hz, 1H, H-4'), 6.83 (*d*, *J* = 8.4 Hz, 1H, H-8), 6.82 (*d*, *J* = 9 Hz, 1H, H-6), 2.34 (s, 3H, CH₃), ¹³C NMR (75 MHz, DMSO-d₆): δ (ppm) 158.76, 157.20, 153.98, 151.04, 134.12, 133.40, 132.16, 132.09, 129.88, 129.26, 127.43, 122.49, 111.69, 108.69, 107.17, 20.77

HRMS calcd for C₁₆H₁₀O₃Cl (M-H)⁻: *m/z*: 285.0397, found: 285.0314

4-μεθυλο-5-υδροξυ-3-(4-χλωροφαινυλο)-2H-χρωμεν-2-όνη (**4c**):



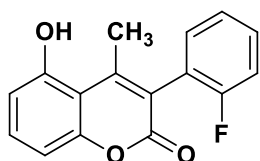
Με βάση τη γενική μέθοδο σύνθεσης των υδροξυκουμαρινών, σε σφαιρική φιάλη προστίθενται 0.48 mmol (157 mg) 5-ακετυλοξυ-4-μεθυλο-3-(4-χλωροφαινυλο)-κουμαρίνης, 16.78 mmol (800 μL) μονοένυδρης υδραζίνης και 13.9 mL μεθανόλης. Παραλαμβάνεται λευκό στερεό.

Απόδοση: 70%, **Σ.Τ.:** >250 °C

¹H NMR (600 MHz, DMSO-d₆): δ (ppm) 10.72 (br, 1H, OH), 7.50 (*d*, *J* = 7.8 Hz, 2H, H-2', H-6'), 7.39 (*t*, *J* = 8.4 Hz, 1H, H-7), 7.31 (*d*, *J* = 8.4 Hz, 2H, H-3', H-5'), 6.82 (*d*, *J* = 7.8 Hz, 1H, H-8), 6.82 (*d*, *J* = 8.4 Hz, 1H, H-6), 2.40 (s, 3H, CH₃)

HRMS calcd for C₁₆H₁₀O₃Cl (M-H)⁻: *m/z*: 285.0397, found: 285.0319.

4-μεθυλο-5-υδροξυ-3-(2-φθοροφαινυλο)-2H-χρωμεν-2-όνη (**4d**):

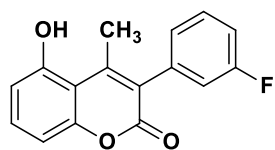


Με βάση τη γενική μέθοδο σύνθεσης των υδροξυκουμαρινών, σε σφαιρική φιάλη προστίθενται 0.43 mmol (133.1 mg) 5-ακετυλοξυ-4-μεθυλο-3-(2-φθοροφαινυλο)-κουμαρίνης, 6.39 mmol (300 μL) μονοένυδρης υδραζίνης και 6.9 mL μεθανόλης. Παραλαμβάνεται λευκό στερεό.

Απόδοση: 63%, **Σ.Τ.:** > 250 °C

¹H NMR (600 MHz, DMSO-d₆): δ (ppm) 10.78 (br, 1H, OH), 7.49-7.46 (m, 1H, H-6'), 7.42 (*t*, *J* = 8.4 Hz, 1H, H-7), 7.35 (*t*, *J* = 7.8 Hz, 1H, H-4'), 7.30-7.28 (m, 2H, H-3', H-5'), 6.85 (*d*, *J* = 9.6 Hz, 1H, H-8), 6.83 (*d*, *J* = 9 Hz, 1H, H-6), 2.40 (s, 3H, CH₃)

HRMS calcd for C₁₆H₁₀O₃F (M-H)⁻: *m/z*: 269.0692, found: 269.0612

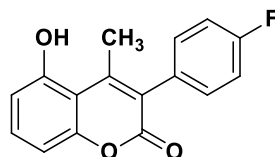
4-μεθυλο-5-υδροξυ-3-(3-φθοροφαινυλο)-2H-χρωμεν-2-όνη (**4e**):

Με βάση τη γενική μέθοδο σύνθεσης των υδροξυκουμαρινών, σε σφαιρική φιάλη προστίθενται 0.47 mmol (146.7 mg) 5-ακετυλοξυ-4-μεθυλο-3-(3-φθοροφαινυλο)-κουμαρίνης, 7.05 mmol (340 μ L) μονοένυδρης υδραζίνης και 7.6 mL μεθανόλης. Παραλαμβάνεται υπόλευκο στερεό.

Απόδοση: 61%, **Σ.Τ.:** > 250 °C

¹H NMR (600 MHz, DMSO-d₆): δ (ppm) 10.71 (br, 1H, OH), 7.50-7.47 (m, 1H, H-5'), 7.39 (t, J = 8.4 Hz, 1H, H-7), 7.22 (td, J = 9 Hz, J = 2.4 Hz, 1H, H-4'), 7.16 (d, J = 9 Hz, 1H, H-2'), 7.11 (d, J = 7.8 Hz, 1H, H-6'), 6.83 (d, J = 8.4 Hz, 1H, H-8), 6.81 (d, J = 9 Hz, 1H, H-6), 2.40 (s, 3H, CH₃)

HRMS calcd for C₁₆H₁₀O₃F (M-H)⁻: m/z : 269.0692, found: 269.0610

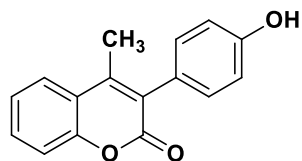
4-μεθυλο-5-υδροξυ-3-(4-φθοροφαινυλο)-2H-χρωμεν-2-όνη (**4f**):

Με βάση τη γενική μέθοδο σύνθεσης των υδροξυκουμαρινών, σε σφαιρική φιάλη προστίθενται 0.88 mmol (274.6 mg) 5-ακετυλοξυ-3-(4-φθοροφαινυλο)-4-μεθυλοκουμαρίνης, 13.2 mmol (630 μ L) μονοένυδρης υδραζίνης και 14.3 mL μεθανόλης. Παραλαμβάνεται υποκίτρινο στερεό.

Απόδοση: 82%, **Σ.Τ.:** >250 °C

¹H NMR (600 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 9.50 (br, 1H, OH), 7.16–7.12 (m, 3H, H-6, H-7, H-8), 7.00 (pseudotriplet, 2H, H-2', H-6'), 6.69 (d, J = 8.4 Hz, 1H, H-3'), 6.67 (dd, J = 8.4 Hz, J = 1.2 Hz, 1H, H-5'), 2.37 (s, 3H, CH₃), ¹³C NMR (75 MHz, DMSO-d₆): δ (ppm) 163.23, 159.99, 157.07, 153.77, 149.96, 132.53, 132.43, 131.81, 131.48, 123.85, 115.29, 115.01, 111.59, 109.15, 107.12, 21.38

HRMS calcd for C₁₆H₁₀O₃F (M-H)⁻: m/z : 269.0692, found: 269.0610.

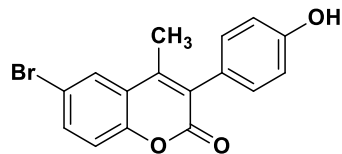
3-(4-υδροξυφαινυλο)-4-μεθυλο-2H-χρωμεν-2-όνη (**4h**):

Με βάση τη γενική μέθοδο σύνθεσης των υδροξυκουμαρινών, σε σφαιρική φιάλη προστίθενται 0.41 mmol (121.5 mg) 5-ακετυλοξυ-4-μεθυλο-3-(4-υδροξυφαινυλο)-κουμαρίνης, 6.15 mmol (290 μ L) μονοένυδρης υδραζίνης και 6.6 mL μεθανόλης. Παραλαμβάνεται λευκό στερεό.

Απόδοση: 72%, **Σ.Τ.:** 239-241 °C (**Σ.Τ** βιβλιογραφίας: 243-246 °C [45])

¹H NMR (600 MHz, DMSO-d₆): δ (ppm) 9.61 (s, 1H, OH), 7.81 (d, J = 7.8 Hz, 1H, H-5), 7.61 (t, J = 7.8 Hz, 1H, H-7), 7.40-7.37 (m, 2H, H-6, H-8), 7.12 (d, J = 7.8 Hz, 2H, H-2', H-6'), 6.83 (d, J = 8.4 Hz, 2H, H-3', H-5'), 2.28 (s, 3H, CH₃)

6-βρωμο-4-μεθυλο-3-(4-υδροξυφαινυλο)-2H-χρωμεν-2-όνη (**4i**):



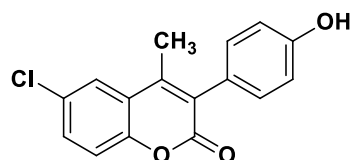
Με βάση τη γενική μέθοδο σύνθεσης των υδροξυκουμαρινών, σε σφαιρική φιάλη προστίθενται 0.96 mmol (359.5 mg) 3-(4-ακετυλοξυφαινυλο)-6-βρωμο-4-μεθυλο-κουμαρίνης, 14.45 mmol (689 μ L) μονοένυδρης υδραζίνης και 15.6 mL μεθανόλης. Παραλαμβάνεται

λευκό στερεό.

Απόδοση: 42%, **Σ.Τ.:** >250 °C

$^1\text{H NMR}$ (600 MHz, DMSO- d_6): δ (ppm) 9.64 (br, 1H, OH), 7.96 (s, 1H, H-5), 7.77 (d, J = 9 Hz, 1H, H-7), 7.38 (d, J = 9 Hz, 1H, H-8), 7.12 (d, J = 8.4 Hz, 2H, H-2', H-6'), 6.83 (d, J = 8.4 Hz, 2H, H-3', H-5'), 2.27 (s, 3H, CH₃)

4-μεθυλο-3-(4-υδροξυφαινυλο)-6-χλωρο-2H-χρωμεν-2-όνη (**4j**):



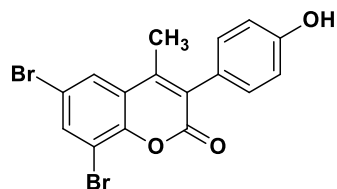
Με βάση τη γενική μέθοδο σύνθεσης των υδροξυκουμαρινών, σε σφαιρική φιάλη προστίθενται 0.85 mmol (280.7 mg) 3-(4-ακετυλοξυφαινυλο)-6-χλωρο-4-μεθυλο-κουμαρίνης, 33.56 mmol (1.6 mL) μονοένυδρης υδραζίνης και 18.9 mL μεθανόλης. Παραλαμβάνεται

λευκό στερεό.

Απόδοση: 46%, **Σ.Τ.:** >250 °C

$^1\text{H NMR}$ (600 MHz, DMSO- d_6): δ (ppm) 9.64 (br, 1H, OH), 7.85 (s, 1H, H-5), 7.65 (dd, J = 8.4 Hz, J = 2.4 Hz, 1H, H-7), 7.45 (d, J = 8.4 Hz, 1H, H-8), 7.12 (d, J = 8.4 Hz, 2H, H-2', H-6'), 6.83 (d, J = 8.4 Hz, 2H, H-3', H-5'), 2.28 (s, 3H, CH₃)

6,8-διβρωμο-4-μεθυλο-3-(4-υδροξυφαινυλο)-2H-χρωμεν-2-όνη (**4k**):



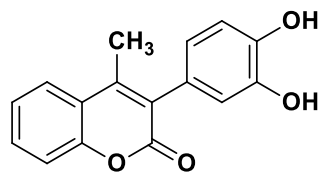
Με βάση τη γενική μέθοδο σύνθεσης των υδροξυκουμαρινών, σε σφαιρική φιάλη προστίθενται 0.79 mmol (355.5 mg) 3-(4-ακετυλοξυφαινυλο)-6,8-διβρωμο-4-μεθυλο-κουμαρίνης, 11.79 mmol (562 μ L) μονοένυδρης υδραζίνης και 12.8 mL μεθανόλης.

Παραλαμβάνεται κίτρινο στερεό.

Απόδοση: 93%, **Σ.Τ.:** >250 °C

$^1\text{H NMR}$ (600 MHz, DMSO- d_6): δ (ppm) 9.69 (s, 1H, OH), 8.15 (d, J = 1.8 Hz, 1H, H-7), 7.99 (d, J = 1.8 Hz, 1H, H-5), 7.13 (d, J = 9 Hz, 2H, H-2', H-6'), 6.85 (d, J = 8.4 Hz, 2H, H-3', H-5'), 2.28 (s, 3H, CH₃)

HRMS calcd for C₁₆H₉O₃Br₂ (M-H): m/z : 406.8997, found: 406.8920

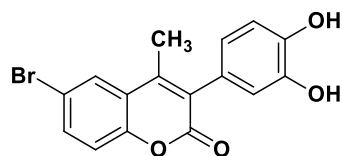
3-(3,4-δινδροξυφαινυλο)-4-μεθυλο-2H-χρωμεν-2-όνη (**4l**):

Με βάση τη γενική μέθοδο σύνθεσης των υδροξυκουμαρινών, σε σφαιρική φιάλη προστίθενται 0.42 mmol (149 mg) 3-(3,4-διακετυλοξυφαινυλο)-4-μεθυλοκουμαρίνης, 12.69 mmol (600 μ L) μονοένυδρης υδραζίνης και 6.9

mL μεθανόλης. Παραλαμβάνεται λευκό στερεό.

Απόδοση: 45%, **Σ.Τ.:** 237 °C (decomp.)

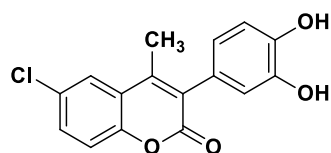
¹H NMR (600 MHz, DMSO-d₆): δ (ppm) 9.05 (br, 2H, OH), 7.82 (d, J = 8.4 Hz, 1H, H-5), 7.61 (t, J = 8.4 Hz, 1H, H-7), 7.35 (d, J = 8.4 Hz, 2H, H-6, H-8), 6.79 (d, J = 7.8 Hz, 1H, H-5'), 6.69 (d, J = 1.2 Hz, 1H, H-2'), 6.55 (dd, J = 8.4 Hz, J = 1.8 Hz, 1H, H-6'), 2.29 (s, 3H, CH₃)

6-βρωμο-3-(3,4-δινδροξυφαινυλο)-4-μεθυλο-2H-χρωμεν-2-όνη (**4m**):

Με βάση τη γενική μέθοδο σύνθεσης των υδροξυκουμαρινών, σε σφαιρική φιάλη προστίθενται 0.63 mmol (271.6 mg) 6-βρωμο-3-(3,4-διακετυλοξυφαινυλο)-4-μεθυλο-κουμαρίνης, 18.89 mmol (900 μ L) μονοένυδρης υδραζίνης και 10.2 mL μεθανόλης. Παραλαμβάνεται λευκό στερεό.

Απόδοση: 95%, **Σ.Τ.:** > 250 °C

¹H NMR (600 MHz, DMSO-d₆): δ (ppm) 9.07 (br, 2H, OH), 7.96 (s, 1H, H-5), 7.76 (dd, J = 8.4 Hz, J = 2.4 Hz, 1H, H-7), 7.38 (d, J = 9 Hz, 1H, H-8), 6.79 (d, J = 7.8 Hz, 1H, H-5'), 6.69 (s, 1H, H-2'), 6.55 (dd, J = 7.8 Hz, J = 1.8 Hz, 1H, H-6'), 2.28 (s, 3H, CH₃)

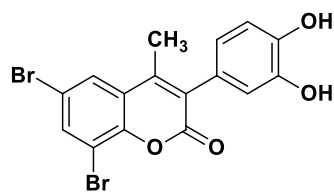
3-(3,4-δινδροξυφαινυλο)-4-μεθυλο-6-χλωρο-2H-χρωμεν-2-όνη (**4n**):

Με βάση τη γενική μέθοδο σύνθεσης των υδροξυκουμαρινών, σε σφαιρική φιάλη προστίθενται 0.60 mmol (233 mg) 3-(3,4-διακετυλοξυφαινυλο)-4-μεθυλο-6-χλωρο-κουμαρίνης, 18.06 mmol (860 μ L) μονοένυδρης υδραζίνης και 9.8 mL μεθανόλης. Παραλαμβάνεται λευκό στερεό.

Απόδοση: 50%, **Σ.Τ.:** > 250 °C

¹H NMR (600 MHz, DMSO-d₆): δ (ppm) 9.07 (br, 2H, OH), 7.84 (d, J = 2.4 Hz, 1H, H-5), 7.64 (dd, J = 8.4 Hz, J = 2.4 Hz, 1H, H-7), 7.44 (d, J = 9 Hz, 1H, H-8), 6.79 (d, J = 7.8 Hz, 1H, H-5'), 6.69 (s, 1H, H-2'), 6.55 (dd, J = 7.8 Hz, J = 1.8 Hz, 1H, H-6'), 2.28 (s, 3H, CH₃)

6,8-διβρωμο-3-(3,4-διυδροξυφαινυλο)-4-μεθυλο-2H-χρωμεν-2-όνη (**4o**):



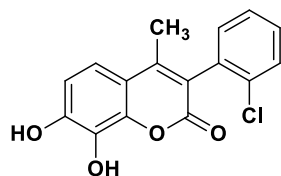
Με βάση τη γενική μέθοδο σύνθεσης των υδροξυκουμαρινών, σε σφαιρική φιάλη προστίθενται 0.59 mmol (300 mg) 3-(3,4-διακετυλοξυφαινυλο)-6,8-διβρωμο-4-μεθυλο-κουμαρίνης, 8.82 mmol (420 μ L) μονοένυδρης υδραζίνης και 9.5 mL μεθανόλης.

Παραλαμβάνεται κίτρινο στερεό.

Απόδοση: 65%, **Σ.Τ.:** 238 °C (decomp.)

$^1\text{H NMR}$ (600 MHz, DMSO- d_6): δ (ppm) 9.11 (br, 2H, OH), 8.13 (d, $J = 1.8$ Hz, 1H, H-7), 7.97 (d, $J = 1.8$ Hz, 1H, H-5), 6.80 (d, $J = 7.8$ Hz, 1H, H-5'), 6.70 (d, $J = 1.2$ Hz, 1H, H-2'), 6.56 (dd, $J = 8.4$ Hz, $J = 1.8$ Hz, 1H, H-6'), 2.27 (s, 3H, CH $_3$)

7,8-διυδροξυ-4-μεθυλο-3-(2-χλωροφαινυλο)-2H-χρωμεν-2-όνη (**10a**):



Σύμφωνα με τη γενική μέθοδο απακετυλίωσης κουμαρινών, σε μια σφαιρική φιάλη προστίθενται 0.65 mmol (250 mg) 7,8-διακετυλοξυ-3-(2-χλωροφαινυλο)-4-μεθυλο-κουμαρίνης, 9.75 mmol (464 μ L) μονοένυδρης υδραζίνης και 10.48 mL μεθανόλης. Παραλαμβάνεται

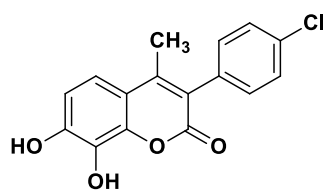
υποκίτρινο στερεό.

Απόδοση: 80%, **Σ.Τ.:** > 250 °C

$^1\text{H NMR}$ (600 MHz, DMSO- d_6): δ (ppm) 7.58 (d, $J = 8.4$ Hz, 1H, H-6'), 7.46-7.42 (m, 2H, H-4', H-5'), 7.37 (dd, $J = 7.2$ Hz, $J = 2.4$ Hz, 1H, H-3'), 7.18 (d, $J = 8.4$ Hz, 1H, H-5), 6.86 (d, $J = 9$ Hz, 1H, H-6), 2.10 (s, 3H, CH $_3$), $^{13}\text{C NMR}$ (75 MHz, DMSO- d_6): δ (ppm) 159.28, 150.32, 149.63, 142.69, 134.10, 133.54, 132.27, 132.22, 129.91, 129.27, 120.03, 116.18, 112.59, 112.50, 16.19

HRMS calcd for C $_{16}$ H $_{12}$ O $_4$ Cl (M+H) $^+$: m/z: 303.0346, found: 303.0414

7,8-διυδροξυ-4-μεθυλο-3-(4-χλωροφαινυλο)-2H-χρωμεν-2-όνη (**10b**):



Σύμφωνα με τη γενική μέθοδο απακετυλίωσης κουμαρινών, σε μια σφαιρική φιάλη προστίθενται 0.78 mmol (300 mg) 7,8-διακετυλοξυ-3-(4-χλωροφαινυλο)-4-μεθυλο-κουμαρίνης, 23.27 mmol (1.11 mL) μονοένυδρης υδραζίνης και 12.6 mL μεθανόλης. Παραλαμβάνεται

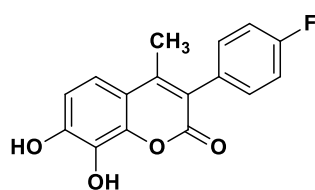
κίτρινο στερεό.

Απόδοση: 61%, **Σ.Τ.:** > 250 °C

$^1\text{H NMR}$ (600 MHz, DMSO- d_6): δ (ppm) 7.50 (d, $J = 8.4$ Hz, 2H, H-2', H-6'), 7.34 (d, $J = 7.8$ Hz, 2H, H-3', H-5'), 7.16 (d, $J = 7.8$ Hz, 1H, H-5), 6.83 (d, $J = 8.4$ Hz, 1H, H-6), 2.19 (s, 3H, CH $_3$)

HRMS calcd for C $_{16}$ H $_{12}$ O $_4$ Cl (M+H) $^+$: m/z: 303.0346, found: 303.0413

7,8-διυδροξυ-4-μεθυλο-3-(4-φθοροφαινυλο)-2H-χρωμεν-2-όνη (**10c**):

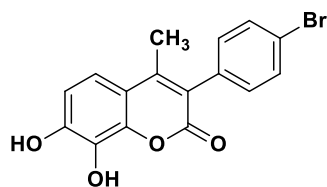


Σύμφωνα με τη γενική μέθοδο απακετυλίωσης κουμαρινών, σε μια σφαιρική φιάλη προστίθενται 0.49 mmol (180 mg) 7,8-διακετυλοξυ-3-(4-φθοροφαινυλο)-4-μεθυλο-κουμαρίνης, 14.58 mmol (0.70 mL) μονοένυδρης υδραζίνης και 7.88 mL μεθανόλης. Παραλαμβάνεται υποκίτρινο στερεό.

Απόδοση: 83%, **Σ.Τ.:** > 250 °C

¹H NMR (600 MHz, DMSO-d₆): δ (ppm) 7.35 (pseudotriplet, 2H, H-2', H-6'), 7.26 (pseudotriplet, 2H, H-3', H-5'), 7.17 (d, J = 8.4 Hz, 1H, H-5), 6.84 (d, J = 8.4 Hz, 1H, H-6), 2.19 (s, 3H, CH₃), ¹³C NMR (75 MHz, DMSO-d₆): δ (ppm) 163.18, 160.22, 159.94, 149.14, 149.01, 142.45, 132.57, 132.47, 132.03, 131.36, 131.32, 121.24, 116.07, 115.09, 114.80, 113.08, 112.34, 16.50

7,8-διυδροξυ-3-(4-βρωμοφαινυλο)-4-μεθυλο-2H-χρωμεν-2-όνη (**10d**):



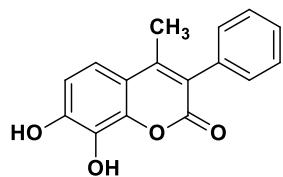
Σύμφωνα με τη γενική μέθοδο απακετυλίωσης κουμαρινών, σε μια σφαιρική φιάλη προστίθενται 0.70 mmol (300 mg) 7,8-διακετυλοξυ-3-(4-βρωμοφαινυλο)-4-μεθυλο-κουμαρίνης, 20.87 mmol (0.99 mL) μονοένυδρης υδραζίνης και 11.3 mL μεθανόλης. Παραλαμβάνεται

κίτρινο στερεό.

Απόδοση: 66%, **Σ.Τ.:** > 250 °C

¹H NMR (600 MHz, DMSO-d₆): δ (ppm) 7.59 (d, J = 7.8 Hz, 2H, H-3', H-5'), 7.23 (d, J = 7.2 Hz, 2H, H-2', H-6'), 6.96 (s, 1H, H-5), 6.53 (s, 1H, H-6), 2.14 (s, 3H, CH₃)

7,8-διυδροξυ-4-μεθυλο-3-φαινυλο-2H-χρωμεν-2-όνη (**10e**):

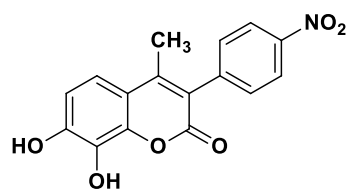


Σύμφωνα με τη γενική μέθοδο απακετυλίωσης κουμαρινών, σε μια σφαιρική φιάλη προστίθενται 0.65 mmol (230 mg) 7,8-διακετυλοξυ-3-φαινυλο-4-μεθυλο-κουμαρίνης, 19.58 mmol (0.93 mL) μονοένυδρης υδραζίνης και 10.6 mL μεθανόλης. Παραλαμβάνεται υποκίτρινο

στερεό.

Απόδοση: 87%, **Σ.Τ.:** > 250 °C (**Σ.Τ. βιβλιογραφίας:** 268 °C [89])

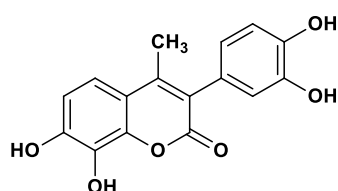
¹H NMR (600 MHz, DMSO-d₆): δ (ppm) 7.44 (t, J = 7.8 Hz, 2H, H-3', H-5'), 7.38 (t, J = 7.8 Hz, 1H, H-4'), 7.29 (d, J = 7.8 Hz, 2H, H-2', H-6'), 7.16 (d, J = 8.4 Hz, 1H, H-5), 6.84 (d, J = 9 Hz, 1H, H-6), 2.19 (s, 3H, CH₃)

7,8-διυδροξυ-4-μεθυλο-3-(4-νιτροφαινυλο)-2H-χρωμεν-2-όνη (**10f**):

Σύμφωνα με τη γενική μέθοδο απακετυλίωσης κουμαρινών, σε μια σφαιρική φιάλη προστίθενται 0.50 mmol (200 mg) 7,8-διακετυλοξυ-3-(4-νιτροφαινυλο)-4-μεθυλο-κουμαρίνης, 15.10 mmol (0.72 mL) μονοένυδρης υδραζίνης και 8.2 mL μεθανόλης. Παραλαμβάνεται υποκίτρινο στερεό.

Απόδοση: 95%, **Σ.Τ.:** > 250 °C

$^1\text{H NMR}$ (600 MHz, DMSO- d_6): δ (ppm) 8.30 (d, $J = 9$ Hz, 2H, H-3', H-5'), 7.63 (d, $J = 9$ Hz, 2H, H-2', H-6'), 7.22 (d, $J = 9$ Hz, 1H, H-5), 6.87 (d, $J = 9$ Hz, 1H, H-6), 2.22 (s, 3H, CH₃)

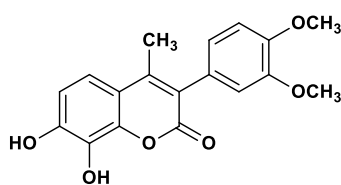
7,8-διυδροξυ-3-(3,4-διυδροξυφαινυλο)-4-μεθυλο-2H-χρωμεν-2-όνη (**10g**):

Σύμφωνα με τη γενική μέθοδο απακετυλίωσης κουμαρινών, σε μια σφαιρική φιάλη προστίθενται 0.75 mmol (350 mg) 7,8-διακετυλοξυ-3-(3,4-διακετυλοξυφαινυλο)-4-μεθυλο-κουμαρίνης, 44.83 mmol (2 mL) μονοένυδρης υδραζίνης και 12.1 mL μεθανόλης. Παραλαμβάνεται κίτρινο στερεό.

Απόδοση: 73%, **Σ.Τ.:** > 250 °C

$^1\text{H NMR}$ (600 MHz, DMSO- d_6): δ (ppm) 7.12 (d, $J = 8.4$ Hz, 1H, H-5), 6.82 (d, $J = 9$ Hz, 1H, H-6'), 6.77 (d, $J = 7.8$ Hz, 1H, H-5'), 6.65 (s, 1H, H-2'), 6.52 (d, $J = 8.4$ Hz, 1H, H-6), 2.20 (s, 3H, CH₃), $^{13}\text{C NMR}$ (75 MHz, DMSO- d_6): δ (ppm) 160.41, 148.80, 148.15, 144.95, 144.78, 142.34, 131.95, 125.88, 122.48, 121.51, 117.83, 115.95, 115.22, 113.35, 112.27, 16.60

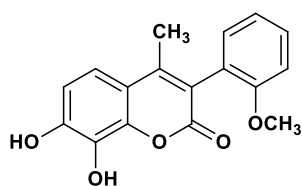
HRMS calcd for C₁₆H₁₃O₆ (M+H)⁺ : m/z: 301.0634, found: 301.0699

7,8-διυδροξυ-3-(3,4-διμεθοξυφαινυλο)-4-μεθυλο-2H-χρωμεν-2-όνη (**10h**):

Σύμφωνα με τη γενική μέθοδο απακετυλίωσης κουμαρινών, σε μια σφαιρική φιάλη προστίθενται 0.73 mmol (300 mg) 7,8-διακετυλοξυ-3-(3,4-διμεθοξυφαινυλο)-4-μεθυλο-κουμαρίνης, 21.82 mmol (1.04 mL) μονοένυδρης υδραζίνης και 11.8 mL μεθανόλης. Παραλαμβάνεται υποκίτρινο στερεό.

Απόδοση: 91%, **Σ.Τ.:** > 250 °C

$^1\text{H NMR}$ (600 MHz, DMSO- d_6): δ (ppm) 7.15 (d, $J = 9$ Hz, 1H, H-5), 7.00 (d, $J = 7.8$ Hz, 1H, H-6'), 6.88 (s, 1H, H-2'), 6.83 (d, $J = 9$ Hz, 1H, H-6), 6.81 (d, $J = 8.4$ Hz, 1H, H-5'), 3.80 (s, 3H, OCH₃), 3.74 (s, 3H, OCH₃), 2.21 (s, 3H, CH₃), $^{13}\text{C NMR}$ (75 MHz, DMSO- d_6): δ (ppm) 160.38, 148.93, 148.64, 148.27, 142.41, 132.00, 127.44, 122.80, 122.22, 115.99, 114.13, 113.27, 112.31, 111.36, 55.61, 55.53, 16.66

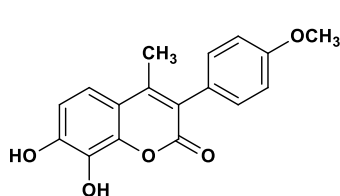
7,8-διυδροξυ-3-(2-μεθοξυφαινυλο)-4-μεθυλο-2H-χρωμεν-2-όνη (**10i**):

κίτρινο στερεό.

Σύμφωνα με τη γενική μέθοδο απακετυλίωσης κουμαρινών, σε μια σφαιρική φιάλη προστίθενται 0.52 mmol (200 mg) 7,8-διακετυλοξυ-3-(2-μεθοξυφαινυλο)-4-μεθυλο-κουμαρίνης, 15.69 mmol (0.75 mL) μονοένυδρης υδραζίνης και 8.5 mL μεθανόλης. Παραλαμβάνεται

Απόδοση: 56%, **Σ.Τ.:** > 250 °C

¹H NMR (600 MHz, DMSO-d₆): δ (ppm) 7.39 (t, *J* = 7.2 Hz, 1H, H-4'), 7.15 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H, H-6'), 7.14 (d, *J* = 9 Hz, 1H, H-3'), 7.10 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H, H-5), 7.01 (t, *J* = 7.2 Hz, 1H, H-5'), 6.83 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H, H-6), 3.72 (s, 3H, OCH₃), 2.09 (s, 3H, CH₃), ¹³C NMR (75 MHz, DMSO-d₆): δ (ppm) 159.71, 157.02, 149.40, 149.03, 142.54, 132.04, 131.43, 129.56, 123.79, 120.28, 119.33, 115.88, 113.03, 112.30, 111.30, 55.44, 16.30

7,8-διυδροξυ-3-(4-μεθοξυφαινυλο)-4-μεθυλο-2H-χρωμεν-2-όνη (**10j**):

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

Απόδοση: 84%, **Σ.Τ.:** > 250 °C

¹H NMR (600 MHz, DMSO-d₆): δ (ppm) 7.22 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H, H-2', H-6'), 7.14 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H, H-5), 6.99 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H, H-3', H-5'), 6.83 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H, H-6), 3.80 (s, 3H, OCH₃), 2.20 (s, 3H, CH₃), ¹³C NMR (75 MHz, DMSO-d₆): δ (ppm) 160.45, 158.64, 148.96, 142.37, 132.02, 131.67, 127.08, 121.91, 115.97, 113.48, 112.29, 55.14, 16.59

2.5.2 Αξιολόγηση της βιοδραστικότητας *in vitro* για τα κουμαρινικά ανάλογα της Σειράς A

2.5.2.1 Δοκιμή δέσμευσης της ρίζας ABTS^{•+}

Για την αξιολόγηση της αντιοξειδωτικής δράσης μέσω της μεθόδου ABTS, αρχικά παρασκευάζεται αιθανολικό διάλυμα ABTS (7 mM) με προσθήκη υπερθειϊκού νατρίου, το οποίο αποθηκεύεται στους 4-8 °C έως ότου η απορρόφησή του διαλύματος στα 734 nm λάβει τιμή 0.700 ± 0.010. Σε μία κυψελίδα τοποθετούνται 10-20 μL δείγματος (0.1 mM σε DMSO) και 990-980 μL διαλύματος ABTS και αφήνονται σε θερμοκρασία περιβάλλοντος για 6 min. Στη συνέχεια, μετράται η απορρόφηση στα 734 nm. Η (%)αναγωγή της ελεύθερης ρίζας υπολογίζεται από την Εξίσωση 2.1 όπου τα δείγματα αναφοράς (control) περιέχουν DMSO αντί για κουμαρινική ένωση. Ως πρότυπη ένωση χρησιμοποιήθηκε το ασκορβικό οξύ.

$$(\%) \text{ Αναγωγή} = \frac{Abs_{control} - Abs_{sample}}{Abs_{control}} \times 100 \quad (2.1)$$

2.5.2.2 Δοκιμή δέσμησης των ελευθέρων ριζών υδροξυλίου (HO•)

Κατά την παρούσα μέθοδο [23], 10 μL δείγματος (0.1 mM σε DMSO) προστίθενται σε διάλυμα που περιέχει αιθυλενοδιαμινοτετραοξικό οξύ (EDTA), τριχλωριούχο σίδηρο (FeCl_3), ασκορβικό οξύ και ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών αλάτων (pH 7.4) και επώάζονται στους 37 °C για 30 min. Στη συνέχεια, προστίθενται 1 mL αντιδραστήριου Nash και 250 μL διαλύματος τριχλωροξικού οξέος (CCl_3COOH) και έπειτα από 10 min επώαση στους 60 °C, μετράται η απορρόφηση στα 734 nm. Το δείγμα αναφοράς (control) περιείχε μόνο DMSO αντί για κουμαρινική ένωση, ενώ ως πρότυπο χρησιμοποιήθηκε το Trolox. Η %δέσμηση της των ελευθέρων ριζών υδροξυλίου (HO•) υπολογίζεται από την ακόλουθη Εξίσωση (2.2):

$$(\%) \text{ Δέσμηση} = \frac{Abs_{sample} - Abs_{control}}{Abs_{control}} \quad (2.2)$$

2.5.2.3 Δοκιμή αναστολής της οξειδωσης του λινολεϊκού οξέους μέσω του εκκινητή ελευθέρων ριζών AAPH

Σε μια κυψελίδα χαλαζία τοποθετούνται 10 μL δείγματος (0.1 mM σε DMSO), 10 μL λινολεϊκού οξέος (LA) (16 mM) και 50 μL του εκκινητή ελευθέρων ριζών AAPH (40 mM) καθώς και ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών αλάτων (pH 7.4) έως τον όγκο του 1 mL. Το δείγμα αναφοράς περιείχε μόνο DMSO αντί για κουμαρινική ένωση και η απορρόφηση μετρήθηκε μετά από 2 min στους 37 °C και στα 234 nm. Η % αναστολή της λιπιδικής υπεροξειδωσης υπολογίστηκε από την Εξίσωση (2.3):

$$(\%) \text{ Αναστολή} = \frac{(Abs_{control} - Abs_{blank}) - (Abs_{sample} - Abs_{blank})}{(Abs_{control} - Abs_{blank})} \times 100 \quad (2.3)$$

2.5.2.4 Δοκιμή DCF-DA

Κατά το πρωτόκολλο αυτό, παρασκευάζεται διάλυμα 2',7'-διχλωροφλουορεσκεΐνης διοξικής (DCF-DA) συγκέντρωσης 20 mM σε DMSO και αποθηκεύεται στους -20 °C απουσία φωτός. Σε κάθε πηγάδι ενός πλακιδίου 96 θέσεων επιστρώνονται 3×10^4 κύτταρα. Έπειτα από 24 h επώασης (37 °C, 5% CO_2), προστίθεται κατάλληλη ποσότητα υπεροξειδίου του υδρογόνου (H_2O_2) συγκέντρωσης 2mM και τα κύτταρα επώάζονται για 2 h. Στη συνέχεια, προστίθενται οι εξεταζόμενες ενώσεις (100 μM) και ακολουθεί επώαση για 24 h. Ακολουθεί ξέπλυμα με διάλυμα ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών αλάτων (PBS) και προσθήκη του διαλύματος DCF-DA με στόχο την επίτευξη τελικής συγκέντρωσης 10 μM σε 200 μL θρεπτικού υλικού ανά πηγάδι, ενώ τα κύτταρα επώάζονται για ακόμη 40 min. Τέλος, πραγματοποιείται αφαίρεση του διαλύματος και προσθήκη θρεπτικού υλικού χωρίς ορό εμβρύου μόσχου (FBS), ενώ καταγράφεται το φάσμα φθορισμού για συνθήκες διέγερσης/εκπομπής 495/530 nm, αντίστοιχα. Το δείγμα αναφοράς (control) δεν περιείχε κουμαρινική ένωση, ενώ το blank δείγμα δεν περιείχε κύτταρα. Ένωση αναφοράς αποτέλεσε το ασκορβικό οξύ. Η ικανότητα παραγωγής ελευθέρων ριζών υπολογίστηκε από την ακόλουθη Εξίσωση (2.4):

$$(\%) \text{Παραγωγή ROS} = \frac{(Emission_{sample} - Emission_{blank}) - (Emission_{control} - Emission_{blank})}{(Emission_{control} - Emission_{blank})} \times 100 \quad (2.4)$$

2.5.2.5 Δοκιμή αναστολής της δράσης του ενζύμου λιποξυγονάσης από σόγια (LOX)

Για τον προσδιορισμό της ικανότητας των εξεταζόμενων ενώσεων να αναστέλλουν τη δράση της λιποξυγονάσης από σόγια, εφαρμόζεται η ακόλουθη μέθοδος. Σε μία κυψελίδα χαλαζία τοποθετούνται 10 μL του εξεταζόμενου δείγματος (0.1 mM σε DMSO), 200 μL διαλύματος LOX και 100 μL διαλύματος λινελαϊκού οξέος, ενώ συμπληρώνεται φωσφορικό διάλυμα τρισαμινομεθανίου (tris), pH 9, έως τον όγκο του 1 mL. Το δείγμα αναφοράς (control) περιείχε DMSO αντί για κουμαρινική ένωση. Η απορρόφηση μετρήθηκε στα 234 nm και η % ικανότητα αναστολής της δράσης της LOX υπολογίστηκε από την ακόλουθη Εξίσωση (2.5). Αξίζει να σημειωθεί ότι υπήρχαν blank μετρήσεις για κάθε δείγμα, οι οποίες δεν περιείχαν λινολεϊκό οξύ.

$$(\%) \text{Αναστολή} = \frac{(Abs_{control} - Abs_{blank}) - (Abs_{sample} - Abs_{blank})}{(Abs_{control} - Abs_{blank})} \times 100 \quad (2.5)$$

2.5.2.6 Δοκιμές κυτταρικής βιωσιμότητας

Σε κάθε πηγάδι ενός πλακιδίου 96 θέσεων επιστρώνονται 30×10^4 κύτταρα HaCaT, A549 και A375 και επωάζονται (37 °C, 5% CO₂) για 24 h. Στη συνέχεια, πραγματοποιείται προσθήκη των κουμαρινικών αναλόγων (100 μM) και ακολουθεί επώαση για άλλες 24 h. Μετά το πέρας αυτού του διαστήματος, προστίθεται κατάλληλη ποσότητα διαλύματος MTT και το πλακίδιο επανατοποθετείται στον επωαστήρα για 4 h προκειμένου να σχηματιστούν οι κρύσταλλοι φορμαζάνης. Οι κρύσταλλοι διαλυτοποιούνται στη συνέχεια με την προσθήκη DMSO (100 μL) και υπό ήπια ανάδευση για 40 min. Η απορρόφηση μετράται στα 540 nm με απορρόφηση αναφοράς στα 720 nm. Ως πρότυπη ένωση χρησιμοποιήθηκε η σιλιμπινίνη (100 μM). Τα δείγματα αναφοράς περιείχαν DMSO αντί για κουμαρινική ένωση, ενώ τα blank δείγματα δεν περιείχαν κύτταρα.

Τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν σε συνεργασία με το Εργαστήριο Υγιεινής και Προστασίας Περιβάλλοντος του τμήματος Ιατρικής του Δημοκρίτειου Πανεπιστημίου Θράκης, από τον Επίκουρο Καθηγητή Χρήστο Κοντογιώργη και τους συνεργάτες του.

2.5.2.7 Μελέτη μοριακής μοντελοποίησης στη λιποξυγονάση από σόγια

Για τις μελέτες μοριακής μοντελοποίησης, χρησιμοποιήθηκε η κρυσταλλική δομή της λιποξυγονάσης από σόγια με PDB code 3PZW, η οποία απεικονίστηκε μέσω του προγράμματος UCSF Chimera. Για την κατάλληλη προετοιμασία της πρωτεΐνης πραγματοποιείται αφαίρεση των μορίων νερού και προσθήκη των υπολειμμάτων που λείπουν με το Modeller, ενώ ακολουθεί προσθήκη ατόμων υδρογόνου και AMBER99SB-ILDN φορτίων, ενώ το φορτίο του σιδήρου επιλέγεται ως +2.0, χωρίς να τεθεί κάποιος περιορισμός στο άτομο του σιδήρου και στους συνδέτες.

Το λογισμικό OpenBabel χρησιμοποιήθηκε για να δημιουργήσει και να ελαχιστοποιήσει την τρισδιάστατη δομή των προσδετών χρησιμοποιώντας το

πεδίο δύναμης MMFF94, ενώ το λογισμικό ACPYPE (AnteChamberPYthon Parser interfacE) χρησιμοποιήθηκε για να δημιουργήσει τις τοπολογίες και τις παραμέτρους των συνδετών μέσω του Antechamber. Οι ελαχιστοποιήσεις των δυνάμεων επιτεύχθηκαν χρησιμοποιώντας το πεδίο δυνάμεων AMBER99SB-ILDN με το GROMACS 4.6 ως το πακέτο εργαλείων της προσομοίωσης της μοριακής πρόσδεσης. Οι μελέτες πρόσδεσης πραγματοποιήθηκαν με το πρόγραμμα AutoDockVina (1.1.2), χρησιμοποιώντας ένα grid box μεγέθους 100Å, 70 Å, 70 Å στις διαστάσεις X, Y, Z της SLOX-1. Το πρόγραμμα UCSF-Chimera εφαρμόστηκε για τη δημιουργία των κατάλληλων αρχείων για τη μελέτη της πρόσδεσης καθώς και την ανάλυση των αποτελεσμάτων. Η πρόσδεση πραγματοποιήθηκε θέτοντας ως μέγιστο όριο 20 πιθανούς τρόπους σύνδεσης της SLOX-1.

Οι μελέτες μοριακής πρόσδεσης πραγματοποιήθηκαν σε συνεργασία με το Εργαστήριο Φαρμακευτικής Χημείας του Τμήματος Φαρμακευτικής του Αριστοτελείου Πανεπιστημίου Θεσσαλονίκης και την Επίκουρη Καθηγήτρια Ελένη Ποντίκη.

2.5.2.8 Χρωματογραφική μελέτη IAM και HSA

Οι φυσικοχημικές και βιομιμητικές ιδιότητες των εξεταζόμενων ενώσεων μελετήθηκαν χρησιμοποιώντας Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Απόδοσης στα 220-230 nm. Χρησιμοποιήθηκαν δύο είδη στηλών χρωματογραφίας:

- 1) ακινητοποιημένων τεχνητών μεμβρανών (IAM, immobilized artificial membrane), REGISIAM.PC.DD.2, Regis Technologies
- 2) ακινητοποιημένης λευκωματίνης του ορού (HSA, human serum albumin), CHIRAL PAK

Για την παρούσα μελέτη εξετάστηκαν τα κουμαρινικά ανάλογα της Σειράς A, ουδέτερα ή ελαφρώς όξινα. Οι χρόνοι έκλουσης στη χρωματογραφική στήλη ακινητοποιημένων μεμβρανών (IAM) υπολογίστηκαν σε pH 7.40. Η κινητή φάση αποτελούταν από ακετονιτρίλιο (CH₃CN) σε διαφορετικές συγκεντρώσεις (10%, 15%, 20%, 25%, 30%) και ρυθμό ροής 3 mL/min. Οι χρόνοι έκλουσης (t_r) κάθε κουμαρινικού παραγώγου μετρήθηκαν τρεις φορές και οδήγησαν στην εκτίμηση του παράγοντα κατακράτησης (logk) μέσω της ακόλουθης Εξίσωσης (2.6):

$$\log k = \log \left(\frac{t_r - t_0}{t_0} \right) \quad (2.6)$$

όπου t₀ νεκρός χρόνος- χρόνος έκλουσης μη κατακρατούμενης ουσίας (κιτρικό νάτριο).

Ως αποτέλεσμα, προέκυψε μια τιμή παράγοντα κατακράτησης logk για κάθε συκέντρωση CH₃CN, ενώ από το διάγραμμα του παράγοντα κατακράτησης σε συνάρτηση με τις συγκεντρώσεις ακετονιτρίλιου υπολογίστηκε η τιμή logK_w για συκέντρωση ακετονιτρίλιου 0% για κάθε κουμαρινικό παράγωγο. Στη συνέχεια, εκτιμήθηκαν ο συντελεστής λιποφιλίας (logP) καθώς και τα κλάσματα θετικά (F⁺) και αρνητικά (F⁻) φορτισμένων ειδών μέσω της χρήσης του λογισμικού ADME Boxes version 3.0 (PharmaAlgorithms).

Οι εκτιμώμενες τιμές (%) απορρόφησης από το στόμα υπολογίζονται από την Εξίσωση (2.7).

$$(\%) \text{ HOA} = \frac{100}{1+10^{-(2.17+0.88 \cdot \log Kw - 0.006 \cdot MW - 0.83 \cdot A - 0.53 \cdot F^{*+} + 1.18 \cdot F^{*-})}} \quad (2.7)$$

όπου MW το μοριακό βάρος της εκάστοτε ένωσης

Για τη στήλη ακινητοποιημένης λευκωματίνης του ορού (HSA), οι χρόνοι έκλουσης υπολογίστηκαν σε pH 7.00, ενώ ως κινητή φάση επιλέχθηκε ακετονιτρίλιο 10% και ρυθμός ροής 1 mL/min.

Οι εκτιμώμενες τιμές (%) της πρόσδεσης στις πρωτεΐνες του πλάσματος (% PPB, Plasma Protein Binding) υπολογίστηκαν χρησιμοποιώντας την Εξίσωση (2.8).

$$(\%) \text{ PPB} = 101 * \frac{10^{\log k_{10}}}{1+10^{\log k_{10}}} \quad (2.8)$$

όπου $\log k_{10}$ ο παράγοντας κατακράτησης για συγκέντρωση ακετονιτρίλιου 10%

Τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν σε συνεργασία με το Εργαστήριο Ανόργανης και Αναλυτικής Χημείας της σχολής Χημικών Μηχανικών του Εθνικού Μετσόβιου Πολυτεχνείου και τον Επίκουρο Καθηγητή Φώτιο Τσόπελα και τους συνεργάτες του.

2.5.3 Αξιολόγηση της βιοδραστικότητας *in vitro* για τα κουμαρινικά ανάλογα της Σειράς B

2.5.3.1 Δοκιμή δέσμευσης της ελεύθερης ρίζας DPPH

Η πειραματική διαδικασία περιλαμβάνει, αρχικά, την παρασκευή διαλύματος DPPH 0.0025% (w/v) σε αιθανόλη, το οποίο αφήνεται υπό μαγνητική ανάδευση για 20 min, απουσία φωτός. Έπειτα, σε κάθε θέση ενός πλακιδίου 96 θέσεων (96 well plate), προστίθενται 195 μ L αιθανολικού διαλύματος DPPH και 5 μ L από κάθε ένα από τα δείγματα προς εξέταση. Παράλληλα, παρασκευάζονται δείγματα αναφοράς (control), τα οποία περιέχουν 195 μ L DPPH και 5 μ L διμεθυλοσουλφοξειδίου (DMSO). Το plate αναδεύεται ελαφρώς και αφήνεται σε σκοτάδι για 30 min και 60 min. Τέλος, με τη βοήθεια του reader (Epoch 2 Microplate Reader της εταιρείας Bio Tek Instruments) μετράται η απορρόφηση στα 515 nm, και εξετάζεται ως προς την απορρόφηση των control. Ως ένωση αναφοράς χρησιμοποιήθηκε το Trolox.

2.5.3.2 Δοκιμή αναστολής της οξειδωσης του λινολεϊκού οξέους μέσω του εκκινητή ελευθέρων ριζών AAPH

Αρχικά, σε κυψελίδα χαλαζία προστίθενται 0.93 mL ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών αλάτων συγκέντρωσης 0.05 M με pH 7.4, μαζί με 10 μ L άλατος νατρίου λινελαϊκού οξέος (16 mM). Στη συνέχεια, προστίθενται 50 μ L διαλύματος AAPH (40 mM) και ξεκινάει η παρακολούθηση του ρυθμού οξειδωσης στα 234 nm

και στους 37 °C. Ως ένωση αναφοράς χρησιμοποιήθηκε το Trolox. Τα δείγματα αναφοράς περιείχαν DMSO αντί για κουμαρινική ένωση.

2.5.3.3 Δοκιμή αναστολής της δράσης του ενζύμου λιποξυγονάσης από σόγια (LOX)

Για τον έλεγχο της αναστολής της λιποξυγονάσης από σόγια προστίθενται 0.1 mL λινελαϊκό νάτριο και 0.2 mL ενζυμικό διάλυμα ($1/9 \times 10^{-4}$ w/v σε φυσιολογικό ορό) σε ρυθμιστικό διάλυμα Tris pH 9.0 σε μία κυψελίδα χαλαζία. Η μετατροπή του λινελαϊκού νατρίου σε 13-υδροϋπεροξυλινελαϊκό οξύ στα 234 nm παρουσία της εξεταζόμενης ένωσης καταγράφεται και συγκρίνεται με αυτή που προκαλείται από την ένωση αναφοράς, Νορδιδρογουαϊαρετικό οξύ (NDGA). Για τις ενώσεις για τις οποίες η προκαλούμενη αναστολή ήταν $\geq 50\%$ στα 100 μM προσδιορίστηκε και η τιμή IC_{50} σε μM (χρησιμοποιήθηκαν διαλύματα 5-100 μM).

Τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν σε συνεργασία με το Εργαστήριο Φαρμακευτικής Χημείας του Τμήματος Φαρμακευτικής του Αριστοτελείου Πανεπιστημίου Θεσσαλονίκης, από την Καθηγήτρια Δήμητρα Χατζηπαύλου-Λίτινα και τους συνεργάτες της.

2.5.3.4 Δοκιμή κυτταροτοξικότητας έναντι της καρκινικής σειράς A431

Για τη μελέτη της κυτταροτοξικότητας, αρχικά επιστρώνονται 1×10^4 κύτταρα A431 σε κάθε πηγάδι ενός πλακιδίου 96 θέσεων και επωάζονται (37 °C, 5% CO_2) για 24 h. Στη συνέχεια, πραγματοποιείται αφαίρεση του θρεπτικού υλικού και προσθήκη των κουμαρινικών αναλόγων (0.5% DMSO) και ακολουθεί επώαση για άλλες 24 h. Μετά το πέρας αυτού του διαστήματος, αφαιρείται το θρεπτικό υλικό που περιέχει τις εξεταζόμενες ενώσεις και προστίθεται φρέσκο θρεπτικό υλικό. Έπειτα από επώαση για 24 h, προστίθεται κατάλληλη ποσότητα διαλύματος MTT (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) (0.65 mg/mL) και το πλακίδιο επανατοποθετείται στον επωαστήρα για 3 h προκειμένου να σχηματιστούν οι κρύσταλλοι φορμαζάνης. Οι κρύσταλλοι διαλυτοποιούνται στη συνέχεια με την προσθήκη DMSO (200 μL) και η απορρόφηση μετράται στα 570 nm. Τα δείγματα αναφοράς περιείχαν DMSO αντί για κουμαρινική ένωση και η βιωσιμότητα των κυττάρων υπολογίστηκε από την ακόλουθη Εξίσωση (2.9).

$$(\%) \text{ Βιωσιμότητα} = \frac{\text{Abs}_{\text{sample}}}{\text{Abs}_{\text{control}}} \times 100 \quad (2.9)$$

Τα καρκινικά κύτταρα A431 καλλιιεργήθηκαν σε θρεπτικό υλικό Dulbecco's Modified Eagle Medium high glucose, no glutamine (DMEM), εμπλουτισμένο με 10% ορό εμβρύου βοός (FBS) και αντιβιοτικά. Οι κυτταρικές σειρές διατηρήθηκαν σε τυπικές συνθήκες καλλιέργειας (37 °C και 5% CO_2). Η απορρόφηση στα 570 nm μετρήθηκε με τη συσκευή plate reader Epoch 2 Microplate Reader της εταιρείας Bio Tek Instruments.

Τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν σε συνεργασία με το Εργαστήριο Βιοϊατρικής Οπτικής και Εφαρμοσμένης Βιοφυσικής της Σχολής Ηλεκτρολόγων Μηχανικών και Μηχανικών Υπολογιστών του Εθνικού Μετσόβιου Πολυτεχνείου και την Δρ. Ελένη Αλεξανδράτου.

2.5.3.5 Δοκιμή πρόσδεσης στο ctDNA

Για τη μελέτη αλληλεπίδρασης των κουμαρινικών αναλόγων με το ctDNA, αρχικά παρασκευάστηκε διάλυμα ctDNA (10mM) σε ρυθμιστικό διάλυμα Tris-HCl (10 mM, pH 7.4) και αφέθηκε προς ανάδευση στους 4 °C για 24 h. Στη συνέχεια, μετρήθηκε ο λόγος της απορρόφησης A260nm/A280nm και βρέθηκε μεταξύ 1.8-1.9 το οποίο υποδεικνύει ότι το DNA είναι απαλλαγμένο από πρωτεΐνες. Στη συνέχεια, 1 μL από τις εξεταζόμενες ενώσεις (10 mM σε DMSO) προστέθηκε σε 999 μL ctDNA (0-100 μM) και επωάστηκαν στους 37 °C για 5 min. Τα φάσματα απορρόφησης λήφθηκαν στο εύρος 230-500 nm.

Για τον προσδιορισμό της σταθεράς σύνδεσης της ένωσης με το ctDNA (K_b) χρησιμοποιείται η εξίσωση Benesi-Hildebrand (2.10):

$$\frac{1}{A-A_0} = \frac{1}{A_c-A_0} + \frac{1}{(A_c-A_0) \times K_b \times [DNA]} \quad (2.10)$$

όπου K_b: η σταθερά ισχύος σύνδεσης της ένωσης με το DNA,

A₀: η απορρόφηση του ctDNA απουσία ένωσης,

A: η απορρόφηση του ctDNA παρουσία ένωσης,

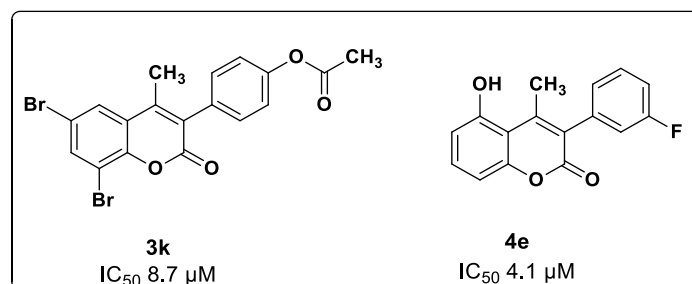
A_c: η απορρόφηση κορεσμού.

2.6 ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Σαράντα πέντε νέα 3-αρυλο-κουμαρινικά παράγωγα συντέθηκαν σε ικανοποιητικές έως υψηλές αποδόσεις (35-95%) και υψηλή καθαρότητα και χαρακτηρίστηκαν μέσω φασματοσκοπίας ^1H και ^{13}C NMR, καθώς και φασματομετρίας HR-MS. Τα παράγωγα κατηγοριοποιήθηκαν σε δύο σειρές: η Σειρά A διαθέτει ακετυλοξυ- ή υδροξυ- υποκαταστάτες είτε στη θέση 5 του κουμαρινικού σκελετού είτε στο φαινολικό δακτύλιο της θέσης 3, ενώ η Σειρά B διαθέτει 7,8 διακετυλοξυ- ή διυδροξυ- υποκατατάσταση.

Τα μόρια της Σειράς A αξιολογήθηκαν για την αντιοξειδωτική τους δράση μέσω τεσσάρων διαφορετικών δοκιμών, για την ικανότητά τους να αναστέλλουν τη δράση της λιποξυγονάσης από σόγια ως ένδειξη αντιφλεγμονώδους δράσης καθώς και για την επίδρασή τους στη βιωσιμότητα τόσο καρκινικών όσο και υγιών ανθρώπινων κυτταρικών σειρών. Όσον αφορά τη δοκιμή δέσμησης της ρίζας ABTS*⁺ είναι αξιοσημείωτο ότι η υποκατάσταση με υδροξυλομάδα στη θέση 4' του 3-φαινολικού δακτυλίου (**4h-4k**) έναντι της θέσης 5 του κουμαρινικού σκελετού (**4a-4f**), οδηγεί σε μερική ή και ολική απώλεια της αντιοξειδωτικής δράσης, υποδεικνύοντας τη σημασία της παρουσίας της υδροξυλομάδας στη συγκεκριμένη θέση.

Ικανότερους αναστολείς της δράσης της λιποξυγονάσης αποτέλεσαν τα μόρια **3k** (IC_{50} 8.7 μM) και **4e** (IC_{50} 4.1 μM), για τα οποία πραγματοποιήθηκαν και *in silico* δοκιμές μοριακής πρόσδεσης, οι οποίες υπέδειξαν αλλοστερική δέσμηση με το ένζυμο (Σχήμα 2.25).



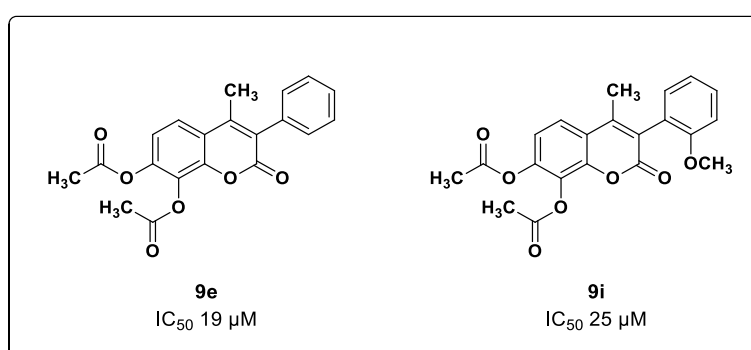
Σχήμα 2.25 Ικανότεροι αναστολείς της λιποξυγονάσης από τη Σειρά A.

Η μελέτη της κυτταροτοξικότητας στην καρκινική σειρά A375, υπέδειξε τη σημασία του ακετυλοξυ- δομικού χαρακτηριστικού στην ενίσχυση της δράσης, ενώ υψηλότερη κυτταροτοξικότητα έναντι της σειράς A549, επέδειξαν τα φθορο υποκατεστημένα παράγωγα **4d** (75.7%) και **4f** (62.5%). Είναι εξίσου σημαντικό ότι η πλειοψηφία των κουμαρινικών αναλόγων δε μείωσε σημαντικά τη βιωσιμότητα των υγιών κερατινοκυττάρων HaCaT.

Τέλος, μέσω ανάλυσης βιομιμητικής χρωματογραφίας εκτιμήθηκε η απορρόφησή από το στόμα και η σύνδεση με τις πρωτεΐνες του πλάσματος, απ' όπου προέκυψε ότι οι εξεταζόμενες ενώσεις παρουσίασαν υψηλά ποσοστά απορρόφησης και επομένως μπορούν να θεωρηθούν κατάλληλες για φαρμακευτικά σκευάσματα

που προορίζονται για χορήγηση εκ του στόματος, καθώς και αρκετά υψηλά ποσοστά πρωτεϊνικής σύνδεσης.

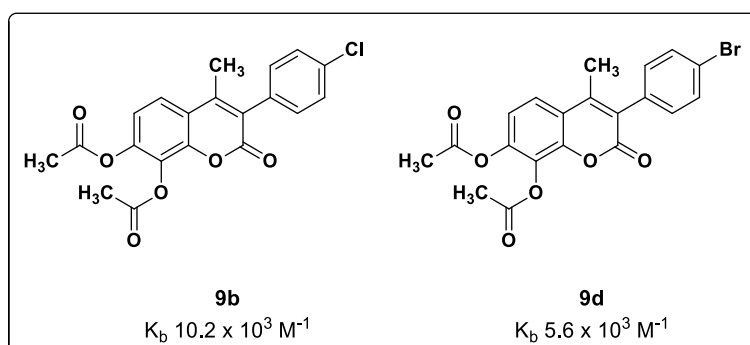
Τα μόρια της Σειράς Β αξιολογήθηκαν για την αντιοξειδωτική τους δράση μέσω των δοκιμών δέσμησης της ελεύθερης ρίζας DPPH και αναστολής της λιπιδικής υπεροξειδωσης, για την ικανότητά τους να αναστέλλουν τη δράση της λιποξυγονάσης από σόγια, για την κυτταροτοξικότητά τους έναντι της καρκινικής σειράς A431 καθώς και για την ικανότητα πρόσδεσής τους στο ctDNA. Όλα τα 7,8-διυδροξυ κουμαρινικά ανάλογα παρουσίασαν ισχυρή ικανότητα δέσμησης της ελεύθερης ρίζας DPPH (>82%), ενώ τα διακετυλοξυ παράγωγα επέδειξαν υψηλότερες τιμές αναστολής της λιπιδικής υπεροξειδωσης (41.1-95.3%). Επιπλέον, τα διακετυλοξυ-παράγωγα **9e** (IC₅₀ 19 μM) και **9i** (IC₅₀ 25 μM) αποτέλεσαν τους ισχυρότερους αναστολείς της λιποξυγονάσης (Σχήμα 2.26).



Σχήμα 2.26 Ικανότεροι αναστολείς της λιποξυγονάσης από τη Σειρά Β.

Όσον αφορά τις μελέτες κυτταροτοξικότητας, παρατηρήθηκε ότι τα διακετυλοξυ-παράγωγα επέδειξαν ισχυρότερη δράση από τα διυδροξυ-παράγωγα και μάλιστα το ανάλογο **9d** που φέρει ομάδα βρωμίου στο φαινολικό δακτύλιο της θέσης 3 του κουμαρινικού σκελετού επέφερε τη μεγαλύτερη μείωση στη βιωσιμότητα των καρκινικών κυττάρων (61.2%). Είναι αξιοσημείωτο ότι η παρατήρηση αυτή είναι σύμφωνη με τα αποτελέσματα προηγούμενης ερευνητικής προσπάθειας του εργαστηρίου Οργανικής Χημείας ΕΜΠ [61], όπου παρατηρήθηκε η επίδραση της συνδυαστικής παρουσίας ακετυλοξυ-ομάδας στον κουμαρινικό σκελετό με ομάδα βρωμίου στον φαινολικό δακτύλιο της θέσης 3 στην κυτταροτοξική δράση και οδήγησαν στο σχεδιασμό της Σειράς Β.

Ακόμη, μελετήθηκε η ικανότητα πρόσδεσης των ενώσεων που επέδειξαν ισχυρότερη κυτταροτοξικότητα έναντι της καρκινικής σειράς A431 στο ctDNA και βρέθηκε ότι τα παράγωγα **9b** και **9d** που παρουσίασαν ισχυρότερη κυτταροτοξική δράση στη συγκέντρωση των 100 μM εμφάνισαν και την υψηλότερη τιμή σταθεράς σύνδεσης με το ctDNA ($10.2 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$ και $5.6 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$, αντίστοιχα) προκαλώντας την αποσταθεροποίησή του (Σχήμα 2.27).



Σχήμα 2.27 Χημική δομή κουμαρινικών αναλόγων **9b** και **9d**, τα οποία παρουσίασαν τις υψηλότερες τιμές σταθεράς σύνδεσης με το ctDNA.

Τέλος, εκτιμήθηκαν ορισμένες φαρμακολογικές ιδιότητες των νέων κουμαρινικών αναλόγων της Σειράς Β, σύμφωνα με τις οποίες όλα τα παράγωγα κρίνονται κατάλληλα για χορήγηση από το στόμα με βάση τον κανόνα του Lipinski, ενώ σύμφωνα με το συμπληρωματικό κανόνα του Veber, τα διακετυλοξυ παράγωγα ενδεχομένως να παρουσιάζουν μειωμένη καταλληλότητα, καθώς παραβιάζουν το κριτήριο της τοπολογικής επιφάνειας ($> 140 \text{ \AA}^2$).

Συνολικά, οι ενώσεις που παρουσίασαν συνδυασμένη βιολογική δράση και μπορούν να αποτελέσουν μόρια οδηγούς για το σχεδιασμό νέων κουμαρινικών αναλόγων είναι τα ακετυλοξυ παράγωγα **3e** και **9b**, που παρουσιάζονται στον Πίνακα 2.13.

Πίνακας 2.13 Βιολογική δράση κουμαρινικών αναλόγων **3e** και **9b**.

Δομή:	 3e	 9b
Αναστολή της LOX (IC ₅₀):	11.4 μM	100 μM
Αντιοξειδωτική δράση:	Δέσμευση ·OH (100 μM): 85.2%	Αναστολή της λιπιδικής υπεροξειδωσης (100 μM): 95.3%
Κυτταροτοξικότητα έναντι των σειρών:	A375 (100 μM): 60.7%	A431 (100 μM): 45.9%
Σταθερά σύνδεσης με το ctDNA:	-	$K_b = 10.2 \cdot 10^3 M^{-1}$

2.7 ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- [1] S. Prasad, S. Gupta, A. Tyagi, Reactive oxygen species (ROS) and cancer: Role of antioxidative nutraceuticals, *Cancer Lett.* 387 (2017) 95–105. <https://doi.org/10.1016/J.CANLET.2016.03.042>.
- [2] M. Sharifi-Rad, N. V. Anil Kumar, P. Zucca, E.M. Varoni, L. Dini, E. Panzarini, J. Rajkovic, P.V. Tsouh Fokou, E. Azzini, I. Peluso, A. Prakash Mishra, M. Nigam, Y. El Rayess, M. El Beyrouthy, L. Polito, M. Iriti, N. Martins, M. Martorell, A.O. Docea, W.N. Setzer, D. Calina, W.C. Cho, J. Sharifi-Rad, Lifestyle, Oxidative Stress, and Antioxidants: Back and Forth in the Pathophysiology of Chronic Diseases, *Front. Physiol.* 0 (2020) 694. <https://doi.org/10.3389/FPHYS.2020.00694>.
- [3] G. Pizzino, N. Irrera, M. Cucinotta, G. Pallio, F. Mannino, V. Arcoraci, F. Squadrito, D. Altavilla, A. Bitto, Oxidative Stress: Harms and Benefits for Human Health, *Oxid. Med. Cell. Longev.* 2017 (2017). <https://doi.org/10.1155/2017/8416763>.
- [4] H. Sies, Oxidative Stress: Concept and Some Practical Aspects, *Antioxidants.* 9 (2020) 852. <https://doi.org/10.3390/ANTIOX9090852>.
- [5] P. Dhiman, N. Malik, A. Khatkar, M. Kulharia, Antioxidant, Xanthine Oxidase and Monoamine Oxidase Inhibitory Potential of Coumarins: A Review, *Curr. Org. Chem.* 21 (2017) 294–304. <https://doi.org/10.2174/1385272820666161021103547>.
- [6] A.S. Hazell, S. Faim, G. Wertheimer, V.R. Silva, C.S. Marques, The impact of oxidative stress in thiamine deficiency: A multifactorial targeting issue, *Neurochem. Int.* 62 (2013) 796–802. <https://doi.org/10.1016/J.NEUINT.2013.01.009>.
- [7] Y.K. Al-Majedy, D.L. Al-Duhaidahawi, K.F. Al-Azawi, A.A. Al-Amiery, A.A.H. Kadhum, A.B. Mohamad, Coumarins as Potential Antioxidant Agents Complemented with Suggested Mechanisms and Approved by Molecular Modeling Studies, *Mol.* 21 (2016) 135. <https://doi.org/10.3390/MOLECULES21020135>.
- [8] L. Todorov, L. Saso, I. Kostova, Antioxidant Activity of Coumarins and Their Metal Complexes, *Pharm.* 16 (2023) 651. <https://doi.org/10.3390/PH16050651>.
- [9] P. Ionita, The Chemistry of DPPH· Free Radical and Congeners, *Int. J. Mol. Sci.* 22 (2021) 1–15. <https://doi.org/10.3390/IJMS22041545>.
- [10] S.C.T. Nicklisch, J.H. Waite,

- Optimized DPPH assay in a detergent-based buffer system for measuring antioxidant activity of proteins, *MethodsX*. 1 (2014) 233–238. <https://doi.org/10.1016/J.MEX.2014.10.004>.
- [11] S.B. Kedare, R.P. Singh, Genesis and development of DPPH method of antioxidant assay, *J. Food Sci. Technol.* 48 (2011) 412. <https://doi.org/10.1007/S13197-011-0251-1>.
- [12] R.L. Prior, X. Wu, K. Schaich, Standardized Methods for the Determination of Antioxidant Capacity and Phenolics in Foods and Dietary Supplements, *J. Agric. Food Chem.* 53 (2005) 4290–4302. <https://doi.org/10.1021/JF0502698>.
- [13] T. Nomura, M. Kikuchi, A. Kubodera, Y. Kawakami, Proton-donative antioxidant activity of fucoxanthin with 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH), *Biochem. Mol. Biol. Int.* 42 (1997) 361–370. <https://doi.org/10.1080/15216549700202761>.
- [14] J.D. Yeo, F. Shahidi, Critical Re-Evaluation of DPPH assay: Presence of pigments affects the results, *J. Agric. Food Chem.* 67 (2019) 7526–7529. <https://doi.org/10.1021>.
- [15] I. Nakanishi, K. Ohkubo, K. Imai, M. Kamibayashi, Y. Yoshihashi, K.I. Matsumoto, K. Fukuhara, K. Terada, S. Itoh, T. Ozawa, S. Fukuzumi, Solubilisation of a 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl radical in water by β -cyclodextrin to evaluate the radical-scavenging activity of antioxidants in aqueous media, *Chem. Commun.* 51 (2015) 8311–8314. <https://doi.org/10.1039/C5CC02236C>.
- [16] A. Ayala, M.F. Muñoz, S. Argüelles, Lipid peroxidation: Production, metabolism, and signaling mechanisms of malondialdehyde and 4-hydroxy-2-nonenal, *Oxid. Med. Cell. Longev.* 2014 (2014). <https://doi.org/10.1155/2014/360438>.
- [17] H. Yin, L. Xu, N.A. Porter, Free radical lipid peroxidation: Mechanisms and analysis, *Chem. Rev.* 111 (2011) 5944–5972. <https://doi.org/10.1021/CR200084Z>.
- [18] J.M. Lü, P.H. Lin, Q. Yao, C. Chen, Chemical and molecular mechanisms of antioxidants: experimental approaches and model systems, *J. Cell. Mol. Med.* 14 (2010) 840–860. <https://doi.org/10.1111/J.1582-4934.2009.00897.X>.
- [19] M. Repetto, J. Semprine, A. Boveris, M. Repetto, J. Semprine, A. Boveris, Lipid Peroxidation: Chemical Mechanism, Biological Implications and Analytical Determination, *Lipid Peroxidation*. (2012). <https://doi.org/10.5772/45943>.
- [20] H.M. Alessio, Lipid

- peroxidation in healthy and diseased models: influence of different types of exercise, *Handb. Oxid. Antioxidants Exerc.* (2000) 115–127. <https://doi.org/10.1016/B978-044482650-3/50005-5>.
- [21] K. Das, A. Roychoudhury, Reactive oxygen species (ROS) and response of antioxidants as ROS-scavengers during environmental stress in plants, *Front. Environ. Sci.* 0 (2014) 53. <https://doi.org/10.3389/FENV.2014.00053>.
- [22] S.M. Klein, G. Cohen, A.I. Cederbaum, Production of formaldehyde during metabolism of dimethyl sulfoxide by hydroxyl radical-generating systems, *Biochemistry.* 20 (2002) 6006–6012. <https://doi.org/10.1021/BI00524A013>.
- [23] C. Kontogiorgis, G.E. Deligiannidou, V. Karamani, D. Hadjipavlou-Litina, D. Lazari, A. Papadopoulos, Antioxidant Profile of Home Prepared Taraxacum Officinale Weber Ex Wigg Beverage, *Curr. Nutraceuticals.* 1 (2020) 64–72. <https://doi.org/10.2174/2665978601666200212110603>.
- [24] F. Xiao, T. Xu, B. Lu, R. Liu, Guidelines for antioxidant assays for food components, *Food Front.* 1 (2020) 60–69. <https://doi.org/10.1002/FFT2.10>.
- [25] R. Wołosiak, B. Drużyńska, D. Derewiaka, M. Piecyk, E. Majewska, M. Ciecierska, E. Worobiej, P. Pakosz, Verification of the Conditions for Determination of Antioxidant Activity by ABTS and DPPH Assays—A Practical Approach, *Mol.* 27 (2021) 50. <https://doi.org/10.3390/MOLECULES27010050>.
- [26] A. Cano, A.B. Maestre, J. Hernández-Ruiz, M.B. Arnao, ABTS/TAC Methodology: Main Milestones and Recent Applications, *Process.* 11 (2023) 185. <https://doi.org/10.3390/PR11010185>.
- [27] I.R. Ilyasov, V.L. Beloborodov, I.A. Selivanova, R.P. Terekhov, ABTS/PP Decolorization Assay of Antioxidant Capacity Reaction Pathways, *Int. J. Mol. Sci.* 21 (2020). <https://doi.org/10.3390/IJMS21031131>.
- [28] M.B. Arnao, Some methodological problems in the determination of antioxidant activity using chromogen radicals: a practical case, *Trends Food Sci. Technol.* 11 (2000) 419–421. [https://doi.org/10.1016/S0924-2244\(01\)00027-9](https://doi.org/10.1016/S0924-2244(01)00027-9).
- [29] L.J. Hofseth, J.R. Hébert, Diet and acute and chronic, systemic, low-grade inflammation, *Diet, Inflammation, Heal.* (2022) 85–111. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-822130-3.00011-9>.
- [30] S. Qian, O. Golubnitschaja, X.

- Zhan, Chronic inflammation: key player and biomarker-set to predict and prevent cancer development and progression based on individualized patient profiles, *EPMA J.* 2019 104. 10 (2019) 365–381. <https://doi.org/10.1007/S13167-019-00194-X>.
- [31] J. Toro-Pérez, R. Rodrigo, Contribution of oxidative stress in the mechanisms of postoperative complications and multiple organ dysfunction syndrome, *Redox Rep.* 26 (2021) 35–44. <https://doi.org/10.1080/13510002.2021.1891808>.
- [32] H.J. Forman, H. Zhang, Targeting oxidative stress in disease: promise and limitations of antioxidant therapy, *Nat. Rev. Drug Discov.* 20 (2021) 689–709. <https://doi.org/10.1038/s41573-021-00233-1>.
- [33] T.S. Leyane, S.W. Jere, N.N. Houreld, Oxidative Stress in Ageing and Chronic Degenerative Pathologies: Molecular Mechanisms Involved in Counteracting Oxidative Stress and Chronic Inflammation, *Int. J. Mol. Sci.* 23 (2022) 7273. <https://doi.org/10.3390/IJMS23137273>.
- [34] N. Khansari, Y. Shakiba, M. Mahmoudi, Chronic inflammation and oxidative stress as a major cause of age-related diseases and cancer, *Recent Pat. Inflamm. Allergy Drug Discov.* 3 (2009) 73–80. <https://doi.org/10.2174/187221309787158371>.
- [35] T. Hussain, B. Tan, Y. Yin, F. Blachier, M.C.B. Tossou, N. Rahu, Oxidative Stress and Inflammation: What Polyphenols Can Do for Us?, *Oxid. Med. Cell. Longev.* 2016 (2016). <https://doi.org/10.1155/2016/7432797>.
- [36] D. Yuan, A. Xu, Evolution of Inflammation-Related Lipid Metabolism Pathway and Inflammatory Lipid Signaling in *Amphioxus*, *Amphioxus Immun. Tracing Orig. Hum. Immun.* (2016) 189–205. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-849903-0.00010-5>.
- [37] R.G. Snodgrass, B. Brüne, Regulation and Functions of 15-Lipoxygenases in Human Macrophages, *Front. Pharmacol.* 10 (2019) 719. <https://doi.org/10.3389/FPHAR.2019.00719/BIBTEX>.
- [38] N.C. Gilbert, J. Gerstmeier, E.E. Schexnaydre, F. Börner, U. Garscha, D.B. Neau, O. Werz, M.E. Newcomer, Structural and mechanistic insights into 5-lipoxygenase inhibition by natural products, *Nat. Chem. Biol.* 16 (2020) 783–790. <https://doi.org/10.1038/s41589-020-0544-7>.
- [39] Q.-Y. Sun, H.-H. Zhou, X.-Y. Mao, Emerging Roles of 5-Lipoxygenase Phosphorylation in Inflammation and Cell Death, (2019).

- <https://doi.org/10.1155/2019/2749173>.
- [40] L. Heinrich, R. Booiijink, A. Khurana, R. Weiskirchen, R. Bansal, Lipoxygenases in chronic liver diseases: current insights and future perspectives, *Trends Pharmacol. Sci.* 43 (2022) 188–205.
<https://doi.org/10.1016/J.TIPS.2021.12.001>.
- [41] F. da C. Souza, M.T. Ferreira, A. Colquhoun, Influence of Lipoxygenase Inhibition on Glioblastoma Cell Biology, *Int. J. Mol. Sci.* 21 (2020) 8395.
<https://doi.org/10.3390/IJMS21218395>.
- [42] K. Mikulska-Ruminska, I. Shrivastava, J. Krieger, S. Zhang, H. Li, H. Baylr, S.E. Wenzel, A.P. Vandemark, V.E. Kagan, I. Bahar, Characterization of Differential Dynamics, Specificity, and Allosteric of Lipoxygenase Family Members, *J. Chem. Inf. Model.* 59 (2019) 2496–2508.
<https://doi.org/10.1021/ACS.JCI.9B00006>.
- [43] E. Pontiki, D. Hadjipavlou-Litina, Multi-Target Cinnamic Acids for Oxidative Stress and Inflammation: Design, Synthesis, Biological Evaluation and Modeling Studies, *Molecules.* 24 (2019).
<https://doi.org/10.3390/MOLECULES24010012>.
- [44] A.S. Abdelkhalek, H. Kothayer, S. Rezaq, K.Y. Orabi, D.G. Romero, O.I. El-Sabbagh, Synthesis of new multitarget-directed ligands containing thienopyrimidine nucleus for inhibition of 15-lipoxygenase, cyclooxygenases, and pro-inflammatory cytokines, *Eur. J. Med. Chem.* 256 (2023) 115443.
<https://doi.org/10.1016/J.EJMECH.2023.115443>.
- [45] M. Roussaki, C.A. Kontogiorgis, D. Hadjipavlou-Litina, S. Hamilakis, A. Detsi, A novel synthesis of 3-aryl coumarins and evaluation of their antioxidant and lipoxygenase inhibitory activity, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 20 (2010) 3889–3892.
<https://doi.org/10.1016/J.BMCL.2010.05.022>.
- [46] M. Roussaki, K. Zelianaios, E. Kavetsou, S. Hamilakis, D. Hadjipavlou-Litina, C. Kontogiorgis, T. Liargkova, A. Detsi, Structural modifications of coumarin derivatives: Determination of antioxidant and lipoxygenase (LOX) inhibitory activity, *Bioorg. Med. Chem.* 22 (2014) 6586–6594.
<https://doi.org/10.1016/J.BMC.2014.10.008>.
- [47] E. Dainese, A. Sabatucci, G. Van Zadelhoff, C.B. Angelucci, P. Vachette, G.A. Veldink, A.F. Agrò, M. Maccarrone, Structural Stability of Soybean Lipoxygenase-1 in Solution as Probed by Small Angle X-ray Scattering, *J. Mol. Biol.* 349 (2005) 143–152.
<https://doi.org/10.1016/J.JMB.2005.03.027>.
- [48] H. Zhao, L. Wu, G. Yan, Y. Chen,

- M. Zhou, Y. Wu, Y. Li, Inflammation and tumor progression: signaling pathways and targeted intervention, *Signal Transduct. Target. Ther.* 2021 61. 6 (2021) 1–46. <https://doi.org/10.1038/s41392-021-00658-5>.
- [49] N. Rohleder, Stress and inflammation – The need to address the gap in the transition between acute and chronic stress effects, *Psychoneuroendocrinology*. 105 (2019) 164–171. <https://doi.org/10.1016/J.PSYNEUEN.2019.02.021>.
- [50] J. Kay, E. Thadhani, L. Samson, B. Engelward, Inflammation-induced DNA damage, mutations and cancer, *DNA Repair (Amst)*. 83 (2019) 102673. <https://doi.org/10.1016/J.DNAREP.2019.102673>.
- [51] L.M. Coussens, Z. Werb, Inflammation and cancer, *Nature*. 420 (2002) 860. <https://doi.org/10.1038/NATURE01322>.
- [52] N. Singh, D. Baby, J. Rajguru, P. Patil, S. Thakkannavar, V. Pujari, Inflammation and Cancer, *Ann. Afr. Med.* 18 (2019) 121. https://doi.org/10.4103/AAM.AAM_56_18.
- [53] F.R. Greten, S.I. Grivennikov, Inflammation and Cancer: Triggers, Mechanisms, and Consequences, *Immunity*. 51 (2019) 27–41. <https://doi.org/10.1016/J.IMMUNI.2019.06.025>.
- [54] C. Schneider, A. Pozzi, Cyclooxygenases and lipoxygenases in cancer, *Cancer Metastasis Rev.* 30 (2011) 277–294. <https://doi.org/10.1007/s10555-011-9310-3>.
- [55] A. Orafaie, M. Mousavian, H. Orafaie, H. Sadeghian, An overview of lipoxygenase inhibitors with approach of in vivo studies, *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* 148 (2020) 106411. <https://doi.org/10.1016/J.PROSTAGLANDINS.2020.106411>.
- [56] M. Myriagkou, E. Papakonstantinou, G.-E. Deligiannidou, A. Patsilnakos, C. Kontogiorgis, E. Pontiki, Novel Pyrimidine Derivatives as Antioxidant and Anticancer Agents: Design, Synthesis and Molecular Modeling Studies, *Mol.* 28 (2023) 3913. <https://doi.org/10.3390/MOLECULES28093913>.
- [57] I. Kostopoulou, A. Diassakou, E. Kavetsou, E. Kritsi, P. Zoumpoulakis, E. Pontiki, D. Hadjipavlou-Litina, A. Detsi, Novel quinolinone–pyrazoline hybrids: synthesis and evaluation of antioxidant and lipoxygenase inhibitory activity, *Mol. Divers.* 25 (2021) 723–740. <https://doi.org/10.1007/S11030-020-10045-X>.
- [58] O.S. Kwon, J.S. Choi, M.N. Islam, Y.S. Kim, H.P. Kim, Inhibition of 5-lipoxygenase and skin inflammation by the aerial parts of *Artemisia capillaris* and

- its constituents, *Arch. Pharmacol Res.* 34 (2011) 1561–1569. <https://doi.org/10.1007/S12272-011-0919-0>.
- [59] M. Iranshahi, M. Askari, A. Sahebkar, D. Hadjipavlou-Litina, Evaluation of antioxidant, anti-inflammatory and lipoxygenase inhibitory activities of the prenylated coumarin umbelliprenin, *DARU Journal of Pharmaceutical Sciences*, 14 (2009) 99-103.
- [60] A. Önder, Anticancer activity of natural coumarins for biological targets, *Stud. Nat. Prod. Chem.* 64 (2020) 85–109. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-817903-1.00003-6>.
- [61] E. Kavetsou, A. Katopodi, L. Argyri, E. Chainoglou, E. Pontiki, D. Hadjipavlou-Litina, A. Chroni, A. Detsi, Novel 3-aryl-5-substituted-coumarin analogues: Synthesis and bioactivity profile, *Drug Dev. Res.* 81 (2020) 456–469. <https://doi.org/10.1002/ddr.21639>.
- [62] Y. Rai, R. Pathak, N. Kumari, D.K. Sah, S. Pandey, N. Kalra, R. Soni, B.S. Dwarakanath, A.N. Bhatt, Mitochondrial biogenesis and metabolic hyperactivation limits the application of MTT assay in the estimation of radiation induced growth inhibition, *Sci. Rep.* 8 (2018). <https://doi.org/10.1038/S41598-018-19930-W>.
- [63] M. Ghasemi, T. Turnbull, S. Sebastian, I. Kempson, The mtt assay: Utility, limitations, pitfalls, and interpretation in bulk and single-cell analysis, *Int. J. Mol. Sci.* 22 (2021) 12827. <https://doi.org/10.3390/IJMS22312827/S1>.
- [64] N.T.H. Nga, T.T.B. Ngoc, N.T.M. Trinh, T.L. Thuoc, D.T.P. Thao, Optimization and application of MTT assay in determining density of suspension cells, *Anal. Biochem.* 610 (2020) 113937. <https://doi.org/10.1016/J.AB.2020.113937>.
- [65] S.U. Rehman, T. Sarwar, M.A. Husain, H.M. Ishqi, M. Tabish, Studying non-covalent drug–DNA interactions, *Arch. Biochem. Biophys.* 576 (2015) 49–60. <https://doi.org/10.1016/J.ABB.2015.03.024>.
- [66] L. Andrezálová, Z. Országhová, Covalent and noncovalent interactions of coordination compounds with DNA: An overview, *J. Inorg. Biochem.* 225 (2021) 111624. <https://doi.org/10.1016/J.JINORGBIO.2021.111624>.
- [67] Y. Gilad, H. Senderowitz, Docking studies on DNA intercalators, *J. Chem. Inf. Model.* 54 (2014) 96–107. <https://doi.org/10.1021/ci400352t>.
- [68] S. Ramotowska, A. Ciesielska, M. Makowski, What Can Electrochemical Methods Offer in Determining DNA–Drug Interactions?, *Mol.* 26 (2021)

3478.
<https://doi.org/10.3390/MOLECULES26113478>.
- [69] A. Tzani, E. Kritsi, L. Tsamantioti, I. Kostopoulou, M.A. Karadendrou, P. Zoumpoulakis, A. Detsi, Synthesis, Conformational Analysis and ctDNA Binding Studies of Flavonoid Analogues Possessing the 3,5-di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl Moiety, *Antioxidants*. 11 (2022) 2273. <https://doi.org/10.3390/ANTIOX11112273/S1>.
- [70] M.J. Matos, E. Uriarte, L. Santana, 3-Phenylcoumarins as a Privileged Scaffold in Medicinal Chemistry: The Landmarks of the Past Decade, *Molecules*. 26 (2021). <https://doi.org/10.3390/MOLECULES26216755>.
- [71] M.A. Musa, L. Latinwo, M.Y. Joseph, V.L. Badisa, Identification of 7,8-Diacetoxy-3-Arylcoumarin Derivative as a Selective Cytotoxic and Apoptosis-inducing Agent in a Human Prostate Cancer Cell Line, *Anticancer Res.* 37 (2017) 6005–6014. <https://doi.org/10.21873/anticancer.12047>.
- [72] M.A. Musa, L.M. Latinwo, C. Virgile, V.L.D. Badisa, A.J. Gbadebo, Synthesis and in vitro evaluation of 3-(4-nitrophenyl)coumarin derivatives in tumor cell lines, *Bioorg. Chem.* 58 (2015) 96–103. <https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2014.11.009>.
- [73] S. Sordon, J. Popłoński, M. Milczarek, M. Stachowicz, T. Tronina, A.Z. Kucharska, J. Wietrzyk, E. Huszcza, Structure–Antioxidant–Antiproliferative Activity Relationships of Natural C7 and C7–C8 Hydroxylated Flavones and Flavanones, *Antioxidants*. 8 (2019). <https://doi.org/10.3390/ANTIOX8070210>.
- [74] S. Majumder, P.L. Majumder, Further Evidence for the Mechanism of Formation of Coumarin by Perkin Reaction from salicylaldehyde and a Novel Synthesis of 1,1-diphenyl-2(2'-hydroxyphenyl) ethene from O- α,α -diphenylacetylsalicylaldehyde with Et₃N, 11th Int. Electron. Conf. Synth. Org. Chem. (2007) 1310. <https://doi.org/10.3390/ECSOC-11-01310>.
- [75] A.H. Blatt, The fries reaction, *Chem. Rev.* 27 (1940) 413–436. <https://doi.org/10.1021/CR60087A004/ASSET/CR60087A004.FP>.
- [76] W.B. Li, X.P. Qiao, Z.X. Wang, S. Wang, S.W. Chen, Synthesis and antioxidant activity of conjugates of hydroxytyrosol and coumarin, *Bioorg. Chem.* 105 (2020) 104427. <https://doi.org/10.1016/J.BIOORG.2020.104427>.
- [77] K. Zhang, W. Ding, J. Sun, B. Zhang, F. Lu, R. Lai, Y. Zou, G. Yedid, Antioxidant and antitumor activities of 4-arylcoumarins and 4-aryl-3,4-

- dihydrocoumarins, *Biochimie*. 107 (2014) 203–210. <https://doi.org/10.1016/J.BIOCH.2014.03.014>.
- [78] F. Tsopelas, T. Vallianatou, A. Tsantili-Kakoulidou, The potential of immobilized artificial membrane chromatography to predict human oral absorption, *Eur. J. Pharm. Sci.* 81 (2016) 82–93. <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2015.09.020>.
- [79] F. Tsopelas, M. Ochsenkühn-Petropoulou, A. Tsantili-Kakoulidou, Void volume markers in reversed-phase and biomimetic liquid chromatography, *J. Chromatogr. A.* 1217 (2010) 2847–2854. <https://doi.org/10.1016/J.CHROMA.2010.02.062>.
- [80] F. Tsopelas, C. Giaginis, A. Tsantili-Kakoulidou, Lipophilicity and biomimetic properties to support drug discovery, *Expert Opin. Drug Discov.* 12 (2017) 885–896. <https://doi.org/10.1080/17460441.2017.1344210>.
- [81] The Biopharmaceutics Classification System (BCS) Guidance | FDA, (n.d.). <https://www.fda.gov/about-fda/center-drug-evaluation-and-research-cder/biopharmaceutics-classification-system-bcs-guidance> (accessed August 2, 2022).
- [82] A. Katopodi, E. Tsotsou, T. Iliou, G.-E. Deligiannidou, E. Pontiki, C. Kontogiorgis, F. Tsopelas, A. Detsi, Synthesis, Bioactivity, Pharmacokinetic and Biomimetic Properties of Multi-Substituted Coumarin Derivatives, *Mol.* 26 (2021) 5999. <https://doi.org/10.3390/MOLECULES26195999>.
- [83] S. Saito, J. Kawabata, Effects of electron-withdrawing substituents on DPPH radical scavenging reactions of protocatechuic acid and its analogues in alcoholic solvents, *Tetrahedron.* 61 (2005) 8101–8108. <https://doi.org/10.1016/J.TET.2005.06.040>.
- [84] S.M.V. De Almeida, E.A. Lafayette, L.P.B.G. Da Silva, C.A. Da Cruz Amorim, T.B. De Oliveira, A.L.T. Gois Ruiz, J.E. De Carvalho, R.O. De Moura, E.I. Carneiro Beltrão, M.D.C. De Alves Lima, L.B. De Carvalho, Synthesis, DNA Binding, and Antiproliferative Activity of Novel Acridine-Thiosemicarbazone Derivatives, *Int. J. Mol. Sci.* 16 (2015) 13023–13042. <https://doi.org/10.3390/IJMS160613023>.
- [85] M.S. Alqahtani, M. Kazi, M.A. Alsenaidy, M.Z. Ahmad, Advances in Oral Drug Delivery, *Front. Pharmacol.* 12 (2021) 62. <https://doi.org/10.3389/FPHAR.2021.618411/XML/NLM>.
- [86] C.A. Lipinski, F. Lombardo, B.W. Dominy, P.J. Feeney, Experimental and

- computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 23 (1997) 3–25. [https://doi.org/10.1016/S0169-409X\(96\)00423-1](https://doi.org/10.1016/S0169-409X(96)00423-1).
- [87] D.F. Veber, S.R. Johnson, H.Y. Cheng, B.R. Smith, K.W. Ward, K.D. Kopple, Molecular properties that influence the oral bioavailability of drug candidates, *J. Med. Chem.* 45 (2002) 2615–2623. <https://doi.org/10.1021/JM020017N>.
- [88] J. Lin, W. Zhang, N. Jiang, Z. Niu, K. Bao, L. Zhang, D. Liu, C. Pan, X. Yao, Total synthesis of bulbophylol-B, *J. Nat. Prod.* 71 (2008) 1938–1941. <https://doi.org/10.1021/NP800226N/>.
- [89] S. Jacobson, B. Ghosh, CXVI.—Syntheses of benzo- γ -pyrones and flavones. Part III, *J. Chem. Soc. Trans.* 107 (1915) 1051–1058. <https://doi.org/10.1039/CT9150701051>.

Κεφάλαιο 3ο

ΣΧΕΔΙΑΣΜΟΣ ΚΑΙ ΣΥΝΘΕΣΗ ΝΕΩΝ
ΚΟΥΜΑΡΙΝΙΚΩΝ ΑΝΑΛΟΓΩΝ ΩΣ ΑΝΑΣΤΟΛΕΙΣ
ΤΗΣ ΑΚΕΤΥΛΟΧΟΛΙΝΕΣΤΕΡΑΣΗΣ

3.1 ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΥΠΟΒΑΘΡΟ

3.1.1 Νόσος του Αλτσχάιμερ

Η νόσος του Αλτσχάιμερ είναι μια προοδευτική νευροεκφυλιστική διαταραχή η οποία ανακαλύφθηκε από τον κλινικό ψυχίατρο γερμανικής καταγωγής Alois Alzheimer το 1906 [1]. Η νόσος του Αλτσχάιμερ είναι η κυριότερη αιτία απώλειας μνήμης, αποτελώντας το 60-70% των περιπτώσεων άνοιας και επηρεάζοντας περίπου 50 εκατομμύρια ανθρώπους παγκοσμίως κυρίως σε ηλικία 65 ετών και άνω [2,3]. Η νόσος Αλτσχάιμερ έχει τρία διαφορετικά στάδια, ήπιο, μέτριο και σοβαρό.

Τα πιο κοινά συμπτώματα της νόσου περιλαμβάνουν [4–6]:

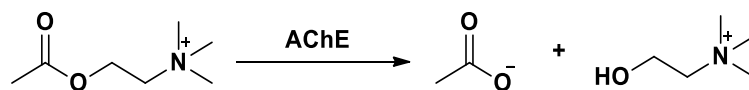
- Απώλεια μνήμης,
- Δυσκολίες στον προγραμματισμό και την εκτέλεση διεκπεραίωση βασικών εργασιών,
- Διαταραχές της όρασης,
- Διαταραχές του προφορικού και γραπτού λόγου,
- Διαταραχή της αντίληψης του χώρου και του χρόνου,
- Ελλιπής ικανότητα κριτικής σκέψης,
- Αλλαγές στη διάθεση και τη συμπεριφορά.

Η πολυπλοκότητα των συμπτωμάτων υποδηλώνει και την πολλαπλότητα των αιτιολογικών παραγόντων που οδηγούν στη νόσο AD. Υπάρχουν βέβαια ορισμένες γενικά αποδεκτές κύριες υποθέσεις, οι οποίες περιλαμβάνουν αυτή του β-αμυλοειδούς, της υπερφωσφορυλιωμένης ταυ πρωτεΐνης καθώς και τη χολινεργική υπόθεση [2,7–9].

3.1.2 Χολινεργική υπόθεση

Η ακετυλοχολίνη είναι ένας νευροδιαβιβαστής που εντοπίζεται στις συναπτικές απολήξεις στον εγκεφαλικό φλοιό και σε άλλες περιοχές του ΚΝΣ και μεσολαβεί στη μεταβίβαση των ερεθισμάτων από το κινητικό νεύρο στο σκελετικό μυ (νευρομυϊκή σύναψη) [10,11]. Οι χολινεργικοί νευρώνες συνθέτουν, αποθηκεύουν και απελευθερώνουν την ακετυλοχολίνη, η οποία φαίνεται να συμμετέχει σε λειτουργίες μνήμης και συμπεριφοράς. Ακόμη, στους χολινεργικούς νευρώνες συντίθεται χολινεστεράσες όπως η ακετυλοχολινεστεράση, η ακετυλοτρανσφεράση της χολίνης και η βουτυρυλοχολινεστεράση [12–16].

Η ακετυλοχολίνη φυσιολογικά υδρολύεται από την ακετυλοχολινεστεράση (acetylcholinesterase, AChE) σε χολίνη και οξικό οξύ (Σχήμα 3.1). Μετά την υδρόλυση, η χολίνη προσλαμβάνεται γρήγορα από τη νευρωνική μεμβράνη για να επαναχρησιμοποιηθεί για τη σύνθεση ακετυλοχολίνης (acetylcholine, ACh).



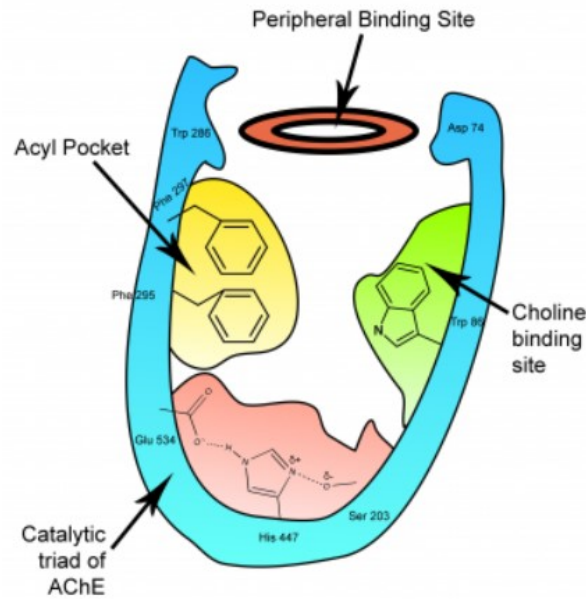
Σχήμα 3.1 Υδρόλυση της ακετυλοχολίνης από την AChE.

Η δυσλειτουργία των χολινεργικών νευρώνων και πιο συγκεκριμένα η μειωμένη ικανότητα επαναπρόσληψης της χολίνης και ακετυλίωσής της από την ακετυλοτρανσφεράση με στόχο τη σύνθεση της ακετυλοχολίνης, οδηγούν σε μειωμένα επίπεδα της ακετυλοχολίνης στο ΚΝΣ. Μελέτες έχουν δείξει ότι τα μειωμένα επίπεδα ακετυλοχολίνης συνδέονται με την απώλεια μνήμης καθώς και με τη νόσο Αλτσχάιμερ και για αυτό το λόγο τρία από τα τέσσερα εγκεκριμένα φαρμακευτικά σκευάσματα κατά της νόσου Αλτσχάιμερ στην Ευρώπη, στηρίζονται στην αναστολή του ενζύμου ακετυλοχολινεστεράση. Ωστόσο, μέχρι στιγμής οι εγκεκριμένοι αναστολείς της ακετυλοχολινεστεράσης επιφέρουν μεν ανακούφιση των συμπτωμάτων αλλά δεν έχουν καταφέρει να επιβραδύνουν ή να αντιμετωπίσουν επιτυχώς τη νόσο Αλτσχάιμερ [17–20]. Επομένως, η ανάπτυξη νέων αναστολέων της ακετυλοχολινεστεράσης είναι εξέχουσας σημασίας στην προσπάθεια αντιμετώπισης της νόσου AD και για αυτό κατέχει ιδιαίτερο ενδιαφέρον στη Φαρμακευτική Χημεία [21].

3.1.3 Ακετυλοχολινεστεράση

Η ακετυλοχολινεστεράση ανήκει στις α/β υδρολάσες, μια οικογένεια πρωτεϊνών που περιλαμβάνει χολινεστεράσες, καρβοξυλεστεράσες, λιπάσες κ.α. [22]. Φυσιολογικός της ρόλος είναι η υδρόλυση του νευροδιαβιβαστή ακετυλοχολίνη σε χολίνη και οξικό οξύ [23,24]. Εντοπίζεται σε πληθώρα μοριακών μορφών, οι οποίες διαφέρουν τόσο ως προς την τεταρτοταγή τους δομή, όσο και ως προς τον τρόπο σύνδεσης με τη εκάστοτε σύναψη. Οι διαφορές αυτές ποικίλλουν από ιστό σε ιστό ακόμα και στον ίδιο οργανισμό, ούτως ώστε να ικανοποιούν τις διαφορετικές προϋποθέσεις κάθε σύναψης [25]. Η γνώση της δομής της ακετυλοχολινεστεράσης είναι απαραίτητη για το σχεδιασμό νέων αναστολέων [26,27].

Εν γένει, το μόριο της ακετυλοχολινεστεράσης έχει ελλειψοειδές σχήμα διαστάσεων $45 \times 60 \times 65 \text{ \AA}$. Το μονομερές του ενζύμου είναι μία α/β πρωτεΐνη, η οποία περιέχει 12 κεντρικά β πτυχωτά φύλλα περιβαλλόμενα από 14 α έλικες. Το πιο αξιοσημείωτο τμήμα της δομής είναι ένα βαθύ στενό «φαράγγι» (ή «λαιμός») μήκους περίπου 20 \AA στη μέση του ενζύμου, το οποίο γίνεται πιο πλατύ κοντά στον πυθμένα του. Το ενεργό κέντρο της ακετυλοχολινεστεράσης εντοπίζεται σε απόσταση 4 \AA από τη βάση του μορίου και αποτελείται από τέσσερις επιμέρους υπομονάδες [28,29] (Εικόνα 3.1).



Εικόνα 3.1 Δομή ακετυλοχολινεστεράσης.

Η εστερατική υπομονάδα (esteratic subsite) περιέχει την καταλυτική τριάδα των αμινοξέων τα οποία απαρτίζουν το ενεργό κέντρο, όπου πραγματοποιείται η υδρόλυση της ακετυλοχολίνης. Τα αμινοξέα αυτά είναι σερίνη 203 (SER203), ιστιδίνη 447 (HIS447) και γλουταμινικό οξύ 334 (GLU334) [30].

Η ανιονική υπομονάδα (anionic subsite) αποτελείται από τα αμινοξέα τρυπτοφάνη 86 (TRP86), τυροσίνη 133 (TYR133), τυροσίνη 337 (TYR337) και φαινυλαλανίνη 338 (PHE338). Είναι ουδέτερα φορτισμένα και λιπόφιλη και χρησιμεύει στην πρόσδεση της θετικά φορτισμένης ακετυλοχολίνης, καθώς και άλλων τεταρτοταγών μορίων. Τα κατιονικά υποστρώματα δεν προσδένονται στα αρνητικά φορτισμένα αμινοξέα του ανιονικού κέντρου, αλλά αλληλεπιδρούν με 14 αρωματικά αμινοξέα που αποτελούν το «φαράγγι» που οδηγεί προς το ενεργό κέντρο του ενζύμου. Αυτά τα 14 αμινοξέα του αρωματικού «λαιμού» διατηρούνται σταθερά ακόμη και σε ακετυλοχολινεστεράσες από διαφορετικούς οργανισμούς. Από αυτά, η τρυπτοφάνη 86 είναι ιδιαίτερα σημαντική, καθώς η αντικατάστασή της, για παράδειγμα από αλανίνη, προκαλεί μείωση της δραστηριότητας του ενζύμου κατά 3000 φορές [28].

Το «acyl pocket» αποτελείται από τα αμινοξέα φαινυλαλανίνη 295 (PHE 295) και φαινυλαλανίνη 297 (PHE297) και συμβάλλει στην πρόσδεση της ακετυλοχολίνης στην AChE καθώς αλληλεπιδρά με την ακετυλο-ομάδα της. Ακόμη, είναι υπεύθυνο για την εκλεκτικότητα του ενζύμου ως προς τα διάφορα υποστρώματα, καθώς αποτρέπει την είσοδο σε μεγαλύτερα μόρια. Το «oxyanion hole» αποτελείται από τα αμινοξέα γλυκίνη 121 (GLY121), γλυκίνη 122 (GLY122) και αλανίνη 204 (ALA204). Ο ρόλος του έγκειται στη σταθεροποίηση του ενδιάμεσου προϊόντος της ακετυλοχολίνης, κατά την κατάλυσή της [25,31].

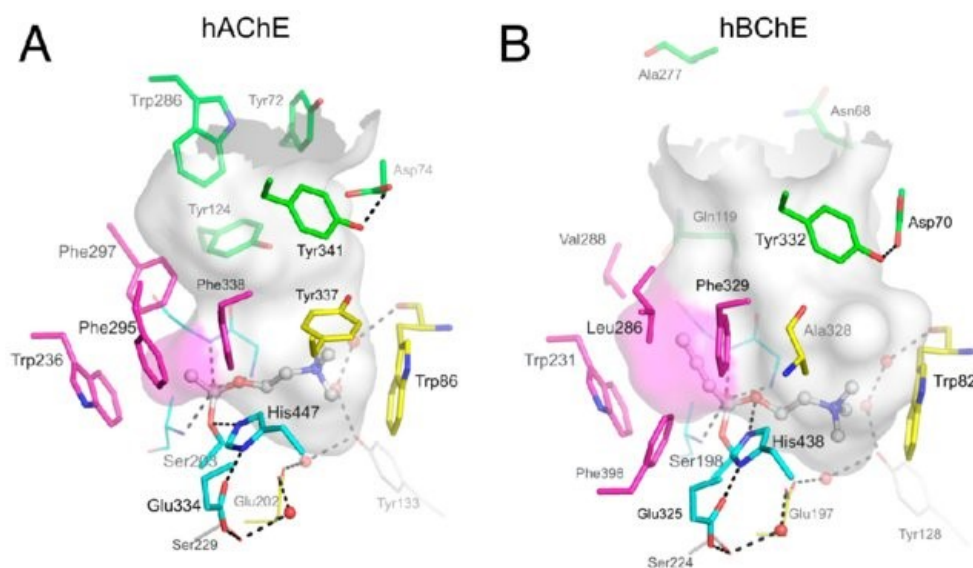
Πέρα από τις τέσσερις υπομονάδες του ενεργού κέντρου, η ακετυλοχολινεστεράση περιέχει ένα ή περισσότερα περιφερειακά ανιονικά

κέντρα (Peripheral Anionic Site, PAS). Ένα τέτοιο περιφερειακό ανιονικό κέντρο εντοπίζεται στην επιφάνεια του ανθρώπινου ενζύμου σε απόσταση 20 Å από το ενεργό κέντρο. Αρχικά, χρησιμεύει για την αλλοστερική πρόσδεση μορίων ενώ συμβάλλει και σε μη χολινεργικές λειτουργίες, όπως στο σχηματισμό συμπλόκου με το β-αμυλοειδές πεπτίδιο (Aβ), το οποίο παίζει σημαντικό ρόλο στην παθογένεση της νόσου του Αλτσχάιμερ [32,33]. Η δομή του περιφερειακού ανιονικού κέντρου και ο αριθμός λειτουργιών που του αντιστοιχούν οδηγούν στο συμπέρασμα ότι είναι μία περιοχή μεγάλης πολυπλοκότητας και χρηστικότητας [34].

3.1.4 Βουτυρυλοχολινεστεράση

Η βουτυρυλοχολινεστεράση (butyrylcholinesterase, BuChE) ή αλλιώς ψευδοχολινεστεράση αποτελεί μία υδρολάση που φέρει μεγάλη συγγένεια με την AChE. Η BuChE συντίθεται στο ήπαρ και εντοπίζεται στο πλάσμα, αλλά και στο περιφερικό και κεντρικό νευρικό σύστημα. Φέρει μεγαλύτερο εύρος υποστρωμάτων απ' ότι η ακετυλοχολινεστεράση, με τη βουτυρυλοχολίνη να αποτελεί το κυριότερο, ενώ μπορεί να υδρολύσει και την ακετυλοχολίνη [35,36].

Η δομή της BuChE είναι παρόμοια με της AChE, καθώς παρουσιάζουν κατά 65% ομολογία στην αλληλουχία των αμινοξέων τους. Το ενεργό κέντρο της BuChE βρίσκεται κι αυτό στο βάθος ενός στενού φαραγγιού στα 20 Å με τα αμινοξέα σερίνη 198 (SER198), ιστιδίνη 438 (HIS438) και γλουταμινικό οξύ 325 (GLU325) να αποτελούν την καταλυτική τριάδα (Εικόνα 3.2). Η κυριότερη διαφορά τους εντοπίζεται στην περιοχή «acyl rocket», όπου τα αμινοξέα που εντοπίζονται στην BuChE, δημιουργούν μεγαλύτερο κενό χώρο στο εσωτερικό του ενζύμου (περίπου 300 Å παραπάνω από την AChE), επιτρέποντας την πρόσδεση και σε πιο ογκώδη υποστρώματα [37].



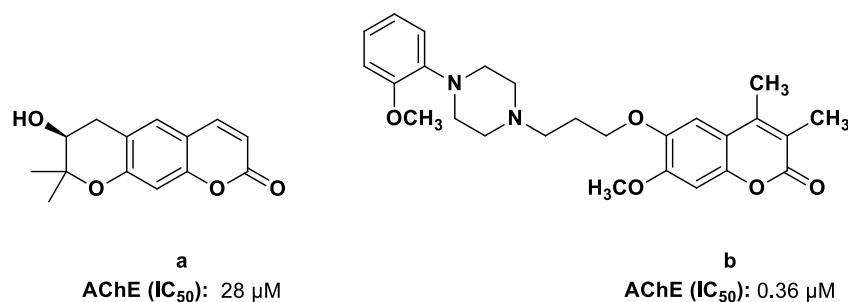
Εικόνα 3.2 Τριδιάστατη δομή: **A:** της ανθρώπινης AChE (PDB: 4EY4) και **B:** της ανθρώπινης BuChE (PDB: 1P0I) παρουσία ακετυλοχολίνης και βουτυρυλοχολίνης ως προσδέτη, αντίστοιχα [36].

Ο ρόλος της βουρτυλοχολινεστεράσης δεν είναι επακριβώς γνωστός, ωστόσο αυξημένα επίπεδά της εντοπίζονται σε περιπτώσεις μειωμένων επιπέδων ακετυλοχολινεστεράσης. Πιο συγκεκριμένα, έχει βρεθεί ότι όταν μειώνεται η ενεργότητα της AChE στο ΚΝΣ, η ενεργότητα της BuChE αυξάνεται έως και κατά 165% και γι' αυτό το ενδιαφέρον πλέον στρέφεται στην αναστολή και των δύο ενζύμων [35,38]. Η δυνατότητα της να υδρολύει την ακετυλοχολίνη σε συνδυασμό με δεδομένα που παρουσιάζουν συσχέτιση μεταξύ της BuChE και του σχηματισμού πλακών του β-αμυλοειδούς πεπτιδίου, οδηγούν στο να συγκαταλέγεται και η BuChE ως φαρμακολογικός στόχος για τη νόσο του Αλτσχάιμερ [39,40]. Τέλος, νεότερες έρευνες παρουσιάζουν τη συσχέτιση της βουτυροχολινεστεράσης με την παθογένεση κι άλλων νόσων όπως η παχυσαρκία [41].

3.1.5 Κουμαρίνες ως αναστολείς της ακετυλοχολινεστεράσης και της βουτυροχολινεστεράσης

Φυσικά προϊόντα και δομικά τροποποιημένα ανάλογά τους που ανήκουν στις κατηγορίες των αλκαλοειδών, των τερπενίων, των πολυφαινολών και των κουμαρινών έχουν παρουσιάσει σημαντική ικανότητα να αναστέλλουν τη δράση των χολινεστερασών [42–44].

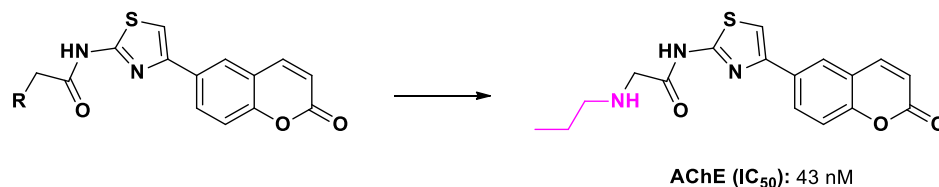
Πιο συγκεκριμένα, η δεκουρσινόλη αποτελεί μια φυσική κουμαρίνη που απομονώνεται από τις ρίζες του φυτού *Angelica gigas* και η οποία έχει επιδείξει αξιόλογη δράση έναντι του ενζύμου της ακετυλοχολινεστεράσης με IC_{50} 28 μM [45]. Ακόμη, η ενσακουλίνη αποτελεί μια συνθετική κουμαρίνη, η οποία έχει παρουσιάσει πολύ ισχυρή ικανότητα αναστολής της AChE με τιμή IC_{50} 0.36 μM και γι' αυτό έχει χρησιμοποιηθεί σαν ένωση οδηγός για το σχεδιασμό νέων κουμαρινών με αντι-AChE δράση (Σχήμα 3.2) [46].



Σχήμα 3.2 Χημική δομή: **a**: δεκουρσινόλης και **b**: ενσακουλίνης.

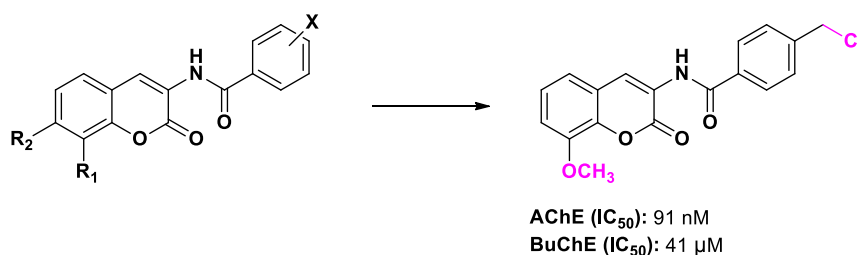
Σε πρόσφατη μελέτη των Sonmez et al. [47] συντέθηκε μια σειρά υβριδικών μορίων κουμαρινών-θειαζολίων, τα οποία εξετάστηκαν ως προς την ικανότητά τους να αναστέλλουν τη δράση των ενζύμων AChE και BuChE, ενώ πραγματοποιήθηκε και μοριακή μοντελοποίηση της πρόσδεσής τους στο ενεργό κέντρο των ενζύμων. Η γενική δομή των εξεταζόμενων ενώσεων, καθώς και το παράγωγο που παρουσίασε τη βέλτιστη δράση παρουσιάζονται στο Σχήμα 3.3. Τα συντιθέμενα κουμαρινικά ανάλογα παρουσίασαν τιμές IC_{50} μεταξύ 0.043 μM και 13.53 μM

έναντι της ακετυλοχολινεστεράσης και IC_{50} μεταξύ 2.35 μM και 189.40 μM έναντι της βουτυρυλοχολινεστεράσης, με τα περισσότερα παράγωγα να επιδεικνύουν υψηλή εκλεκτικότητα έναντι της AChE. Παρατηρήθηκε ότι η υποκατάσταση με N-αλκυλο ή ετεροκυκλική ομάδα αντί για αρυλο ομάδα, ευνόησε τη δράση, πιθανώς λόγω αλληλεπιδράσεων κατιόντος-π με την καταλυτική τριάδα του ενζύμου.



Σχήμα 3.3 Γενική δομή υβριδικών μορίων κουμαρινών-θειαζολίων (αριστερά) και χημική δομή του αναλόγου που παρουσίασαν την καλύτερη δράση (δεξιά).

Επιπρόσθετα, η ερευνητική ομάδα των Hu et al. [48] συνέθεσε μια σειρά από 3-(4-αμινοφαινυλο)-κουμαρινικά παράγωγα, τα οποία αξιολογήθηκαν για την ικανότητά τους να αναστέλλουν τη δράση των ενζύμων AChE και BuChE. Η γενική δομή των εξεταζόμενων ενώσεων, καθώς και το παράγωγο που παρουσίασε τη βέλτιστη αντι-AChE δράση (IC_{50} 91 nM), παρουσιάζονται στο Σχήμα 3.4. Το παράγωγο το οποίο παρουσίασε τη μέγιστη ανασταλτική δράση έναντι της AChE, παρουσίασε και υψηλή εκλεκτικότητα (BuChE: IC_{50} 41 μM). Ακόμη, η πιθανή του νευροπροστατευτική δράση επιβεβαιώθηκε και μέσω του μοντέλου zebrafish. Πιο συγκεκριμένα, η επιβράδυνση της κίνησης των zebrafish που προκαλείται από τριχλωριούχο αργίλιο ($AlCl_3$) χρησιμοποιήθηκε ως προσομοίωση των κινητικών διαταραχών της νόσου του Αλτσχάιμερ, ενώ μελετήθηκε η ικανότητα των κουμαρινικών αναλόγων να επαναφέρουν την κίνηση σε φυσιολογικά επίπεδα. Το παράγωγο που αποτέλεσε τον ικανότερο αναστολέα της AChE επέδειξε σημαντικό θεραπευτικό αποτέλεσμα και σε αυτή τη μέθοδο.



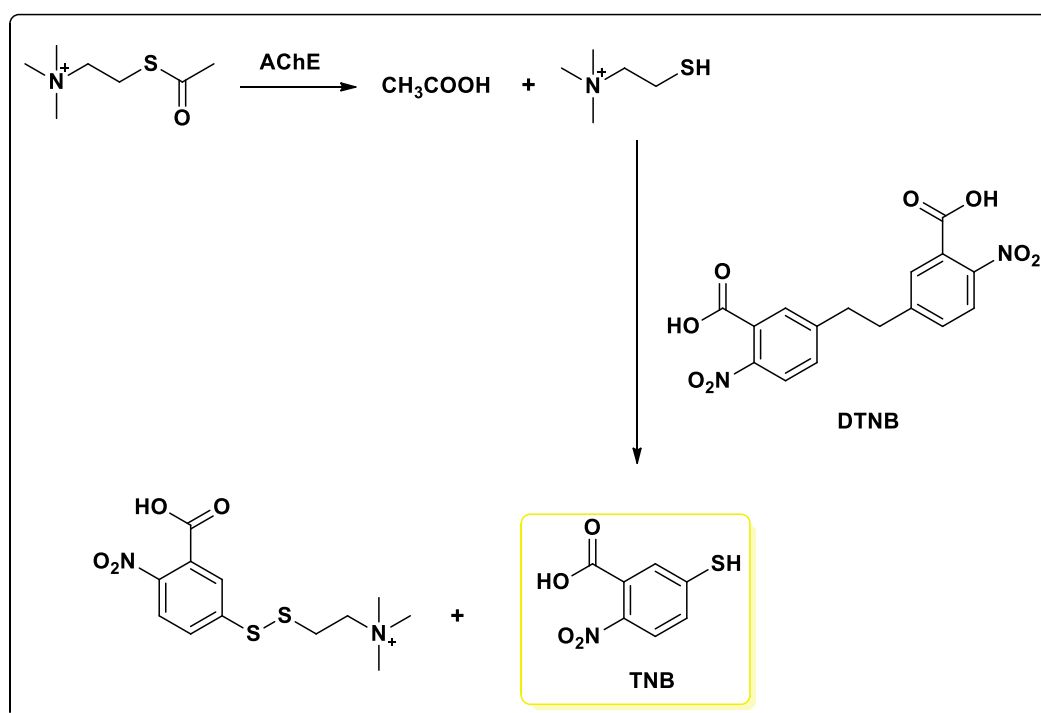
Σχήμα 3.4 Γενική δομή από 3-(4-αμινοφαινυλο)-κουμαρινικών παραγώγων (αριστερά) και χημική δομή του πλέον δραστικού αναλόγου (δεξιά).

Τέλος, η ερευνητική ομάδα των Mzezewa et al. [49] συνέθεσε μια σειρά από 3,7-διυποκατεστημένα κουμαρινικά ανάλογα, τα οποία εξετάστηκαν μέσω μιας σειράς μεθόδων για την νευροπροστατευτική τους δράση. Οι εξεταζόμενες ενώσεις δεν παρουσίασαν σημαντική ικανότητα αναστολής της ακετυλοχολινεστεράσης, ωστόσο, παρουσίασαν σημαντική ικανότητα αναστολής της βουτυρυλοχολινεστεράσης καθώς και της μονοαμινοξειδάσης A και B, ένζυμα τα οποία είναι υπεύθυνα για το μεταβολισμό νευροδιαβιβαστών όπως η

σερετονίνη και η ντοπαμίνη και έχει βρεθεί ότι σχετίζονται με διάφορες παθήσεις του νευρικού συστήματος, καθώς και με τη νόσο του Αλτσχάιμερ [50].

3.1.6 Μέθοδος του Ellman

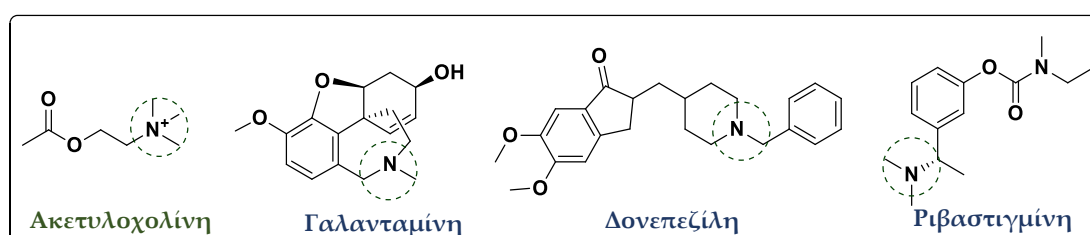
Η πιο κοινή μέθοδος *in vitro* αξιολόγησης της ικανότητας μορίων να αναστέλλουν τη δράση χολινεστερασών είναι η μέθοδος του Ellman [51]. Κατά τη συγκεκριμένη μέθοδο, ως υπόστρωμα χρησιμοποιείται η ακετυλο- ή βουτυρυλοθειοχολίνη που υδρολύεται από την εκάστοτε χολινεστεράση προς παραγωγή θειοχολίνης και οξικού ή βουτυρικού οξέος, αντίστοιχα. Η % αναστολή της δράσης του ενζύμου προσδιορίζεται μέσω υπολογισμού του ρυθμού παραγωγής της θειοχολίνης. Για το σκοπό αυτό, στο διάλυμα προστίθεται 5,5'-διθειο-2-νιτροβενζοϊκό οξύ (5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoic) acid, DTNB) το οποίο αντιδρά με την ακετυλο- ή βουτυρυλοθειοχολίνη προς παραγωγή του 5-θειο-2-νιτροβενζοϊκού οξέος (5-thio-2-nitrobenzoate, TNB) το οποίο φέρει έντονο κίτρινο χρώμα και απορροφά στα 412 nm (Σχήμα 3.5). Επομένως, σε περίπτωση που η δράση του ενζύμου έχει ανασταλεί μερικώς, μειώνεται ο ρυθμός υδρόλυσης του υποστρώματος και η παραγωγή της θειοχολίνης με αποτέλεσμα τη μείωση της απορρόφηση στα 412 nm [52–54].



Σχήμα 3.5 Υδρόλυση της ακετυλοθειοχολίνης και παραγωγή του 5-θειο-2-νιτροβενζοϊκού οξέος (TNB).

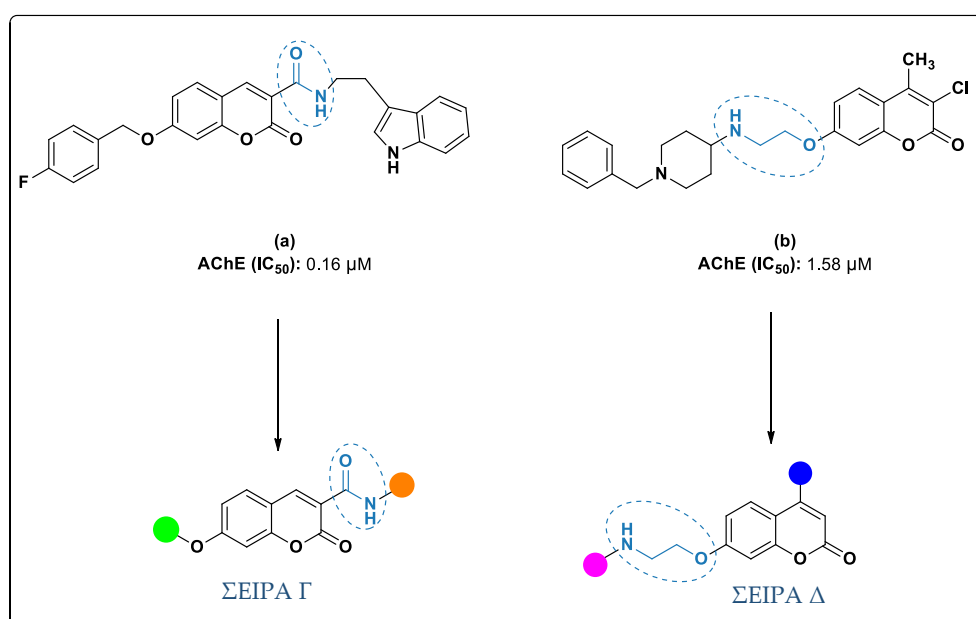
3.2 ΣΚΟΠΟΣ

Ο σχεδιασμός και η σύνθεση των νέων κουμαρινικών αναλόγων των Σειρών Γ και Δ, στηρίχθηκε σε εντατική ανασκόπηση της τρέχουσας βιβλιογραφίας με στόχο τη βελτιστοποίηση της δράσης τους ως αναστολείς του ενζύμου ακετυλοχολινεστεράση. Πιο συγκεκριμένα, η ύπαρξη αμινομάδας ή αμιδικού δεσμού φαίνεται να διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην ενίσχυση της ανασταλτικής δράσης έναντι της ακετυλοχολινεστεράσης. Ειδικότερα, τόσο το υπόστρωμα του ενζύμου, η ακετυλοχολίνη, όσο και οι τρεις χημικές ενώσεις που αποτελούν φαρμακευτικά μόρια για τη μετρίαση των συμπτωμάτων της νόσου του Αλτσχάιμερ μέσω της αναστολής της δράσης του ενζύμου ακετυλοχολινεστεράση, φέρουν αμινομάδα (Σχήμα 3.6). Το θετικό της φορτίο σε φυσιολογικό pH οδηγεί στην αλληλεπίδραση με το ανιονικό μέρος του ενεργού κέντρου του ενζύμου και συμβάλλει στην επιτυχή πρόσδεσή τους σε αυτό [55].



Σχήμα 3.6 Χημική δομή υποστρώματος (ακετυλοχολίνη) και εγκεκριμένων φαρμάκων – αναστολέων της AChE (γαλανταμίνη, δονεπεζίλη, ριβαστιγμίνη).

Ακόμη, σύμφωνα με την τρέχουσα βιβλιογραφία αρκετά κουμαρινικά παράγωγα τα οποία φέρουν είτε αμινομάδα είτε αμιδικό δεσμό έχουν επιδείξει αξιολογημένη δράση και γι' αυτό χρησιμοποιήθηκαν ως μόρια οδηγού στο σχεδιασμό των Σειρών Γ και Δ (Σχήμα 3.7).



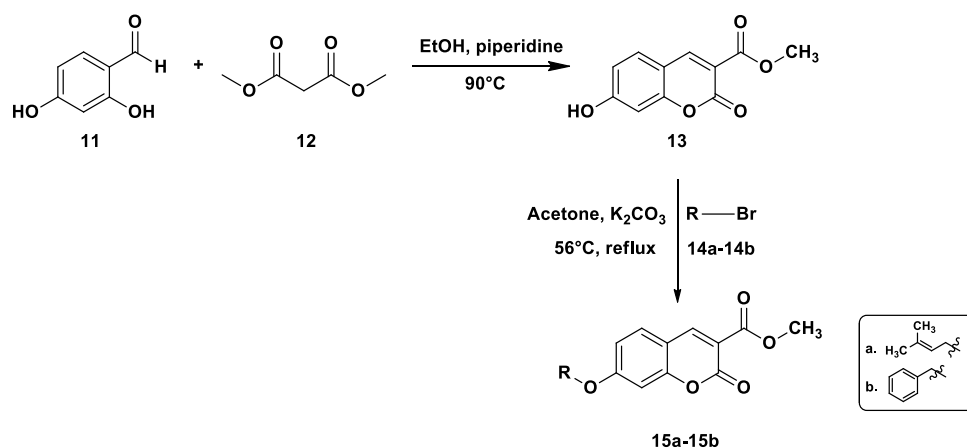
Σχήμα 3.7 Σχεδιασμός των νέων κουμαρινικών αναλόγων των Σειρών Γ και Δ [56,57].

Στόχος των νέων κουμαρινικών αναλόγων των Σειρών Γ και Δ που σχεδιάστηκαν είναι να αναστέλλουν *in vitro* τόσο τη δράση της ακετυλοχολινεστεράσης όσο και τη δράση της βουτυρυλοχολινεστεράσης, καθότι έχει βρεθεί ότι σε πολλές περιπτώσεις όταν αναστέλλεται η δράση της ακετυλοχολινεστεράσης, η βουτυρυλοχολινεστεράση παράγεται σε μεγαλύτερα επίπεδα, υδρολύοντας το λιγότερο συγγενές της υπόστρωμα, ακετυλοχολίνη και αποτελώντας επομένως εξίσου σημαντικό θεραπευτικό στόχο [58].

3.3 ΣΧΕΔΙΑΣΜΟΣ ΚΑΙ ΣΥΝΘΕΣΗ ΤΩΝ ΝΕΩΝ ΚΟΥΜΑΡΙΝΙΚΩΝ ΑΝΑΛΟΓΩΝ

Τα κουμαρινικά καρβοξαμίδια της Σειράς Γ προέκυψαν μέσω αντιδράσεων τριών σταδίων (Σχήματα 3.8 & 3.9):

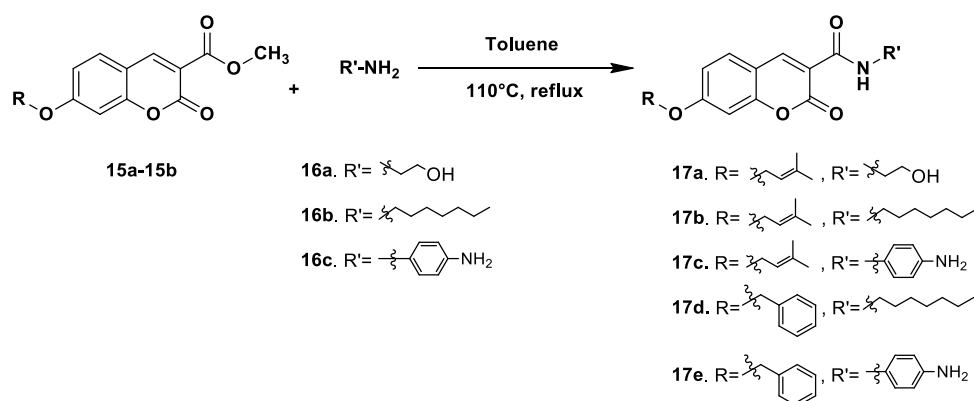
- Σύνθεση της 3-μεθοξυ-καρβονυλο-7-υδροξυ-κουμαρίνης (**13**) και των 7-πρενυλοξυ- ή 7-βενζυλοξυ-3-μεθοξυ-καρβονυλο-κουμαρινών (**15a-15b**)



Σχήμα 3.8 Συνθετική πορεία 3-μεθοξυ-καρβονυλο-7-υδροξυ-κουμαρίνης και των 7-υποκατεστημένων αναλόγων της.

Αρχικά, η σύνθεση της 3-μεθοξυ-καρβονυλο-7-υδροξυ-κουμαρίνης (**13**) επιτυγχάνεται μέσω αντίδρασης συμπύκνωσης Knoevenagel μεταξύ της 2,4-διυδροξυ-βενζαλδεΐδης (**11**) και του μηλονικού διμεθυλεστέρα (**12**) σε αναλογία 1:1 σε διαλύτη αιθανόλη, παρουσία καταλυτικής ποσότητας πιπεριδίνης. Στη συνέχεια, η 3-μεθοξυ-καρβονυλο-7-υδροξυ-κουμαρίνη (**13**) αντιδρά μέσω αντίδρασης σύνθεσης αιθέρων κατά Williamson, είτε με πρενυλο-βρωμίδιο (**14a**) είτε με βενζυλο-βρωμίδιο (**14b**) σε αναλογία 1:1.2, σε διαλύτη ακετόνη, παρουσία ανθρακικού καλίου προς τη σύνθεση των 3-μεθοξυ-καρβονυλο-7-πρενυλοξυ-κουμαρίνης (**15a**) και 7-βενζυλοξυ-3-μεθοξυ-καρβονυλο-κουμαρίνης (**15b**).

- Σύνθεση των νέων κουμαρινικών καρβοξαμιδίων (**17a-17e**)

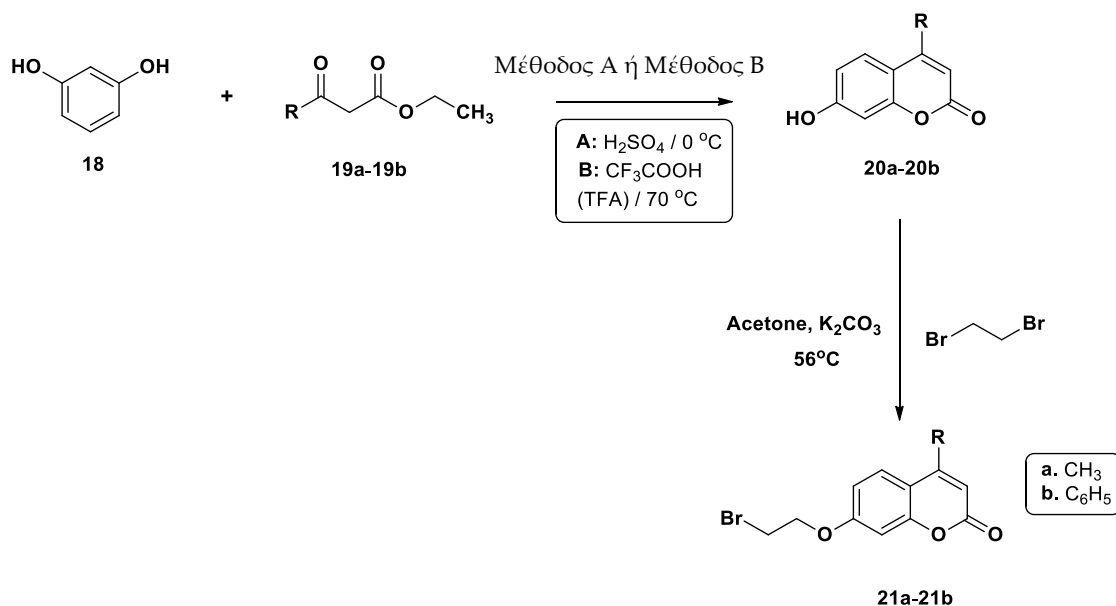


Σχήμα 3.9 Συνθετική πορεία των νέων κουμαρινικών καρβοξαμιδίων **17a-17e**.

Η σύνθεση των τελικών καρβοξαμιδίων επιτυγχάνεται μέσω αντίδρασης μεταξύ των κουμαρινικών παραγώγων **15a** και **15b** και κατάλληλα υποκατεστημένων πρωτοταγών αμινών σε διαλύτη τολουόλιο και αναλογία 1:2.

Η σύνθεση των νέων κουμαρινικών αναλόγων της Σειράς Δ πραγματοποιήθηκε σε τρία στάδια (Σχήματα 3.10 & 3.11):

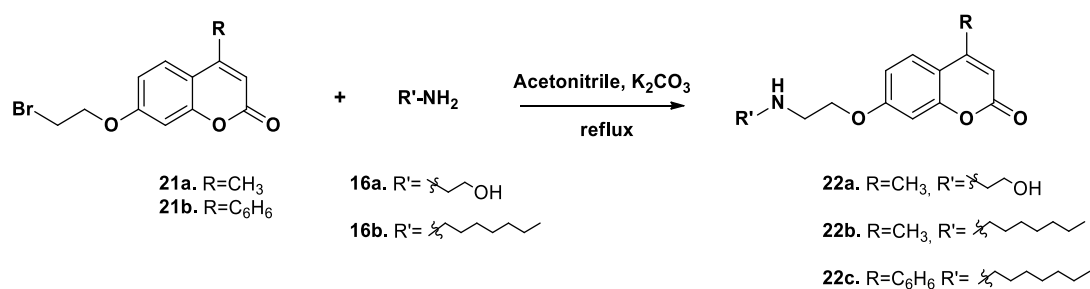
- Σύνθεση των 4-υποκατεστημένων-7-υδροξυ-κουμαρινικών παραγώγων (**20a-20b**) και των των 7-βρωμοαιθοξυ-κουμαρινικών παραγώγων (**21a-21b**)



Σχήμα 3.10 Συνθετική πορεία 4-υποκατεστημένων-7-υδροξυ-κουμαρινικών παραγώγων και των 7-βρωμοαιθοξυ-κουμαρινικών αναλόγων.

Τα 4-υποκατεστημένα-7-υδροξυ-κουμαρινικά παράγωγα **20a-20b** συντέθηκαν μέσω αντίδρασης Pechmann μεταξύ της ρεσορκινόλης και του κατάλληλου β-κετοεστέρα είτε παρουσία θεικού οξέος (H₂SO₄) (Μέθοδος A, **20a**) είτε παρουσία τριφθοροξικού οξέος (CF₃COOH) (Μέθοδος B, **20b**). Στη συνέχεια, η σύνθεση των 7-βρωμοαιθοξυ-κουμαρινικών παραγώγων (**21a-21b**) πραγματοποιείται μέσω αντίδρασης σύνθεσης αιθέρων κατά Williamson.

- Σύνθεση των νέων αμινοαιθοξυ-κουμαρινικών παραγώγων (**22a-22c**)



Σχήμα 3.11 Συνθετική πορεία των νέων αμινοαιθοξυ-κουμαρινικών παραγώγων.

Η σύνθεση των νέων αμινοαιθοξυ-κουμαρινικών παραγώγων (**22a-22c**) πραγματοποιήθηκε μέσω αντίδρασης μεταξύ των εκάστοτε 7-βρωμοαιθοξυ-κουμαρινικών παραγώγων (**21a-21b**) και κατάλληλα υποκατεστημένων πρωτοταγών αμινών (**16a-16b**) σε διαλύτη ακετονιτρίλιο και αναλογία 1.6:1.5, παρουσία ανθρακικού καλίου.

3.4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ-ΣΥΖΗΤΗΣΗ

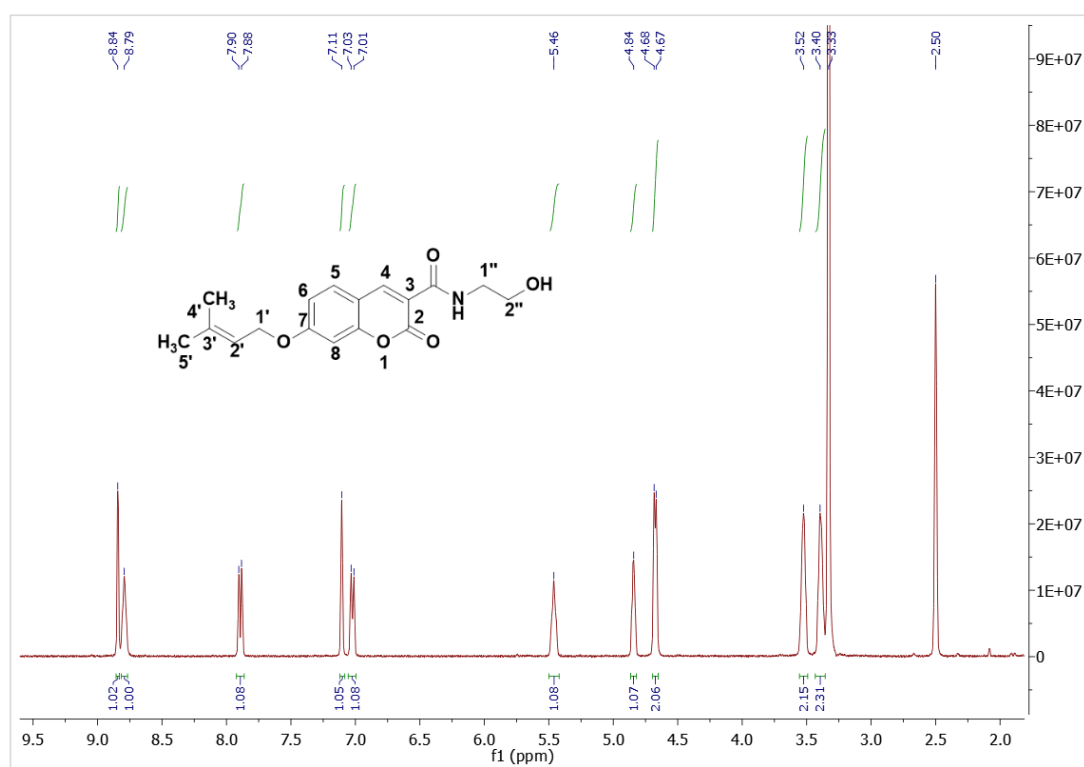
3.4.1 Σύνθεση των νέων κουμαρινικών αναλόγων

Σύμφωνα με τις μεθόδους που αναφέρθηκαν προηγουμένως συντέθηκαν πέντε νέα κουμαρινικά καρβοξαμίδια που ανήκουν στη Σειρά Γ και τρία νέα αμινοαιθοξυ κουμαρινικά ανάλογα που ανήκουν στη Σειρά Δ.

Για τη Σειρά Γ, τα νέα κουμαρινικά ανάλογα παραλήφθηκαν σε υψηλή καθαρότητα μέσω ανακρυστάλλωσης σε ικανοποιητικές αποδόσεις μεταξύ 40-50%. Για τη Σειρά Δ, τα νέα κουμαρινικά ανάλογα παραλήφθηκαν έπειτα από καθαρισμό με χρωματογραφία στήλης σε αποδόσεις μεταξύ 40-60%. Τέλος, ταυτοποιήθηκαν και χαρακτηρίστηκαν δομικά μέσω φασματοσκοπίας πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού πρωτονίου και άνθρακα (^1H NMR και ^{13}C NMR), καθώς και φασματομετρίας μάζας υψηλής ανάλυσης (HR-MS).

3.4.2 Φασματοσκοπική μελέτη των νέων κουμαρινικών αναλόγων

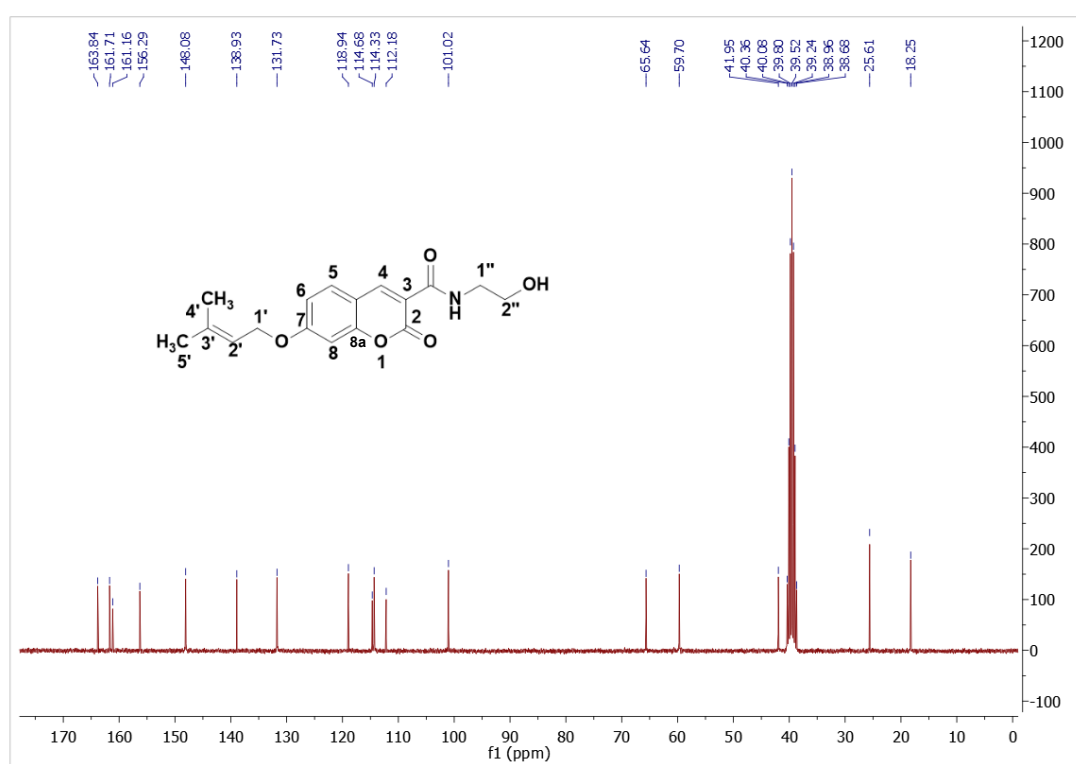
Ακολουθεί φασματοσκοπική μελέτη πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού ^1H και ^{13}C NMR των ενώσεων **17a**, **17e** και **22a** (Εικόνες 3.3 – 3.7).



Εικόνα 3.3 Φάσμα ^1H NMR N-(2-υδροξαιθυλο)-7-((3-μεθυλοβουτ-2-εν-1-υλ)οξυ)-2-οξο-2H-χρωμεν-3-καρβοξαμίδιου (**17a**).

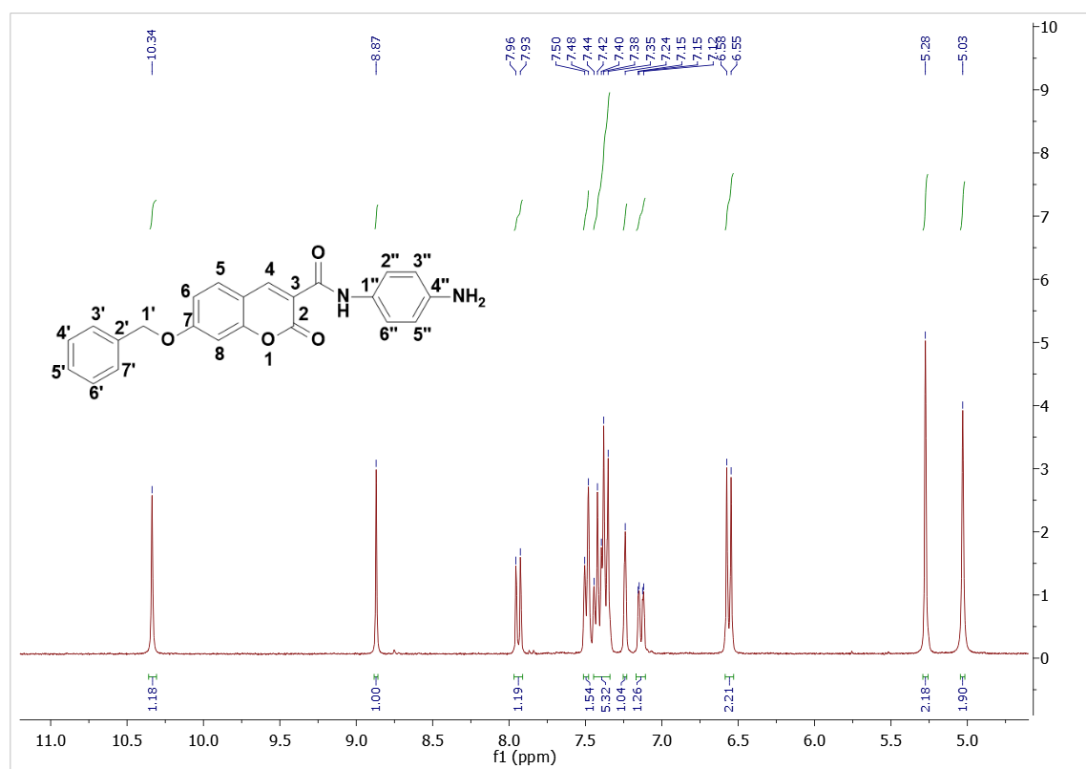
Το φάσμα ^1H της ένωσης **17a** (Εικόνα 3.3), χαρακτηρίζεται από την παρουσία δύο απλών κορυφών σε δ_{H} 1.73 και 1.76 ppm, οι οποίες αποδίδονται στα τρία ισοδύναμα πρωτόνια των μεθυλίων της πρενυλοξυ-ομάδας στις θέσεις 4' και 5' αντίστοιχα. Οι ευρείες κορυφές σε δ_{H} 3.40 και 3.52 ppm αποδίδονται στα αλειφατικά πρωτόνια τα οποία βρίσκονται στις θέσεις 1'' και 2''. Η διπλή κορυφή σε δ_{H} 4.68 ppm αποδίδεται στα δύο ισοδύναμα αλειφατικά πρωτόνια της θέσης 1', ενώ η ευρεία κορυφή σε δ_{H} 4.84 ppm αποδίδεται στο πρωτόνιο του υδροξυλίου της υδροξυαιθυλο-αλυσίδας. Επίσης, η ευρεία κορυφή σε δ_{H} 5.46 ppm, αποδίδεται στο πρωτόνιο της θέσης 2'.

Στην αρωματική περιοχή, η διπλή κορυφή σε δ_{H} 7.02 ppm αντιστοιχεί στο H-6, ενώ το H-8 εμφανίζεται ως απλή κορυφή σε δ_{H} 7.11 ppm. Η διπλή κορυφή σε δ_{H} 7.89 ppm αποδίδεται στο H-5, , ενώ η ευρεία κορυφή σε δ_{H} 8.79 αποδίδεται στο αμιδικό πρωτόνιο, και η απλή κορυφή σε δ_{H} 8.84 ppm αποδίδεται στο H-4.



Εικόνα 3.4 Φάσμα ^{13}C NMR N-(2-υδροξυαιθυλο)-7-((3-μεθυλοβουτ-2-εν-1-υλ)οξυ)-2-οξο-2H-χρωμεν-3-καρβοξαμιδίου (**17a**).

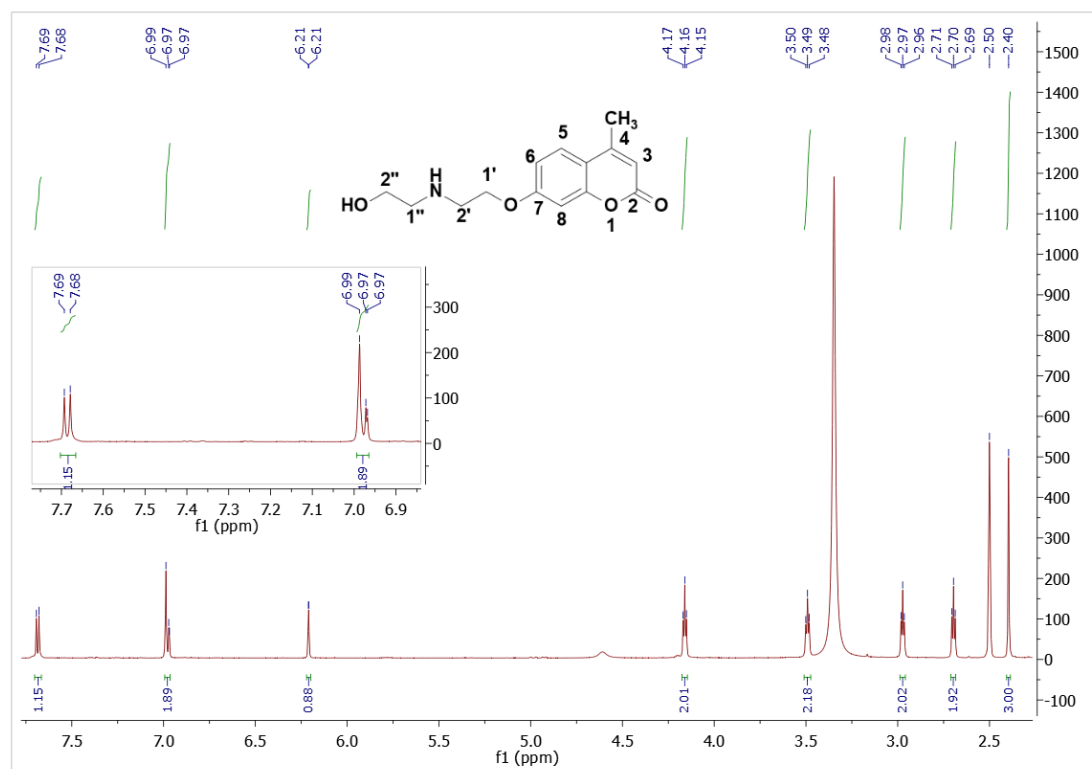
Στο φάσμα ^{13}C NMR του N-(2-υδροξυαιθυλο)-7-((3-μεθυλοβουτ-2-εν-1-υλ)οξυ)-2-οξο-2H-χρωμεν-3-καρβοξαμιδίου (**17a**) (Εικόνα 3.4), οι τέσσερις κορυφές συντονισμού στο εύρος δ_{C} 163.94 -156.29 ppm αποδίδονται στους περισσότερο αποθωρακισμένους άνθρακες και πιο συγκεκριμένα στους δύο άνθρακες των καρβονυλίων, στον άνθρακα της θέσης 7, καθώς και στον άνθρακα της θέσης 8a. Ακόμη, χαρακτηριστικές είναι οι κορυφές που παρουσιάζονται μεταξύ 65.64 ppm και 41.95 ppm και αποδίδονται στους άνθρακες των θέσεων 1', 1'' και 2'', ενώ σε δ_{C} 25.61 ppm και 18.25 ppm εμφανίζονται οι κορυφές συντονισμού των μεθυλοομάδων.



Εικόνα 3.5 Φάσμα ¹H NMR N-(4-αμινοφαινυλο)-7-(βενζυλοξυ)-2-οξο-2H-χρωμεν-3-καρβοξαμίδιου (**17e**).

Το φάσμα ¹H της ένωσης **17e** (Εικόνα 3.5) χαρακτηρίζεται από την παρουσία μίας απλής κορυφής σε δ_H 5.03 ppm, η οποία αποδίδεται στα πρωτόνια της αμινομάδας της θέσης 4''. Η απλή κορυφή σε δ_H 5.28 ppm, αποδίδεται στα δύο ισοδύναμα αλειφατικά πρωτόνια της θέσης 1'. Η διπλή κορυφή σε χημική μετατόπιση 6.57 ppm αντιστοιχεί στα ισοδύναμα αρωματικά πρωτόνια H-3'' και H-5''. Η διπλή διπλών κορυφή που εμφανίζεται σε δ_H 7.14 ppm αποδίδεται στο H-6, που εμφανίζει σύζευξη με το γειτονικό πρωτόνιο (H-5) και J4 σύζευξη με το H-8.

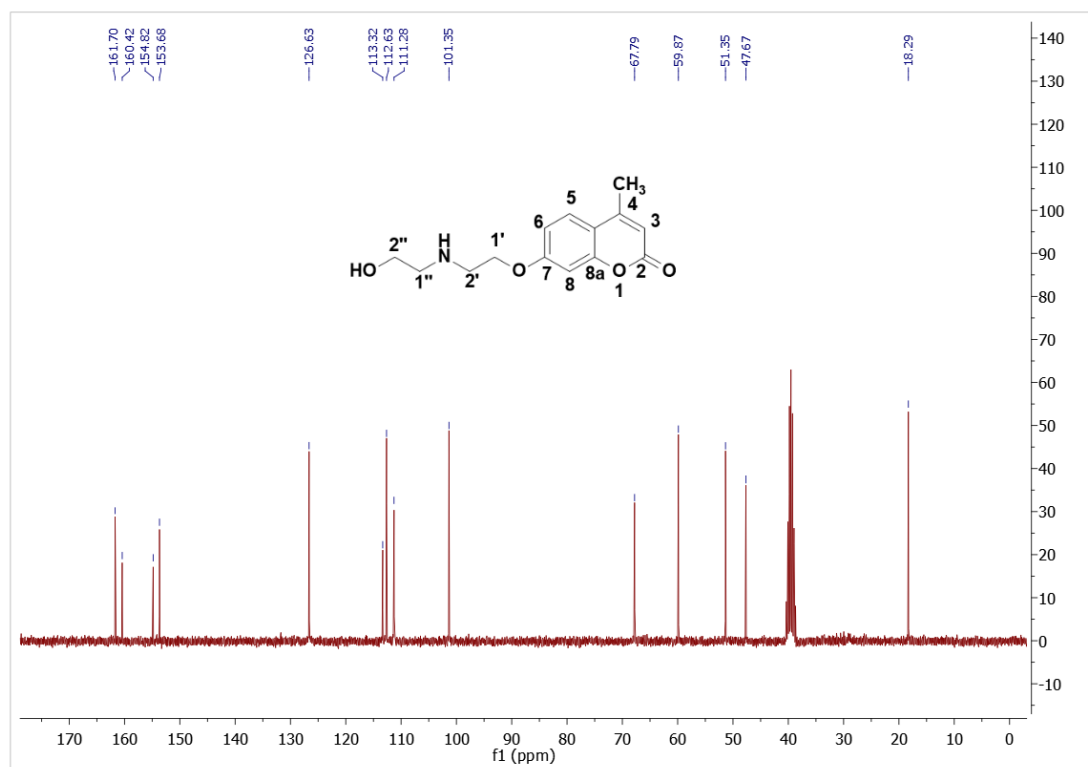
Η απλή κορυφή σε δ_H 7.24 ppm αποδίδεται στο H-8 ενώ στο εύρος 7.44-7.35 ppm εμφανίζεται μία πολλαπλή κορυφή που αποδίδεται στα πρωτόνια του βενζολικού δακτυλίου (H-3'-H-7'). Η διπλή κορυφή σε δ_H 7.49 ppm αντιστοιχεί στα ισοδύναμα αρωματικά πρωτόνια H- 2'' και H-6'', ενώ η διπλή κορυφή σε δ_H 7.95 ppm αποδίδεται στο H-5, και η απλή κορυφή σε δ_H 8.87 ppm αποδίδεται στο H-4. Τέλος, η απλή κορυφή σε δ_H 10.34 ppm αποδίδεται στο αμιδικό πρωτόνιο.



Εικόνα 3.6 Φάσμα ¹H NMR 7-(2-((2-υδροξυαιθυλ)αμινο)αιθοξυ)-4-μεθυλο-2H-χρωμεν-2-όνη (**22a**).

Το φάσμα ¹H της ένωσης **22a** (Εικόνα 3.6) χαρακτηρίζεται από μία απλή κορυφή σε δH 2.40 ppm, η οποία αποδίδεται στα τρία ισοδύναμα πρωτόνια του μεθυλίου της θέσης 4. Η τριπλή κορυφή σε δH 2.70 ppm αντιστοιχεί στα δύο πρωτόνια της θέσης 1'' και η τριπλή κορυφή σε δH 2.97 ppm αποδίδεται στα δύο αλειφατικά πρωτόνια της θέσης 2'. Η τριπλή κορυφή σε δH 3.49 ppm αποδίδεται στα πρωτόνια H-2'' και η τριπλή κορυφή σε δH 4.16 ppm αποδίδεται στα πρωτόνια H-1'.

Η απλή κορυφή σε δH 6.21 ppm αποδίδεται στο H-3 και η πολλαπλή κορυφή στο εύρος 6.97-6.99 ppm αποδίδεται στα δύο αρωματικά πρωτόνια των θέσεων 6 και 8. Τέλος, η πλέον αποθωρακισμένη διπλή κορυφή σε δH 7.69 ppm, αποδίδεται στο H-5.



Εικόνα 3.7 Φάσμα ^{13}C NMR 7-(2-((2-υδροξυαιθυλ)αμινο)αιθοξυ)-4-μεθυλο-2Η-χρωμεν-2-όνη (**22a**).

Στο φάσμα ^{13}C NMR της 7-(2-((2-υδροξυαιθυλ)αμινο)αιθοξυ)-4-μεθυλο-2Η-χρωμεν-2-όνης (**22a**) (Εικόνα 3.7). Οι τέσσερις κορυφές συντονισμού στο εύρος δε 161.70-153.68 ppm οποίες αποδίδονται στους άνθρακες των θέσεων 2, 4, 7, καθώς και στον άνθρακα της θέσης 8a. Οι κορυφές των υπόλοιπων ατόμων άνθρακα του κουμαρινικού σκελετού συντονίζονται στο εύρος 126.63-101.35 ppm, ενώ μεταξύ 67.79 ppm και 47.67 ppm παρουσιάζονται τέσσερις κορυφές που αποδίδονται στους άνθρακες των θέσεων 1', 2', 1'' και 2''. Τέλος σε δε 18.29 ppm εμφανίζεται η κορυφή συντονισμού της μεθυλο-ομάδας.

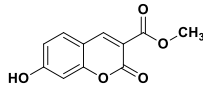
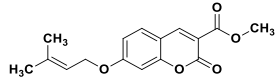
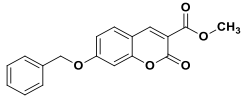
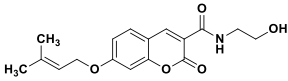
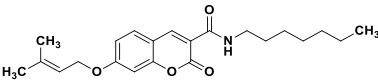
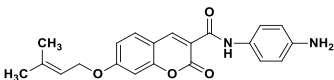
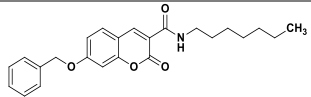
3.4.3 Αξιολόγηση της ικανότητας των νέων κουμαρινικών αναλόγων να αναστέλλουν τη δράση των ενζύμων ακετυλοχολινεστεράση (AChE) και βουτυρυλοχολινεστεράση (BuChE)

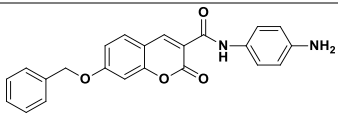
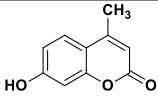
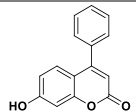
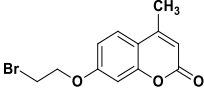
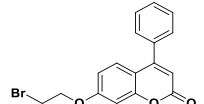
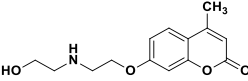
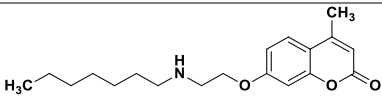
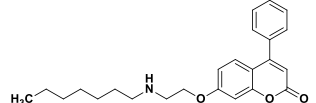
Τα νέα κουμαρινικά καρβοξαμίδια **17a-17e** της Σειράς Γ, καθώς και τα νέα αμινοαιθοξυ-κουμαρινικά ανάλογα **22a-22c** της Σειράς Δ, αλλά και τα αρχικά κουμαρινικά παράγωγα **13**, **15a**, **15b** και **20a**, **20b**, **21a** και **21b** εξετάστηκαν ως προς την ικανότητα τους να αναστέλλουν τη δράση του ενζύμου ακετυλοχολινεστεράση του οργανισμού *electrophorus electricus*, καθώς και τη δράση της βουτυρυλοχολινεστεράσης από ορό αλόγου *in vitro*. Τα συγκεκριμένα ένζυμα χρησιμοποιήθηκαν λόγω της ομοιότητας που παρουσιάζουν με τα αντίστοιχα ανθρώπινης προέλευσης [59,60].

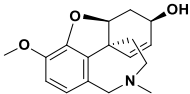
Τα κουμαρινικά παράγωγα εξετάστηκαν στη συγκέντρωση των 100 μM και όσα υπέδειξαν ανασταλτική δράση > 50% εξετάστηκαν σε μεγαλύτερο εύρος συγκεντρώσεων 100 μM - 5 μM , προκειμένου να υπολογιστεί η συγκέντρωση IC_{50} .

Τα αποτελέσματα της αξιολόγησης της ανασταλτικής δράσης των κουμαρινικών παραγώγων έναντι της ακετυλοχολινεστεράσης (AChE) και της βουτυρυλοχολινεστεράσης (BuChE) παρατίθενται στον Πίνακα 3.1.

Πίνακας 3.1 Αξιολόγηση της ικανότητας των κουμαρινικών αναλόγων των Σειρών Γ και Δ να αναστέλλουν τη δράση των ενζύμων AChE και BuChE (%) σε συγκέντρωση 100 μM και IC₅₀ (μM).

Ένωση	Χημική δομή	(%) Αναστολή AChE (100 μM)	Αναστολή AChE IC ₅₀ (μM)	(%) Αναστολή BuChE (100 μM)	Αναστολή BuChE IC ₅₀ (μM)
<u>ΣΕΙΡΑ Γ</u>					
13		36.9 ± 9.6	-	48.6 ± 3.6	-
15a		41.0 ± 5.6	-	50.3 ± 1.0	100.0 ± 1.4
15b		40.2 ± 5.6	-	37.4 ± 2.2	-
17a		70.4 ± 2.0	34.9 ± 5.2	no	-
17b		19.1 ± 0.5	-	22.1 ± 1.3	-
17c		55.4 ± 1.2	81.7 ± 1.6	62.4 ± 4.8	61.8 ± 2.2
17d		28.1 ± 3.4	-	69.8 ± 3.8	15.2 ± 1.6

17e		25.1 ± 2.3	-	9.6 ± 0.7	-
<u>ΣΕΙΡΑ Δ</u>					
20a		39.1 ± 4.8	-	no	-
20b		39.9 ± 2.6	-	48.8 ± 3.0	-
21a		39.7 ± 2.2	-	no	-
21b		28.3 ± 1.5	-	50.3 ± 1.2	100.0 ± 1.8
22a		71.8 ± 2.3	41.5 ± 1.9	46.9 ± 0.1	-
22b		54.3 ± 4.3	94.2 ± 5.5	18.4 ± 2.2	-
22c		68.2 ± 2.6	45.4 ± 1.3	89.6 ± 0.3	10.0 ± 1.1

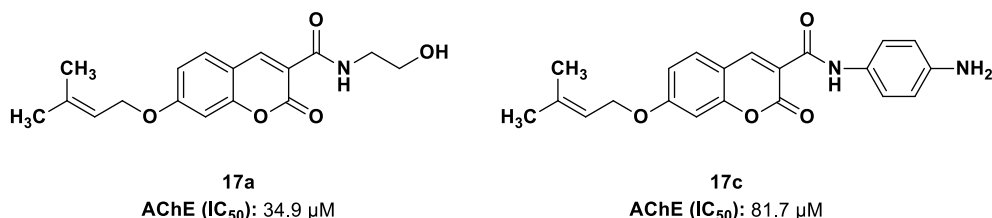
Γαλανταμίνη		-	0.92 ± 0.1	-	n.t.
Τακρίνη		-	0.033 ± 0.001	-	0.005 ± 0.001

Νο: Η ένωση δεν έδειξε δράση στις συγκεκριμένες πειραματικές συνθήκες
n.t.: not tested (δεν εξετάστηκε)

Αρχικά, για τη Σειρά Γ, διαπιστώνεται ότι οι αρχικές ενώσεις **13**, **15a** και **15b** εμφανίζουν σχετικά χαμηλή ικανότητα αναστολής του ενζύμου της ακετυλοχολινεστεράσης, καθώς για συγκέντρωση 100 μM το ποσοστό αναστολής κυμαίνεται από 37% έως 41%.

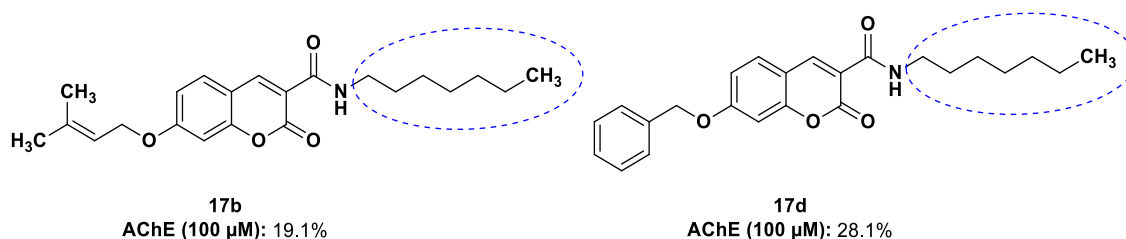
Όσον αφορά τα κουμαρινικά καρβοξαμίδια (**17a-17e**), παρατηρείται ότι τα βενζυλοξυ παράγωγα εμφανίζουν πολύ χαμηλές τιμές αναστολής της δράσης της AChE στη συγκέντρωση των 100 μM . Πιο συγκεκριμένα, το παράγωγο **17d** εμφάνισε 28% ικανότητα αναστολής του ενζύμου της ακετυλοχολινεστεράσης, ενώ το παράγωγο **17e** εμφάνισε 25% ικανότητα αναστολής.

Ωστόσο, για τα πρενυλοξυ-κουμαρινικά παράγωγα που συντέθηκαν (**17a-17c**), τα ποσοστά αναστολής για συγκέντρωση 100 μM κυμαίνονται από 19-70%. Χαμηλότερη δράση επιδεικνύει η ένωση **17b**, η οποία εμφανίζει ποσοστό αναστολής 19.1%. Αντίθετα, η **17c** εμφανίζει ικανοποιητική δράση, με τιμή IC_{50} 81.7 μM . Η ένωση **17a** αποτελεί τον ικανότερο αναστολέα της Σειράς Γ καθώς αναστέλλει τη δράση του ενζύμου κατά 70.4% σε συγκέντρωση 100 μM και εμφανίζει τιμή IC_{50} 34.9 μM (Σχήμα 3.12).



Σχήμα 3.12 Χημική δομή των ενώσεων **17a** και **17c** που αποτελούν τους καλύτερους αναστολείς της AChE μεταξύ των μορίων της Σειράς Γ.

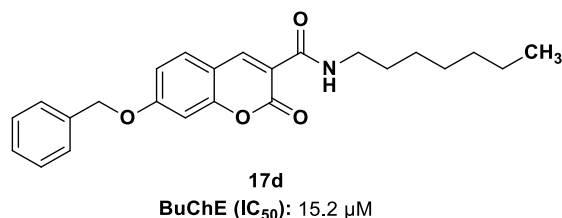
Τέλος, συγκρίνοντας την **17b**, το μόνο πρενυλοξυ-κουμαρινικό καρβοξαμίδιο που δεν επέδειξε ανασταλτική δράση, με το βενζυλοξυ-ανάλογό της, **17d**, το οποίο επίσης βρέθηκε ανενεργό, συμπεραίνεται ότι η υποκατάσταση με επτυλο-αλυσίδα στη συγκεκριμένη θέση δεν ευνοεί την αντι-AChE δράση (Σχήμα 3.13).



Σχήμα 3.13 Χημική δομή των ενώσεων **17b** και **17d**, οι οποίες εμφάνισαν χαμηλή ικανότητα αναστολής της δράσης της AChE.

Σχετικά με την ικανότητά των μορίων της Σειράς Γ να αναστέλλουν τη δράση της βουτυρυλοχολινεστεράσης, παρατηρείται ότι τα κουμαρινικά παράγωγα **13** και **15a** παρουσίασαν υψηλότερη δράση (49% και 50%) απ' ό τι έναντι της AChE (40% και 29%), αντίστοιχα στη συγκέντρωση των 100 μM . Ακόμη, ενδιαφέρουσα παρατήρηση αποτελεί το γεγονός ότι τα κουμαρινικά-καρβοξαμίδια επέδειξαν διαφορετική συμπεριφορά ανάλογα με την υποκατάστασή τους. Ειδικότερα, ενώ

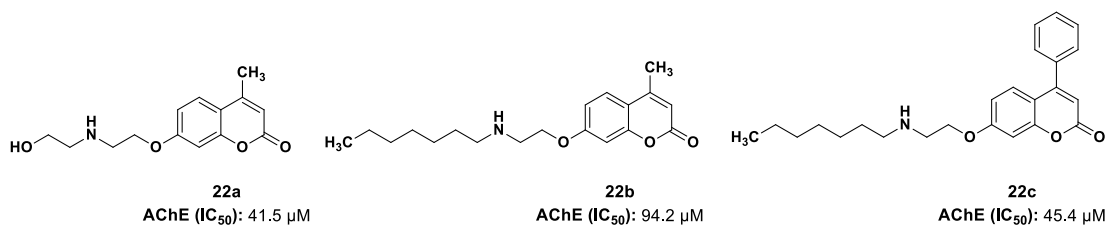
τα παράγωγα **17b** και **17e** παρουσίασαν χαμηλή τιμή αναστολής (10-20%) και των δύο ενζύμων, το παράγωγο **17c** αποτελεί ικανοποιητικό αναστολέα και στις δύο περιπτώσεις (AChE: IC₅₀ 81.7 μM & BuChE: IC₅₀ 61.8 μM). Τέλος, το παράγωγο **17a** αποτελεί εκλεκτικό αναστολέα της AChE (IC₅₀ 34.9 μM), ενώ το παράγωγο **17d** εκλεκτικό και ισχυρό αναστολέα της BuChE με τιμή IC₅₀ 15.2 μM (Σχήμα 3.14).



Σχήμα 3.14 Χημική δομή του ισχυρότερου αναστολέα της BuChE, μεταξύ των μορίων της Σειράς Γ, **17d**.

Μεταξύ των μορίων της Σειράς Δ, παρατηρείται ότι οι αρχικές ενώσεις **20a**, **20b**, **21a** και **21b** εμφανίζουν σχετικά χαμηλή ικανότητα αναστολής του ενζύμου της ακετυλοχολινεστεράσης, καθώς για συγκέντρωση 100 μM το ποσοστό αναστολής κυμαίνεται από 28% έως 40%.

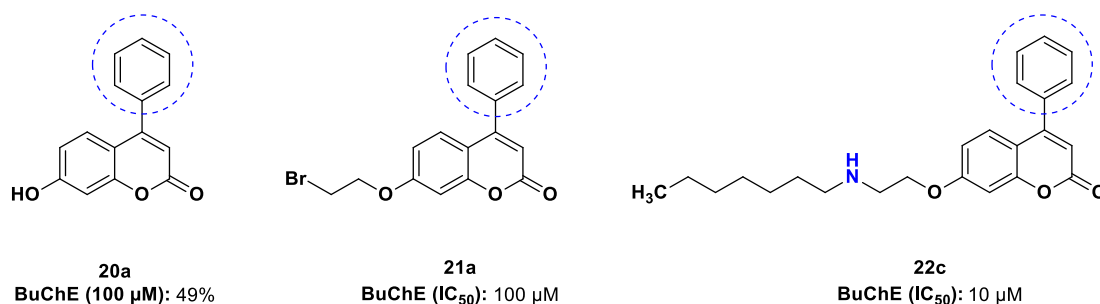
Τα νέα αμινοαιθοξυ-κουμαρινικά παράγωγα **22a-22c** αποτέλεσαν ικανοποιητικούς αναστολείς της ακετυλοχολινεστεράσης. Πιο συγκεκριμένα, το παράγωγο **22a** επέδειξε 71.8% ικανότητα αναστολής της δράσης της ακετυλοχολινεστεράσης σε συγκέντρωση 100 μM και τιμή IC₅₀ 41.5 μM. Παρόμοια τιμή IC₅₀ (45.4 μM) παρουσίασε το παράγωγο **22c**, ενώ το μεθυλο-ανάλογό του **22b** εμφάνισε τιμή IC₅₀ 94.2 μM (Σχήμα 3.15).



Σχήμα 3.15 Χημική δομή ενώσεων **22a**, **22b** και **22c**.

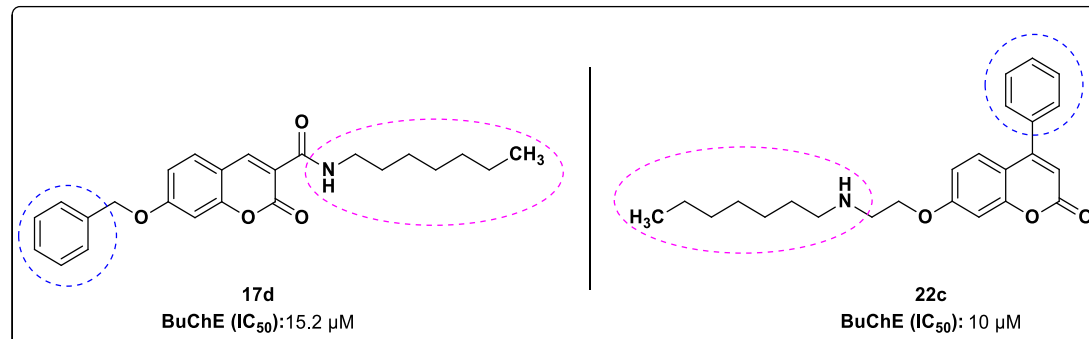
Σχετικά με την ικανότητά των μορίων της Σειράς Δ, να αναστέλλουν τη δράση της βουτυρυλοχολινεστεράσης, παρατηρείται ότι τα 4-μεθυλο κουμαρινικά ανάλογα **20a** και **21a** δεν παρουσίασαν δράση έναντι της BuChE, ενώ τα 4-φαινυλο ανάλογά τους επέδειξαν ικανοποιητική τιμή αναστολής της BuChE (~50%) στη συγκέντρωση των 100 μM. Ακόμη, είναι εξαιρετικά ενδιαφέρον το γεγονός ότι η παρουσία φαινυλο ομάδας στη θέση 4 του κουμαρινικού σκελετού φαίνεται να συμβάλλει στην ικανότητα αναστολής της δράσης της BuChE και για την περίπτωση των νέων αμινοαιθοξυ-κουμαρινικών παραγώγων. Ειδικότερα, το 4-φαινυλο παράγωγο **22c** αποτελεί τον ικανότερο αναστολέα της BuChE μεταξύ των εξεταζόμενων μορίων με τιμή IC₅₀ 10 μM, καθώς τα 4-μεθυλο παράγωγα **22a** και **22b** ήταν ανενεργά.

Ακόμη, τα 4-φαινυλο ανάλογα της Σειράς Δ παρουσίασαν ικανοποιητική δράση έναντι της BuChE, με το νέο αμινοαιθοξυ-παράγωγο **22c** ωστόσο, το οποίο διαθέτει αμινομάδα και η οποία αποτέλεσε βασικό δομικό χαρακτηριστικό για το σχεδιασμό των μορίων της Σειράς Δ καθώς σχετίζεται με την ικανότητα δέσμευσης στο ενεργό κέντρο των χολινεστερασών [55], να αποτελεί τον ισχυρότερο αναστολέα (IC_{50} 10 μ M) (Σχήμα 3.16).



Σχήμα 3.16 Επίδραση της παρουσίας 4-φαινυλο ομάδας καθώς και αμινομάδας στην ανασταλτική δράση έναντι της BuChE.

Τέλος, είναι αξιοσημείωτο ότι η παρουσία τόσο φαινυλο όσο και επτυλο ομάδας στον κουμαρινικό σκελετό φαίνεται να βελτιώνει σημαντικά την ικανότητα αναστολής της δράσης της βουτυρυλοχολινεστεράσης, καθώς οι δύο ικανότεροι αναστολείς της BuChE, **17d** και **22c**, διαθέτουν αυτό το συνδυασμό υποκατάστασης αν και σε διαφορετικές θέσεις του κουμαρινικού σκελετού (Σχήμα 3.17).

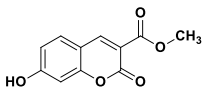
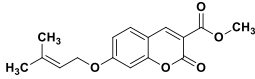
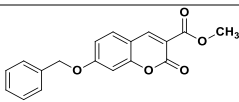
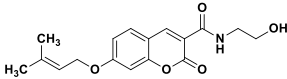
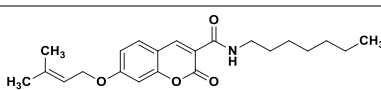
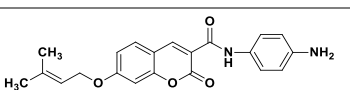
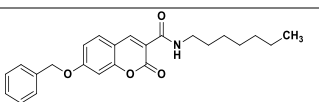
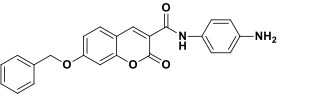
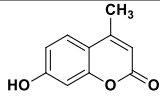
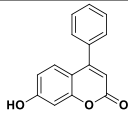
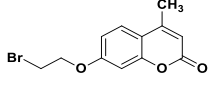
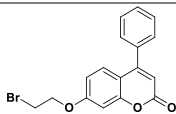
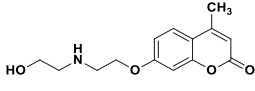
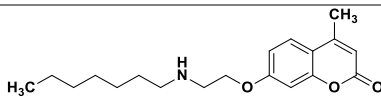


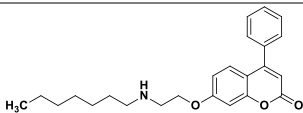
Σχήμα 3.17 Χημική δομή καλύτερων αναστολέων της BuChE, **17d** και **22c**.

3.4.4 Πρόβλεψη φυσικοχημικών ιδιοτήτων

Για την πρόβλεψη των φαρμακολογικών ιδιοτήτων [61,62] των νέων κουμαρινικών παραγώγων, έγινε χρήση των υπολογιστικών εργαλείων *SwissADME* (<http://www.swissadme.ch/>) και *pkCSM* (<http://biosig.unimelb.edu.au/pkcsml/>). Ειδικότερα, έγινε πρόβλεψη του συντελεστή λιποφιλίας και της δυνατότητας απορρόφησης εκ στόματος (*per os*) βάσει των κανόνων των Lipinski [63] και Veber [64] καθώς και της δυνατότητας διαπέρασης του αιματοεγκεφαλικού φραγμού. Παρακάτω παρατίθενται οι εκτιμώμενες φυσικοχημικές, σύμφωνα με το εργαλείο *SwissADME* για τα κουμαρινικά ανάλογα των σειρών Γ και Δ (Πίνακας 3.2).

Πίνακας 3.2 Εκτιμώμενες φυσικοχημικές ιδιότητες ενώσεων των σειρών Γ και Δ.

Ένωση	Χημική δομή	MW ¹ (g/mol)	logP ²	N _{OH,NH} ³	N _{O,N} ⁴	N _{rot,b} ⁵	PSA (Å ²) ⁶
13		220.18	1.48	1	5	2	76.74
15a		288.30	3.05	0	5	5	65.74
15b		310.30	3.14	0	4	5	65.74
17a		317.34	2.29	2	6	6	88.77
17b		371.47	4.78	1	5	10	68.54
17c		364.40	3.40	3	6	5	94.56
17d		393.48	4.86	1	5	10	68.54
17e		386.40	3.40	3	6	5	94.56
20a		176.17	1.81	1	3	0	50.44
20b		238.24	2.89	1	3	1	50.44
21a		283.12	2.94	0	3	3	39.44
21b		345.19	4.00	0	3	4	39.44
22a		263.29	1.63	2	5	6	71.70
22b		317.42	4.15	1	4	10	51.47

22c		379.49	5.07	1	4	11	51.47
-	Γαλανταμίνη	287.35	1.92	1	4	1	41.93
-	Δονεπεζίλη	379.50	4.00	0	4	6	38.78
-	Ριβαστιγμίνη	250.34	2.34	0	4	5	32.78

¹MW: Μοριακό βάρος

²logP: Συντελεστής μερισμού, ενδεικτικός της λιποφιλικότητας

³N_{OH,NH}: Θέσεις δοτών πρωτονίου σε δεσμό υδρογόνου

⁴N_{O,N}: Θέσεις δεκτών πρωτονίου σε δεσμό υδρογόνου

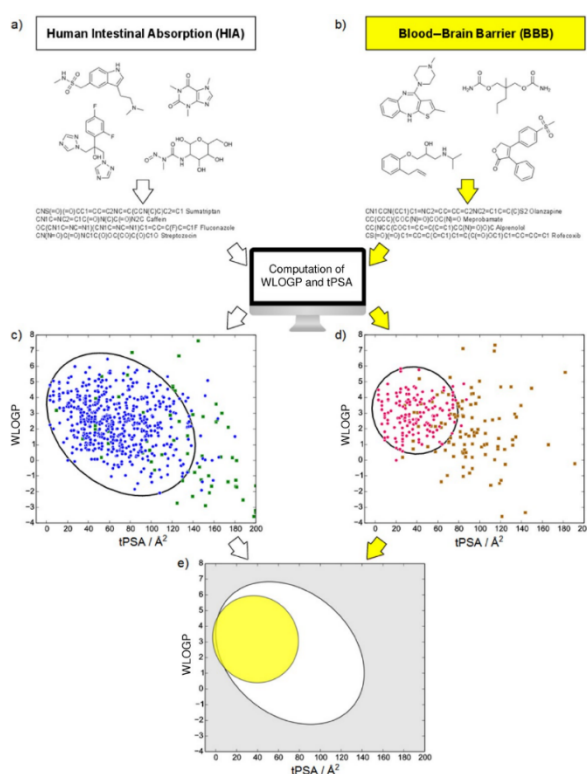
⁵N_{rot,b}: Αριθμός περιστρεφόμενων δεσμών

⁶PSA: Εμβαδόν της πολικής επιφάνειας (polar surface area, PSA)

Από τα παραπάνω δεδομένα, φαίνεται ότι μόνο η ένωση **22c** παραβιάζει το κριτήριο της τιμής logP (5.07) του Lipinski, καθώς και του αριθμού περιστρεφόμενων δεσμών (11) του Weber, ενώ οι υπόλοιπες ενώσεις δεν παραβιάζουν κανένα από τα κριτήρια και κρίνονται κατάλληλες για χορήγηση εκ του στόματος.

Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκε η πρόβλεψη της διαπερατότητας του αιματοεγκεφαλικού φραγμού (ΑΕΦ) μέσω της παραμέτρου logBB, από το υπολογιστικό εργαλείο *pkCSM* που αναπτύχθηκε από το Πανεπιστήμιο της Μελβούρνης σε συνεργασία με το Πανεπιστήμιο του Κέιμπριτζ (Πίνακας 3.3). Η αξιολόγηση γίνεται ως εξής:

- logBB>0.3: καλή διαπερατότητα ΑΕΦ
- logBB<-1: χαμηλή διαπερατότητα ΑΕΦ



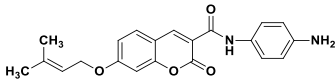
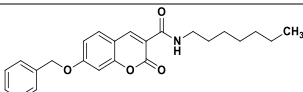
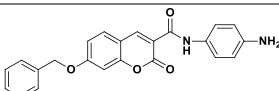
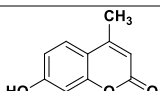
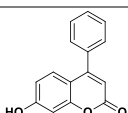
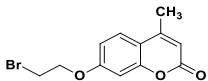
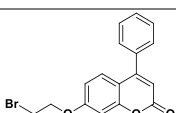
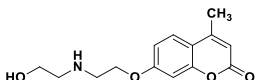
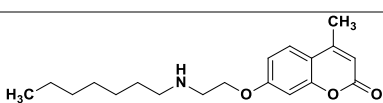
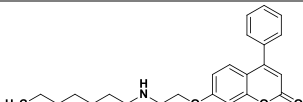
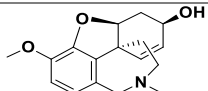
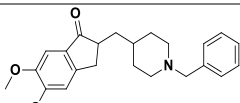
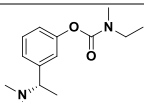
Εικόνα 3.8 Μέθοδος BOILED-Egg.

με υψηλότερη πιθανότητα απορρόφησης από την γαστρεντερική οδό, και την εσωτερική («κρόκος») το φυσικοχημικό χώρο των μορίων με την υψηλότερη πιθανότητα διαπέρασης του ΑΕΦ (Εικόνα 3.8).

Σε μία διαφορετική προσέγγιση για την πρόβλεψη της διαπερατότητας του ΑΕΦ, έγινε εκ νέου χρήση του υπολογιστικού εργαλείου *SwissADME*, το οποίο αναπτύχθηκε από το *Molecular Modeling Group* του Ελβετικού Ινστιτούτου Βιοπληροφορικής (Πίνακας 3.3). Το συγκεκριμένο εργαλείο χρησιμοποιεί τη μέθοδο *Brain Or Intestinal EstimateD permeation method* (ή *BOILED-Egg*), σύμφωνα με την οποία η γαστρεντερική και η εγκεφαλική απορρόφηση προβλέπονται μέσω υπολογισμού του συντελεστή μερισμού $\log P$ και του εμβαδού της τοπολογικής πολικής επιφάνειας $TPSA$. Η γραφική αναπαράσταση των σημείων αυτών δίνει δύο ελλειπτικές περιοχές, με την εξωτερική («ασπράδι») να αποτελεί το φυσικοχημικό χώρο των μορίων

Πίνακας 3.3 Πρόβλεψη εγκεφαλικής διαπερατότητας ενώσεων των Σειρών Γ και Δ.

Ένωση	Χημική δομή	$\log BB$	Διαπερατότητα ΑΕΦ βάσει μεθόδου BBOILED-Egg
13		-0.405	X
15a		-0.046	✓
15b		0.051	✓
17a		-0.687	X
17b		-0.346	✓

17c		-0.257	✓
17d		-0.360	✓
17e		-0.238	X
20a		0.201	✓
20b		0.164	✓
21a		0.211	✓
21b		0.204	✓
22a		-0.372	X
22b		0.071	✓
22c		0.056	✓
Γαλανταμίνη		0.706	✓
Δονεπεζίλη		0.366	✓
Ριβαστιγμίνη		0.241	✓

Εξετάζοντας τα αποτελέσματα του παραπάνω πίνακα, αρχικά παρατηρείται ότι όλα τα κουμαρινικά παράγωγα παράγωγα παρουσιάζουν τιμή logBB μεταξύ των κρίσιμων ορίων. Όσον αφορά τα παράγωγα **17a**, **17d**, **22a** και **22c**, τα οποία εμφάνισαν και την υψηλότερη ανασταλτική δράση έναντι των χολινεστερασών, παρατηρείται ότι παρουσιάζουν ικανοποιητική τιμή logBB, ενώ σύμφωνα με τη μέθοδο BOILED-egg οι ενώσεις **17a** και **22a** δε δύνανται να διαπεράσουν το αιματοεγκεφαλικό φραγμό.

Σε αυτό το πλαίσιο, κατάλληλες δομικές τροποποιήσεις ή ενσωμάτωση στην κατάλληλη φαρμακοτεχνική μορφή ενδέχεται να βελτιώσουν τη συμπεριφορά των μορίων ώστε να επιτυγχάνεται η διέλευση τους μέσω του ΑΕΦ, στους χολινεργικούς νευρώνες.

Τέλος, ως μερική επιβεβαίωση της μεθόδου εξετάστηκαν οι αντίστοιχες παράμετροι και για τις τρεις φαρμακευτικές ενώσεις-αναστολείς της ακετυλοχολινεστεράσης (γαλανταμίνη, δονεπεζίλη, ριβαστιγμίνη) για τις οποίες και οι δύο διαφορετικές μέθοδοι συγκλίνουν στο ότι είναι ικανές να διαπεράσουν τον αιματοεγκεφαλικό φραγμό.

3.4.5 Μελέτη μοριακής πρόσδεσης των κουμαρινικών αναλόγων στο ένζυμο hAChE

Τα κουμαρινικά ανάλογα που παρουσίασαν ισχυρότερη δράση *in vitro* έναντι του ενζύμου της ακετυλοχολινεστεράσης από τον οργανισμό *electrophorus electricus* (eeAChE), εξετάστηκαν μέσω πειραμάτων μοριακής πρόσδεσης ως προς τις αλληλεπιδράσεις τους με το ενεργό κέντρο του ανθρώπινου ενζύμου (hAChE), με εφαρμογή του προγράμματος Glide [Glide, Schrodinger, LLC, New York, NY, 2014].

3.4.5.1 Σύγκριση eeAChE και hAChE

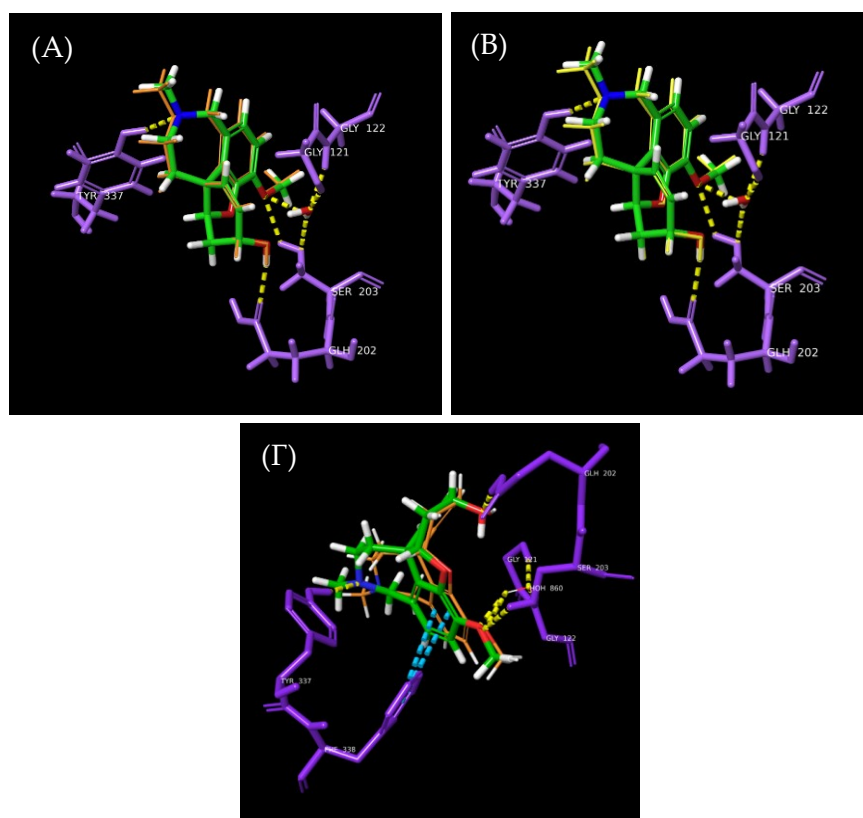
Η σύγκριση της αλληλουχίας της ακετυλοχολινεστεράσης από τον οργανισμό *electrophorus electricus* (eeAChE) και της AChE ανθρώπινης προέλευσης (hAChE), πραγματοποιήθηκε μέσω του εργαλείου Protein Blast (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), χρησιμοποιώντας τις αλληλουχίες των ενζύμων από τη βάση δεδομένων Uniprot (<https://www.uniprot.org/>). Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της μελέτης, τα ένζυμα παρουσιάζουν 60% ομολογία μεταξύ τους, ενώ είναι πολύ σημαντικό ότι η καταλυτική τριάδα αμινοξέων της hAChE (SER203, GLU334 και HIS447) είναι συντηρημένη και στο ένζυμο eeAChE (Εικόνα 3.9).

	203	334	447
hAChE	FGESAGAASV	KDEGSYFLVY	LWMGVPHIGYE
eeAChE	FGESAGAASV	QNEGSYFLIY	EWMGVVHIGYE

Εικόνα 3.9 Σύγκριση επιλεγμένων αλληλουχιών των hAChE και eeAChE.

3.4.5.2 Επικύρωση της μεθόδου πρόσδεσης

Αρχικά, για την επικύρωση της μεθόδου πρόσδεσης πραγματοποιήθηκαν πειράματα μοριακής πρόσδεσης της γαλανταμίνης. Για το σκοπό αυτό, χρησιμοποιήθηκε κρυσταλλογραφική δομή του συμπλόκου της AChE με τη γαλανταμίνη (PDB κωδικός: 4EY6, ανάλυση: 2.40 Å) από τη βάση δεδομένων RSCB Protein Data Bank (<https://www.rcsb.org/>). Εξετάστηκαν οι αλγόριθμοι πρότυπης ακρίβειας (standard precision, SP), υψηλής ακρίβειας (extra precision, XP) και επαγόμενης προσαρμογής (Induced-Fit Docking, IFD). Η υπέρθεση της διαμόρφωσης της γαλανταμίνης που προκύπτει από την εφαρμογή κάθε αλγορίθμου, στην κρυσταλλική διαμόρφωση, παρουσιάζεται στην Εικόνα 3.10.



Εικόνα 3.10 Υπέρθυση της διαμόρφωσης της γαλανταμίνης όπως εξήχθη από την κρυσταλλική δομή του συμπλόκου με την AChE (με πράσινο χρώμα) και της διαμόρφωσης που προκύπτει από την μοριακή πρόσδεση στο καταλυτικό κέντρο του ενζύμου (με πορτοκαλί χρώμα) μετά την εφαρμογή του αλγορίθμου πρόσδεσης: (A): SP, (B): XP και (Γ): IFD.

Η υπέρθεση των διαμορφώσεων κρίνεται ικανοποιητική κατόπιν εφαρμογής και των τριών αλγορίθμων και στη συνέχεια της μελέτης επιλέχθηκε η εφαρμογή του αλγορίθμου SP. Στον Πίνακα 3.4 παρουσιάζονται οι τιμές των σκορ πρόσδεσης (docking score) της γαλανταμίνης στην AChE που προέκυψαν μετά την εφαρμογή των διαφορετικών αλγορίθμων.

Πίνακας 3.4 Ενέργεια πρόσδεσης γαλανταμίνης στην AChE για κάθε αλγόριθμο.

Αλγόριθμος	SP	XP	IFD
Docking score	-7.667 kcal/mol	-7.400 kcal/mol	-10.907 kcal/mol

Η πρόσδεση της γαλανταμίνης στο ενεργό κέντρο της AChE σταθεροποιείται μέσω των ακόλουθων κρίσιμων αλληλεπιδράσεων:

- ✓ Η μεθοξυ ομάδα της γαλανταμίνης αλληλεπιδρά μέσω δεσμού-Η με το αμινοξύ της καταλυτικής τριάδας της AChE, **SER203** άμεσα αλλά μέσω ενός κρίσιμου μορίου ύδατος. Το ίδιο μόριο ύδατος γεφυρώνει αλληλεπιδράσεις

μέσω δεσμού-Η της φαρμακοφόρου ομάδας με τα αμινοξέα της περιοχής «oxyanion hole», **GLY121** και **GLY122**.

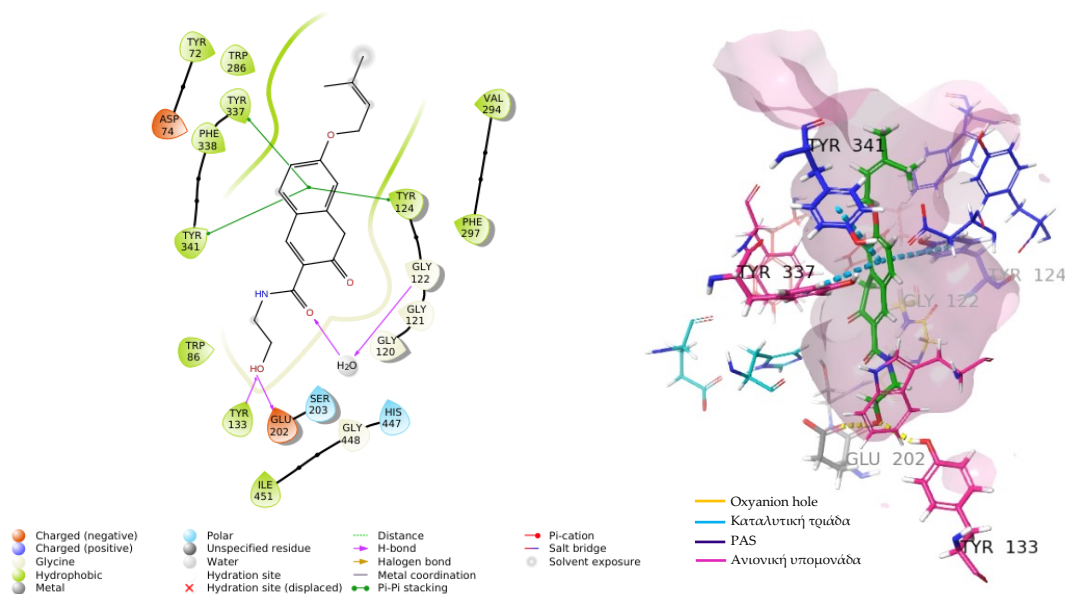
- ✓ Η τεταρτοταγής αμινομάδα της γαλανταμίνης αλληλεπιδρά μέσω δεσμού-Η με το αμινοξύ της ανιονικής υπομονάδας, **TYR337**, το οποίο είναι σημαντικό για την πρόσδεση της ακετυλοχολίνης στην AChE [23,65],
- ✓ Το υδροξύλιο της γαλανταμίνης σταθεροποιεί δεμό-Η με την πλευρική καρβοξυλομάδα του αμινοξέος **GLU202**, (στη γειτνίαση του καταλυτικού κέντρου)
- ✓

3.4.5.3 Μοριακή πρόσδεση των νέων αναλόγων στο ένζυμο AChE

Η μελέτη μοριακής πρόσδεσης των νέων κουμαρινών αναλόγων των Σειρών Γ και Δ που παρουσίασαν αξιολογη αντι-AChE δράση, πραγματοποιήθηκε με το πρόγραμμα Glide και τον αλγόριθμο πρότυπης ακρίβειας (standard precision, SP). Για την αξιολόγηση των αποτελεσμάτων ορίστηκαν ως κρίσιμα τα αμινοξέα της AChE με τα οποία αλληλεπιδρά η γαλανταμίνη (TYR337, GLU202, GLY121, GLY122), καθώς και αυτά τα οποία σύμφωνα με τη βιβλιογραφία παίζουν σημαντικό ρόλο στην πρόσδεση της ακετυλοχολίνης και στην κατάλυσή της από την AChE. Ειδικότερα:

- ✓ Η καταλυτική τριάδα αμινοξέων: GLU334, HIS447, SER203,
- ✓ Τα αμινοξέα της ανιονικής υπομονάδας, των «acyl pocket» και «oxyanion hole» που συντελούν στην πρόσδεση και σταθεροποίηση της ακετυλοχολίνης: TRP86, TYR133, TYR337, PHE338 & PHE295, PHE297 & GLY121, GLY122, ALA204,
- ✓ Τα αμινοξέα του Περιφερειακού Ανιονικού Κέντρου (PAS): TYR72, TYR124, TYR341, TRP286.

Τα ληφθέντα αποτελέσματα για τις ενώσεις **17a**, **17c**, **22a**, **22b** παρουσιάζονται στις Εικόνες 3.11-3.15, ενώ στους Πίνακες 3.5-3.9 καταγράφονται αναλυτικά οι αλληλεπιδράσεις κάθε κουμαρινικού αναλόγου με τα αμινοξέα του ενεργού κέντρου της AChE, καθώς και οι προκύπτουσες τιμές docking score (D.S.), ενώ συγκριτικά παρατίθενται και τα αντίστοιχα αποτελέσματα για τη γαλανταμίνη.

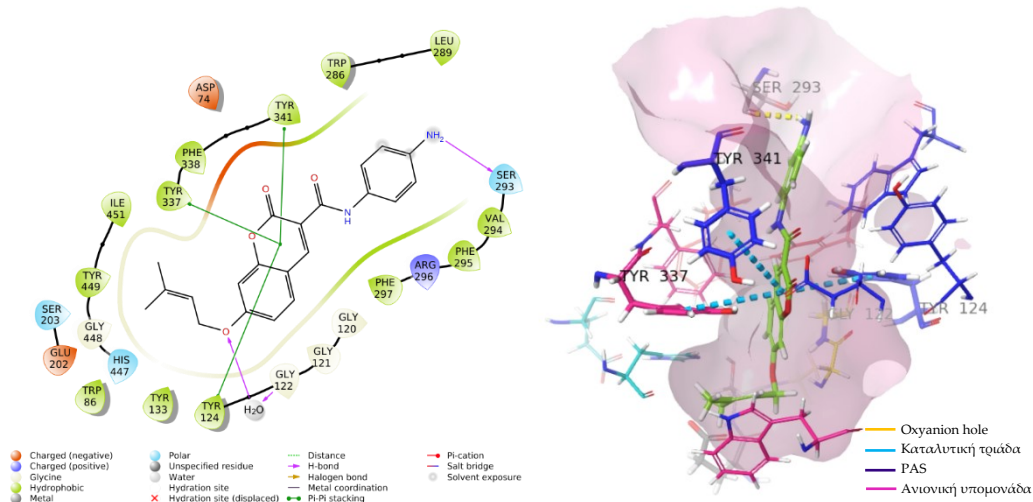


Εικόνα 3.11 Διδιάστατη (αριστερά) και τριδιάστατη (δεξιά) απεικόνιση της πρόσδεσης της **17a** (πράσινο χρώμα) στο ενεργό κέντρο της AChE.

Πίνακας 3.5 Αποτελέσματα μοριακής πρόσδεσης της **17a** στο ενεργό κέντρο της AChE.

Ένωση	D.S. (kcal/mol)	Αμινοξέα							
		TYR133	GLY121	GLY122	TYR124	GLU202	SER203	TYR337	TYR341
17a	-7.857	Δεσμός H	-	Δεσμός H μέσω H ₂ O	π-π	Δεσμός H	-	π-π	π-π
Γαλανταμίνη	-7.667	-	Δεσμός H μέσω H ₂ O	Δεσμός H μέσω H ₂ O	-	Δεσμός H	Δεσμός H	Δεσμός H	-

Η ένωση **17a**, η οποία παρουσίασε την ισχυρότερη ανασταλτική δράση έναντι της AChE (IC₅₀ 34.9 μM) κατά την πρόσδεσή της εμφανίζει πλήθος αλληλεπιδράσεων με αμινοξέα των υπομονάδων κατά μήκος όλου του «φαραγγιού» της AChE γεγονός που αντανακλάται και στο υψηλό docking score -7.857 kcal/mol. Ειδικότερα, ο αρωματικός δακτύλιος σταθεροποιείται στο «λαιμό» του ενζύμου μέσω π-π αλληλεπιδράσεων με τα αρωματικά αμινοξέα του PAS, TYR124 και TYR341, καθώς και με το κρίσιμο αμινοξύ της ανιονικής υπομονάδας, TYR337. Το αμιδικό καρβονύλιο αλληλεπιδρά με το «oxyanion hole» σχηματίζοντας δεσμό υδρογόνου, διαμεσολαβούμενου από το συντηρημένο μόριο ύδατος, με το κρίσιμο αμινοξύ GLY122 μιμούμενο τη γαλανταμίνη, ενώ τέλος η υδροξυλομάδα της **17a** σχηματίζει δεσμό υδρογόνου τόσο με την TYR133 (ανιονική υπομονάδα) όσο και με το κρίσιμο αμινοξύ GLU202 (στη γειτνίαση του καταλυτικού αμινοξέως SER203), όπως και η γαλανταμίνη.

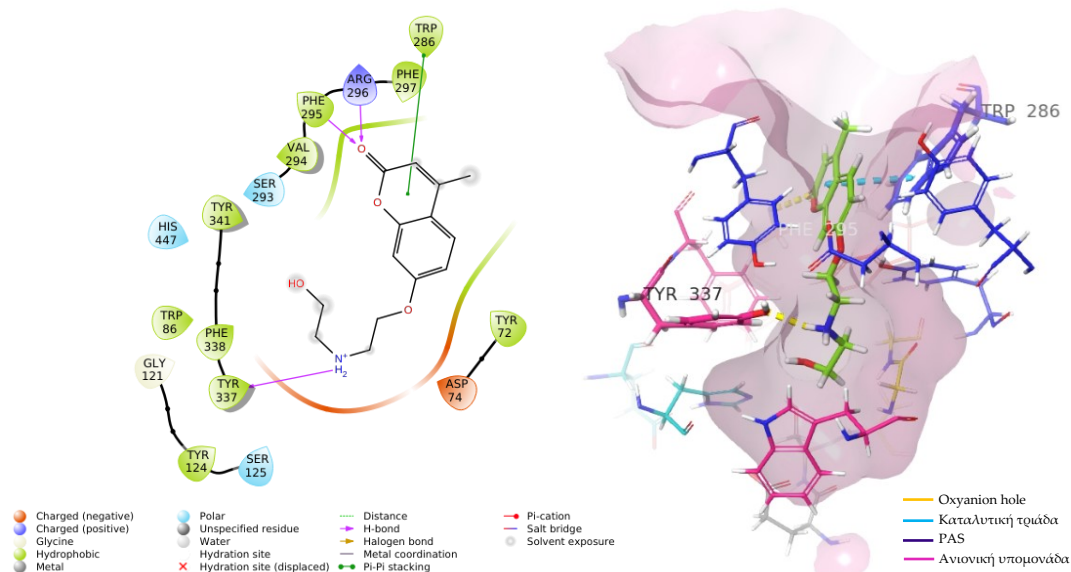


Εικόνα 3.12 Διδιάστατη (αριστερά) και τριδιάστατη (δεξιά) απεικόνιση της πρόσδεσης της **17c** (πράσινο χρώμα) στο ενεργό κέντρο της AChE.

Πίνακας 3.6 Αποτελέσματα μοριακής πρόσδεσης της **17c** στο ενεργό κέντρο της AChE.

Ένωση	D.S. (kcal/mol)	Αμινοξέα							
		GLY121	GLY122	TYR124	GLU202	SER203	SER293	TYR337	TYR341
17c	-7.760	-	Δεσμός H μέσω H ₂ O	π-π	-	-	Δεσμός H	π-π	π-π
Γαλανταμίνη	-7.667	Δεσμός H μέσω H ₂ O	Δεσμός H μέσω H ₂ O	-	Δεσμός H	Δεσμός H	-	Δεσμός H	-

Η ένωση **17c**, η οποία εμφάνισε ικανοποιητική ανασταλτική δράση έναντι της AChE (IC₅₀ 81.7 μM), παρουσιάζει επίσης αρκετές αλληλεπιδράσεις κατά μήκος όλου του «φαραγγιού» της AChE με ικανοποιητικό docking score -7.760 kcal/mol. Στην περίπτωση της **17c**, ο δακτύλιος της πυρόνης σταθεροποιεί π-π αλληλεπιδράσεις με τα αρωματικά αμινοξέα του PAS, TYR124 και TYR341, καθώς και με το κρίσιμο αμινοξύ της ανιονικής υπομονάδας, TYR337. Η πρόσδεση σταθεροποιείται περαιτέρω μέσω του δεσμού-H της δευτεροταγούς αμινομάδας με το αμινοξύ SER293 στη γειτνίαση του acyl rocket. Τέλος, το οξυγόνο της πρενυλοξυ-αλυσίδας της **17c** σχηματίζει, όπως και η γαλανταμίνη, γέφυρα δεσμού υδρογόνου μέσω του συντηρημένου ύδατος με το κρίσιμο αμινοξύ της περιοχής «oxyanion hole», GLY122.

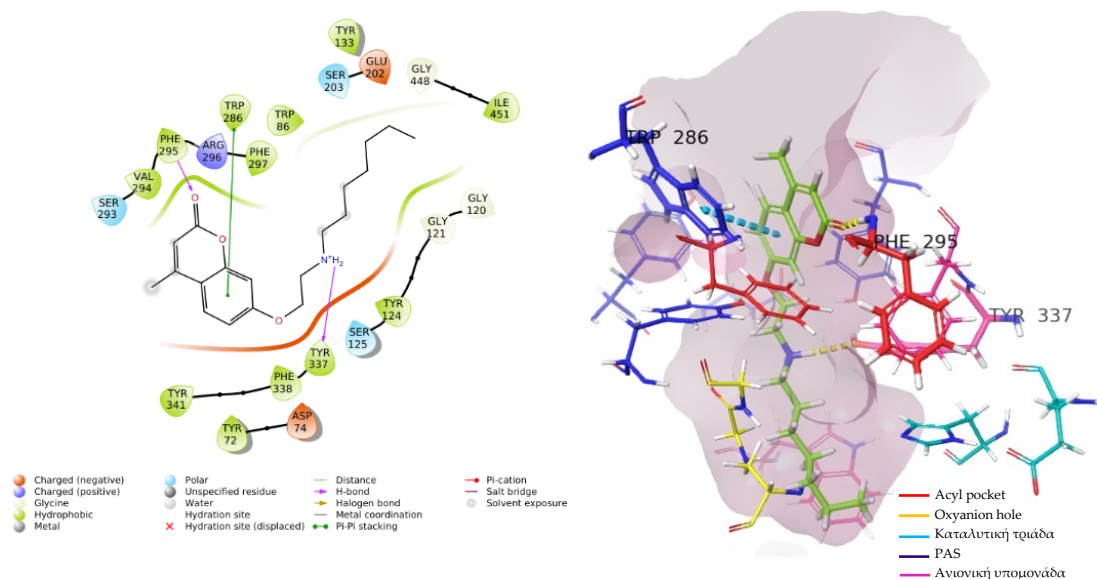


Εικόνα 3.13 Διδιάστατη (αριστερά) και τριδιάστατη (δεξιά) απεικόνιση της πρόσδεσης της **22a** (πράσινο χρώμα) στο ενεργό κέντρο της AChE.

Πίνακας 3.7 Αποτελέσματα μοριακής πρόσδεσης της **22a** στο ενεργό κέντρο της AChE.

Ένωση	D.S. (kcal/mol)	Αμινοξέα							
		GLY121	GLY122	GLU202	SER203	TRP286	PHE295	ARG296	TYR337
22a	-6.343	-	-	-	-	π-π	Δεσμός H	Δεσμός H	Δεσμός H
Γαλανταμίνη	-7.667	Δεσμός H μέσω H ₂ O	Δεσμός H μέσω H ₂ O	Δεσμός H	Δεσμός H	-	-	-	Δεσμός H

Η ένωση **22a**, η οποία παρουσίασε αξιόλογη ανασταλτική δράση έναντι της AChE (IC_{50} 41.5 μ M), εμφάνισε τιμή docking score -6.343 kcal/mol. Ο δακτύλιος της πυρόνης σταθεροποιεί π-π αλληλεπίδραση με το αρωματικό αμινοξύ του PAS TRP286 ενώ επιπλέον το κουμαρινικό καρβονύλιο αλληλεπιδρά με δεσμούς-H με τα αμινοξέα PHE295 (περιοχή acyl rocket) και ARG296. Η πρωτονιωμένη αμινομάδα του μορίου αλληλεπιδρά μέσω δεσμού-H με την πλευρική αλυσίδα του κρίσιμου αμινοξέος TYR337 της ανιονικής υπομονάδας, όπως και η γαλανταμίνη.

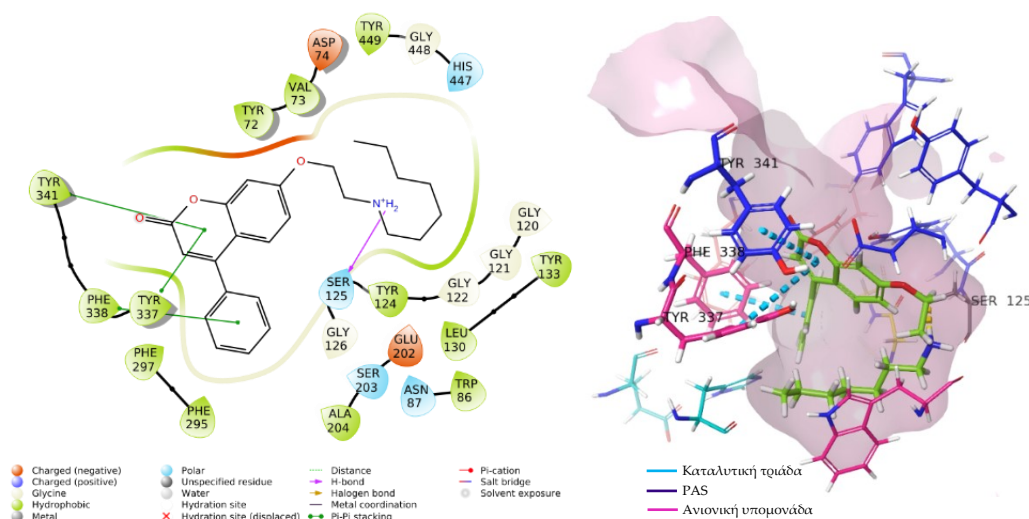


Εικόνα 3.14 Διδιάστατη (αριστερά) και τριδιάστατη (δεξιά) απεικόνιση της πρόσδεσης της **22b** (πράσινο χρώμα) στο ενεργό κέντρο της AChE.

Πίνακας 3.8 Αποτελέσματα μοριακής πρόσδεσης της **22b** στο ενεργό κέντρο της AChE.

Ένωση	D.S. (kcal/mol)	Αμινοξέα						
		GLY121	GLY122	GLU202	SER203	TRP286	PHE295	TYR337
22b	-7.989	-	-	-	-	π-π	Δεσμός H	Δεσμός H
Γαλανταμίνη	-7.667	Δεσμός H μέσω H ₂ O	Δεσμός H μέσω H ₂ O	Δεσμός H	Δεσμός H	-	-	Δεσμός H

Η ένωση **22b**, η οποία παρουσίασε χαμηλή ανασταλτική δράση έναντι της AChE (IC₅₀ 94.2 μM), εμφάνισε λιγότερες αλληλεπιδράσεις με τα αμινοξέα του ενζύμου σε σχέση με τα υπόλοιπα κουμαρινικά ανάλογα, όμως το docking score εξακολούθησε να είναι υψηλό (-7.989 kcal/mol). Ειδικότερα, ο αρωματικός δακτύλιος σταθεροποιεί π-π αλληλεπίδραση με το αμινοξύ του PAS TRP286, ενώ το κουμαρινικό καρβονύλιο αλληλεπιδρά μέσω δεσμού-H με το αμινοξύ PHE295 (acyl pocket). Κατ' αναλογία προς το ανάλογο **22b**, η πρωτονιωμένη αμινομάδα προσανατολίζεται προς το κρίσιμο αμινοξύ TYR337 (ανιονική υπομονάδα) αλληλεπιδρώντας μέσω δεσμού-H με την πλευρική αλυσίδα του όπως η γαλανταμίνη.



Εικόνα 3.15 Διδιάστατη (αριστερά) και τριδιάστατη (δεξιά) απεικόνιση της πρόσδεσης της **22c** (πράσινο χρώμα) στο ενεργό κέντρο της AChE.

Πίνακας 3.9 Αποτελέσματα μοριακής πρόσδεσης της **22c** στο ενεργό κέντρο της AChE.

Ένωση	D.S. (kcal/mol)	Αμινοξέα							
		GLY121	GLY122	SER125	GLU202	SER203	TYR337	PHE338	TYR341
22c	-8.228	-	-	Δεσμός H	-	-	π-π	π-π	π-π
Γαλανταμίνη	-7.667	Δεσμός H μέσω H ₂ O	Δεσμός H μέσω H ₂ O	-	Δεσμός H	Δεσμός H	Δεσμός H	-	-

Η ένωση **22c**, η οποία αποτελεί ισχυρό αναστολέα της AChE (IC₅₀ 45.4 μM), εμφάνισε την υψηλότερη τιμή docking score -8.228 kcal/mol. Η πρόσδεση της ένωσης σταθεροποιείται από ένα σύμπλεγμα π-π αλληλεπιδράσεων του πυρρονικού δακτυλίου με τους αρωματικούς δακτυλίους του αμινοξέος TYR341 (PAS) και του κρίσιμου αμινοξέος TYR337 (acyl pocket) αλλά και π-π αλληλεπίδρασης μεταξύ της φαινυλο-ομάδας της θέσης 4 του κουμαρινικού σκελετού με το αμινοξύ PHE338 (acyl pocket). Περαιτέρω, η πρωτονιωμένη αμινομάδα της ένωσης αλληλεπιδρά μέσω δεσμού-Η με το αμινοξύ SER125.

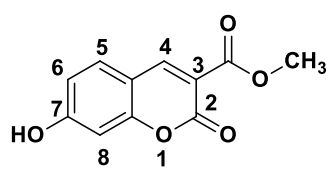
Συμπερασματικά, όλα τα κουμαρινικά ανάλογα παρουσίασαν αλληλεπίδραση με το κρίσιμο αμινοξύ **TYR337** (ανιονική υπομονάδα), καθώς και με ένα ή και περισσότερα αμινοξέα του Περιφερειακού Ανιονικού Κέντρου (**PAS**), όπως η TYR341 και η PHE338, με ενέργειες πρόσδεσης (docking score) παρόμοιες ή και υψηλότερες σε σχέση με τη γαλανταμίνη. Η πρόσδεση των κουμαρινικών αναλόγων τόσο στο PAS όσο και στο εσωτερικό του ενεργού κέντρου της AChE αποτελεί επιθυμητό χαρακτηριστικό των νεότερων αναστολέων της AChE (**dual binding site inhibitors**). Ειδικότερα, με αυτό τον τρόπο αναστέλλεται τόσο η δράση

της AChE, αυξάνοντας τα επίπεδα της ακετυλοχολίνης στο ΚΝΣ, όσο και παρεμποδίζεται ο σχηματισμός συμπλόκου μεταξύ του PAS της AChE και του β-αμυλοειδούς πεπτιδίου, που οδηγεί σε αλλαγή της τριδιάστατης δομής του, προάγοντας τον ολιγομερισμό του που θεωρείται αιτία παθογένεσης της νόσου του Αλτσχάιμερ [66–68].

3.5 ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

3.5.1 Σύνθεση των νέων κουμαρινικών αναλόγων της Σειράς Γ

Σύνθεση της 3-μεθοξυ-καρβονυλο-7-υδροξυ-2H-χρωμεν-2-όνης (**13**):



Σε σφαιρική φιάλη διαλύονται 7.24 mmol (1000 mg) 2,4-διυδροξυ-βενζαλδεΐδης και 7.24 mmol (857.4 μ L) μηλονικού μεθυλεστέρα σε 29.0 mL αιθανόλης και προστίθενται 14 σταγόνες πιπεριδίνης. Το μίγμα αφήνεται υπό συνεχή ανάδευση για 24 h στους 90 °C

παρουσία κάθετου ψυκτήρα και σε αδρανείς συνθήκες αζώτου N_2 . Η πορεία της αντίδρασης παρακολουθείται μέσω χρωματογραφίας λεπτής στιβάδας (TLC) σε σύστημα διαλυτών πετρελαϊκός αιθέρας (PE)/οξικός αιθυλεστέρας (EtOAc) = 70 : 30. Μετά το πέρας της αντίδρασης, η σφαιρική φιάλη καταψύχεται μέχρις ότου να καθιζάνει στερεό, οπότε και πραγματοποιείται διήθηση υπό κενό για την παραλαβή του. Παραλαμβάνεται κίτρινο στερεό προϊόν.

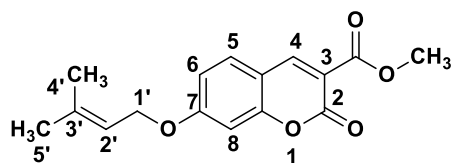
Απόδοση: 61%, **Σ.Τ.:** 260 °C (decomposed) (**Σ.Τ. βιβλιογραφίας:** 263-266 °C [69])

1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6): δ (ppm) 8.69 (s, 1H, H-4), 7.74 (d, J = 8.7 Hz, 1H, H-5), 6.83 (dd, J = 8.7 Hz, J = 2.1 Hz, 1H, H-6), 6.71 (d, J = 1.8 Hz, 1H, H-8), 3.79 (s, 3H, OCH₃).

Γενική μέθοδος σύνθεσης των κουμαρινικών παραγώγων **15a-15b**

Σε σφαιρική φιάλη προστίθεται ποσότητα της 3-μεθοξυ-καρβονυλο-7-υδροξυ-κουμαρίνης (1 eq) και κατάλληλη ποσότητα πρενυλοξυ ή βενζυλοξυ βρωμιδίου (1.2 eq) παρουσία ξηρής βάσης ανθρακικού καλίου (K_2CO_3) σε διαλύτη ακετόνη. Το μίγμα αφήνεται υπό συνεχή ανάδευση για 24 h στους 56 °C παρουσία κάθετου ψυκτήρα και σε αδρανείς συνθήκες αζώτου N_2 . Η πορεία της αντίδρασης παρακολουθείται μέσω χρωματογραφίας λεπτής στιβάδας (TLC) σε κατάλληλη αναλογία συστήματος διαλυτών. Μετά το πέρας της αντίδρασης πραγματοποιείται διήθηση υπό κενό προς απομάκρυνση της βάσης και παραλαβή του οργανικού διηθήματος, το οποίο εξατμίζεται σε περιστροφικό εξατμιστήρα. Ακολουθεί ανακρυστάλλωση προς καθαρισμό του προϊόντος.

3-μεθοξυ-καρβονυλο-7-πρενυλοξυ-2H-χρωμεν-2-όνη (**15a**):



Σύμφωνα με την παραπάνω γενική μέθοδο, 2.73 mmol (600 mg) 3-μεθοξυ-καρβονυλο-7-υδροξυ-κουμαρίνης, 3.28 mmol (380.7 μ L) πρενυλο-βρωμιδίου και 2.73 mmol (377.3 mg) K_2CO_3 προστίθενται σε 38.2 mL ακετόνης.

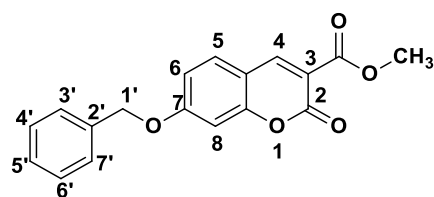
Παραλαμβάνεται στερεό υποκίτρινου χρώματος.

Απόδοση: 38%, **Σ.Τ.:** 107 °C

1H NMR (300 MHz, $CDCl_3$): δ (ppm) 8.54 (s, 1H, H-4), 7.49 (d, J =8.7 Hz, 1H, H-5), 6.89 (dd, J = 8.7 Hz, J = 2.1 Hz, 1H, H-6), 6.82 (d, J = 1.8 Hz, 1H, H-8), 5.46 (t, J = 6.6 Hz, 1H,

H-2'), 4.61 (d, $J = 6.6$ Hz, 2H, H-1'), 3.94 (s, 3H, OCH₃), 1.81 (s, 3H, CH₃), 1.77 (s, 3H, CH₃).

7-βενζυλοξυ-3-μεθοξυ-καρβονυλο-2H-χρωμεν-2-όνη (**15b**):



Σύμφωνα με την παραπάνω γενική μέθοδο, 2.73 mmol (600 mg) 3-μεθοξυ-καρβονυλο-7-υδροξυ-κουμαρίνης, 3.28 mmol (389.6 μ L) βενζυλοβρωμιδίου και 2.73 mmol (377.3 mg) K₂CO₃ προστίθενται σε 38.2 mL ακετόνης.

Παραλαμβάνεται στερεό μωβ χρώματος.

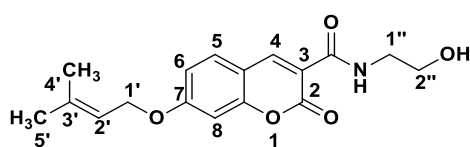
Απόδοση: 30%, **Σ.Τ.:** 134 °C (**Σ.Τ. βιβλιογραφίας:** 139-140 °C [70])

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 8.54 (s, 1H, H-4), 7.51 (d, $J = 8.7$ Hz, 1H, H-5), 7.41-7.39 (m, 5H, H-3', H-4', H-6', H-6', H-7'), 6.97 (d, $J = 8.7$ Hz, 1H, H-6), 6.88 (s, 1H, H-8), 5.16 (s, 2H, H-1'), 3.94 (s, 3H, OCH₃)

Γενική μέθοδος σύνθεσης καρβοξαμιδίων (**17a-17e**)

Σε σφαιρική φιάλη προστίθεται ποσότητα (1 eq) της εκάστοτε 7-υποκατεστημένης κουμαρίνης (**15a** & **15b**) και κατάλληλη ποσότητα πρωτοταγούς αμίνης (2 eq) σε διαλύτη τολουόλιο. Το μίγμα αφήνεται υπό συνεχή ανάδευση για 48 h στους 110 °C παρουσία κάθετου ψυκτήρα και σε αδρανείς συνθήκες αζώτου N₂. Η πορεία της αντίδρασης παρακολουθείται μέσω χρωματογραφίας λεπτής στιβάδας (TLC) σε κατάλληλη αναλογία συστήματος διαλυτών. Μετά το πέρας της αντίδρασης ακολουθεί διήθηση του καταβυθιζόμενου στερεού και ανακρυστάλλωση προς παραλαβή καθαρού προϊόντος.

N-(2-υδροξαιθυλο)-7-((3-μεθυλοβουτ-2-εν-1-υλ)οξυ)-2-οξο-2H-χρωμεν-3-καρβοξαμίδιο (**17a**):



Σύμφωνα με τη γενική μέθοδο σύνθεσης καρβοξαμιδίων, 0.35 mmol (100.1 mg) 3-μεθοξυ-καρβονυλο-7-πρενυλοξυ-κουμαρίνης και 0.70 mmol (42.1 μ L) αιθανολαμίνης προστίθενται σε 2.3 mL τολουόλιο.

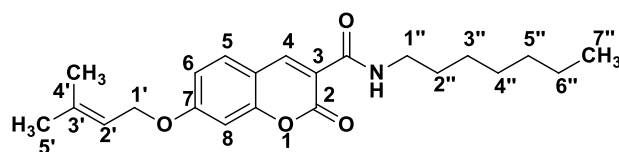
Παραλαμβάνεται στερεό λευκού χρώματος.

Απόδοση: 39%, **Σ.Τ.:** 157-158 °C

¹H NMR (300 MHz, DMSO-d₆): δ (ppm) 8.84 (s, 1H, H-4), 8.79 (t, $J = 3.9$ Hz, 1H, NH), 7.89 (d, $J = 6.3$ Hz, 1H, H-5), 7.11 (s, 1H, H-8), 7.02 (d, $J = 6.6$ Hz, 1H, H-6), 5.46 (t, $J = 5.4$ Hz, 1H, H-2'), 4.84 (t, $J = 2.7$ Hz, 1H, OH), 4.68 (d, $J = 4.8$ Hz, 2H, H-1'), 3.52 (br, 2H, H-1''), 3.40 (br, 2H, H-2''), 1.76 (s, 3H, CH₃), 1.73 (s, 3H, CH₃), ¹³C NMR (75 MHz, DMSO-d₆): δ (ppm) 163.84, 161.71, 161.16, 156.29, 148.08, 138.93, 131.73, 118.94, 114.68, 114.33, 112.18, 101.02, 65.64, 59.70, 41.95, 25.61, 18.25.

HRMS calcd for C₁₇H₂₀O₅N (M+H)⁺: m/z : 318.1263, found: 318.1341

N-επτυλο-7-((3-μεθυλοβουτ-2-εν-1-υλ)οξυ)-2-οξο-2*H*-χρωμεν-3-καρβοξαμίδιο (**17b**):



Σύμφωνα με τη γενική μέθοδο σύνθεσης καρβοξαμιδίων, 0.53 mmol (152.8 mg) 3-μεθοξυ-καρβονυλο-7-πρενυλοξυ-κουμαρίνης και 1.06 mmol (120.2

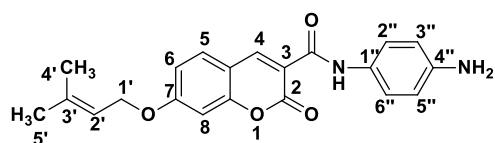
μL) επτυλαμίνης προστίθενται σε 3.5 mL τολουόλιο. Παραλαμβάνεται στερεό υποκίτρινου χρώματος.

Απόδοση: 43%, **Σ.Τ.:** 114-115 °C

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 8.83 (s, 1H, NH), 8.77 (s, 1H, H-4), 7.57 (d, *J* = 9.0 Hz, 1H, H-5), 6.93 (dd, *J* = 9.0 Hz, *J* = 1.5 Hz, 1H, H-6), 6.86 (s, 1H, H-8), 5.48 (t, *J* = 4.1 Hz, 1H, H-2'), 4.61 (d, *J* = 6.6 Hz, 1H, H-1'), 3.47-3.41 (m, 2H, H-1''), 1.82 (s, 3H, CH₃), 1.78 (s, 3H, CH₃), 1.65-1.60 (m, 2H, H-2''), 1.34-1.29 (m, 8H, H-3'', H-4'', H-5'', H-6''), 0.90-0.86 (m, 3H, CH₃-7'').

HRMS calcd for C₂₂H₃₀O₄N (M+H)⁺: *m/z*: 372.2097, found: 372.2231

N-(4-αμινοφαινυλο)-7-((3-μεθυλοβουτ-2-εν-1-υλ)οξυ)-2-οξο-2*H*-χρωμεν-3-καρβοξαμίδιο (**17c**):



Σύμφωνα με τη γενική μέθοδο σύνθεσης καρβοξαμιδίων, 0.5 mmol (144.2 mg) 3-μεθοξυ-καρβονυλο-7-πρενυλοξυ-κουμαρίνης και 1 mmol (108.1 mg) 1,4-

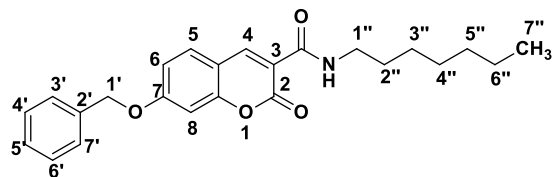
φαινυλενο-διαμίνης προστίθενται σε 3.3 mL τολουόλιο. Παραλαμβάνεται στερεό κίτρινου χρώματος.

Απόδοση: 49%, **Σ.Τ.:** 180-181 °C

¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ (ppm) 10.34 (s, 1H, NH-1''), 8.87 (s, 1H, H-4), 7.92 (d, *J* = 8.7 Hz, 1H, H-5), 7.37 (d, *J* = 8.7 Hz, 2H, H-2'', H-6''), 7.15 (s, 1H, H-8), 7.05 (dd, *J* = 8.7 Hz, *J* = 2.1 Hz, 1H, H-6), 6.56 (d, *J* = 8.7 Hz, 2H, H-3'', H-5''), 5.47 (t, *J* = 6.9 Hz, 1H, H-2'), 5.03 (s, 2H, NH₂-4''), 4.69 (d, *J* = 6.9 Hz, 2H, H-1'), 1.76 (s, 3H, CH₃), 1.74 (s, 3H, CH₃), ¹³C NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆): δ (ppm) 163.38, 161.27, 158.89, 155.96, 147.40, 145.66, 135.97, 131.56, 128.56, 128.23, 128.02, 127.05, 121.34, 115.62, 114.29, 113.91, 112.45, 101.20, 70.22.

HRMS calcd for C₂₁H₂₁O₄N₂ (M+H)⁺: *m/z*: 365.1423, found: 365.1494

7-(βενζυλοξυ)-*N*-επτυλο-2-οξο-2*H*-χρωμεν-3-καρβοξαμίδιο (**17d**):



Σύμφωνα με τη γενική μέθοδο σύνθεσης καρβοξαμιδίων, 0.39 mmol (120.9 mg) 3-μεθοξυ-καρβονυλο-7-βενζυλοξυ-κουμαρίνης και 0.78 mmol (115.6 μL) επτυλαμίνης προστίθενται

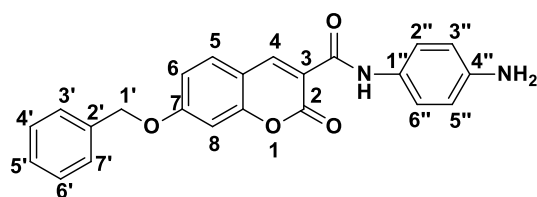
σε 2.6 mL τολουόλιο. Παραλαμβάνεται στερεό κόκκινου χρώματος.

Απόδοση: 45%, **Σ.Τ.:** 141-142 °C

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 8.83 (s, 1H, H-4), 8.74 (t, *J* = 5.1 Hz, 1H, NH), 7.59 (d, *J* = 3.3 Hz, 1H, H-5), 7.43-7.36 (m, 5H, H-3', H-4', H-5', H-6', H-7'), 7.00 (dd, *J*=8.7 Hz, *J*=2.4 Hz, 1H, H-6), 6.93 (d, *J*=2.1 Hz, 1H, H-8), 5.17 (s, 1H, H-1'), 3.44 (q, *J* = 6.6 Hz, 2H, H-1''), 1.64-1.60 (m, 2H, H-2''), 1.34-1.25 (m, 8H, H-3'', H-4'', H-5'', H-6''), 0.88-0.86 (m, 3H, CH₃), ¹³C NMR (75 MHz, DMSO-d₆): δ (ppm) 163.88, 162.01, 156.62, 148.21, 135.47, 131.06, 128.98, 128.70, 127.68, 115.22, 114.70, 112.78, 101.47, 70.92, 40.01, 31.87, 29.57, 29.11, 27.13, 22.74, 14.21.

HRMS calcd for C₂₄H₂₈O₄N (M+H)⁺: *m/z*: 394.1940, found: 394.2010

N-(4-αμινοφαινυλο)-7-(βενζυλοξυ)-2-οξο-2H-χρωμεν-3-καρβοξαμίδιο (**17e**):



Σύμφωνα με τη γενική μέθοδο σύνθεσης καρβοξαμιδίων, 0.46 mmol (142.7 mg) 3-μεθοξυ-καρβονυλο-7-βενζυλοξυ-κουμαρίνης και 0.92 mmol (99.5 mg) 1,4-φαινυλενο-διαμίνης

προστίθενται σε 3.1 mL τολουόλιο. Παραλαμβάνεται στερεό χρυσού χρώματος.

Απόδοση: 43%, **Σ.Τ.:** 218-219 °C

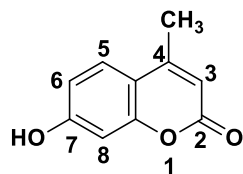
¹H NMR (300 MHz, DMSO-d₆): δ (ppm) 10.34 (s, 1H, NH-1''), 8.87 (s, 1H, H-4), 7.95 (d, *J* = 8.7 Hz, 1H, H-5), 7.49 (d, *J* = 7.5 Hz, 2H, H-2'', H-6''), 7.44-7.35 (m, 5H, H-3', H-4', H-5', H-6', H-7'), 7.24 (s, 1H, H-8), 7.14 (dd, *J* = 8.7 Hz, *J* = 2.1 Hz, 1H, H-6), 6.57 (d, *J* = 8.7 Hz, 2H, H-3'', H-5''), 5.28 (s, 2H, H-1'), 5.03 (s, 2H, NH₂).

HRMS calcd for C₂₃H₁₉O₄N₂ (M+H)⁺: *m/z*: 387.1267, found: 387.1343

3.5.2 Σύνθεση των νέων κουμαρινικών αναλόγων της Σειράς Δ

Παρασκευή αναλόγων της ουμπελιφερόνης με τη μέθοδο Pechmann (20a-20b)

7-υδροξυ-4-μεθυλο-2H-χρωμεν-2-όνη (20a):



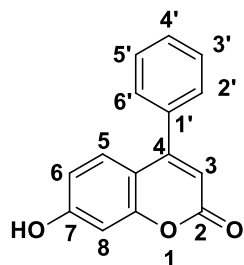
Σε σφαιρική φιάλη προστίθενται 100 mL πυκνού θεικού οξέος (H₂SO₄) υπό ψύξη στους 0 °C. Παρασκευάζεται διάλυμα 90.82 mmol (10 g) ρεσορκινόλης σε 92.10 mmol (12 mL) 3-οξοβουτανοϊκού αιθυλεστέρα, το οποίο προστίθεται στάγδην και υπό ανάδευση στη σφαιρική φιάλη σε θερμοκρασία κάτω

των 10 °C. Το μίγμα της αντίδρασης αναδεύεται για 24 h σε θερμοκρασία περιβάλλοντος. Η πορεία της αντίδρασης παρακολουθείται μέσω χρωματογραφίας λεπτής στιβάδας (TLC) σε σύστημα διαλυτών πετρελαϊκός αιθέρας (PE)/οξικός αιθυλεστέρας (EtOAc) = 70 : 30. Μετά το τέλος της αντίδρασης, το μίγμα προστίθεται σε πάγο υπό έντονη ανάδευση και το στερεό που καταβυθίζεται διηθείται υπό κενό με ποσότητα παγωμένου νερού. Ακολουθεί ανακρουστάλλωση με κατάλληλη ποσότητα μεθανόλης και διχλωρομεθανίου και παραλαμβάνεται στερεό υποκίτρινου χρώματος.

Απόδοση: 70%, **Σ.Τ.:** 186-187 °C (**Σ.Τ. βιβλιογραφίας:** 185-187 °C [71])

¹H NMR (600 MHz, DMSO-d₆): δ (ppm) 10.50 (br, 1H, OH), 7.58 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H, H-5), 6.79 (dd, *J* = 8.4 Hz, *J* = 2.4 Hz, 1H, H-6), 6.70 (d, *J* = 2.4 Hz, 1H, H-8), 6.12 (s, 1H, H-3), 2.35 (s, 3H, CH₃)

7-υδροξυ-4-φαινυλο-2H-χρωμεν-2-όνη (**20b**):



Σε σφαιρική φιάλη προστίθενται 4.54 mmol ρεσορκινόλης (500 mg) και 4.54 mmol οξικού αιθυλεστέρα (784 μL) σε 1.14 mL τριφθοροξικού οξέος (CF₃COOH) υπό ψύξη. Στη συνέχεια, το μίγμα της αντίδρασης θερμαίνεται υπό ανάδευση σε ελαιόλουτρο στους 75 °C για 24 h. Η εξέλιξη της αντίδρασης παρακολουθείται μέσω χρωματογραφίας λεπτής στιβάδας (TLC) σε σύστημα διαλυτών πετρελαϊκός αιθέρας (PE)/οξικός αιθυλεστέρας (EtOAc) = 70 : 30. Το προϊόν λαμβάνεται έπειτα από απόχυση σε πάγο και διήθηση υπό κενό υπό τη μορφή κίτρινου στερεού.

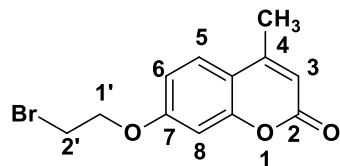
Απόδοση: 80%, **Σ.Τ.:** 238-239 °C (**Σ.Τ. βιβλιογραφίας:** 232-234 °C [72])

¹H NMR (600 MHz, DMSO-d₆): δ (ppm) 10.66 (br, 1H, OH), 7.56-7.50 (m, 5H, H-2' & H-3', H-4', H-5', H-6'), 7.28 (d, *J* = 9 Hz, 1H, H-5), 6.81 (d, *J* = 1.8 Hz, 1H, H-8), 6.78 (dd, *J* = 9 Hz, *J* = 1.8 Hz, 1H, H-6), 6.15 (s, 1H, H-3)

Γενική μέθοδος παρασκευής 7-βρωμοαιθοξυ-κουμαρινικών παραγώγων (**21a-21b**)

Σε σφαιρική φιάλη προστίθεται ποσότητα της 4-υποκατεστημένης-7-υδροξυ-κουμαρίνης (1 eq) και κατάλληλη ποσότητα διβρωμοαιθανίου (10 eq) παρουσία ξηρής βάσης ανθρακικού καλίου (K₂CO₃) σε διαλύτη ακετόνη. Το μίγμα αφήνεται υπό συνεχή ανάδευση για 48 h στους 56 °C παρουσία κάθετου ψυκτήρα και σε αδρανείς συνθήκες αζώτου N₂. Η πορεία της αντίδρασης παρακολουθείται μέσω χρωματογραφίας λεπτής στιβάδας (TLC) σε κατάλληλη αναλογία συστήματος διαλυτών. Μετά το πέρας της αντίδρασης πραγματοποιείται διήθηση υπό κενό προς απομάκρυνση της βάσης και παραλαβή του οργανικού διηθήματος, το οποίο εξατμίζεται σε περιστροφικό εξατμιστήρα. Ακολουθεί χρωματογραφία στήλης προς καθαρισμό του προϊόντος.

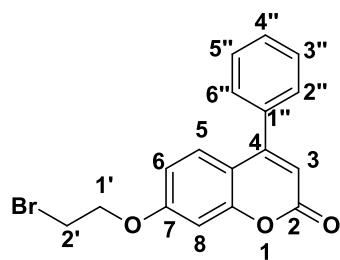
7-(2-βρωμοαιθοξυ)-4-μεθυλο-2H-χρωμεν-2-όνη (**21a**):



Σύμφωνα με τη γενική μέθοδο, 1.42 mmol (250 mg) της 4-μεθυλο-7-υδροξυ-κουμαρίνης, 14.20 mmol (1123 μL) διβρωμοαιθανίου και 1.42 mmol (196.3 mg) K₂CO₃ προστίθενται σε 20.0 mL ακετόνης. Παραλαμβάνεται λευκό στερεό.

Απόδοση: 44%, **Σ.Τ.:** 106-108 °C (**Σ.Τ. βιβλιογραφίας:** 104-105 °C [73])

¹H NMR (600 MHz, DMSO-d₆): δ (ppm) 7.51 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H, H-5), 6.89 (dd, *J* = 8.7 Hz, *J* = 2.7 Hz, 1H, H-6), 6.82 (d, *J* = 2.4 Hz, 1H, H-8), 6.16 (d, *J* = 0.6 Hz, 1H, H-3), 4.35 (t, *J* = 5.4 Hz, 2H, H-1'), 3.67 (t, *J* = 5.4 Hz, 2H, H-2'), 2.40 (d, *J* = 1.2 Hz, 3H, CH₃)

7-(2-βρωμοαιθοξυ)-4-φαινυλο-2H-χρωμεν-2-όνη (**21b**):

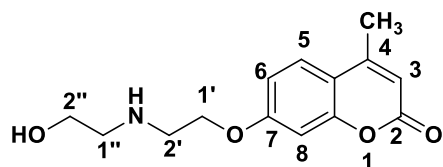
Σύμφωνα με την παραπάνω μέθοδο, 1.78 mmol (425 mg) 4-φαινυλο-7-υδροξυ-κουμαρίνης και 17.80 mmol διβρωμοαιθανίου διαλύονται σε 25.0 mL ακετόνης με προσθήκη 246 mg K_2CO_3 . Παραλαμβάνεται στερεό υποκίτρινου χρώματος.

Απόδοση: 50%, **Σ.Τ.:** 110-111 °C (**Σ.Τ. βιβλιογραφίας:** 108-109 °C [74])

1H NMR (600 MHz, $DMSO-d_6$): δ (ppm) 7.53-7.51 (m, 3H, H-5, H-2', H-6'), 7.45-7.39 (m, 3H, H-3', H-4', H-5'), 6.89 (d, $J = 3.8$ Hz, 1H, H-8), 6.82 (dd, $J = 7.9$ Hz, $J = 2.3$ Hz, 1H, H-6), 6.24 (d, $J = 2.7$ Hz, 1H, H-3), 4.37 (t, $J = 5.1$ Hz, 2H, H-1''), 3.68 (t, $J = 5.6$ Hz, 2H, H-2')

Γενική μέθοδος σύνθεσης νέων αμινοαιθοξυ-κουμαρινικών αναλόγων (**22a-22c**)

Σε σφαιρική φιάλη προστίθεται ποσότητα των εκάστοτε 7-βρωμοαιθοξυ-κουμαρινικών παραγώγων (1.6 eq) και ενδεδειγμένη ποσότητα πρωτοταγούς αμίνης (1.5 eq), παρουσία ξηρής βάσης ανθρακικού καλίου (K_2CO_3) σε διαλύτη ακετονιτρίλιο. Το μίγμα αφήνεται υπό ανάδευση για 48 h στους 80 °C σε αδρανείς συνθήκες αζώτου N_2 , παρουσία κάθετου ψυκτήρα. Η εξέλιξη της αντίδρασης διενεργείται μέσω χρωματογραφίας λεπτής στιβάδας (TLC) σε κατάλληλη αναλογία συστήματος διαλυτών. Μετά το τέλος της αντίδρασης, πραγματοποιείται χρωματογραφία στήλης για τον καθαρισμό του τελικού προϊόντος.

7-((2-υδροξυαιθυλ)αμινο)αιθοξυ)-4-μεθυλο-2H-χρωμεν-2-όνη (**22a**):

Σύμφωνα με τη γενική μέθοδο, 0.29 mmol (81.0 mg) 7-(2-βρωμοαιθοξυ)-4-μεθυλο-κουμαρίνης, 0.27 mmol (16 μ L) αιθανολαμίνης και 0.31 mmol (42.8 mg) K_2CO_3 προστίθενται σε 2.7 mL ακετονιτρίλιο. Παραλαμβάνεται στερεό

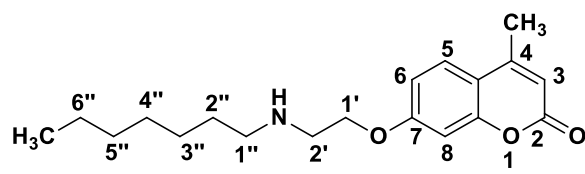
λευκού χρώματος.

Απόδοση: 61%, **Σ.Τ.:** 117-119 °C

1H NMR (600 MHz, $DMSO-d_6$): δ (ppm) 7.69 (d, $J = 8.4$ Hz, 1H, H-5), 6.99-6.97 (m, 2H, H-6, H-8), 6.21 (s, 1H, H-3), 4.16 (t, $J = 5.4$ Hz, 1H, H-1'), 3.49 (t, $J = 5.4$ Hz, 1H, H-2''), 2.97 (t, $J = 5.4$ Hz, 1H, H-2'), 2.70 (t, $J = 5.4$ Hz, 1H, H-1''), 2.40 (s, 3H, CH_3), ^{13}C NMR (75 MHz, $DMSO-d_6$): δ (ppm) 161.70, 160.42, 154.82, 153.68, 126.63, 113.32, 112.63, 111.28, 101.35, 67.79, 59.87, 51.35, 47.67, 18.29

HRMS calcd for $C_{14}H_{18}O_4N$ ($M+H$)⁺: m/z : 264.1158, found: 264.1231

7-(2-(επτυλαμινο)αιθοξυ)-4-μεθυλο-2H-χρωμεν-2-όνη (**22b**):



Σύμφωνα με τη γενική μέθοδο, 0.31 mmol (87.3 mg) 7-(2-βρωμοαιθοξυ)-4-μεθυλο-κουμαρίνης, 0.29 mmol (43 μ L) επτυλαμίνης και 0.33 mmol (45.5 mg) K_2CO_3 προστίθενται σε 2.9 mL

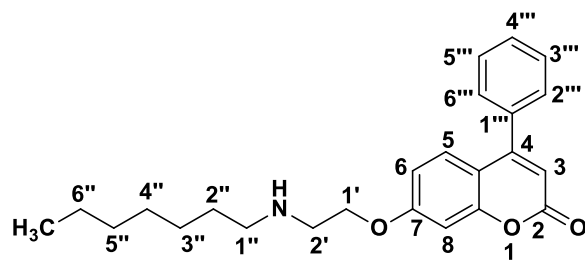
ακετονιτρίλιο. Παραλαμβάνεται κολλώδες στερεό υπόλευκου χρώματος.

Απόδοση: 50%

1H NMR (300 MHz, $DMSO-d_6$): δ (ppm) 7.70-7.68 (m, 1H, NH), 7.61 (d, $J = 9.3$ Hz, 1H, H-6), 6.90-6.88 (m, H-5, H-8), 6.17 (s, 1H, H-3), 4.55 (t, $J = 5.1$ Hz, 2H, H-1'), 2.92 (t, $J = 5.1$ Hz, 2H, H-2'), 2.57 (t, $J = 6.6$ Hz, 2H, H-1''), 2.36 (s, 3H, CH_3 -4), 1.40 (br, 2H, H-2''), 1.19-1.23 (m, 8H, H-3''-H-6''), 0.82-0.81 (m, 3H, CH_3)

HRMS calcd for $C_{19}H_{28}O_3N$ (M+H) $^+$: m/z : 318.1991, found: 318.2059

7-(2-(επτυλαμινο)αιθοξυ)-4-φαινυλο-2H-χρωμεν-2-όνη (**22c**):



Σύμφωνα με τη γενική μέθοδο, 1.11 mmol (150.2 mg) 7-(2-βρωμοαιθοξυ)-4-φαινυλο-κουμαρίνης, 1.04 mmol (154.9 μ L) επτυλαμίνης και 1.18 mmol (163.1 mg) K_2CO_3 προστίθενται σε 10.4 mL ακετονιτρίλιο. Παραλαμβάνεται ελαιώδες προϊόν

υποκίτρινου χρώματος.

Απόδοση: 42%

1H NMR (300 MHz, $DMSO-d_6$): δ (ppm) 8.96 (br, 1H, NH), 7.57-7.54 (m, 5H, H-2'''-H-6'''), 7.41 (d, $J = 9$ Hz, 1H, H-5), 7.17 (d, $J = 2.1$ Hz, 1H, H-8), 7.00 (dd, $J = 9$ Hz, 1H, H-6), 6.29 (s, 1H, H-3), 4.39 (br, 2H, H-1'), 2.96 (t, $J = 6.6$ Hz, 2H, H-2''), 1.64 (br, 2H, H-1''), 1.29-1.23 (m, 10H, H-2''-H-6''), 0.86-0.84 (m, 3H, CH_3)

HRMS calcd for $C_{24}H_{30}O_3N$ (M+H) $^+$: m/z : 380.2147, found: 380.2220

3.5.3 Δοκιμή αναστολής της δράσης του ενζύμου ακετυλοχολινεστεράση

Σε κάθε θέση ενός πλακιδίου 96 θέσεων προστίθενται 158 μ L ρυθμιστικού διαλύματος Tris-HCl (50 mM, pH 8.0), 20 μ L ακετυλοχολινεστεράσης *electrophorus electricus* (0.1 Units/mL) και 2 μ L της εκάστοτε ένωσης διαλυμένης σε DMSO, σε διάφορες συγκεντρώσεις. Ακολουθεί επώαση για 15 min και έπειτα προστίθενται 10 μ L 5,5-διθειο-δις-(2-νιτροβενζοϊκό οξύ) (DTNB) και 10 μ L ακετυλοθειοχολίνης (ATCI). Η απορρόφηση (A) στα 412 nm μετράται για τις χρονικές στιγμές $t=0$ (προσθήκη ATCI) και $t=10$ min και εξετάζεται ως προς τις αντίστοιχες απορροφήσεις του control δείγματος, το οποίο περιέχει DMSO αντί για κουμαρινική ένωση.

Η ποσοστιαία αναστολή της ακετυλοχολινεστεράσης υπολογίζεται από την Εξίσωση (3.1):

$$(\%) \text{ Αναστολή} = \left(1 - \frac{\Delta A_{\text{sample}}}{\Delta A_{\text{control}}}\right) \times 100 \quad (3.1)$$

όπου:

- $\Delta A_{\text{sample}} = A_{\text{sample},t=10 \text{ min}} - A_{\text{sample},t=0 \text{ min}}$
- $\Delta A_{\text{control}} = A_{\text{control},t=10 \text{ min}} - A_{\text{control},t=0 \text{ min}}$

3.5.4 Δοκιμή αναστολής της δράσης του ενζύμου βουτυρυλοχολινεστεράση

Σε κάθε θέση ενός πλακιδίου 96 θέσεων προστίθενται 158 μL ρυθμιστικού διαλύματος Tris-HCl (50mM, pH 8.0), 20 μL βουτυρυλοχολινεστεράσης από ορό αλόγου (0.4 Units/mL) και 2 μL της εκάστοτε ένωσης διαλυμένης σε DMSO, σε διάφορες συγκεντρώσεις. Ακολουθεί επώαση για 15 min και έπειτα προστίθενται 10 μL 5,5-διθειο-δισ-(2-νιτροβενζοϊκό οξύ) (DTNB) και 10 μL βουτυρυλοθειοχολίνης (BTCI). Η απορρόφηση (A) στα 412 nm μετράται για τις χρονικές στιγμές $t=0$ (προσθήκη BTCI) και $t=10 \text{ min}$ και εξετάζεται ως προς τις αντίστοιχες απορροφήσεις του control δείγματος, το οποίο περιέχει DMSO αντί για κουμαρινική ένωση. Η ποσοστιαία αναστολή της βουτυρυλοχολινεστεράσης υπολογίζεται σύμφωνα με την εξίσωση (3.1).

3.5.5 Υπολογιστική μελέτη μοριακής πρόσδεσης

3.5.5.1 Προετοιμασία της πρωτεΐνης στόχου

Το μοντέλο του ενζύμου της ανθρώπινης ακετυλοχολινεστεράσης (PDB: 4EY6) προετοιμάστηκε μέσω του προγράμματος Protein Preparation Wizard [Protein Preparation Wizard; Epik, Schrodinger, LLC, New York, NY, 2016] της πλατφόρμας MAESTRO, ώστε να χρησιμοποιηθεί στα πειράματα Μοριακής Πρόσδεσης. Συγκεκριμένα, πραγματοποιήθηκε απομάκρυνση όλων των μορίων H_2O (εκτός από το συντηρημένο μόριο H_2O 860 που σχηματίζει δεσμούς υδρογόνου με τα αμινοξέα GLY121, GLY122 του ενεργού κέντρου) και ελαχιστοποίηση της ενέργειάς του.

3.5.5.2 Προετοιμασία προσδετών

Τα νέα κουμαρινικά καρβοξαμίδια και αμινο-αιθοξυ-κουμαρινικά παράγωγα **17a**, **17c**, **22a**, **22b** και **22c**, προετοιμάστηκαν μέσω του προγράμματος LigPrep [LigPrep, Schrodinger, LLC, New York, NY, 2014] της πλατφόρμας MAESTRO σε pH = 8.0 \pm 0.5, όπου παρουσιάζεται η βέλτιστη δράση του εξεταζόμενου ενζύμου. Ακόμη, προκειμένου να ελαχιστοποιηθεί η ενέργειά τους χρησιμοποιήθηκε το πεδίο δύναμης OPLS3e.

3.5.5.3 Πειράματα Μοριακής Πρόσδεσης

Για τα πειράματα Μοριακής Πρόσδεσης, εφαρμόστηκε ο αλγόριθμος πρότυπης ακρίβειας (Standard Precision, SP), του προγράμματος Glide [Glide, Schrodinger,

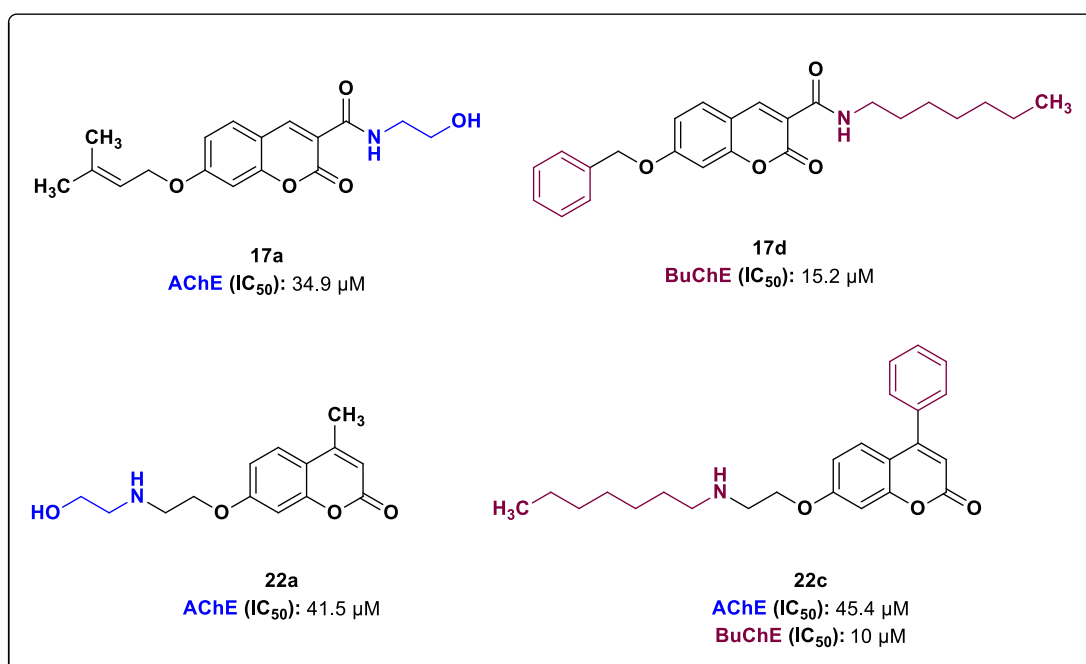
LLC, New York, NY, 2014]. Η πρόσδεση πραγματοποιήθηκε θέτοντας ως μέγιστο όριο 20 πιθανές διαμορφώσεις του προσδέτη, ενώ το grid box επιλέχθηκε κατάλληλα ώστε να περιέχει την καταλυτική τριάδα της ακετυλοχολινεστεράσης καθώς και όλο το «φαράγγι», στο βάθος του οποίου εντοπίζεται.

Η υπολογιστική μελέτη μοριακής πρόσδεσης πραγματοποιήθηκε σε συνεργασία με την Ερευνήτρια Β του Ινστιτούτου Βιολογίας, Φαρμακευτικής Χημείας και Βιοτεχνολογίας του Ε.Ι.Ε. Μαρία Ζερβού.

3.6 ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Πέντε νέα κουμαρινικά καρβοξαμίδια (Σειρά Γ) και τρία νέα αμινοαιθοξυκουμαρινικά παράγωγα (Σειρά Δ) συντέθηκαν σε ικανοποιητικές αποδόσεις (40-60%) και χαρακτηρίστηκαν μέσω φασματοσκοπίας ^1H και ^{13}C NMR, καθώς και φασματομετρίας HR-MS.

Τα νέα κουμαρινικά παράγωγα εξετάστηκαν ως προς την ικανότητά τους να αναστέλλουν τη δράση των ενζύμων ακετυλοχολινεστεράση και βουτυρυλοχολινεστεράση, ως ένδειξη πιθανής νευροπροστατευτικής δράσης. Τα περισσότερα από τα νέα κουμαρινικά ανάλογα επέδειξαν ικανοποιητική ανασταλτική δράση έναντι τουλάχιστον ενός εκ των δύο ενζύμων. Τα παράγωγα που έδειξαν ισχυρότερη ανασταλτική δράση παρουσιάζονται στο Σχήμα 3.18.



Σχήμα 3.18 Χημική δομή των ισχυρότερων αναστολέων των AChE και BuChE.

Τα παράγωγα **17a** και **22a** αποτελούν εκλεκτικούς αναστολείς της ακετυλοχολινεστεράσης, ενώ το παράγωγο **17d** αποτελεί εκλεκτικό αναστολέα της βουτυρυλοχολινεστεράσης. Ωστόσο, το παράγωγο **22c** αποτελεί ισχυρό αναστολέα και των δύο ενζύμων. Η ύπαρξη μορίων που μπορούν να αναστέλλουν τόσο την AChE όσο και τη BuChE είναι σημαντική για ασθενείς με αυξημένα επίπεδα και των δύο ενζύμων, ενώ οι εκλεκτικοί αναστολείς είτε της AChE είτε της BuChE μπορούν να εφαρμοσθούν κάθε φορά ανάλογα με τον επιλεγμένο θεραπευτικό στόχο.

Ακόμη, η παρουσία ορισμένων δομικών χαρακτηριστικών στον κουμαρινικό σκελετό φαίνεται να συσχετίζεται άμεσα με την ικανότητα αναστολής της δράσης των χολινεστερασών. Πιο συγκεκριμένα, τα μόρια **17a** και **22a** που συντέθηκαν μέσω αντίδρασης με αιθανολαμίνη, παρουσίασαν ισχυρότερη αναστολή της AChE με τιμές IC₅₀ 34.9 και 41.5 μM, αντίστοιχα. Όσον αφορά την αναστολή της

BuChE, σημαντικό ρόλο έχει η συνδυαστική παρουσία φαινυλο και επτυλο ομάδας στον κουμαρινικό σκελετό (**17d** και **22c**).

Στη συνέχεια, εκτιμήθηκαν διάφορες φυσικοχημικές παράμετροι των νέων ενώσεων μέσω δύο διαφορετικών υπολογιστικών εργαλείων (pkCSm και SwissAdme), σύμφωνα με τις οποίες όλες οι ενώσεις εκτός από την **22c**, καθίστανται κατάλληλες για χορήγηση από του στόματος, ενώ σύμφωνα με την τιμή του παράγοντα logBB θεωρούνται ικανές να διαπεράσουν τον αιματοεγκεφαλικό φραγμό.

Τέλος, οι μελέτες μοριακής πρόσδεσης των κουμαρινών αναλόγων που παρουσίασαν ανασταλτική δράση έναντι της AChE, στο στο φαράγγι εισόδου του ενζύμου στο βάθος του οποίου διευθετείται το καταλυτικό κέντρο, υπέδειξε πληθώρα αλληλεπιδράσεων με υψηλές τιμές ενέργειας πρόσδεσης, συγκρίσιμες ή και υψηλότερες σε σχέση με τη γαλανταμίνη. Όλα τα κουμαρινικά ανάλογα παρουσίασαν αλληλεπίδραση με το κρίσιμο αμινοξύ TYR337, καθώς και με ένα ή και περισσότερα αμινοξέα του Περιφερειακού Ανιονικού Κέντρου (PAS), καθιστώντας τα πιθανούς αναστολείς διπλής πρόσδεσης (dual binding site inhibitors).

3.7 ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- [1] H. Hippus, G. Neundörfer, The discovery of Alzheimer's disease, *Dialogues Clin. Neurosci.* 5 (2003) 101. <https://doi.org/10.31887/DCNS.2003.5.1/HHIPPIUS>.
- [2] Z. Breijyeh, R. Karaman, D. Muñoz-Torrero, R. Dembinski, Comprehensive Review on Alzheimer's Disease: Causes and Treatment, *Mol.* 25 (2020) 5789. <https://doi.org/10.3390/MOLECULES25245789>.
- [3] M.P.G. Moreta, N. Burgos-Alonso, M. Torrecilla, J. Marco-Contelles, C. Bruzos-Cidón, Efficacy of acetylcholinesterase inhibitors on cognitive function in alzheimer's disease. Review of reviews, *Biomedicines.* 9 (2021) 1689. <https://doi.org/10.3390/BIOMEDICINES9111689/S1>.
- [4] X.L. Li, N. Hu, M.S. Tan, J.T. Yu, L. Tan, Behavioral and Psychological Symptoms in Alzheimer's Disease, *Biomed Res. Int.* 2014 (2014). <https://doi.org/10.1155/2014/927804>.
- [5] C.G. Lyketsos, M.C. Carrillo, J.M. Ryan, A.S. Khachaturian, P. Trzepacz, J. Amatniek, J. Cedarbaum, R. Brashear, D.S. Miller, Neuropsychiatric symptoms in Alzheimer's disease, *Alzheimer's Dement.* 7 (2011) 532–539. <https://doi.org/10.1016/J.JALZ.2011.05.2410>.
- [6] L. Mucke, Alzheimer's disease, *Nat.* 461 (2009) 895–897. <https://doi.org/10.1038/461895a>.
- [7] M.A. Deture, D.W. Dickson, The neuropathological diagnosis of Alzheimer's disease, *Mol. Neurodegener.* 14 (2019) 1–18. <https://doi.org/10.1186/S13024-019-0333-5>.
- [8] C.A. Lane, J. Hardy, J.M. Schott, Alzheimer's disease, *Eur. J. Neurol.* 25 (2018) 59–70. <https://doi.org/10.1111/ENE.13439>.
- [9] M. Citron, Alzheimer's disease: strategies for disease modification, *Nat. Rev. Drug Discov.* 9 (2010) 387–398. <https://doi.org/10.1038/nrd2896>.
- [10] R.L. Rotundo, Acetylcholinesterase at the neuromuscular junction, *Neurosci. Lett.* 735 (2020) 135157. <https://doi.org/10.1016/J.NEULET.2020.135157>.
- [11] E. Blotnick-Rubin, L. Anglister, Fine localization of acetylcholinesterase in the synaptic cleft of the vertebrate neuromuscular junction, *Front. Mol. Neurosci.* 11 (2018) 123. <https://doi.org/10.3389/FNMOL.2018.00123>.
- [12] C. Colangelo, P. Shichkova, D. Keller, H. Markram, S. Ramaswamy, Cellular, synaptic and network effects of acetylcholine in the neocortex, *Front. Neural Circuits.* 13 (2019) 24. <https://doi.org/10.3389/FNCIR.2019.00024>.
- [13] H. Soreq, S. Seidman,

- Acetylcholinesterase – new roles for an old actor, *Nat. Rev. Neurosci.* 2 (2001) 294–302. <https://doi.org/10.1038/35067589>.
- [14] O. Lockridge, D.M. Quinn, Esterases, *Compr. Toxicol.* Second Ed. 4 (2010) 243–273. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-046884-6.00414-0>.
- [15] E.A. Bittner, J.A.J. Martyn, *Neuromuscular Physiology and Pharmacology, Pharmacol. Physiol. Anesth. Found. Clin. Appl.* (2019) 412–427. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-48110-6.00021-1>.
- [16] A.R. Zivkovic, G.M. Paul, S. Hofer, K. Schmidt, T. Brenner, M.A. Weigand, S.O. Decker, Increased Enzymatic Activity of Acetylcholinesterase Indicates the Severity of the Sterile Inflammation and Predicts Patient Outcome following Traumatic Injury, *Biomolecules.* 13 (2023) 267. <https://doi.org/10.3390/BIOM13020267/S1>.
- [17] H. Hampel, M.M. Mesulam, A.C. Cuello, A.S. Khachaturian, A. Vergallo, M.R. Farlow, P.J. Snyder, E. Giacobini, Z.S. Khachaturian, Revisiting the Cholinergic Hypothesis in Alzheimer’s Disease: Emerging Evidence from Translational and Clinical Research, *J. Prev. Alzheimer’s Dis.* 6 (2018) 2–15. <https://doi.org/10.14283/JPAD.2018.43>.
- [18] P.T. Francis, The interplay of neurotransmitters in Alzheimer’s disease, *CNS Spectr.* 10 (2005) 6–9. <https://doi.org/10.1017/S1092852900014164>.
- [19] E.E.N. Vlachou, I. Fotopoulos, C. Gabriel, E. Pontiki, D.J. Hadjipavlou-Litina, K.E. Litinas, Synthesis and biological evaluation of fused dipyranoquinolinones as inhibitors of acetylcholinesterase with antioxidant properties, *Eur. J. Med. Chem. Reports.* 5 (2022) 100063. <https://doi.org/10.1016/J.EJMCR.2022.100063>.
- [20] A. Ece, Towards more effective acetylcholinesterase inhibitors: a comprehensive modelling study based on human acetylcholinesterase protein–drug complex, *J. Biomol. Struct. Dyn.* 38 (2020) 565–572. <https://doi.org/10.1080/07391102.2019.1583606>.
- [21] M. Bortolami, D. Rocco, A. Messori, R. Di Santo, R. Costi, V.N. Madia, L. Scipione, F. Pandolfi, Acetylcholinesterase inhibitors for the treatment of Alzheimer’s disease – a patent review (2016–present), <https://doi.org/10.1080/13543776.2021.1874344>.
- [22] M. Holmquist, Alpha/Beta-hydrolase fold enzymes: structures, functions and mechanisms, *Curr. Protein Pept. Sci.* 1 (2000) 209–235. <https://doi.org/10.2174/1389203003381405>.
- [23] Y. Zhou, S. Wang, Y. Zhang, Catalytic Reaction Mechanism of Acetylcholinesterase

- Determined by Born-Oppenheimer ab initio QM/MM Molecular Dynamics Simulations, *J. Phys. Chem. B.* 114 (2010) 8817. <https://doi.org/10.1021/JP104258D>.
- [24] X.P. Zhang, W. Xu, J.H. Wang, Y. Shu, MnO₂/DNAzyme-mediated ratiometric fluorescence assay of acetylcholinesterase, *Analyst.* 147 (2022) 4008–4013. <https://doi.org/10.1039/D2AN01180H>.
- [25] I. Silman, J.L. Sussman, Acetylcholinesterase: ‘classical’ and ‘non-classical’ functions and pharmacology, *Curr. Opin. Pharmacol.* 5 (2005) 293–302. <https://doi.org/10.1016/J.COPH.2005.01.014>.
- [26] I. Silman, J.L. Sussman, Acetylcholinesterase: How is structure related to function?, *Chem. Biol. Interact.* 175 (2008) 3–10. <https://doi.org/10.1016/J.CBI.2008.05.035>.
- [27] H. Dvir, I. Silman, M. Harel, T.L. Rosenberry, J.L. Sussman, Acetylcholinesterase: From 3D structure to function, *Chem. Biol. Interact.* 187 (2010) 10–22. <https://doi.org/10.1016/J.CBI.2010.01.042>.
- [28] M.B. Colovic, D.Z. Krstic, T.D. Lazarevic-Pasti, A.M. Bondzic, V.M. Vasic, Acetylcholinesterase Inhibitors: Pharmacology and Toxicology, *Curr. Neuropharmacol.* 11 (2013) 315. <https://doi.org/10.2174/1570159X11311030006>.
- [29] S.C. Peitzika, E. Pontiki, A Review on Recent Approaches on Molecular Docking Studies of Novel Compounds Targeting Acetylcholinesterase in Alzheimer Disease, *Molecules.* 28 (2023) 1084. <https://doi.org/10.3390/MOLECULES28031084/S1>.
- [30] Ł.J. Walczak-Nowicka, M. Herbet, Acetylcholinesterase Inhibitors in the Treatment of Neurodegenerative Diseases and the Role of Acetylcholinesterase in their Pathogenesis, *Int. J. Mol. Sci.* 22 (2021) 9290. <https://doi.org/10.3390/IJMS22179290>.
- [31] A. A. Ordentlich, D. Barak, C. Kronman, Y. Flashner, M. Leitner, Y. Segall, N. Ariel, S. Cohen, B. Velan, A. Shafferman, Dissection of the human acetylcholinesterase active center determinants of substrate specificity. Identification of residues constituting the anionic site, the hydrophobic site, and the acyl pocket - PubMed, *J Biol Chem.* 268 (1993) 17083–95.
- [32] N.C. Inestrosa, J.P. Sagal, M. Colombres, Acetylcholinesterase interaction with Alzheimer amyloid beta., *Subcell. Biochem.* 38 (2005) 299–317. https://doi.org/10.1007/0-387-23226-5_15.
- [33] A. Arya, R. Chahal, R. Rao, M.H. Rahman, D. Kaushik, M.F. Akhtar, A. Saleem, S.M.A. Khalifa, H.R. El-Seedi, M. Kamel, G.M. Albadrani, M.M. Abdel-Daim, V. Mittal,

- Acetylcholinesterase Inhibitory Potential of Various Sesquiterpene Analogues for Alzheimer's Disease Therapy, *Biomol.* 11 (2021) 350. <https://doi.org/10.3390/BIOM11030350>.
- [34] G. Johnson, S. Moore, The Peripheral Anionic Site of Acetylcholinesterase: Structure, Functions and Potential Role in Rational Drug Design, *Curr. Pharm. Des.* 12 (2005) 217–225. <https://doi.org/10.2174/138161206775193127>.
- [35] G. Marucci, M. Buccioni, D.D. Ben, C. Lambertucci, R. Volpini, F. Amenta, Efficacy of acetylcholinesterase inhibitors in Alzheimer's disease, *Neuropharmacology.* 190 (2021) 108352. <https://doi.org/10.1016/J.NEUROPHARM.2020.108352>.
- [36] T.L. Rosenberry, X. Brazzolotto, I.R. MacDonald, M. Wandhammer, M. Trovaslet-Leroy, S. Darvesh, F. Nachon, Comparison of the binding of reversible inhibitors to human butyrylcholinesterase and acetylcholinesterase: A crystallographic, kinetic and calorimetric study, *Molecules.* 22 (2017). <https://doi.org/10.3390/MOLECULES22122098>.
- [37] S. Xing, Q. Li, B. Xiong, Y. Chen, F. Feng, W. Liu, H. Sun, Structure and therapeutic uses of butyrylcholinesterase: Application in detoxification, Alzheimer's disease, and fat metabolism, *Med. Res. Rev.* 41 (2021) 858–901. <https://doi.org/10.1002/MED.21745>.
- [38] S.N. Dighe, G.S. Deora, E. De La Mora, F. Nachon, S. Chan, M.O. Parat, X. Brazzolotto, B.P. Ross, Discovery and structure-activity relationships of a highly selective butyrylcholinesterase inhibitor by Structure-based virtual screening, *J. Med. Chem.* 59 (2016) 7683–7689. <https://doi.org/10.1021/ACS.JMEDCHEM.6B00356/>.
- [39] N.H. Greig, D.K. Lahiri, K. Sambamurti, Butyrylcholinesterase: an important new target in Alzheimer's disease therapy, *Int. Psychogeriatrics.* 14 (2002) 77–91. <https://doi.org/10.1017/S1041610203008676>.
- [40] Z.Y. Ha, S. Mathew, K.Y. Yeong, Butyrylcholinesterase: A Multifaceted Pharmacological Target and Tool, *Curr. Protein Pept. Sci.* 21 (2019) 99–109. <https://doi.org/10.2174/1389203720666191107094949>.
- [41] S. Brimijoin, Y. Gao, L. Geng, V.P. Chen, Treating cocaine addiction, obesity, and emotional disorders by viral gene transfer of butyrylcholinesterase, *Front. Pharmacol.* 9 (2018) 112. <https://doi.org/10.3389/FPHAR.2018.00112>.
- [42] S. Ahmed, S.T. Khan, M.K. Zargaham, A.U. Khan, S. Khan, A. Hussain, J. Uddin, A. Khan, A. Al-Harrasi, Potential therapeutic natural products

- against Alzheimer's disease with Reference of Acetylcholinesterase, *Biomed. Pharmacother.* 139 (2021) 111609. <https://doi.org/10.1016/J.BIOPH A.2021.111609>.
- [43] T. Zhao, K.M. Ding, L. Zhang, X.M. Cheng, C.H. Wang, Z.T. Wang, Acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase inhibitory activities of β -carboline and quinoline alkaloids derivatives from the plants of genus *peganum*, *J. Chem.* (2013). <https://doi.org/10.1155/2013/717232>.
- [44] T.C. Dos Santos, T.M. Gomes, B.A.S. Pinto, A.L. Camara, A.M. De Andrade Paes, Naturally occurring acetylcholinesterase inhibitors and their potential use for Alzheimer's disease therapy, *Front. Pharmacol.* 9 (2018) 1192. <https://doi.org/10.3389/fphar.2018.01192>.
- [45] S.Y. Kang, K.Y. Lee, S.H. Sung, M.J. Park, Y.C. Kim, Coumarins isolated from *Angelica gigas* inhibit acetylcholinesterase: Structure-activity relationships, *J. Nat. Prod.* 64 (2001) 683–685. <https://doi.org/10.1021/NP000441W>.
- [46] P. Anand, B. Singh, N. Singh, A review on coumarins as acetylcholinesterase inhibitors for Alzheimer's disease, *Bioorg. Med. Chem.* 20 (2012) 1175–1180. <https://doi.org/10.1016/J.BMC.2011.12.042>.
- [47] F. Sonmez, B. Zengin Kurt, I. Gazioglu, L. Basile, A. Dag, V. Cappello, T. Ginex, M. Kucukislamoglu, S. Guccione, Design, synthesis and docking study of novel coumarin ligands as potential selective acetylcholinesterase inhibitors, *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.* 32 (2017) 285–297. <https://doi.org/10.1080/14756366.2016.1250753>.
- [48] Y.H. Hu, J. Yang, Y. Zhang, K.C. Liu, T. Liu, J. Sun, X.J. Wang, Synthesis and biological evaluation of 3-(4-aminophenyl)-coumarin derivatives as potential anti-Alzheimer's disease agents, *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.* 34 (2019) 1083–1092. <https://doi.org/10.1080/14756366.2019.1615484>.
- [49] S.C. Mzezewa, S.I. Omoruyi, L.S. Zondagh, S.F. Malan, O.E. Ekpo, J. Joubert, Design, synthesis, and evaluation of 3,7-substituted coumarin derivatives as multifunctional Alzheimer's disease agents, *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.* 36 (2021) 1607–1621. <https://doi.org/10.1080/14756366.2021.1913137>.
- [50] T. Behl, D. Kaur, A. Sehgal, S. Singh, N. Sharma, G. Zengin, F.L. Andronie-Cioara, M.M. Toma, S. Bungau, A.G. Bumbu, Role of Monoamine Oxidase Activity in Alzheimer's Disease: An Insight into the Therapeutic Potential of Inhibitors, *Molecules.* 26 (2021). <https://doi.org/10.3390/MOLECULES26123724>.
- [51] G.L. Ellman, A colorimetric method for determining low concentrations of mercaptans,

- Arch. Biochem. Biophys. 74 (1958) 443–450. [https://doi.org/10.1016/0003-9861\(58\)90014-6](https://doi.org/10.1016/0003-9861(58)90014-6).
- [52] K. Raghupathi, S. Thayumanavan, Nano-Armoring of Enzymes: Rational Design of Polymer-Wrapped Enzymes, *Methods Enzymol.* 590 (2017) 381–411. <https://doi.org/10.1016/BS.MIE.2017.01.007>.
- [53] L.K. Oliver, Laboratory Assessment of Exposure to Neurotoxic Agents, *Clin. Neurotoxicology Syndr. Subst. Environ. Expert Consult - Online Print.* (2009) 213–221. <https://doi.org/10.1016/B978-032305260-3.50023-X>.
- [54] G. Šinko, M. Čalić, A. Bosak, Z. Kovarik, Limitation of the Ellman method: Cholinesterase activity measurement in the presence of oximes, *Anal. Biochem.* 370 (2007) 223–227. <https://doi.org/10.1016/J.AB.2007.07.023>.
- [55] P. Bohn, N. Le Fur, G. Hagues, J. Costentin, N. Torquet, C. Papamicaël, F. Marsais, V. Levacher, Rational design of central selective acetylcholinesterase inhibitors by means of a “bio-oxidisable prodrug” strategy, *Org. Biomol. Chem.* 7 (2009) 2612–2618. <https://doi.org/10.1039/B903041G>.
- [56] S.S. Xie, J.S. Lan, X. Wang, Z.M. Wang, N. Jiang, F. Li, J.J. Wu, J. Wang, L.Y. Kong, Design, synthesis and biological evaluation of novel donepezil–coumarin hybrids as multi-target agents for the treatment of Alzheimer’s disease, *Bioorg. Med. Chem.* 24 (2016) 1528–1539. <https://doi.org/10.1016/J.BMC.2016.02.023>.
- [57] S. Ghanei-Nasab, M. Khoobi, F. Hadizadeh, A. Marjani, A. Moradi, H. Nadri, S. Emami, A. Foroumadi, A. Shafiee, Synthesis and anticholinesterase activity of coumarin-3-carboxamides bearing tryptamine moiety, *Eur. J. Med. Chem.* 121 (2016) 40–46. <https://doi.org/10.1016/J.EJMECH.2016.05.014>.
- [58] N.H. Greig, T. Utsuki, D.K. Ingram, Y. Wang, G. Pepeu, C. Scali, Q.S. Yu, J. Mamczarz, H.W. Holloway, T. Giordano, D. Chen, K. Furukawa, K. Sambamurti, A. Brossi, D.K. Lahiri, Selective butyrylcholinesterase inhibition elevates brain acetylcholine, augments learning and lowers Alzheimer β -amyloid peptide in rodent, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102 (2005) 17213–17218. <https://doi.org/10.1073/PNAS.0508575102/>.
- [59] E.E.J. Kasteel, S.M. Nijmeijer, K. Darney, L.S. Lautz, J.L.C.M. Dorne, N.I. Kramer, R.H.S. Westerink, Acetylcholinesterase inhibition in electric eel and human donor blood: an in vitro approach to investigate interspecies differences and human variability in toxicodynamics, *Arch. Toxicol.* 94 (2020) 4055–4065. <https://doi.org/10.1007/S00204-020-02927-8>.

- [60] D.R. Moorad, G.E. Garcia, B.P. Doctor, Amino Acid Sequence of Horse Serum Butyrylcholinesterase, *Struct. Funct. Cholinesterases Relat. Proteins.* (1998) 145–146. https://doi.org/10.1007/978-1-4899-1540-5_37.
- [61] F. Tsopelas, T. Vallianatou, A. Tsantili-Kakoulidou, The potential of immobilized artificial membrane chromatography to predict human oral absorption, *Eur. J. Pharm. Sci.* 81 (2016) 82–93. <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2015.09.020>.
- [62] M.S. Alqahtani, M. Kazi, M.A. Alsenaidy, M.Z. Ahmad, *Advances in Oral Drug Delivery*, *Front. Pharmacol.* 12 (2021) 62. <https://doi.org/10.3389/FPHAR.2021.618411>.
- [63] C.A. Lipinski, F. Lombardo, B.W. Dominy, P.J. Feeney, Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 23 (1997) 3–25. [https://doi.org/10.1016/S0169-409X\(96\)00423-1](https://doi.org/10.1016/S0169-409X(96)00423-1).
- [64] D.F. Veber, S.R. Johnson, H.Y. Cheng, B.R. Smith, K.W. Ward, K.D. Kopple, Molecular properties that influence the oral bioavailability of drug candidates, *J. Med. Chem.* 45 (2002) 2615–2623. <https://doi.org/10.1021/JM020017N>.
- [65] L.A. Nascimento, É.C.M. Nascimento, J.B.L. Martins, In silico study of tacrine and acetylcholine binding profile with human acetylcholinesterase: docking and electronic structure, *J. Mol. Model.* 28 (2022) 1–13. <https://doi.org/10.1007/S00894-022-05252-2>.
- [66] I. Dorronsoro, A. Castro, A. Martinez, Peripheral and dual binding site inhibitors of acetylcholinesterase as neurodegenerative disease-modifying agents, *Expert Opin. Ther. Pat.* 13 (2003) 1725–1732. <https://doi.org/10.1517/eotp.13.1.1725.23103>.
- [67] J.R. De Almeida, M. Figueiro, W.P. Almeida, C.H.T. De Paula Da Silva, Discovery of novel dual acetylcholinesterase inhibitors with antifibrillogenic activity related to Alzheimer’s disease, *Future Med. Chem.* 10 (2018) 1037–1053. <https://doi.org/10.4155/FMC-2017-0201>.
- [68] I. Zueva, J. Dias, S. Lushchekina, V. Semenov, M. Mukhamedyarov, T. Pashirova, V. Babaev, F. Nachon, N. Petrova, L. Nurullin, L. Zakharova, V. Ilyin, P. Masson, K. Petrov, New evidence for dual binding site inhibitors of acetylcholinesterase as improved drugs for treatment of Alzheimer’s disease, *Neuropharmacology.* 155 (2019) 131–141. <https://doi.org/10.1016/J.NEUROPHARM.2019.05.025>.
- [69] H. Valizadeh, S. Vaghefi, One-

- Pot Wittig and Knoevenagel Reactions in Ionic Liquid as Convenient Methods for the Synthesis of Coumarin Derivatives, 39 (2009) 1666–1678. <https://doi.org/10.1080/00397910802573163>.
- [70] R.S. Swaroop, Divya; Sharma, R. B.; Kapil, No Title, Indian J. Chem. - Sect. B Org. Med. Chem. 22 (1983) 105–108.
- [71] T. Guerrero, F. Vázquez-Ortega, I. Lagunes, E. Ortiz-Blanco, G. Sosa-Ortiz, R. Tovar-Miranda, M.E. Medina, Á. Trigos, Antagonistic activity of hydroxycoumarin-based antioxidants as possible singlet oxygen precursor photosensitizers, Dye. Pigment. 192 (2021) 109447. <https://doi.org/10.1016/J.DYEPIG.2021.109447>.
- [72] D.A. Olmedo, J.L. López-Pérez, E. Del Olmo, L.M. Bedoya, R. Sancho, J. Alcamí, E. Muñoz, A. San Feliciano, M.P. Gupta, Neoflavonoids as Inhibitors of HIV-1 Replication by Targeting the Tat and NF- κ B Pathways, Molecules. 22 (2017). <https://doi.org/10.3390/MOLECULES22020321>.
- [73] N. Jiang, Q. Huang, J. Liu, N. Liang, Q. Li, Q. Li, S.S. Xie, Design, synthesis and biological evaluation of new coumarin-dithiocarbamate hybrids as multifunctional agents for the treatment of Alzheimer's disease, Eur. J. Med. Chem. 146 (2018) 287–298. <https://doi.org/10.1016/J.EJMECH.2018.01.055>.
- [74] S.S. Xie, X. Wang, N. Jiang, W. Yu, K.D.G. Wang, J.S. Lan, Z.R. Li, L.Y. Kong, Multi-target tacrine-coumarin hybrids: Cholinesterase and monoamine oxidase B inhibition properties against Alzheimer's disease, Eur. J. Med. Chem. 95 (2015) 153–165. <https://doi.org/10.1016/J.EJMECH.2015.03.040>.

Κεφάλαιο 4ο

ΣΧΕΔΙΑΣΜΟΣ ΚΑΙ ΣΥΝΘΕΣΗ ΝΕΩΝ ΥΒΡΙΔΙΚΩΝ
ΜΟΡΙΩΝ ΚΟΥΜΑΡΙΝΩΝ-ΧΑΛΚΟΝΩΝ ΚΑΙ
ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΤΗΣ ΒΙΟΔΡΑΣΤΙΚΟΤΗΤΑΣ ΤΟΥΣ

4.1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ

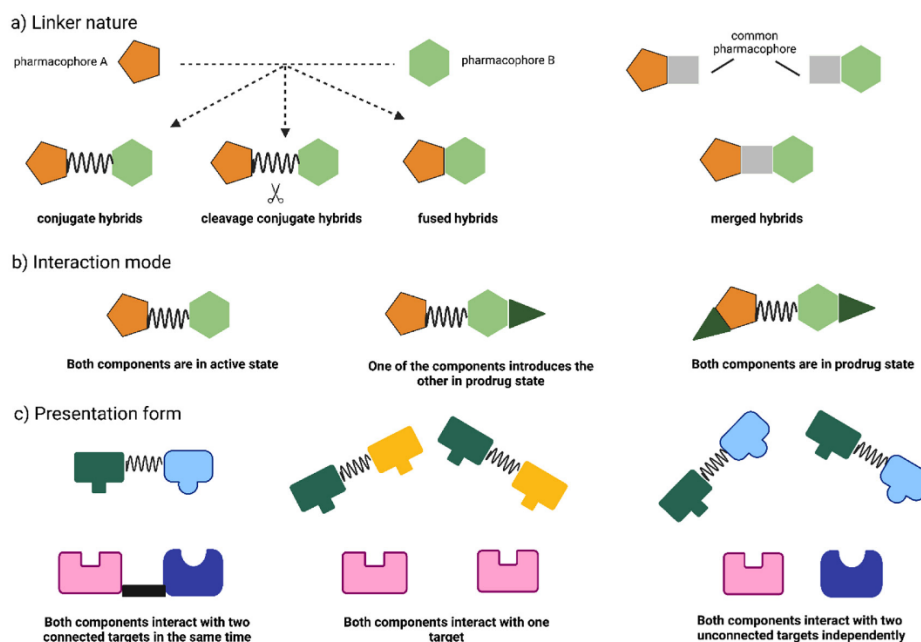
4.1.1 Υβριδικά μόρια

Τον τελευταίο αιώνα, η ανακάλυψη νέων φαρμάκων έγκειται κυρίως στην προσέγγιση «ένας στόχος-μία ασθένεια» (“one target-one disease”), όπου με γνώμονα τις γνώσεις που υπάρχουν για κάθε βιολογικό στόχο, αναπτύσσονται στοχευμένα φάρμακα ώστε να δρουν επιτυχώς έναντι αυτού. Ωστόσο, η πολυπαραγοντικότητα ορισμένων ασθενειών, όπως ο καρκίνος ή οι νευροεκφυλιστικές διαταραχές, οδήγησαν αρχικά στο συνδυασμό περισσότερων τους ενός δραστικών ουσιών σ' ένα φαρμακευτικό σκεύασμα, χορηγώντας με αυτό τον τρόπο ένα «κοκτέιλ» φαρμάκων. Πλεονεκτήματα αποτελούν η ταυτόχρονη αντιμετώπιση περισσότερων του ενός στόχων και η καλύτερη συμμόρφωση των ασθενών στη λήψη της αγωγής τους όταν αυτή αποτελείται από λιγότερες δόσεις. Παρόλα αυτά, η μέθοδος αυτή ενέχει ορισμένα μειονεκτήματα όπως αλληλεπιδράσεις μεταξύ των δραστικών ουσιών [1].

Τα γεγονότα αυτά οδήγησαν στην ανακάλυψη των υβριδικών μορίων τα οποία συνδυάζουν δύο ή περισσότερα φαρμακοφόρα τμήματα στη δομή τους και δρουν συνεργιστικά για την αντιμετώπιση πολλαπλών στόχων, εμφανίζοντας σε πολλές περιπτώσεις βελτιωμένη δράση σε σχέση με τις επιμέρους δομές [2–6].

Τα υβριδικά μόρια μπορούν να κατηγοριοποιηθούν σε τρεις κατηγορίες (Εικόνα 4.1), ανάλογα με [7,8]:

- Τον τρόπο αλληλεπίδρασης του κάθε φαρμακοφόρου τμήματος με το στόχο
- Τη φύση της παρουσίας των επιμέρους μορίων (σε ενεργή μορφή ή μορφή προφάρμακου)
- Τον τρόπο σύνδεσης των επιμέρους δομών μεταξύ τους.



Εικόνα 4.1 Κατηγοριοποίηση υβριδικών μορίων [7].

Όσον αφορά τον τρόπο σύνδεσης, μπορεί να πραγματοποιηθεί με τους εξής τρόπους:

i. Σύνδεση μέσω χρήσης ενός συνδέτη (Linked Conjugates)

Σε αυτήν την περίπτωση χρησιμοποιείται ένας συνδέτης μεταξύ των φαρμακοφόρων, η επιλογή του οποίου παίζει σημαντικό ρόλο στα χαρακτηριστικά του μορίου. Οι συνδέτες μπορεί να είναι είτε σταθεροί (non-cleavable), είτε να διασπώνται (cleavable) παρουσία κατάλληλων συνθηκών όπως pH ή ενζύμων. Ακόμη, διακρίνονται σε γραμμικούς, π.χ. μεθυλενικές ή πολυμερικές αλυσίδες και μη-γραμμικούς, π.χ. αρωματικοί ή ετεροκυκλικοί δακτύλιοι.

ii. Σύνδεση μέσω συνένωσης των μορίων (Fused hybrids)

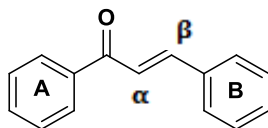
Στην περίπτωση της συνένωσης, δεν χρησιμοποιείται συνδέτης αλλά τα μόρια συνδέονται απευθείας μεταξύ τους, χωρίς να επικαλύπτει το ένα το άλλο. Ανάλογα με τη φύση των επιμέρους δομών και τον τρόπο που αλληλεπιδρούν μεταξύ τους, τα υβριδικά μόρια που προκύπτουν μέσω συνένωσης μπορούν να χωριστούν σε σταθερά και ασταθή. Τα ασταθή μόρια, όταν βρεθούν στο εσωτερικό του οργανισμού αποσυντίθεται στα αρχικά μόρια, ενώ τα σταθερά μόρια δρουν σαν πολυλειτουργικά καινοτόμα φάρμακα με περισσότερους από έναν μηχανισμούς.

iii. Σύνδεση μέσω «συγχώνευσης» των μορίων (Merged hybrids)

Στην τρίτη περίπτωση, το υβριδικό μόριο προκύπτει μέσω της συγχώνευσης όμοιων δομικών στοιχείων που ανήκουν στα επιμέρους μόρια. Η αλληλοεπικάλυψη έχει ως αποτέλεσμα μικρότερα και επομένως απλούστερα μόρια [7,9].

4.1.2 Υβριδικά μόρια κουμαρινών-χαλκονών

Οι χαλκόνες ή αλλιώς 1,3-διφαινυλο-2-προπεν-1-όνες, αποτελούνται από δύο αρωματικούς δακτυλίους (A και B) που ενώνονται μέσω ενός α , β ακόρεστου καρβονυλικού συστήματος τριών ανθράκων (Σχήμα 4.1). Είναι φυσικά προϊόντα που βρίσκονται σε διάφορα φυτικά είδη, φρούτα (π.χ. εσπεριδοειδή, σταφύλια) και λαχανικά (π.χ. κουνουπίδια, κρεμμύδια) [10]. Ειδικότερα, διάφορες χαλκόνες, με μεθυλο,πρενυλο και υδροξυ ομάδες, έχουν απομονωθεί από τις οικογένειες Asteraceae, Fabaceae, Cannabaceae, Solanaceae κ.α. Οι διυδροξυ-χαλκόνες φαίνεται να παρουσιάζουν πολλές ευεργετικές ιδιότητες τόσο για τα φυτά από τα οποία προέρχονται όσο και για τα ζώα και τους ανθρώπους [11]. Οι χαλκόνες αποτελούν ενδιάμεσα της βιοσύνθεσης των φλαβονοειδών, που είναι ενώσεις ευρέως διαδεδομένες σε φυτικούς οργανισμούς και διαθέτουν ένα μεγάλο φάσμα βιολογικών ιδιοτήτων [12].

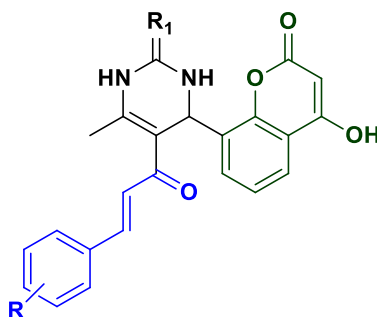


Σχήμα 4.1 Χημική δομή της 1,3-διφαινυλο-2-προπεν-1-όνης.

Οι χαλκόνες έχουν επιδείξει σημαντική αντιμυκητιασική [13,14], αντιοξειδωτική, αντιφλεγμονώδη [15,16] και αντικαρκινική δράση [17–19], καθώς και δράση εναντίον της φυματίωσης [20], της ελονοσίας [21,22] και της λεισμανίασης [23]. Η κυριότερη μέθοδος σύνθεσης των χαλκονών γίνεται μέσω αντίδρασης μικτής αλδολικής συμπύκνωσης (Claisen – Schmidt condensation) ανάμεσα σε καρβονυλικές ενώσεις η οποία αναπτύχθηκε το 1881 [24,25].

Οι πολλαπλές βιολογικές δράσεις τόσο των χαλκονών όσο και των κουμαρινών, έχει οδηγήσει, διάφορες ερευνητικές ομάδες να σχεδιάσουν και να συνθέσουν υβριδικά μόρια κουμαρινών-χαλκονών τα οποία εμφανίζουν ένα ευρύ φάσμα φαρμακολογικών ιδιοτήτων.

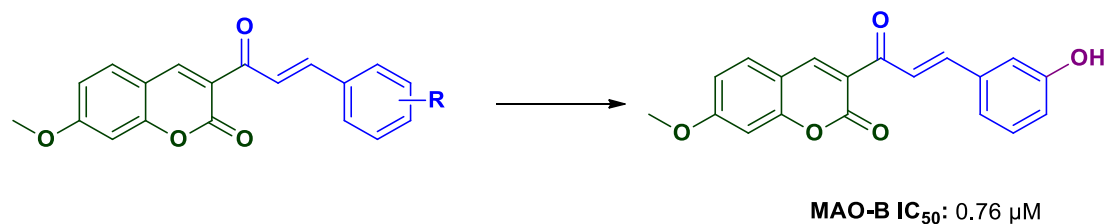
Για παράδειγμα, η ερευνητική ομάδα των Konidala et al. [26], συνέθεσε νέα υβριδικά μόρια κουμαρινών-χαλκονών με τη δομή που φαίνεται στο Σχήμα 4.2, τα οποία εξετάστηκαν για την αντιμικροβιακή και αντιοξειδωτική τους δράση. Τα υβριδικά μόρια εξετάστηκαν για την αντιμικροβιακή τους δράση έναντι των παθογόνων *Staphylococcus aureus* (NCIM 2122), *Escherichia coli* (NCIM 2137) και *Aspergillus niger* (NCIM 652) παρουσιάζουν τιμές MIC μεταξύ 8 και 49 μM . Ακόμη, η αντιοξειδωτική τους δράση εξετάστηκε μέσω της δοκιμής δέσμμευσης της ελεύθερης ρίζας DPPH, με ορισμένα παράγωγα να παρουσιάζουν παρόμοια δράση με το ασκορβικό οξύ που χρησιμοποιήθηκε ως πρότυπο (80% αναστολή στη συγκέντρωση των 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$).



Σχήμα 4.2 Γενική δομή υβριδικών μορίων κουμαρινών-χαλκονών με αντιοξειδωτική και αντιμικροβιακή δράση.

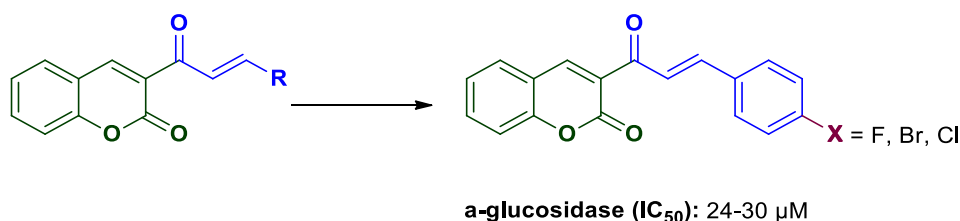
Επιπλέον, η ερευνητική ομάδα των Moya-Alvarado et al., συνέθεσε μία σειρά υβριδικών μορίων κουμαρινών-χαλκονών, τα οποία εξετάστηκαν ως αναστολείς της μονοαμινοξειδάσης A και B (Monoamine Oxidase, MAO-A & MAO-B). Τα εξεταζόμενα μόρια βρέθηκαν ικανότεροι αναστολείς της MAO-B με πέντε από τα δεκατέσσερα υβριδικά μόρια να παρουσιάζουν τιμή IC_{50} μικρότερη από 10 μM . Το ανάλογο που παρουσίασε τη βέλτιστη δράση (IC_{50} 0.76 μM) φέρει υδροξυ-

υποκαταστάτη σε μετα θέση, ενώ υποκατάσταση με υδροξυ ομάδα σε ορθο ή παρα θέση, οδήγησε σε απώλεια της δράσης (Σχήμα 4.3).



Σχήμα 4.3 Γενική δομή υβριδικών μορίων κουμαρινών-χαλκονών (αριστερά) και δομή του παραγώγου που αποτέλεσε καλύτερο αναστολέα της MAO-B (δεξιά).

Τέλος, σε μελέτη των Hu και των συνεργατών του [27], συντέθηκαν υβριδικά μόρια κουμαρινών-χαλκονών με γενική δομή του Σχήματος 4.4, όπου R είναι διάφορες αρυλο και ετεροκυκλικές ομάδες, και εξετάστηκαν ως αναστολείς της α-γλυκοσιδάσης. Όλα τα παράγωγα ανέστειλαν επιτυχώς τη δράση του ενζύμου με τιμές IC₅₀ μεταξύ 24 και 125 μM, ενώ η ακαρβόζη που χρησιμοποιήθηκε ως πρότυπο παρουσίασε τιμή IC₅₀ 260 μM. Τα παράγωγα που παρουσίασαν την καλύτερη δράση διαθέτουν ως υποκαταστάτη αρυλο δακτύλιο, υποκατεστημένο σε p θέση με ομάδα φθορίου, βρωμίου ή χλωρίου, υποδεικνύοντας τη σημασία της υποκατάστασης με αλογόνο στη συγκεκριμένη θέση.



Σχήμα 4.4 Γενική δομή υβριδικών μορίων κουμαρινών-χαλκονών (αριστερά) και δομή των παραγώγων που αποτέλεσαν καλύτερους αναστολείς της α-γλυκοσιδάσης (δεξιά).

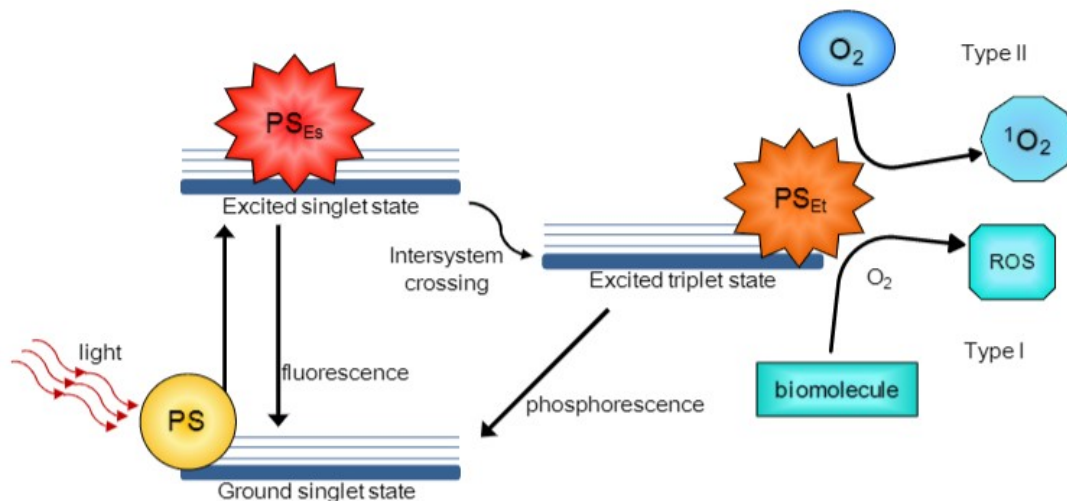
4.1.3 Φωτοδυναμική Θεραπεία (Photodynamic Therapy, PDT)

Η φωτοδυναμική θεραπεία (PDT) αποτελεί μία θεραπευτική προσέγγιση που περιλαμβάνει τη χρήση ενός φωτοευαίσθητοποιητή, ο οποίος έπειτα από ακτινοβολία με κατάλληλη πηγή φωτός και παρουσία οξυγόνου, οδηγεί στην παραγωγή δραστικών μορφών οξυγόνου (ROS), οι οποίες επάγουν τον κυτταρικό θάνατο [28–30]. Είναι σημαντικό ότι κανένας από αυτούς παράγοντες δεν πρέπει να είναι τοξικός από μόνος του, αλλά ο συνδυασμός τους να οδηγεί στη φωτοδυναμική δράση [31]. Η PDT αποτελεί μία παρεμβατική μέθοδο που εφαρμόζεται για την αντιμετώπιση τόσο καλοσηθών ασθενειών όπως η ακμή όσο και κακοσηθών ασθενειών, όπως ο καρκίνος του δέρματος και του οισοφάγου [32]. Ειδικότερα, ενώ ανακαλύφθηκε εδώ και περισσότερο από έναν αιώνα πριν, χρησιμοποιείται κυρίως από το 1970 και έπειτα. Πλεονεκτήματα της μεθόδου αποτελούν οι λιγότερες παρενέργειες και η καλύτερη ανοχή από τους ασθενείς σε

σχέση με άλλες μεθόδους όπως η χημειοθεραπεία [33]. Ωστόσο, μειονεκτήματα αποτελούν η φωτοευαισθησία έπειτα από κάθε θεραπεία καθώς και η δυσκολία διοχέτευσης του φωτός σε ορισμένες περιοχές του ανθρώπινου οργανισμού, περιορίζοντας έτσι τη χρήση του έναντι συγκεκριμένων τύπων καρκίνου [34,35].

Η φωτοδυναμική θεραπεία θα μπορούσε να θεωρηθεί ως μία διαδικασία δύο σταδίων. Αρχικά η φωτοευαίσθητη ουσία χορηγείται στον ασθενή είτε τοπικά είτε συστηματικά. Κατά το δεύτερο στάδιο και μετά την πάροδο κατάλληλου χρονικού διαστήματος ώστε ο φωτοευαίσθητοποιητής να έχει συγκεντρωθεί σε μεγάλο βαθμό στους πάσχοντες ιστούς, οι ιστοί αυτοί ακτινοβολούνται με οπτική ακτινοβολία κατάλληλων φασματικών χαρακτηριστικών. Με αυτόν τον τρόπο προκαλείται ενεργοποίηση/διέγερση του φωτοευαίσθητοποιητή η οποία σημαίνει την έναρξη μιας σειράς φωτοχημικών αντιδράσεων, τα προϊόντα των οποίων προκαλούν σημαντικές βλάβες σε συστατικά, όπως οργανίδια και μεμβράνες, αλλά και λειτουργίες των μη υγιών κυττάρων, οδηγώντας τα τελικά σε κυτταρικό θάνατο [36].

Όσον αφορά το φωτοευαίσθητοποιητή, ο μηχανισμός δράσης του μπορεί να είναι τύπου I ή τύπου II. Στον τύπο I, τα μόρια του φωτοευαίσθητοποιητή έπειτα από ακτινοβολία με κατάλληλη πηγή φωτός, διεγείρονται στην πρώτη ή τριπλή διεγερμένη στάθμη. Στη συνέχεια, μέσω μεταφοράς ηλεκτρονίων τα διεγερμένα μόρια αλληλεπιδρούν με το υπόστρωμα (π.χ. καρκινικός όγκος) παράγοντας ελεύθερες ρίζες. Αντίθετα, κατά τον τύπο II, τα διεγερμένα μόρια μεταφέρουν ενέργεια σε μοριακό οξυγόνο το οποίο μετατρέπεται σε μονήρες οξυγόνο και αλληλεπιδρά με λιπίδια, πρωτεΐνες κ.α. οδηγώντας σε νέκρωση ή απόπτωση (Εικόνα 4.2) [33,37–39].



Εικόνα 4.2 Μηχανισμοί δράσης φωτοευαίσθητοποιητών [34].

Το ποσοστό με το οποίο θα συμμετέχουν οι δύο τύποι αντιδράσεων στο τελικό κυτταροτοξικό αποτέλεσμα εξαρτάται από:

- τη συγκέντρωση οξυγόνου,
- το pH,
- το φωτοευαίσθητοποιητή,

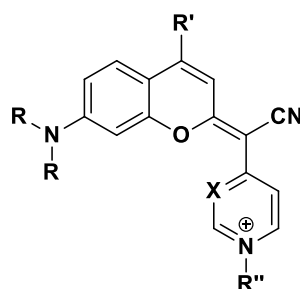
➤ το είδος του κυττάρου.

Επιθυμητά χαρακτηριστικά του φωτοευαισθητοποιητή είναι να έχει μεγάλο χρόνο ζωής στην τριπλή διεγερμένη στάθμη και σημαντική ικανότητα παραγωγής ελευθέρων ριζών και/ή μονήρους οξυγόνου. Ακόμη, είναι σημαντικό να παρουσιάζουν επιλεκτικότητα ως προς τους καρκινικούς ιστούς, γρήγορη αποδέσμευση από τους υγιείς ιστούς και απομάκρυνση από τον οργανισμό μετά το τέλος της θεραπείας και χαμηλή τοξικότητα απουσία φωτός. Επιπλέον, καθώς η ακτινοβολήση με μήκος κύματος 600-850 nm, διεισδύει βαθύτερα στο δέρμα, προτιμώνται φωτοευαισθητοποιητές με απορροφήσεις σε υψηλότερα μήκη κύματος [40].

4.1.4 Κουμαρίνες και χαλκόνες στη Φωτοδυναμική Θεραπεία

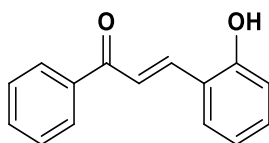
Διαφορετικά μόρια φυσικής ή συνθετικής προέλευσης έχουν παρουσιάσει αξιόλογη φωτοευαισθητοποιητική δράση, όπως οι πορφυρίνες και οι φθαλοκυανίνες, αλλά και οι κουμαρίνες και οι χαλκόνες [41–44].

Ειδικότερα, σε μελέτη των Ortega-Forte et al. [45], συντέθηκε μία σειρά νέων κουμαρινικών αναλόγων, τα οποία εξετάστηκαν για τη φωτοευαισθητοποιητική τους δράση (Σχήμα 4.5). Η φωτοτοξικότητα των νέων παραγώγων εξετάστηκε έναντι της καρκινικής σειράς αδενοκαρκινώματος HeLa τόσο υπό συνθήκες υποξίας όσο και υπό κανονικές συνθήκες οξυγόνου (νορμοξία). Τα εξεταζόμενα ανάλογα παρουσίασαν ισχυρότερη φωτοτοξικότητα υπό συνθήκες νορμοξίας (0.03-40μM), επιβεβαιώνοντας το ρόλο του οξυγόνου και άρα της παραγωγής ελευθέρων ριζών στη δράση τους. Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκε μελέτη χωρικού εντοπισμού στο εσωτερικό των κυττάρων, σύμφωνα με την οποία, οι κουμαρίνες εισχωρούν στα μιτοχόνδρια των κυττάρων.



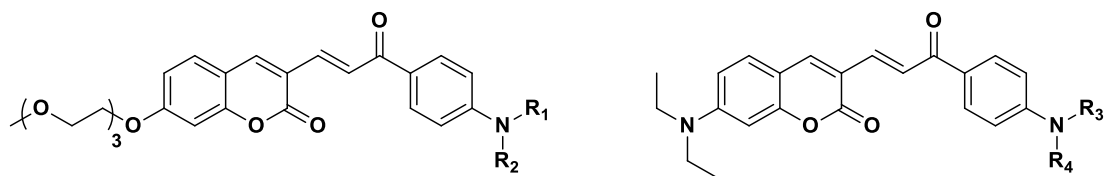
Σχήμα 4.5 Χημική δομή κουμαρινών με φωτοευαισθητοποιητική δράση.

Όσον αφορά τις χαλκόνες, υβριδικά μόρια χαλκονών-φθαλοκυανινών έχουν συντεθεί και μελετηθεί για τη φωτοτοξικότητά τους έναντι παθογόνων μικροοργανισμών και καρκινικών κυττάρων [46,47]. Ακόμη, σε ερευνητική εργασία των μελετήθηκε η φωτοευαισθητοποιητική δράση της 2-υδροξυχαλκόνης (Σχήμα 4.6), η οποία παρουσίασε ισχυρή δράση τόσο έναντι της κυτταρικής σειράς κερατινοκυττάρων HaCaT, καθώς και έναντι των δερματόφυτων *Trichophyton rubrum* και *Trichophyton mentagrophytes* [48].



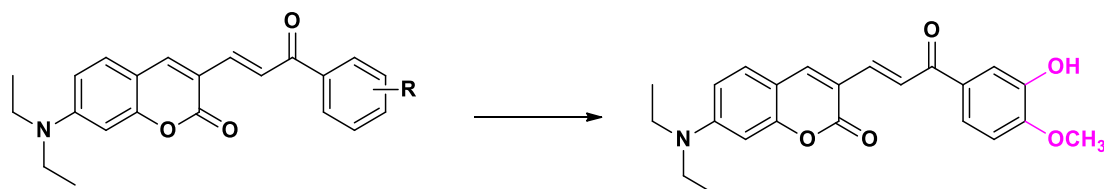
Σχήμα 4.6 Χημική δομή 2-υδροξυ-χαλκόνης.

Ωστόσο, στη βιβλιογραφία υπάρχουν ελάχιστες μελέτες αναφορικά με την εφαρμογή υβριδικών μορίων κουμαρινών-χαλκονών στη φωτοδυναμική θεραπεία. Πιο συγκεκριμένα, σε ερευνητική εργασία των Zou et al. [49], συντέθηκαν δύο νέες σειρές υβριδικών μορίων κουμαρινών-χαλκονών (Σχήμα 4.7), τα οποία παρουσίασαν ικανοποιητική ικανότητα παραγωγής ROS *in vitro*, ενώ οι μελέτες χωρικού εντοπισμού υπέδειξαν την ικανότητα των μορίων να εισχωρούν στο εσωτερικό των κυττάρων και μάλιστα στα μιτοχόνδρια. Ακόμη, είναι σημαντικό ότι τέσσερα από τα έξι εξεταζόμενα μόρια, παρουσίασαν ισχυρή φωτοτοξική δράση έναντι της ανθρώπινης ηπατικής καρκινικής σειράς HepG2, με τιμές IC₅₀ κάτω από 10 μM, ενώ απουσία φωτός παρουσίαζαν IC₅₀ μεγαλύτερο από 50 μM.



Σχήμα 4.7 Χημική δομή νέων σειρών υβριδικών μορίων κουμαρινών-χαλκονών με ισχυρή φωτοτοξική δράση.

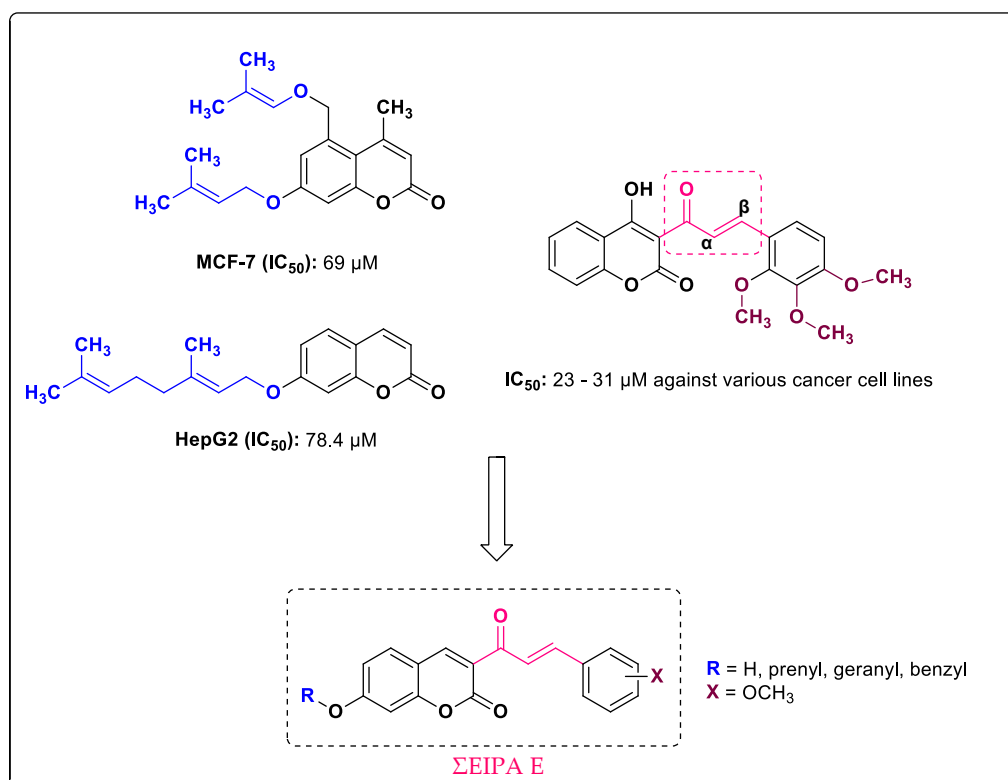
Τέλος, σε μελέτη των Wang et al. [50], συντέθηκε μία νέα σειρά υβριδικών μορίων κουμαρινών-χαλκονών (Σχήμα 4.8), τα οποία αποτελούν δομικά ανάλογα της ξανθοχουμόλης, μίας φυσικής χαλκόνης που είναι αξιόλογος αναστολέας του αντιοξειδωτικού ενζύμου αναγωγάση της θειορεδοξίνης (Thioredoxin reductase, TrxR). Είναι αξιοσημείωτο ότι το παράγωγο που παρουσίασε την καλύτερη ανασταλτική δράση έναντι του ενζύμου με τιμή IC₅₀ 3.6 μM, παρουσίασε σημαντική ικανότητα παραγωγής ελευθέρων ριζών στο εσωτερικό καρκινικών κυττάρων του παχέος εντέρου (HCT116). Τέλος, η ικανότητα φθορισμού του, το καθιστά κατάλληλο και για τον τομέα της διάγνωσης.



Σχήμα 4.8 Γενική δομή υβριδικών μορίων κουμαρινών-χαλκονών (δεξιά) και αναλόγου που παρουσίασε την ισχυρότερη φωτοευαισθητοποιητική δράση (δεξιά).

4.2 ΣΚΟΠΟΣ

Ο σχεδιασμός και η σύνθεση των νέων υβριδικών μορίων κουμαρινών-χαλκονών της Σειράς Ε στηρίχτηκε τόσο στην τρέχουσα βιβλιογραφία όσο και σε μόρια οδηγούς του εργαστηρίου Οργανική Χημείας ΕΜΠ (ΕΟΧ ΕΜΠ). Αρχικά, σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, είναι γνωστό ότι ο υβριδισμός δύο ή περισσότερων φαρμακοφόρων δομών μπορεί να οδηγήσει σε νέα μόρια με συνδυασμένη ή και αυξημένη βιοδραστικότητα [51]. Πιο συγκεκριμένα, υβριδικά μόρια κουμαρινών-χαλκονών έχουν μελετηθεί και διακριθεί για πληθώρα βιολογικών δράσεων, μεταξύ των οποίων η αντιοξειδωτική, αντιμικροβιακή και αντικαρκινική δράση [50,52]. Οι δομές αυτές, σε συνδυασμό με την παρατήρηση από προηγούμενες ερευνητικές εργασίες του ΕΟΧ ΕΜΠ ότι η εισαγωγή μιας ισοπρενοειδούς πλευρικής αλυσίδας στον κουμαρινικό σκελετό συχνά συνεισφέρει στην αντικαρκινική δράση του μορίου [53,54] οδήγησαν στο σχεδιασμό των μορίων της Σειράς Ε (Σχήμα 4.9).

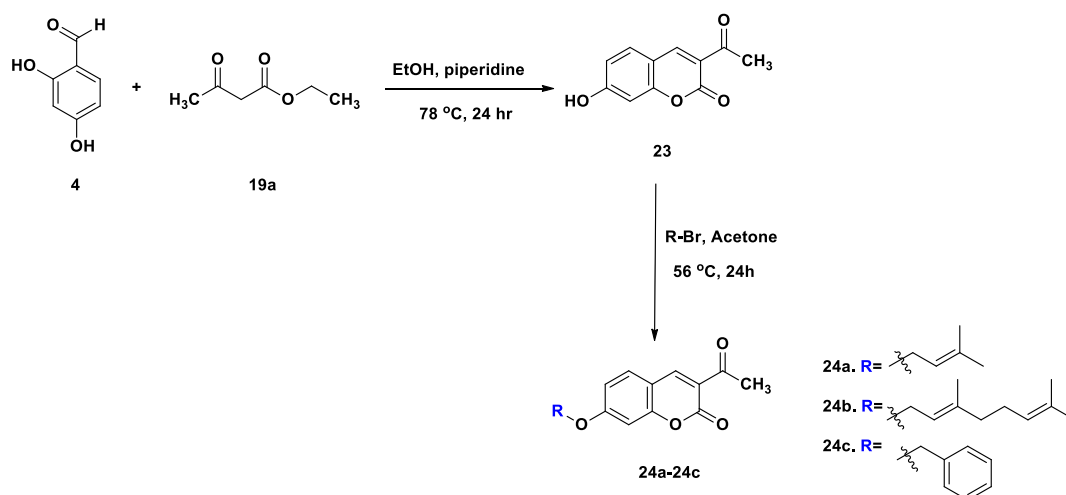


Σχήμα 4.9 Σχεδιασμός υβριδικών μορίων κουμαρινών-χαλκονών Σειράς Ε [53–55].

Τα νέα υβριδικά μόρια κουμαρινών-χαλκονών, στα οποία ο δακτύλιος Α της χαλκόνης, έχει αντικατασταθεί από τον κουμαρινικό σκελετό, σχεδιάστηκαν κατάλληλα με σκοπό να παρουσιάζουν συνδυασμένη ικανότητα αναστολής της λιπιδικής υπεροξειδωσης και της δράσης της λιποξυγονάσης από σόγια, καθώς και κυτταροτοξική και φωτοευαίσθητοποιητική δράση.

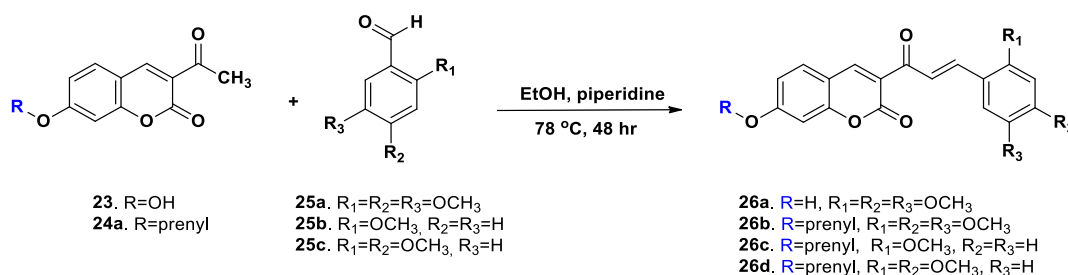
4.3 ΣΧΕΔΙΑΣΜΟΣ ΚΑΙ ΣΥΝΘΕΣΗ ΤΩΝ ΝΕΩΝ ΚΟΥΜΑΡΙΝΙΚΩΝ ΑΝΑΛΟΓΩΝ

Για τη σύνθεση των υβριδικών μορίων κουμαρινών-χαλκονών, αρχικά, πραγματοποιήθηκε η σύνθεση της 3-ακετυλο-7-υδροξυ-κουμαρίνης (**23**) μέσω αντίδρασης Knoevenagel μεταξύ της 2,4-διυδροξυ-βενζαλδεΐδης και ακετοξικού αιθυλεστέρα σε αιθανόλη παρουσία πιπεριδίνης. Στη συνέχεια, η 3-ακετυλο-7-υδροξυ-κουμαρίνη αντέδρασε με διαφορετικά υποκατεστημένα βρωμίδια μέσω αντίδρασης σύνθεσης αιθέρων κατά Williamson για τη σύνθεση των ενώσεων **24a-24c** (Σχήμα 4.10).



Σχήμα 4.10 Συνθετική πορεία της 3-ακετυλο-7-υδροξυ-κουμαρίνης (**23**) και των 7-αλκοξυ (**24a** & **24b**) και βενζυλοξυ (**24c**) παραγώγων της.

Τέλος, τα 3-ακετυλο-7-υποκατεστημένα-κουμαρινικά παράγωγα **23** και **24a** αντέδρασαν με κατάλληλα υποκατεστημένες βενζαλδεΐδες σε αιθανόλη παρουσία πιπεριδίνης για τη σύνθεση των νέων υβριδικών μορίων κουμαρινών-χαλκονών **26a-26d** (Σχήμα 4.11).

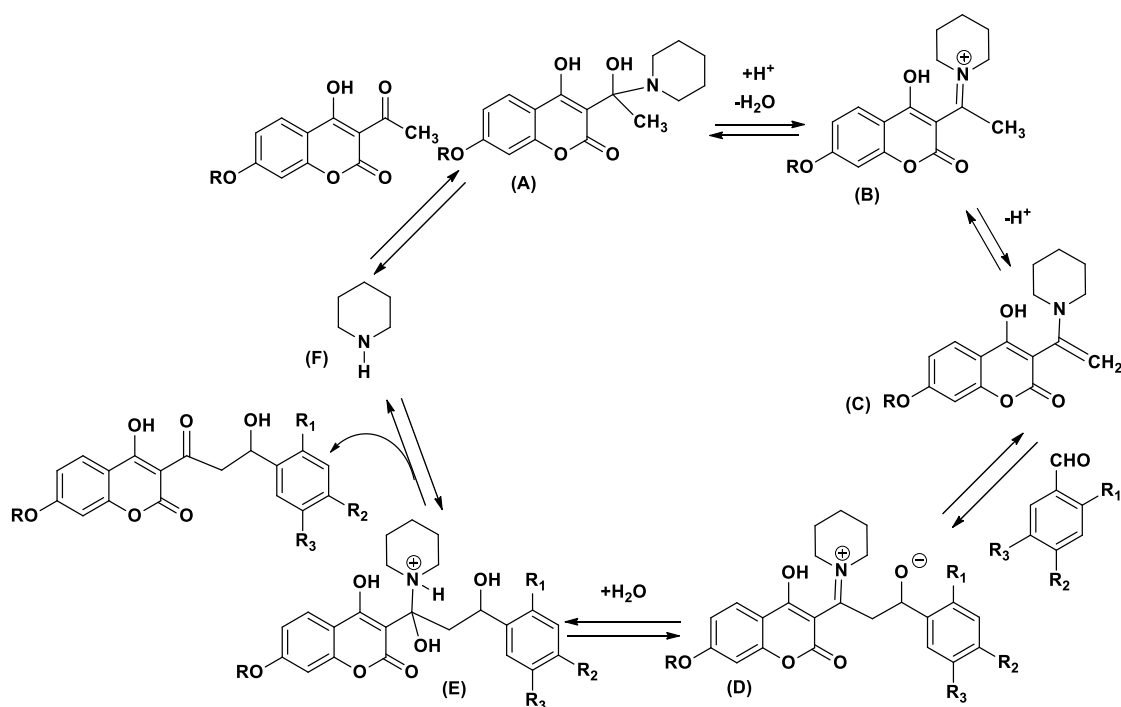


Σχήμα 4.11 Συνθετική πορεία νέων υβριδικών μορίων κουμαρινών-χαλκονών (**26a-26d**).

Μηχανισμός σύνθεσης υβριδικών μορίων κουμαρινών-χαλκονών

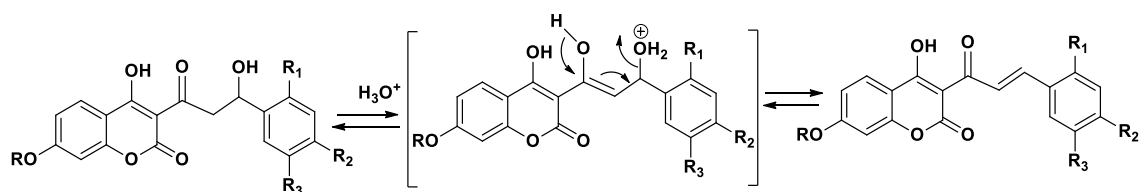
Η σύνθεση των υβριδικών μορίων κουμαρινών-χαλκονών πραγματοποιείται μέσω αλδολικής συμπύκνωσης και καταλύεται από την πιπεριδίνη. Ο καταλυτικός κύκλος περιλαμβάνει τον ενδιάμεσο σχηματισμό καρβινολαμίνης (A), ιόντος ιμινίου (B) και εναμίνης (C). Στη συνέχεια, πραγματοποιείται

πυρηνόφιλη προσθήκη στην αλδεΐδη οπότε σχηματίζεται ο νέος δεσμός C – C (D). Ο κύκλος ολοκληρώνεται με την προσθήκη H₂O προς το σχηματισμό μιας νέας καρβινολαμίνης (E) και διάσπασή της προς το προϊόν αλδολικής συμπύκνωσης και απελευθέρωση της αμίνης (F) (Σχήμα 4.12).



Σχήμα 4.12 Μηχανισμός καταλυόμενης από πιπεριδίνη αλδολικής συμπύκνωσης.

Η όξινη κατεργασία του μίγματος μετά το πέρας της αντίδρασης οδηγεί στην αφυδάτωση του προϊόντος και στο σχηματισμό της επιθυμητής χαλκόνης (Σχήμα 4.13).



Σχήμα 4.13 Μηχανισμός αφυδάτωσης του προϊόντος αλδολικής συμπύκνωσης.

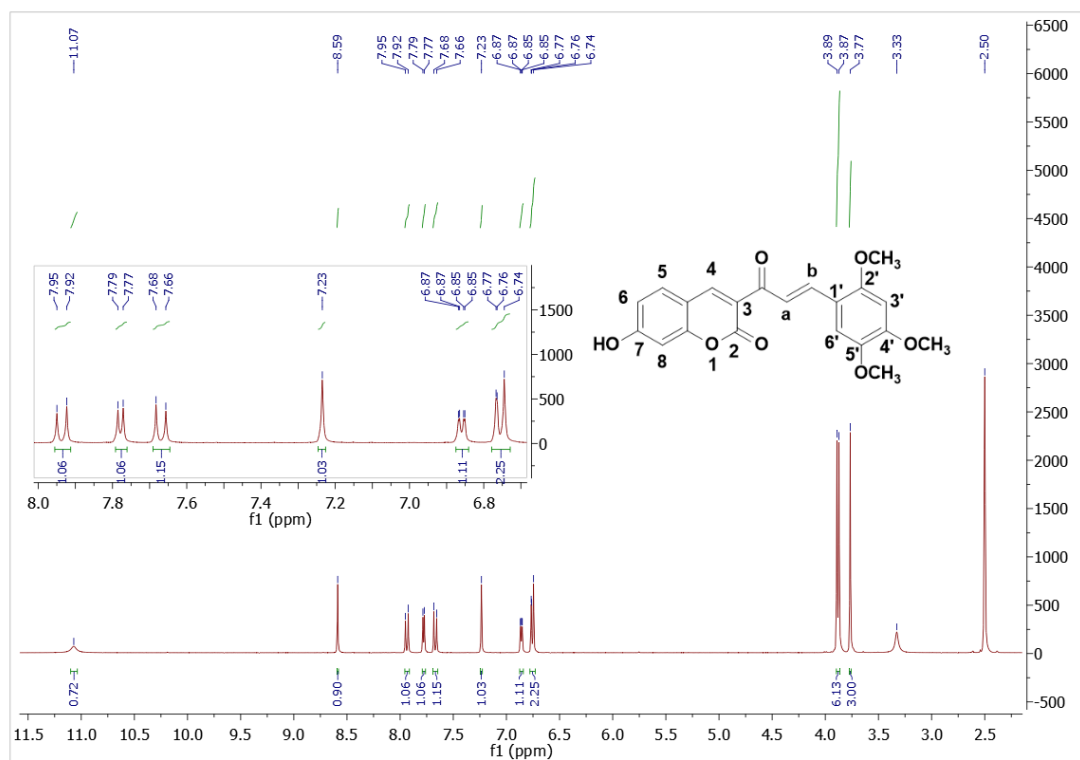
4.4 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ

4.4.1 Σύνθεση των νέων κουμαρινικών και υβριδικών αναλόγων της Σειράς E

Σύμφωνα με τις μεθόδους που προαναφέρθηκαν συντέθηκαν τέσσερα 3-ακετυλο-7-υποκατεστημένα-κουμαρινικά παράγωγα σε υψηλές αποδόσεις μεταξύ 60% και 97%, εκ των οποίων η 3-ακετυλο-7-βενζυλοξυ-κουμαρίνη (**24c**) παρουσιάζεται για πρώτη φορά στη βιβλιογραφία καθώς και τέσσερα νέα υβριδικά μόρια κουμαρινών χαλκονών σε αποδόσεις της τάξης του 30%. Τέλος, ταυτοποιήθηκαν και χαρακτηρίστηκαν δομικά μέσω φασματοσκοπίας πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού πρωτονίου και άνθρακα (^1H NMR και ^{13}C NMR), καθώς και φασματομετρίας μάζας υψηλής ανάλυσης (HR-MS).

4.4.2 Φασματοσκοπική μελέτη

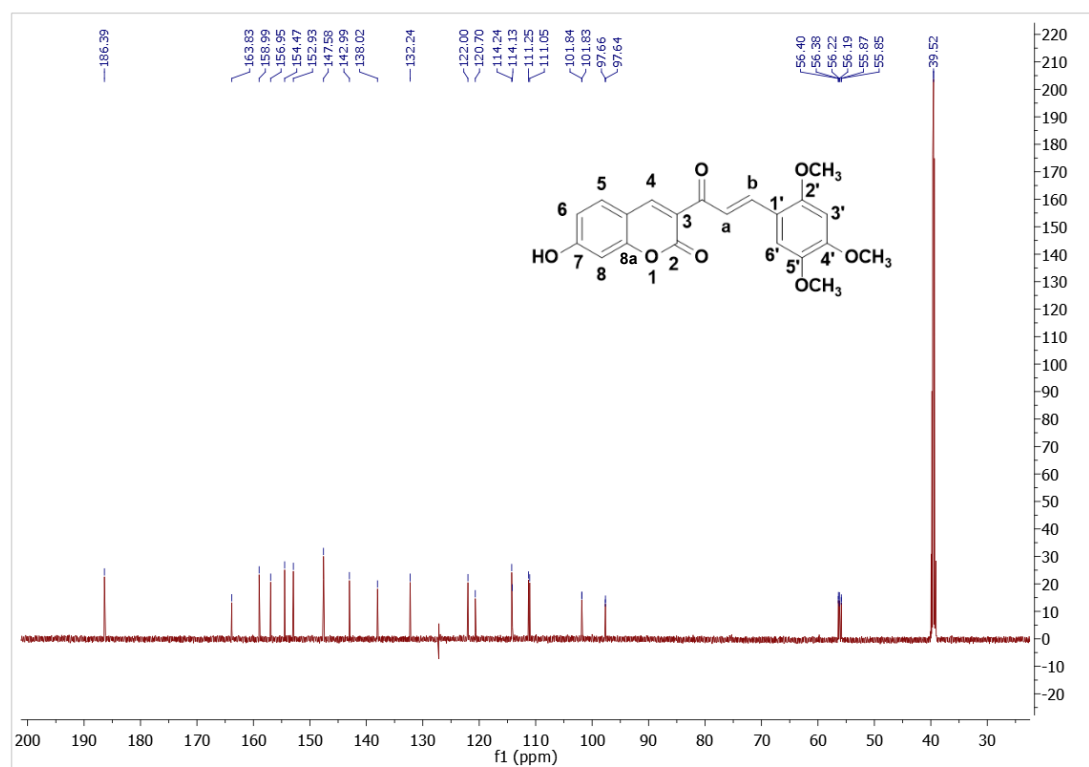
Ακολουθεί φασματοσκοπική μελέτη πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού ^1H και ^{13}C NMR των ενώσεων **26a** και **26b**. (Εικόνες 4.3-4.6).



Εικόνα 4.3 Φάσμα ^1H NMR της 7-υδροξυ-3-(3-(2,4,5,-τριμεθοξυφαινυλ)ακρυλοΐλ)-2H-χρωμεν-2-όνης (**26a**).

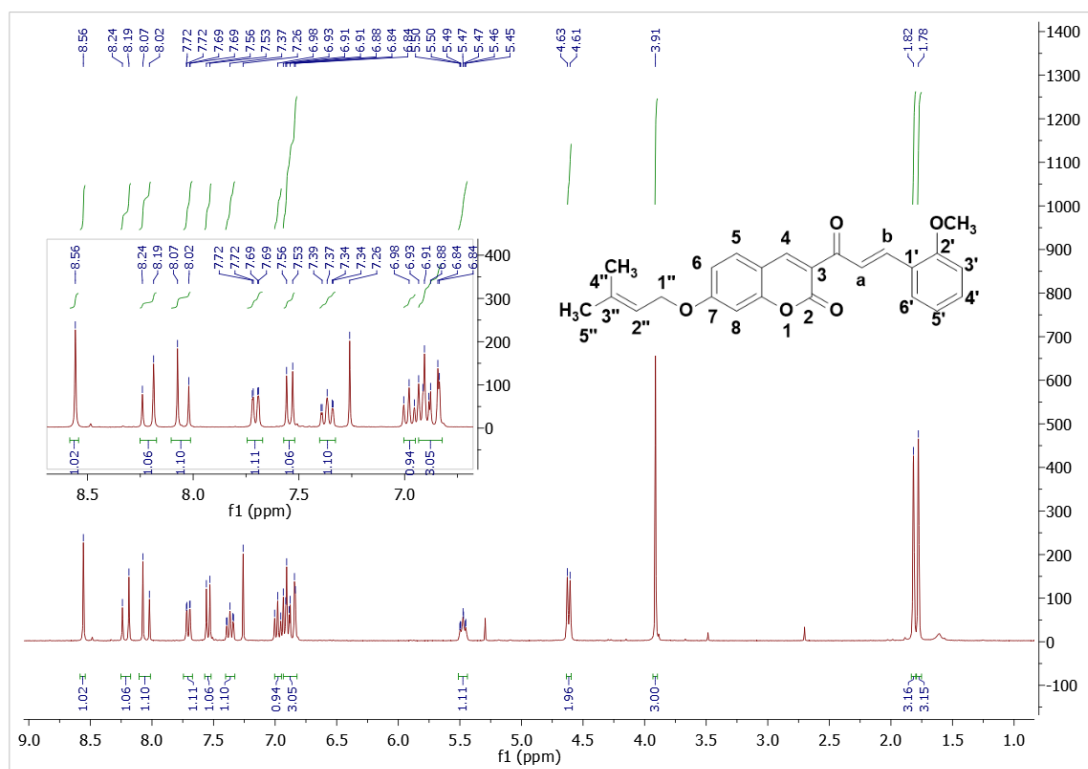
Το φάσμα ^1H NMR της **26a** (Εικόνα 4.3) χαρακτηρίζεται από τρεις απλές κορυφές σε δH 2 3.77, 3.87 και 3.89 ppm που αποδίδονται στα πρωτόνια των μεθοξυ-ομάδων. δH 6.74 ppm εμφανίζεται μία απλή κορυφή που αποδίδεται στο πρωτόνιο H-3'. Σε δH 6.77 ppm εμφανίζεται μία διπλή κορυφή, η οποία αποδίδεται στο H-8, λόγω της σύζευξης του με το H-6. Στη συνέχεια, σε δH 6.86 ppm εμφανίζεται μία διπλή διπλών κορυφή, που αποδίδεται στο H-6. Σε δH 7.24 ppm εμφανίζεται μία απλή

κορυφή που οφείλεται στο H-6'. Σε δ_H 7.67 ppm εμφανίζεται μια διπλή κορυφή με $J = 15.6$ Hz που οφείλεται στο H-a. Έπειτα, σε δ_H 7.78 ppm εμφανίζεται μία διπλή κορυφή που οφείλεται στο H-5. Σε δ_H 7.94 ppm εμφανίζεται άλλη μία διπλή κορυφή με $J = 15.6$ Hz η οποία αποδίδεται στο H-b. Η τιμή των σταθερών σύζευξης των βινυλικών πρωτονίων, αποδεικνύει την *trans* διευθέτησή τους κι άρα και τη στερεοεκλεκτικότητα της αντίδρασης. Τέλος, σε δ_H 8.59 ppm εμφανίζεται μία απλή κορυφή που αποδίδεται στο H-4 και σε δ_H 11.07 ppm εμφανίζεται μία ευρεία κορυφή που αντιστοιχεί στην ομάδα OH.



Εικόνα 4.4 Φάσμα ^{13}C NMR της 7-υδροξυ-3-(3-(2,4,5,-τριμεθοξυφαινυλ)ακρυλοΐλ)-2H-χρωμεν-2-όνης (**26a**).

Στο φάσμα ^{13}C NMR της ένωσης **26a** (Εικόνα 4.4) παρατηρούμε αρχικά μία κορυφή σε χαμηλό μαγνητικό πεδίο, σε δ_c 186.39 ppm, η οποία αποδίδεται στον καρβονυλικό άνθρακα του α, β ακόρεστου συστήματος. Στη συνέχεια, μεταξύ 163.83 και 147.58 ppm εμφανίζονται οι άνθρακες των θέσεων 2, 7, 8a, 2', 4' και 5'. Οι άνθρακες των μεθοξυ-ομάδων συντονίζονται σε δ_c 56.39, 56.21 και 55.86 ppm αντίστοιχα.

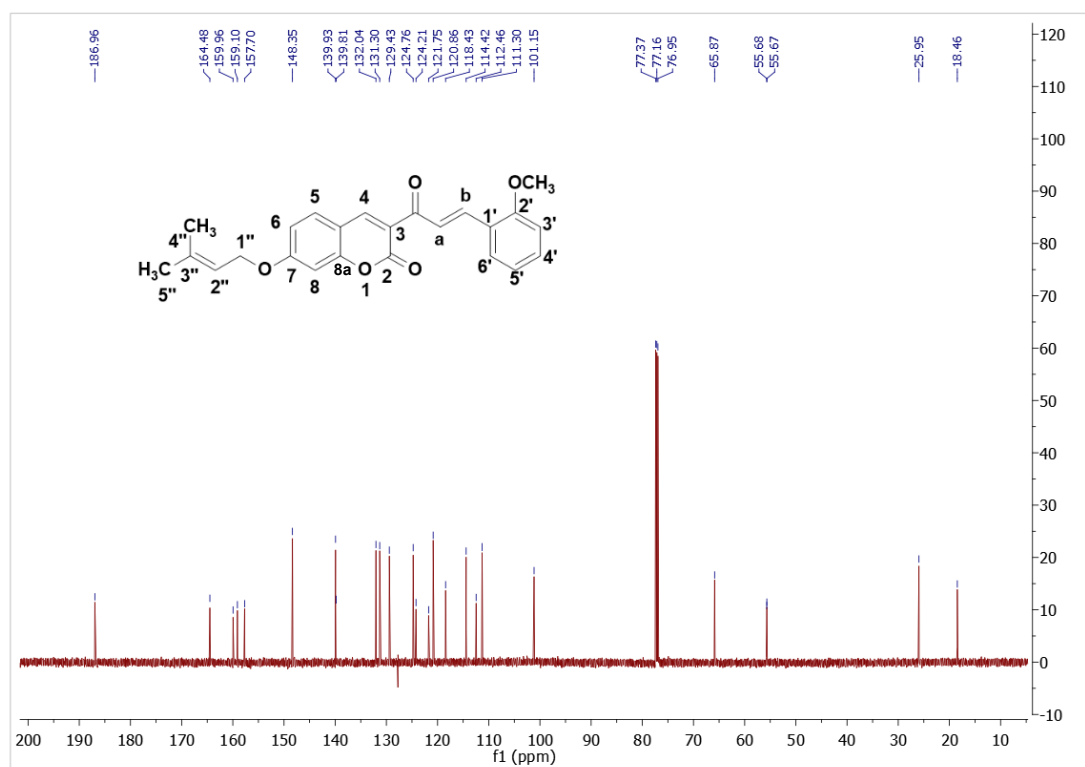


Εικόνα 4.5 Φάσμα ¹H NMR της 3-(3-(2-μεθοξυφαινυλ)ακρυλοϋλ)-7-πρενυλοξυ-2H-χρωμεν-2-όνης (**26d**).

Το φάσμα ¹H NMR της **26d** (Εικόνα 4.5) χαρακτηρίζεται από την παρουσία δύο απλών κορυφών σε δ_H 1.78 και 1.80 ppm που αποδίδονται στα πρωτόνια των μεθυλο-ομάδων της πρενυλοξυ-αλυσίδας και μίας απλής κορυφής σε δ_H 3.91 ppm που οφείλεται στα τρία ισοδύναμα πρωτόνια της μεθοξυ-ομάδας. Στη συνέχεια, σε δ_H 4.61 ppm εμφανίζεται μία διπλή κορυφή, η οποία αποδίδεται στα δύο πρωτόνια της θέσης 1'' και σε δ_H 5.48 ppm εμφανίζεται μια τριπλή τριπλών κορυφή που οφείλεται στο H-2'', κορυφές που ανήκουν στα πρωτόνια της πρενυλοξυ-αλυσίδας.

Σε δ_H 6.91 ppm εμφανίζεται μία τριπλή κορυφή που αποδίδεται στο πρωτόνιο της θέσης 3', ενώ μεταξύ 6.84 και 6.93 ppm ακολουθεί μία πολλαπλή κορυφή που ολοκληρώνεται για τρία πρωτόνια, τα H-6, H-8 και H-5'. Σε δ_H 7.37 ppm εμφανίζεται μία τριπλή κορυφή η οποία αποδίδεται στο H-4'. Έπειτα, σε δ_H 7.54 ppm εμφανίζεται μία διπλή κορυφή που οφείλεται στο H-5 και σε δ_H 7.71 εμφανίζεται μία διπλή διπλών κορυφή η οποία οφείλεται στο H-6'.

Ακόμη, σε δ_H 8.05 ppm εμφανίζεται μία διπλή κορυφή με $J = 15.9$ Hz, η οποία αποδίδεται στο H-a, ενώ σε δ_H 8.21 ppm, εμφανίζεται άλλη μία διπλή κορυφή με $J = 15.9$ Hz και η οποία αποδίδεται στο H-b,. Τέλος, σε δ_H 8.56 ppm εμφανίζεται μία απλή κορυφή που οφείλεται στο H-4.



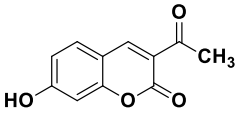
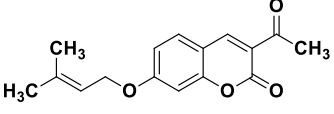
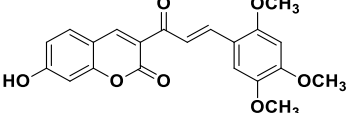
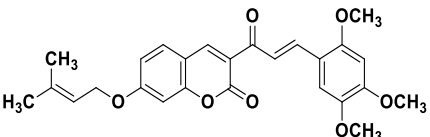
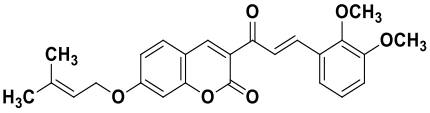
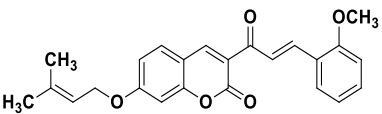
Εικόνα 4.6 Φάσμα ^{13}C NMR της 3-(3-(2-μεθοξυφαινυλ)ακρυλοϋλ)-7-πρενυλοξυ-2H-χρωμεν-2-όνης (**26d**).

Στο φάσμα ^{13}C NMR της ένωσης **26d** (Εικόνα 4.6) παρατηρούμε αρχικά μία κορυφή σε χαμηλό μαγνητικό πεδίο, σε δ_c 186.96 ppm, η οποία αποδίδεται στον καρβονυλικό άνθρακα του α , β ακόρεστου συστήματος. Στη συνέχεια, μεταξύ 164.48 και 157.70 ppm εμφανίζονται οι άνθρακες των θέσεων 2, 7, 8a και 2' του μορίου. Η κορυφή που εμφανίζεται σε δ_c 55.68 ppm, αποδίδεται στον άνθρακα της μεθοξυ-ομάδας. Οι άνθρακες των μεθυλο-ομάδων της πρενυλοξυ-αλυσίδας συντονίζονται σε δ_c 25.95 και 18.46 ppm.

4.4.3 Αξιολόγηση της βιολογικής δράσης των νέων αναλόγων της Σειράς E

Τα νέα κουμαρινικά ανάλογα της Σειράς E εξετάστηκαν ως προς: (i) την ικανότητά τους να αναστέλλουν τη λιπιδική υπεροξειδωση (LP) του λινολεϊκού οξέος όπως επάγεται από τον εκκινητή ελευθέρων ριζών AAPH, (ii) την ικανότητά τους να αναστέλλουν τη δράση του ενζύμου της λιποξυγονάσης από σόγια (LOX) ως ένδειξη αντιφλεγμονώδους δράσης και (iii) την κυτταροτοξικότητά τους έναντι της καρκινικής σειράς ανθρώπινου προστάτη LNCaP *in vitro*. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στον Πίνακα 4.1.

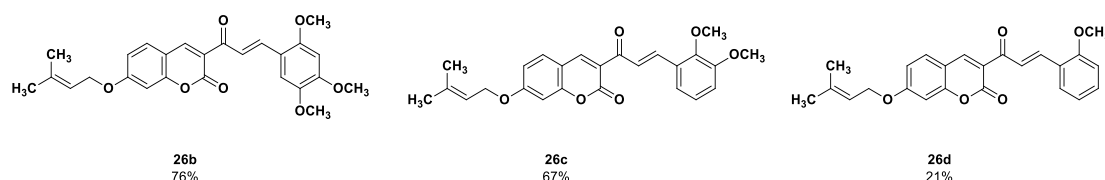
Πίνακας 4.1 (%) Ικανότητα αναστολής της λιπιδικής υπεροξειδωσης (100 μM), ικανότητα αναστολής της δράσης της λιποξυγονάσης από σόγια (IC_{50} (μM)) και κυτταροτοξικότητα έναντι της καρκινικής σειράς LNCaP (IC_{50} (μM)).

Ένωση	Δομή	(%) Αναστολή της λιπιδικής υπεροξειδωσης (LP) 100 μM	Αναστολή της δράσης της λιποξυγονάσης IC_{50} (μM)	Κυτταροτοξική δράση έναντι LNCaP IC_{50} (μM)
23		94	56	>200
24a		No	39	>200
26a		16	No	59
26b		76	No	>200
26c		67	32.5	130
26d		21	100	105
-	Trolox	95	-	-
-	NGDA	-	0.45	-

NGDA: Nordihydroguaiaretic acid.

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα, παρατηρείται ότι η 3-ακετυλο-7-υδροξυκουμαρίνη (**23**) αποτελεί τον πιο ισχυρό αναστολέα της λιπιδικής υπεροξειδωσης (94%), παρουσιάζοντας παρόμοια αναστολή με το πρότυπο Trolox (95%), ενώ το πρενυλοξυ-ανάλογό της (**24a**) είναι ανενεργό. Ωστόσο, η υποκατάσταση με πρενυλοξυ-ομάδα στα υβριδικά μόρια κουμαρινών-χαλκονών φαίνεται να

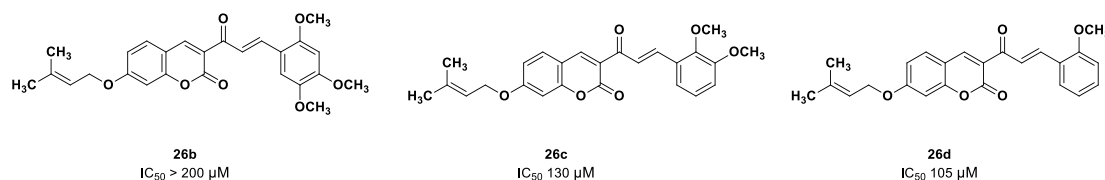
ενισχύει την αντιοξειδωτική δράση. Ειδικότερα, η ένωση **26b** παρουσίασε την ισχυρότερη αντιοξειδωτική δράση (76%), ενώ το υδροξυ-ανάλογό της, **26a**, βρέθηκε ανενεργό (16%). Ακόμη, το πρενυλοξυ-παράγωγο **26c** παρουσίασε επίσης σημαντική αντιοξειδωτική δράση (67%), ενώ το ανάλογο **26d** που φέρει μόνο μια μεθοξυ-ομάδα στο δακτύλιο Β αποτελεί ασθενή αναστολέα (21%). Συμπεραίνεται επομένως ότι η αύξηση του αριθμού των μεθοξυ-ομάδων στο δακτύλιο Β, οδηγεί σε αύξηση της αντιοξειδωτικής δράσης των πρενυλοξυ-υβριδικών μορίων κουμαρινών-χαλκονών (Σχήμα 4.14).



Σχήμα 4.14 Επίδραση του αριθμού μεθοξυ-υποκαταστατών στην ικανότητα αναστολής της λιπιδικής υπεροξειδωσίας των πρενυλοξυ-υβριδικών μορίων κουμαρινών-χαλκονών.

Επιπλέον, όσον αφορά την ικανότητα των νέων κουμαρινικών αναλόγων της Σειράς Ε να αναστέλλουν τη δράση της λιποξυγονάσης από σόγια, τα κουμαρινικά ανάλογα **24a** και **26c** αποτελούν τους ισχυρότερους αναστολείς με τιμές IC_{50} 39 μ M και 32.5 μ M, αντίστοιχα. Είναι αξιοσημείωτο ότι παρόλο που η ένωση **26d**, η οποία διαθέτει μια μεθοξυ-ομάδα στο δακτύλιο Β αποτελεί έναν ικανοποιητικό αναστολέα της λιποξυγονάσης (IC_{50} 100 μ M), η υποκατάσταση με τρεις μεθοξυ-ομάδες είτε για το πρενυλοξυ ανάλογό της, **26b**, είτε για το υδροξυ-ανάλογο, **26a**, οδήγησε σε ανενεργά μόρια. Ακόμη, η 3-ακετυλο-7-υδροξυ-κουμαρίνη επέδειξε σημαντική ικανότητα αναστολής της LOX (IC_{50} 56 μ M).

Τέλος, τα κουμαρινικά παράγωγα της Σειράς Ε εξετάστηκαν ως προς την κυτταροτοξική τους δράση έναντι της καρκινικής σειράς ανθρώπινου προστάτη LNCaP. Παρατηρείται ότι τόσο η 3-ακετυλο-7-υδροξυ-κουμαρίνη (**23**) όσο και το πρενυλοξυ-ανάλογό της, **24a**, δεν εμφανίζουν κυτταροτοξική δράση έναντι της καρκινικής σειράς LNCaP. Ανάμεσα στα νέα υβριδικά μόρια κουμαρινών χαλκονών, το υδροξυ-παράγωγο **26a** παρουσίασε την ισχυρότερη κυτταροτοξική δράση με τιμή IC_{50} 59 μ M, ενώ ακολουθεί το πρενυλοξυ-ανάλογο **26d** με τιμή IC_{50} 105 μ M. Στην περίπτωση αυτή, η μείωση του αριθμού των μεθοξυ-ομάδων στο δακτύλιο Β φαίνεται να αυξάνει την κυτταροτοξική δράση (Σχήμα 4.15).

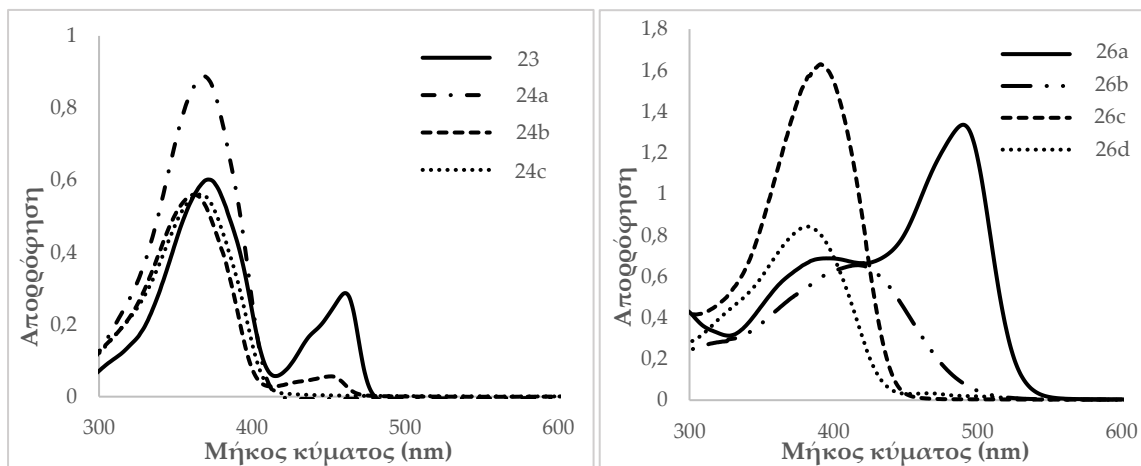


Σχήμα 4.15 Επίδραση του αριθμού μεθοξυ-υποκαταστατών στην κυτταροτοξική δράση των πρενυλοξυ-υβριδικών μορίων κουμαρινών-χαλκονών.

4.4.4 Μελέτη φωτοφυσικών ιδιοτήτων

4.4.4.1 Φάσματα απορρόφησης

Στην Εικόνα 4.7 παρουσιάζονται τα φάσματα απορρόφησης των εξεταζόμενων ενώσεων σε διμεθυλοσουλφοξείδιο (DMSO).

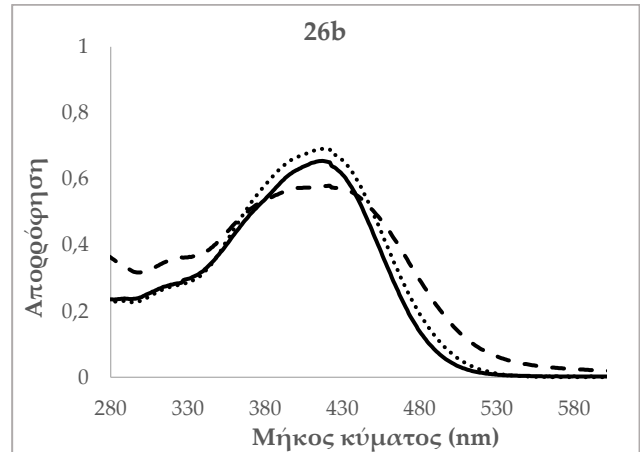
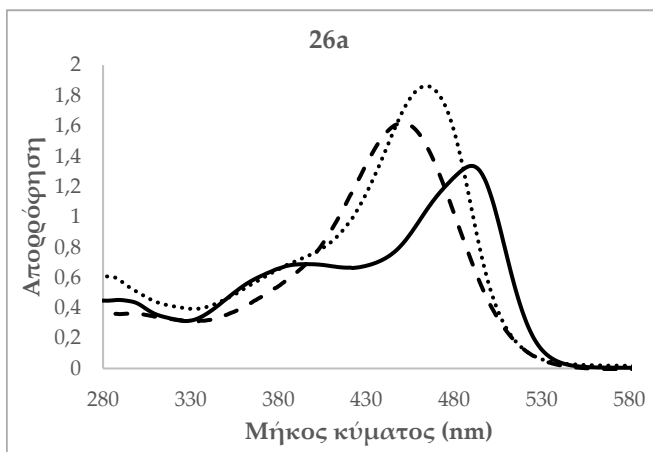
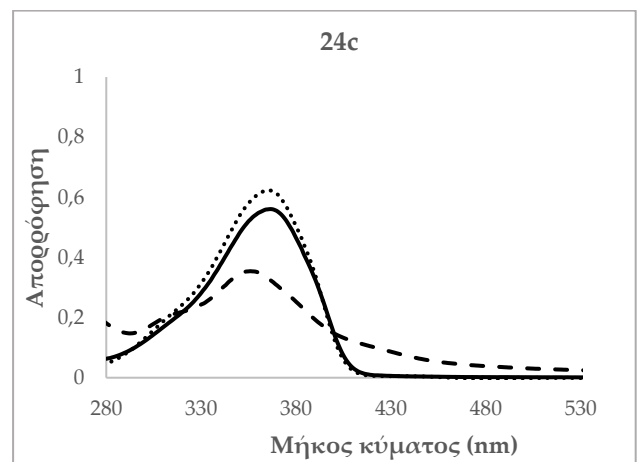
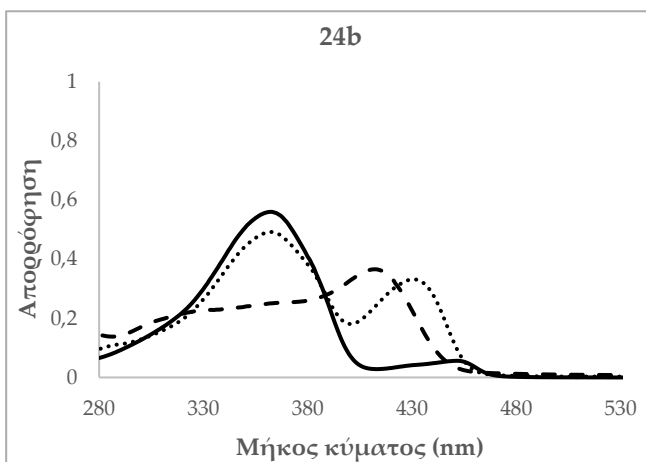
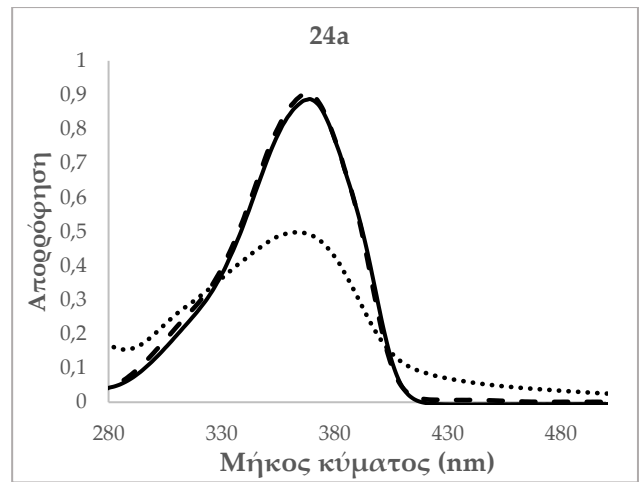
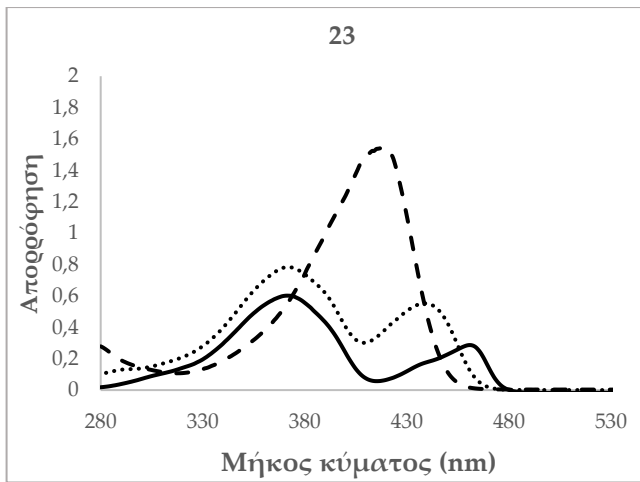


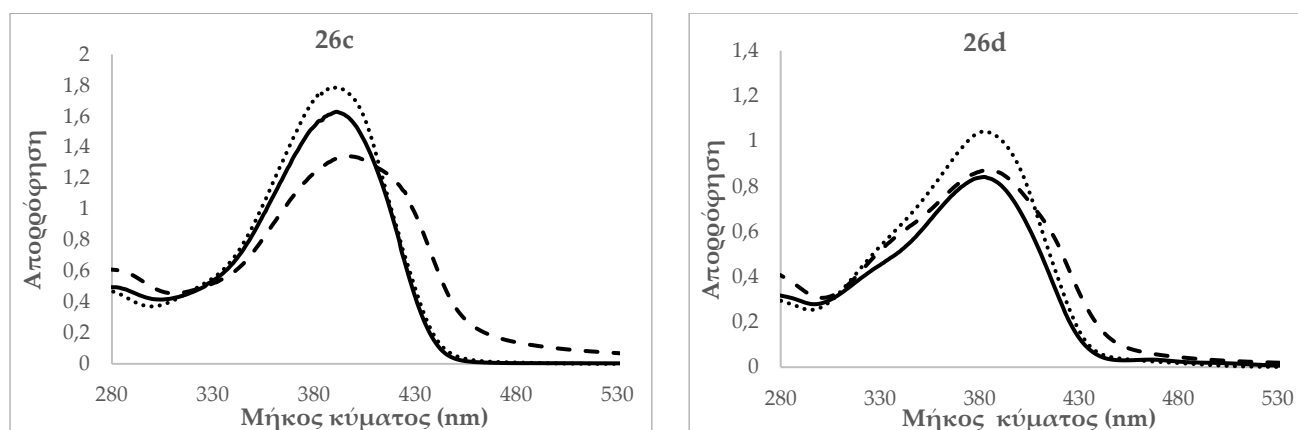
Εικόνα 4.7 Φάσματα απορρόφησης των ενώσεων: **23** (50 μ M), **24a** (50 μ M), **24b** (30 μ M), **24c** (30 μ M), **26a** (50 μ M), **26b** (50 μ M), **26c** (30 μ M) και **26d** (50 μ M) σε DMSO.

Αρχικά, παρατηρείται ότι οι εξεταζόμενες ενώσεις απορροφούν μεταξύ 300 και 550 nm. Τα κουμαρινικά ανάλογα **23** και **24a-24c** εμφανίζουν μέγιστη απορρόφηση στα 370 nm περίπου, ενώ τα υβριδικά μόρια κουμαρινών-χαλκονών, **26a-26d**, απορροφούν σε μεγαλύτερα μήκη κύματος (ερυθρή μετατόπιση – red shift). Ειδικότερα, η ένωση **26a** παρουσιάζει δύο κορυφές, στα 400 και 490 nm, μετατοπισμένες κατά 30 nm σε σχέση με το κουμαρινικό ανάλογό της, **23**. Η ένωση **26b** απορροφά στα 417 nm μετατοπισμένη κατά 50 nm σε σύγκριση με την **24a**, ενώ οι ενώσεις **26c** και **26d** έχουν παρόμοια φάσματα με μέγιστο απορρόφησης περίπου στα 390 nm μετατοπισμένο κατά 20 nm σε σχέση με την **24a**.

Η φωτοδυναμική θεραπεία με χρήση κουμαρινικών παραγώγων και φωτός UVA, λόγω της απορρόφησης τους στην περιοχή αυτή, έχει μελετηθεί εδώ και αρκετά χρόνια για τη θεραπεία διαφόρων δερματικών παθήσεων, όπως η λεύκη, η ψωρίαση κ.α. [56]. Ωστόσο, ακόμη κι εάν η συγκεκριμένη θεραπευτική επιλογή εφαρμόζεται επιτυχώς, έχει συσχετιστεί με αυξημένο κίνδυνο πρόκλησης μελανώματος [57]. Σε αυτό το πλαίσιο, η παρατηρούμενη κόκκινη μετατόπιση στο φάσμα απορρόφησης των υβριδικών μορίων κουμαρινών-χαλκονών σε σχέση με τα κουμαρινικά παράγωγα από τα οποία προέρχονται, είναι πολύ σημαντική καθώς μπορούν να διεγερθούν σε μεγαλύτερο μήκος κύματος από την UVA αποφεύγοντας τον κίνδυνο μελανώματος.

Τα φάσματα απορρόφησης των εξεταζόμενων ενώσεων σε διαφορετικούς διαλύτες DMSO, αιθανόλη (EtOH) και PBS παρουσιάζονται στην Εικόνα 4.8 και τα αποτελέσματα συνοψίζονται στον Πίνακα 4.2.





Εικόνα 4.8 Φάσματα απορρόφησης των εξεταζόμενων ενώσεων σε DMSO (συνεχής γραμμή), αιθανόλη (τελείες) και PBS (διακεκομμένη γραμμή).

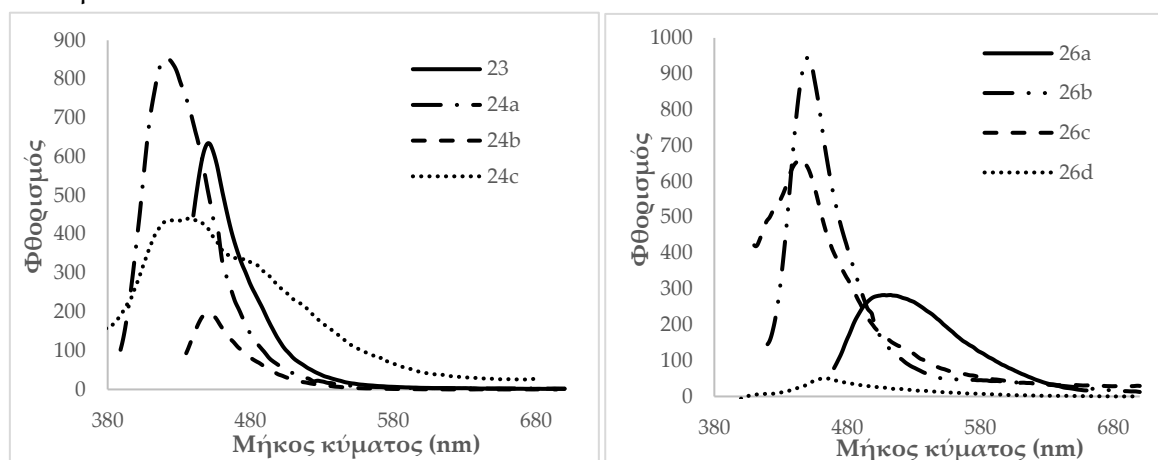
Πίνακας 4.2 Μήκος κύματος μέγιστης απορρόφησης των εξεταζόμενων ενώσεων σε διαφορετικούς διαλύτες (DMSO, EtOH and PBS).

Μήκος κύματος μέγιστης απορρόφησης (nm)			
Ένωση	DMSO	PBS	EtOH
23	374 & 461	420	371 & 439
24a	369	369	369
24b	362	413	362 & 430
24c	367	356	366
26a	400 & 490	451	464
26b	417	400	421
26c	391	390	391
26d	382	380	385

Αρχικά, όσον αφορά την ένωση **23** παρουσιάζει δύο κορυφές απορρόφησης σε DMSO και EtOH, ενώ παρουσιάζει μια κορυφή μεγαλύτερης έντασης σε PBS στα 415 nm. Τα παράγωγα **24a-24c** εμφανίζουν μέγιστη απορρόφηση μεταξύ 360-370 nm, με την ένωση **24b** να παρουσιάζει μετατοπισμένη κορυφή απορρόφησης σε PBS (413 nm). Η μείωση στην απορρόφηση που εμφανίζουν τα παράγωγα **24b** και **24c** σε PBS πιθανώς να οφείλεται στη χαμηλή υδατοδιαλυτότητά τους. Για τα υβριδικά μόρια κουμαρινών-χαλκονών, παρατηρείται ότι τα μόρια **26b-26d** εμφανίζουν παρόμοια φάσματα απορρόφησης με μία μέγιστη κορυφή απορρόφησης σε όλους τους εξεταζόμενους διαλύτες, ενώ το παράγωγο **26a**, παρουσιάζει μία κορυφή μέγιστης απορρόφησης σε αιθανόλη και PBS και δύο κορυφές σε DMSO.

4.4.4.1 Φάσματα φθορισμού

Τα φάσματα φθορισμού των κουμαρινικών αναλόγων σε PBS παρουσιάζονται στην Εικόνα 4.9.

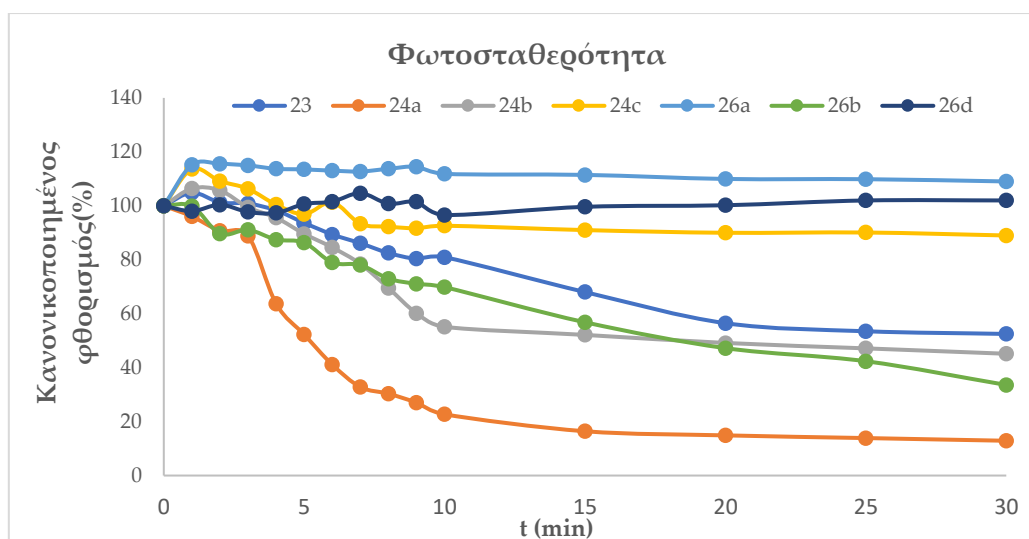


Εικόνα 4.9 Φάσματα φθορισμού των ενώσεων: **23** ($\lambda_{\text{excitation}}=420\text{nm}$, 20nM), **24a** ($\lambda_{\text{excitation}}=369\text{nm}$, 5 μM), **24b** ($\lambda_{\text{excitation}}=413\text{nm}$, 10nM), **24c** ($\lambda_{\text{excitation}}=356\text{nm}$, 5 μM), **26a** ($\lambda_{\text{excitation}}=451\text{nm}$, 5 μM), **26b** ($\lambda_{\text{excitation}}=400\text{nm}$, 5 μM), **26c** ($\lambda_{\text{excitation}}=390\text{nm}$, 5 μM) και **26d** ($\lambda_{\text{excitation}}=380\text{nm}$, 5 μM) σε PBS.

Όλα τα εξεταζόμενα μόρια παρουσιάζουν κορυφή φθορισμού μεταξύ 420-460 nm εκτός από την ένωση **26a** η οποία εμφανίζει φθορισμό στα 510 nm. Τα φάσματα φθορισμού λήφθηκαν σε συγκέντρωση 5 μM των κουμαρινικών αναλόγων εκτός από τα κουμαρινικά ανάλογα **23** και **24b** τα οποία παρουσίασαν υψηλό φθορισμό (εκτός των ορίων του ανιχνευτή) στη συγκέντρωση αυτή και γι' αυτό μελετήθηκαν σε χαμηλότερες συγκεντρώσεις των 20 nM και 10 nM, αντίστοιχα. Ανάμεσα στα υβριδικά μόρια κουμαρινών-χαλκονών, το παράγωγο **26b** παρουσίασε τον υψηλότερο φθορισμό, ενώ το **26d** το χαμηλότερο. Τέλος, είναι αξιοσημείωτο ότι λόγω της ικανότητάς τους να φθορίζουν σε πολύ χαμηλές συγκεντρώσεις, τα εξεταζόμενα κουμαρινικά παράγωγα μπορούν να χρησιμοποιηθούν και στον τομέα της διάγνωσης.

4.4.4.3 Φωτοσταθερότητα

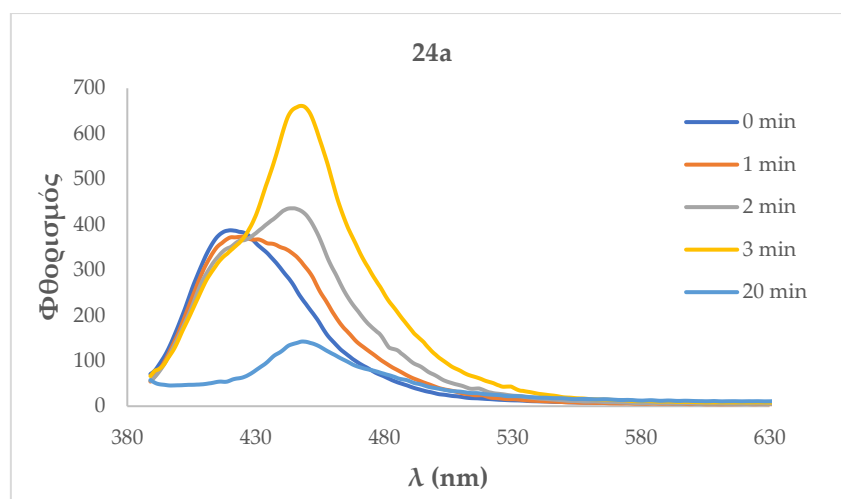
Η φωτοσταθερότητα των ενώσεων μελετάται μέσω της ακτινοβολήσής τους με 13 mW/cm^2 και της καταγραφής της έντασης φθορισμού τους. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στην Εικόνα 4.10.



Εικόνα 4.10 Κανονικοποιημένη ένταση μέγιστου φθορισμού των εξεταζόμενων ενώσεων έπειτα από ακτινοβολήση με 13 mW cm^{-2} .

Παρατηρείται ότι τα παράγωγα **24c**, **26a** και **26d** παρουσίασαν ικανοποιητική σταθερότητα, ενώ για τα παράγωγα **23**, **24b** και **26b** μετά από περίπου 3 min ακτινοβολήσης, φαίνεται να μειώνεται ο φθορισμός τους και άρα να επηρεάζεται η σταθερότητά τους. Ακόμη, η αύξηση της έντασης φθορισμού που παρατηρείται στο πρώτο λεπτό ακτινοβολήσης για τις ενώσεις **23**, **24b**, **24c**, **26a** και **26c** πιθανώς οφείλεται στη χαμηλή υδατοδιαλυτότητά τους και στην ικανότητα τους φωτός να σπάει πιθανά συσσωματώματα. Ειδικότερα, για την ένωση **26c**, η αύξηση του φθορισμού έπειτα από το δεύτερο λεπτό ήταν τόσο έντονη που προκάλεσε κορεσμό του ανιχνευτή και γι' αυτό δεν παρουσιάζονται τα αποτελέσματά της. Τέλος, είναι σημαντικό να αναφερθεί ότι παρόλο που η σταθερότητα ενός φωτοευαίσθητοποιητή είναι απαραίτητη κατά τη διάρκεια της ακτινοβολήσης, η γρήγορη φωτοδιάσπαση μίας ένωσης έπειτα από την ακτινοβολήση, μειώνει τις πιθανότητες πρόκλησης φωτοευαισθησίας [28].

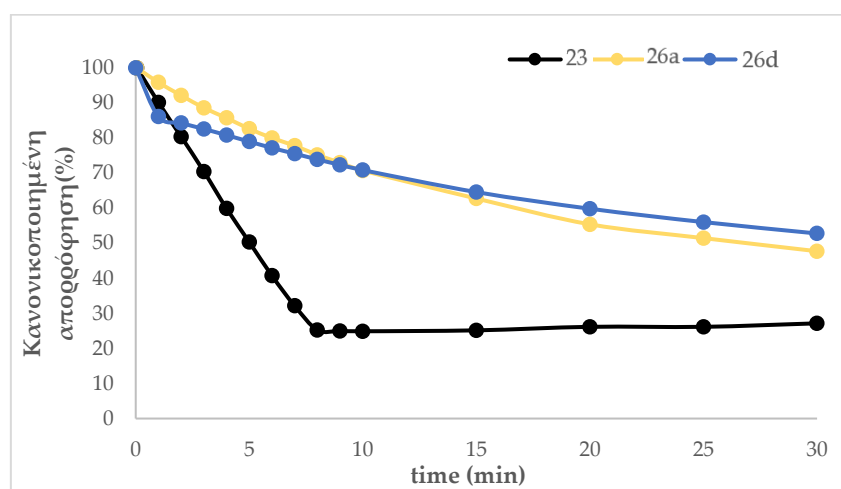
Τέλος, το παράγωγο **24a** αποτελεί εμφανώς το λιγότερο φωτοσταθερό μόριο, καθώς από το πρώτο λεπτό της ακτινοβολήσης παρουσιάζεται ερυθρή μετατόπιση της κορυφής φθορισμού κατά 30 nm. Η νέα κορυφή στα 450 nm υποδηλώνει την ύπαρξη νέας χημικής ένωσης με διαφορετικά οπτικά χαρακτηριστικά, η οποία καταστρέφεται μέχρι το τέλος της ακτινοβολήσης. Ενδεικτικά, παρουσιάζονται επιλεγμένα φάσματα φθορισμού της **24a** κατά τη διάρκεια της ακτινοβολήσης στην Εικόνα 4.11.



Εικόνα 4.11 Φάσματα φθορισμού της **24a** κατά τη διάρκεια της ακτινοβολήσης.

4.4.4.4 Παραγωγή ελευθέρων ριζών οξυγόνου (ROS)

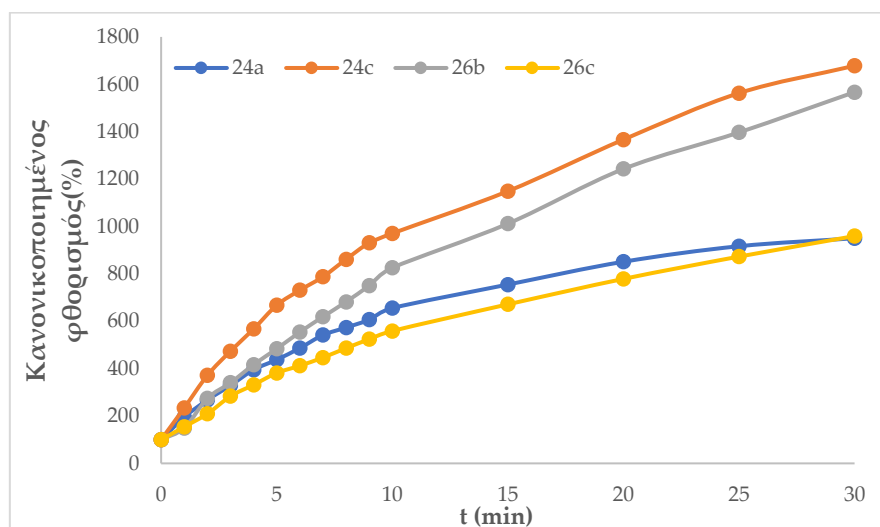
Λόγω των διαφορετικών φωτοφυσικών χαρακτηριστικών των ενώσεων, επιλέχθηκαν δύο διαφορετικές τεχνικές προκειμένου να μελετηθεί η ικανότητα των εξεταζόμενων ενώσεων να παράγουν ελεύθερες ρίζες σε PBS. Τα αποτελέσματα για τα παράγωγα **23**, **26a** και **26d** μέσω της μεθόδου παρακολούθησης της κορυφής απορρόφησης του NADH έπειτα από ακτινοβολήση παρουσιάζονται στην Εικόνα 4.12.



Εικόνα 4.12 Κανονικοποιημένη απορρόφηση του NADH στα 340 nm σε σχέση με το χρόνο ακτινοβολήσης για ισχύ 12.5 mW cm^{-2} και συγκέντρωση των ενώσεων 50 μM .

Η μείωση της απορρόφησης του NADH στα 340 nm είναι ενδεικτική της ικανότητας των κουμαρινικών παραγώγων να παράγουν ελεύθερες ρίζες. Ειδικότερα, η ένωση **23** φαίνεται να παράγει το μεγαλύτερο αριθμό ελευθέρων ριζών σε σχέση με τα παράγωγα **26a** και **26d**, με υψηλό ρυθμό παραγωγής των ROS έως και τα 8 πρώτα min, ο οποίος μετά σταθεροποιείται. Όσον αφορά τις ενώσεις **26a** και **26d**, φαίνεται να παράγουν παρόμοιο αριθμό ROS στο τέλος της ακτινοβολήσης.

Στη συνέχεια μελετήθηκε η ικανότητα των υπόλοιπων κουμαρινικών αναλόγων να παράγουν ελεύθερες ρίζες σύμφωνα με τη μέθοδο H₂DCFDA (Εικόνα 4.13).



Εικόνα 4.13 Κανονικοποιημένος φθορισμός στα 520 nm σε σχέση με το χρόνο ακτινοβολήσης για ισχύ 12.5 mW cm⁻² και συγκέντρωση των ενώσεων 10 nM.

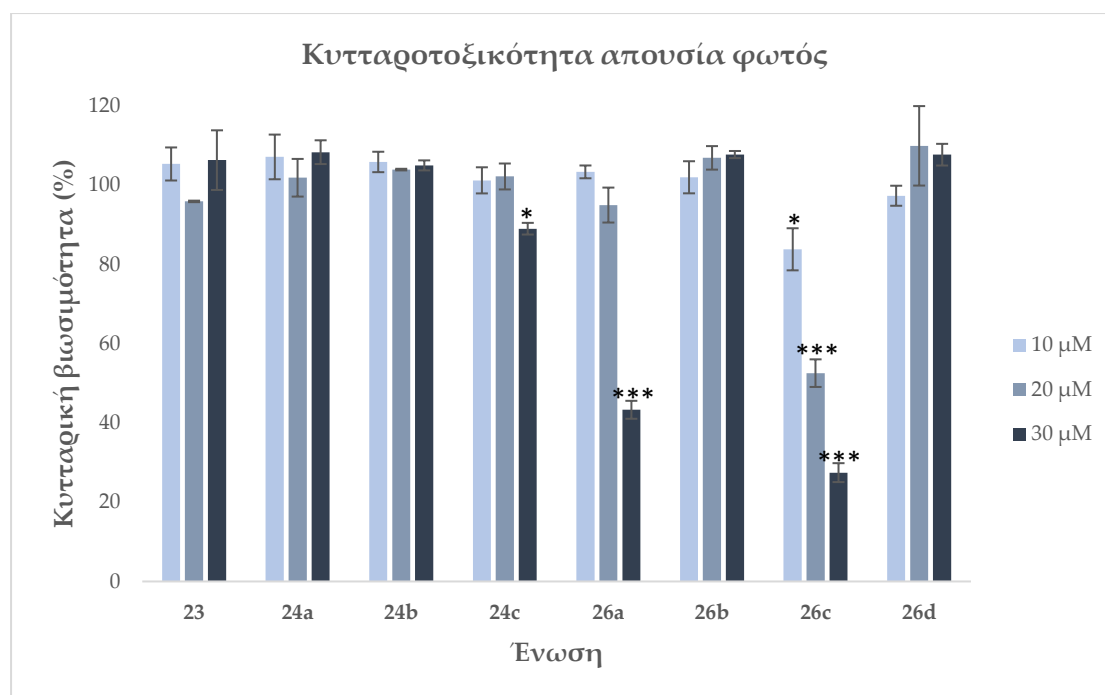
Η αύξηση του φθορισμού στα 520 nm είναι ενδεικτική της μετατροπής της H₂DCFDA σε φθορίζον προϊόν λόγω της αντίδρασής της με ελεύθερες ρίζες. Τα αποτελέσματα παραγωγής ROS για το παράγωγο **24b** δεν παρουσιάζονται στην Εικόνα 4.13 καθώς παρήγαγε πολύ μεγάλο αριθμό ελευθέρων ριζών από το πρώτο λεπτό ακτινοβολήσης, το οποίο προκάλεσε κορεσμό του ανιχνευτή. Επομένως, η ένωση **24b** παρουσίασε τη μεγαλύτερη ικανότητα παραγωγής ROS με τη συγκεκριμένη μέθοδο. Ακολουθούν οι ενώσεις **24c** και **26b** και τέλος οι **24a** και **26c** οι οποίες παράγουν ίδιο αριθμό ROS στο τέλος της ακτινοβολήσης, με την **24a** ωστόσο να φαίνεται να παράγει ταχύτερα ελεύθερες ρίζες στα πρώτα min.

4.4.5 Φωτοδυναμική Θεραπεία

Τα κουμαρινικά ανάλογα της Σειράς E εξετάστηκαν ως προς την ικανότητά τους να δρουν ως φωτοευαίσθητοποιητές έναντι της σειράς ανθρώπινου επιδερμικού καρκινώματος A431. Σε αυτό το πλαίσιο, εξετάστηκε τόσο η επίδραση διαφορετικών συγκεντρώσεων των κουμαρινικών αναλόγων στην κυτταρική βιωσιμότητα όσο και η επίδραση διαφορετικών συνθηκών ακτινοβολήσης.

4.4.5.1 Μελέτη επίδρασης των κουμαρινικών αναλόγων στη βιωσιμότητα των κυττάρων A431 απουσία φωτός

Για τη μελέτη κυτταροτοξικότητας των κουμαρινικών αναλόγων της Σειράς E έναντι της σειράς A431, εξετάστηκαν τρεις διαφορετικές συγκεντρώσεις, 30 μM, 20 μM και 10 μM και τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στην Εικόνα 4.14.



Εικόνα 4.14 Επίδραση διαφορετικών συγκεντρώσεων των νέων κουμαρινικών αναλόγων της Σειράς E στη βιωσιμότητα των κυττάρων A431 απουσία φωτός, * $p < 0.5$ ως προς control, *** $p < 0.001$ ως προς control.

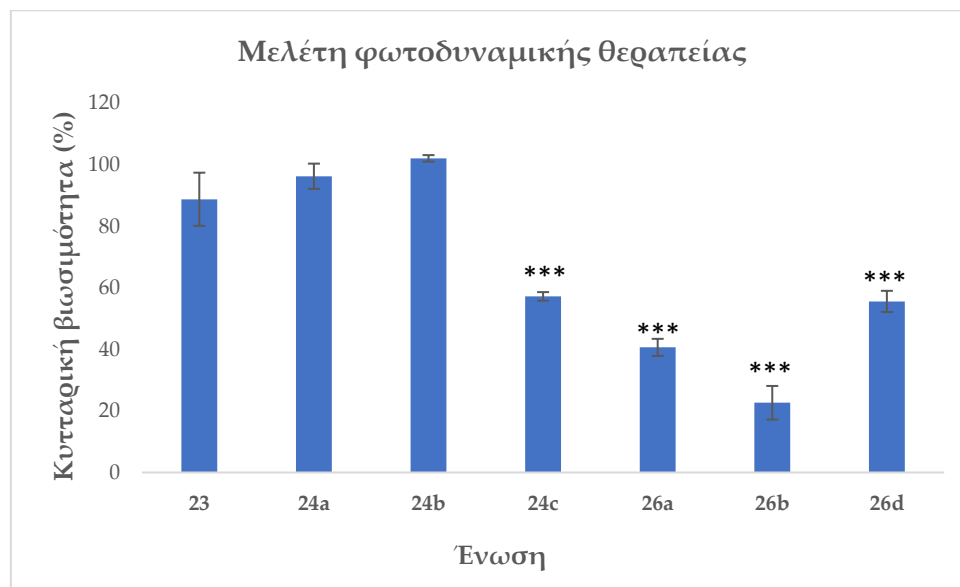
Όσον αφορά την κυτταροτοξική δράση των κουμαρινικών αναλόγων της Σειράς E, παρατηρείται ότι η ένωση **26c** μειώνει σημαντικά την κυτταρική βιωσιμότητα σε όλες τις εξεταζόμενες συγκεντρώσεις και επομένως αποκλείστηκε από περαιτέρω μελέτες. Ακόμη, στη συγκέντρωση των 30 μM, η ένωση **26a**, παρουσίασε σημαντική κυτταροτοξικότητα (57%), ενώ η ένωση **24c** επίσης παρουσίασε κυτταροτοξική δράση (11%). Επομένως, η συγκέντρωση των 20 μM επιλέχθηκε για τη μελέτη φωτοδυναμικής θεραπείας, καθώς όλα τα κουμαρινικά παράγωγα (εκτός από το **26c**) βρέθηκαν μη τοξικά. Ενδιαφέρονσα παρατήρηση αποτελεί το γεγονός ότι ενώ η ένωση **26c** παρουσίασε ισχυρή κυτταροτοξικότητα έναντι της σειράς A431 (IC_{50} 20 μM περίπου), επέδειξε χαμηλή κυτταροτοξική δράση έναντι της καρκινικής σειράς LNCaP (IC_{50} 130 μM). Όπως έχει παρατηρηθεί και σε άλλες μελέτες [54,58], η κυτταροτοξική δράση των κουμαρινικών αναλόγων εξαρτάται σημαντικά από την εξεταζόμενη κυτταρική σειρά.

4.4.5.2 Μελέτη επίδρασης φωτός διέγερσης στη βιωσιμότητα των κυττάρων

Προκειμένου να πραγματοποιηθεί η μελέτη φωτοδυναμικής θεραπείας, είναι αναγκαίο να προσδιοριστεί η κατάλληλη δόση ενέργειας φωτός διέγερσης η οποία δεν οδηγεί σε κυτταρικό θάνατο. Ανάλογα με το φάσμα απορρόφησης των κουμαρινικών αναλόγων, επιλέχθηκαν διαφορετικές πηγές φωτός για τη διέγερσή τους. Σε αυτό το πλαίσιο, ελέγχθηκαν τρεις διαφορετικές τιμές ισχύος του φωτός διέγερσης, 9, 12 και 15 mW cm⁻² για χρόνους ακτινοβολήσης 60 s, 120 s και 180 s για τις οποίες δεν παρατηρήθηκε σημαντική μείωση της κυτταρικής βιωσιμότητας.

4.4.5.3 Μελέτη Φωτοδυναμικής Θεραπείας (PDT)

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της μελέτης επίδρασης φωτός, καθώς και της μελέτης επίδρασης διαφορετικών συγκεντρώσεων των κουμαρινικών αναλόγων απουσία φωτός, τα καρκινικά κύτταρα A431 επώαστηκαν για 4 h με συγκέντρωση 20 μM των κουμαρινικών ενώσεων και στη συνέχεια ακτινοβολήθηκαν με 15 mW cm^{-2} για 3 min. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στην Εικόνα 4.15.



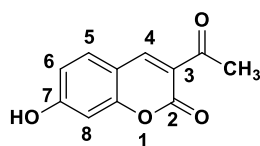
Εικόνα 4.15 Επίδραση της ακτινοβολήσης με 15 mW cm^{-2} για 3 min έπειτα από επώαση με συγκέντρωση 20 μM των εξεταζόμενων ενώσεων στην κυτταρική βιωσιμότητα, *** $p < 0.001$ ως προς control.

Μεταξύ των κουμαρινικών παραγώγων **23**, **24a**, **24b** και **24c**, η ένωση **23** παρουσίασε χαμηλή φωτοτοξικότητα (12%), ενώ το βενζυλοξυ ανάλογο της, **24c**, μείωσε σημαντικά τη βιωσιμότητα των κυττάρων στο 57%. Η παρουσία μιας μακριάς αλυσίδας (πρένυλο- ή γεράνυλο-) στη θέση 7 του κουμαρινικού σκελετού, φαίνεται να καθιστά τις ενώσεις ανενεργές όσον αφορά την φωτοτοξικότητά τους (**24a** και **24b**). Ωστόσο, είναι αξιοσημείωτο ότι όλα τα υβριδικά μόρια κουμαρινών-χαλκόνων που εξετάστηκαν (**26a**, **26b** και **26d**) παρουσίασαν ισχυρή φωτοευαισθητοποιητική δράση, μειώνοντας τη βιωσιμότητα των κυττάρων στο 40%, 22% και 55%, αντίστοιχα. Συνεπώς, ο υβριδισμός των κουμαρινικών αναλόγων με το δομικό σκελετό της χαλκόνης φαίνεται να ενισχύει σημαντικά την αποτελεσματικότητα των ενώσεων. Ανάλογα συμπεράσματα διεξήχθησαν στην ερευνητική δουλειά των Tuncel et al., στην οποία συντέθηκε ένα σύζευγμα χαλκόνης-φθαλοκυανίνης και δοκιμάστηκε για τη φωτοευαισθητοποιητική του δράση έναντι κυττάρων ανθρώπινου αδενοκαρκινώματος του παχέος εντέρου (HT-29), παρουσιάζοντας ενισχυμένη δράση σε σχέση με τη φθαλοκυανίνη στην ελεύθερη μορφή της [59].

4.5 ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

4.5.1 Σύνθεση των κουμαρινικών αναλόγων

Σύνθεση της 3-ακετυλο-7-υδροξυ-2H-χρωμεν-2-όνης (**24a**):



Σε σφαιρική φιάλη προστίθενται 7.24 mmol (1 g) 2,4-διδροξυ-βενζαλδεΐδης και 7.24 mmol (923 μ L) ακετοξικού αιθυλεστέρα, καθώς και 20 mL αιθανόλης και 108 μ L πιπεριδίνης κι αφήνονται στους 90 °C για 24 h υπό συνεχή ανάδευση, παρουσία κάθετου ψυκτήρα κι υπό αδρανείς συνθήκες. Η πορεία της αντίδρασης παρακολουθείται μέσω χρωματογραφίας λεπτής στιβάδας (TLC) σε σύστημα διαλυτών αιθέρας (PE)/οξικός αιθυλεστέρας (EtOAc) = 70 : 30. Μετά το πέρας της αντίδρασης ακολουθεί εξάτμιση υπό ελαττωμένη πίεση για απομάκρυνση του διαλύτη έως ότου παρατηρηθεί εναπόθεση στερεού προϊόντος στα τοιχώματα της σφαιρικής φιάλης. Τέλος, το προϊόν που προκύπτει ανακρυσταλλώνεται με κατάλληλη ποσότητα μεθανόλης και διχλωρομεθανίου και λαμβάνεται υπό τη μορφή καφέ στερεού. Η καθαρότητα του προϊόντος ελέγχεται με φασματοσκοπία ^1H NMR.

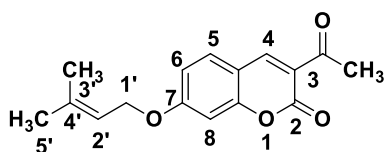
Απόδοση: 68%, **Σ.Τ.:** 233-236 °C (**Σ.Τ. βιβλιογραφίας:** 238 °C [60])

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3): δ (ppm) 8.37 (s, 1H, H-10), 7.37 (d, $J = 9$ Hz, 1H, H-5), 6.75 (dd, $J = 8.4$ Hz, $J = 1.8$ Hz, 1H, H-6), 6.72 (s, 1H, H-8), 2.57 (s, 3H, COCH_3)

Γενική μέθοδος σύνθεσης 7-υποκατεστημένων κουμαρινικών παραγώγων (**24a-24c**)

Σε σφαιρική φιάλη προστίθεται ποσότητα της 3-ακετυλο-7-υδροξυ-κουμαρίνης (1 eq) και κατάλληλη ποσότητα πρενυλοξυ, βενζυλοξυ ή γερανυλοξυ-βρωμιδίου (1.2 eq) παρουσία ξηρού ανθρακικού καλίου (K_2CO_3) σε διαλύτη ακετόνη. Το μίγμα αφήνεται υπό συνεχή ανάδευση για 24 h στους 56 °C παρουσία κάθετου ψυκτήρα και σε αδρανείς συνθήκες αζώτου N_2 . Η πορεία της αντίδρασης παρακολουθείται μέσω χρωματογραφίας λεπτής στιβάδας (TLC) σε κατάλληλη αναλογία συστήματος διαλυτών. Μετά το πέρας της αντίδρασης πραγματοποιείται διήθηση υπό κενό προς απομάκρυνση της βάσης και παραλαβή του οργανικού διηθήματος, το οποίο εξατμίζεται σε περιστροφικό εξατμιστήρα. Ακολουθεί ανακρυστάλλωση με κατάλληλη ποσότητα μεθανόλης και διχλωρομεθανίου προς καθαρισμό του προϊόντος.

3-ακετυλο-7-πρενυλοξυ-2H-χρωμεν-2-όνη (**24a**):

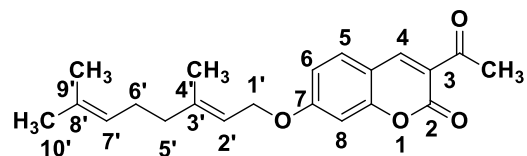


Σύμφωνα με τη γενική μέθοδο σύνθεσης των 7-υποκατεστημένων-κουμαρινών, 1.47 mmol (300mg) 3-ακετυλο-7-υδροξυ-κουμαρίνης προστίθενται σε 20.6 mL ακετόνης. Ακολουθεί η προσθήκη 1.47 mmol (203.1 mg) K_2CO_3 και 1.76 mmol (204 μ L) 3,3-διμεθυλο-αλλυλο-βρωμιδίου (πρενυλο-βρωμίδιο). Παραλαμβάνεται στερό κίτρινου χρώματος.

Απόδοση: 75%, **Σ.Τ.:** 120-122 °C (**Σ.Τ. βιβλιογραφίας:** 108-110 °C [61])

¹H NMR (600 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 8.48 (s, 1H, H-4), 7.52 (d, *J* = 9 Hz, 1H, H-5), 6.89 (dd, *J* = 9 Hz, *J* = 2.4 Hz, 1H, H-6), 6.81 (d, *J* = 2.4 Hz, 1H, H-8), 5.46 (t, *J* = 6.6 Hz, 1H, H-2'), 4.61 (d, *J* = 6.6 Hz, 2H, H-1'), 2.69 (s, 3H, COCH₃), 1.81 (s, 3H, CH₃), 1.77 (s, 3H, CH₃)

3-ακετυλο-7-γερανυλοξυ-2H-χρωμεν-2-όνη (**24b**):



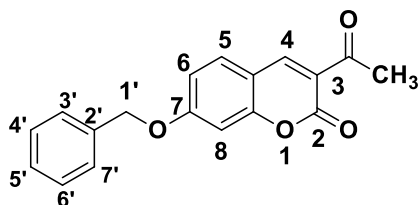
Σύμφωνα με τη γενική μέθοδο σύνθεσης των 7-υποκατεστημένων-κουμαρινών, 1.41 mmol (288.5 mg) 3-ακετυλο-7-υδροξυ-κουμαρίνης

προστίθενται σε 19.7 mL ακετόνης. Ακολουθεί η προσθήκη 1.41 mmol (194.8 mg) K₂CO₃ και 1.69 mmol (350 μL) γερανυλο-βρωμιδίου. Παραλαμβάνεται στερεό μωβ χρώματος.

Απόδοση: 97%, **Σ.Τ.:** 123-124 °C, (**Σ.Τ. βιβλιογραφίας:** 122-124 °C [62])

¹H NMR (600 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 8.49 (s, 1H, H-4), 7.53 (d, *J* = 9 Hz, 1H, H-5), 6.97 (dd, *J* = 9 Hz, *J* = 2.4 Hz, 1H, H-6), 6.82 (d, *J* = 1.8 Hz, 1H, H-8), 5.46 (t, *J* = 6 Hz, 1H, H-2'), 5.07 (t, *J* = 6 Hz, 1H, H-6'), 4.64 (d, *J* = 6 Hz, 2H, H-1'), 2.70 (s, 3H, COCH₃), 2.17-2.09 (m, 4H, H-5', H-4'), 1.76 (s, 3H, CH₃), 1.66 (s, 3H, CH₃), 1.60 (s, 3H, CH₃)

3-ακετυλο-7-βενζυλοξυ-2H-χρωμεν-2-όνη (**24c**):



Σύμφωνα με τη γενική μέθοδο σύνθεσης των 7-υποκατεστημένων-κουμαρινών, 1.96 mmol (400.0 mg) 3-ακετυλο-7-υδροξυ-κουμαρίνης προστίθενται σε 27.4 mL ακετόνης. Ακολουθεί η προσθήκη 1.96 mmol (271.0 mg) K₂CO₃ και 2.35 mmol (273 μL) βενζυλο-βρωμιδίου.

Παραλαμβάνεται στερεό υπόλευκου χρώματος.

Απόδοση: 60%, **Σ.Τ.:** 180-181 °C

¹H NMR (600 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 8.49 (s, 1H, H-4), 7.55 (d, *J* = 9 Hz, 1H, H-5), 7.42-7.37 (m, 5H, H-3', H-4', H-5', H-6', H-7'), 6.97 (dd, *J* = 9 Hz, *J* = 2.4 Hz, 1H, H-6), 6.89 (d, *J* = 1.8 Hz, 1H, H-8), 5.16 (s, 2H, H-1'), 2.70 (s, 3H, COCH₃)

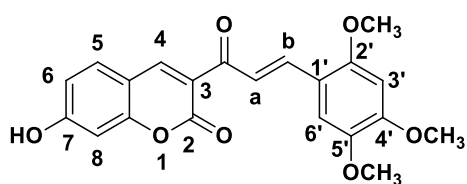
HRMS calcd for C₁₈H₁₅O₄ (M+H)⁺: *m/z*: 295.0965, found: 295.0960

Γενική μέθοδος σύνθεσης κουμαρινών-χαλκονών (26a-26d)

Κατάλληλη ποσότητα της 3-ακετυλο-7-υποκατεστημένης-κουμαρίνης (1 eq) αντιδρά με ισομοριακή ποσότητα βενζαλδεΐδης (1 eq) σε αιθανόλη και πιπεριδίνη. Το μίγμα αφήνεται στους 78 °C για 24hr, παρουσία κάθετου ψυκτήρα. Η πορεία της αντίδρασης παρακολουθείται μέσω χρωματογραφίας λεπτής στιβάδας (TLC) σε

κατάλληλο σύστημα διαλυτών. Μετά το πέρας της αντίδρασης, πραγματοποιείται οξίνιση υπό ψύξη με προσθήκη διαλύματος υδροχλωρικού οξέος (HCl 10%). Σε περίπτωση καταβύθισης στερεού πραγματοποιείται διήθηση υπό κενό. Εναλλακτικά, πραγματοποιείται εκχύλιση με διάλυμα οξικού αιθυλεστέρα και ξήρανση του διηθήματος με Na₂SO₄ ενώ ακολουθεί εξάτμιση υπό ελαττωμένη πίεση και την παραλαβή στερεού προϊόντος. Τέλος, για τον καθαρισμό του προϊόντος πραγματοποιείται ανακρυστάλλωση με κατάλληλη ποσότητα μεθανόλης και διχλωρομεθανίου σε κάθε περίπτωση. Η καθαρότητα του προϊόντος ελέγχεται με φασματοσκοπία ¹H και ¹³C NMR.

3-(3-(2,4,5-τριμεθοξυφαινυλ)ακρυλοϋλ)-7-υδροξυ-2H-χρωμεν-2-όνη (**26a**):



Σύμφωνα με τη γενική μέθοδο σύνθεσης κουμαρινών-χαλκονών, σε σφαιρική φιάλη προστίθενται 0.73 mmol (149.4 mg) 3-ακετυλο-7-υδροξυ-κουμαρίνης και 0.73 mmol (143.6 mg) 2,4,5-τριμεθοξυ-βενζαλδεΐδης σε 2.9 mL

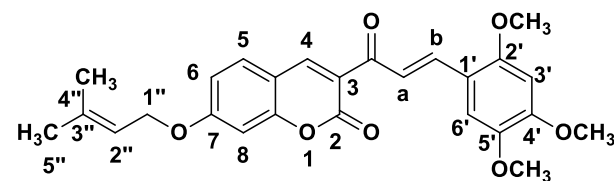
αιθανόλης μαζί με 6 σταγόνες πιπεριδίνης. Μετά το πέρας της αντίδρασης, πραγματοποιείται εκχύλιση της υδατικής στιβάδας και το προϊόν που λαμβάνεται ανακρυσταλλώνεται με κατάλληλη ποσότητα διχλωρομεθανίου και μεθανόλης. Παραλαμβάνεται κόκκινο στερεό.

Απόδοση: 30%, **Σ.Τ.:** 247 °C (decomp.)

¹H NMR (600 MHz, DMSO-d₆): δ (ppm) 11.07 (br, 1H, OH), 8.59 (s, 1H, H-4), 7.94 (d, J = 15.6 Hz, 1H, H-b), 7.78 (d, J = 8.4 Hz, 1H, H-5), 7.67 (d, J = 15.6 Hz, 1H, H-a), 7.24 (s, 1H, H-6'), 6.86 (dd, J = 8.4 Hz, J = 1.8 Hz, 1H, H-6), 6.77 (d, J = 1.8 Hz, 1H, H-8), 6.75 (s, 1H, H-3'), 3.89 (s, 3H, OCH₃), 3.87 (s, 3H, OCH₃), 3.77 (s, 3H, OCH₃), ¹³C NMR (150 MHz, DMSO-d₆) δ (ppm) 186.39, 158.99, 156.95, 154.47, 152.93, 147.58, 142.99, 138.02, 132.24, 122.00, 114.24, 111.25, 111.05, 97.66, 97.64, 56.40, 56.38, 56.22, 56.19, 55.87, 55.85.

HRMS calcd for C₂₁H₁₉O₇ (M+H)⁺: m/z: 383.1053, found: 383.1125

3-(3-(2,4,5-τριμεθοξυφαινυλ)ακρυλοϋλ)-7-υδροξυ-2H-χρωμεν-2-όνη (**26b**):



Σύμφωνα με τη γενική μέθοδο σύνθεσης κουμαρινών-χαλκονών, σε σφαιρική φιάλη προστίθενται 0.44 mmol (120.0 mg) 3-ακετυλο-7-υδροξυ-κουμαρίνης και 0.44 mmol

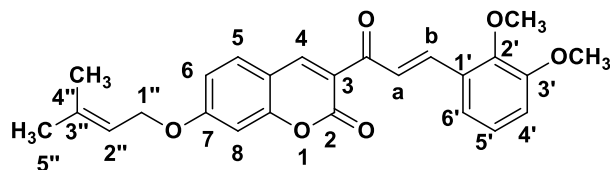
(86.3 mg) 2,4,5-τριμεθοξυ-βενζαλδεΐδης σε 2.0 mL αιθανόλης μαζί με 4 σταγόνες πιπεριδίνης. Παραλαμβάνεται πορτοκαλί στερεό.

Απόδοση: 30%, **Σ.Τ.:** 145 °C

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

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

3-(3-(2,3-διμεθοξυφαινυλ)ακρυλοϋλ)-7-πρενυλοξυ-2H-χρωμεν-2-όνη (**26c**):



Σύμφωνα με τη γενική μέθοδο σύνθεσης κουμαρινών-χαλκονών, σε σφαιρική φιάλη προστίθενται 0.55 mmol (150.0 mg) 3-ακετυλο-7-υδροξυ-κουμαρίνης και 0.55 mmol

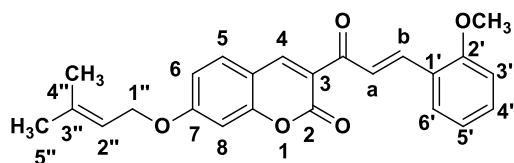
(91.4 mg) 2,4,5-τριμεθοξυ-βενζαλδεϋδης σε 2.3 mL αιθανόλης μαζί με 5 σταγόνες πιπεριδίνης. Παραλαμβάνεται κίτρινο στερεό.

Απόδοση: 32%, **Σ.Τ.:** 136 °C

¹H NMR (600 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 8.57 (s, 1H, H-4), 8.18 (d, *J* = 15.6 Hz, 1H, H-b), 8.03 (d, *J* = 16.2 Hz, 1H, H-a), 7.55 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H, H-5), 7.36 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H, H-6'), 7.08 (t, *J* = 7.8 Hz, 1H, H-5'), 6.96 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H, H-4'), 6.90 (dd, *J* = 9 Hz, *J* = 1.8 Hz, 1H, H-6), 6.85 (d, *J* = 1.8 Hz, 1H, H-8), 5.48 (t, *J* = 6.6 Hz, 1H, H-2''), 4.62 (d, *J* = 6.6 Hz, 2H, H-1''), 3.90 (s, 3H, OCH₃), 3.89 (s, 3H, OCH₃), 1.82 (s, 3H, CH₃), 1.78 (s, 3H, CH₃)

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

3-(3-(2-μεθοξυφαινυλ)ακρυλοϋλ)-7-πρενυλοξυ-2H-χρωμεν-2-όνη (**26d**):



Σύμφωνα με τη γενική μέθοδο σύνθεσης κουμαρινών-χαλκονών, σε σφαιρική φιάλη προστίθενται 0.59 mmol (159.9 mg) 3-ακετυλο-7-πρενυλοξυ-κουμαρίνης και 0.59 mmol (79.9 mg) 2-μεθοξυ-

βενζαλδεϋδης σε 2.4 mL αιθανόλης μαζί με 4 σταγόνες πιπεριδίνης. Μετά το πέρας της αντίδρασης και την οξίνιση, παρατηρείται καταβύθιση στερεού κι έτσι πραγματοποιείται διήθηση υπό κενό. Τέλος, πραγματοποιείται ανακρυστάλλωση με κατάλληλη ποσότητα μεθανόλης και διχλωρομεθανίου. Παραλαμβάνεται κίτρινο στερεό.

Απόδοση: 33%, **Σ.Τ.:** 130-132 °C

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 8.56 (s, 1H, H-4), 8.21 (d, *J* = 15.9 Hz, 1H, H-b), 8.05 (d, *J* = 15.9 Hz, 1H, H-a), 7.71 (dd, *J* = 7.8 Hz, *J* = 1.2 Hz, 1H, H-6'), 7.54 (d, *J* = 8.7 Hz, 1H, H-5), 6.98 (t, *J* = 7.5 Hz, 1H, H-3'), 6.93-6.84 (m, 3H, H-6, H-8, H-5'), 7.37 (pseudotriplet, 1H, H-4'), 5.48 (t, *J* = 6.6 Hz, 1H, H-2''), 4.61 (d, *J* = 6.9 Hz, 2H, H-1'') 3.91 (s, 3H, OCH₃), 1.82 (s, 3H, CH₃), 1.78 (s, 3H, CH₃), ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 186.96, 164.48, 159.96, 159.10, 157.70, 148.35, 139.93, 132.04, 131.30, 129.43, 124.76, 124.21, 121.75, 120.86, 118.43, 114.42, 112.46, 111.30, 101.15, 66.87, 55.68, 55.67, 25.95, 18.46.

HRMS calcd for C₂₄H₂₃O₅ (M+H)⁺: m/z: 391.1467, found: 391.1545

4.5.2 Προσδιορισμός της αναστολής της λιπιδικής υπεροξειδωσης (AAPH)

Για τον προσδιορισμό της ικανότητας των ενώσεων να αναστέλλουν τη λιπιδική υπεροξειδωση σε μια κυψελίδα χαλαζία προστίθενται 0.93 mL ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών αλάτων συγκέντρωσης 0.05 M με pH 7.4 μαζί με 10 μ L από το αιώρημα των 16 mM του άλατος με νάτριο λινελαϊκού οξέος. Με την προσθήκη 50 μ L από το διάλυμα του εκκινητή ελευθέρων ριζών, AAPH (40 mM), ξεκινάει η αντίδραση οξειδωσης στον αέρα και σε θερμοκρασία 37 °C. Προκειμένου να μελετηθεί η αντιοξειδωτική ικανότητα της ένωσης προστίθενται 10 μ L διαλύματος της ένωσης σε DMSO (10 mM) ενώ στην περίπτωση που δεν υπάρχει αντιοξειδωτικό προστίθεται ίδια ποσότητα διαλύτη DMSO. Η παρακολούθηση του ρυθμού οξειδωσης πραγματοποιείται στα 234 nm.

4.5.3 Προσδιορισμός της *in vitro* ικανότητας αναστολής της φυτικής λιποξυγονάσης (LOX)

Για τον προσδιορισμό της αναστολής της δράσης της λιποξυγονάσης, σε κυψελίδα χαλαζία προστίθενται λινελαϊκό νάτριο (0.1 mL) και 0.2 mL ενζυμικό διάλυμα ($1/9 \times 10^{-4}$ w/v σε φυσιολογικό ορό) σε ρυθμιστικό διάλυμα Tris pH 9.0. Η μετατροπή του λινελαϊκού νατρίου σε 13-υδροϋπεροξυλινελαϊκό οξύ στα 234 nm με την παρουσία του διαλύματος της ουσίας καταγράφεται.

Τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν σε συνεργασία με το Εργαστήριο Φαρμακευτικής Χημείας του Τμήματος Φαρμακευτικής του Αριστοτελείου Πανεπιστημίου Θεσσαλονίκης, από την Καθηγήτρια Δήμητρα Χατζηπαύλου – Λίτινα και τους συνεργάτες της.

4.5.4 Φωτοφυσικές ιδιότητες

Τα φάσματα απορρόφησης των ενώσεων καταγράφηκαν χρησιμοποιώντας το φασματόμετρο Perkin Elmer Lambda 35 UV/VIS στο εύρος των 300-700 nm με ταχύτητα σάρωσης 480 nm/min. Η απορρόφηση κάθε ουσίας μετρήθηκε σε DMSO, αιθανόλη και PBS σε τελική συγκέντρωση 50 μ M (**23**, **24a**, **26a**, **26b**, **26d**) και 30 μ M (**24b**, **24c**, **26c**).

Τα φάσματα φθορισμού καταγράφηκαν χρησιμοποιώντας το φασματόμετρο φωταύγειας Perkin Elmer LS45 σε PBS σε συγκέντρωση 5 μ M (**24a**, **24c**, **26a**, **26b**, **26c**, **26d**), 10 nM (**24b**) και 20 nM (**23**). Το μήκος κύματος διέγερσης ορίστηκε στο μήκος κύματος που αντιστοιχεί στη μέγιστη απορρόφηση κάθε ουσίας, δηλαδή 420 nm για την **23**, 369 nm για την **24a**, 413 nm για την **24b**, 356 nm για την **24c**, 451 nm για την **26a**, 400 nm για την **26c** και 380 nm για την **26d**.

4.5.4.1 Συσκευές ακτινοβολήσης

Οι συσκευές ακτινοβολήσης που χρησιμοποιήθηκαν αναπτύχθηκαν στο Εργαστήριο Βιοϊατρικής Οπτικής και Εφαρμοσμένης Βιοφυσικής του Εθνικού Μετσόβιου Πολυτεχνείου. Οι συσκευές βασίζονται σε πηγές φωτός LED που

αντιστοιχούν στη μέγιστη απορρόφηση κάθε ουσίας, σε συνδυασμό με ειδικά οπτικά συστήματα ώστε να επιτυγχάνεται ομοιόμορφη ακτινοβολία στην περιοχή ενδιαφέροντος. Η ισχύς της ακτινοβολίας μετρήθηκε σε επίπεδο διαλύματος ή κυτταρικού επιπέδου, πριν και μετά την ακτινοβολήση, χρησιμοποιώντας μετρητή ισχύος. Η μεταβλητότητα της ισχύος ακτινοβολίας στην ακτινοβολημένη περιοχή ήταν μικρότερη από 2%.

4.5.4.2 Φωτοσταθερότητα

Η φωτοσταθερότητα των εξεταζόμενων ενώσεων μελετήθηκε σε PBS έπειτα από διέγερση με κατάλληλη πηγή φωτός με 13 mW cm^{-2} για 30 min. Τα φάσματα φθορισμού λαμβάνονται κάθε 1 min μεταξύ 0 και 10 min και στη συνέχεια κάθε 5 min μεταξύ 10 και 30 min.

4.5.5 Παραγωγή δραστικών μορφών οξυγόνου (ROS)

Ανάλογα με τις φωτοφυσικές ιδιότητες των κουμαρινικών παραγώγων επιλέγεται η κατάλληλη μέθοδος για την αξιολόγηση της ικανότητάς τους να παράγουν ελεύθερες ρίζες.

Κατά την πρώτη μέθοδο χρησιμοποιείται το δινουκλεοτίδιο αδενίνης νικοτιναμιδίου (NADH) το οποίο απορροφά στα 340 nm, ενώ η οξείδωσή του οδηγεί στη μετατροπή του σε NAD⁺ και άρα στη μείωση της απορρόφησης στο συγκεκριμένο μήκος κύματος. Σε 3 mL διαλύματος NADH (100 μM) και EDTA (100 μM) προστίθεται κατάλληλη ποσότητα από τις ενώσεις **23**, **26a** και **26d** ώστε να επιτύχουμε τελική συγκέντρωση 50 μM. Ακολουθεί ακτινοβολήση με ισχύ 12.5 mW/cm^2 για συνολικά 30 min. Η τιμή της απορρόφησης στα 340 nm λαμβάνεται κάθε 1 min μεταξύ 0 και 10 min και στη συνέχεια κάθε 5 min μεταξύ 10 και 30 min.

Για τη μελέτη της ικανότητας των κουμαρινικών παραγώγων **24a**, **24b**, **24c**, **26b** και **26c** να παράγουν ελεύθερες ρίζες χρησιμοποιήθηκε η ουσία 5-(and-6)-chloromethyl-2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate, acetyl ester, CM-H₂DCFDA, η οποία όταν αντιδρά με ελεύθερες ρίζες μετατρέπεται σε φθορίζον προϊόν. Αρχικά πραγματοποιείται η υδρόλυση της ουσίας. Για το σκοπό αυτό, 15 μL διαλύματος CM-H₂DCFDA σε DMSO (0.87 μM) και 5 μL από το διάλυμα υδρόλυσης (NaOH 4N) προστίθενται σε 40 μL EtOH και επωάζονται για μισή ώρα. Στη συνέχεια, σε κυψελίδα χαλαζία προστίθενται 2955 μL PBS, 35 μL από την υδρολυμένη ποσότητα του εστέρα, καθώς και 30 μL από διάλυμα των κουμαρινικών ενώσεων σε DMSO ώστε να επιτύχουμε τελική συγκέντρωση 10 nM. Ακολουθεί ακτινοβολήση με ισχύ 12.5 mW/cm^2 για συνολικά 30 min. Η διέγερση πραγματοποιήθηκε στα 488 nm με μήκη κύματος εκπομπής φθορισμού μεταξύ 510 nm και 650 nm. Τα φάσματα φθορισμού λαμβάνονται κάθε 1 min μεταξύ 0 και 10 min και στη συνέχεια κάθε 5 min μεταξύ 10 και 30 min.

4.5.6 Μελέτη κυτταροτοξικότητας και φωτοτοξικότητας

Για τα πειράματα που πραγματοποιήθηκαν με τη χρήση κυττάρων A431, σε κάθε πηγάδι ενός πλακιδίου 96 θέσεων (96-well plates) επιστρώνονται 6×10^3 κύτταρα/πηγάδι και επωάζονται για 24 h στους 37 °C και σε 5% CO₂.

4.5.6.1 Κυτταροτοξικότητα απουσία φωτός

Για τη μελέτη της επίδρασης των ενώσεων στην κυτταρική βιωσιμότητα, 24 h μετά την επίστρωση των κυττάρων, προστίθενται διαφορετικές συγκεντρώσεις (10 μM, 20 μM και 30 μM) των ενώσεων σε κάθε πηγάδι για άλλες 24 h. Στη συνέχεια, το θρεπτικό υλικό αφαιρείται και προστίθεται φρέσκο θρεπτικό υλικό. Έπειτα από 24 h η κυτταρική βιωσιμότητα υπολογίζεται μέσω της δοκιμασίας MTT.

4.5.6.2 Κυτταροτοξικότητα παρουσία φωτός

Για τη μελέτη της επίδρασης του φωτός στην κυτταρική βιωσιμότητα, 24 h μετά την επίστρωση των κυττάρων, το θρεπτικό υλικό αφαιρείται και 40 μL PBS προστίθενται σε κάθε πηγάδι ενώ ακολουθεί ακτινοβολήση με 9 mW/cm², 12 mW/cm² και 15 mW/cm² για 1, 2 και 3 min. Στη συνέχεια, το PBS αφαιρείται και προστίθεται φρέσκο θρεπτικό υλικό σε κάθε πηγάδι για 24 h. Έπειτα, το θρεπτικό αφαιρείται και ακολουθεί η διαδικασία κυτταρικής βιωσιμότητας MTT.

4.5.6.3 Φωτοδυναμική θεραπεία

Για τη μελέτη της φωτοδυναμικής θεραπείας, 24 h μετά την επίστρωση των κυττάρων, το θρεπτικό υλικό αφαιρείται και προστίθενται 100 μL θρεπτικού υλικού που περιέχει τα προς εξέταση μόρια σε συγκέντρωση 20 μM και πραγματοποιείται επώαση για 4 h. Στη συνέχεια, το θρεπτικό υλικό απομακρύνεται και 40 μL PBS προστίθενται σε κάθε πηγάδι ενώ ακολουθεί ακτινοβολήση με 15 mW/cm² για 3 min. Το PBS αφαιρείται και προστίθεται φρέσκο θρεπτικό υλικό σε κάθε πηγάδι για 24 h. Τέλος, ακολουθεί η διαδικασία κυτταρικής βιωσιμότητας MTT.

Η ένωση **6c** δεν μελετήθηκε καθώς βρέθηκε κυτταροτοξική στη συγκέντρωση των 20 μM.

4.5.6.4 Δοκιμασία κυτταρικής βιωσιμότητας-MTT

Η κυτταρική βιωσιμότητα μετρήθηκε μέσω της δοκιμασίας MTT. Έπειτα από την αφαίρεση του θρεπτικού υλικού 115 μL από το διάλυμα MTT (0.65 mg/mL) προστίθενται σε κάθε πηγάδι. Τα κύτταρα επωάζονται για 3 h και στη συνέχεια το θρεπτικό υλικό αφαιρείται και προστίθενται 200 μL DMSO σε κάθε πηγάδι με σκοπό τη διαλυτοποίηση των κρυστάλλων φορμαζάνης. Η απορρόφηση μετράται στα 570 nm με τη συσκευή plate reader Epoch 2 Microplate Reader της εταιρείας Bio Tek Instruments. Η κυτταρική βιωσιμότητα υπολογίζεται μέσω της Εξίσωσης 4.1:

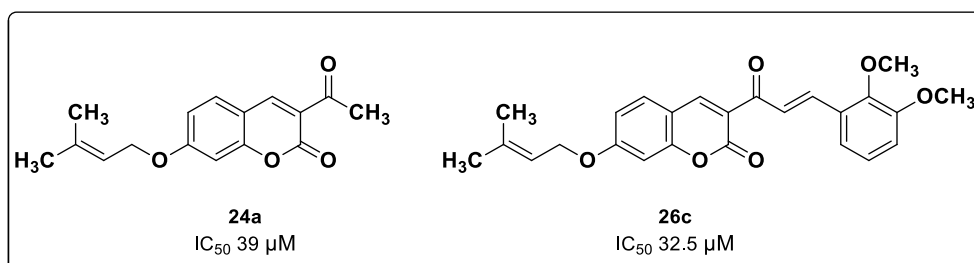
$$(\%) \text{ Βιωσιμότητα} = \frac{Abs_{sample}}{Abs_{control}} \times 100 \quad (4.1)$$

Τα πειράματα οπτικών ιδιοτήτων και οι κυτταρικές δοκιμές πραγματοποιήθηκαν σε συνεργασία με το Εργαστήριο Βιοϊατρικής Οπτικής και Εφαρμοσμένης Βιοφυσικής της Σχολής Ηλεκτρολόγων Μηχανικών και Μηχανικών Υπολογιστών του Εθνικού Μετσόβιου Πολυτεχνείου και την Δρ. Ελένη Αλεξανδράτου.

4.6 ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Τέσσερα 3-ακετυλο-7-υποκατεστημένα κουμαρινικά παράγωγα εκ των οποίων το ένα παρουσιάζεται για πρώτη φορά στη βιβλιογραφία, καθώς και τέσσερα νέα υβριδικά μόρια κουμαρινών-χαλκονών συντέθηκαν σε ικανοποιητικές αποδόσεις, χαρακτηρίστηκαν δομικά και στη συνέχεια μελετήθηκαν για πολλαπλές βιολογικές δράσεις. Πιο συγκεκριμένα, τα παράγωγα αρχικά μελετήθηκαν ως προς την αντιοξειδωτική τους δράση μέσω της ικανότητάς τους να αναστέλλουν τη λιπιδική υπεροξειδωση, ως προς την ικανότητά τους να αναστέλλουν τη δράση της λιποξυγονάσης από σόγια καθώς και ως προς την κυτταροτοξικότητά τους έναντι της καρκινικής σειράς ανθρώπινου προστάτη LNCaP.

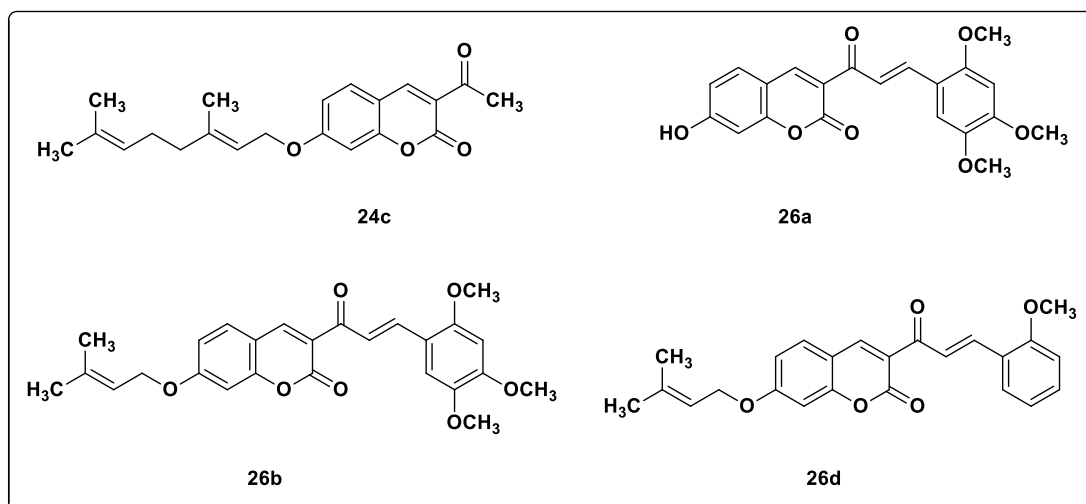
Η 3-ακετυλο-7-υδροξυ-κουμαρίνη (**23**) παρουσίασε τη μεγαλύτερη ικανότητα αναστολής της λιπιδικής υπεροξειδωσης (94%), παρόμοια με το πρότυπο Trolox (95%), ενώ σημαντική παρατήρηση αποτελεί ότι η αύξηση του αριθμού των μεθοξυ ομάδων στο δακτύλιο Β των πρενυλοξυ υβριδικών μορίων (**26b-26d**), φαίνεται να ενισχύει την αντιοξειδωτική τους δράση. Ωστόσο, αντίθετη επίδραση παρατηρείται για την κυτταροτοξική δράση έναντι της σειράς LNCaP όπου η αύξηση του αριθμού μεθοξυ ομάδων φαίνεται να σχετίζεται με μειωμένη κυτταροτοξική δράση για τα πρενυλοξυ υβριδικά μόρια. Ισχυρότερο κυτταροτοξικό παράγοντα αποτελεί το υδροξυ υβριδικό μόριο **26a** με τιμή IC₅₀ 56 μΜ. Όσον αφορά την ικανότητα αναστολής της λιποξυγονάσης, ικανότερους αναστολείς αποτέλεσαν οι ενώσεις **24a** και **26c** με τιμές IC₅₀ 39 μΜ και 32.5 μΜ, αντίστοιχα (Σχήμα 4.16).



Σχήμα 4.16 Ικανότεροι αναστολείς της λιποξυγονάσης της Σειράς Ε.

Στη συνέχεια, τα κουμαρινικά παράγωγα της Σειράς Ε μελετήθηκαν ως προς τις φωτοφυσικές τους ιδιότητες, δηλαδή την απορρόφησή τους σε τρεις διαφορετικούς διαλύτες (DMSO, EtOH και PBS), το φθορισμό τους και τη φωτοσταθερότητά τους. Είναι σημαντικό ότι η πλειοψηφία των κουμαρινικών αναλόγων εμφανίζει ισχυρή ικανότητα φθορισμού σε μικρή συγκέντρωση, επιτρέποντας τη χρήση τους και στον τομέα της διάγνωσης. Σχετικά με τη φωτοσταθερότητα των εξεταζόμενων ενώσεων, η 3-ακετυλο-7-πρενυλοξυ-κουμαρίνη (**24a**) παρουσίασε τη χαμηλότερη σταθερότητα καθώς από το πρώτο λεπτό ακτινοβολήσης παρουσίασε σημαντική ερυθρή μετατόπιση του μήκους κύματος μέγιστου φθορισμού της. Οι ενώσεις **24c**, **26a** και **26d** παρουσίασαν την υψηλότερη φωτοσταθερότητα. Ακόμη, μελετήθηκε η ικανότητα των εξεταζόμενων ενώσεων να παράγουν ελεύθερες ρίζες με δύο διαφορετικές μεθόδους με την 3-ακετυλο-7-γερανυλοξυ-κουμαρίνη (**24b**) να παρουσιάζει ικανοποιητική δράση.

Τέλος, μελετήθηκε η ικανότητα των ενώσεων, εκτός από την **26c** που επέδειξε σημαντική κυτταροτοξικότητα, να δρουν ως φωτοευαισθητοποιητές έναντι της καρκινικής σειράς επιδερμικού καρκινώματος A431. Η ένωση **24c** καθώς και όλα τα υβριδικά μόρια κουμαρινών-χαλκονών **26a**, **26b** και **26d** παρουσίασαν ισχυρή φωτοευαισθητοποιητική δράση, μειώνοντας την κυτταρική βιωσιμότητα στο 57%, 41%, 23% και 56%, αντίστοιχα (Σχήμα 4.17).



Σχήμα 4.17 Ισχυρότεροι φωτοευαισθητοποιητικοί παράγοντες.

4.7 ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- [1] L.K. Gediya, V.C. Njar, Promise and challenges in drug discovery and development of hybrid anticancer drugs, *Expert Opin. Drug Discov.* 4 (2009) 1099–1111. <https://doi.org/10.1517/17460440903341705>.
- [2] G. Bérubé, An overview of molecular hybrids in drug discovery, 11 (2016) 281–305. <https://doi.org/10.1517/17460441.2016.1135125>.
- [3] B. Meunier, Hybrid molecules with a dual mode of action: Dream or reality?, *Acc. Chem. Res.* 41 (2008) 69–77. <https://doi.org/10.1021/AR7000843>.
- [4] M. Decker, Hybrid Molecules Incorporating Natural Products: Applications in Cancer Therapy, Neurodegenerative Disorders and Beyond, *Curr. Med. Chem.* 18 (2011) 1464–1475. <https://doi.org/10.2174/092986711795328355>.
- [5] S.A. Nouredin, R.M. El-Shishtawy, K.O. Al-Footy, Curcumin analogues and their hybrid molecules as multifunctional drugs, *Eur. J. Med. Chem.* 182 (2019) 111631. <https://doi.org/10.1016/J.EJMECH.2019.111631>.
- [6] S. Choudhary, P.K. Singh, H. Verma, H. Singh, O. Silakari, Success stories of natural product-based hybrid molecules for multi-factorial diseases, *Eur. J. Med. Chem.* 151 (2018) 62–97. <https://doi.org/10.1016/J.EJMECH.2018.03.057>.
- [7] W. Liman, N. Ait Lahcen, M. Oubahmane, I. Hdoufane, D. Cherqaoui, R. Daoud, A. El Allali, Hybrid Molecules as Potential Drugs for the Treatment of HIV: Design and Applications, *Pharm.* 15 (2022) 1092. <https://doi.org/10.3390/PH15091092>.
- [8] F.W. Muregi, A. Ishih, Next-generation antimalarial drugs: hybrid molecules as a new strategy in drug design, *Drug Dev. Res.* 71 (2010) 20–32. <https://doi.org/10.1002/DDR.20345>.
- [9] A. Pawełczyk, K. Sowa-Kasprzak, D. Olender, L. Zaprutko, Molecular Consortia—Various Structural and Synthetic Concepts for More Effective Therapeutics Synthesis, *Int. J. Mol. Sci.* 19 (2018) 1104. <https://doi.org/10.3390/IJMS19041104>.
- [10] S.L. Gaonkar, U.N. Vignesh, Synthesis and pharmacological properties of chalcones: a review, *Res. Chem. Intermed.* 43 (2017) 6043–6077. <https://doi.org/10.1007/S11164-017-2977-5>.
- [11] N. Bentradi, A. Hamida-Ferhat, Analytical approaches used in the profiling of natural products with a therapeutic target: a global perspective on nutrition and health, *Stud. Nat. Prod. Chem.* 72 (2022) 57–101. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-823944-5.00017-X>.

- [12] N.A. Raut, P.W. Dhore, S.D. Saoji, D.M. Kokare, Selected Bioactive Natural Products for Diabetes Mellitus, *Stud. Nat. Prod. Chem.* 48 (2016) 287–322. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-63602-7.00009-6>.
- [13] M. Mellado, L. Espinoza, A. Madrid, J. Mella, E. Chávez-Weisser, K. Diaz, M. Cuellar, Design, synthesis, antifungal activity, and structure–activity relationship studies of chalcones and hybrid dihydrochromane–chalcones, *Mol. Divers.* 24 (2020) 603–615. <https://doi.org/10.1007/S11030-019-09967-Y4>.
- [14] A.B. Shaik, R.R. Bhandar, S. Nissankararao, Z. Edis, N.R. Tangirala, S. Shahanaaz, M.M. Rahman, Design, Facile Synthesis and Characterization of Dichloro Substituted Chalcones and Dihydropyrazole Derivatives for Their Antifungal, Antitubercular and Antiproliferative Activities, *Mol.* 25 (2020) 3188. <https://doi.org/10.3390/MOLECULES25143188>.
- [15] H. ur Rashid, Y. Xu, N. Ahmad, Y. Muhammad, L. Wang, Promising anti-inflammatory effects of chalcones via inhibition of cyclooxygenase, prostaglandin E2, inducible NO synthase and nuclear factor κ b activities, *Bioorg. Chem.* 87 (2019) 335–365. <https://doi.org/10.1016/J.BIOORG.2019.03.033>.
- [16] O.A. Nurkenov, M.K. Ibraev, I.A. Schepetkin, A.I. Khlebnikov, T.M. Seilkhanov, A.E. Arinova, M.B. Isabaeva, Synthesis, Structure, and Anti-Inflammatory Activity of Functionally Substituted Chalcones and Their Derivatives, *Russ. J. Gen. Chem.* 89 (2019) 1360–1367. <https://doi.org/10.1134/S1070363219070028>.
- [17] Y. Ouyang, J. Li, X. Chen, X. Fu, S. Sun, Q. Wu, Chalcone Derivatives: Role in Anticancer Therapy, *Biomol.* 11 (2021) 894. <https://doi.org/10.3390/BIOM11060894>.
- [18] P. Dandawate, K. Ahmed, S. Padhye, A. Ahmad, B. Biersack, Anticancer Active Heterocyclic Chalcones: Recent Developments, *Anticancer. Agents Med. Chem.* 21 (2020) 558–566. <https://doi.org/10.2174/1871520620666200705215722>.
- [19] T. Constantinescu, C.N. Lungu, Anticancer activity of natural and synthetic chalcones, *Int. J. Mol. Sci.* 22 (2021) 11306. <https://doi.org/10.3390/IJMS22111306/S1>.
- [20] D. Ramesh, A. Joji, B.G. Vijayakumar, A. Sethumadhavan, M. Mani, T. Kannan, Indole chalcones: Design, synthesis, in vitro and in silico evaluation against Mycobacterium tuberculosis, *Eur. J. Med. Chem.* 198 (2020) 112358. <https://doi.org/10.1016/J.EJMECH.2020.112358>.
- [21] S. Sinha, D.I. Batovska, B. Medhi, B.D. Radotra, A. Bhalla, N.

- Markova, R. Sehgal, *In vitro* anti-malarial efficacy of chalcones: Cytotoxicity profile, mechanism of action and their effect on erythrocytes, *Malar. J.* 18 (2019) 1–11. <https://doi.org/10.1186/S12936-019-3060-Z>.
- [22] H.L. Qin, Z.W. Zhang, R. Lekkala, H. Alsulami, K.P. Rakesh, Chalcone hybrids as privileged scaffolds in antimalarial drug discovery: A key review, *Eur. J. Med. Chem.* 193 (2020) 112215. <https://doi.org/10.1016/J.EJMECH.2020.112215>.
- [23] B. Salehi, C. Quispe, I. Chamkhi, N. El Omari, A. Balahbib, J. Sharifi-Rad, A. Bouyahya, M. Akram, M. Iqbal, A.O. Docea, C. Caruntu, G. Leyva-Gómez, A. Dey, M. Martorell, D. Calina, V. López, F. Les, Pharmacological Properties of Chalcones: A Review of Preclinical Including Molecular Mechanisms and Clinical Evidence, *Front. Pharmacol.* 11 (2021) 2068. <https://doi.org/10.3389/FPHAR.2020.592654>.
- [24] G.D. Yadav, D.P. Wagh, Claisen-Schmidt Condensation using Green Catalytic Processes: A Critical Review, *ChemistrySelect.* 5 (2020) 9059–9085. <https://doi.org/10.1002/SLCT.202001737>.
- [25] F. Dong, C. Jian, F. Zhenghao, G. Kai, L. Zuliang, Synthesis of chalcones via Claisen–Schmidt condensation reaction catalyzed by acyclic acidic ionic liquids, *Catal. Commun.* 9 (2008) 1924–1927. <https://doi.org/10.1016/J.CATCOM.2008.03.023>.
- [26] S.K. Konidala, V. Kotra, R.C.S.R. Danduga, P.K. Kola, R.R. Bhandare, A.B. Shaik, Design, multistep synthesis and in-vitro antimicrobial and antioxidant screening of coumarin clubbed chalcone hybrids through molecular hybridization approach, *Arab. J. Chem.* 14 (2021) 103154. <https://doi.org/10.1016/J.ARABJC.2021.103154>.
- [27] C.M. Hu, Y.X. Luo, W.J. Wang, J.P. Li, M.Y. Li, Y.F. Zhang, D. Xiao, L. Lu, Z. Xiong, N. Feng, C. Li, Synthesis and Evaluation of Coumarin-Chalcone Derivatives as α -Glucosidase Inhibitors, *Front. Chem.* 10 (2022) 598. <https://doi.org/10.3389/FCHEM.2022.926543>.
- [28] E. Halevas, M. Arvanitidou, B. Mavroidi, A.G. Hatzidimitriou, K. Politopoulos, E. Alexandratou, M. Pelecanou, M. Sagnou, A novel curcumin gallium complex as photosensitizer in photodynamic therapy: Synthesis, structural and physicochemical characterization, photophysical properties and in vitro studies against breast cancer cells, *J. Mol. Struct.* 1240 (2021) 130485. <https://doi.org/10.1016/J.MOLSTRUC.2021.130485>.
- [29] G. Gunaydin, M.E. Gedik, S. Ayan, Photodynamic Therapy – Current Limitations and Novel

- Approaches, *Front. Chem.* 9 (2021) 400. <https://doi.org/10.3389/FCHEM.2021.691697>.
- [30] J.F. Algorri, M. Ochoa, P. Roldán-Varona, L. Rodríguez-Cobo, J.M. López-Higuera, Photodynamic therapy: A compendium of latest reviews, *Cancers (Basel)*. 13 (2021) 4447. <https://doi.org/10.3390/CANCERS13174447>.
- [31] T.C. Pham, V.N. Nguyen, Y. Choi, S. Lee, J. Yoon, Recent Strategies to Develop Innovative Photosensitizers for Enhanced Photodynamic Therapy, *Chem. Rev.* 121 (2021) 13454–13619. <https://doi.org/10.1021/ACS.CHEMREV.1C00381>.
- [32] K.T. Kazantzis, K. Koutsonikoli, B. Mavroidi, M. Zachariadis, P. Alexiou, M. Pelecanou, K. Politopoulos, E. Alexandratou, M. Sagnou, Curcumin derivatives as photosensitizers in photodynamic therapy: photophysical properties and in vitro studies with prostate cancer cells, *Photochem. Photobiol. Sci.* 19 (2020) 193–206. <https://doi.org/10.1039/C9PP00375D>.
- [33] A.G. Niculescu, A.M. Grumezescu, Photodynamic Therapy—An Up-to-Date Review, *Appl. Sci.* 11 (2021) 3626. <https://doi.org/10.3390/APP11083626>.
- [34] G.M.F. Calixto, J. Bernegossi, L.M. De Freitas, C.R. Fontana, M. Chorilli, A.M. Grumezescu, Nanotechnology-based drug delivery systems for photodynamic therapy of cancer: A review, *Molecules*. 21 (2016). <https://doi.org/10.3390/MOLECULES21030342>.
- [35] J.H. Correia, J.A. Rodrigues, S. Pimenta, T. Dong, Z. Yang, Photodynamic Therapy Review: Principles, Photosensitizers, Applications, and Future Directions, *Pharm.* 13 (2021) 1332. <https://doi.org/10.3390/PHARMACEUTICS13091332>.
- [36] P. Mroz, A. Yaroslavsky, G.B. Kharkwal, M.R. Hamblin, Cell Death Pathways in Photodynamic Therapy of Cancer, *Cancers (Basel)*. 3 (2011) 2516. <https://doi.org/10.3390/CANCERS3022516>.
- [37] D.E.J.G.J. Dolmans, D. Fukumura, R.K. Jain, Photodynamic therapy for cancer, *Nat. Rev. Cancer* 2003 35. 3 (2003) 380–387. <https://doi.org/10.1038/nrc1071>.
- [38] Z. Shen, Q. Ma, X. Zhou, G. Zhang, G. Hao, Y. Sun, J. Cao, Strategies to improve photodynamic therapy efficacy by relieving the tumor hypoxia environment, *NPG Asia Mater.* 13 (2021) 1–19. <https://doi.org/10.1038/s41427-021-00303-1>.
- [39] R. Falk-Mahapatra, S.O. Gollnick, Photodynamic Therapy and Immunity: An Update, *Photochem. Photobiol.* 96 (2020) 550–559. <https://doi.org/10.1111/PHP.132>

- 53.
- [40] M. Kempa, P. Kozub, J. Kimball, M. Rojkiewicz, P. Kus'd, K. Kus'd, Z. Gryczyn'ski, G. Gryczyn'ski, A. Ratuszna, Physicochemical properties of potential porphyrin photosensitizers for photodynamic therapy, (2015). <https://doi.org/10.1016/j.saa.2015.03.076>.
- [41] J. Bonelli, E. Ortega-Forte, A. Rovira, M. Bosch, O. Torres, C. Cuscó, J. Rocas, J. Ruiz, V. Marchán, Improving Photodynamic Therapy Anticancer Activity of a Mitochondria-Targeted Coumarin Photosensitizer Using a Polyurethane-Polyurea Hybrid Nanocarrier, *Biomacromolecules*. 23 (2022) 2900–2913. <https://doi.org/10.1021/ACS.BIO MAC.2C00361>.
- [42] M. Lan, S. Zhao, W. Liu, C.S. Lee, W. Zhang, P. Wang, Photosensitizers for Photodynamic Therapy, *Adv. Healthc. Mater.* 8 (2019) 1900132. <https://doi.org/10.1002/ADHM.201900132>.
- [43] B. Mansoori, A. Mohammadi, M. Amin Doustvandi, F. Mohammadnejad, F. Kamari, M.F. Gjerstorff, B. Baradaran, M.R. Hamblin, Photodynamic therapy for cancer: Role of natural products, *Photodiagnosis Photodyn. Ther.* 26 (2019) 395–404. <https://doi.org/10.1016/J.PDPDT.2019.04.033>.
- [44] X. Zhao, J. Liu, J. Fan, H. Chao, X. Peng, Recent progress in photosensitizers for overcoming the challenges of photodynamic therapy: from molecular design to application, *Chem. Soc. Rev.* 50 (2021) 4185–4219. <https://doi.org/10.1039/D0CS00173B>.
- [45] E. Ortega-Forte, A. Rovira, A. Gandioso, J. Bonelli, M. Bosch, J. Ruiz, V. Marchán, COUPY Coumarins as Novel Mitochondria-Targeted Photodynamic Therapy Anticancer Agents, *J. Med. Chem.* 64 (2021) 17209–17220. <https://doi.org/10.1021/ACS.JM EDCHEM.1C01254>.
- [46] Y.I. Openda, B. Babu, T. Nyokong, Novel cationic-chalcone phthalocyanines for photodynamic therapy eradication of *S. aureus* and *E. coli* bacterial biofilms and MCF-7 breast cancer, *Photodiagnosis Photodyn. Ther.* 38 (2022) 102863. <https://doi.org/10.1016/J.PDPDT.2022.102863>.
- [47] S. Tuncel, A. Trivella, D. Atilla, K. Bennis, H. Savoie, F. Albrieux, L. Delort, H. Billard, V. Dubois, V. Ahsen, F. Caldefie-Chézet, C. Richard, R.W. Boyle, S. Ducki, F. Dumoulin, Assessing the dual activity of a chalcone-phthalocyanine conjugate: Design, synthesis, and antivasular and photodynamic properties, *Mol. Pharm.* 10 (2013) 3706–3716. <https://doi.org/10.1021/MP400207V>.
- [48] N.M. Bila, C.B. Costa-Orlandi,

- C.O. Vaso, J.L.C. Bonatti, L.R. de Assis, L.O. Regasini, C.R. Fontana, A.M. Fusco-Almeida, M.J.S. Mendes-Giannini, 2-Hydroxychalcone as a Potent Compound and Photosensitizer Against Dermatophyte Biofilms, *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 11 (2021) 399. <https://doi.org/10.3389/FCIMB.2021.679470>.
- [49] Q. Zou, Y. Fang, Y. Zhao, H. Zhao, Y. Wang, Y. Gu, F. Wu, Synthesis and in vitro photocytotoxicity of coumarin derivatives for one- and two-photon excited photodynamic therapy, *J. Med. Chem.* 56 (2013) 5288–5294. <https://doi.org/10.1021/JM400025G>.
- [50] Y. Wang, W. Zhang, J. Dong, J. Gao, Design, synthesis and bioactivity evaluation of coumarin-chalcone hybrids as potential anticancer agents, *Bioorg. Chem.* 95 (2020) 103530. <https://doi.org/10.1016/J.BIOORG.2019.103530>.
- [51] Shaveta, S. Mishra, P. Singh, Hybrid molecules: The privileged scaffolds for various pharmaceuticals, *Eur. J. Med. Chem.* 124 (2016) 500–536. <https://doi.org/10.1016/J.EJMECH.2016.08.039>.
- [52] H. Wei, J. Ruan, X. Zhang, Coumarin–chalcone hybrids: promising agents with diverse pharmacological properties, *RSC Adv.* 6 (2016) 10846–10860. <https://doi.org/10.1039/C5RA26294A>.
- [53] E. Kavetsou, L. Gkionis, G. Galani, C. Gkolfinopoulou, L. Argyri, E. Pontiki, A. Chroni, D. Hadjipavlou-Litina, A. Detsi, Synthesis of prenyloxy coumarin analogues and evaluation of their antioxidant, lipoxygenase (LOX) inhibitory and cytotoxic activity, *Med. Chem. Res.* 26 (2017) 856–866. <https://doi.org/10.1007/s00044-017-1800-6>.
- [54] L. Gkionis, E. Kavetsou, A. Kalospyros, D. Manousakis, M. Garzon Sanz, S. Butterworth, A. Detsi, A. Tirella, Investigation of the cytotoxicity of bioinspired coumarin analogues towards human breast cancer cells, *Mol. Divers.* 1 (2020) 3. <https://doi.org/10.1007/s11030-020-10082-6>.
- [55] K. Patel, C. Karthikeyan, V. Raja Solomon, N. S. Hari Narayana Moorthy, H. Lee, K. Sahu, G. Singh Deora, P. Trivedi, Synthesis of Some Coumarinyl Chalcones and their Antiproliferative Activity Against Breast Cancer Cell Lines, *Lett. Drug Des. Discov.* 8 (2012) 308–311. <https://doi.org/10.2174/157018011794839475>.
- [56] M.A. Pathak, T.B. Fitzpatrick, The evolution of photochemotherapy with psoralens and UVA (PUVA): 2000 BC to 1992 AD, *J. Photochem. Photobiol. B Biol.* 14 (1992) 3–22. [https://doi.org/10.1016/1011-1344\(92\)85080-E](https://doi.org/10.1016/1011-1344(92)85080-E).
- [57] R. Obert, S.S. Tern, H.T.N. Ichols, H. V. Äkevä, Malignant

- Melanoma in Patients Treated for Psoriasis with Methoxsalen (Psoralen) and Ultraviolet A Radiation (PUVA), 336 (1997) 1041–1045.
<https://doi.org/10.1056/NEJM199704103361501>.
- [58] G.J. Finn, E. Kenealy, B.S. Creaven, D.A. Egan, In vitro cytotoxic potential and mechanism of action of selected coumarins, using human renal cell lines, *Cancer Lett.* 183 (2002) 61–68.
[https://doi.org/10.1016/S0304-3835\(02\)00102-7](https://doi.org/10.1016/S0304-3835(02)00102-7).
- [59] S. Tuncel, A. Trivella, D. Atilla, K. Bennis, H. Savoie, F. Albrieux, L. Delort, H. Billard, V. Dubois, V. Ahsen, F. Caldefie-Chézet, C. Richard, R.W. Boyle, S. Ducki, F. Dumoulin, Assessing the dual activity of a chalcone-phthalocyanine conjugate: Design, synthesis, and antivasular and photodynamic properties, *Mol. Pharm.* 10 (2013) 3706–3716.
<https://doi.org/10.1021/MP400207V>.
- [60] T.M. Pereira, F. Vitória, R.C. Amaral, K.P.S. Zanoni, N.Y. Murakami Iha, A.E. Kümmerle, Microwave-assisted synthesis and photophysical studies of novel fluorescent N-acylhydrazone and semicarbazone-7-OH-coumarin dyes, *New J. Chem.* 40 (2016) 8846–8854.
<https://doi.org/10.1039/C6NJ01532H>.
- [61] J.A. Kumar, G. Saidachary, G. Mallesham, B. Sridhar, N. Jain, S.V. Kalivendi, V.J. Rao, B.C. Raju, Synthesis, anticancer activity and photophysical properties of novel substituted 2-oxo-2H-chromenylpyrazolecarboxylates, *Eur. J. Med. Chem.* 65 (2013) 389–402.
<https://doi.org/10.1016/J.EJMECH.2013.03.042>.
- [62] I.E. Orhan, F.S. Senol Deniz, R.E. Salmas, S. Durdagi, F. Epifano, S. Genovese, S. Fiorito, Combined molecular modeling and cholinesterase inhibition studies on some natural and semisynthetic O-alkylcoumarin derivatives, *Bioorg. Chem.* 84 (2019) 355–362.
<https://doi.org/10.1016/J.BIOORG.2018.11.044>.

Κεφάλαιο 5ο

ΣΧΕΔΙΑΣΜΟΣ ΚΑΙ ΣΥΝΘΕΣΗ ΝΕΩΝ
ΔΙΚΟΥΜΑΡΙΝΙΚΩΝ ΑΝΑΛΟΓΩΝ ΜΕ ΧΡΗΣΗ
ΒΑΘΕΩΣ ΕΥΤΗΚΤΙΚΩΝ ΔΙΑΛΥΤΩΝ

5.1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ



5.1.1 Πράσινες προσεγγίσεις στην οργανική σύνθεση





Η «Πράσινη» Χημεία ορίζεται από τον Οργανισμό Προστασίας Περιβάλλοντος ως ο σχεδιασμός χημικών προϊόντων και διαδικασιών που μειώνουν ή/και εξαλείφουν τη χρήση ή την παραγωγή επικίνδυνων ουσιών. Η πράσινη χημεία εισήχθη ως έννοι τον 20ο αιώνα για την ανάπτυξη νέων συνθετικών διαδικασιών, μεθοδολογιών και διεργασιών στον τομέα της χημείας και της χημικής τεχνολογίας ώστε οι συμβατικές υπάρχουσες διαδικασίες και στρατηγικές να αντικατασταθούν από νέες τεχνικές, περισσότερο φιλικές προς περιβάλλον [1,2].

Η Οργανική Χημεία και Σύνθεση βρίσκει εφαρμογή στην παραγωγή ενός μεγάλου φάσματος τεχνολογικών προϊόντων που μπορεί να έχουν οικιακή ή βιομηχανική χρήση, όπως καύσιμα, λιπάσματα, πολυμερή, φάρμακα, καλλυντικά και απορρυπαντικά. Επομένως, λόγω της σπουδαιότητάς της και του ρόλου που έχει στην καθημερινή ζωή, καθίσταται αναγκαία η ανάπτυξη νέων τεχνικών και προσεγγίσεων με εφαρμογή στην Οργανική Χημεία, που θα είναι περισσότερο φιλικές προς το περιβάλλον, αλλά και οικονομικές [3–6].

Ειδικότερα, η εφαρμογή πράσινων προσεγγίσεων στην Οργανική Σύνθεση περιλαμβάνει διάφορες μεθόδους, όπως χρήση εναλλακτικών διαλυτών περισσότερων φιλικών προς το περιβάλλον ή και αποφυγή της χρήση διαλύτη [7], εναλλακτικές πηγές ενέργειας, αντιδράσεις πολλών συστατικών (Multicomponent Reactions, MCR) ή και υψηλής οικονομίας ατόμου (Atom Efficiency, AE) [8,9]. Ο σχεδιασμός φιλικών προς το περιβάλλον διεργασιών και προϊόντων πραγματοποιείται με γνώμονα τις 12 αρχές της πράσινης χημείας, οι οποίες καθιερώθηκαν από τον Paul Anastas και συνοψίζονται στον Πίνακα 5.1 [10].

Πίνακας 5.1 Οι 12 Αρχές της Πράσινης Χημείας.

	1. Πρόληψη αποβλήτων		7. Χρήση ανανεώσιμων πρώτων υλών
	2. Οικονομία ατόμου		8. Μείωση ενδιάμεσων παραγώγων
	3. Λιγότερο επικίνδυνες χημικές συνθέσεις		9. Κατάλυση
	4. Σχεδιασμός ασφαλέστερων χημικών προϊόντων		10. Σχεδιασμός αποικοδομήσιμων προϊόντων

	5. Ασφαλέστεροι διαλύτες και βοηθητικά μέσα		11. Ανάλυση πραγματικού χρόνου για πρόληψη της ρύπανσης
	6. Σχεδιασμός για ενεργειακή αποτελεσματικότητα		12. Ασφαλέστερη χημεία για την πρόληψη ατυχημάτων

Μία από τις προτεινόμενες αρχές στην οποία δίνεται ιδιαίτερη έμφαση στον τομέα της οργανικής σύνθεσης είναι ο περιορισμός της χρήσης διαλυτών ή η χρήση μη τοξικών διαλυτών. Οι συνηθέστερα χρησιμοποιούμενοι διαλύτες είναι οι πτητικές οργανικές ενώσεις (VOCs) που θεωρούνται εξαιρετικά τοξικές παρά της άριστες διαλυτικές ιδιότητές τους (π.χ. ακετόνη, διχλωρομεθάνιο κ.α.). Επομένως, η ελαχιστοποίηση της χρήσης διαλυτών ή η αντικατάστασή τους από άλλους λιγότερο βλαβερούς είναι εξέχουσας σημασίας [2,11,12]. Παραδείγματα πράσινων διαλυτών αποτελούν:

- Το νερό,
- Υπερκρίσιμα υγρά, όπως υπερκρίσιμο διοξείδιο του άνθρακα
- Ιοντικά Υγρά (ΙΥ),
- Βαθέως Ευτηκτικοί Διαλύτες (Deep Eutectic Solvents, DES),
- Φυσικά προϊόντα όπως λιμονένιο, πινένιο, η γλυκερόλη και παράγωγά της,
- Προϊόντα από βιομάζα, όπως η διυδρολεβογλυκοζενόνη [1].

5.1.2 Ιοντικά υγρά (ΙΥ)

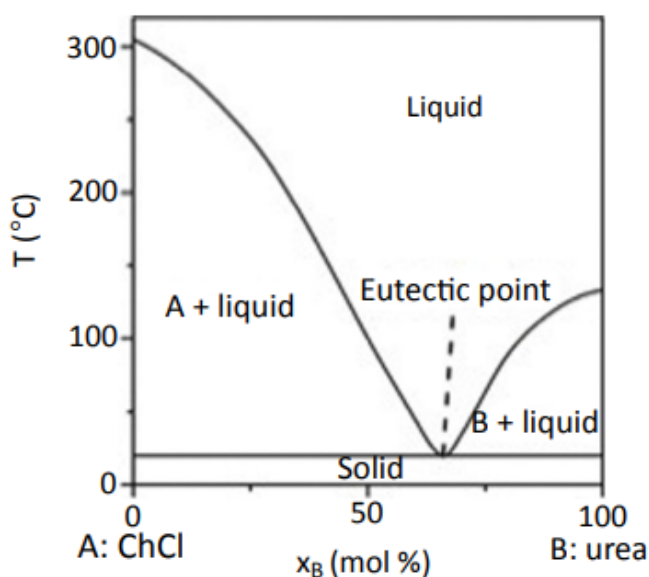
Τις τελευταίες δύο δεκαετίες, τα ιοντικά υγρά χρησιμοποιούνται τόσο σε εργαστηριακό όσο και σε βιομηχανικό επίπεδο, με στόχο την εξάλειψη των επιπτώσεων των κλασικών οργανικών διαλυτών στο περιβάλλον. Συγκεκριμένα, τα ιοντικά υγρά θεωρούνται μία αποδοτική και φιλική προς το περιβάλλον εναλλακτική έναντι της χρήσης οργανικών διαλυτών, ενώ παρουσιάζουν πλεονεκτήματα όπως χημική και θερμική σταθερότητα, μη πτητικότητα κ.α. [13–15]. Τα ΙΥ αποτελούνται κατά κύριο λόγο από οργανικά κατιόντα και από οργανικά ή ανόργανα ανιόντα και βρίσκονται σε υγρή κατάσταση σε χαμηλές θερμοκρασίες (μικρότερες των 100 °C), ακόμη και σε θερμοκρασία περιβάλλοντος σε ορισμένες περιπτώσεις [16,17].

Τα ΙΥ μπορούν να αντικαταστήσουν τόσο διαλύτες όσο και καταλύτες, παρουσιάζοντας υψηλή βιοαποικοδομησιμότητα και χαμηλή τοξικότητα, ενώ είναι πολύ σημαντικό το γεγονός ότι μπορούν να ανακτηθούν και να επαναχρησιμοποιηθούν [18]. Τα ΙΥ βρίσκουν εφαρμογή σε πολλούς τομείς, όπως στην κατάλυση [19] και εκχύλιση [20], το διαχωρισμό μειγμάτων [21] και το σχηματισμό νανοσωματιδίων [22] ενώ πολλές φορές διαθέτουν από μόνα τους

αντιμικροβιακές και αντιμυκητιασικές ιδότητες [23]. Τα τελευταία χρόνια, τα ΙΥ χρησιμοποιούνται ευρέως σε ποικίλες αντιδράσεις οργανικής σύνθεσης κουμαρινών, όπως είναι οι Pechmann [24], Wittig και Knoevenagel [25]. Ακόμη, είναι σημαντικό να αναφερθεί πως τα ιοντικά υγρά έχουν αξιοποιηθεί και χρησιμοποιηθεί ως διαλύτες για τη σύνθεση δικουμαρινικών αναλόγων μέσω αντίδρασης Domino Knoevenagel-Michael [26].

5.1.3 Βαθέως Ευτηκτικοί Διαλύτες (DES)

Οι βαθέως ευτηκτικοί διαλύτες (Deep Eutectic Solvents, DES) αναγνωρίζονται ως μια νέα κατηγορία διαλυτών, αναλόγων των ιοντικών υγρών καθώς παρουσιάζουν αρκετά κοινά χαρακτηριστικά και ιδιότητες, όπως υψηλή θερμοκή σταθερότητα και μη πτητικότητα [27]. Οι DES σχηματίζονται από ευτηκτικά μίγματα ενός δότη δεσμού υδρογόνου (Hydrogen Bond Donor, HBD) και ενός δέκτη (Hydrogen Bond acceptor, HBA) και βασικό χαρακτηριστικό τους είναι ότι το σημείο τήξης τους είναι πολύ χαμηλότερο από αυτά των επιμέρους συστατικών [2]. Πρώτη φορά παρατηρήθηκαν από τους Abbot et al. [28], το 2003, οι οποίοι παρατήρησαν ότι η ανάμειξη χλωριούχου χολίνης (Σ.Τ. 302 °C) και ουρίας (Σ.Τ. 133 °C), οδήγησε στην παρασκευή ενός μίγματος που βρίσκεται σε υγρή κατάσταση σε θερμοκρασία περιβάλλοντος (> 12 °C) (Εικόνα 5.1).

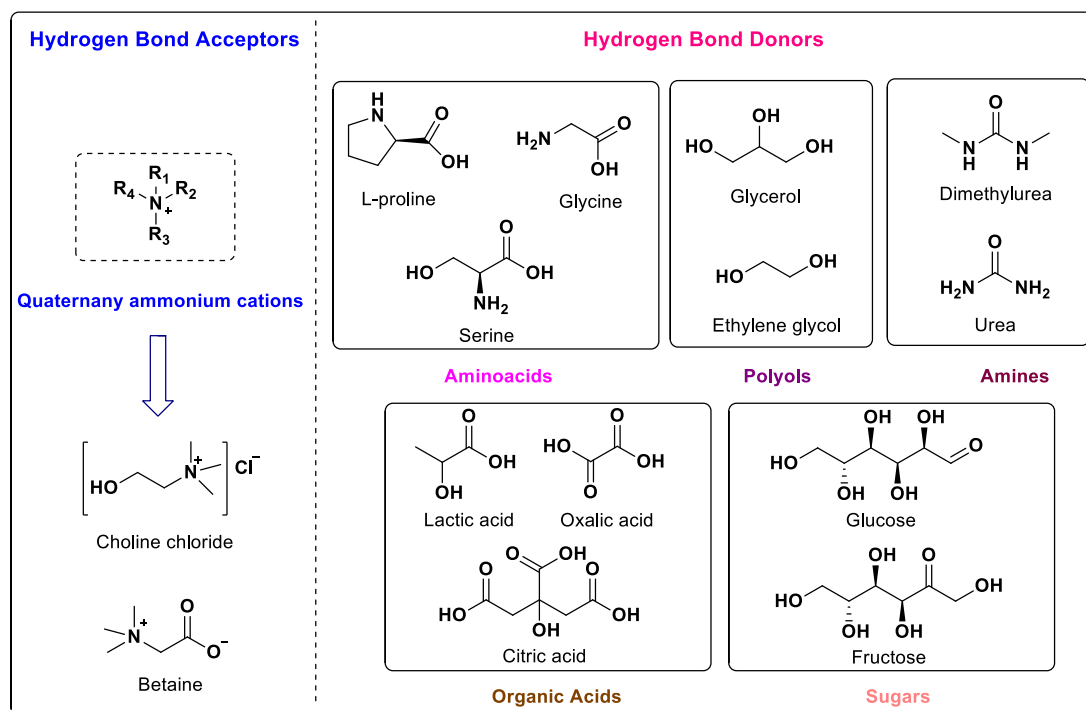


Εικόνα 5.1 Διάγραμμα φάσεων για το ευτηκτικό μίγμα χλωριούχου χολίνης/ουρίας = 1:2 [29].

Οι DES σχηματίζονται συνήθως με απλή ανάμειξη των συστατικών υπό θέρμανση χωρίς να απαιτείται η χρήση κάποιου διαλύτη ή η πραγματοποίηση χημικής αντίδρασης όπως συμβαίνει πολλές φορές για το σχηματισμό των ΙΥ [30]. Ακόμη, για το σχηματισμό των DES μπορεί να χρησιμοποιηθεί μεγάλο εύρος ενώσεων όπως τεταρτοταγή άλατα αμμωνίου, καρβοξυλικά οξέα και αμίνες [31]. Το μεγάλο πλήθος συστατικών που μπορεί να χρησιμοποιηθεί επιτρέπει και το σχηματισμό πολλών διαφορετικών DES και άρα τον κατάλληλο σχεδιασμό τους

για κάθε εφαρμογή [32]. Ειδικότερα, οι DES χρησιμοποιούνται σε εφαρμογές οργανικής σύνθεσης, εκχύλισης, βιοκατάλυσης, ηλεκτροχημείας κ.α. [33]. Για παράδειγμα, διάφορα DES έχουν χρησιμοποιηθεί ως εκχυλιστικά μέσα βιοδραστικών συστατικών από φυτικά είδη, όπως τζίντζερ [34] και πρόπολη [35], έναντι συμβατικών διαλυτών όπως η αιθανόλη.

Ακόμη, *in vivo* μελέτες έχουν επιβεβαιώσει τη χαμηλή τοξικότητά τους, ειδικά όταν προέρχονται από συστατικά φυσικής προέλευσης (Σχήμα 5.1) [36]. Οι βαθέως ευτηκτικοί διαλύτες που προέρχονται από φυσικά συστατικά ονομάζονται NaDES (Natural Deep Eutectic Solvents) [37]. Χαρακτηριστικά παραδείγματα NaDES που συναντάμε στη φύση είναι το μέλι και διάφορα σιρόπια που αποτελούν μίγμα σακχάρων υψηλού ιξώδους [38].



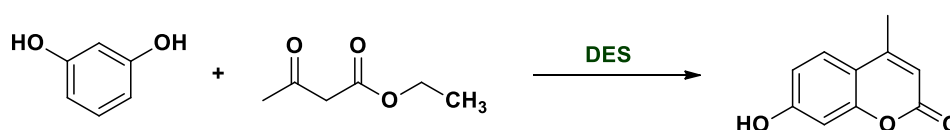
Σχήμα 5.1 Συχνά χρησιμοποιούμενα συστατικά φυσικής προέλευσης για τους NaDES.

Το αυξημένο ιξώδες των βαθέων ευτηκτικών διαλυτών είναι από τις ιδιότητες οι οποίες μπορούν να προκαλέσουν δυσχέρεια στη χρήση τους, ενώ επιφέρουν και μειωμένη αγωγιμότητα. Πολλοί DES παρουσιάζουν αρκετά υψηλό ιξώδες (>100 mPa.s) σε θερμοκρασία δωματίου, το οποίο αποδίδεται στην ύπαρξη ενός εκτεταμένου δικτύου δεσμών 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 με τις οποίες αλληλεπιδρούν τα συστατικά, όπως ηλεκτροστατικές ή δυνάμεις Van der Waals [39,40]. Το πρόβλημα αυτό επιλύεται μερικές φορές με την προσθήκη νερού, εάν αυτό είναι δυνατό [35]. Ωστόσο, το ιξώδες ενός βαθέως ευτηκτικού διαλύτη μπορεί να μειωθεί σημαντικά με την επιλογή των κατάλληλων συστατικών και στη σωστή γραμμομοριακή αναλογία, καθώς DES όπως

μενθόλη/οκτανοϊκό οξύ = 1:3 παρουσιάζουν χαμηλές τιμές ιξώδους (7.61 mPa.s στους 25 °C) [41]. Αντίθετα, DES που σχηματίζονται από σάκχαρα είναι υψηλού ιξώδους [42].

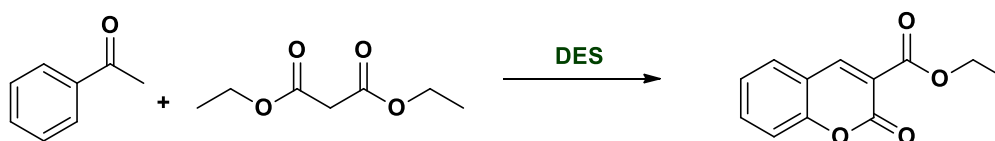
Οι βαθέως ευτηκτικοί διαλύτες χρησιμοποιούνται ευρέως για τη σύνθεση κουμαρινικών αναλόγων σε αντιδράσεις όπως συμπύκνωση Pechmann [43] και αντίδραση Knoevenagel [44,45].

Ειδικότερα, σε μελέτη των Rather et al. [43], εξετάστηκε η χρήση μίας ομάδας διαφορετικών βαθέως ευτηκτικών διαλυτών ως διαλύτες αλλά και καλύτες για την αντίδραση Pechmann. Ως αντίδραση μοντέλο μελετήθηκε η αντίδραση μεταξύ της ρεσορκινόλης και του ακετοξικού αιθυλεστέρα προς παραγωγή της 4-μεθυλοουμπελοφρονής (Σχήμα 5.2). Εξετάστηκαν τόσο διαφορετικές θερμοκρασίες από 60 έως 120 °C, όσο και διαφορετικά DES, μεταξύ των οποίων χλωριούχος χολίνη/γλυκερόλη(1:2), χλωριούχος χολίνη/ουρία(1:2), φρουκτόζη/ουρία(1:2), χλωριούχος χολίνη/γλυκόζη(1:1), κιτρικό οξύ/μαννιτόλη/ουρία(3:2:5) και χλωριούχος χολίνη/τρυγικό οξύ(1:2). Υψηλότερη απόδοση (90%) επιτεύχθηκε με τη χρήση του DES χλωριούχος χολίνη/τρυγικό οξύ = 1:2 στους 110 °C για 8 h, ενώ σημαντικό ρόλο φάνηκε να διαδραματίζει και η ποσότητα του DES που χρησιμοποιείται. Ακόμη, βρέθηκε ότι ο DES μπορεί να επαναχρησιμοποιηθεί έως και 4 φορές χωρίς να μειώνεται σημαντικά η απόδοση της αντίδρασης (81%).



Σχήμα 5.2 Αντίδραση μοντέλο για τη συμπύκνωση Pechmann με τη χρήση DES.

Ακόμη, οι Keshavarzipour και Tavakol [45], ερεύνησαν την πραγματοποίηση της αντίδρασης Knoevenagel μεταξύ διαφορετικών σαλικυλαδεΐδων και ενώσεων που έχουν ενεργή μεθυλενική ομάδα με τη χρήση DES. Πιο συγκεκριμένα, χρησιμοποιήθηκαν DES χλωριούχου χολίνης/χλωριούχου ψευδαργύρου σε διαφορετικές γραμμομοριακές αναλογίες μεταξύ τους, καθώς και DES χλωριούχου χολίνης/χλωριούχου κασσίτερου = 1:1. Υψηλότερη απόδοση (96%) στην αντίδραση μοντέλο μεταξύ της σαλικυλαλδεΐδης και του μηλονικού διαιθυλεστέρα (Σχήμα 5.3) επιτεύχθηκε με τη χρήση DES χλωριούχου χολίνης/χλωριούχου ψευδαργύρου = 1:2, ενώ η θερμοκρασία βελτιστοποιήθηκε στους 80 °C. Τα κουμαρινικά ανάλογα που συντέθηκαν με αυτή τη μέθοδο, συντέθηκαν σε υψηλές αποδόσεις μεταξύ 60 και 97%. Τέλος, βρέθηκε ότι ο DES μπορεί να επαναχρησιμοποιηθεί έως και 4 φορές χωρίς να μειώνεται σημαντικά η απόδοση της αντίδρασης (87%).

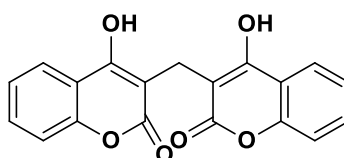


Σχήμα 5.3 Αντίδραση μοντέλο για την αντίδραση Knoevenagel με τη χρήση DES.

5.1.4 Φαρμακευτικό προφίλ δικουμαρινών

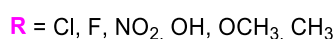
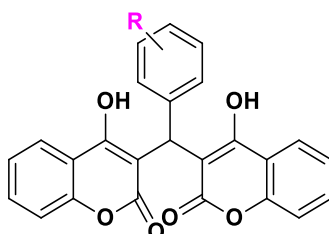
Οι δικουμαρίνες είναι βιολογικά δραστικές φαρμακοφόρες δομές και αποτελούν ένα ιδιαίτερα ενδιαφέρον πεδίο μελέτης για την επιστημονική κοινότητα. Οι δικουμαρίνες έχουν επιδείξει πληθώρα βιολογικών δράσεων όπως είναι η αντιπηκτική [46], αντιοξειδωτική [47], αντιδιαβητική [48] και αντιμυκητιακή [49], καθώς και η ικανότητα αναστολής της ουρεάσης για την πρόληψη ασθενειών όπως η πυελονεφρίτιδα [50]. Ο δικουμαρινικός σκελετός αποτελεί επομένως κατάλληλο δομικό υπόβαθρο για τροποποιήσεις με στόχο τη σύνθεση νέων βιοδραστικών μορφών.

Μία από τις πιο γνωστές δικουμαρίνες είναι η δικουμαρόλη (Σχήμα 5.4), η οποία απομονώθηκε πρώτη φορά το 1940 από το φυτό *Melilotus officinalis* Pall (της οικογένειας Fabaceae) και η οποία χρησιμοποιείται ως αντιπηκτικό σε ασθενείς που πάσχουν από καρδιαγγειακές παθήσεις και θρομβώσεις, λόγω της δομικής ομοιότητάς της με τη βιταμίνη Κ. Ακόμη, έχει παρουσιάσει αξιόλογη αντιμικροβιακή και αντικική δράση, αλλά η χρόνια χρήση της οδηγεί σε παρενέργειες όπως νευροτοξικότητα [46].



Σχήμα 5.4 Χημική δομή δικουμαρόλης.

Σε ερευνητική μελέτη των Simijonović et al. [47], πραγματοποιήθηκε ο σχεδιασμός και η σύνθεση νέων αναλόγων της δικουμαρόλης (Σχήμα 5.5), τα οποία μελετήθηκαν ως προς την ικανότητά τους να αναστέλλουν τη λιπιδική υπεροξειδωση, καθώς και τη δράση της λιποξυγονάσης (LOX) από σόγια ως ένδειξη αντιφλεγμονώδους δράσης. Η πλειοψηφία των δικουμαρινικών αναλόγων παρουσίασε εξαιρετική ανασταλτική ικανότητα της λιπιδικής υπεροξειδωσης (> 84%) στη συγκέντρωση των 100 μM. Ακόμη, τα εξεταζόμενα παράγωγα παρουσίασαν ικανοποιητική ανασταλτική δράση έναντι της LOX, με τιμές IC₅₀ μεταξύ 50 και 100 μM.

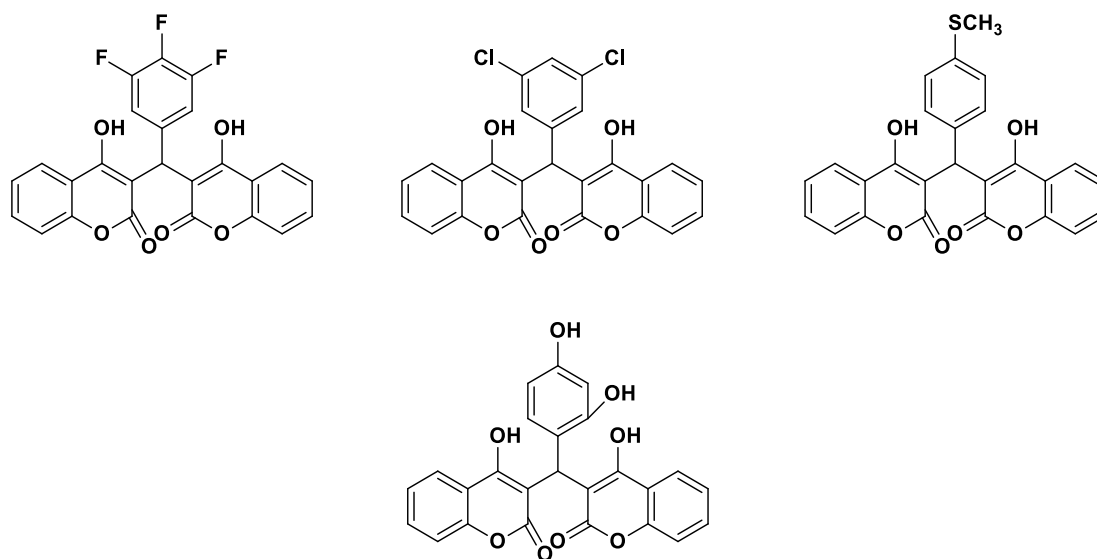


Σχήμα 5.5 Γενική δομή δικουμαρινικών αναλόγων με αντιοξειδωτική δράση και ικανότητα αναστολής της λιποξυγονάσης.

Σε ερευνητική μελέτη των Mahmoodi et al. [51], συντέθηκαν δικουμαρινικά ανάλογα τα οποία μελετήθηκαν για την αντιμικροβιακή τους δράση, έναντι των

αρνητικών κατά Gram *Pseudomonas aeruginosa* και *Escherichia coli* και των θετικών κατά Gram *Micrococcus luteus* και *Staphylococcus aureus*. Είναι σημαντικό ότι η παρουσία αλογόνων φαίνεται να οδήγησε σε αύξηση της δράσης ενώ ορισμένα ανάλογα παρουσίασαν υψηλότερη δράση και από το πρότυπο, την κεφοταξίμη. Επιπλέον, η αντιμικροβιακή δράση των δικουμαρινών επιβεβαιώθηκε και σε μελέτη των Hamdi et al. [52], έναντι των *Propionibacterium acnes* (ATCC 11827), *Staphylococcus epidermidis* (ATCC 12228) και *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538).

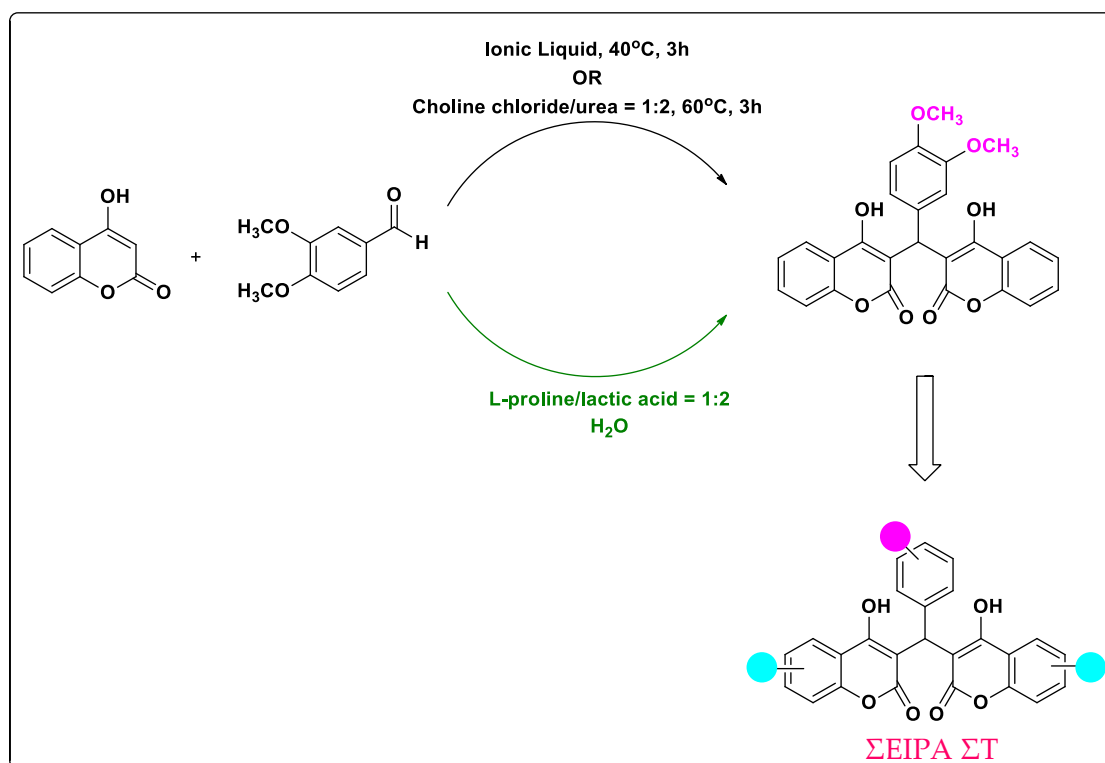
Τέλος, στην ερευνητική εργασία των Sui et al. [53], συντέθηκαν διαφορετικές σειρές κουμαρινικών αναλόγων, μεταξύ των οποίων και δικουμαρίνες και εξετάστηκαν ως προς την αντιμικροβιακή και κυτταροτοξική τους δράση (Σχήμα 5.6). Είναι αξιοσημείωτο ότι κατά τη μελέτη αντιμικροβιακής δράσης έναντι διαφορετικών στελεχών του *Staphylococcus aureus*, μόνο τα δικουμαρινικά ανάλογα παρουσίασαν αντιμικροβιακή δράση, ενώ αυτά τα οποία φέρουν αλογόνο στη δομή τους, παρουσίασαν τη βέλτιστη δράση. Ακόμη, κατά τη μελέτη κυτταροτοξικότητας έναντι των καρκινικών σειρών αδενοκαρκινώματος (HuTu80 και 4T1) και παγκρέατος (PANC1), βρέθηκε εκ νέου ότι οι δικουμαρίνες παρουσιάζουν την ισχυρότερη δράση με τιμές IC_{50} μεταξύ 18.78 και 32.63 $\mu\text{g/mL}$ έναντι 45.85-65.62 $\mu\text{g/mL}$ που παρουσίασε το πρότυπο, καρβοπλατίνη.



Σχήμα 5.6 Χημική δομή δικουμαρινικών αναλόγων με αξιολογημένη αντιμικροβιακή και κυτταροτοξική δράση.

5.2 ΣΚΟΠΟΣ

Ο σχεδιασμός και η σύνθεση των νέων δικουμαρινικών αναλόγων της Σειράς ΣΤ στηρίχθηκε σε μόρια οδηγούς που έχουν συντεθεί στο Εργαστήριο Οργανικής Χημείας ΕΜΠ και έχουν επιδείξει αξιόλογη βιολογική δράση και πιο συγκεκριμένα, αντιμυκητιασική έναντι του *Candida albicans* [49]. Ακόμη, η σύνθεση δικουμαρινών μέσω της αντίδρασης Domino Michael-Κnoevenagel έχει μελετηθεί ευρέως με τη χρήση πολλών διαλυτών, όπως τολουόλιο, αιθανόλη, νερό, αλλά ακόμη και με τη χρήση πράσινων διαλυτών όπως Ιοντικά Υγρά και Βαθέως Ευτηκτικοί Διαλύτες. Σε αυτό το πλαίσιο, η σύνθεση δικουμαρινικών αναλόγων έχει ήδη επιτευχθεί από την ερευνητική ομάδα του ΕΟΧ ΕΜΠ σε προηγούμενες ερευνητικές εργασίες είτε με τη χρήση Ιοντικών Υγρών στους 40 °C για 3 h είτε χρησιμοποιώντας το Βαθέως Ευτηκτικό Διαλύτη χλωριούχος χολίνη/ουρία = 1:2 στους 60 °C για 3 h [54]. Στηριζόμενοι στη συνθετική πορεία που έχει ήδη αναπτυχθεί στο Εργαστήριο Οργανικής Χημείας ΕΜΠ, οδηγηθήκαμε στη σύνθεση νέων δικουμαρινικών αναλόγων μέσω της χρήσης του φυσικού Βαθέως Ευτηκτικού Διαλύτη L-προλίνη/γαλακτικό οξύ = 1:2 και νερού (Σχήμα 5.7).

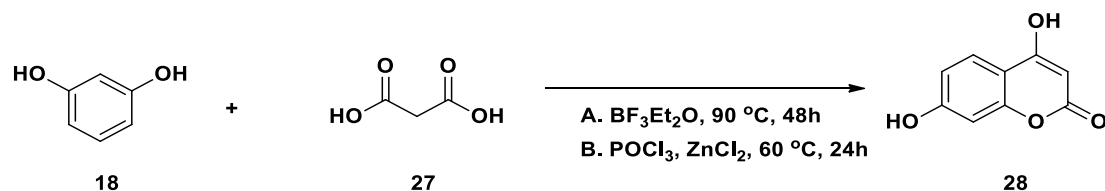


Σχήμα 5.7 Σχεδιασμός κουμαρινικών αναλόγων Σειράς ΣΤ.

5.3 ΣΧΕΔΙΑΣΜΟΣ ΤΩΝ ΝΕΩΝ ΚΟΥΜΑΡΙΝΙΚΩΝ ΑΝΑΛΟΓΩΝ

Για να επιτευχθεί σύνθεση των νέων δικουμαρινικών αναλόγων που θα φέρουν διαφορετικούς υποκαταστάτες στον κουμαρινικό σκελετό, αρχικά πραγματοποιήθηκε η σύνθεση των 6- ή 7- υποκατεστημένων 4-υδροξυ-κουμαρινών **28**, **30a** και **30b** (Σχήματα 5.8 & 5.9).

➤ Σύνθεση της 4,7-διυδροξυ-κουμαρίνης (**28**)



Σχήμα 5.8 Συνθετική πορεία 4,7-διυδροξυ-κουμαρίνης (**28**).

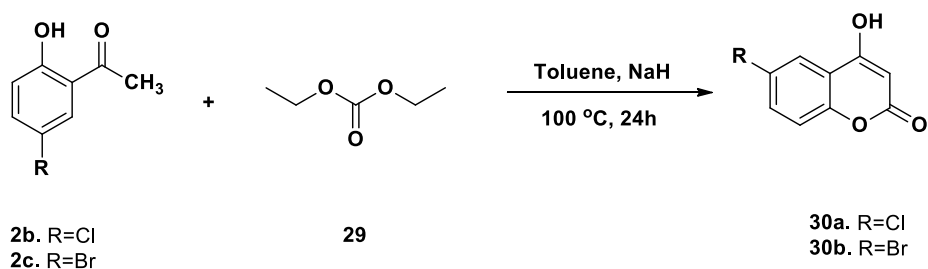
Για τη σύνθεση της 4,7-διυδροξυ-κουμαρίνης εξετάστηκαν δύο εναλλακτικές συνθετικές πορείες (Σχήμα 5.8). Κατά τη Μέθοδο Α χρησιμοποιείται σύμπλοκο τριφθοριούχου βορίου-διαιθυλαιθέρα στους 90 °C, ενώ κατά τη Μέθοδο Β χρησιμοποιούνται οξυχλωριούχος φωσφόρος και χλωριούχος ψευδάργυρος στους 60 °C (Πίνακας 5.2).

Πίνακας 5.2 Μελέτη εναλλακτικών συνθηκών αντίδρασης σύνθεσης της 4,7-διυδροξυ-κουμαρίνης (**28**).

Μέθοδος	Ρεσορκινόλη (eq)	Μηλονικό οξύ (eq)	Συνθήκες	Απόδοση (%)
A	1	3	BF ₃ Et ₂ O, 90 °C, 48 h	78
B	1	1	POCl ₃ , ZnCl ₂ , 60 °C, 24 h	50

Παρατηρείται ότι υψηλότερη απόδοση επιτυγχάνεται με την Μέθοδο Α, η οποία φέρει επίσης περισσότερο πράσινο χαρακτήρα, λόγω της χρήσης του BF₃Et₂O έναντι του τοξικού POCl₃ και επομένως επιλέχθηκε ως βέλτιστη μέθοδος.

➤ Σύνθεση των 6-υποκατεστημένων-4-υδροξυ-κουμαρινών (**30a-30b**)

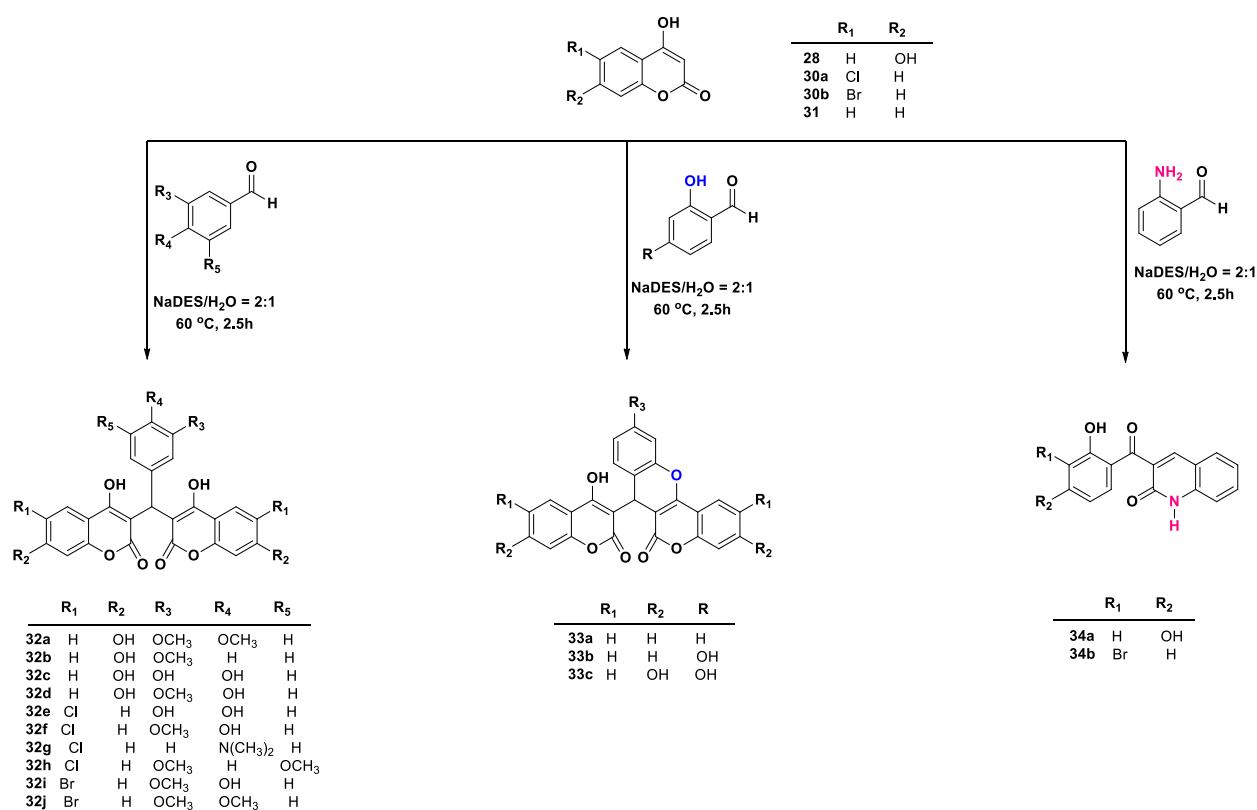


Σχήμα 5.9 Συνθετική πορεία των 6-υποκατεστημένων-4-υδροξυ-κουμαρινών **30a-30b**.

Η σύνθεση των 6-υποκατεστημένων-4-υδροξυ-κουμαρινών (**30a-30b**) πραγματοποιήθηκε μέσω αντίδρασης μεταξύ μίας κατάλληλα υποκατεστημένης 2-υδροξυ-ακετοφαινόνης και του ανθρακικού διαιθυλεστέρα, παρουσία περίσσειας υδριδίου του νατρίου και τολουολίου ως διαλύτη (Σχήμα 5.9).

➤ Σύνθεση των νέων αναλόγων της Σειράς ΣΤ

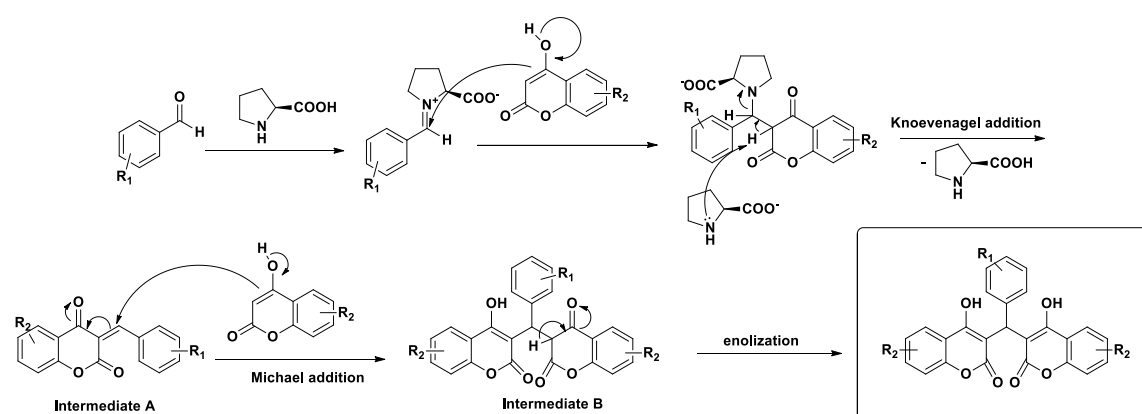
Η σύνθεση των νέων δικουμαρινικών αναλόγων **32a-32j** πραγματοποιήθηκε μέσω αντίδρασης Domino Knoevenagel-Michael μεταξύ μιας κατάλληλα υποκατεστημένης βενζαλδεΐδης και μιας υποκατεστημένης 4-υδροξυ-κουμαρίνης (**28**, **30a-30b**) παρουσία του βαθέως ευτηκτικού διαλύτη (NaDES) L-προλίνη/γαλακτικό οξύ = 1:2 και νερού σε αναλογία 2:1 (w/w) στους 60 °C για 2.5 h (Σχήμα 5.10). Ωστόσο, στην περίπτωση χρήσης σαλικυλαδεΐδων παρατηρήθηκε ότι η αντίδραση οδήγησε στη σύνθεση βενζοπυρανοκουμαρινών (**33a-33c**). Ενδιαφέρουσα παρατήρηση αποτέλεσε επίσης ότι η αντίδραση μεταξύ των υποκατεστημένων 4-υδροξυ-κουμαρινών και της 2-αμινο-βενζαλδεΐδης υπό τις ίδιες συνθήκες οδήγησε στο σχηματισμό νέων κινολινονικών αναλόγων (**34a-34b**). Η συγκεκριμένη συνθετική πορεία, παρουσιάζεται για πρώτη φορά στη βιβλιογραφία.



Σχήμα 5.10 Σύνθεση των νέων κουμαρινικών και κινολινονικών αναλόγων της Σειράς ΣΤ.

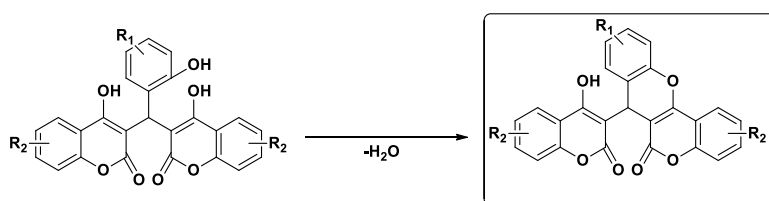
Μηχανισμός σύνθεσης δικουμαρινών

Ο μηχανισμός σύνθεσης των νέων δικουμαρινικών αναλόγων μέσω αντίδρασης Domino Knoevenagel-Michael, με τη χρήση του Φυσικού Βαθέως Ευτηκτικού Διαλύτη L-προλίνη/γαλακτικό οξύ = 1:2 παρουσιάζεται στο Σχήμα 5.11. Η προλίνη αποτελεί πολύ σημαντικό οργανοκαταλύτη που χρησιμοποιείται συχνά στην αντίδραση Knoevenagel, ενώ έχει χαμηλό κόστος [2]. Πιο συγκεκριμένα, η προλίνη καταλύει την αντίδραση μέσω του σχηματισμού εναμίνης με το καρβονύλιο της αλδεΐδης. Στη συνέχεια, πραγματοποιείται συμπύκνωση Knoevenagel προς το σχηματισμό του ασταθούς α,β ακόρεστου ενδιάμεσου προϊόντος, **A**. Στη συνέχεια, η προσθήκη Michael οδηγεί στο σχηματισμό του ενδιάμεσου **B**. Τέλος, το ενδιάμεσο **B** υπόκειται σε ταυτομερισμό της ενόλης, σχηματίζοντας το τελικό επιθυμητό προϊόν.



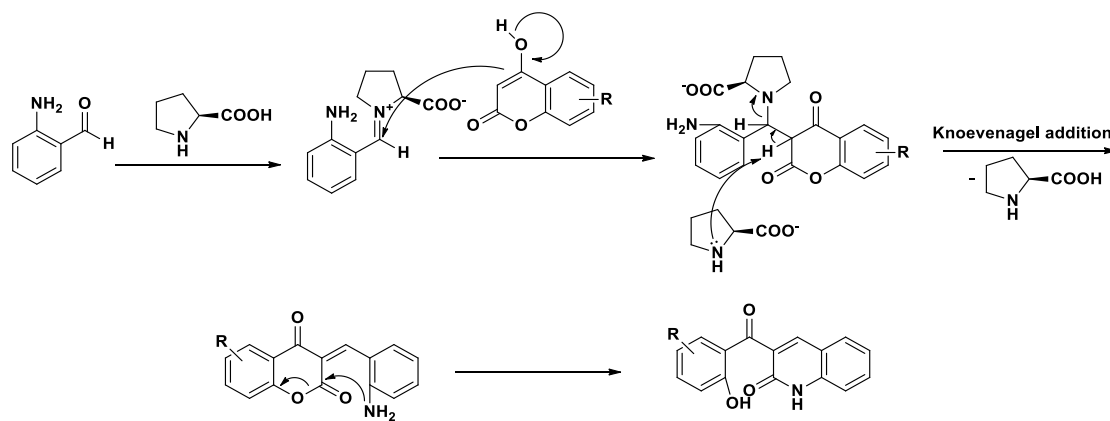
Σχήμα 5.11 Μηχανισμός Domino Knoevenagel-Michael για τη σύνθεση των δικουμαρινικών αναλόγων.

Στην περίπτωση χρήσης σαλικυλαλδεΐδων, η διαφορά στο μηχανισμό που οδηγεί στη σύνθεση των βενζοπυρανοκουμαρινών **33a-33c**, έγκειται στο τελευταίο βήμα όπου πραγματοποιείται συμπύκνωση του προϊόντος (Σχήμα 5.12).



Σχήμα 5.12 Μηχανισμός Domino Knoevenagel-Michael για τη σύνθεση των βενζοπυρανοκουμαρινών.

Ο μηχανισμός σύνθεσης των νέων κινολινονών **34a-34b**, ξεκινά εκ νέου με το σχηματισμό εναμίνης μεταξύ της βενζαλδεΐδης και της προλίνης και συνεχίζει με τη συμπύκνωση Knoevenagel, ενώ στο τέλος πραγματοποιείται ο σχηματισμός λακτάμης (Σχήμα 5.13).



Σχήμα 5.13 Μηχανισμός σύνθεσης κινολινονών.

5.4 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ-ΣΥΖΗΤΗΣΗ

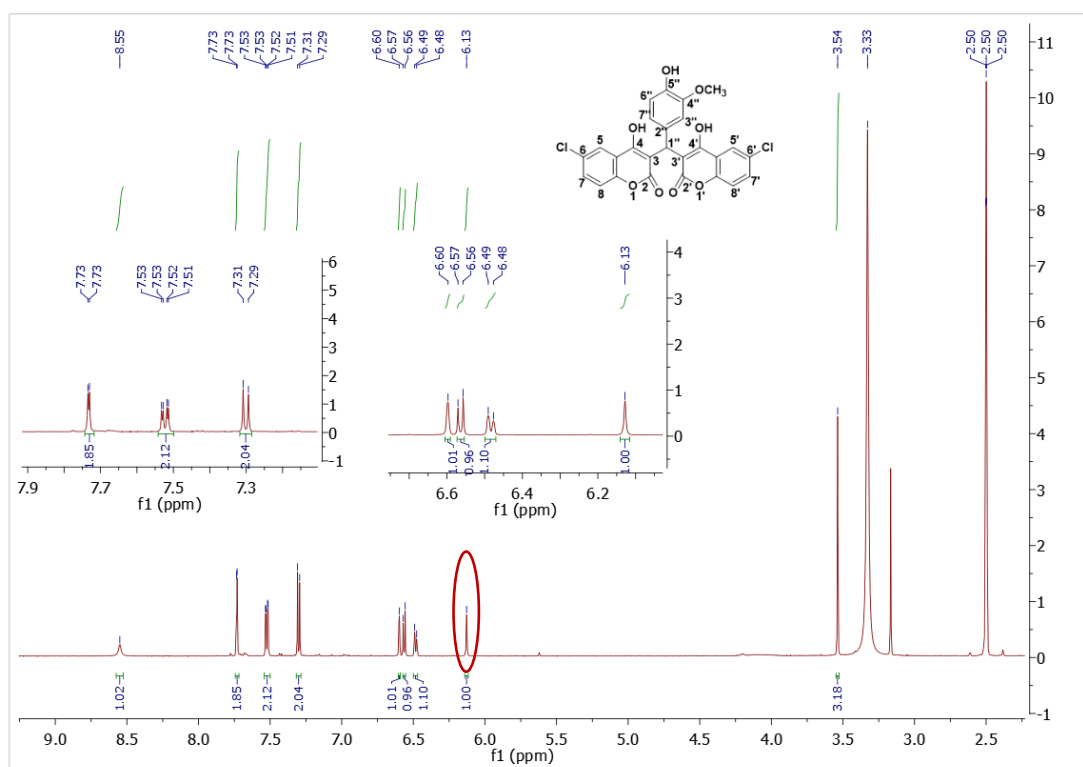
5.4.1 Σύνθεση των νέων δικουμαρινικών αναλόγων

Δέκα νέα δικουμαρινικά ανάλογα (**32a-32j**) συντέθηκαν μέσω αντίδρασης Domino Knoevenagel-Michael χρησιμοποιώντας το Βαθέως Ευτηκτικό Διαλύτη L-προλίνη/γαλακτικό οξύ = 1:2 και νερό σε αναλογία 2:1 (w/w) και παραλήφθηκαν σε υψηλή καθαρότητα μέσω καθαρισμού με μεθανόλη εν θερμώ ή μέσω χρωματογραφίας στήλης σε ικανοποιητικές αποδόσεις μεταξύ 50-95%. Είναι σημαντικό ότι η συγκεκριμένη αντίδραση χαρακτηρίζεται από υψηλή οικονομία ατόμου, το οποίο προσδίδει ακόμη περισσότερο πράσινο χαρακτήρα στην εξεταζόμενη συνθετική πορεία. Ακόμη, είναι αξιοσημείωτο ότι η χρήση σαλικυλαλδεΰδων οδήγησε στη σύνθεση τριών βενζοπυρανοκουμαρινικών αναλόγων (**33a-33c**), σε αποδόσεις μεταξύ 40-95%, ενώ η χρήση της 2-αμινοβενζαλδεΰδης οδήγησε στη σύνθεση δύο νέων κινολινονικών παραγώγων (**34a-34b**) σε χαμηλές αποδόσεις (30-40%), όπως βρέθηκε έπειτα από διερεύνηση με φασματοσκοπία ^1H και ^{13}C NMR, καθώς και δύο διαστάσεων (2D NMR), αλλά και φασματομετρίας μάζας υψηλής ανάλυσης (HR-MS). Η σύνθεση των νέων κινολινονικών παραγώγων μέσω της συγκεκριμένης μεθόδου δεν αναφέρεται μέχρι στιγμής στην υπάρχουσα βιβλιογραφία.

5.4.2 Φασματοσκοπική μελέτη των νέων δικουμαρινικών και κινολινονικών αναλόγων

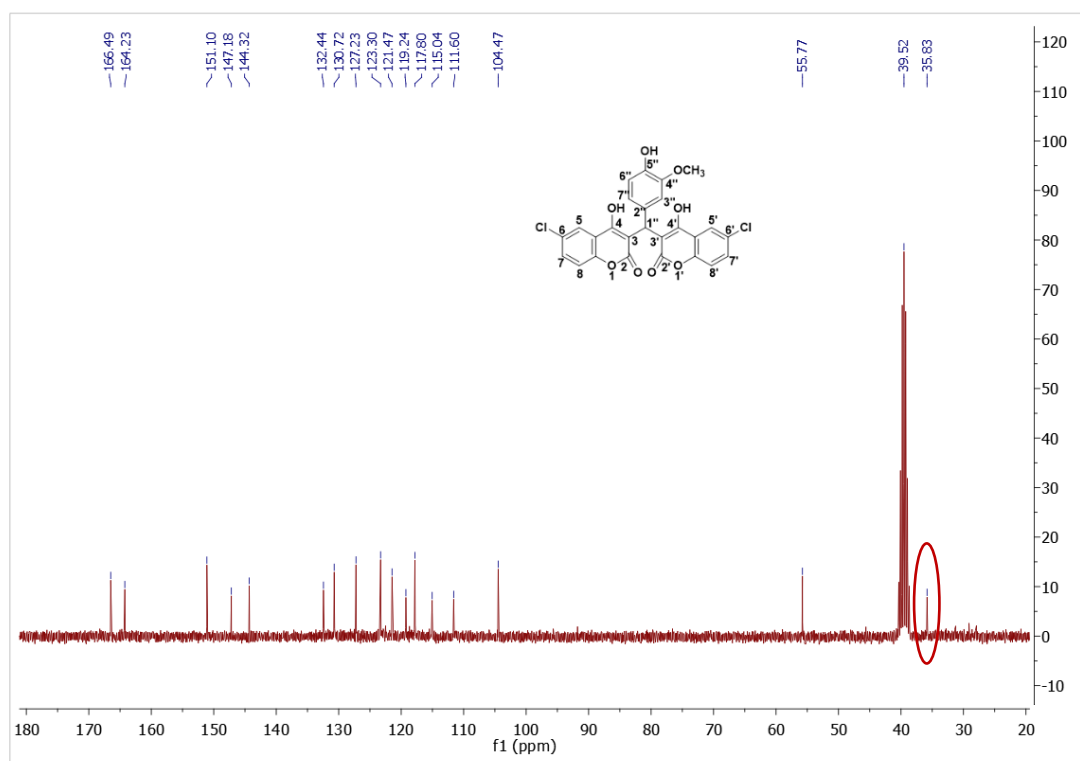
I) Ταυτοποίηση φασματικών κορυφών της ένωσης **32f**

Αρχικά, παρουσιάζεται η φασματοσκοπική μελέτη ^1H και ^{13}C NMR της δικουμαρίνης **32f** (Εικόνες 5.2 & 5.3).



Εικόνα 5.2 Φάσμα ¹H NMR της 3,3'-(4-υδροξυ-5-μεθοξυ-φαινυλομεθυλενο)-δι-(4-υδροξυ-6-χλωρο-2H-βενζοπυραν-2-όνης) (**32f**).

Το φάσμα ¹H NMR της **32f** (Εικόνα 5.2) χαρακτηρίζεται από την παρουσία μιας απλής κορυφής σε δ_H 3.54 ppm που ολοκληρώνεται για τρία πρωτόνια και αποδίδεται στα τρία ισοδύναμα πρωτόνια της μεθοξυ-ομάδας. Στη συνέχεια, σε δ_H 6.13 ppm εμφανίζεται μια απλή κορυφή, η οποία αποδίδεται στο πρωτόνιο H-1'' και σηματοδοτεί το σχηματισμό της δικουμαρίνης. Σε δ_H 6.48 ppm εμφανίζεται μία διπλή κορυφή, η οποία ολοκληρώνεται για ένα πρωτόνιο και αποδίδεται στο H-7'' και σε δ_H 6.56 ppm εμφανίζεται μια διπλή κορυφή, η οποία επίσης ολοκληρώνεται για ένα πρωτόνιο και αποδίδεται στο H-6''. Σε δ_H 6.59 ppm εμφανίζεται μία απλή κορυφή, η οποία αποδίδεται στο πρωτόνιο H-3'', ενώ σε δ_H 7.30 ppm εμφανίζεται μια διπλή κορυφή με $J = 8.4$ Hz, η οποία ολοκληρώνεται για δύο πρωτόνια, τα H-8 και H-8' αντίστοιχα. Έπειτα, σε δ_H 7.52 ppm εμφανίζεται μία διπλή διπλών κορυφή με $J = 8.4$ Hz και $J = 2.4$ Hz, η οποία ολοκληρώνεται για δύο πρωτόνια, τα H-7 και H-7'. Τέλος, σε δ_H 7.73 ppm παρουσιάζεται μία διπλή κορυφή, η οποία ολοκληρώνεται για δύο πρωτόνια, τα H-5 και H-5' αντίστοιχα, ενώ σε δ_H 8.55 ppm εμφανίζεται μία απλή κορυφή, η οποία ολοκληρώνεται για ένα πρωτόνιο και αντιστοιχεί στο υδροξύλιο (OH) της θέσης 5'' του φαινολικού δακτυλίου.

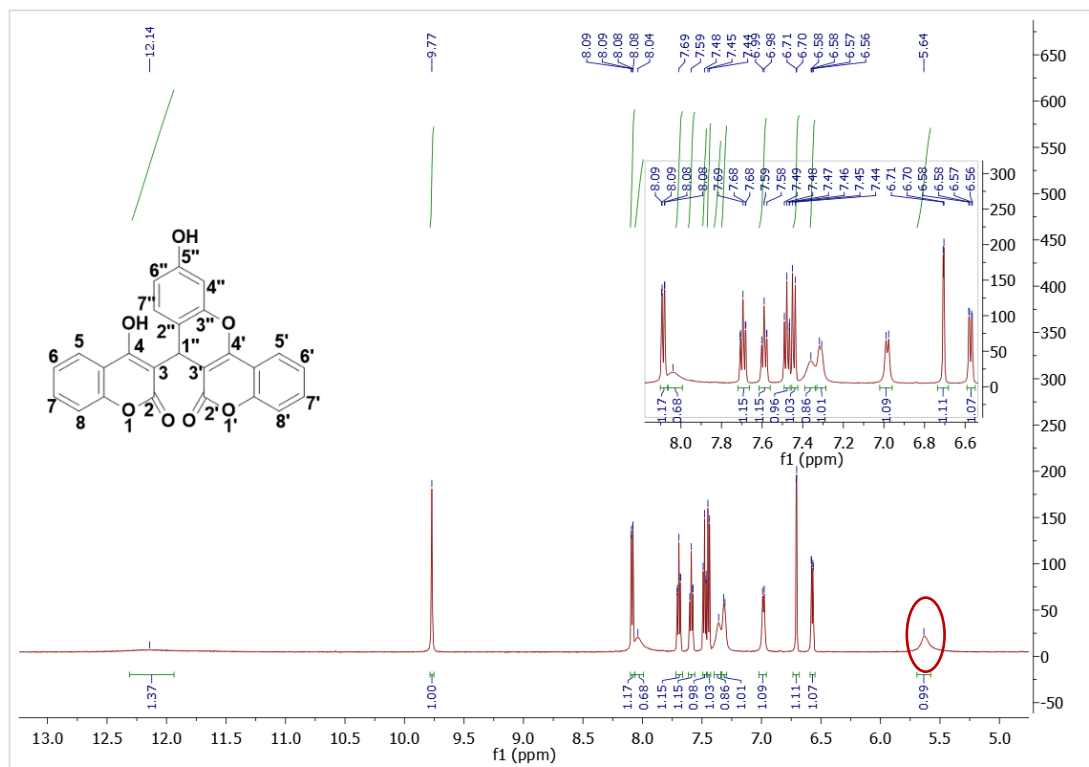


Εικόνα 5.3 Φάσμα ^{13}C NMR της 3,3'-(4-υδροξυ-5-μεθοξυ-φαινυλομεθυλενο)-δι-(4-υδροξυ-6-χλωρο-2H-βενζοπυραν-2-όνης) (**32f**).

Στο φάσμα ^{13}C NMR της **32f** (Εικόνα 5.3), παρατηρούνται μεταξύ 166.49 ppm και 144.32 ppm πέντε κορυφές οι οποίες αποδίδονται στους περισσότερους αποθωρακισμένους άνθρακες και πιο συγκεκριμένα στους άνθρακες των καρβονυλίων, καθώς και στους άνθρακες των θέσεων 8a & 8a', 4 & 4' και 5''. Ακόμη, χαρακτηριστικές είναι οι κορυφές που παρουσιάζονται σε δε 55.77 και 35.83 ppm και αποδίδονται στους άνθρακες της μεθοξυ-ομάδας και της θέσης 1'', αντίστοιχα.

II) Ταυτοποίηση φασματικών κορυφών της ένωσης **33b**

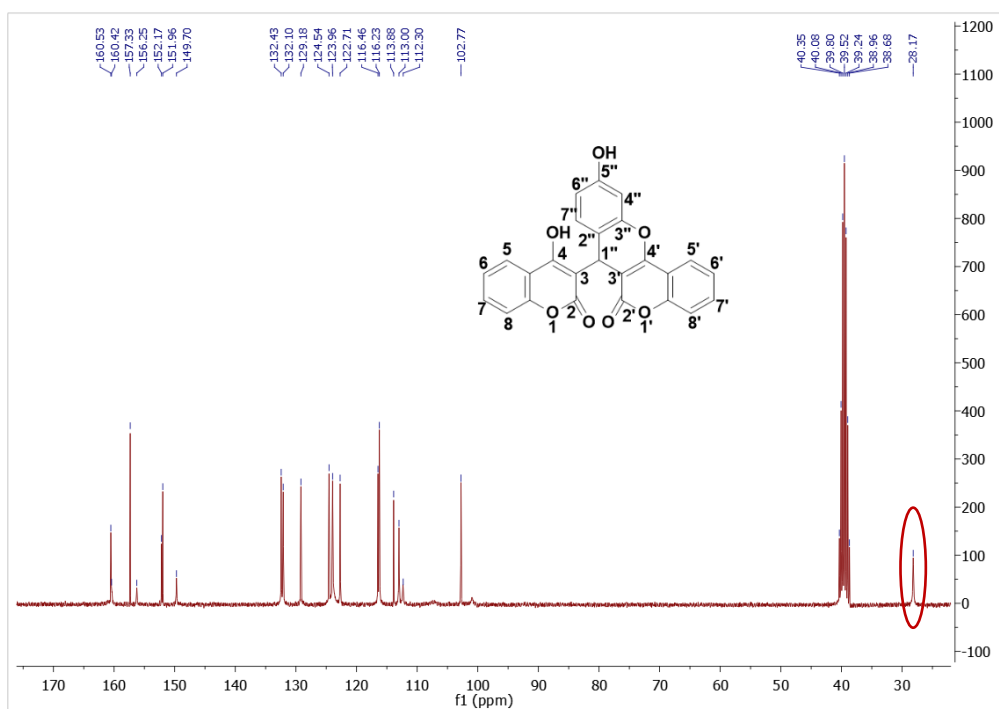
Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκε πλήρης φασματοσκοπική μελέτη ^1H και ^{13}C NMR καθώς και NMR δύο διαστάσεων (2D) της 10-υδροξυ-7-(4-υδροξυ-2-οξο-2H-χρωμεν-3-υλ)χρωμενο[4,3-b]χρωμεν-6(7H)-όνης (**33b**) με στόχο την ταυτοποίηση της δομής της. Αρχικά, παρουσιάζεται το φάσμα ^1H NMR της **33b** (Εικόνα 5.4).



Εικόνα 5.4 Φάσμα ¹H NMR της 10-υδροξυ-7-(4-υδροξυ-2-οξο-2*H*-χρωμεν-3-υλ)χρωμενο[4,3-*b*]χρωμεν-6(7*H*)-όνης (**33b**).

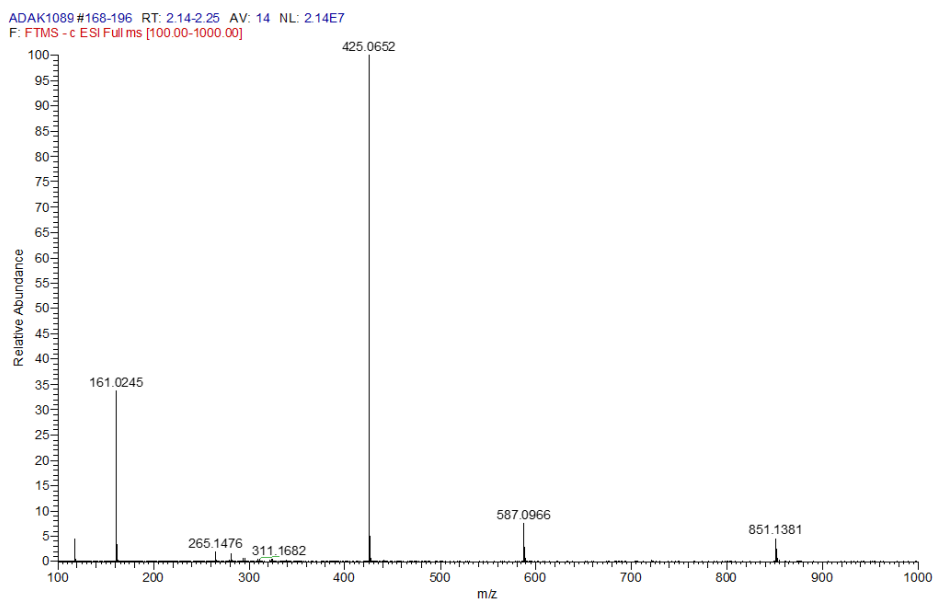
Στο φάσμα ¹H NMR της **33b** (Εικόνα 5.4) αρχικά παρατηρείται μία ευρεία κορυφή σε δ_H 5.64 ppm η οποία αποδίδεται στο H-1'' και είναι ενδεικτική του σχηματισμού της δικουμαρίνης. Ακολουθεί μία διπλή διπλών κορυφή σε δ_H 6.58 ppm η οποία αποδίδεται στο H-6'', μία διπλή κορυφή σε δ_H 6.71 ppm που αποδίδεται στο H-4'', καθώς και μία διπλή κορυφή σε δ_C 6.99 ppm η οποία αποδίδεται στο H-7''. Ωστόσο, παρατηρείται ότι τα πρωτόνια του κουμαρινικού σκελετού που αναμένονταν να εμφανιστούν ανά ζεύγη σε μία κορυφή ως χημικά ισοδύναμα, H-5 & H-5', H-6 & H-6', H-7 & H-7', H-8 & H-8', εμφανίζονται σε διακριτές κορυφές μεταξύ 7.44 και 8.09 ppm, το οποίο οδήγησε στην υπόθεση σύνθεσης της βενζοπυρανοκουμαρίνης **33b**. Τέλος, σε δ_H 9.77 ppm εμφανίζεται μία απλή κορυφή που αποδίδεται στην ομάδα υδροξυλίου της θέσης 5'', ενώ σε δ_H 12.14 ppm εμφανίζεται μία ευρεία κορυφή που πιθανώς αποδίδεται στο υδροξύλιο της θέσης 4.

Στη συνέχεια παρουσιάζεται το φάσμα ¹³C NMR της 10-υδροξυ-7-(4-υδροξυ-2-οξο-2*H*-χρωμεν-3-υλ)χρωμενο[4,3-*b*]χρωμεν-6(7*H*)-όνης **33b** (Εικόνα 5.5).



Εικόνα 5.5 Φάσμα ^{13}C NMR της 3,3'-(4-υδροξυ-5-μεθοξυ-φαινυλομεθυλενο)-δι-(4-υδροξυ-6-χλωρο-2H-βενζοπυραν-2-όνης) (**33b**).

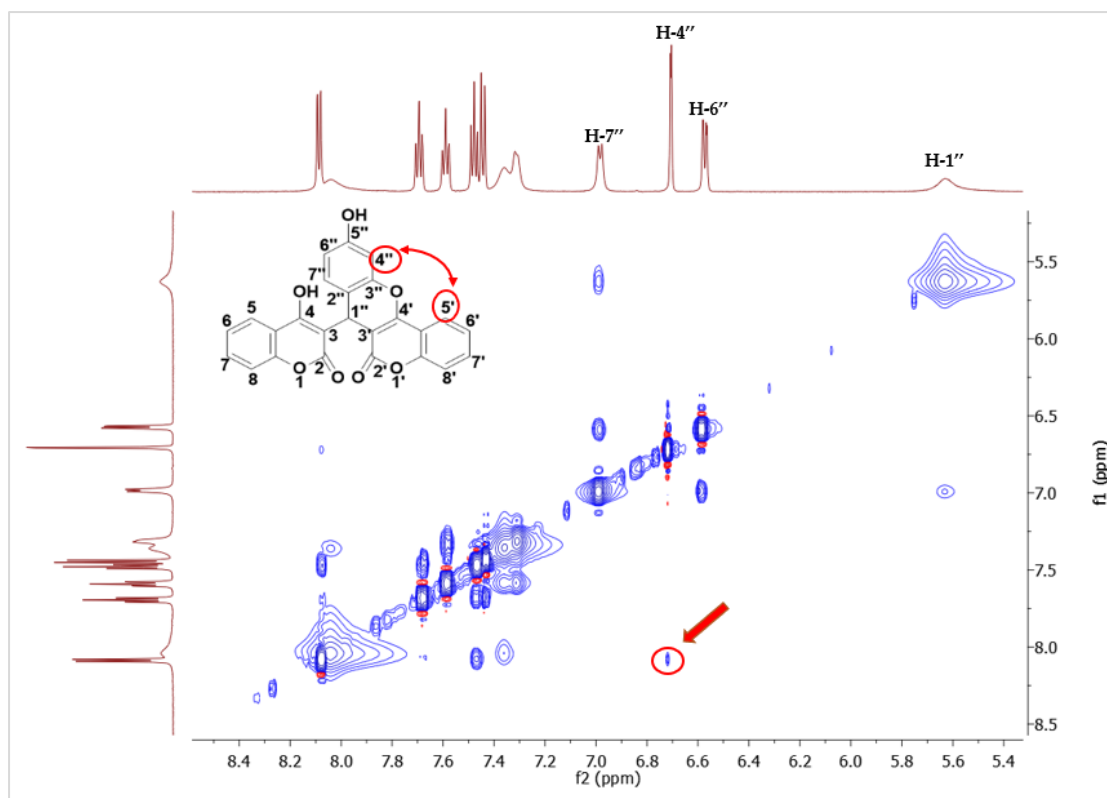
Στο φάσμα ^{13}C NMR της **33b** (Εικόνα 5.5), σε δ_c 28.17 ppm παρουσιάζεται η χαρακτηριστική κορυφή του άνθρακα της θέσης 1'' που υποδεικνύει το σχηματισμό της δικουμαρίνης. Ωστόσο, η εκ νέου παρατήρηση ότι οι άνθρακες του κουμαρινικού σκελετού που αναμένονταν να εμφανίζονται σε κοινή κορυφή, δεν είναι πλέον χημικά ισοδύναμοι, οδήγησε στη μελέτη του προϊόντος **33b** μέσω φασματομετρίας μάζας υψηλής ανάλυσης (HR-MS) προκειμένου να διερευνηθεί η υπόθεση εάν το προϊόν αποτελεί συμπυκνωμένη βενζοπυρανοκουμαρίνη (Εικόνα 5.6).



Εικόνα 5.6 Φάσμα HRMS (ESI) του μορίου **33b**.

Από το παραπάνω φάσμα, παρατηρείται ότι το κύριο μοριακό ιόν έχει λόγο m/z 425.0652 το οποίο αντιστοιχεί στο συντακτικό τύπο $C_{25}H_{13}O_7$ με θεωρητικό λόγο m/z 425.0740 και συνεπώς επιβεβαιώνει τη σύνθεση του δικουμαρινικού αναλόγου στη συμπυκνωμένη του μορφή (**33b**).

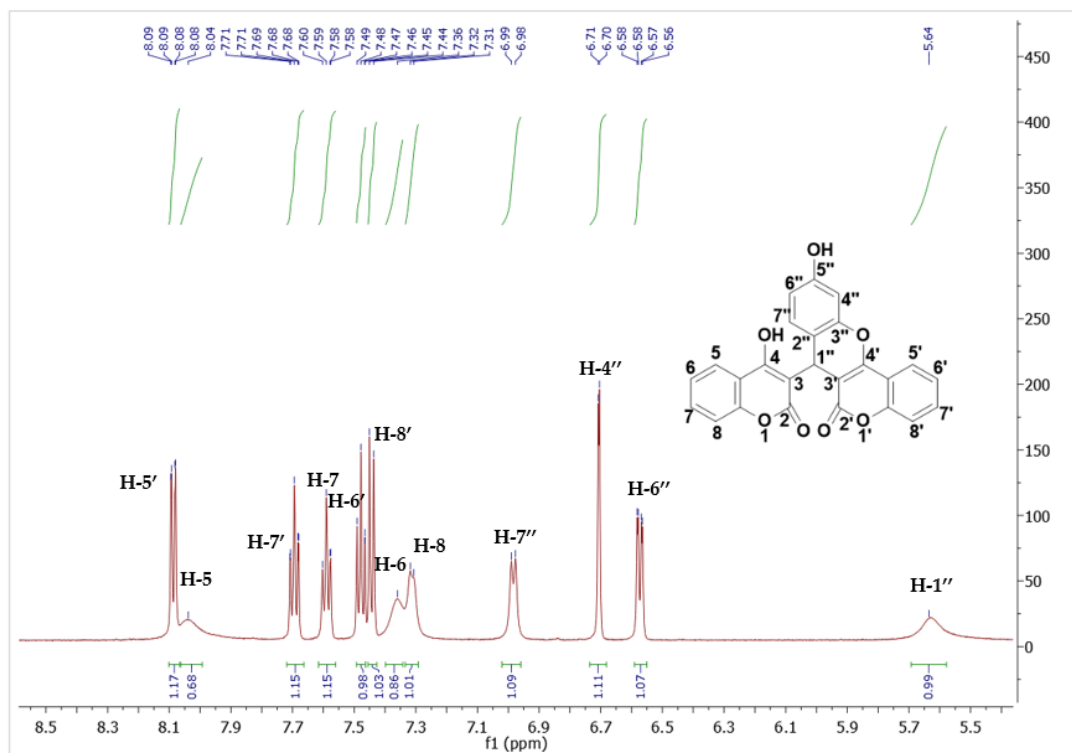
Η φασματοσκοπική μελέτη 1H NMR οδήγησε στην ταυτοποίηση των κορυφών που αντιστοιχούν στα πρωτόνια H-4'', H-6'' και H-7''. Προκειμένου να πραγματοποιηθεί πλήρης ταυτοποίηση της δομής της **33b**, ακολούθησε φασματοσκοπική μελέτη NMR δύο διαστάσεων (NMR 2D). Η φασματοσκοπία 2D 1H - 1H NOESY (Nuclear Overhauser enhancement spectroscopy), ανέδειξε τους συσχετισμούς μεταξύ πρωτονίων που γειτνιάζουν χωρικά (Εικόνα 5.7).



Εικόνα 5.7 Φάσμα 2D ¹H-¹H NOESY NMR της 3,3'-(4-υδροξυ-5-μεθοξυφαινυλομεθυλενο)-δι-(4-υδροξυ-6-χλωρο-2H-βενζοπυραν-2-όνης) (**33b**).

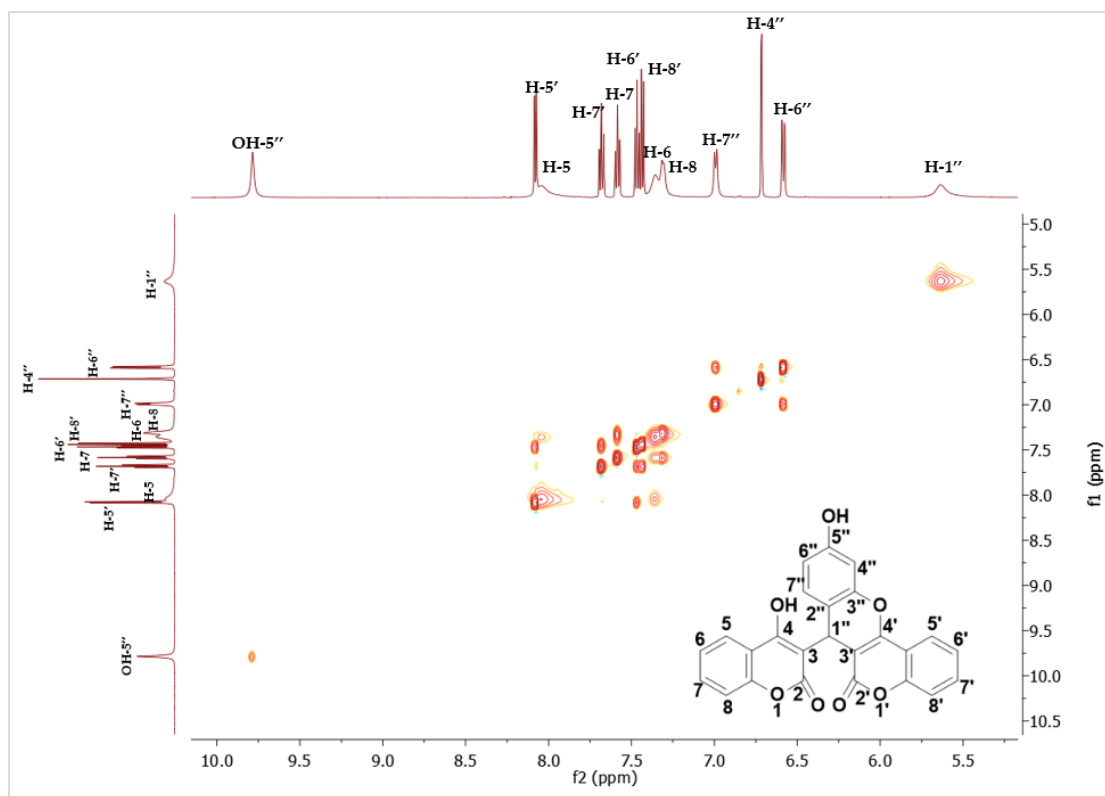
Στο φάσμα NOESY της **33b** (Εικόνα 5.7) παρουσιάζονται αλληλεπιδράσεις στο χώρο μεταξύ των πρωτονίων του μορίου, με κυριότερη την αλληλεπίδραση του πρωτονίου H-4'' (6.71 ppm) με το πρωτόνιο που συντονίζεται σε διπλή κορυφή σε δ_H 8.08 ppm. Η αλληλεπίδραση αυτή υποδεικνύει ότι σε δ_H 8.08 ppm εμφανίζεται το πρωτόνιο της θέσης 5' που βρίσκεται πιο κοντά στο χώρο οδηγώντας στην ταυτοποίησή του.

Ακόμη, η παρατήρηση αυτή μας επιτρέπει να δημιουργήσουμε μία υπόθεση εργασίας για την απόδοση των πρωτονίων της **33b** στο φάσμα ¹H NMR, η οποία παρουσιάζεται στην Εικόνα 5.8 και θα επιβεβαιωθεί στη συνέχεια μέσω του ομοπυρηνικού φάσματος 2D ¹H-¹H TOCSY καθώς και μέσω των ετεροπυρηνικών φασμάτων 2D ¹H-¹³C HSQC και 2D ¹H-¹³C HMBC.



Εικόνα 5.8 Απόδοση των κορυφών στο φάσμα ¹H NMR της 3,3'-(4-υδροξυ-5-μεθοξυ-φαινυλομεθυλενο)-δι-(4-υδροξυ-6-χλωρο-2H-βενζοπυραν-2-όνης) (**33b**).

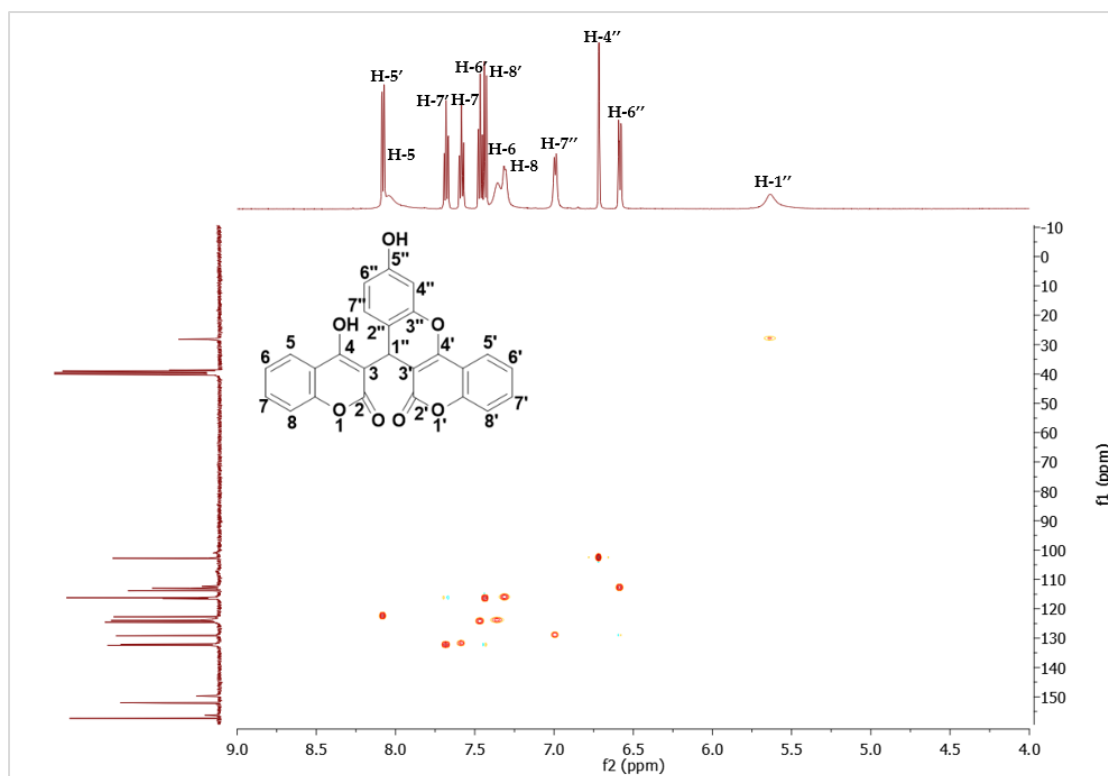
Ακολουθεί το φάσμα 2D ¹H-¹H TOCSY (Total Correlation Spectroscopy) της **33b** στο οποίο καταγράφονται συσχετισμοί μεταξύ πρωτονίων που βρίσκονται στο ίδιο spin σύστημα (Εικόνα 5.9).



Εικόνα 5.9 Φάσμα 2D ^1H - ^1H TOCSY NMR της 3,3'-(4-υδροξυ-5-μεθοξυφαιτυλομεθυλενο)-δι-(4-υδροξυ-6-χλωρο-2H-βενζοπυραν-2-όνης) (**33b**).

Από το φάσμα TOCSY της **33b** (Εικόνα 5.9) επιβεβαιώνουμε τόσο την αποτίμηση των πρωτονίων των θέσεων 6'' και 7'', όσο και ότι οι κορυφές που παρουσιάζονται σε δ_{H} 8.04, 7.36, 7.59 και 7.32 ppm ανήκουν σε πρωτόνια που βρίσκονται στον ίδιο αρωματικό δακτύλιο και συγκεκριμένα στις θέσεις 5-8, αντίστοιχα. Ακόμη, επιβεβαιώνεται ότι τα πρωτόνια που παρουσιάζονται σε δ_{H} 8.08, 7.48, 7.69 και 7.45 ppm ανήκουν στον ίδιο δακτύλιο (θέσεις 5'-8'). Επιπλέον έχοντας ταυτοποιήσει το H-5' (δ_{H} 8.08-d) ακολουθώντας τους συσχετισμούς TOCSY ταυτοποιούνται περαιτέρω τα πρωτόνια H-6' (δ_{H} 7.48-t), H-7' (δ_{H} 7.69-t) και H-8' (δ_{H} 7.45-d). Προκειμένου να ταυτοποιηθούν τα πρωτόνια του άλλου δακτυλίου διενεργήθηκαν οι μελέτες ετεροπυρηνικής φασματοσκοπίας που παρουσιάζονται στη συνέχεια.

Στην Εικόνα 5.10 παρουσιάζεται το φάσμα του ^1H - ^{13}C HSQC (Hetero-nuclear Single Quantum Coherence) της **33b**, από το οποίο λαμβάνουμε συσχετισμούς μεταξύ ατόμων πρωτονίου και των άμεσα συνδεδεμένων ατόμων άνθρακα.



Εικόνα 5.10 Φάσμα ^1H - ^{13}C HSQC NMR της 3,3'-(4-υδροξυ-5-μεθοξυφαινυλομεθυλενο)-δι-(4-υδροξυ-6-χλωρο-2H-βενζοπυραν-2-όνης) (**33b**).

Μέσω της φασματοσκοπίας HSQC επιτεύχθηκε η συσχέτιση μεταξύ των πρωτονίων με τον αντίστοιχο άνθρακα με τον οποίο συνδέονται ομοιοπολικά (Πίνακας 5.3), ενώ το φάσμα ^1H - ^{13}C HMBC καθοδήγησε την ταυτοποίηση των πρωτονίων H-5, H-6, H-7 και H-8 όπως θα αναλυθεί στη συνέχεια.

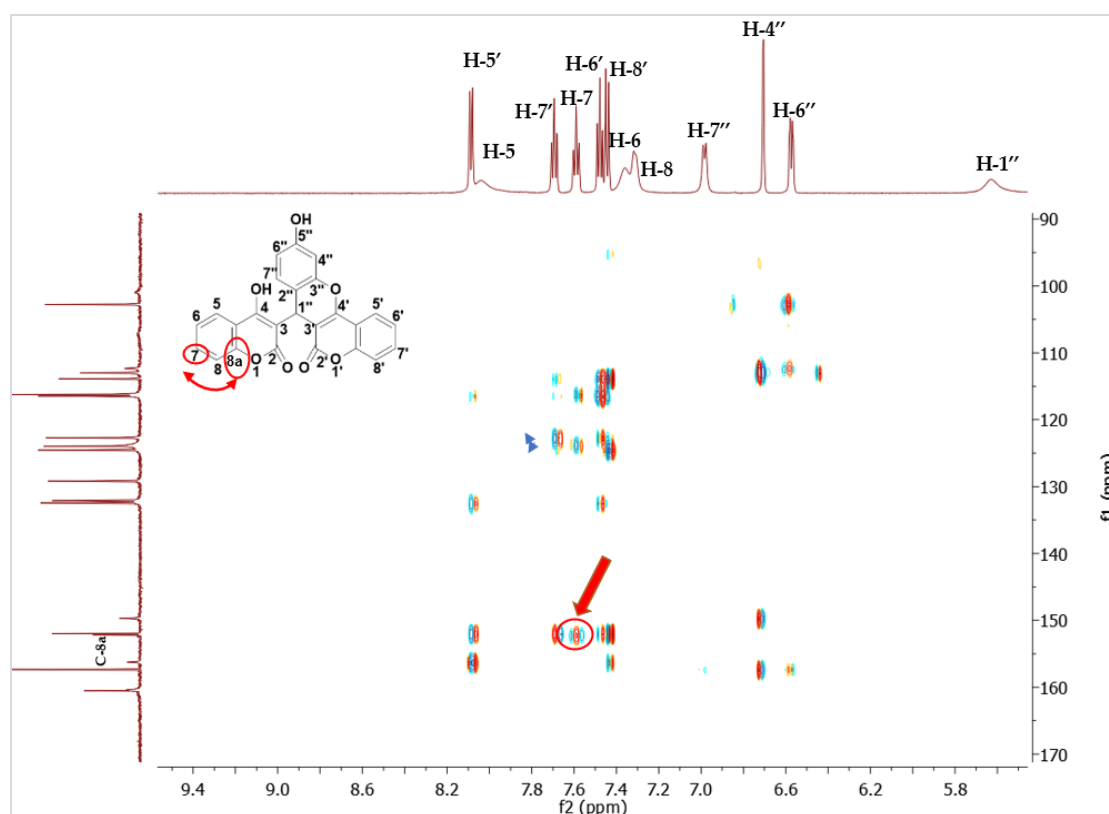
Πίνακας 5.3 Ταυτοποίηση ατόμων πρωτονίου και άνθρακα της ένωσης **33b**.

Πρωτόνιο	^1H (ppm)	^{13}C (ppm)
H-1''	5.64 (br)	28.17
H-6''	6.58 (dd)	113.00
H-4''	6.71 (d)	102.77
H-7''	6.99 (d)	129.18
H-8	7.32 (br)	116.23
H-6	7.36 (br)	123.96
H-8'	7.45 (d)	116.46
H-6'	7.48 (t)	124.54
H-7	7.59 (t)	132.10

H-7'	7.69 (t)	132.43
H-5	8.04 (br)	n.d.
H-5'	8.08 (d)	122.71
OH-5''	9.77 (s)	157.36

n.d.: not determined (δε μπόρεσε να προσδιοριστεί)

Η φασματοσκοπία HMBC (Heteronuclear Multiple Bond Correlation), η οποία δείχνει συσχετισμούς μεταξύ πρωτονίων και ανθράκων έως και τέσσερις δεσμούς μακριά, χρησιμοποιήθηκε προκειμένου να επιτευχθεί η ταυτοποίηση των πρωτονίων των θέσεων 5-8, ενώ επιπλέον επιβεβαίωσε την αποτίμηση των υπόλοιπων πρωτονίων της ένωσης (Εικόνα 5.11).

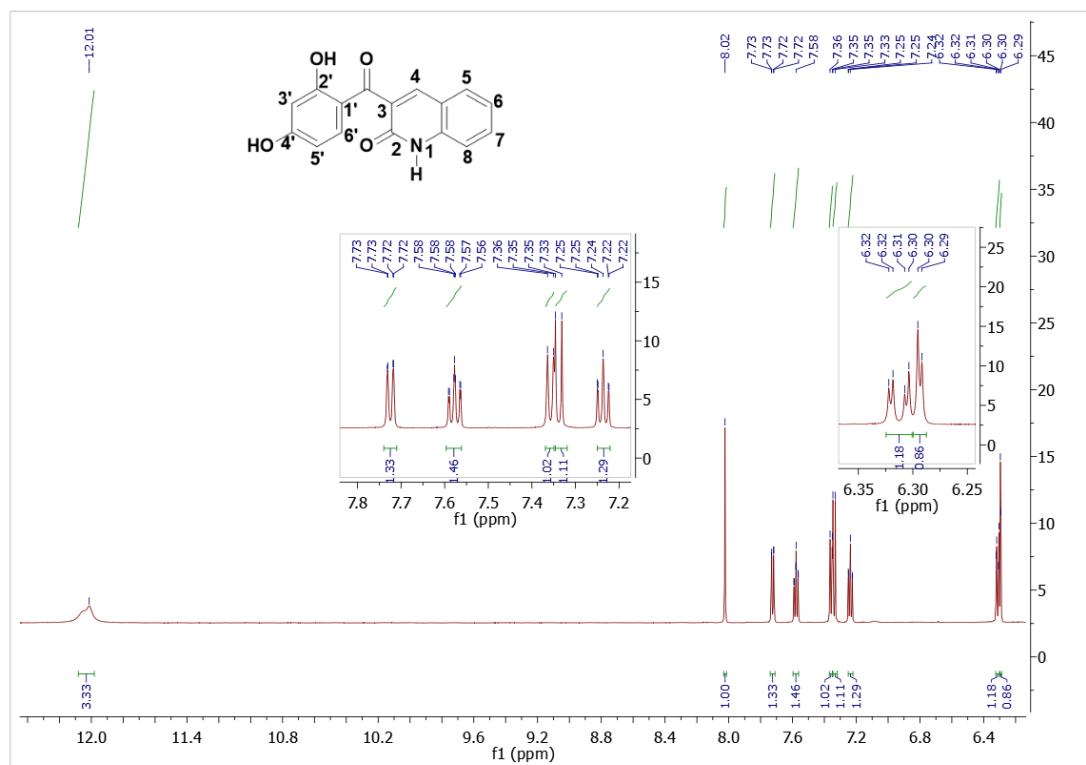


Εικόνα 5.11 Φάσμα ^1H - ^{13}C HMBC NMR της 3,3'-(4-υδροξυ-5-μεθοξυφαινυλομεθυλενο)-δι-(4-υδροξυ-6-χλωρο-2H-βενζοπυραν-2-όνης) (**33b**).

Το φάσμα HMBC υπέδειξε αρκετές αλληλεπιδράσεις μεταξύ των οποίων η αλληλεπίδραση μεταξύ του πρωτονίου που εμφανίζεται σε τριπλή κορυφή σε δH 7.59 ppm καθώς και του αποπροστατευμένου άνθρακα που εμφανίζεται σε δC 152.17 ppm. Η παρατήρηση αυτή οδηγεί στο συμπέρασμα ότι μεταξύ των πρωτονίων H-6 ή H-7 που θα μπορούσαν να εμφανίζονται ως τριπλή κορυφή, η κορυφή σε δH 7.59 ppm αποδίδεται στο H-7, καθώς βρίσκεται τρεις δεσμούς μακριά από τον αποπροστατευμένο άνθρακα της θέσης **8a**. Περαιτέρω, η μελέτη των συσχετίσεων TOCSY επιβεβαιώνει την απόδοση των πρωτονίων του φάσματος ^1H NMR και την ταυτοποίηση της δομής της **33b**.

III) Ταυτοποίηση φασματικών κορυφών της ένωσης **34a**

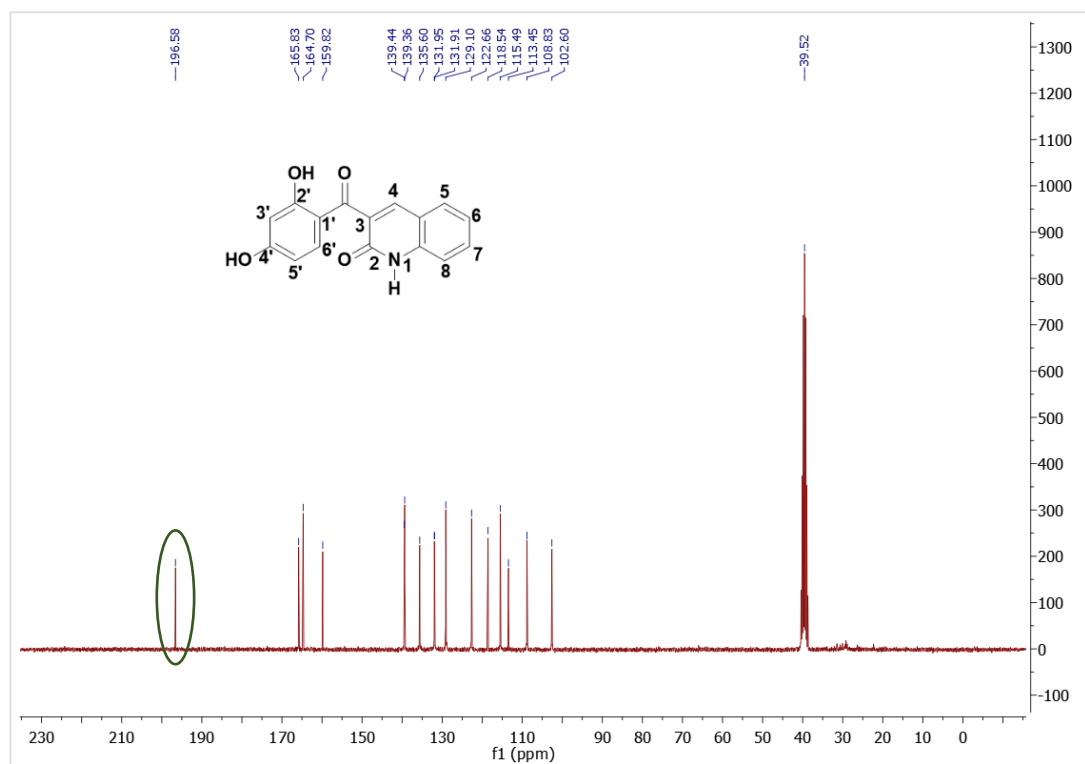
Τέλος, παρουσιάζεται πλήρης φασματοσκοπική μελέτη της ένωσης 3-(2,4-διυδροξυβενζοϊλ)κινολινόνη (**34a**) με στόχο την ταυτοποίηση της δομής της. Αρχικά, παρουσιάζονται τα φάσματα ^1H και ^{13}C NMR της **34a**, τα οποία υποδεικνύουν το σχηματισμό της (Εικόνες 5.12 & 5.13).



Εικόνα 5.12 Φάσμα ^1H NMR της 3-(2,4-διυδροξυβενζοϊλ)κινολινόνης (**34a**).

Αρχικά, σε δ_{H} 6.29 ppm παρατηρείται μία διπλή κορυφή ($J = 1.8$ Hz) που ολοκληρώνεται για ένα πρωτόνιο και αποδίδεται στο H-3', ενώ ακολουθεί μία διπλή διπλών κορυφή σε δ_{H} 6.31 ppm. Στη συνέχεια, εμφανίζεται μία τριπλή κορυφή σε δ_{H} 7.24 ppm, ενώ ακολουθούν δύο διπλές κορυφές σε δ_{H} 7.35 ppm και 7.36 ppm. Σε δ_{H} 7.58 ppm παρουσιάζεται μία τριπλή διπλών κορυφή, ενώ σε δ_{H} 7.72 ppm εμφανίζεται μία διπλή διπλών κορυφή. Σε δ_{H} 8.02 ppm εμφανίζεται η χαρακτηριστική απλή κορυφή του πρωτονίου της θέσης 4, ενώ τέλος, σε δ_{H} 12.07 ppm παρατηρείται μια ευρεία κορυφή που ολοκληρώνεται για τρία πρωτόνια, αυτά των υδροξυλομάδων καθώς και της αμιδομάδας.

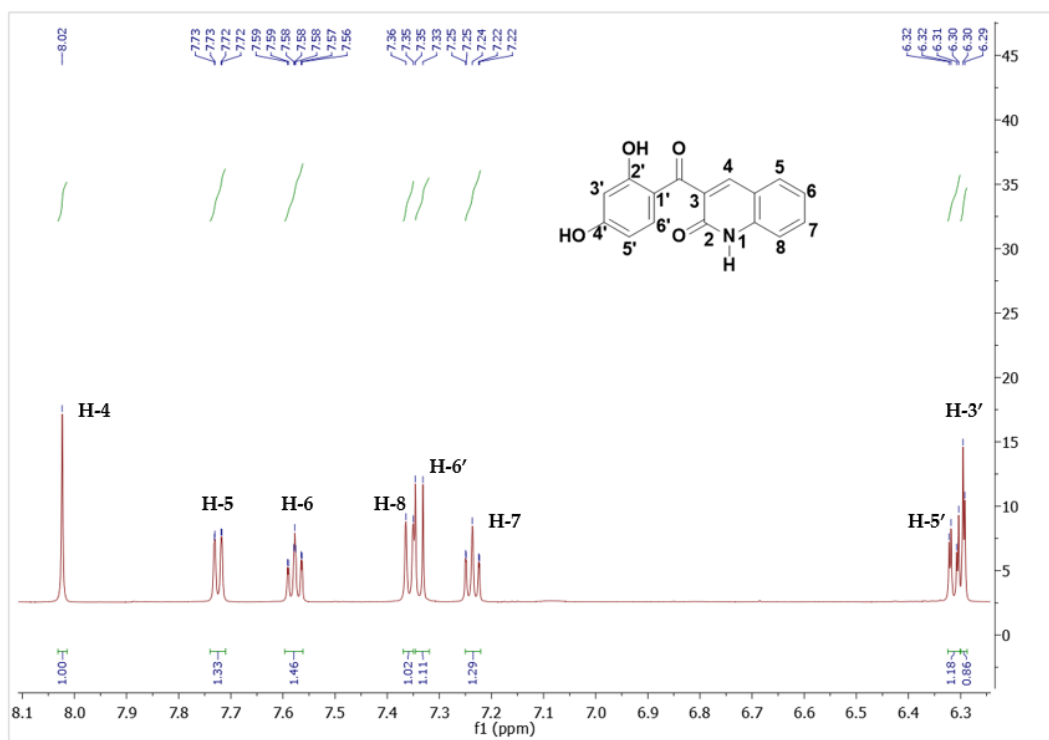
Η αποτίμηση των υπόλοιπων κορυφών στο φάσμα ^1H NMR της **34a**, θα πραγματοποιηθεί με τη βοήθεια φασματοσκοπίας ^{13}C NMR καθώς και NMR δύο διαστάσεων (2D) στη συνέχεια. Το φάσματα ^{13}C NMR της **34a** παρουσιάζεται στην Εικόνα 5.13.



Εικόνα 5.13 Φάσμα ^{13}C NMR της 3-(2,4-διυδροξυβενζοϋλ)κινολινόνης (**34a**).

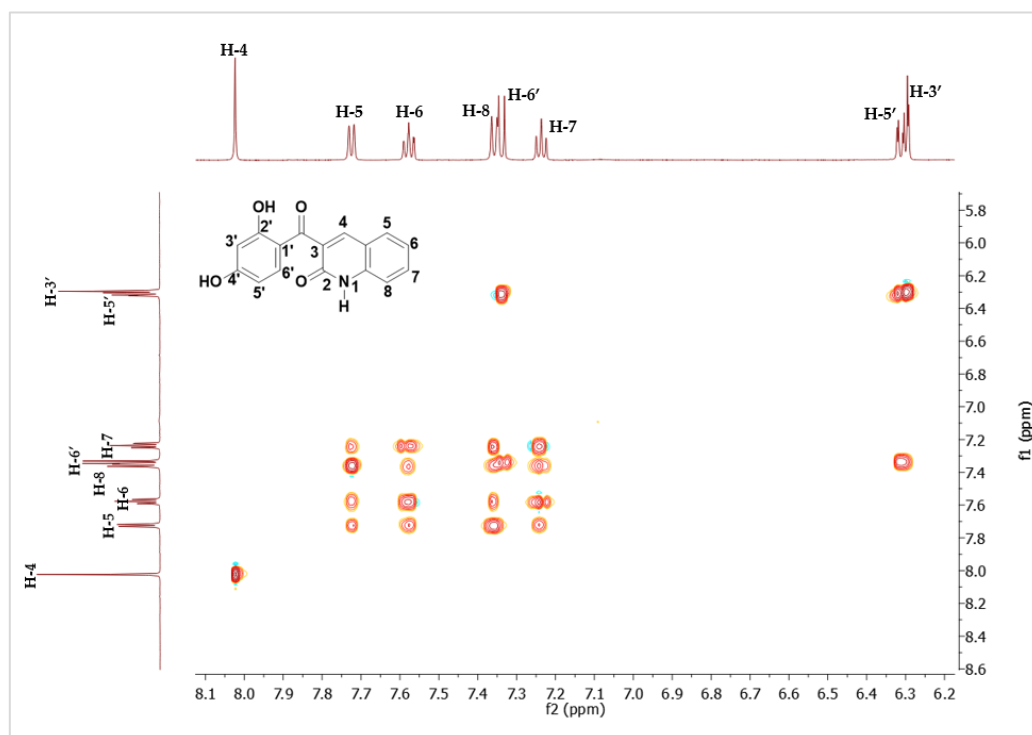
Σημαντική παρατήρηση στο φάσμα ^{13}C NMR της **34a** (Εικόνα 5.13) αποτελεί η χαρακτηριστική κορυφή σε δc 196.58 ppm η οποία υποδεικνύει την παρουσία του καρβonyλίου στη θέση 3 του ετεροκυκλικού δακτυλίου. Μεταξύ 165.83 και 159.82 ppm εμφανίζονται οι αποθωρακισμένοι άνθρακες των θέσεων 2, 2' και 4', ενώ οι υπόλοιποι έντεκα άνθρακες του μορίου συντονίζονται στο εύρος μεταξύ 139.44 και 102.60 ppm.

Η ταυτοποίηση της δομής του κινολινονικού αναλόγου **34a** έγινε εφικτή με τη χρήση μελέτη φασματοσκοπίας NMR δύο διαστάσεων, ενώ η υπόθεση εργασίας που διαμορφώθηκε παρουσιάζεται στην Εικόνα 5.14.



Εικόνα 5.14 Απόδοση των κορυφών στο φάσμα ^1H NMR της NMR της 3-(2,4-διυδροξυβενζοΐλ)κινολινόνης (34a).

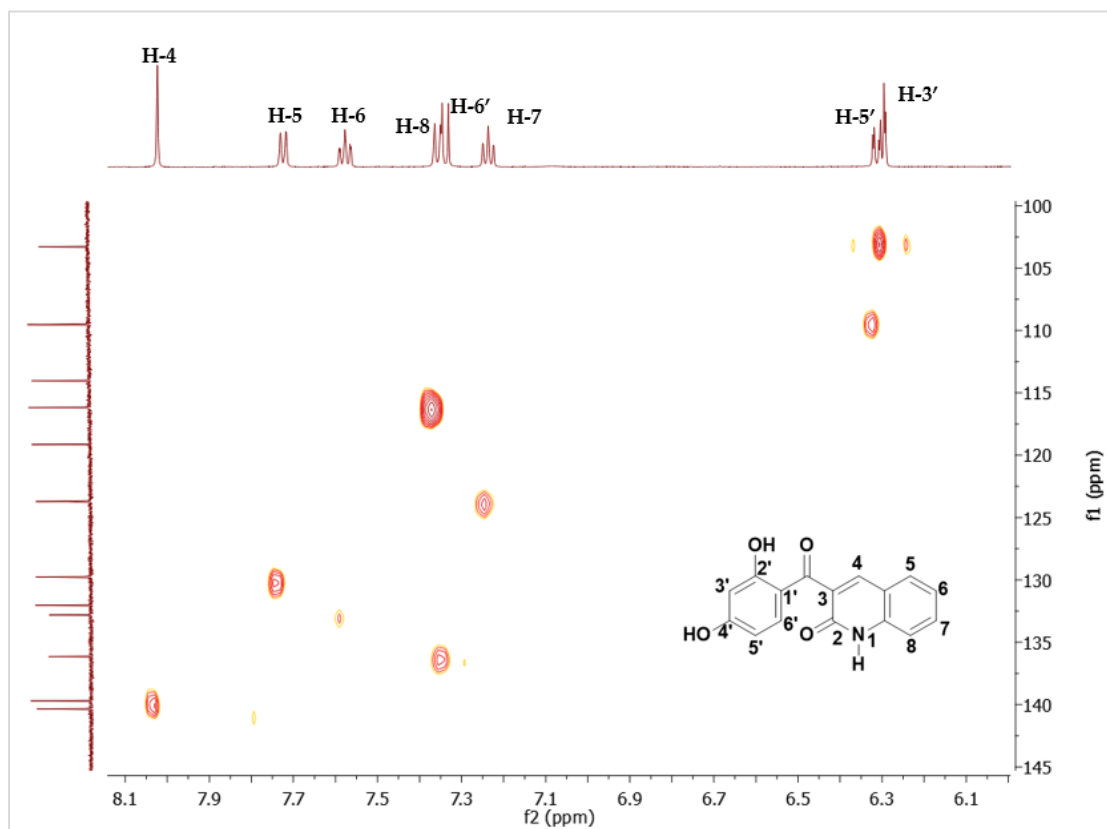
Το φάσμα 2D ^1H - ^1H TOCSY επιβεβαίωσε το συσχετισμό μεταξύ των πρωτονίων που ανήκουν στο ίδιο spin-system και συγκεκριμένα διέκρινε τα πρωτόνια των δύο αρωματικών δακτυλίων (Εικόνα 5.15).



Εικόνα 5.15 Φάσμα TOCSY NMR της 3-(2,4-διυδροξυβενζοΐλ)κινολινόνης (34a).

Οι συσχετίσεις TOCSY που καταγράφονται μεταξύ των κορυφών που εμφανίζονται σε δ_H 7.24, 7.36, 7.58 και 7.72 ppm επιβεβαιώνουν την αρχική υπόθεση ότι πρόκειται για τα πρωτόνια του δακτυλίου της κινολινόνης (θέσεις 5-8). Επιπλέον η συσχέτιση μεταξύ των κορυφών σε δ_H 6.31 και 7.34 ppm επιβεβαιώνει ότι πρόκειται για τα πρωτόνια H-5' και H-6' του αρωματικού δακτυλίου της θέσης 3.

Στη συνέχεια, ελήφθη το φάσμα ¹H-¹³C HSQC από το οποίο συσχετίστηκαν τα πρωτόνια της ένωσης με τα άμεσα συνδεδεμένα άτομα άνθρακα (Εικόνα 5.16).



Εικόνα 5.16 Φάσμα ¹H-¹³C HSQC NMR της 3-(2,4-διυδροξυβενζοϋλ)κινολινόνης (34a).

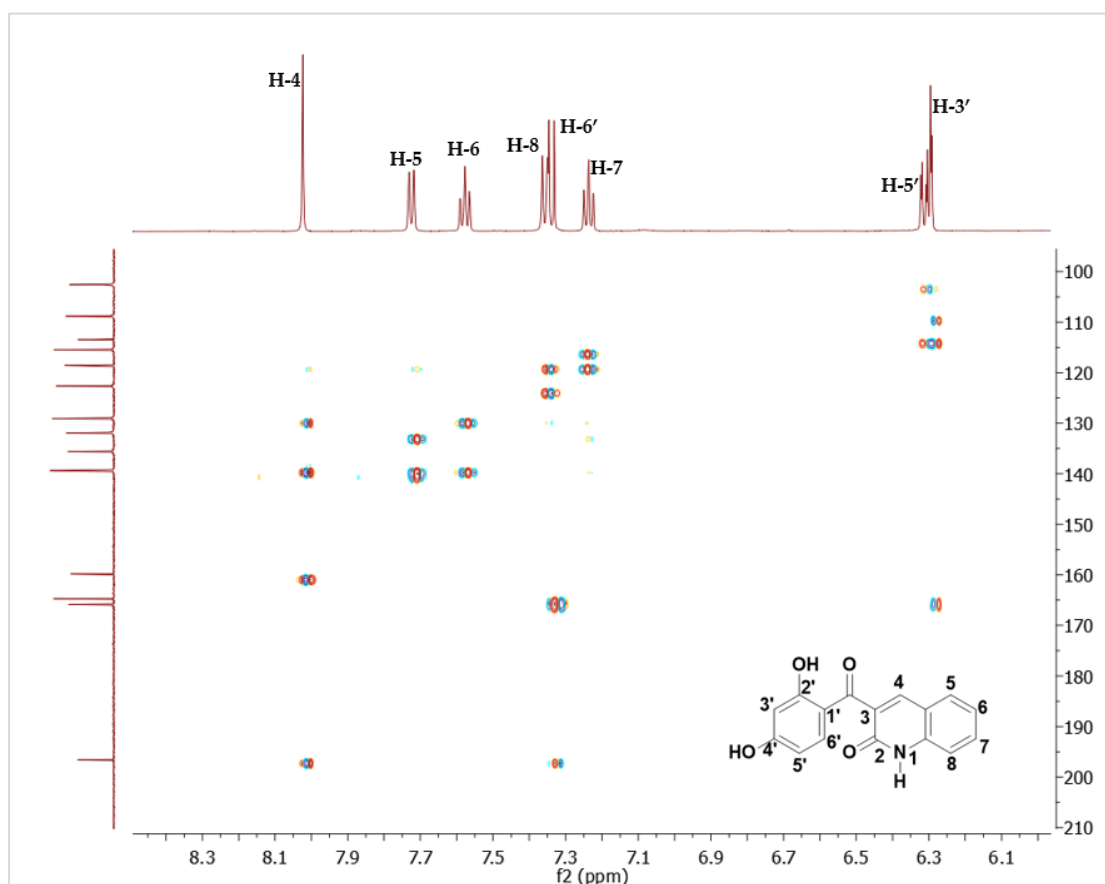
Η αντιστοίχιση των ανθράκων με τα πρωτόνια με τα οποία συνδέονται ομοιοπολικά παρουσιάζεται στον Πίνακα 5.4.

Πίνακας 5.4 Ταυτοποίηση ατόμων πρωτονίου και άνθρακα της ένωσης 34a.

Πρωτόνιο	¹ H (ppm)	¹³ C (ppm)
H-3'	6.29 (d)	103.28
H-5'	6.31 (dd)	109.51
H-7	7.24 (t)	123.71
H-6'	7.35 (d)	136.15

H-8	7.36 (d)	116.17
H-6	7.58 (t)	132.82
H-5	7.72 (dd)	129.76
H-4	8.02 (s)	140.35

Περαιτέρω, η φασματοσκοπία HMBC οδήγησε στη διασαφήνιση της δομής της ένωσης **34a**. (Εικόνα 5.17).



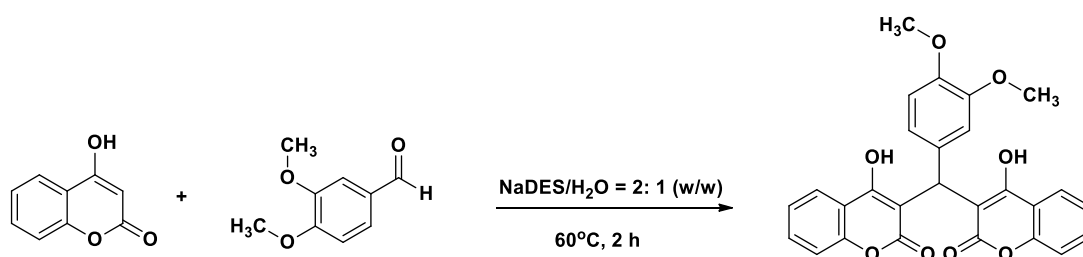
Εικόνα 5.17 Φάσμα ^1H - ^{13}C HMBC NMR της 3-(2,4-διυδροξυβενζοΐλ)κινολινόνης (**34a**).

Οι συσχετισμοί μεταξύ του καρβονυλίου (δ_{C} 196.58 ppm) και της απλής κορυφής σε δ_{H} 8.02 ppm καθώς και της διπλής κορυφής σε δ_{H} 7.35 ppm οδηγούν σε ταυτοποίηση των πρωτονίων H-4 και H-6', αντίστοιχα. Επομένως, μέσω των συσχετισμών TOCSY ταυτοποιείται και το H-5'. Επιπλέον, οι συσχετισμοί μεταξύ του C-4 (140.35 ppm) και της διπλής διπλών κορυφής κορυφής σε δ_{H} 7.72 ppm καθώς και της τριπλής κορυφής σε δ_{H} 7.58 ppm ταυτοποιούν τα πρωτόνια H-5 και H-6 αντίστοιχα. Επομένως μέσω των συσχετισμών TOCSY ταυτοποιούνται περαιτέρω τα πρωτόνια H-7 και H-8. Κατ' αυτόν τον τρόπο, ολοκληρώνεται η αποτίμηση των κορυφών του φάσματος ^1H NMR της **34a**, και ταυτοποιείται η δομή

του κινολινονικού παραγώγου, το οποίο παρουσιάζεται για πρώτη φορά στη βιβλιογραφία.

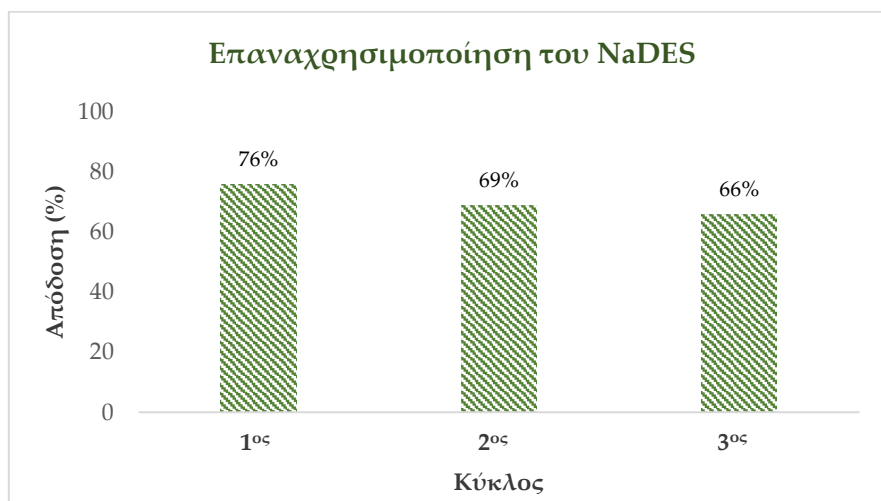
5.4.3 Ανάκτηση και επαναχρησιμοποίηση του NaDES

Τα νέα δικουμαρινικά ανάλογα συντέθηκαν επιτυχώς χρησιμοποιώντας το φυσικό βαθέως ευτηκτικό διαλύτη (NaDES) L-προλίνη/γαλακτικό οξύ = 1:2 σε αναλογία NaDES/H₂O = 1:2. Η δυνατότητα ανάκτησης και επαναχρησιμοποίησης του NaDES μελετήθηκε στην αντίδραση-μοντέλο μεταξύ της 4-υδροξυκουμαρίνης και της 3,4-διμεθοξυ-βενζαλδεΐδης για τη σύνθεση της 3,3'-(3,4-διμεθοξυ-φαινυλομεθυλο)-δι-(4-υδροξυ-2H-βενζοπυραν-2-όνης) (Σχήμα 5.14).



Σχήμα 5.14 Αντίδραση-μοντέλο.

Έπειτα από την ολοκλήρωση της αντίδρασης, προστίθεται νερό στο μίγμα και ακολουθεί διήθηση του προϊόντος. Ο NaDES ανακτάται μέσω ήπιας εξάτμισης του διηθήματος και επαναχρησιμοποιείται εκ νέου στην πρότυπη αντίδραση. Οι υπολογιζόμενες αποδόσεις αντίδρασης έπειτα από μέχρι και τρεις κύκλους παρουσιάζονται στην Εικόνα 5.18.



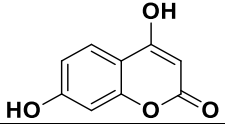
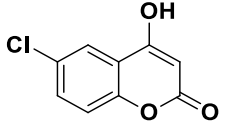
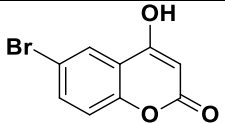
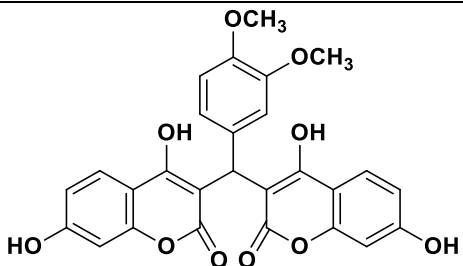
Εικόνα 5.18 Ανακυκλωσιμότητα και επαναχρησιμοποίηση του NaDES.

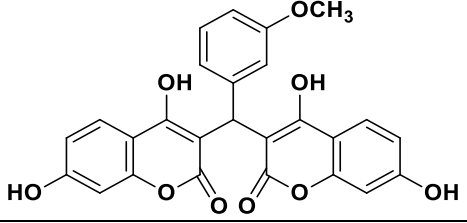
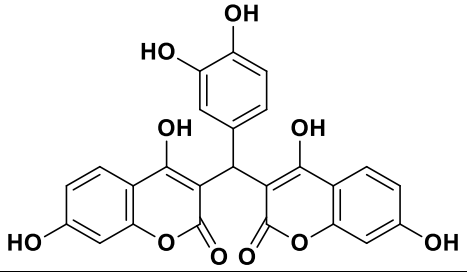
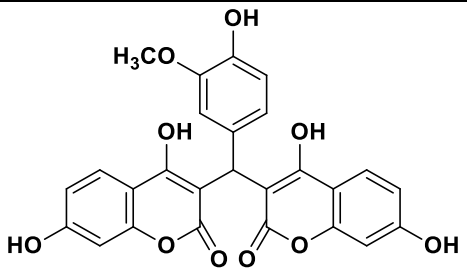
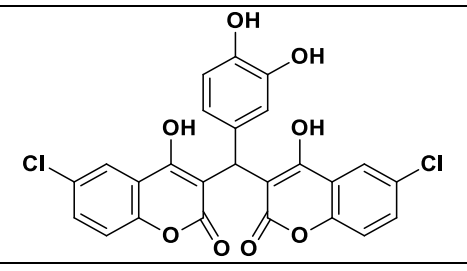
Παρατηρείται ότι η απόδοση της αντίδρασης μειώνεται κατά μόλις 10% έπειτα από τρεις κύκλους αντιδράσεων, καθιστώντας τον NaDES L-προλίνη/γαλακτικό οξύ = 1:2 κατάλληλο και αποδοτικό για χρήση τουλάχιστον έως και τρεις φορές στην αντίδραση Domino Michael-Knoevenagel, χαρακτηριστικό πολύ σημαντικό προκειμένου να αναπτύξουμε περισσότερο πράσινες συνθετικές πορείες.

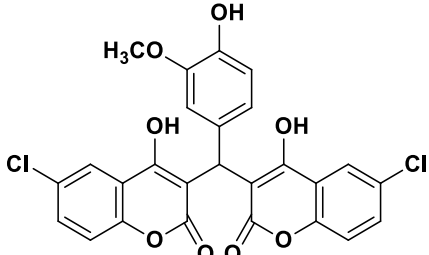
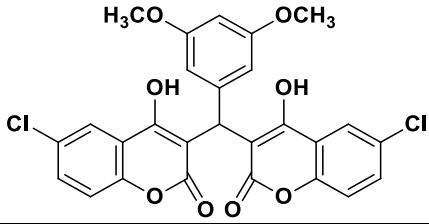
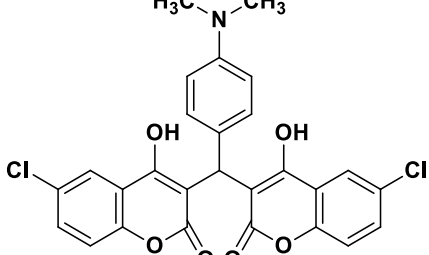
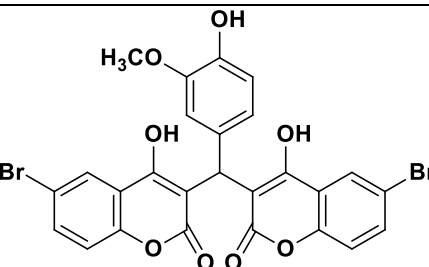
5.4.4 Αξιολόγηση της αντιοξειδωτικής δράσης των νέων αναλόγων της Σειράς ΣΤ

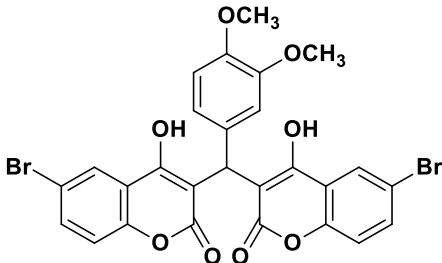
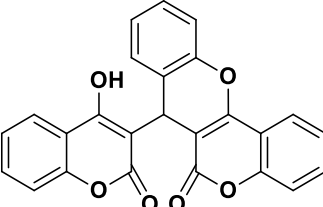
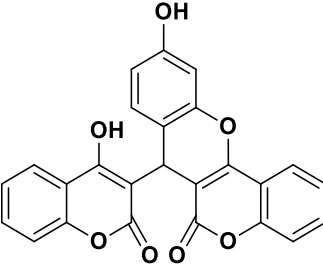
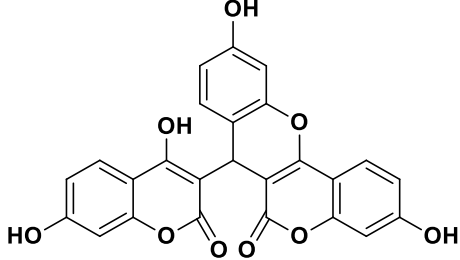
Τα νέα κουμαρινικά και κινολινονικά ανάλογα της Σειράς ΣΤ αξιολογήθηκαν ως προς την αντιοξειδωτική τους δράση μέσω της δοκιμής δέσμευσης της ελεύθερης ρίζας DPPH και αναστολής της λιπιδικής υπεροξειδωσης (LP) του λινολεϊκού οξέος, υποκινούμενη από τον εκκινητή ελευθέρων ριζών, AAPH (Πίνακας 5.5).

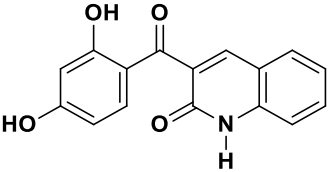
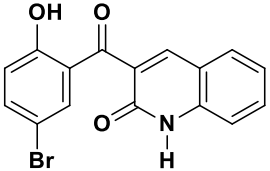
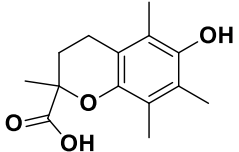
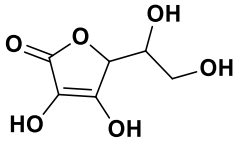
Πίνακας 5.5 Αξιολόγηση της αντιοξειδωτικής δράσης των νέων αναλόγων της Σειράς ΣΤ.

A/A	Δομή	(%) Ικανότητα αναστολής της ελεύθερης ρίζας DPPH 30 min (100 μM)	(%) Ικανότητα αναστολής της ελεύθερης ρίζας DPPH 60 min (100 μM)	Ικανότητα αναστολής της ελεύθερης ρίζας DPPH 30 min IC ₅₀ (μM)	Ικανότητα αναστολής της ελεύθερης ρίζας DPPH 60 min IC ₅₀ (μM)	(%) Ικανότητα αναστολής της λιπιδικής υπεροξειδωσης (LP) (100 μM)
28		No	No	-	-	100 ± 1.3
30a		No	No	-	-	56.7 ± 6.8
30b		No	No	-	-	87.0 ± 5.1
32a		No	No	-	-	75.2 ± 3.9

32b		No	No	-	-	80.1 ± 1.3
32c		52.2 ± 0.6	60.8 ± 0.4	72.5 ± 0.9	8.1 ± 0.4	99.8 ± 0.7
32d		41.7 ± 1.8	62.6 ± 3.9	-	51.6 ± 3.1	91.9 ± 2.3
32e		53.3 ± 4.9	68.1 ± 1.1	71.9 ± 1.3	12.7 ± 0.07	82.2 ± 0.2

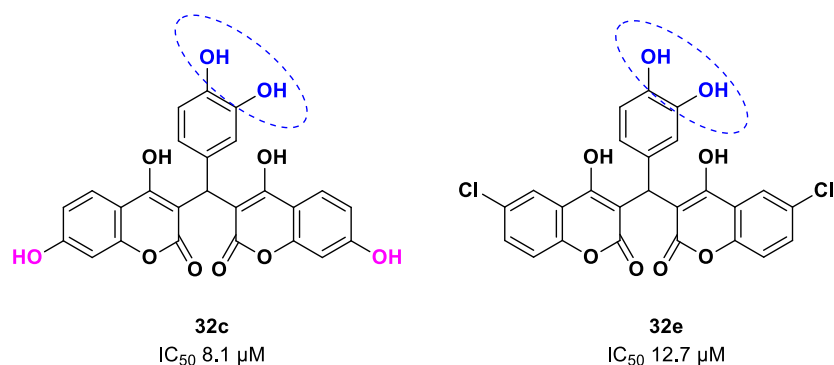
32f		55.2 ± 8.4	73.9 ± 8.2	59.16 ± 3.8	37.0 ± 3.6	92.1 ± 2.6
32g		No	No	-	-	77.7 ± 4.4
32h		27.4 ± 1.4	32.6 ± 1.8	-	-	95.2 ± 1.9
32i		35.2 ± 2.9	57.9 ± 4.8	-	63.5 ± 6.3	83.0 ± 1.6

32j		No	No	-	-	95.1 ± 1.7
33a		No	No	-	-	85.9 ± 3.2
33b		No	No	-	-	88.9 ± 0.9
33c		No	No	-	-	93.4 ± 0.1

34a		No	No	-	-	70.1 ± 2.2
34b		No	No	-	-	68.9 ± 1.8
Trolox		82.8 ± 1.0	92.3 ± 0.8	17.1 ± 0.5	9.6 ± 0.7	81.4 ± 5.1
Ασκορβικό οξύ (Βιταμίνη C)		-	-	-	-	75.1 ± 0.5

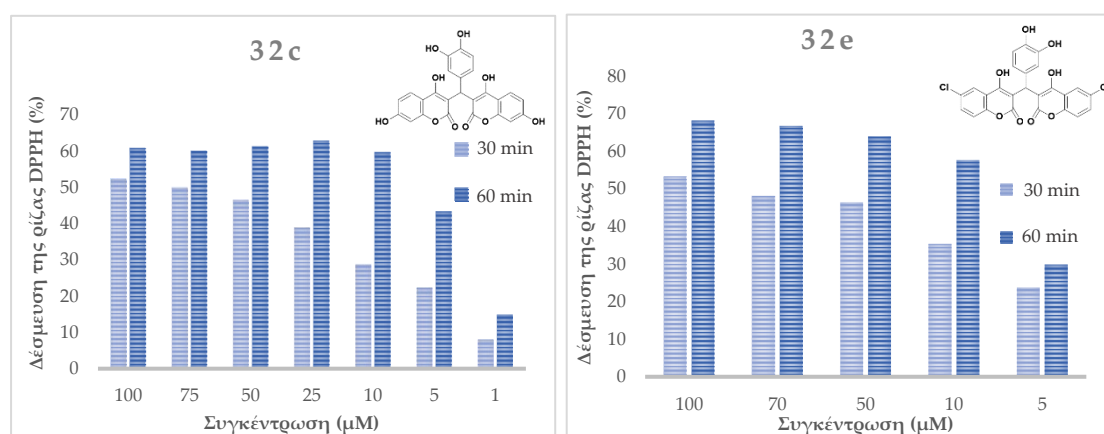
No: Η ένωση δεν έδειξε δράση στις συγκεκριμένες πειραματικές συνθήκες

Όσον αφορά την ικανότητα των νέων κουμαρινικών και κινολινονικών αναλόγων να δεσμεύουν την ελεύθερη ρίζα DPPH, παρατηρείται ότι η πλειοψηφία των εξεταζόμενων ενώσεων δεν παρουσίασε αντιοξειδωτική δράση στη συγκέντρωση των 100 μM . Ισχυρότερη ικανότητα δέσμευσης παρουσίασαν οι ενώσεις **32c** και **32e** με τιμές IC_{50} 8.1 μM και 12.7 μM , αντίστοιχα, με την **32c** να παρουσιάζει καλύτερη δράση και από το πρότυπο, Trolox (IC_{50} 9.6 μM). Και οι δύο ενώσεις διαθέτουν κατεχολικό σύστημα στον αρωματικό δακτύλιο της θέσης 1'' (Σχήμα 5.15), το οποίο είναι γνωστό ότι ενισχύει σημαντικά την ικανότητα δέσμευσης της ρίζας DPPH, ενώ η ένωση **32c** η οποία παρουσίασε την καλύτερη δράση διαθέτει και επιπλέον ομάδες υδροξυλίου στον κουμαρινικό σκελετό.



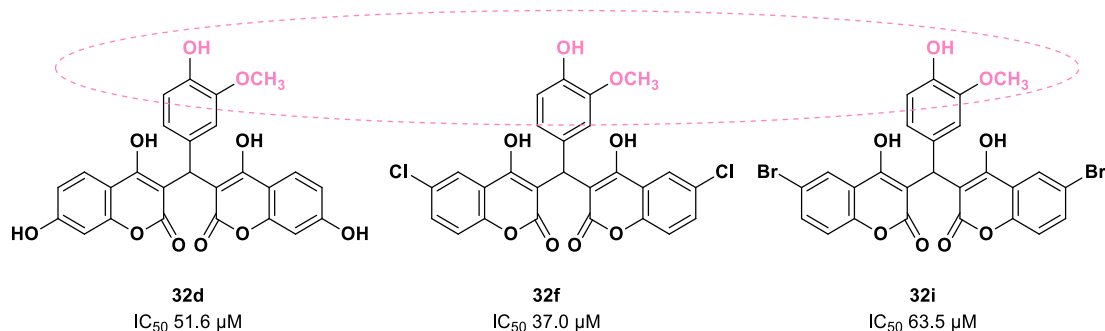
Σχήμα 5.15 Χημική δομή των ενώσεων **32c** και **32e**.

Τα αποτελέσματα από την ικανότητα δέσμευσης της ρίζας DPPH για διάφορες συγκεντρώσεις των ενώσεων **32c** και **32e**, παρουσιάζονται στην Εικόνα 5.19.



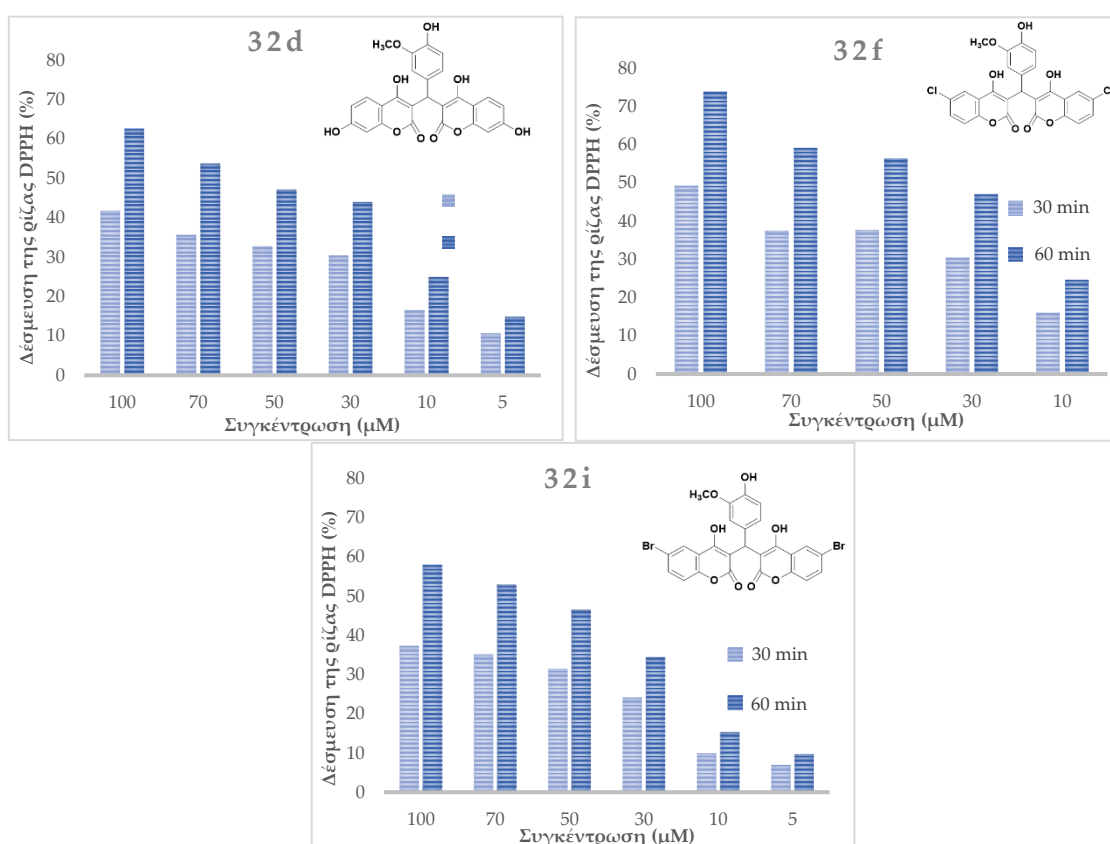
Εικόνα 5.19 (%) Δέσμευση της ελεύθερης ρίζας DPPH των ενώσεων **32c** και **32e**.

Επιπρόσθετα, σημαντική παρατήρηση αποτελεί ότι οι ενώσεις **32d**, **32f** και **32i** (Σχήμα 5.16), οι οποίες αποτελούν παράγωγα της βανιλίνης (3-μεθοξυ-4-υδροξυ-βενζαλδεΐδη) και διαθέτουν υδροξυ και μεθοξυ ομάδες σε γειτονικές θέσεις στο φαινολικό δακτύλιο της θέσης 1'' εμφανίζουν επίσης αξιόλογη αντιοξειδωτική δράση με τιμές IC_{50} στα 60 min 51.6 μM , 63.5 μM και 37.0 μM , αντίστοιχα. Το παράγωγο **32f** το οποίο φέρει ομάδες χλωρίου στον κουμαρινικό σκελετό παρουσίασε σημαντικά χαμηλότερη τιμή IC_{50} (37.0 μM) από τα υπόλοιπα.



Σχήμα 5.16 Χημική δομή των ενώσεων **32d**, **32f** και **32i**.

Τα αποτελέσματα από την ικανότητα δέσμευσης της ρίζας DPPH για διάφορες συγκεντρώσεις των ενώσεων **32d**, **32f** και **32i**, παρουσιάζονται στην Εικόνα 5.20.

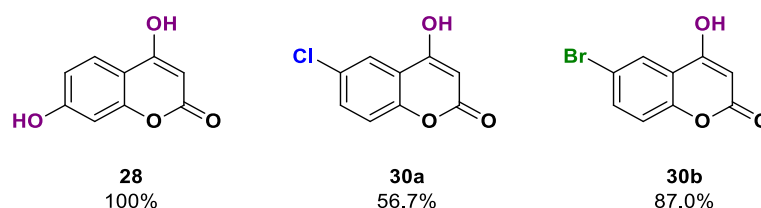


Εικόνα 5.20 (%) Δέσμευση της ελεύθερης ρίζας DPPH των ενώσεων **32d**, **32f** και **32i**.

Συνεπώς, η αντιοξειδωτική δράση των νέων δικουμαρινικών αναλόγων όπως αυτή εκφράζεται μέσω της δέσμευσης της ελεύθερης ρίζας DPPH, εννοείται σημαντικά από την παρουσία υδροξυ και μεθοξυ ομάδας σε γειτονικές θέσεις στο φαινολικό δακτύλιο της θέσης 1' και ακόμη περισσότερο από την ορθο-διυδροξυ-υποκατάσταση.

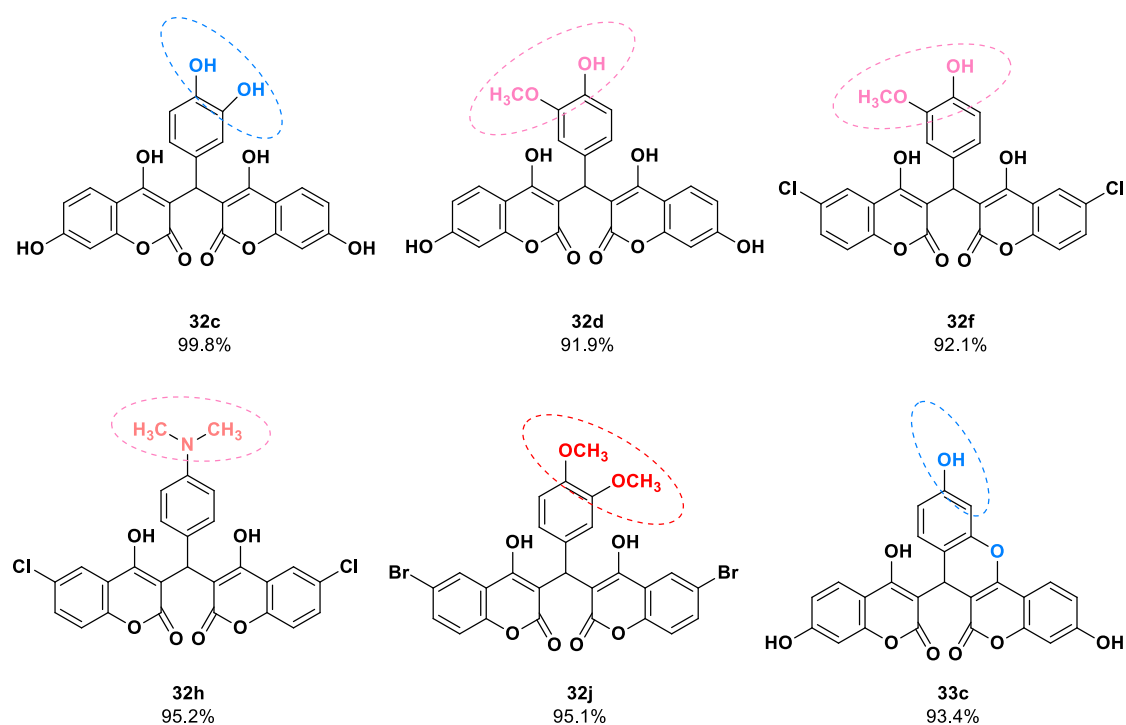
Όσον αφορά την ικανότητα των νέων κουμαρινικών και κινολινονικών αναλόγων που εξετάστηκαν να αναστέλλουν τη λιπιδική υπεροξειδωση που επάγεται από τον εκκινητή ελευθέρων ριζών 2,2'-αζωδις(2-αμιδινοπροπανίου)διϋδροχλωρίδιο,

ΑΑΡΗ, παρατηρείται ότι η πλειονότητά τους εμφανίζει εξαιρετική ικανότητα αναστολής (Πίνακας 5.5). Το κουμαρινικό ανάλογο **28** επέδειξε την καλύτερη ανασταλτική δράση, με ποσοστό αναστολής 100%, ενώ οι ενώσεις αναφοράς Trolox και ασκορβικό οξύ (Vitamin C) παρουσίασαν τιμές αναστολής 81.4% και 75.1%, αντίστοιχα. Τα κουμαρινικά ανάλογα της **28**, **30a** και **30b**, παρουσίασαν ποσοστά αναστολής 56.7% και 87.0%, αντίστοιχα (Σχήμα 5.17). Επομένως, η παρουσία φαινολικών υδροξυλίων στον κουμαρινικό σκελετό φαίνεται πως ενισχύει σημαντικά την αντιοξειδωτική δράση. Ειδικότερα, ο μηχανισμός της λιπιδικής υπεροξειδωσης περιλαμβάνει μία αλυσιδωτή αντίδραση, η οποία ξεκινά με την προσβολή της μεθυλενικής ομάδας του λινελαϊκού οξέος από ελεύθερες ρίζες και επομένως ενώσεις που φέρουν δότες ηλεκτρονίου αναμένεται να έχουν αξιολογή αντιοξειδωτική δράση [55].



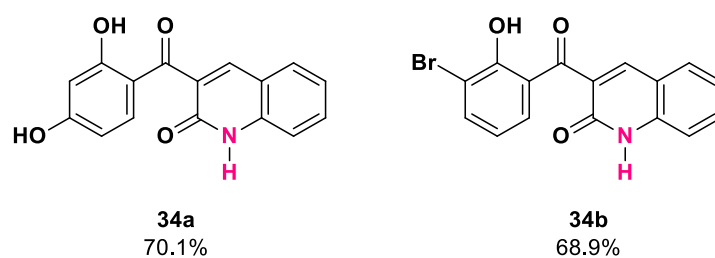
Σχήμα 5.17 Χημική δομή των κουμαρινικών αναλόγων **28**, **30a** και **30b**.

Τα δικουμαρινικά ανάλογα **32a-32j** και **33a-33c** που εξετάστηκαν, επέδειξαν στην πλειονότητά τους εξαιρετική ικανότητα αναστολής της λιπιδικής υπεροξειδωσης, μεταξύ 75 και 100%. Στη συνέχεια παρουσιάζονται τα ανάλογα που παρουσίασαν ποσοστά αναστολής μεγαλύτερα από 90% στη συγκέντρωση των 100 μΜ (Σχήμα 5.18).



Σχήμα 5.18 Χημική δομή των αναλόγων που παρουσίασαν υψηλότερη ικανότητα αναστολής της λιπιδικής υπεροξειδωσης.

Παρατηρείται ότι τα δικουμαρινικά ανάλογα επέδειξαν στο σύνολό τους ισχυρή ικανότητα αναστολής της λιπιδικής υπεροξειδωσης ανεξάρτητα από τους υποκαταστάτες τους σε μεγάλο βαθμό. Ωστόσο, είναι αξιοσημείωτο ότι στην περίπτωση των κινολινονών **34a** και **34b**, το ποσοστό αναστολής ήταν 70.1% και 68.9%, αντίστοιχα (Σχήμα 5.19). Επομένως, κυριότερη επίδραση στην αντιοξειδωτική δράση φαίνεται να έχει η παρουσία του κουμαρινικού σκελετού, ενώ η ύπαρξη διαφορετικών υποκαταστατών στον δικουμαρινικό σκελετό δεν επιδρά σημαντικά.



Σχήμα 5.19 Χημική δομή κινολινονών **34a** και **34b**.

5.5 ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

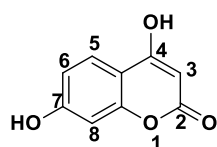
5.5.1 Παρασκευή του φυσικού βαθέως ευτηκτικού διαλύτη (NaDES)

Για τη σύνθεση του φυσικού βαθέως ευτηκτικού διαλύτη L-προλίνη/γαλακτικό οξύ = 1:2, σε σφαιρική φιάλη προστίθεται κατάλληλη ποσότητα του δέκτη δεσμών υδρογόνου (L-προλίνη, 1 eq) καθώς και του δέκτη (γαλακτικό οξύ, 2 eq) και αναδεύονται στους 60 °C, έως ότου σχηματιστεί διαυγές υγρό. Το προκύπτον NaDES χρησιμοποιείται χωρίς περαιτέρω καθαρισμό.

5.5.2 Σύνθεση των νέων αναλόγων της Σειράς ΣΤ

Σύνθεση της 4,7-διυδροξυ-2H-χρωμεν-2-όνης (**28**) :

Μέθοδος Α



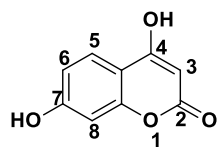
Σε σφαιρική φιάλη προστίθενται 4.72 mmol (519.4 mg) ρεσορκινόλης και 14.15 mmol (1.47 g) μηλονικού οξέος και 2.4 mL $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$ υπό ψύξη. Στη συνέχεια, η σφαιρική τοποθετείται σε ελαιόλουτρο στους 90 °C και συνδέεται με κάθετο ψυκτήρα υπό αδρανείς συνθήκες για 48 h. Η αντίδραση παρακολουθείται μέσω χρωματογραφίας λεπτής στοιβάδας (TLC) σε σύστημα διαλυτών πετρελαϊκός αιθέρας (PE)/οξικός αιθυλεστέρας (EtOAc) = 60 : 40.

Μετά το πέρας της αντίδρασης, η σφαιρική φιάλη αφήνεται να έρθει σε θερμοκρασία περιβάλλοντος, τοποθετείται σε παγόλουτρο και έπειτα προστίθενται 28 mL υδατικού διαλύματος οξικού νατρίου 20%. Ακολουθεί διήθηση και εκπλύσεις με νερό και διαιθυλαιθέρα και στη συνέχεια το προϊόν ξηραίνεται. Το τελικό προϊόν παραλήφθηκε έπειτα από χρωματογραφία στήλης με σύστημα διαλυτών διχλωρομεθάνιο (DCM)/μεθανόλη (MeOH) = 90 : 10. Παραλαμβάνεται πορτοκαλί στερεό.

Απόδοση: 78%, **Σ.Τ.:** 270-274 °C (**Σ.Τ. βιβλιογραφίας:** 265-267 °C [56])

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, DMSO-d_6): δ (ppm) 12.23 (s, 1H, OH), 10.51 (s, 1H, OH), 7.63 (d, $J = 8.8$ Hz, 1H, H-5), 6.76 (dd, $J = 8.8$ Hz, $J = 2.4$ Hz, 1H, H-6), 6.66 (d, $J = 2.4$ Hz, 1H, H-8), 5.38 (s, 1H, H-3)

Μέθοδος Β



Σε σφαιρική φιάλη προστίθενται 2.40 mmol (264.7 mg) ρεσορκινόλης, 2.40 mmol (251.2 mg) μηλονικού οξέος, 7.56 mmol (1 g) ZnCl_2 και 687 μL POCl_3 υπό ψύξη. Η σφαιρική φιάλη συνδέεται με κάθετο ψυκτήρα υπό αδρανείς συνθήκες και αφήνεται στους 60 °C για 12 h.

Η αντίδραση παρακολουθείται μέσω χρωματογραφίας λεπτής στοιβάδας (TLC) σε σύστημα διαλυτών πετρελαϊκός αιθέρας (PE)/οξικός αιθυλεστέρας (EtOAc) = 60 : 40. Μετά το πέρας της αντίδρασης, προστίθενται στη σφαιρική 8.6 mL H_2O και στη συνέχεια η σφαιρική τοποθετείται στο ψυγείο για όλη τη νύχτα (overnight). Την

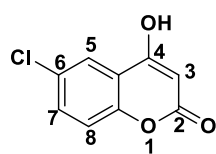
επόμενη μέρα, το καταβυθιζόμενο στερεό διηθείται και ξηραίνεται. Παραλαμβάνεται σκούρο μωβ προϊόν.

Απόδοση: 50%

Γενική μέθοδος σύνθεσης των 6-υποκατεστημένων-4-υδροξυ-κουμαρινών (30a-30b)

Σε σφαιρική φιάλη προστίθεται το υδρίδιο του νατρίου σε τολουόλιο και στάγδην κατάλληλη ποσότητα 5-υποκατεστημένης-2-υδροξυ-ακετοφαινόνης (1 eq) διαλυμένη σε τολουόλιο υπό ψύξη. Ακολουθεί προσθήκη του ανθρακικού διαιθυλεστέρα (2 eq) και θέρμανση σε ελαιόλουτρο στους 100 °C για 24 h, παρουσία κάθετου ψυκτήρα υπό αδρανείς συνθήκες. Η αντίδραση παρακολουθείται μέσω χρωματογραφίας λεπτής στοιβάδας (TLC) σε σύστημα διαλυτών πετρελαϊκός αιθέρας (PE)/οξικός αιθυλεστέρας (EtOAc) = 80 : 20. Στη συνέχεια, το μίγμα της αντίδρασης αποχύνεται σε νερό υπό ψύξη και ακολουθεί οξίνιση. Το επιθυμητό προϊόν παραλαμβάνεται με διήθηση και εκπλύσεις με νερό και διαιθυλαιθέρα, ενώ χρησιμοποιείται στο επόμενο στάδιο, χωρίς περαιτέρω επεξεργασία καθαρισμού.

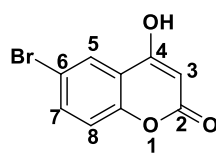
6-χλωρο-4-υδροξυ-2H-χρωμεν-2-όνη (30a) :



Σύμφωνα με τη γενική μέθοδο, σε σφαιρική φιάλη προστίθενται 2.28 mmol (389.2 mg) 4-υδροξυ-6-χλωρο-ακετοφαινόνης, 3.42 mmol (414.6 μL) ανθρακικού διαιθυλεστέρα και 11.38 mmol (273.0 mg) υδριδίου του νατρίου σε 6.5 mL τολουόλιο.

Απόδοση: 49%

6-βρωμο-4-υδροξυ-2H-χρωμεν-2-όνη (30b) :



Σύμφωνα με τη γενική μέθοδο, σε σφαιρική φιάλη προστίθενται 2.26 mmol (700 mg) 6-βρωμο-2-υδροξυ-ακετοφαινόνης, 4.88 mmol (591.6 μL) ανθρακικού διαιθυλεστέρα και 16.23 mmol (389.6 mg) υδριδίου του νατρίου σε 9.2 mL τολουόλιο. Παραλαμβάνεται μπεζ στερεό.

Απόδοση: 45%, **Σ.Τ.:** 276-279 °C

¹H NMR (300 MHz, DMSO-d₆): δ (ppm) 7.90 (d, J = 2.1 Hz, 1H, H-5), 7.80 (dd, J = 8.7 Hz, J = 2.4 Hz, 1H, H-7), 7.36 (d, J = 9 Hz, 1H, H-8), 5.61 (s, 1H, H-3)

Απόδοση: 49%, **Σ.Τ.:** 264°C

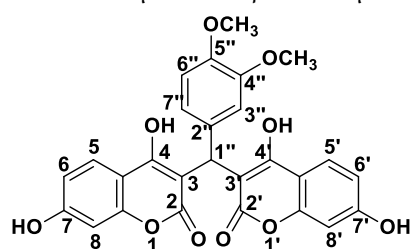
Γενική μέθοδος παρασκευής των νέων δικουμαρινικών και κινολινονικών αναλόγων της Σειράς ΣΤ (32a-32h, 33a-33c, 34a-34b)

Για τη σύνθεση των νέων δικουμαρινικών και κινολινονικών αναλόγων, ποσότητα κατάλληλα υποκατεστημένης 4-υδροξυ-κουμαρίνης (2eq) προστίθεται σε σφαιρική φιάλη μαζί με ποσότητα κατάλληλα υποκατεστημένης βενζαλδεΐδης

(1eq), παρουσία του φυσικού βαθέως ευτηκτικού διαλύτη (NaDES) L-προλίνη/γαλακτικό οξύ = 1:2 και νερού σε αναλογία NaDES/H₂O = 2:1 (w/w). Ακολουθεί μαγνητική ανάδευση για 2.5 h υπό αδρανείς συνθήκες αζώτου στους 60 °C, παρουσία κάθετου ψυκτήρα.

Η πορεία της αντίδρασης παρακολουθείται μέσω χρωματογραφίας λεπτής στιβάδας (TLC) σε σύστημα διαλυτών πετρελαϊκός αιθέρας (PE)/οξικός αιθυλεστέρας (EtOAc) = 60 : 40 και διχλωρομεθάνιο (DCM)/μεθανόλη (MeOH) = 90 : 10. Μετά το πέρας της αντίδρασης, η σφαιρική φιάλη τοποθετείται σε παγόλουτρο, προστίθεται σταδιακά νερό και το καταβυθιζόμενο στερεό διηθείται και ξηραίνεται. Τέλος, το προϊόν λαμβάνεται σε καθαρή μορφή μέσω καθαρισμού με χρωματογραφίας στήλης ή επεξεργασίας με μεθανόλη εν θερμώ.

3,3'-(3,4-διμεθοξυ-φαινυλομεθυλενο)-δι-(4,7-διυδροξυ-2H-βενζοπυραν-2-ονη) (**32a**):

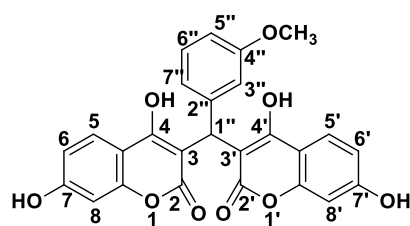


Σε σφαιρική φιάλη εισάγονται 0.31 mmol (60.0 mg) 4,7-διυδροξυ-κουμαρίνης και 0.15 mmol (25.7 mg) της 3,4-διμεθοξυ-βενζαλδεΐδης σε 1007 μ L DES και 504 μ L H₂O . Παραλαμβάνεται στερεό ανοιχτού πορτοκαλί χρώματος.

Απόδοση: 49%, **Σ.Τ.:** 210 °C (dec.)

¹H NMR (600 MHz, DMSO-d₆): δ (ppm) 10.06 (s, 2H, OH), 7.59 (d, J = 8.4 Hz, 2H, H-5, H-5'), 6.73 (d, J = 8.4 Hz, 1H, H-6''), 6.65-6.63 (m, 3H, H-6, H-6', H-3''), 6.59 (d, J = 8.4 Hz, 1H, H-7''), 6.55 (d, J = 1.8 Hz, 2H, H-8, H-8'), 6.08 (s, 1H, H-1''), 3.67 (s, 3H, OCH₃), 3.51 (s, 3H, OCH₃), ¹³C NMR (75 MHz, DMSO-d₆): δ (ppm) 168.78, 165.57, 160.41, 154.31, 148.38, 146.75, 135.84, 125.73, 119.23, 112.44, 111.94, 111.74, 111.69, 202.28, 101.40, 55.82, 55.76, 35.78

3,3'-(3-μεθοξυ-φαινυλομεθυλενο)-δι-(4,7-διυδροξυ-2H-βενζοπυραν-2-όνη) (**32b**):

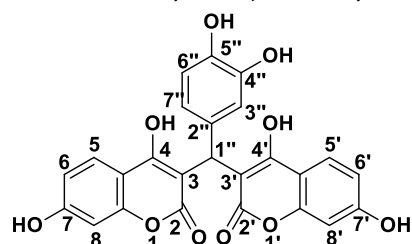


Σε σφαιρική φιάλη εισάγονται 0.31 mmol (59.5 mg) 4,7-διυδροξυ-κουμαρίνης και 0.15 mmol (20.9 mg) της 3-μεθοξυ-βενζαλδεΐδης σε 1000 μ L DES και 500 μ L H₂O. Παραλαμβάνεται ροζ στερεό.

Απόδοση: 50%, **Σ.Τ.:** 203 °C (dec.)

¹H NMR (600 MHz, DMSO-d₆): δ (ppm) 10.07 (s, 2H, OH), 7.59 (d, J = 9 Hz, 2H, H-5, H-5'), 7.04 (t, J = 7.8 Hz, 1H, H-6''), 6.65-6.62 (m, 4H, H-6, H-6', H-8, H-8'), 6.57-6.56 (m, 3H, H-3'', H-5'', H-7''), 6.11 (s, 1H, H-1''), 3.60 (s, 3H, OCH₃), ¹³C NMR (75 MHz, DMSO-d₆): δ (ppm) 168.65, 165.39, 160.36, 159.14, 154.25, 145.07, 128.76, 125.63, 119.51, 113.62, 112.30, 111.80, 109.22, 101.27, 101.00, 54.91, 36.09

3,3'-(3,4-διυδροξυ-φαινυλομεθυλενο)-δι-(4,7-διυδροξυ-2H-βενζοπυραν-2-όνη) (**32c**):



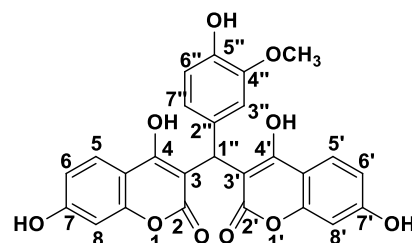
Σε σφαιρική φιάλη εισάγονται 0.44 mmol (80.0 mg) 4,7-διυδροξυ-κουμαρίνης και 0.22 mmol (31.0 mg) της 4,7-διυδροξυ-βενζαλδεΐδης σε 976 μ L DES και 488 μ L H₂O. Παραλαμβάνεται ροζ στερεό.

Απόδοση: 58%, **Σ.Τ.:** 240 °C (dec.)

¹H NMR (300 MHz, DMSO-d₆): δ (ppm) 17.55 (br, 1H, OH), 10.10 (s, 2H, OH), 8.44 (s, 1H, OH), 8.27 (s, 2H, OH), 7.60 (d, $J = 8.7$ Hz, 2H, H-5, H-5'), 6.65 (dd, $J = 8.7$ Hz, $J = 2.1$ Hz, 2H, H-6, H-6'), 7.56 (d, $J = 2.1$ Hz, 2H, H-8, H-8'), 6.48 (d, $J = 8.4$ Hz, 2H, H-3'', H-6''), 6.30 (d, $J = 8.4$ Hz, 1H, H-7''), 5.98 (s, 1H, H-1''), ¹³C NMR (75 MHz, DMSO-d₆): δ (ppm) 168.31, 165.19, 160.07, 154.06, 144.36, 142.30, 133.91, 125.39, 117.39, 114.83, 114.46, 112.35, 111.42, 101.29, 101.01, 35.19

HRMS calcd for C₂₅H₁₅O₁₀ (M-H)⁻: m/z : 475.0743, found: 475.0675

3,3'-(3-μεθοξυ-4-υδροξυ-φαινυλο)μεθυλενο)-δι-(4,7-διυδροξυ-2H-βενζοπυραν-2-όνη) (**32d**):

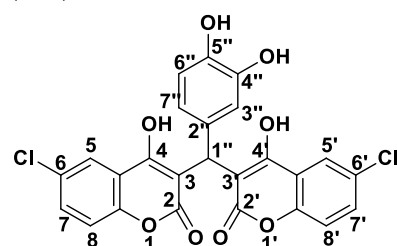


Σε σφαιρική φιάλη εισάγονται 0.17 mmol (29.4 mg) 4,7-διυδροξυ-κουμαρίνης και 0.08 mmol (12.6 mg) της 3-μεθοξυ-4-μεθοξυ-βενζαλδεΐδης σε 976 μ L DES και 488 μ L H₂O. Παραλαμβάνεται ροζ στερεό.

Απόδοση: 50%, **Σ.Τ.:** 220-225 °C

¹H NMR (300 MHz, DMSO-d₆): δ (ppm) 10.08 (s, 2H, OH), 8.48 (s, 1H, OH), 7.59 (d, $J = 8.7$ Hz, 2H, H-5, H-5'), 6.64 (dd, $J = 8.7$ Hz, $J = 1.8$ Hz, 2H, H-6, H-6'), 6.59-6.52 (m, 4H, H-8, H-8', H-3'', H-6''), 6.48 (d, $J = 8.4$ Hz, 1H, H-7''), 6.04 (s, 1H, H-1'')

3,3'-(3,4-διυδροξυ-φαινυλομεθυλενο)-δι-(4-υδροξυ-6-χλωρο-2H-βενζοπυραν-2-όνη) (**32e**):



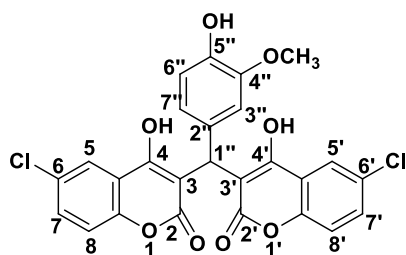
Σε σφαιρική φιάλη εισάγονται 0.36 mmol (70.6 mg) 4-υδροξυ-6-χλωρο-κουμαρίνης και 0.18 mmol (24.8 mg) 3,4-διυδροξυ-βενζαλδεΐδης σε 1170 μ L DES και 585 μ L H₂O. Παραλαμβάνεται ανοιχτό πορτοκαλί στερεό.

Απόδοση: 53%, **Σ.Τ.:** 205 °C (dec.)

¹H NMR (600 MHz, DMSO-d₆): δ (ppm) 8.49 (s, 1H, OH), 8.35 (s, 1H, OH), 7.73 (d, $J = 2.4$ Hz, 2H, H-5, H-5'), 7.53 (dd, $J = 8.4$ Hz, $J = 2.4$ Hz, 2H, H-7, H-7'), 7.30 (d, $J = 9$ Hz, 2H, H-8, H-8'), 6.50 (d, $J = 7.8$ Hz, 2H, H-3'', H-6''), 6.31 (d, $J = 8.4$ Hz, 1H, H-7''), 6.08 (s, 1H, H-1''), ¹³C NMR (75 MHz, DMSO-d₆): δ (ppm) 166.34, 164.17, 151.05, 132.26, 130.60, 127.13, 123.27, 121.48, 117.10, 117.30, 115.07, 114.29, 104.40, 35.46

HRMS calcd for $C_{25}H_{13}O_8Cl_2$ (M-H)⁻: m/z : 511.0066, found: 510.9980

3,3'-(3-μεθοξυ-4-υδροξυ-φαινυλομεθυλενο)-δι-(4-υδροξυ-6-χλωρο-2H-βενζοπυραν-2-όνη) (32f):



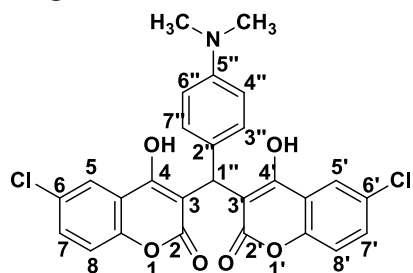
Σε σφαιρική φιάλη εισάγονται 0.27 mmol (52.7 mg) 4-υδροξυ-6-χλωρο-κουμαρίνης και 0.13 mmol (20.4 mg) 3-μεθοξυ-4-υδροξυ-βενζαλδεΐδης σε 873 μ L DES και 437 μ L H_2O . Παραλαμβάνεται υποκίτρινο στερεό.

Απόδοση: 78%, **Σ.Τ.:** 241 °C (decomposed)

¹H NMR (600 MHz, DMSO- d_6): δ (ppm) 8.55 (br, 1H, OH), 7.73 (d, J = 3 Hz, 2H, H-5, H-5'), 7.52 (dd, J = 8.4 Hz, J = 2.4 Hz, 2H, H-7, H-7'), 7.30 (d, J = 8.4 Hz, 2H, H-8, H-8'), 6.60 (s, 1H, H-3''), 6.56 (d, J = 8.4 Hz, 1H, H-6''), 6.48 (d, J = 7.8 Hz, 1H, H-7''), 6.13 (s, 1H, H-1''), 3.54 (s, 3H, OCH₃), ¹³C NMR (75 MHz, DMSO- d_6): δ (ppm) 166.49, 164.23, 151.01, 147.18, 144.32, 132.44, 130.72, 127.23, 123.30, 121.47, 119.25, 117.80, 115.04, 111.60, 104.47, 55.77, 35.83

HRMS calcd for $C_{26}H_{15}O_8Cl_2$ (M-H)⁻: m/z : 525.0222, found: 525.0135

3,3'-(4-διμεθυλαμινο-φαινυλομεθυλενο)-δι-(4,7-διυδροξυ-2H-βενζοπυραν-2-όνη) (32g):



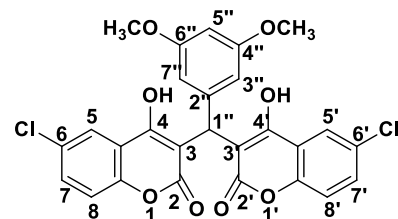
Σε σφαιρική φιάλη εισάγονται 0.33 mmol (64.2 mg) 4-υδροξυ-6-χλωρο-κουμαρίνης και 0.16 mmol (24.4 mg) *p*-διμεθυλαμινο-βενζαλδεΐδης σε 1063 μ L DES και 532 μ L νερό. Παραλαμβάνεται ανοιχτό ροζ στερεό.

Απόδοση: 58%, **Σ.Τ.:** 247-250 °C

¹H NMR (400 MHz, DMSO- d_6): δ (ppm) 7.73 (br, 2H, H-5', H-5'), 7.55 (d, J = 8.4 Hz, 2H, H-7, H-7'), 7.33 (d, J = 8 Hz, 4H, H-3'', H-4'', H-6'', H-7''), 7.21 (d, J = 8 Hz, 2H, H-8, H-8'), 6.23 (s, 1H, H-1''), 3.11 (s, 6H, CH₃), ¹³C NMR (75 MHz, DMSO- d_6): δ (ppm) 166.61, 164.15, 151.19, 141.49, 131.00, 128.19, 127.36, 123.33, 121.28, 119.14, 117.94, 111.17, 103.75, 45.19, 36.04

HRMS calcd for $C_{27}H_{20}O_6NCl_2$ (M+H)⁺: m/z : 524.0589, found: 524.0644

3,3'-(3,5-διμεθοξυ-φαινυλομεθυλενο)-δι-(4-υδροξυ-6-χλωρο-2H-βενζοπυραν-2-όνη) (32h):



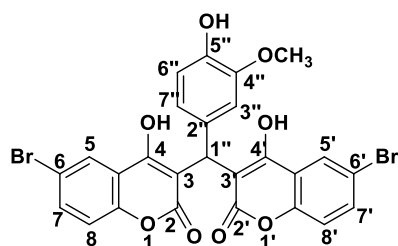
Σε σφαιρική φιάλη εισάγονται 0.34 mmol (67.4mg) 4-υδροξυ-6-χλωρο-κουμαρίνης και 0.17 mmol (28.5 mg) της 3,5-διμεθοξυ-βενζαλδεΐδης σε 1118 μ L DES και 559 μ L H_2O . Παραλαμβάνεται κίτρινο στερεό.

Απόδοση: 48%, **Σ.Τ.:** 187 °C (dec.)

$^1\text{H NMR}$ (600 MHz, DMSO- d_6): δ (ppm) 7.74 (d, $J = 2.4$ Hz, 2H, H-5, H-5'), 7.54 (dd, $J = 9$ Hz, $J = 2.4$ Hz, 2H, H-7, H-7'), 7.31 (d, $J = 9$ Hz, 2H, H-8, H-8'), 6.27 (s, 1H, H-5''), 6.20 (s, 2H, H-3'', H-7''), 6.14 (s, 1H, H-1''), 3.60 (s, 6H, OCH₃), $^{13}\text{C NMR}$ (75 MHz, DMSO- d_6): δ (ppm) 166.52, 164.08, 160.17, 151.06, 144.25, 130.76, 12.21, 123.27, 121.29, 117.77, 105.40, 103.88, 96.21, 54.91, 36.37

HRMS calcd for C₂₇H₁₇O₈Cl₂ (M-H)⁻: m/z : 539.0379, found: 539.0348

3,3'-(3-μεθοξυ-4-υδροξυ-φαινυλομεθυλενο)-δι-(6-βρωμο-4-υδροξυ-2H-βενζοπυραν-2-όνη) (**32i**):

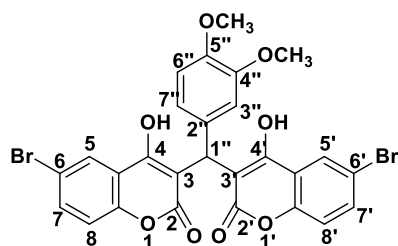


Σε σφαιρική φιάλη εισάγονται 0.25 mmol (59.3 mg) 4-υδροξυ-6-βρωμο-κουμαρίνης και 0.12 mmol (18.7 mg) 3-μεθοξυ-4-υδροξυ-βενζαλδεΐδης σε 803 μL DES και 402 μL . Παραλαμβάνεται πορτοκαλί στερεό.

Απόδοση: 94%, **Σ.Τ.:** 208 °C (dec.)

$^1\text{H NMR}$ (600 MHz, DMSO- d_6): δ (ppm) 7.87 (d, $J = 2.4$ Hz, 2H, H-5, H-5'), 7.72-7.67 (m, 3H, OH), 7.64 (dd, $J = 9$ Hz, $J = 2.4$ Hz, 2H, H-7, H-7'), 7.25 (d, $J = 8.4$ Hz, 2H, H-8, H-8'), 6.59 (s, 1H, H-3''), 6.56 (d, $J = 8.4$ Hz, 1H, H-6''), 6.48 (d, $J = 8.4$ Hz, 1H, H-7''), 6.12 (s, 1H, H-1''), 3.54 (s, 3H, OCH₃)

3,3'-(3,4-διμεθοξυ-φαινυλομεθυλενο)-δι-(6-βρωμο-4-υδροξυ-2H-βενζοπυραν-2-όνη) (**32j**):

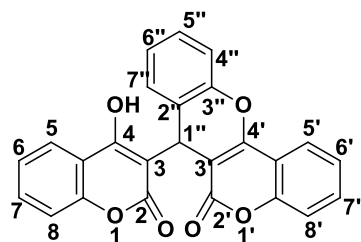


Σε σφαιρική φιάλη εισάγονται 0.38 mmol (74.3 mg) 4-υδροξυ-6-βρωμο-κουμαρίνης και 0.15 mmol (25.6 mg) της 3,4-διμεθοξυ-βενζαλδεΐδης σε 1240 μL DES και 623 μL H₂O. Παραλαμβάνεται κίτρινο στερεό.

Απόδοση: 95%, **Σ.Τ.:** 175-178 °C

$^1\text{H NMR}$ (600 MHz, DMSO- d_6): δ (ppm) 7.86 (d, $J = 2.4$ Hz, 2H, H-5, H-5'), 7.72-7.67 (m, 2H, OH), 7.64 (dd, $J = 8.4$ Hz, $J = 2.4$ Hz, 2H, H-7, H-7'), 7.25 (d, $J = 8.4$ Hz, 2H, H-8, H-8'), 6.74 (d, $J = 8.4$ Hz, 1H, H-7''), 6.62 (s, 1H, H-3''), 6.59 (d, $J = 8.4$ Hz, 1H, H-6''), 6.15 (s, 1H, H-1''), 3.68 (s, 3H, OCH₃), 3.52 (s, 3H, OCH₃)

7-(4-υδροξυ-2-οξο-2H-χρωμεν-3-υλ)χρωμενο[4,3-b]χρωμεν-6(7H)-όνη (**33a**):

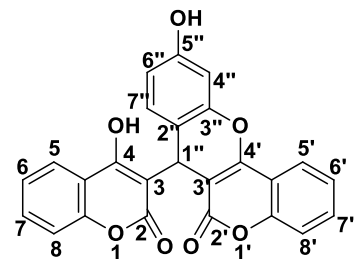


Σε σφαιρική φιάλη εισάγονται 0.71 mmol (115.2 mg) 4-υδροξυ-κουμαρίνης και 0.36 mmol (43.4 mg) της 2-υδροξυ-βενζαλδεΐδης, σε 1544 μL DES και 772 μL νερό. Παραλαμβάνεται λευκό στερεό.

Απόδοση: 69%, **Σ.Τ.:** 248-250 °C (**Σ.Τ. βιβλιογραφίας:** 250-252 °C [57])

$^1\text{H NMR}$ (300 MHz, DMSO-d_6): δ (ppm) 12.14 (br, 2H, OH), 8.10 (dd, $J = 7.8$ Hz, $J = 1.2$ Hz, 1H, H-5'), 8.03 (br, 1H, H-5), 7.70 (t, $J = 7.8$ Hz, 1H, H-7'), 7.60 (t, $J = 7.8$ Hz, 1H, H-7), 7.51-7.44 (m, 2H, H-6, H-8, H-6', H-8'), 7.33 (br, 4H, H-4'', H-5'', H-6'', H-7''), 7.22-7.12 (m, 2H, H-), 5.76 (br, 1H, H-1''), $^{13}\text{C NMR}$ (75 MHz, DMSO-d_6): δ (ppm) 160.88, 160.41, 156.25, 152.22, 151.98, 149.18, 132.45, 132.14, 128.64, 128.33, 125.34, 124.52, 123.92, 122.60, 122.30, 116.46, 116.23, 113.81, 28.67

10-υδροξυ-7-(4-υδροξυ-2-οξο-2H-χρωμεν-3-υλ)χρωμενο[4,3-b]χρωμεν-6(7H)-όνη (33b):



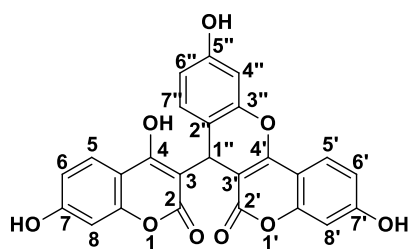
Σε σφαιρική φιάλη εισάγονται 0.82 mmol (133.6 mg) 4-υδροξυ-κουμαρίνης και 0.41 mmol (56.9 mg) της 2,4-διυδροξυ-βενζαλδεΐδης, σε 1800 μL DES και 900 μL νερό. Λαμβάνεται στερεό έντονου ροζ χρώματος.

Απόδοση: 68%, **Σ.Τ.:** 277-278 °C (**Σ.Τ. βιβλιογραφίας:** 272-274 °C [58])

$^1\text{H NMR}$ (600 MHz, DMSO-d_6): δ (ppm) 12.14 (br, H, 4-OH), 9.77 (s, 1H, 5''-OH), 8.09 (dd, $J = 8.4$ Hz, $J = 1.2$ Hz, 1H, H-5'), 8.04 (br, 1H, H-5), 7.69 (t, $J = 8.4$ Hz, 1H, H-7'), 7.59 (t, $J = 7.8$ Hz, 1H, H-7), 7.48 (t, $J = 7.8$ Hz, 1H, H-6'), 7.44 (d, $J = 7.8$ Hz, 1H, H-8'), 7.36 (br, 1H, H-6), 7.32 (br, 1H, H-8), 9.84 (d, $J = 7.8$ Hz, 1H, H-7''), 6.76 (d, $J = 2.4$ Hz, 1H, H-), 6.57 (dd, $J = 8.4$ Hz, $J = 2.4$ Hz, 1H, H-), 5.64 (br, 1H, H-1''), $^{13}\text{C NMR}$ (75 MHz, DMSO-d_6): δ (ppm) 160.53, 160.42, 157.33, 156.25, 152.17, 151.96, 149.70, 132.43, 132.10, 129.18, 124.54, 123.96, 122.71, 116.46, 116.23, 113.88, 113.00, 112.30, 102.77, 28.17

HRMS calcd for $\text{C}_{25}\text{H}_{13}\text{O}_7$ (M-H) $^-$: m/z : 425.0740, found: 425.0652

7-(4,7-διυδροξυ-2-οξο-2H-χρωμεν-3-υλ)-3,10-διυδροξυχρωμενο[4,3-b]χρωμεν-6(7H)-όνη (33c):

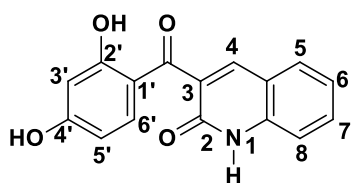


Σε σφαιρική φιάλη εισάγονται 0.34 mmol (61.4 mg) 4,7-διυδροξυ-κουμαρίνης και 0.17 mmol (23.8 mg) της 2,4-διυδροξυ-βενζαλδεΐδης, σε 1123 μL DES και 562 μL νερό. Παραλαμβάνεται λευκό στερεό.

Απόδοση: 94%, **Σημείο τήξης:** 180 °C (dec.)

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, DMSO-d_6): δ (ppm) 10.50 (s, 1H, OH), 9.76 (br, 1H, OH), 9.43 (s, 1H, H-OH), 7.82 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H, H-5'), 7.69 (br, 1H, H-5), 7.06 (d, $J = 7.6$ Hz, 1H, H-6'), 6.85 (d, $J = 8.4$ Hz, 1H, H-6), 6.68 (s, 1H, H-8'), 6.52 (br, 2H, H-8, H-7''), 6.44 (d, $J = 8.4$ Hz, 1H, H-6''), 6.36 (s, 1H, H-4''), 5.43 (br, 1H, H-1'')

3-(2,4-διυδροξυβενζοϊλ)κινολινόνη (**34a**):



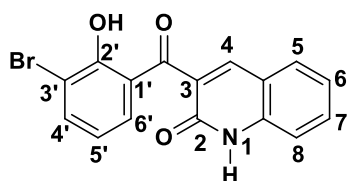
Σε σφαιρική φιάλη εισάγονται 0.29 mmol (50.8 mg) 4,7-διυδροξυ-κουμαρίνης και 0.14 mmol (17.3 mg) της 2-αμινο-βενζαλδεΐδης, σε 950 μ L DES και 465 μ L νερό. Παραλαμβάνεται κίτρινο στερεό.

Απόδοση: 42%, **Σ.Τ.:** 219 °C (dec.)

¹H NMR (600 MHz, DMSO-d₆): δ (ppm) 12.01 (br, 3H, OH, NH), 8.02 (s, 1H, H-4), 7.72 (dd, J = 7.8 Hz, 1H, H-5), 7.58 (td, J = 8.4 Hz, J = 1.2 Hz, 1H, H-6), 7.36 (d, J = 8.4 Hz, 1H, H-8), 7.34 (t, J = 9 Hz, 1H, H-6'), 7.24 (t, J = 7.8 Hz, 1H, H-7), 6.31 (dd, J = 9 Hz 1H, H-5'), 6.29 (d, J = 1.8 Hz, 1H, H-3'), ¹³C NMR (75 MHz, DMSO-d₆): δ (ppm) 196.58, 165.83, 164.70, 159.82, 139.44, 139.36, 135.60, 131.95, 131.91, 129.10, 122.66, 118.54, 115.49, 113.45, 108.83, 102.60

HRMS calcd for C₁₆H₁₀O₄N (M-H)⁻: m/z : 280.0688, found: 280.0621

3-(3-βρωμο-2-υδροξυβενζοϊλ)κινολινόνη (**34b**):



Σε σφαιρική φιάλη εισάγονται 0.38 mmol (91.2 mg) 4-υδροξυ-6-βρωμο-κουμαρίνης και 0.19 mmol (22.9 mg) της 2-αμινο-βενζαλδεΐδης, σε 1234 μ L DES και 617 μ L νερό. Παραλαμβάνεται μπεζ στερεό.

Απόδοση: 31%, **Σ.Τ.:** 295 °C

¹H NMR (300 MHz, DMSO-d₆): δ (ppm) 11.96 (s, 1H, OH), 10.74 (s, 1H, NH), 8.19 (s, 1H, H-4), 7.81 (d, J = 7.8 Hz, 1H, H-5), 7.62-7.56 (m, 3H, H-7, H-8, H-5'), 7.34 (d, J = 8.4 Hz, 1H, H-4'), 7.23 (t, J = 7.5 Hz, 1H, H-6), 6.87 (d, J = 8.7 Hz, 1H, H-6')

HRMS calcd for C₁₆H₉O₃NBr (M-H)⁻: m/z : 341.9844, found: 341.9777

5.5.3 Φασματοσκοπία NMR δύο διαστάσεων (2D NMR)

Τα φάσματα NMR δύο διαστάσεων (2D NMR) ελήφθησαν στο φασματογράφο Varian 600 MHz με χρήση αισθητήρα HCN του Εθνικού Ιδρύματος Ερευνών. Ειδικότερα, τα 2D ετεροπυρηνικά φάσματα ¹H-¹³C HSQC ελήφθησαν με 128 σειριακές FIDs (increments) και 4-32 σαρώσεις ανά FID. Το εύρος λήψης κατά τον F2-άξονα ήταν 9615 Hz και κατά τον άξονα-F1 αντιστοιχούσε στην περιοχή -10 έως 190 ppm. Τα 2D ετεροπυρηνικά φάσματα ¹H-¹³C HMBC ελήφθησαν με 128 ή 256 σειριακές FIDs (increments) και 200 ή 80 σαρώσεις ανά FID για τα μόρια **34a** και **33b**, αντίστοιχα. Το εύρος λήψης κατά τον F2-άξονα ήταν 6200 Hz και κατά τον άξονα-F1 αντιστοιχούσε στην περιοχή (-15 έως 225 ppm).

Τα 2D ομοπυρηνικά φάσματα ¹H-¹H TOCSY ελήφθησαν με 128 ή 200 σειριακές FIDs (increments) και 2 ή 8 σαρώσεις ανά FID για τις ενώσεις **33b** και **34a**, αντίστοιχα. Το εύρος λήψης κατά τον F2-άξονα ήταν 6600 Hz (0 έως 11 ppm) και κατά τον άξονα-F1 επίσης (0 έως 11 ppm). Χρησιμοποιήθηκε χρόνος μίξης (mixing time) 20 ms και 80 ms, αντίστοιχα για τις 2 ενώσεις. Τέλος, το 2D φάσμα ¹H-¹H

NOESY της **33b** ελήφθη με 200 σειριακές FIDs (increments) και 128 σαρώσεις ανά FID. Το εύρος λήψης κατά τον F2-άξονα ήταν 9615 Hz (-2 έως 14 ppm) και κατά τον άξονα-F1 επίσης (-2 έως 14 ppm). Χρησιμοποιήθηκε χρόνος μίξης (mixing time) 1 s.

Η φασματοσκοπική μελέτη 2D NMR πραγματοποιήθηκε σε συνεργασία με την Ερευνήτρια Β του Ινστιτούτου Βιολογίας, Φαρμακευτικής Χημείας και Βιοτεχνολογίας του Ε.Ι.Ε. Μαρία Ζερβού.

5.5.4 Ανακύκλωση και επαναχρησιμοποίηση του NaDES

Όπως περιγράφεται στην παράγραφο 5.4.2, έπειτα από το πέρας της αντίδρασης, προστίθεται νερό στο μίγμα και πραγματοποιείται διήθηση του προϊόντος. Το διήθημα τοποθετείται στους 40 °C και σε 80 rpm σε συσκευή Temperature Controlled Shaker device (Gallenkamp) προκειμένου να πραγματοποιηθεί ήπια εξάτμιση του νερού και στη συνέχεια, ο NaDES που συλλέγεται επαναχρησιμοποιείται σε επόμενη αντίδραση.

5.5.5 Δοκιμή δέσμησης της ελεύθερης ρίζας DPPH

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, σε κάθε θέση ενός πλακιδίου 96 θέσεων (96 well plate), προστίθενται 195 μL αιθανολικού διαλύματος DPPH και 5 μL από κάθε ένα από τα δείγματα προς εξέταση. Παράλληλα, παρασκευάζονται δείγματα αναφοράς (control), τα οποία περιέχουν 195 μL DPPH και 5 μL διμεθυλοσουλφοξειδίου (DMSO). Το plate αναδεύεται ελαφρώς και αφήνεται σε σκοτάδι. Τέλος, με τη βοήθεια του Epoch 2 Microplate Reader της εταιρείας Bio Tek Instruments, μετράται η απορρόφηση στα 515 nm για 30 min και 60 min, και εξετάζεται ως προς την απορρόφηση των control. Ως ένωση αναφοράς χρησιμοποιήθηκε το Trolox. Η δέσμηση (%) της ελεύθερης ρίζας DPPH υπολογίζεται από την εξίσωση (5.1):

$$(\%) \text{ Δέσμηση} = \frac{A_{\text{control}} - A_{\text{sample}}}{A_{\text{control}}} \times 100 \quad (5.1)$$

5.5.6 Δοκιμή αναστολής της οξειδωσης του λινολεϊκού οξέους μέσω του εκκινητή ελευθέρων ριζών AAPH

Σε κυψελίδα χαλαζία προστίθενται 1302 μL ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών αλάτων 0.05 M pH 7.4 (προθερμασμένο στους 37 °C), 14 μL άλατος νατρίου λινελαϊκού οξέος (16 mM) και 14 μL δείγματος (10 mM σε DMSO). Τα δείγματα control περιέχουν DMSO αντί για βιοδραστική ένωση. Ακολουθεί η προσθήκη του εκκινητή, 70 μL AAPH (40 mM), και αμέσως μετράται η απορρόφηση στα 234 nm ($t = 0 \text{ min}$), καθώς και μετά από ένα λεπτό ($t = 1 \text{ min}$) και η αναστολή (%) της λιπιδικής υπεροξειδωσης υπολογίζεται από την εξίσωση (5.2):

$$(\%) \text{ Αναστολή} = \left(1 - \frac{A_{\text{sample}_{t=1\text{min}}} - A_{\text{sample}_{t=0\text{min}}}}{A_{\text{control}_{t=1\text{min}}} - A_{\text{control}_{t=0\text{min}}} \right) \times 100 \quad (5.2)$$

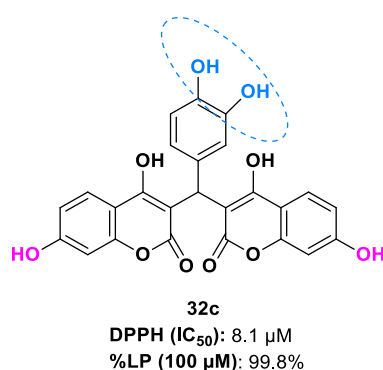
5.6 ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Δέκα νέα δικουμαρινικά ανάλογα (**32a-32j**) συντέθηκαν χρησιμοποιώντας το φυσικό βαθέως ευτηκτικό διαλύτη (NaDES) L-προλίνη/γαλακτικό οξύ = 1:2 σε αναλογία NaDES/H₂O = 2:1 (w/w) και παραλήφθηκαν σε υψηλή καθαρότητα και σε ικανοποιητικές αποδόσεις μεταξύ 50-95%. Η χρήση του NaDES L-προλίνη/γαλακτικό οξύ στην αντίδραση Domino Michael-Knoevenagel αναφέρεται για πρώτη φορά στη βιβλιογραφία.

Είναι αξιοσημείωτο ότι η χρήση διαφορετικών σαλικυλαλδεΐδων οδήγησε στη σύνθεση τριών βενζοπυρανοκουμαρινικών αναλόγων (**33a-33c**), σε αποδόσεις μεταξύ 40-95%, ενώ η χρήση της 2-αμινο-βενζαλδεΐδης οδήγησε στη σύνθεση δύο νέων κινολινονικών παραγώγων (**34a-34b**) σε χαμηλές αποδόσεις (30-40%), όπως βρέθηκε έπειτα από διερεύνηση με φασματοσκοπία ¹H και ¹³C NMR, καθώς και NMR δύο διαστάσεων (HSQC, TOCSY, HMBC, NOESY NMR), αλλά και φασματομετρίας μάζας υψηλής ανάλυσης (HR-MS). Ακόμη, η σύνθεση των νέων κινολινονών με την παρούσα μέθοδο αναφέρεται επίσης πρώτη φορά στη βιβλιογραφία.

Επιπλέον, μελετήθηκε η δυνατότητα ανάκτησης και επαναχρησιμοποίησης του NaDES και βρέθηκε ότι μπορεί να επαναχρησιμοποιηθεί επιτυχώς, χωρίς δηλαδή να μειώνεται σημαντικά η απόδοση της αντίδρασης, τουλάχιστον μέχρι και τρεις φορές, ενισχύοντας τον πράσινο χαρακτήρα της προτεινόμενης συνθετικής πορείας.

Τέλος, τα νέα κουμαρινικά και κινολινονικά ανάλογα μελετήθηκαν ως προς την αντιοξειδωτική τους δράση, με τα παράγωγα **32c** (Σχήμα 5.20) και **32e** (IC₅₀ 8.1 μM και 12.7 μM, στα 60 min, αντίστοιχα) τα οποία διαθέτουν κατεχολικό σύστημα στη δομή τους, και τα παράγωγα **32d**, **32f** και **32i** τα οποία διαθέτουν υδροξύ και μεθοξύ ομάδα σε γειτονικές θέσεις στο φαινολικό δακτύλιο της θέσης 1'' (IC₅₀ 51.6, 63.5 και 37.0 μM, στα 60 min, αντίστοιχα) να παρουσιάζουν αξιόλογη δράση.



Σχήμα 5.20 Χημική δομή του δικουμαρινικού αναλόγου **32c** που επέδειξε την καλύτερη αντιοξειδωτική δράση.

Όσον αφορά την ικανότητα αναστολής της λιπιδικής υπεροξειδωσης (LP) υποκινούμενη από τον εκκινητή ελευθέρων ριζών AAPH, η πλειοψηφία των δικουμαρινικών αναλόγων παρουσίασε ισχυρή δράση (>80%) ενώ τα κινολινονικά ανάλογα **34a** και **34b**, παρουσίασαν ικανοποιητική, αλλά χαμηλότερη

ανασταλτική δράση (70.1% και 68.9%, αντίστοιχα), οδηγώντας στο συμπέρασμα ότι κυριότερη επίδραση στην αντιοξειδωτική δράση φαίνεται να έχει η παρουσία του κουμαρινικού σκελετού, ενώ η ύπαρξη διαφορετικών υποκαταστατών στον δικουμαρινικό σκελετό δε φαίνεται να επιδρά σημαντικά.

5.7 ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- [1] L. Rubab, A. Anum, S.A. Al-Hussain, A. Irfan, S. Ahmad, S. Ullah, A.A. Al-Mutairi, M.E.A. Zaki, *Green Chemistry in Organic Synthesis: Recent Update on Green Catalytic Approaches in Synthesis of 1,2,4-Thiadiazoles*, *Catalysts*. 12 (2022).
<https://doi.org/10.3390/catal12111329>.
- [2] M.A. Karadendrou, I. Kostopoulou, V. Kakokefalou, A. Tzani, A. Detsi, *L-Proline-Based Natural Deep Eutectic Solvents as Efficient Solvents and Catalysts for the Ultrasound-Assisted Synthesis of Aurones via Knoevenagel Condensation*, *Catalysts*. 12 (2022) 249.
<https://doi.org/10.3390/CATAL12030249>.
- [3] R.A. Sheldon, *Green solvents for sustainable organic synthesis: state of the art*, *Green Chem.* 7 (2005) 267–278.
<https://doi.org/10.1039/B418069K>.
- [4] T. Schaub, *Efficient Industrial Organic Synthesis and the Principles of Green Chemistry*, *Chem. – A Eur. J.* 27 (2021) 1865–1869.
<https://doi.org/10.1002/CHEM.202003544>.
- [5] R. Ratti, *Industrial applications of green chemistry: Status, Challenges and Prospects*, *SN Appl. Sci.* 2 (2020).
<https://doi.org/10.1007/S42452-020-2019-6>.
- [6] T.L. Chen, H. Kim, S.Y. Pan, P.C. Tseng, Y.P. Lin, P.C. Chiang, *Implementation of green chemistry principles in circular economy system towards sustainable development goals: Challenges and perspectives*, *Sci. Total Environ.* 716 (2020) 136998.
<https://doi.org/10.1016/J.SCITOTENV.2020.136998>.
- [7] B.A. de Marco, B.S. Rechelo, E.G. Tótolí, A.C. Kogawa, H.R.N. Salgado, *Evolution of green chemistry and its multidimensional impacts: A review*, *Saudi Pharm. J.* 27 (2019) 1–8.
<https://doi.org/10.1016/J.JSPS.2018.07.011>.
- [8] R.C. Cioc, E. Ruijter, R.V.A. Orru, *Multicomponent reactions: advanced tools for sustainable organic synthesis*, *Green Chem.* 16 (2014) 2958–2975.
<https://doi.org/10.1039/C4GC00013G>.
- [9] R.S. Varma, *Journey on greener pathways: from the use of alternate energy inputs and benign reaction media to sustainable applications of nanocatalysts in synthesis and environmental remediation*, *Green Chem.* 16 (2014) 2027–2041.
<https://doi.org/10.1039/C3GC42640H>.
- [10] J.C. Anastas, P.T.; Warner, *Green Chemistry: theory and Practice*, 12 Principles of Green Chemistry, Oxford Univ. Press. (1998) p.30.

- [11] X. Zhou, X. Zhou, C. Wang, H. Zhou, Environmental and human health impacts of volatile organic compounds: A perspective review, *Chemosphere*. 313 (2023) 137489. <https://doi.org/10.1016/J.CHEMOSPHERE.2022.137489>.
- [12] E. David, V.C. Niculescu, Volatile Organic Compounds (VOCs) as Environmental Pollutants: Occurrence and Mitigation Using Nanomaterials, *Int. J. Environ. Res. Public Health*. 18 (2021) 13147. <https://doi.org/10.3390/IJERPH182413147>.
- [13] D. Skarpalezos, A. Detsi, Deep eutectic solvents as extraction media for valuable flavonoids from natural sources, *Appl. Sci*. 9 (2019) 4169. <https://doi.org/10.3390/app9194169>.
- [14] A. Tzani, D. Skarpalezos, A. Papadopoulou, D. Aravopoulou, I. Kleidas, E. Ioannou, E. Voutsas, A. Kyritsis, A. Detsi, Synthesis of novel non-toxic naphthenic and benzoic acid ionic liquids. Structure-properties relationship and evaluation of their biodegradability potential, *J. Mol. Liq.* 296 (2019) 111927. <https://doi.org/10.1016/J.MOLLIQ.2019.111927>.
- [15] G. Kaur, H. Kumar, M. Singla, Diverse applications of ionic liquids: A comprehensive review, *J. Mol. Liq.* 351 (2022) 118556. <https://doi.org/10.1016/J.MOLLIQ.2022.118556>.
- [16] M. Watanabe, M.L. Thomas, S. Zhang, K. Ueno, T. Yasuda, K. Dokko, Application of Ionic Liquids to Energy Storage and Conversion Materials and Devices, *Chem. Rev.* 117 (2017) 7190–7239. <https://doi.org/10.1021/ACS.CHEMREV.6B00504>.
- [17] A.M. Curreri, S. Mitragotri, E.E.L. Tanner, Recent Advances in Ionic Liquids in Biomedicine, *Adv. Sci.* 8 (2021) 2004819. <https://doi.org/10.1002/ADVS.202004819>.
- [18] P. McNeice, P.C. Marr, A.C. Marr, Basic ionic liquids for catalysis: the road to greater stability, *Catal. Sci. Technol.* 11 (2021) 726–741. <https://doi.org/10.1039/D0CY02274H>.
- [19] M. Honarmand, A. Tzani, A. Detsi, Synthesis of novel multi-OH functionalized ionic liquid and its application as dual catalyst-solvent for the one-pot synthesis 4H-pyrans, *J. Mol. Liq.* 290 (2019) 111358. <https://doi.org/10.1016/J.MOLLIQ.2019.111358>.
- [20] E.S. Morais, A.M. Da Costa Lopes, M.G. Freire, C.S.R. Freire, J.A.P. Coutinho, A.J.D. Silvestre, Use of Ionic Liquids and Deep Eutectic Solvents in Polysaccharides Dissolution and Extraction Processes towards Sustainable Biomass Valorization, *Mol.* 25 (2020) 3652. <https://doi.org/10.3390/MOLEC250303652>.

- ULES25163652.
- [21] N. Gjineci, E. Boli, A. Tzani, A. Detsi, E. Voutsas, Separation of the ethanol/water azeotropic mixture using ionic liquids and deep eutectic solvents, *Fluid Phase Equilib.* 424 (2016) 1–7. <https://doi.org/10.1016/J.FLUID.2015.07.048>.
- [22] D. Koukouzelis, A.R.N. Pontillo, S. Koutsoukos, E. Pavlatou, A. Detsi, Ionic liquid – Assisted synthesis of silver mesoparticles as efficient surface enhanced Raman scattering substrates, *J. Mol. Liq.* 306 (2020) 112929. <https://doi.org/10.1016/J.MOLLIQ.2020.112929>.
- [23] S.S. Santos, N. Keppeler, J. Giarolla, E.I. Ferreira, O.A. El Seoud, Applications of Ionic Liquids in Pharmaceutical Sciences, *Funct. Biomater.* (2022) 471–502. https://doi.org/10.1007/978-981-16-7152-4_17.
- [24] M.K. Potdar, M.S. Rasalkar, S.S. Mohile, M.M. Salunkhe, Convenient and efficient protocols for coumarin synthesis via Pechmann condensation in neutral ionic liquids, *J. Mol. Catal. A Chem.* 235 (2005) 249–252. <https://doi.org/10.1016/J.MOLCAT.2005.04.007>.
- [25] H. Valizadeh, S. Vaghefi, One-Pot Wittig and Knoevenagel Reactions in Ionic Liquid as Convenient Methods for the Synthesis of Coumarin Derivatives, 39 (2009) 1666–1678. <https://doi.org/10.1080/00397910.802573163>.
- [26] P. Teli, A. Sethiya, S. Agarwal, An Insight View on Synthetic Protocol, Mechanistic and Biological Aspects of Biscoumarin Derivatives, *ChemistrySelect.* 4 (2019) 13772–13787. <https://doi.org/10.1002/slct.201903632>.
- [27] E.L. Smith, A.P. Abbott, K.S. Ryder, Deep Eutectic Solvents (DESs) and Their Applications, *Chem. Rev.* 114 (2014) 11060–11082. <https://doi.org/10.1021/CR300162P>.
- [28] A.P. Abbott, G. Capper, D.L. Davies, R.K. Rasheed, V. Tambyrajah, Novel solvent properties of choline chloride/urea mixtures, *Chem. Commun.* (2003) 70–71. <https://doi.org/10.1039/B210714G>.
- [29] M. Pätzold, S. Siebenhaller, S. Kara, A. Liese, C. Syltatk, D. Holtmann, Deep Eutectic Solvents as Efficient Solvents in Biocatalysis, *Trends Biotechnol.* 37 (2019) 943–959. <https://doi.org/10.1016/J.TIBTECH.2019.03.007>.
- [30] S.K. Singh, A.W. Savoy, Ionic liquids synthesis and applications: An overview, *J. Mol. Liq.* 297 (2020) 112038. <https://doi.org/10.1016/J.MOLLIQ.2019.112038>.
- [31] B.B. Hansen, S. Spittle, B. Chen, D. Poe, Y. Zhang, J.M. Klein, A. Horton, L. Adhikari, T. Zelovich, B.W. Doherty, B. Gurkan, E.J. Maginn, A. Ragauskas, M. Dadmun, T.A. Zawodzinski,

- G.A. Baker, M.E. Tuckerman, R.F. Savinell, J.R. Sangoro, *Deep Eutectic Solvents: A Review of Fundamentals and Applications*, *Chem. Rev.* 121 (2021) 1232–1285.
<https://doi.org/10.1021/ACS.CHEMREV.0C00385>.
- [32] A. Paiva, R. Craveiro, I. Aroso, M. Martins, R.L. Reis, A.R.C. Duarte, *Natural deep eutectic solvents - Solvents for the 21st century*, *ACS Sustain. Chem. Eng.* 2 (2014) 1063–1071.
<https://doi.org/10.1021/sc500096j>.
- [33] R. Svirgelj, N. Dossi, C. Grazioli, R. Toniolo, *Deep Eutectic Solvents (DESs) and Their Application in Biosensor Development*, *Sensors (Basel)*. 21 (2021).
<https://doi.org/10.3390/S21134263>.
- [34] A. Tzani, S. Kalafateli, G. Tatsis, M. Bairaktari, I. Kostopoulou, A.R.N. Pontillo, A. Detsi, *Natural Deep Eutectic Solvents (NADESs) as Alternative Green Extraction Media for Ginger (*Zingiber officinale* Roscoe)*, *Sustain. Chem.* 2 (2021) 576–598.
<https://doi.org/10.3390/SUSCHEM2040032>.
- [35] M. Jones, A. Tzani, I. Pitterou, F. Divani, T. Tsiaka, G. Sotiroudis, P. Zoumpoulakis, A. Detsi, *Green Extraction of Greek Propolis Using Natural Deep Eutectic Solvents (NADES) and Incorporation of the NADES-Extracts in Cosmetic Formulation*, *Sustain. Chem.* 4 (2022) 8–25.
<https://doi.org/10.3390/SUSCHEM4010002>.
- [36] L. Lomba, M.P. Ribate, E. Zaragoza, J. Concha, M.P. Garralaga, D. Errazquin, C.B. García, B. Giner, *Deep Eutectic Solvents: Are They Safe?*, *Appl.* 11 (2021) 10061.
<https://doi.org/10.3390/APP112110061>.
- [37] Y.H. Choi, J. van Spronsen, Y. Dai, M. Verberne, F. Hollmann, I.W.C.E. Arends, G.J. Witkamp, R. Verpoorte, *Are Natural Deep Eutectic Solvents the Missing Link in Understanding Cellular Metabolism and Physiology?*, *Plant Physiol.* 156 (2011) 1701–1705.
<https://doi.org/10.1104/PP.111.178426>.
- [38] Y. Liu, J.B. Friesen, J.B. McAlpine, D.C. Lankin, S.N. Chen, G.F. Pauli, *Natural Deep Eutectic Solvents: Properties, Applications, and Perspectives*, *J. Nat. Prod.* 81 (2018) 679–690.
<https://doi.org/10.1021/ACS.JNATPROD.7B00945>.
- [39] A.P. Abbott, G. Capper, S. Gray, *Design of improved deep eutectic solvents using hole theory*, *ChemPhysChem.* 7 (2006) 803–806.
<https://doi.org/10.1002/cphc.200500489>.
- [40] Q. Zhang, K. De Oliveira Vigier, S. Royer, F. Jérôme, *Deep eutectic solvents: Syntheses, properties and applications*, *Chem. Soc. Rev.* 41 (2012) 7108–7146.
<https://doi.org/10.1039/c2cs35178a>.

- [41] N. Rodriguez Rodriguez, A. Van Den Bruinhorst, L.J.B.M. Kollau, M.C. Kroon, K. Binnemans, Degradation of Deep-Eutectic Solvents Based on Choline Chloride and Carboxylic Acids, *ACS Sustain. Chem. Eng.* 7 (2019) 11521–11528. <https://doi.org/10.1021/ACSSUSCHEMENG.9B01378>.
- [42] T. El Achkar, H. Greige-Gerges, S. Fourmentin, Basics and properties of deep eutectic solvents: a review, *Environ. Chem. Lett.* 19 (2021) 3397–3408. <https://doi.org/10.1007/S10311-021-01225-8>.
- [43] I.A. Rather, R. Ali, An Efficient and Versatile Deep Eutectic Solvent-Mediated Green Method for the Synthesis of Functionalized Coumarins, *ACS Omega.* 7 (2022) 10649–10659. <https://doi.org/10.1021/ACSOMEGA.2C00293>.
- [44] M. Lončarić, M. Sušjenka, M. Molnar, An Extensive Study of Coumarin Synthesis via Knoevenagel Condensation in Choline Chloride Based Deep Eutectic Solvents, *Curr. Org. Synth.* 17 (2020) 98–108. <https://doi.org/10.2174/1570179417666200116155704>.
- [45] F. Keshavarzipour, H. Tavakol, The synthesis of coumarin derivatives using choline chloride/zinc chloride as a deep eutectic solvent, *J. Iran. Chem. Soc.* 13 (2016) 149–153. <https://doi.org/10.1007/S13738-015-0722-9>.
- [46] C. Sun, W. Zhao, X. Wang, Y. Sun, X. Chen, A pharmacological review of dicoumarol: An old natural anticoagulant agent, *Pharmacol. Res.* 160 (2020) 105193. <https://doi.org/10.1016/J.PHRS.2020.105193>.
- [47] D. Simijonović, E.E. Vlachou, Z.D. Petrović, D.J. Hadjipavlou-Litina, K.E. Litinas, N. Stanković, N. Mihović, M.P. Mladenović, Dicoumarol derivatives: Green synthesis and molecular modelling studies of their anti-LOX activity, *Bioorg. Chem.* 80 (2018) 741–752. <https://doi.org/10.1016/J.BIOORG.2018.07.021>.
- [48] M. Mohammadi-Khanaposhtani, H. Yahyavi, E. Barzegaric, S. Imanparast, M.M. Heravi, M. Ali Faramarzi, A. Foroumadi, H. Adibi, B. Larijani, M. Mahdavi, New Biscoumarin Derivatives as Potent α -Glucosidase Inhibitors: Synthesis, Biological Evaluation, Kinetic Analysis, and Docking Study, 40 (2018) 915–926. <https://doi.org/10.1080/10406638.2018.1509359>.
- [49] A. Tzani, C. Vaitsis, E. Kritsi, M. Smiljkovic, M. Sokovic, P. Zoumpoulakis, A. Detsi, Green synthesis of bis-(β -dicarbonyl)-methane derivatives and biological evaluation as putative anticandidial agents, *J. Mol. Struct.* 1216 (2020) 128276. <https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2020.128276>.
- [50] K.M. Khan, S. Iqbal, M.A. Lodhi, G.M. Maharvi, Zia-Ullah, M.I. Choudhary, Atta-ur-Rahman, S. Perveen, Biscoumarin: New

- class of urease inhibitors; Economical synthesis and activity, *Bioorganic Med. Chem.* 12 (2004) 1963–1968. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2004.01.010>.
- [51] N.O. Mahmoodi, Z. Jalalifard, G.P. Fathanbari, Green synthesis of bis-coumarin derivatives using Fe(III) as a catalyst and investigation of their biological activities, *J. Chinese Chem. Soc.* 67 (2020) 172–182. <https://doi.org/10.1002/JCCS.201800444>.
- [52] N. Hamdi, M.C. Puerta, P. Valerga, Synthesis, structure, antimicrobial and antioxidant investigations of dicoumarol and related compounds, *Eur. J. Med. Chem.* 43 (2008) 2541–2548. <https://doi.org/10.1016/J.EJMECH.2008.03.038>.
- [53] Y.P. Sui, H.R. Huo, J.J. Xin, J. Li, X.J. Li, X.L. Du, H. Ma, H.Y. Zhou, H.D. Zhan, Z.J. Wang, C. Li, F. Sui, M.K. Li, D.J. McPhee, Antibacterial and Antitumor Activities of Biscoumarin and Dihydropyran Derivatives, *Molecules.* 20 (2015) 17614. <https://doi.org/10.3390/MOLECULES200917614>.
- [54] A. Tzani, A. Douka, A. Papadopoulos, E.A. Pavlatou, E. Voutsas, A. Detsi, Synthesis of Biscoumarins Using Recyclable and Biodegradable Task-Specific Ionic Liquids, *ACS Sustain. Chem. Eng.* 1 (2013) 1180–1185. <https://doi.org/10.1021/sc4001093>.
- [55] P. Mura, Analytical techniques for characterization of cyclodextrin complexes in aqueous solution: A review, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 101 (2014) 238–250. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2014.02.022>.
- [56] S.S. Xie, X.B. Wang, J.Y. Li, L. Yang, L.Y. Kong, Design, synthesis and evaluation of novel tacrine-coumarin hybrids as multifunctional cholinesterase inhibitors against Alzheimer's disease, *Eur. J. Med. Chem.* 64 (2013) 540–553. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2013.03.051>.
- [57] S. Ahadi, M. Zolghadr, H.R. Khavasi, A. Bazgir, An organocatalytic three-component synthesis of chromeno[4,3-b]chromenones, *J. Iran. Chem. Soc.* 11 (2014) 155–162. <https://doi.org/10.1007/S13738-013-0285-6>.
- [58] S. Abdolmohammadi, TiO₂ NPs-Coated Carbon Nanotubes as a Green and Efficient Catalyst for the Synthesis of [1]Benzopyrano[b][1]benzopyranones and Xanthenols in Water, *Comb. Chem. High Throughput Screen.* 21 (2018) 594–601. <https://doi.org/10.2174/1386207321666181018164739>.

Κεφάλαιο 6ο

ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΝΕΑΣ ΠΡΑΣΙΝΗΣ ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑΣ ΓΙΑ
ΤΗ ΣΥΝΘΕΣΗ ΚΟΥΜΑΡΙΝΙΚΩΝ ΑΝΑΛΟΓΩΝ ΜΕΣΩ
ΑΝΤΙΔΡΑΣΗΣ SUZUKI-MIYAUURA

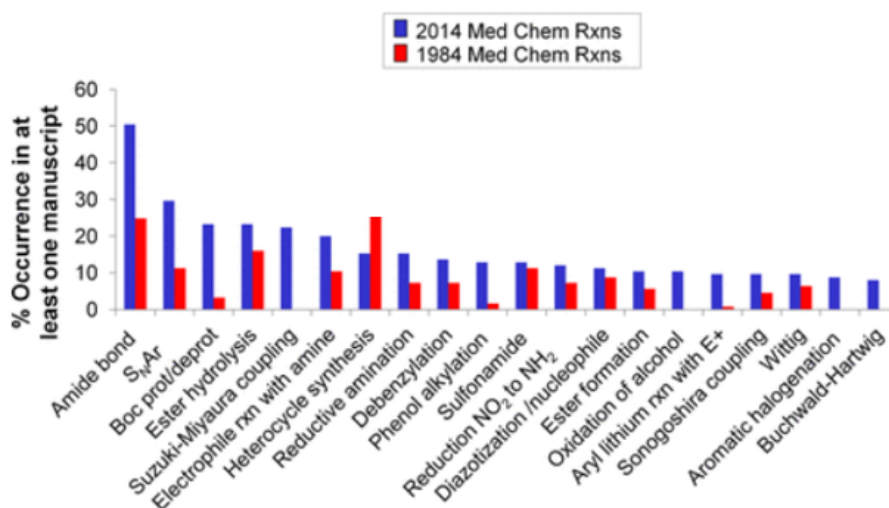
6.1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ

6.1.1 Αντιδράσεις σχηματισμού δεσμού άνθρακα-άνθρακα

Οι αντιδράσεις σχηματισμού δεσμού άνθρακα-άνθρακα (C-C coupling) είναι από τις περισσότερο χρησιμοποιούμενες χημικές αντιδράσεις οργανικής σύνθεσης, καθώς τα προϊόντα τους βρίσκουν εφαρμογή σε διάφορες βιομηχανίες, όπως φαρμάκων, απορρυπαντικών και γεωργίας. Ειδικότερα, η μελέτη αντιδράσεων σχηματισμού δεσμού άνθρακα-άνθρακα έχει ξεκινήσει από τον 19^ο αιώνα, με χαμηλές ωστόσο αποδόσεις λόγω της δημιουργίας παραπροϊόντων. Στη συνέχεια, μετά το 1960, ανακαλύφθηκε ότι η χρήση μετάλλων ως καταλύτες οδήγησε σε υψηλότερες αποδόσεις. Ορισμένες από τις περισσότερο χρησιμοποιούμενες αντιδράσεις σχηματισμού δεσμού άνθρακα-άνθρακα είναι οι αντιδράσεις Heck, Wurtz και Suzuki-Miyaura [1–3].

6.1.2 Αντίδραση Suzuki-Miyaura

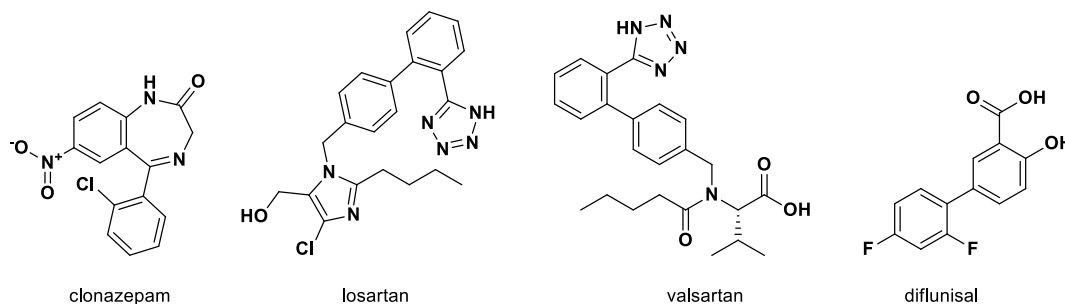
Η αντίδραση Suzuki-Miyaura ανακαλύφθηκε το 1979 από τους Miyaura, Yamada, και Suzuki [4] και αποτελεί την αντίδραση μεταξύ ενός αλκυλαλογονιδίου με διάφορα παράγωγα που φέρουν βόριο, όπως βορονικά οξέα, παρουσία μεταλλικού καταλύτη, συνήθως σε βασικό περιβάλλον. Ειδικότερα, συνήθως χρησιμοποιείται παλλάδιο, ενώ άλλοι μεταλλικοί καταλύτες που έχουν χρησιμοποιηθεί είναι το νικέλιο [5], ο σίδηρος [6] κι ο χαλκός [7]. Η αντίδραση Suzuki-Miyaura μία από τις πλέον χρησιμοποιούμενες αντιδράσεις στην οργανική συνθετική και φαρμακευτική χημεία, όπως φαίνεται στην Εικόνα 6.1 [8].



Εικόνα 6.1 Περισσότερο χρησιμοποιούμενες αντιδράσεις οργανικής σύνθεσης σε επιστημονικές δημοσιεύσεις του 1984 και 2014 [8].

Η αντίδραση Suzuki-Miyaura χρησιμοποιείται ιδιαίτερα στη φαρμακευτική βιομηχανία για τη σύνθεση φαρμάκων όπως η λοσαρτάνη, η βαλσαρτάνη, διφλουνιζάλη, αταζαναβίρη και κλοναζεπάμη (Σχήμα 6.2). Πλεονεκτήματά της αποτελούν το μεγάλο εύρος μορίων που μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως

υπόστρωμα, οι σχετικά ήπιες συνθήκες αντίδρασης (συνήθως 60 °C – 100 °C), καθώς και η δυνατότητα χρήσης νερού ως διαλύτη σε ορισμένες περιπτώσεις [9]. Ωστόσο, τόσο οι μεταλλικοί καταλύτες όσο και οι οργανικοί διαλύτες που συνήθως χρησιμοποιούνται αποτελούν κίνδυνο για το περιβάλλον.



Εικόνα 6.2 Χημικές δομές φαρμακευτικών ενώσεων που συντίθενται μέσω της μεθόδου Suzuki-Miyaura.

6.1.3 Πράσινες προσεγγίσεις στην αντίδραση Suzuki-Miyaura

Τα τελευταία χρόνια, πραγματοποιούνται εντατικές ερευνητικές προσπάθειες ανάπτυξης περισσότερο πράσινων μεθόδων για την πραγματοποίηση της αντίδρασης Suzuki-Miyaura. Οι προσεγγίσεις αυτές αφορούν κυρίως την ανάπτυξη νέων καταλυτών [10,11] και τη χρήση πράσινων διαλυτών [12].

Καταλύτες

Οι συνηθέστερα χρησιμοποιούμενοι καταλύτες στην αντίδραση Suzuki-Miyaura είναι ενώσεις παλλαδίου όπως το χλωριούχο ή το οξικό παλλάδιο, αλλά και σύμπλοκα παλλαδίου, όπως οι τριφαινυλοφωσφίνες, οι οποίες είναι ευοξειδωτές και τοξικές. Τα σύμπλοκα παλλαδίου οδηγούν εν γένει σε υψηλότερες αποδόσεις και στερεοεκλεκτικότητα, ωστόσο, ενέχουν περιβαλλοντικούς κινδύνους ενώ δε δύνανται να απομονωθούν και να επαναχρησιμοποιηθούν [13].

Η χρήση ετερογενών καταλυτών παλλαδίου φαίνεται να αποτελεί μία πολλά υποσχόμενη λύση καθώς μπορούν εύκολα να απομονωθούν μετά το πέρας της αντίδρασης. Πιο συγκεκριμένα, έχει μελετηθεί η ακινητοποίηση παλλαδίου σε νανοσωματίδια πυριτίου [14], γραφένιο [15], μεταλλικά οξείδια [16], νανοσωλήνες άνθρακα [17], κ.α. τα οποία εφαρμόστηκαν με επιτυχία στην αντίδραση Suzuki-Miyaura. Επιπλέον, έχει μελετηθεί η χρήση νανοσωματιδίων παλλαδίου ως καταλύτες ή και υβριδικών νανοσωματιδίων παλλαδίου-οξειδίου του σιδήρου (II, III), Pd/Fe₃O₄, τα οποία φέρουν μαγνητικές ιδιότητες και μπορούν να ανακτηθούν και να επαναχρησιμοποιηθούν [18,19].

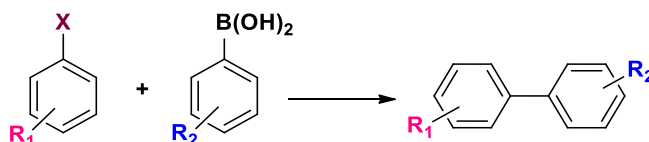
Ακόμη, τα τελευταία χρόνια, εξετάζεται η παρασκευή συμπλόκων παλλαδίου με κυκλοδεξτρίνες, φυσικούς κυκλικούς ολιγοσακχαρίτες που σχηματίζουν σύμπλοκα εγκλεισμού με πληθώρα μορίων, αυξάνοντας την υδατοδιαλυτότητά τους. Σε πρόσφατη (2022) ερευνητική εργασία των Shinde et al. [20],

παρασκευάστηκε ένα σύμπλοκο τροποποιημένης β-κυκλοδεξτρίνης με οξικό παλλάδιο (PdLn@Et-β-CD), το οποίο παρουσίασε υψηλή υδατοδιαλυτότητα. Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκε η αντίδραση Suzuki-Miyaura μεταξύ πλήθους διαφορετικών αλκυλαλογονιδίων και αρυλο-βορονικών οξέων, παρουσία του συμπλόκου PdLn@Et-β-CD και ανθρακικού καλίου ως βάση, σε νερό, στους 60 °C, οδηγώντας σε πολύ υψηλές αποδόσεις. Ακόμη, ο καταλύτης μπορεί να απομονωθεί και να επαναχρησιμοποιηθεί χωρίς να μειώνεται σημαντικά η απόδοση της αντίδρασης έως και 7 φορές. Παρόλα αυτά, ακόμη και αυτές οι προσεγγίσεις συνοδεύονται πολλές φορές από υψηλό κόστος και αυξημένη δυσκολία παρασκευής.

Διαλύτες

Η αντίδραση Suzuki-Miyaura πραγματοποιείται σε ένα πλήθος οργανικών πολικών και άπολων διαλυτών, όπως N,N-Διμεθυλοφορμαμίδιο (DMF), τετραϋδροφουράνιο (THF), διμεθυλοσουλφοξείδιο (DMSO), μεθανόλη, τολουόλιο κ.α. [2,21–23]. Για το σκοπό αυτό απαιτείται η χρήση εναλλακτικών διαλυτών, όπως νερό ή και Ιοντικά Υγρά (IY ή ionic liquids, IL) [24,25] και Βαθέως Ευτηκτικοί Διαλύτες (DES) [26,27].

Η σύνθεση υποκατεστημένων διφαινυλίων όπως φαίνεται στο Σχήμα 6.1 έχει μελετηθεί από πληθώρα ερευνητικών ομάδων τόσο με τη χρήση νερού και υδατικών εκχυλισμάτων, όσο και με IY και σπανιότερα DES ως διαλύτες και τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στον Πίνακα 6.1.



Σχήμα 6.1 Σύνθεση υποκατεστημένων διφαινυλίων.

Πίνακας 6.1 Συνθήκες σύνθεσης υποκατεστημένων διφαινυλίων μέσω πράσινων προσεγγίσεων.

Διαλύτης	Καταλύτης	Βάση	Θερμοκρασία	Χρόνος	Απόδοση (%)	Βιβλ. ¹
H ₂ O	Σύμπλοκο παλλάδιου (SiO ₂ -Fe ₃ O ₄ -IL@Pd)	K ₂ CO ₃	80 °C	10-22 h	88-95	[28]
Υδατικό εκχύλισμα μπανάνας	Pd(OAc) ₂	-	Περιβάλλοντος	5-20 min	92-99	[29]
Υδατικό εκχύλισμα βιοαποβλήτων παραγωγής ρυζιού	Pd(OAc) ₂	-	Περιβάλλοντος	2-4 h	45-90	[30]
Μαννιτόλη/Διμεθυλο ουρία/NH ₄ Cl	Pd(OAc) ₂	Na ₂ CO ₃	90 °C	6 h	78-97	[31]
Πολυαιθυλενογλυκόλη 300	τρεις(διβενζυλιδενοακετόνη) διπαλλάδιο	K ₂ CO ₃	55 °C	1 h	60-95	[32]
Τριμεθυλοβουτυλαμμώνιο/δισ(τριφθορομεθανοσουλφονυλ)ιμίδιο ([TMBA]NTf ₂)	Νανοςύνθετο παλλάδιο	K ₂ CO ₃	80 °C	12-18 h	24-96	[33]

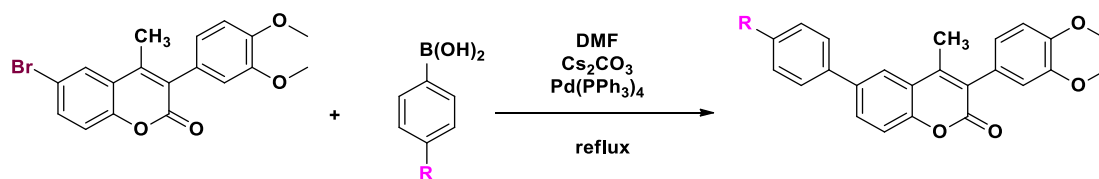
¹Βιβλιογραφία

Παρατηρείται ότι η χρήση πράσινων διαλυτών οδηγεί σε εξίσου υψηλές αποδόσεις και πολύ συχνά και σε μικρότερους χρόνους αντίδρασης. Τέλος, τα τελευταία χρόνια η πραγματοποίηση της αντίδρασης Suzuki-Miyaura εξετάζεται και απουσία διαλυτών, μέσω μηχανοχημικών μεθόδων, όπως η μέθοδος ball milling [34].

6.1.4 Αντίδραση Suzuki-Miyaura για τη σύνθεση κουμαρινών

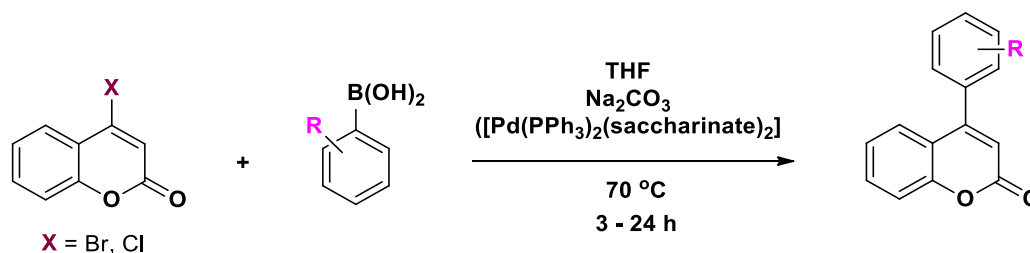
Η σύνθεση νέων κουμαρινικών αναλόγων μπορεί να πραγματοποιηθεί και μέσω της αντίδρασης Suzuki-Miyaura. Ωστόσο, αξίζει να σημειωθεί ότι δεν υπάρχουν πολλές ερευνητικές μελέτες που να χρησιμοποιούν τον κουμαρινικό σκελετό ως αντιδρών για την αντίδραση Suzuki-Miyaura [35–37], ενώ δεν υπάρχουν καθόλου αναφορές για την πραγματοποίησή της σε πράσινους διαλύτες.

Για παράδειγμα, σε ερευνητική μελέτη των Roussaki et al. [38], πραγματοποιήθηκε η σύνθεση νέων 3,6-διαρυλο-κουμαρινικών αναλόγων. Για το σκοπό αυτό, εξετάστηκαν διαφορετικοί καταλύτες ($\text{Pd}(\text{OAc})_2$, Pd/C , $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$), αλλά και βάσεις (Na_2CO_3 , CaCO_3 , Cs_2CO_3), ενώ ως διαλύτης χρησιμοποιήθηκε τόσο τολουόλιο όσο και *N,N*-Διμεθυλοφορμαμίδιο (DMF). Τα προϊόντα ελήφθησαν σε αποδόσεις της τάξης του 40%, σύμφωνα με τη βέλτιστη μέθοδο που παρουσιάζεται στο Σχήμα 6.2.



Σχήμα 6.2 Σύνθεση 3,6-διαρυλο-κουμαρινικών αναλόγων μέσω αντίδρασης Suzuki-Miyaura.

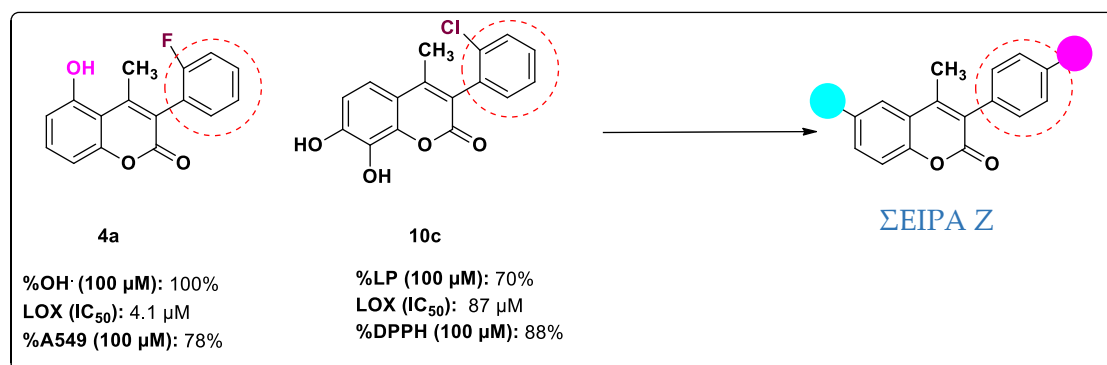
Επιπλέον, η ερευνητική ομάδα των Shah και των συνεργατών του [39], πραγματοποίησε επιτυχώς τη σύνθεση μίας μεγάλης ομάδας 4-αρυλο-κουμαρινικών παραγώγων, σε διαλύτη τετραϋδροφουράνιο (THF), παρουσία βάσης Na_2CO_3 στους 70 °C για 3-24 h. Ακόμη, ως καταλύτης χρησιμοποιήθηκε ένα σύμπλοκο τριφαινυλο φωσφορικού παλλαδίου και ζαχαρίνης ($[\text{Pd}(\text{PPh}_3)_2(\text{saccharinate})_2]$). Τα παράγωγα συντέθηκαν σε υψηλές αποδόσεις μεταξύ 70 και 98% (Σχήμα 6.3).



Σχήμα 6.3 Σύνθεση 4-αρυλο-κουμαρινικών αναλόγων μέσω αντίδρασης Suzuki-Miyaura.

6.2 ΣΚΟΠΟΣ

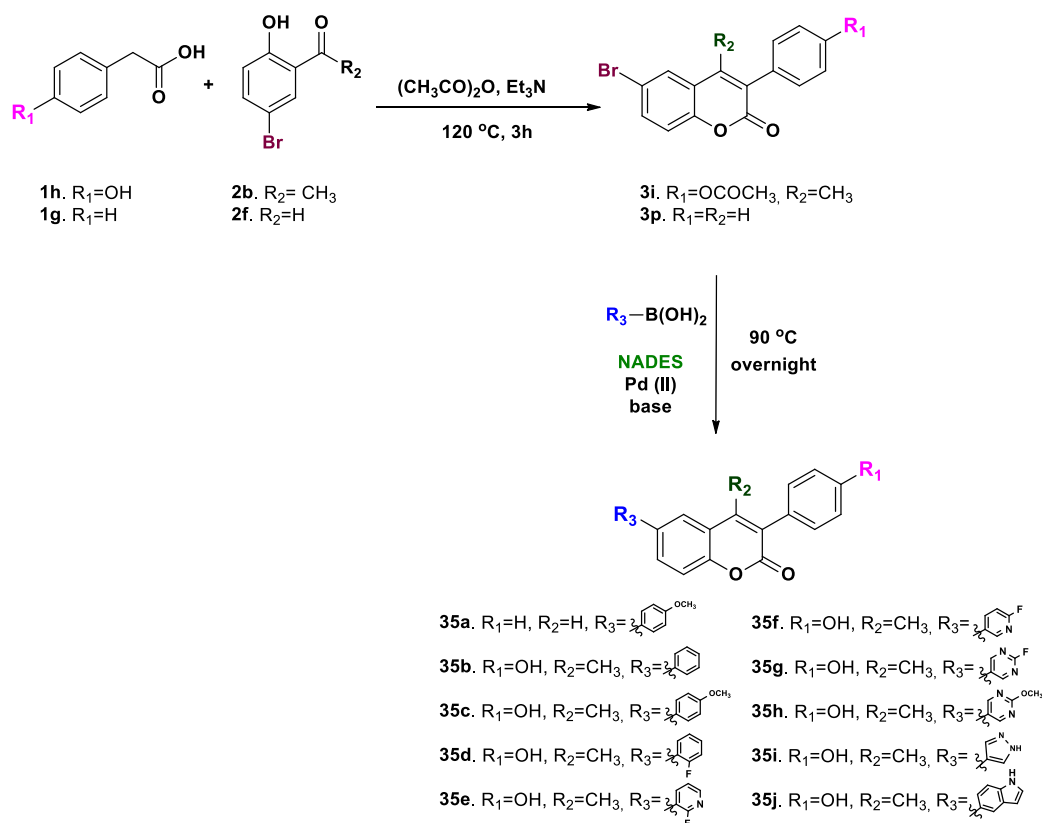
Ο σχεδιασμός των νέων κουμαρινικών αναλόγων της Σειράς Z πραγματοποιήθηκε χρησιμοποιώντας ως μόρια οδηγούς τα 3-αρυλο-κουμαρινικά ανάλογα των Σειρών A και B που επέδειξαν αξιόλογη βιολογική δράση. Στόχο αποτέλεσε η σύνθεση νέων 3,6-διυποκατεστημένων-κουμαρινικών παραγώγων με αξιόλογη κυτταροτοξική δράση, τα οποία φέρουν αρυλο ομάδα στη θέση 3 και διαφορετικούς αρυλο ή ετεροκυκλικούς αρωματικούς δακτυλίους στη θέση 6 του κουμαρινικού σκελετού. Πιο συγκεκριμένα, ως μόρια οδηγοί χρησιμοποιήθηκαν οι ενώσεις **4a** και **10c**, οι οποίες επέδειξαν αξιόλογη αντιοξειδωτική δράση και ανασταλτική δράση έναντι της λιποξυγονάσης (LOX) από σόγια, ενώ η **4a** παρουσίασε και ισχυρή κυτταροτοξικότητα έναντι της ανθρώπινης καρκινικής σειράς πνεύμονα A549 (Σχήμα 6.4). Επιπρόσθετο στόχο του συγκεκριμένου κεφαλαίου αποτελεί η ανάπτυξη μίας περισσότερο πράσινης και φιλικής προς το περιβάλλον μεθόδου για την αντίδραση Suzuki-Miyaura, μέσω της χρήσης φυσικών βαθέως ευτηκτικών διαλυτών.



Σχήμα 6.4 Σχεδιασμός νέας Σειράς κουμαρινικών αναλόγων (Σειρά Z).

6.3 ΣΧΕΔΙΑΣΜΟΣ ΚΑΙ ΣΥΝΘΕΣΗ ΤΩΝ ΝΕΩΝ ΚΟΥΜΑΡΙΝΙΚΩΝ ΑΝΑΛΟΓΩΝ

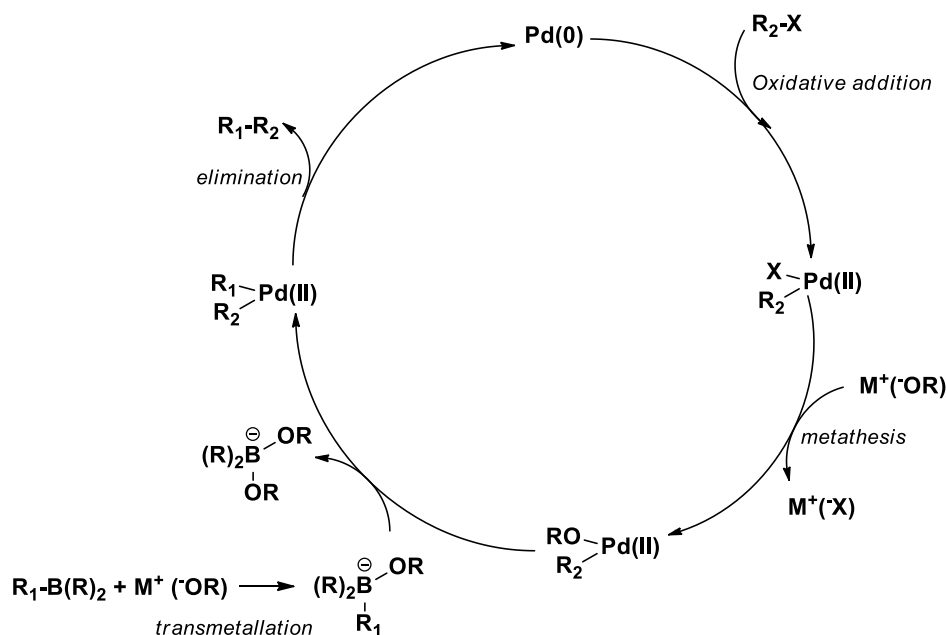
Η σύνθεση των νέων κουμαρινικών αναλόγων της Σειράς Z, πραγματοποιήθηκε μέσω αντίδρασης Suzuki-Miyaura μεταξύ των 6-βρωμο-3-αρυλο-κουμαρινών **3i** και **3p** με διαφορετικά αρυλο και ετεροκυκλικά αρωματικά βορονικά οξέα, χρησιμοποιώντας φυσικούς βαθέως ευτηκτικούς διαλύτες, παρουσία βάσης και καταλύτη παλλαδίου στους 90 °C, σύμφωνα με το γενικό Σχήμα 6.5.



Σχήμα 6.5 Συνθετική πορεία των νέων κουμαρινικών αναλόγων της Σειράς Z.

Μηχανισμός αντίδρασης Suzuki-Miyaura

Ο γενικός μηχανισμός της αντίδρασης Suzuki-Miyaura μεταξύ ενός οργανοβορονικού παραγώγου ($R_1-B(R)_2$) και ενός αλκυλαλογονιδίου (R_2-X) παρουσία βάσης (MOR) και καταλύτη παλλαδίου παρουσιάζεται στο Σχήμα 6.6.



Σχήμα 6.6 Μηχανισμός αντίδρασης Suzuki-Miyaura.

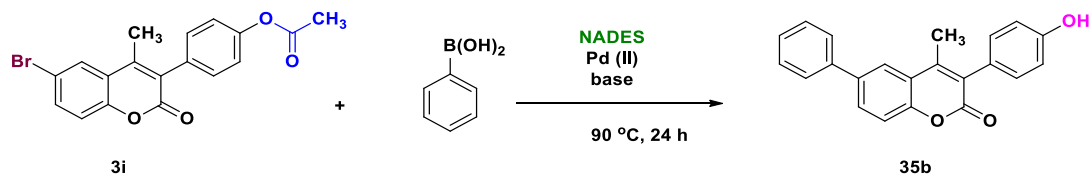
Η αντίδραση Suzuki-Miyaura ξεκινά μέσω οξειδωτικής προσθήκης ενός αλκυλαλογονιδίου στο στοιχειακό παλλάδιο $[Pd(0)]$ προς σχηματισμό του $Pd(II)$. Στη συνέχεια, πραγματοποιείται ανταλλαγή μεταξύ του ανιόντος της βάσης και του καταλύτη παλλαδίου (μετάθεση) και στη συνέχεια ανταλλαγή μετάλλων μεταξύ του $Pd(II)$ και του οργανοβορονικού συμπλόκου (transmetallation). Τελευταίο βήμα αποτελεί ο σχηματισμός του δεσμού C-C και του τελικού προϊόντος (R_1-R_2), καθώς και η αναγέννηση του στοιχειακού καταλύτη [40,41].

6.4 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ-ΣΥΖΗΤΗΣΗ

6.4.1 Σύνθεση των νέων κουμαρινικών αναλόγων

Η αντίδραση Suzuki-Miyaura πραγματοποιείται σε βασικό περιβάλλον παρουσία καταλύτη παλλαδίου, ενώ συνήθεις διαλύτες που χρησιμοποιούνται είναι το τολουόλιο, διοξάνιο και N,N-Διμεθυλοφορμαμίδιο [42]. Ακόμη, ως καταλύτης παλλαδίου συχνά χρησιμοποιείται το τετράκις-τριφαινυλο φωσφορικό παλλάδιο, ωστόσο είναι γνωστό ότι η χρήση φωσφινών πρέπει να αποφεύγεται λόγω αυξημένης τοξικότητας [43].

Σε μία προσπάθεια να αναπτυχθεί μία πιο πράσινη συνθετική μεθοδολογία για την αντίδραση Suzuki-Miyaura, εξετάστηκε η χρήση φυσικών βαθέως ευτηκτικών διαλυτών (NaDES) καθώς και γλυκερόλης, ως διαλύτες. Ως βάσεις μελετήθηκαν το ανθρακικό νάτριο (Na_2CO_3) και το ανθρακικό κάλιο (K_2CO_3) ενώ ως καταλύτης χρησιμοποιήθηκε τόσο οξικό παλλάδιο ($\text{Pd}(\text{OAc})_2$) όσο και χλωριούχο παλλάδιο (PdCl_2). Η αντίδραση-μοντέλο μεταξύ της 3-(4-ακετυλοξυφαινυλο)-6-βρωμο-4-μεθυλο-κουμαρίνης (**3i**) και του φαινυλο-βορονικού οξέος (Σχήμα 6.7) χρησιμοποιήθηκε για να βελτιστοποιηθούν οι συνθήκες και τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στον Πίνακα 6.2.



Σχήμα 6.7 Πρότυπη αντίδραση για τη μελέτη της αντίδρασης Suzuki-Miyaura.

Πίνακας 6.2 Συνθήκες που μελετήθηκαν στην αντίδραση-μοντέλο και αποδόσεις. Χρόνος αντίδρασης: 24 h, Θερμοκρασία: 90 °C.

Διαλύτης	Βάση	Καταλύτης	Απόδοση (%)
Χλωριούχος χολίνη/γλυκερόλη = 1:2	Na_2CO_3	$\text{Pd}(\text{OAc})_2$	81
Βεταΐνη/γλυκερόλη = 1:2	Na_2CO_3	$\text{Pd}(\text{OAc})_2$	70
Χλωριούχος χολίνη/γλυκερόλη = 1:2	K_2CO_3	$\text{Pd}(\text{OAc})_2$	72
Χλωριούχος χολίνη/γλυκερόλη = 1:2	K_2CO_3	PdCl_2	83
Βεταΐνη/γλυκερόλη = 1:2	K_2CO_3	$\text{Pd}(\text{OAc})_2$	81
L-προλίνη/γλυκερόλη = 1:2	K_2CO_3	$\text{Pd}(\text{OAc})_2$	ίχνη
Γλυκερόλη	K_2CO_3	$\text{Pd}(\text{OAc})_2$	ίχνη
Φρουκτόζη/ουρία/ H_2O = 1:1.5:1	K_2CO_3	$\text{Pd}(\text{OAc})_2$	-
Γλυκόζη/ουρία/ H_2O = 1:1.5:1	K_2CO_3	$\text{Pd}(\text{OAc})_2$	-

Από τα αποτελέσματα του Πίνακα 6.2, παρατηρείται ότι η χρήση των NaDES χλωριούχος χολίνη/γλυκερόλη = 1:2 και βεταΐνη/γλυκερόλη = 1:2, με καταλύτη το οξικό παλλάδιο, οδήγησε σε υψηλά ποσοστά αποδόσεων, μεταξύ 70-81%,

ανεξάρτητα από τη χρησιμοποιούμενη βάση (Na_2CO_3 ή K_2CO_3). Ακόμη, στην περίπτωση χρήσης χλωριούχου παλλαδίου (PdCl_2) ως καταλύτη μαζί με NaDES χλωριούχο χολίνη/γλυκερόλη = 1:2 ως διαλύτη και K_2CO_3 ως βάση, παρατηρείται ότι η απόδοση διατηρείται υψηλή (83%).

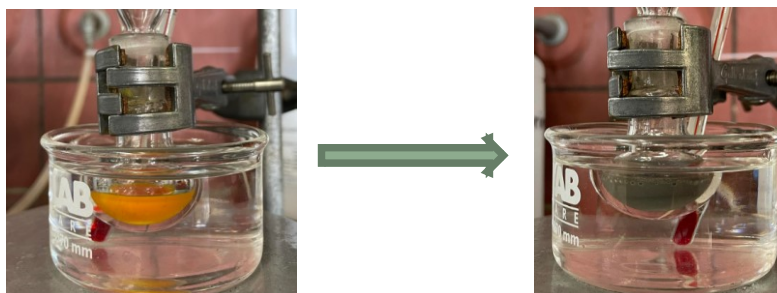
Επιπλέον, παρατηρήθηκε ότι η αντίδραση μεταξύ του ακετυλοξυ-κουμαρινικού παραγώγου **3i** και του φαινυλο-βορονικού οξέος, ανεξάρτητα από τη χρησιμοποιούμενη βάση ή τον καταλύτη, οδήγησε στην απομάκρυνση της ακετυλο-ομάδας και στο σχηματισμό του υδροξυ-κουμαρινικού αναλόγου **35b**, στην περίπτωση των NaDES χλωριούχος χολίνη/γλυκερόλη = 1:2 και βεταΐνη/γλυκερόλη = 1:2. Στην περίπτωση χρήσης του NaDES L-πρόλινη/γλυκερόλη = 1:2, καθώς και καθαρής γλυκερόλης πραγματοποιήθηκε επιτυχώς η απομάκρυνση της ακετυλο-ομάδας από την 3-(4-ακετυλοξυφαινυλο)-6-βρωμο-4-μεθυλο-κουμαρίνη (**3i**), ωστόσο δεν πραγματοποιήθηκε η αντίδραση Suzuki-Miyaura, με αποτέλεσμα ως τελικό προϊόν να παραληφθεί η 6-βρωμο-4-μεθυλο-3-(4-υδροξυ-φαινυλο)-κουμαρίνη (**4i**).

Τέλος, είναι αξιοσημείωτο ότι η χρήση των NaDES φρουκτόζη/ουρία/ H_2O = 1:1.5:1 και γλυκόζη/ουρία/ H_2O = 1:1.5:1, τα οποία δεν περιέχουν γλυκερόλη, δεν οδήγησε σε σχηματισμό προϊόντος.

Καταλήγοντας, ως βέλτιστη επιλέχθηκε η χρήση του NaDES χλωριούχος χολίνη/γλυκερόλη = 1:2, παρουσία βάσης Na_2CO_3 και $\text{Pd}(\text{OAc})_2$, καθώς εκτός από την υψηλή απόδοση στην οποία οδήγησε (81%), οδήγησε και σε προϊόν υψηλότερης καθαρότητας.

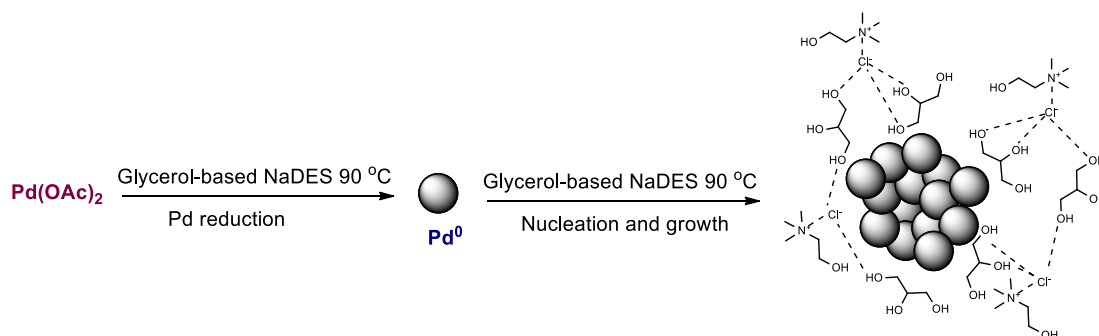
Είναι σημαντικό να αναφερθεί ότι οι αναφορές της αντίδρασης Suzuki-Miyaura σε διαλύτες NADES ή γλυκερόλη στη διεθνή βιβλιογραφία είναι περιορισμένες ενώ δεν υπάρχουν αναφορές στις οποίες αντιδρών είναι ένα κουμαρινικό ανάλογο. Οι Delaye et al. [44], το 2018, αναφέρουν την πραγματοποίηση της αντίδρασης Suzuki-Miyaura σε διαλύτη χλωριούχο χολίνη/γλυκερόλη = 1:2 για τη σύνθεση μιδαζολικών ετεροκυκλικών αναλόγων χωρίς όμως να δίνεται ερμηνεία για το ρόλο της γλυκερόλης στην εξέλιξη της αντίδρασης.

Στην περίπτωση της αντίδρασης-μοντέλο που μελετήθηκε στην παρούσα διδακτορική διατριβή, παρατηρήθηκε ότι κατά την προσθήκη του καταλύτη παλλαδίου στο μίγμα της αντίδρασης υπό θέρμανση, το παλλάδιο διασπείρεται σταδιακά ομοιογενώς και το χρώμα της αντίδρασης γίνεται γκρι σκούρο, όταν το NaDES είναι είτε χλωριούχος χολίνη/γλυκερόλη = 1:2 είτε βεταΐνη/γλυκερόλη = 1:2 (Εικόνα 6.3).



Εικόνα 6.3 Μεταβολή χρώματος της αντίδρασης.

Η παρατήρηση αυτή οδήγησε στην υπόθεση δημιουργίας νανοσωματιδίων παλλαδίου (PdNPs) στο μίγμα της αντίδρασης (Σχήμα 6.8). Όσον αφορά τη σύνθεση μεταλλικών νανοσωματιδίων σε βαθέως ευτηκτικούς διαλύτες, υπάρχουν ελάχιστες βιβλιογραφικές αναφορές οι περισσότερες από τις οποίες αφορούν στη χρήση των DES ως ηλεκτρολύτες για τη σύνθεση των νανοσωματιδίων μέσω ηλεκτροαπόθεσης [45]. Ωστόσο, πρόσφατα (2021) αναφέρθηκε για πρώτη φορά η σύνθεση νανοσωματιδίων παλλαδίου (PdNPs) σε DES που περιέχουν γλυκερόλη και ειδικότερα σε NaDES χλωριούχου χολίνης/γλυκερόλης μέσω θέρμανσης στους 80 °C. Η σύνθεση των PdNPs στους NaDES που περιέχουν γλυκερόλη πιθανώς επιτυγχάνεται λόγω του αναγωγικού χαρακτήρα των πολυολών σε υψηλές θερμοκρασίες [46].



Σχήμα 6.8 Σχηματισμός PdNPs στο NaDES Χλωριούχος χολίνη/Γλυκερόλη = 1:2.

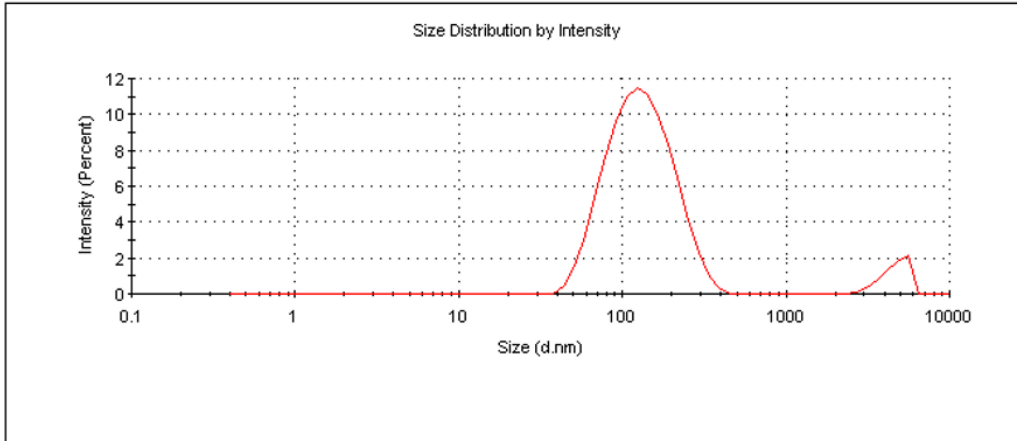
6.4.2 Δυναμική Σκέδαση Φωτός νανοσωματιδίων παλλαδίου

Η υπόθεση του σχηματισμού νανοσωματιδίων παλλαδίου (PdNPs) και μελετήθηκε μέσω μεθόδου Δυναμικής Σκέδασης Φωτός (DLS), με τα αποτελέσματα να παρουσιάζονται στον Πίνακα 6.3 και στην Εικόνα 6.4.

(A)

	Size (d.nm):	% Intensity:	St Dev (d.nm):
Z-Average (d.nm): 129.9	Peak 1: 139.1	93.6	62.34
Pdl: 0.301	Peak 2: 4649	6.4	810.3
Intercept: 0.930	Peak 3: 0.000	0.0	0.000

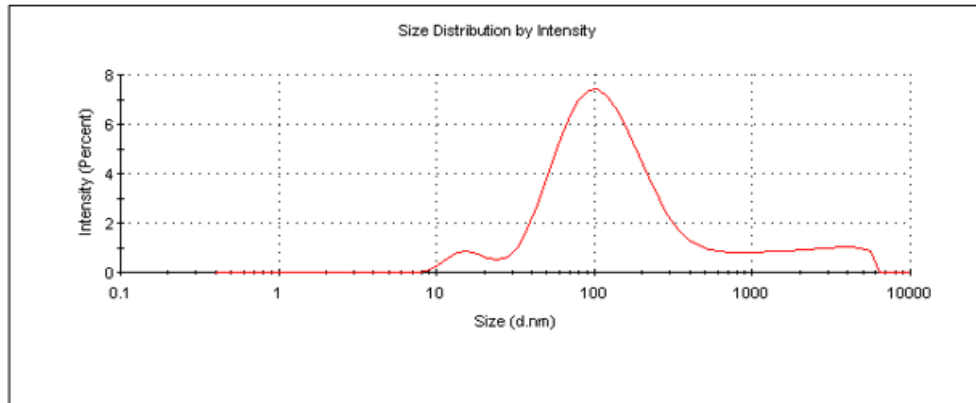
Result quality : Good

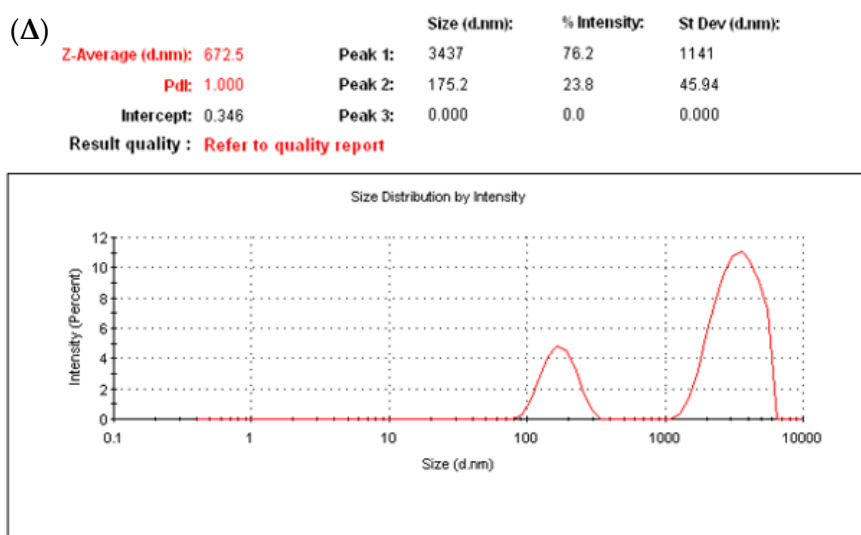
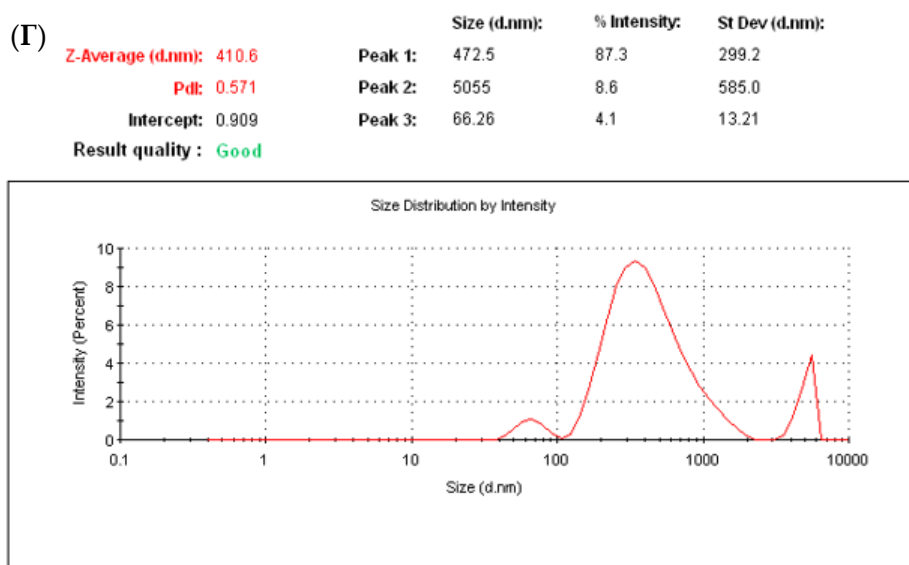


(B)

	Size (d.nm):	% Intensity:	St Dev (d.nm):
Z-Average (d.nm): 99.55	Peak 1: 153.5	83.1	137.1
Pdl: 0.458	Peak 2: 2618	12.5	1442
Intercept: 0.903	Peak 3: 16.42	4.4	4.294

Result quality : Good





Εικόνα 6.4 Ενδεικτικά διαγράμματα κατανομής μεγέθους των PdNPs σε: (Α): NaDES χλωριούχος χολίνη/γλυκερόλη = 1:2, (Β): NaDES βεταΐνη/γλυκερόλη = 1:2, (Γ): NaDES L-προλίνη/γλυκερόλη = 1:2 και (Δ): Γλυκερόλη.

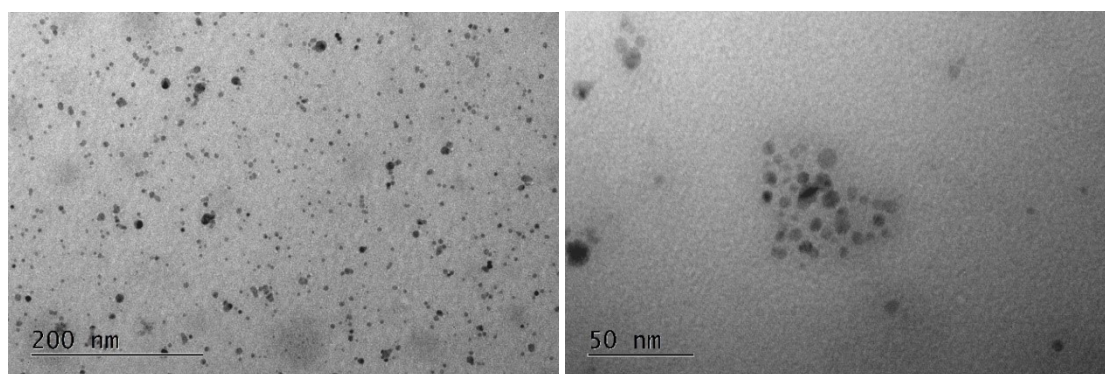
Πίνακας 6.3 Μέγεθος PdNPs στους διαφορετικούς διαλύτες και απόδοση αντίδρασης.

Διαλύτης	Μέση υδροδυναμική διάμετρος (nm)	PDI	ζ-δυναμικό	Απόδοση (%)
Χλωριούχος χολίνη/γλυκερόλη = 1:2	140.6 ± 14.8	0.343 ± 0.06	-18.6 ± 2.5	72-83
Βεταΐνη/γλυκερόλη = 1:2	128.4 ± 40.0	0.476 ± 0.07	-22.7 ± 2.5	70-81
L-προλίνη/γλυκερόλη = 1:2	467.1 ± 54.3	0.634 ± 0.05	-36.4 ± 4.9	ίχνη
Γλυκερόλη	180 nm (25%) > 1 μm (75%)	-	-	ίχνη

Από τα αποτελέσματα του Πίνακα 6.3, παρατηρούμε ότι στους NaDES χλωριούχος χολίνη/γλυκερόλη = 1:2 και βεταΐνη/γλυκερόλη = 1:2 σχηματίζονται νανοσωματίδια μεγέθους περίπου 150 nm και στις περιπτώσεις αυτές η απόδοση της αντίδρασης είναι μεταξύ 70 και 83%. Ωστόσο, στον NaDES L-προλίνη/γλυκερόλη = 1:2 σχηματίζονται νανοσωματίδια με υδροδυναμική διάμετρο περίπου 470 nm, ενώ στη γλυκερόλη μόνο ένα μικρό μέρος (25%) του παλλαδίου βρίσκεται σε νανοκλίμακα (180 nm), καθώς το υπόλοιπο έχει μέγεθος μεγαλύτερο από 1 μm. Στις περιπτώσεις αυτές, παραλαμβάνονται ίχνη του προϊόντος της αντίδρασης Suzuki-Miyaura, γεγονός που μας οδηγεί στο συμπέρασμα ότι ο σχηματισμός των PdNPs και ειδικότερα το μέγεθός τους, σχετίζεται με την εξέλιξη της αντίδρασης.

6.4.3 Ηλεκτρονική Μικροσκοπία Διερχόμενης Δέσμης (TEM)

Τα PdNPs που σχηματίστηκαν σε NaDES χλωριούχος χολίνη/γλυκερόλη = 1:2 εξετάστηκαν ως προς τη μορφολογία τους μέσω Ηλεκτρονικής Μικροσκοπίας Διερχόμενης Δέσμης (Εικόνα 6.5).

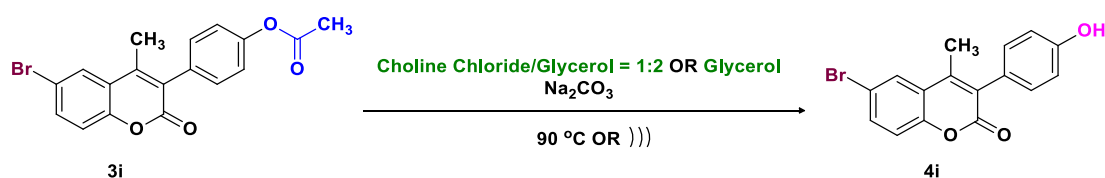


Εικόνα 6.5 Εικόνες TEM των PdNPs.

Από τις Εικόνες TEM επιβεβαιώνεται ο σχηματισμός των PdNPs στον NaDES χλωριούχος χολίνη/γλυκερόλη = 1:2, τα οποία έχουν σφαιρικό σχήμα και μέγεθος 5 - 10 nm.

6.4.4 Μελέτη αντίδρασης απακετυλίωσης

Η απομάκρυνση της ακετυλο-ομάδας στις εξεταζόμενες συνθήκες αποτελεί σημαντική παρατήρηση καθότι πλεονεκτεί ως προς τον «πράσινο» χαρακτήρα της, έναντι της συμβατικής μεθόδου με μεθανόλη και μονοένυδρη υδραζίνη, η οποία χρησιμοποιήθηκε για το σχηματισμό των υδροξυκουμαρινικών αναλόγων των Σειρών Α και Β (Κεφάλαιο 2). Για το σκοπό αυτό, η αντίδραση (Σχήμα 6.9) μελετήθηκε περαιτέρω και μέσω της χρήσης υπερήχων (Πίνακας 6.4).



Σχήμα 6.9 Αντίδραση απακετυλίωσης με NaDES ή γλυκερόλη.

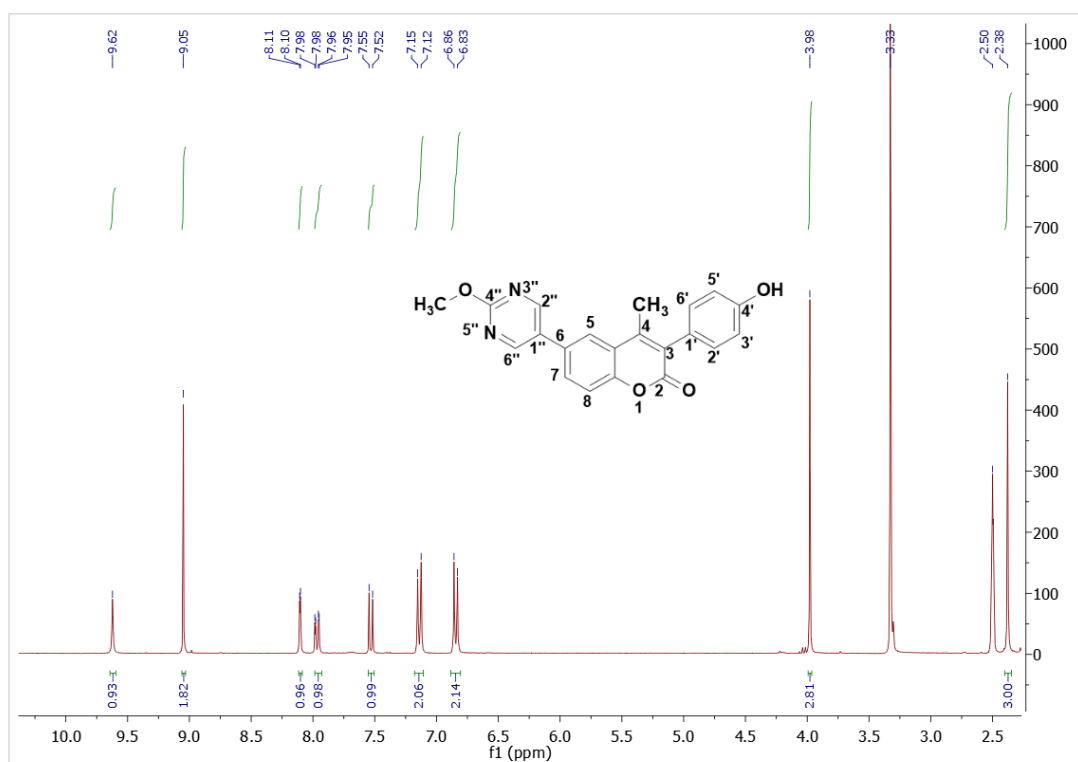
Πίνακας 6.4 Εξεταζόμενες συνθήκες της αντίδρασης απακετυλίωσης.

Διαλύτης	Μέθοδος	Χρόνος	Απόδοση (%)
Χλωριούχος χολίνη/Γλυκερόλη = 1:2	Συμβατική θέρμανση	3 h	79
Χλωριούχος χολίνη/Γλυκερόλη = 1:2	Υπέρηχοι	15 min	73
Γλυκερόλη	Συμβατική θέρμανση	3 h	72
Γλυκερόλη	Υπέρηχοι	6 min	92

Παρατηρείται ότι η αντίδραση απακετυλίωσης πραγματοποιείται τόσο σε καθαρή γλυκερόλη όσο και σε NaDES χλωριούχος χολίνη/γλυκερόλη = 1:2, παρουσία βάσης ανθρακικού νατρίου. Η αντίδραση ολοκληρώνεται σε 3 ώρες στους 90 °C με υψηλές αποδόσεις (72-79%) και για τους δύο διαλύτες, ενώ είναι αξιοσημείωτο ότι στην περίπτωση της χρήσης υπερηχητικής ακτινοβολίας ολοκληρώνεται σε μόλις σε 6 min και με απόδοση 92% σε γλυκερόλη και σε 15 min στο NaDES με 73% απόδοση). Ακόμη, είναι σημαντικό να σημειωθεί ότι το προϊόν παραλαμβάνεται σε υψηλή καθαρότητα χωρίς να απαιτείται περαιτέρω καθαρισμός και σε υψηλότερη απόδοση σε σχέση με τη συμβατική μέθοδο με μεθανόλη και μονοένυδρη υδραζίνη του 2^{ου} Κεφαλαίου (42%).

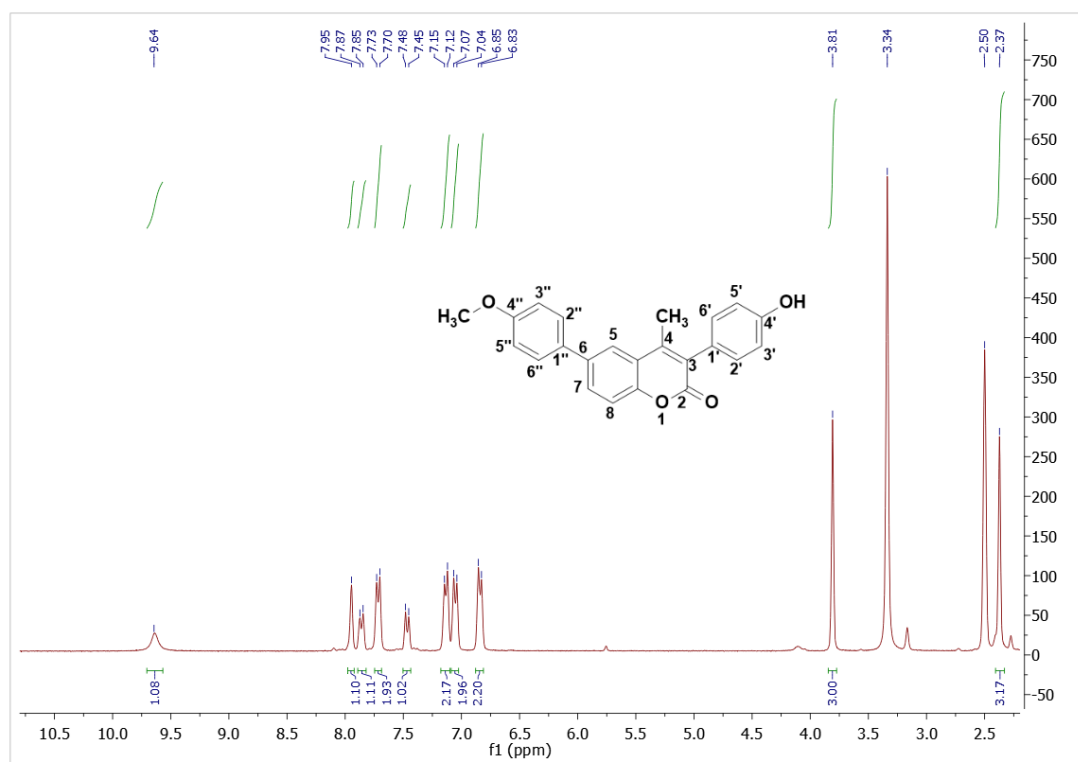
6.4.5 Φασματοσκοπική μελέτη των νέων κουμαρινικών αναλόγων

Ακολουθεί φασματοσκοπική μελέτη ^1H και ^{13}C NMR των κουμαρινικών αναλόγων **35h** και **35c**. (Εικόνες 6.6-6.8).



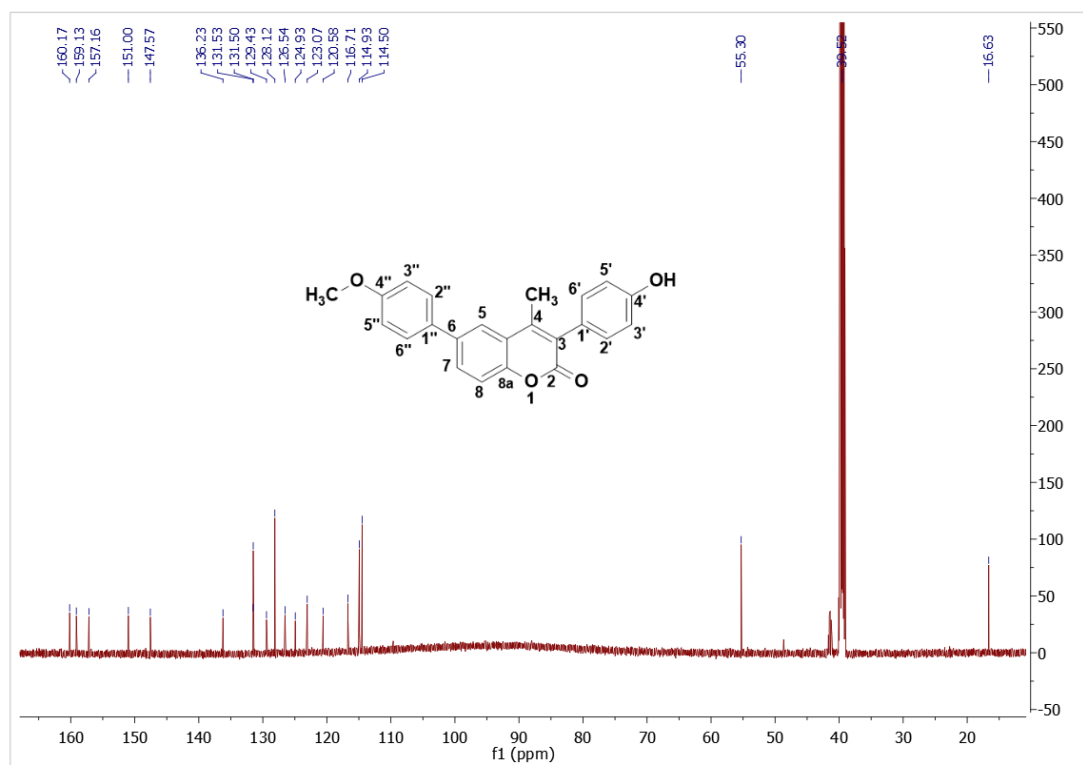
Εικόνα 6.6 Φάσμα ^1H NMR της 6-(2-μεθοξυπυριμιδιν-5-υλ)-4-μεθυλο-3-4-(υδροξυφαινυλο)-2H-χρωμεν-2-όνης (**35h**).

Στο φάσμα ^1H NMR της **35h** (Εικόνα 6.6) παρατηρείται μία απλή κορυφή σε δ_{H} 2.38 ppm που ολοκληρώνεται για τρία πρωτόνια και αποδίδεται στα πρωτόνια της μεθυλο-ομάδας. Ακολουθούν δύο διπλές κορυφές σε δ_{H} 6.85 και 7.14 ppm με σταθερά σύζευξης $J = 8.7$ Hz, οι οποίες ολοκληρώνονται για δύο πρωτόνια η κάθε μία και αποδίδονται στα ισοδύναμα πρωτόνια H-3' & H-5' και H-2' & H-6', αντίστοιχα. Στη συνέχεια, εμφανίζονται μία διπλή κορυφή σε δ_{H} 7.54 ppm ($J = 8.7$ Hz) και μία διπλή διπλών κορυφή σε δ_{H} 7.97 ppm ($J = 8.7$ Hz, $J = 2.1$ Hz), οι οποίες αποδίδονται στα H-8 και H-7, αντίστοιχα. Ακόμη, σε δ_{H} 8.10 ppm εμφανίζεται μία διπλή κορυφή με $J = 2.1$ Hz, η οποία αποδίδεται στο H-5 λόγω της σύζευξης του με το H-7. Ακόμη, χαρακτηριστική κορυφή αποτελεί η απλή κορυφή σε δ_{H} 9.05 ppm που ολοκληρώνεται για δύο πρωτόνια και αποδίδεται στα πρωτόνια των θέσεων 2'' και 6'', ενώ σε δ_{H} 9.62 ppm παρατηρείται μία απλή κορυφή που αποδίδεται στην ομάδα υδροξυλίου.



Εικόνα 6.7 Φάσμα ^1H NMR της 6-(4-μεθοξυφαινυλο)-4-μεθυλο-3-(4-υδροξυφαινυλο)-2H-χρωμεν-2-όνης (**35c**).

Στο φάσμα ^1H NMR **35c** (Εικόνα 6.7), παρατηρούνται αρχικά δύο απλές κορυφές σε δ_H 2.37 και 3.81 ppm, οι οποίες ολοκληρώνονται για τρία πρωτόνια έκαστη και αποδίδονται στα πρωτόνια της μεθυλο-ομάδας και της μεθοξυ-ομάδας, αντίστοιχα. Στη συνέχεια, εμφανίζονται τρεις διπλές κορυφές σε δ_H 6.84 ppm ($J = 7.8$ Hz), 7.05 ppm ($J = 8.4$ Hz) και 7.14 ppm ($J = 7.8$ Hz), οι οποίες ολοκληρώνονται για δύο πρωτόνια η κάθε μία και αποδίδονται στα ισοδύναμα πρωτόνια των θέσεων H-3' & H-5', H-3'' & H-5'' και H-2' & H-6', αντίστοιχα. Ακολουθεί μία διπλή κορυφή σε δ_H 7.47 ppm με $J = 8.4$ Hz, η οποία αποδίδεται στο H-8 καθώς και ακόμη μία διπλή κορυφή σε δ_H 7.72 ppm με $J = 8.1$ Hz, η οποία αποδίδεται στα ισοδύναμα H-2'' και H-6''. Τα πρωτόνια των θέσεων 7 και 8 του κουμαρινικού σκελετού εμφανίζονται στη συνέχεια σε διπλή κορυφή σε δ_H 7.86 ppm ($J = 8.1$ Hz) και απλή στα 7.95 ppm, αντίστοιχα. Τέλος, σε δ_H 9.64 ppm εμφανίζεται μία ευρεία κορυφή που αποδίδεται στην υδροξυλομάδα.



Εικόνα 6.8 Φάσμα ^{13}C NMR της 6-(4-μεθοξυφαινυλο)-4-μεθυλο-3-(4-υδροξυφαινυλο)-2H-χρωμεν-2-όνης (**35c**).

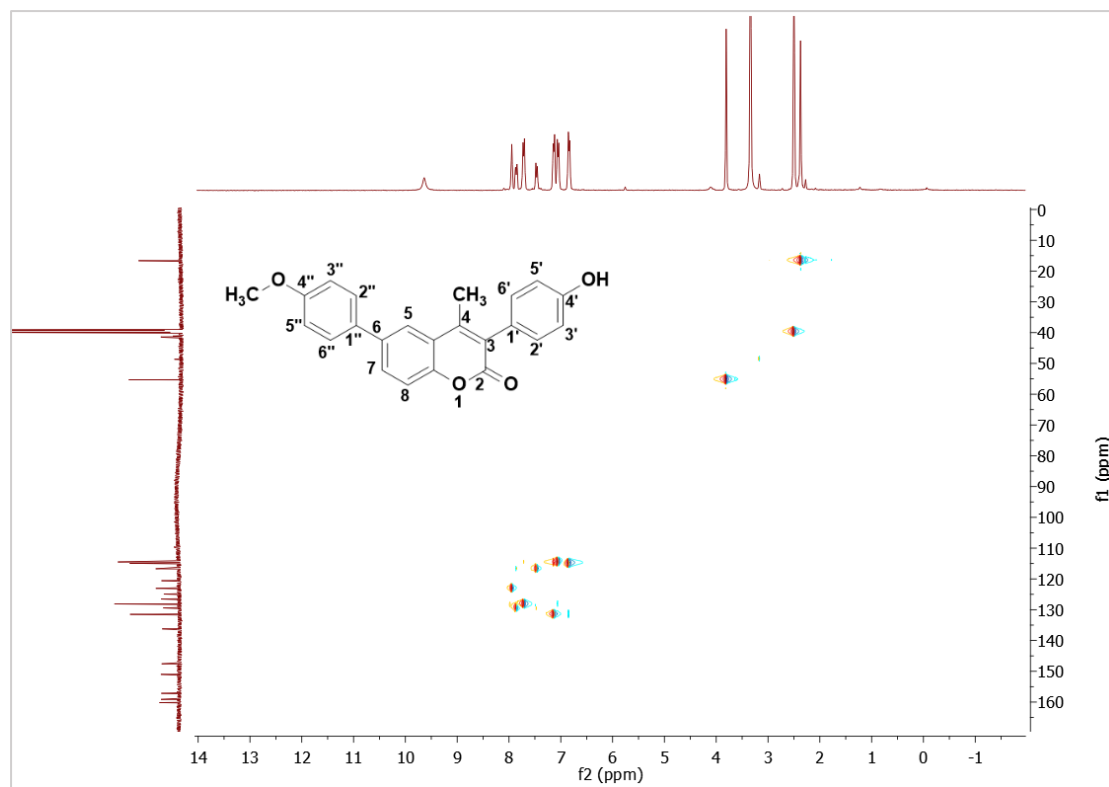
Στο φάσμα ^{13}C NMR της **35c** (Εικόνα 6.8), παρατηρούνται αρχικά πέντε κορυφές μεταξύ 160.17 και 147.57 ppm, οι οποίες αποδίδονται στους περισσότερους αποθωρακισμένους άνθρακες του μορίου, δηλαδή τους άνθρακες του καρβονυλίου και των θέσεων 8a, 4', 4'' και 4. Ακολουθούν οι υπόλοιποι άνθρακες του κουμαρινικού σκελετού μεταξύ 136.23 και 114.50 ppm, ενώ οι κορυφές σε δε 55.30 και 16.63 ppm αποδίδονται στον άνθρακα της μεθοξυ και μεθυλο-ομάδας, αντίστοιχα.

Ακόμη, οι άνθρακες που συνδέονται ομοιοπολικά με πρωτόνιο βρέθηκαν μέσω του ετεροπυρηνικού πειράματος ^1H - ^{13}C HSQC (Hetero-nuclear Single Quantum Coherence) (Εικόνα 6.9) και παρουσιάζονται στον Πίνακα 6.5.

Πίνακας 6.5 Ταυτοποίηση ατόμων πρωτονίου και άνθρακα της ένωσης **35c**.

Πρωτόνιο	^1H (ppm)	^{13}C (ppm)
CH_3	2.37 (s)	16.63
OCH_3	3.81 (s)	55.30
H-3' & H-5'	6.84 (d)	114.93
H-3'' & H-5''	7.05 (d)	114.50
H-2' & H-6'	7.14 (d)	131.50

H-8	7.47 (d)	116.71
H-2'' & H-6''	7.72 (d)	128.12
H-7	7.86 (d)	129.43
H-5	7.95 (s)	123.07



Εικόνα 6.9 Φάσμα ^1H - ^{13}C HSQC NMR της 6-(4-μεθοξυφαινυλο)-4-μεθυλο-3-(4-υδροξυφαινυλο)-2H-χρωμεν-2-όνης (35c).

6.4.6 Αξιολόγηση της κυτταροτοξικότητας των νέων αναλόγων της Σειράς Z

Τα νέα 3,6-διυποκατεστημένα κουμαρινικά ανάλογα που παρασκευάστηκαν μέσω της αντίδρασης Suzuki-Miyaura, εξετάστηκαν ως προς την κυτταροτοξική τους δράση έναντι της ανθρώπινης καρκινικής σειράς A431 και τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στον Πίνακα 6.6.

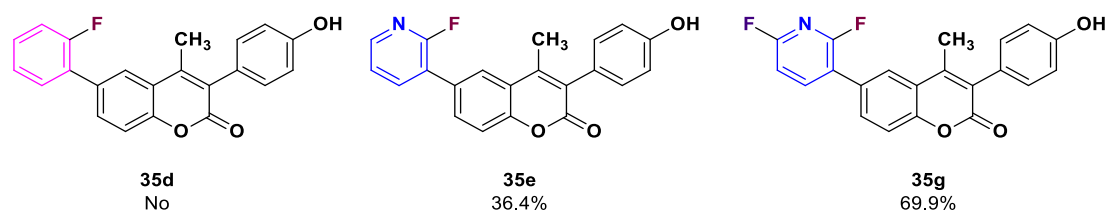
Πίνακας 6.6 Αποτελέσματα κυτταροτοξικότητας των αναλόγων της Σειράς Z.

Ένωση	Δομή	(%)Κυτταροτοξικότητα A431 (100 μM)
3i		22.1 ± 5.5
4i		58.1 ± 1.0
35a		59.3 ± 1.4
35b		57.9 ± 0.7
35c		17.5 ± 1.7
35d		No
35e		36.4 ± 1.5
35f		n.t.

35g		69.9 ± 4.3
35h		No
35i		57.9 ± 0.3
35j		52.7 ± 2.5

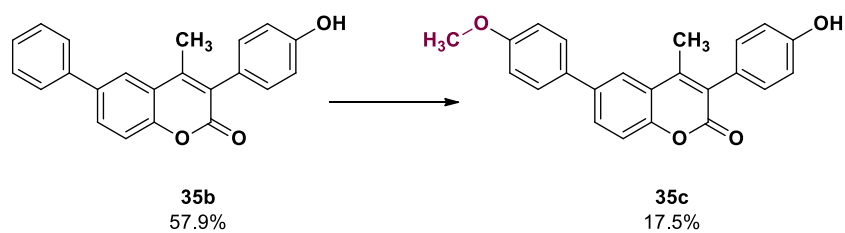
No: Η ένωση δεν έδειξε δράση στις συγκεκριμένες πειραματικές συνθήκες
n.t. : not tested (δεν εξετάστηκε)

Αρχικά παρατηρείται ότι το κουμαρινικό ανάλογο **4i** εμφανίζει ισχυρή κυτταροτοξική δράση έναντι της καρκινικής σειράς A431, στη συγκέντρωση των 100 μM (58.1%). Η πλειοψηφία των 3,6-διυποκατεστημένων κουμαρινικών αναλόγων παρουσίασε εξίσου ικανοποιητική κυτταροτοξικότητα, ενώ ισχυρότερη δράση παρουσίασε η 6-(2,4-διφθοροπυριδιν-3-υλ)-4-μεθυλο-3-(4-υδροξυφαινυλο)-2H-χρωμεν-2-όνη (**35g**), η οποία μείωσε τη βιωσιμότητα στο 30.1%. Ωστόσο, το ανάλογό της, **35e**, το οποίο φέρει μία μόνο ομάδα φθορίου, μείωσε τη βιωσιμότητα στο 63.6%. Ακόμη, συγκρίνοντας τη δράση των κουμαρινικών αναλόγων **35d** και **35e**, τα οποία φέρουν φθόριο στη θέση 2', σημαντική παρατήρηση αποτελεί ότι δεν έχει μόνο η παρουσία ομάδας φθορίου επίδραση στη δράση αλλά και η υποκατάσταση με ομάδα πυριδίνης ή βενζολίου στη θέση 6 του κουμαρινικού σκελετού. Ειδικότερα, η ένωση **35e** η οποία είναι υποκατεστημένη με 2-φθοροπυριδίνη στη θέση 6 του κουμαρινικού σκελετού παρουσιάζει αξιόλογη δράση (36.4%) σε σχέση με την **35d** που φέρει το βιοϊσοστερές του, 2-φθορο-αρυλο υποκαταστάτη, η οποία βρέθηκε ανενεργή (Σχήμα 6.10).



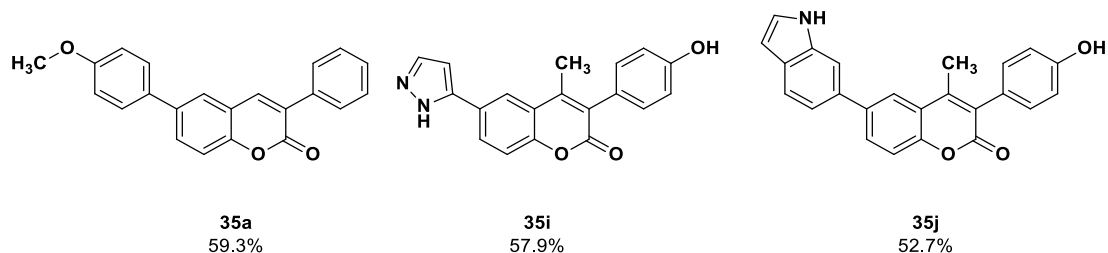
Σχήμα 6.10 Σύγκριση κυτταροτοξικής δράσης των **35d**, **35e** και **35g**.

Επιπλέον, είναι εμφανές ότι η εισαγωγή μεθοξυ ομάδας στο φαινολικό δακτύλιο (**35c**) της θέσης 6 του κουμαρινικού σκελετού, οδήγησε σε σημαντική μείωση της δράσης σε σχέση με το ανάλογό τους **35b** (Σχήμα 6.11).



Σχήμα 6.11 Σύγκριση κυτταροτοξικότητας **35b** και **35c**.

Τέλος, τόσο τα κουμαρινικά ανάλογα **35i** (57.9%) και **35j** (52.7%) που φέρουν είτε ομάδα πυραζολίνης ή ινδόλης ως υποκαταστάτη στη θέση 6 του κουμαρινικού σκελετού, αντίστοιχα, όσο και η 6-(4-μεθοξυφαινυλο)-3-φαινυλο-κουμαρίνη (**35a**, 59.3%), παρουσίασαν αξιόλογη κυτταροτοξική δράση (Σχήμα 6.12).



Σχήμα 6.12 Χημική δομή κουμαρινικών αναλόγων ανάλογα **35a**, **35i** και **35j** με αξιόλογη κυτταροτοξική δράση.

6.5 ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

6.5.1 Παρασκευή των NaDES

Για τη σύνθεση των φυσικώς βαθέως ευηλεκτικών διαλυτών σε σφαιρική φιάλη προστίθεται κατάλληλη ποσότητα του δέκτη δεσμών υδρογόνου καθώς και του δότη δεσμών υδρογόνου μαζί με νερό εάν απαιτείται και αναδεύονται υπό θέρμανση έως ότου σχηματιστεί διαυγές υγρό. Για τη σύνθεση των NaDES με γλυκερόλη η θέρμανση πραγματοποιήθηκε στους 60 °C, ενώ για τους NaDES φρουκτόζη/ουρία/H₂O = 1:1.5:1 και γλυκόζη/ουρία/H₂O = 1:1.5:1 η θέρμανση πραγματοποιήθηκε στους 90 °C.

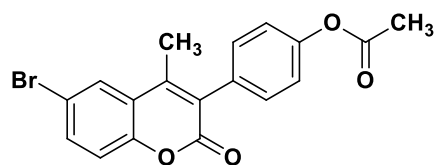
6.5.2 Σύνθεση των νέων κουμαρινικών αναλόγων της Σειράς Z

Γενική μέθοδος σύνθεσης των 3-αρυλο-κουμαρινών 3i & 3p

Σε σφαιρική φιάλη προστίθεται ποσότητα κατάλληλα υποκατεστημένου φαινυλοξικού οξέος (1 eq) και κατάλληλα υποκατεστημένης 2-υδροξυ-ακετοφαινόνης/βενζαλδεΐδης (1.05 eq) σε οξικό ανυδρίτη [(CH₃CO)₂O] παρουσία τριαιθυλαμίνης (Et₃N) (3.1 eq). Το μίγμα αφήνεται υπό ανάδευση στους 120 °C για περίπου 3 h, παρουσία κάθετου ψυκτήρα, υπό αδρανείς συνθήκες.

Η πορεία της αντίδρασης παρακολουθείται μέσω χρωματογραφίας λεπτής στιβάδας (TLC) σε σύστημα διαλυτών πετρελαϊκός αιθέρας (PE)/οξικός αιθυλεστέρας (EtOAc) = 70 : 30. Μετά το πέρας της αντίδρασης, προστίθεται νερό στο μίγμα και πραγματοποιείται εκχύλιση της υδατικής στιβάδας με διχλωρομεθάνιο, ενώ η οργανική φάση ξηραίνεται με θειϊκό νάτριο (Na₂SO₄) και εξατμίζεται υπό ελαττωμένη πίεση. Ακολουθεί προσθήκη διαιθυλαιθέρα υπό ψύξη και καταβύθιση στερεού, ενώ το τελικό προϊόν παραλαμβάνεται ύστερα από κατεργασία με μεθανόλη.

3-(4-ακετυλοξυφαινυλο)-6-βρωμο-4-μεθυλο-2H-χρωμεν-2-όνη (3i):



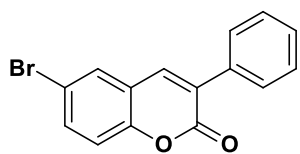
Με βάση τη γενική μέθοδο σύνθεσης των ακετυλοξυ-κουμαρινών, σε 1.5 mL οξικού ανυδρίτη και 0.6 mL Et₃N, προστίθενται 1.33 mmol (200 mg) 4-υδροξυ-φαινυλοξικού οξέος και 1.40 mmol (301 mg) 5-βρωμο-2-υδροξυ-

ακετοφαινόνης. Παραλαμβάνεται λευκό στερεό.

Απόδοση: 38%, **Σ.Τ.:** 185–186 °C

¹H NMR (600 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 7.79 (d, *J* = 2.4 Hz, 1H, H-5), 7.63 (dd, *J* = 9 Hz, *J* = 2.4 Hz, 1H, H-7), 7.31 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H, H-2', H-6'), 7.26 (d, *J* = 9 Hz, 1H, H-8), 7.20 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H, H-3', H-5'), 2.32 (s, 3H, CH₃), 2.32 (s, 3H, OCOCH₃)

HRMS calcd for C₁₈H₁₂O₄Br (M-H)⁻: *m/z*: 370.9997, found: 370.9917

6-βρωμο-3-φαινυλο-2H-χρωμεν-2-όνη (**3p**):

Με βάση τη γενική μέθοδο σύνθεσης των 3-αρυλοκουμαρινών, σε 3.3 mL οξικού ανυδρίτη και 1.6 mL Et₃N, προστίθενται 3.67 mmol (500 mg) φαινυλοξικού οξέος και 3.86 mmol (775 mg) 5-βρωμο-2-υδροξυ-ακετοφαινόνης.

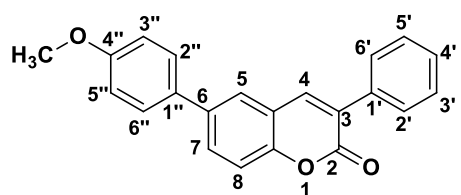
Παραλαμβάνεται ανοιχτό καφέ στερεό.

Απόδοση: 83%, **Σ.Τ.:** 176-176 °C (**Σ.Τ. βιβλιογραφίας:** 171-173 °C [47])

¹H NMR (600 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 7.73 (s, 1H, H-4), 7.69 (d, *J* = 7.2 Hz, 3H, H-5, H-2', H-6'), 7.62 (dd, *J* = 9 Hz, *J* = 2.4 Hz, 1H, H-7), 7.48-7.43 (m, 3H, H-3', H-4', H-5'), 7.25 (d, *J* = 9 Hz, 1H, H-8)

Γενική μέθοδος σύνθεσης των 3,6-διυποκατεστημένων κουμαρινών (**35a-35j**)

Η σύνθεση των νέων κουμαρινικών αναλόγων, τα οποία περιείχαν ακετυλοξυ υποκατάσταση, πραγματοποιήθηκε σε δύο βήματα. Αρχικά, σε σφαιρική φιάλη που περιέχει κατάλληλη ποσότητα του NaDES προστίθεται κατάλληλη ποσότητα της 3-(4-ακετυλοξυφαινυλο)-6-βρωμο-κουμαρίνης (**3i**) (1 eq) παρουσία βάσης ανθρακικού νατρίου (1.25 eq). Μετά το πέρας τριών ωρών και αφού επιβεβαιωθεί η ολοκλήρωση της απομάκρυνσης της ακετυλο-ομάδας μέσω χρωματογραφίας λεπτής στιβάδας (TLC), ακολουθεί η προσθήκη του βορονικού οξέος (1.1 eq) και του οξικού παλλαδίου (2.5% mol). Το μίγμα αναδεύεται για 24 h στους 90 °C, υπό αδρανείς συνθήκες αζώτου, παρουσία κάθετου ψυκτήρα. Ακολουθεί προσθήκη νερού και εκχύλιση της υδατικής στιβάδας με οξικό αιθυλεστέρα. Η οργανική φάση ξηραίνεται με θειϊκό νάτριο (Na₂SO₄) και έπειτα εξατμίζεται υπό ελαττωμένη πίεση. Τέλος, σε περίπτωση που απαιτείται περαιτέρω επεξεργασία προκειμένου το προϊόν να παραληφθεί σε καθαρή μορφή, πραγματοποιείται καθαρισμός μέσω χρωματογραφίας στήλης. Σε περίπτωση που χρησιμοποιείται η 6-βρωμο-3-φαινυλο-κουμαρίνη (**3p**) ή 3-(4-υδροξυφαινυλο)-6-βρωμο-κουμαρίνη, η συνθετική πορεία προχωράει σε ένα βήμα με ταυτόχρονη προσθήκη όλων των αντιδραστηρίων στη σφαιρική φιάλη.

6-(4-μεθοξυφαινυλο)-3-φαινυλο-2H-χρωμεν-2-όνη (**35a**):

Σε 1.7 g NaDES χλωριούχος χολίνη/γλυκερόλη = 1:2 προστίθενται 0.38 mmol (57.1 mg) 4-μεθοξυ-φαινυλο-βορονικού οξέος, 0.34 mmol (102.8 mg) 6-βρωμο-3-φαινυλο-κουμαρίνης και 0.43 mmol (45.2 mg) Na₂CO₃. Στη συνέχεια, προστίθενται και 0.03 mmol (6.4 mg) Pd(OAc)₂

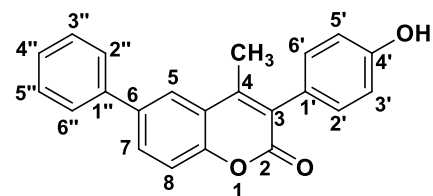
και αφήνονται από ανάδευση στους 90 °C για 24 h. Παραλαμβάνεται κίτρινο στερεό.

Απόδοση: 56%, **Σ.Τ.:** >250 °C (dec.)

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 7.87 (s, 1H, H-4), 7.74-7.68 (m, 5H, H-2', H-3', H-4', H-5', H-6'), 7.53 (d, *J* = 8.7 Hz, 2H, H-2'', H-6''), 7.47-7.40 (m, 3H, H-5, H-7, H-8), 7.01

(d, $J = 8.7$ Hz, 2H, H-3', H-5'), 3.87 (s, 3H, OCH₃), ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 160.69, 159.60, 152.59, 140.05, 137.59, 134.83, 132.07, 131.01, 130.07, 128.98, 128.58, 128.18, 125.58, 119.95, 116.82, 114.56, 55.49

4-μεθυλο-3-(4-υδροξυφαινυλο)-6-φαινυλο-2H-χρωμεν-2-όνη (**35b**):

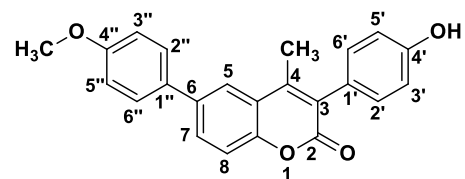


Σε 1.5 g NaDES χλωριούχος χολίνη/γλυκερόλη = 1:2 προστίθενται 0.30 mmol (111.1 mg) 3-(4-ακετυλοξυφαινυλο)-6-βρωμο-κουμαρίνης και 0.37 mmol (39.4 mg) Na₂CO₃ και αφήνονται υπό θέρμανση για 3 h στους 90 °C. Στη συνέχεια, προστίθενται 0.33 mmol (39.9 mg) φαινυλοβορονικού οξέος και 0.02 mmol (5.6 mg) Pd(OAc)₂ και αφήνονται από ανάδευση στους 90 °C για 24 h. Παραλαμβάνεται υπόλευκο στερεό.

Απόδοση: 81%, **Σ.Τ.:** >250 °C (dec.)

¹H NMR (300 MHz, DMSO-d₆): δ (ppm) 7.79 (s, 1H, H-5), 7.70 (d, $J = 8.4$ Hz, 1H, H-7), 7.58 (d, $J = 7.5$ Hz, 2H, H-2'', H-6''), 7.45-7.38 (m, 4H, H-3'', H-4'', H-5'', H-8), 7.13 (d, $J = 7.2$ Hz, 2H, H-2', H-6'), 6.92 (d, $J = 7.8$ Hz, 2H, H-3', H-5'), 2.36 (s, 3H, CH₃), ¹³C NMR (75 MHz, DMSO-d₆): δ (ppm) 160.02, 157.29, 157.17, 151.38, 147.39, 139.09, 136.39, 131.43, 129.73, 128.99, 127.63, 126.91, 124.79, 123.68, 120.55, 118.37, 116.70, 114.88

6-(4-μεθοξυφαινυλο)-4-μεθυλο-3-(4-υδροξυφαινυλο)-2H-χρωμεν-2-όνη (**35c**):

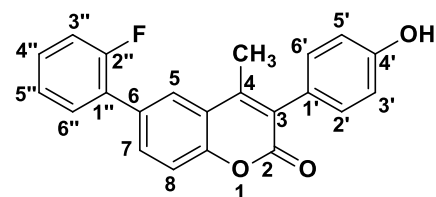


Σε 3.1 g NaDES χλωριούχος χολίνη/γλυκερόλη = 1:2 προστίθενται 0.62 mmol (230.0 mg) 3-(4-ακετυλοξυφαινυλο)-6-βρωμο-κουμαρίνης και 0.77 mmol (81.6 mg) Na₂CO₃ και αφήνονται υπό θέρμανση για 3 h στους 90 °C. Στη συνέχεια, προστίθενται 0.68 mmol (103.0 mg) 4-μεθοξυφαινυλοβορονικού οξέος και 0.05 mmol (11.6 mg) Pd(OAc)₂ και αφήνονται από ανάδευση στους 90 °C για 24 h. Παραλαμβάνεται λευκό στερεό.

Απόδοση: 66%, **Σ.Τ.:** >250 °C (dec.)

¹H NMR (300 MHz, DMSO-d₆): δ (ppm) 9.64 (br, OH), 7.95 (s, 1H, H-5), 7.86 (d, $J = 8.1$ Hz, 1H, H-7), 7.72 (d, $J = 8.1$ Hz, 2H, H-2'', H-6''), 7.47 (d, $J = 8.4$ Hz, 1H, H-8), 7.14 (d, $J = 7.8$ Hz, 2H, H-2', H-6'), 7.05 (d, $J = 8.4$ Hz, 2H, H-3'', H-5''), 6.84 (d, $J = 7.8$ Hz, 2H, H-3', H-5'), 3.81 (s, 3H, OCH₃), 2.37 (s, 3H, CH₃), ¹³C NMR (75 MHz, DMSO-d₆): δ (ppm) 160.17, 159.13, 157.19, 151.00, 147.57, 136.23, 131.53, 131.50, 129.43, 128.12, 126.54, 124.93, 123.07, 120.58, 116.71, 114.93, 114.50, 55.30, 16.63

4-μεθυλο-3-(4-υδροξυφαινυλο)-6-(2-φθοροφαινυλο)-2H-χρωμεν-2-όνη (**35d**):



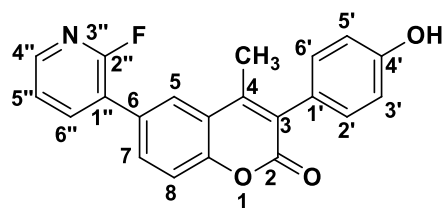
Σε 1 g NaDES χλωριούχος χολίνη/γλυκερόλη = 1:2 προστίθενται 0.13 mmol (41.4 mg) 3-(4-ακετυλοξυφαινυλο)-6-βρωμο-κουμαρίνης και 0.16 mmol (17.0 mg) Na₂CO₃ και αφήνονται υπό θέρμανση για 3 h στους 90 °C. Στη συνέχεια, προστίθενται 0.14 mmol (19.2 mg) 2-φθορο-

φαινυλο-βορονικού οξέος και 0.01 mmol (2.4 mg) Pd(OAc)₂ και αφήνονται από ανάδευση στους 90 °C για 24 h. Παραλαμβάνεται υποκίτρινο στερεό.

Απόδοση: 71%, **Σ.Τ.:** >250 °C (dec.)

¹H NMR (300 MHz, DMSO-d₆): δ (ppm) 9.63 (br, OH), 7.93 (s, 1H, H-5), 7.79 (dt, *J* = 8.7 Hz, *J* = 1.8 Hz, 1H, H-7), 7.65 (td, *J* = 8.4 Hz, *J* = 1.8 Hz, 1H, H-6''), 7.52 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H, H-8), 7.47-7.43 (m, 1H, H-4''), 7.38-7.32 (m, 2H, H-, H-3'', H-5''), 7.15 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H, H-2', H-6'), 6.85 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H, H-3', H-5'), 2.33 (s, 3H, CH₃), ¹³C NMR (75 MHz, DMSO-d₆): δ (ppm) 160.01, 158.97, 157.18, 151.48, 147.18, 131.82, 131.45, 131.22, 131.04, 129.94, 127.24, 126.70, 125.98, 125.06, 124.76, 120.45, 116.39, 116.02, 114.89, 16.53

4-μεθυλο-3-(4-υδροξυφαινυλο)-6-(2-φθοροπυριδιν-3-υλ)-2H-χρωμεν-2-όνη (**35e**):



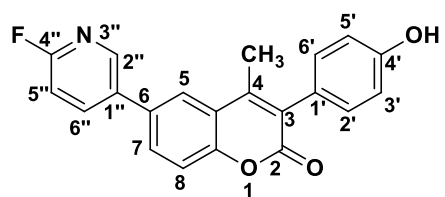
Σε 1.7 g NaDES χλωριούχος χολίνη/γλυκερόλη = 1:2 προστίθενται 0.27 mmol (100.0 mg) 3-(4-ακετυλοξυφαινυλο)-6-βρωμο-κουμαρίνης και 0.33 mmol (34.9 mg) Na₂CO₃ και αφήνονται υπό θέρμανση για 3 h στους 90 °C. Στη συνέχεια, προστίθενται 0.29 mmol (41.5 mg) 2-φθορο-

πυριδιν-3-υλ-βορονικού οξέος και 0.02 mmol (5.2 mg) Pd(OAc)₂ και αφήνονται από ανάδευση στους 90 °C για 24 h. Παραλαμβάνεται υποκίτρινο στερεό.

Απόδοση: 97%, **Σ.Τ.:** >250 °C (dec.)

¹H NMR (300 MHz, DMSO-d₆): δ (ppm) 9.63 (br, OH), 8.28-8.21 (m, 2H, H-4'', H-6''), 8.01 (s, 1H, H-5), 7.86 (d, *J* = 8.7 Hz, 1H, H-7), 7.54 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H, H-8), 7.52-7.49 (m, 1H, H-5''), 7.15 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H, H-2', H-6'), 6.85 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H, H-3', H-5'), 2.34 (s, 3H, CH₃), ¹³C NMR (75 MHz, DMSO-d₆): δ (ppm) 159.92, 159.66, 157.20, 151.82, 147.09, 146.73, 141.73, 131.68, 131.44, 129.55, 126.81, 126.23, 124.68, 122.73, 122.03, 120.56, 116.62, 114.89, 30.70

4-μεθυλο-3-(4-υδροξυφαινυλο)-6-(4-φθοροπυριδιν-3-υλ)-2H-χρωμεν-2-όνη (**35f**):



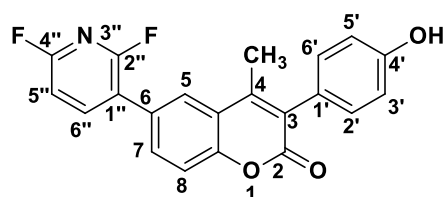
Σε 1.7 g NaDES χλωριούχος χολίνη/γλυκερόλη = 1:2 προστίθενται 0.27 mmol (100.0 mg) 3-(4-ακετυλοξυφαινυλο)-6-βρωμο-κουμαρίνης και 0.33 mmol (34.9 mg) Na₂CO₃ και αφήνονται υπό θέρμανση για 3 h στους 90 °C. Στη συνέχεια, προστίθενται 0.29 mmol (41.5 mg) 4-φθορο-

πυριδιν-3-υλ-βορονικού οξέος και 0.02 mmol (5.2 mg) Pd(OAc)₂ και αφήνονται από ανάδευση στους 90 °C για 24 h. Παραλαμβάνεται σκούρο κίτρινο στερεό.

Απόδοση: 68%, **Σ.Τ.:** >250 °C (dec.)

¹H NMR (300 MHz, DMSO-d₆): δ (ppm) 9.64 (br, OH), 8.67 (s, 1H, H-2''), 8.40 (td, *J* = 7.8 Hz, *J* = 1.8 Hz, 1H, H-6''), 8.07 (s, 1H, H-5), 7.95 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H, H-7), 7.52 (d, *J* = 8.7 Hz, 1H, H-8), 7.31 (dd, *J* = 8.7 Hz, *J* = 2.4 Hz, 1H, H-5''), 7.14 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H, H-2', H-6'), 6.85 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H, H-3', H-5'), 2.38 (s, 3H, CH₃)

6-(2,4-διφθοροπυριδιν-3-υλ)-4-μεθυλο-3-(4-υδροξυφαινυλο)-2H-χρωμεν-2-όνη (**35g**):

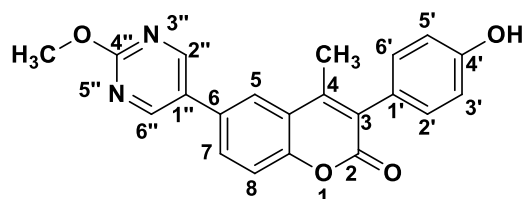


Σε 1.7 g NaDES χλωριούχος χολίνη/γλυκερόλη = 1:2 προστίθενται 0.27 mmol (100.6 mg) 3-(4-ακετυλοξυφαινυλο)-6-βρωμο-κουμαρίνης και 0.34 mmol (36.0 mg) Na_2CO_3 και αφήνονται υπό θέρμανση για 3 h στους 90 °C. Στη συνέχεια, προστίθενται 0.30 mmol (47.1 mg) 2,6-διφθοροπυριδιν-3-υλ-βορονικού οξέος και 0.02 mmol (5.2 mg) $\text{Pd}(\text{OAc})_2$ και αφήνονται από ανάδευση στους 90 °C για 24 h. Παραλαμβάνεται υποκίτρινο στερεό.

Απόδοση: 50%, **Σ.Τ.:** >250 °C (dec.)

$^1\text{H NMR}$ (300 MHz, DMSO-d_6): δ (ppm) 9.64 (br, OH), 8.45 (d, $J = 8.1$ Hz, 1H, H-6''), 8.01 (s, 1H, H-5), 7.84 (d, $J = 7.2$ Hz, 1H, H-), 7.56 (d, $J = 8.7$ Hz, 1H, H-), 7.35 (d, $J = 7.2$ Hz, 1H, H-), 7.15 (d, $J = 8.1$ Hz, 2H, H-2', H-6'), 6.85 (d, $J = 8.1$ Hz, 2H, H-3', H-5'), 2.34 (s, 3H, CH_3)

6-(2-μεθοξυπυριμιδιν-5-υλ)-4-μεθυλο-3-(4-υδροξυφαινυλο)-2H-χρωμεν-2-όνη (**35h**):

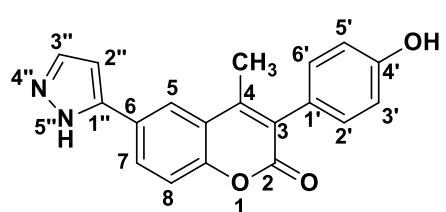


Σε 1.2 g NaDES χλωριούχος χολίνη/γλυκερόλη = 1:2 προστίθενται (41.8 mg) 2-μεθοξυπυριμιδιν-5-υλ-βορονικού οξέος, 0.25 mmol (81.0 mg) 6-βρωμο-3-(4-υδροξυφαινυλο)-κουμαρίνης και 0.31 mmol (32.7 mg) Na_2CO_3 . Στη συνέχεια, προστίθενται 0.02 mmol (4.6 mg) $\text{Pd}(\text{OAc})_2$ και αφήνονται από ανάδευση στους 90 °C για 24 h. Παραλαμβάνεται σκούρο κίτρινο στερεό.

Απόδοση: 63%, **Σ.Τ.:** >250 °C (dec.)

$^1\text{H NMR}$ (300 MHz, DMSO-d_6): δ (ppm) 9.62 (br, OH), 9.05 (s, 2H, H-2'', H-6''), 8.10 (d, $J = 2.1$ Hz, 1H, H-5), 7.97 (dd, $J = 8.7$ Hz, $J = 2.1$ Hz, 1H, H-7), 7.54 (d, $J = 8.7$ Hz, 1H, H-8), 7.14 (d, $J = 8.7$ Hz, 2H, H-2', H-6'), 6.85 (d, $J = 8.7$ Hz, 2H, H-3', H-5'), 3.98 (s, 3H, OCH_3), 2.38 (s, 3H, CH_3)

4-μεθυλο-6-(1H-πυραζολ-5-υλ)-3-(4-υδροξυφαινυλο)-2H-χρωμεν-2-όνη (**35i**):

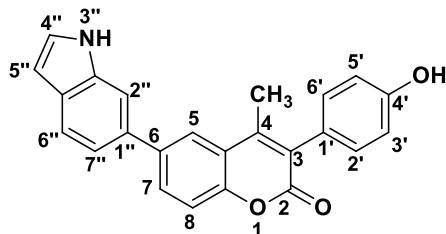


Σε 2.0 g NaDES χλωριούχος χολίνη/γλυκερόλη = 1:2 προστίθενται προστίθενται 0.33 mmol (37.2 mg) πυριμιδιν-5-υλ-βορονικού οξέος, 0.30 mmol (100.0 mg) 6-βρωμο-3-(4-υδροξυφαινυλο)-κουμαρίνης και 0.38 mmol (40.2 mg) Na_2CO_3 . Στη συνέχεια, 0.03 mmol (5.8 mg) $\text{Pd}(\text{OAc})_2$ και αφήνονται από ανάδευση στους 90 °C για 24 h. Παραλαμβάνεται σκούρο κίτρινο στερεό.

Απόδοση: 60%, **Σ.Τ.:** >250 °C (dec.)

$^1\text{H NMR}$ (300 MHz, DMSO-d_6): δ (ppm) 9.64 (br, 1H, OH), 8.02 (s, 1H, H-5), 7.96-7.91 (m, 2H, H-7, H-3''), 7.64 (br, 1H, NH), 7.58-7.48 (m, 2H, H-8, H-2''), 7.13 (d, $J = 7.2$ Hz, 2H, H-2', H-6'), 6.84 (d, $J = 7.2$ Hz, 2H, H-3', H-5'), 2.38 (s, 3H, CH_3)

6-(1H-ινδολ-6-υλ)-4-μεθυλο-3-4-(υδροξυφαινυλο)-2H-χρωμεν-2-όνη (35j):



Σε 1.2 g NaDES χλωριούχος χολίνη/γλυκερόλη = 1:2 προστίθενται 0.29 mmol (36.5 mg) 1H-ινδολ-6-υλ-βορονικού οξέος, 0.18 mmol (60.0 mg) 6-βρωμο-3-(4-υδροξυφαινυλο)-κουμαρίνης και 0.23 mmol (24.2 mg) Na_2CO_3 . Στη συνέχεια, προστίθενται και 0.02 mmol (3.5 mg) $\text{Pd}(\text{OAc})_2$ και αφήνονται από ανάδευση στους 90 °C για

24 h. Παραλαμβάνεται καφέ στερεό.

Απόδοση: 69%, **Σ.Τ.:** >250 °C (dec.)

$^1\text{H NMR}$ (300 MHz, DMSO-d_6): δ (ppm) 11.19 (s, 1H, NH), 9.62 (s, 1H, OH), 8.00 (d, $J = 2.1$ Hz, 1H, H-5), 7.92 (dd, $J = 8.4$ Hz, $J = 2.1$ Hz, 1H, H-7), 7.73 (s, 1H, H-2''), 7.65 (d, $J = 8.1$ Hz, 1H, H-6''), 7.50 (d, $J = 8.7$ Hz, 1H, H-7''), 7.41-7.39 (m, 2H, H-8, H-4''), 7.15 (d, $J = 8.4$ Hz, 2H, H-2', H-6'), 6.85 (d, $J = 8.7$ Hz, 2H, H-3', H-5'), 6.47 (br, 1H, H-5''), 2.39 (s, 3H, CH_3)

6.5.3 Φασματοσκοπία NMR δύο διαστάσεων (2D NMR)

Το ετεροπυρηνικό φάσμα NMR δύο διαστάσεων ^1H - ^{13}C HSQC, ελήφθη στο φασματογράφο Varian 600 MHz με χρήση αισθητήρα HCN του Εθνικού Ιδρύματος Ερευνών. Ειδικότερα, ελήφθη με 96 σειριακές FIDs (increments) και 256 σαρώσεις ανά FID. Το εύρος λήψης κατά τον F2-άξονα ήταν 9615 Hz και κατά τον άξονα-F1 αντιστοιχούσε στην περιοχή -10 έως 190 ppm.

6.5.4 Υδροδυναμική διάμετρος, δείκτης πολυδιασποράς (PDI) και ζ-δυναμικό

Τα νανοσωματίδια χαρακτηρίστηκαν ως προς την υδροδυναμική διάμετρο και το δείκτη πολυδιασποράς μέσω της μεθόδου δυναμικής σκέδασης φωτός (DLS) και το ζ-δυναμικό μέσω ηλεκτροφόρησης με χρήση του οργάνου Zetasizer Nano ZS, Malvern. Οι υδατικές διασπορές εισάγονται σε τριχοειδείς κυψελίδες τύπου U (DTS 1070, Malvern, UK) και οι μετρήσεις πραγματοποιούνται σε θερμοκρασία 25 °C σε υπερκάθαρο νερό (pH 7.0). Οι τιμές για το κάθε μέγεθος προκύπτουν ως ο μέσος όρος τριών τιμών.

6.5.5 Ηλεκτρονική Μικροσκοπία Διερχόμενης Δέσμης (TEM)

Για τη μελέτη TEM χρησιμοποιήθηκε ηλεκτρονικό μικροσκόπιο διερχόμενης δέσμης JEOL JEM-2100 LaB6 υψηλής ανάλυσης (HRTEM), που λειτουργεί στα 200 kV. Η υδατική διασπορά των blank SLNs υποβλήθηκε σε υπερήχους ώστε

διασπαστούν τυχόν συσσωματωμένα σωματίδια. Στη συνέχεια, μία σταγόνα διασποράς τοποθετήθηκε σε πλέγμα χαλκού επικαλυμμένο με άνθρακα 300 mesh και ξηράνθηκε σε αέρα όλη τη νύχτα.

6.5.6 Δοκιμή κυτταροτοξικότητας στην καρκινική σειρά A431

Για τη μελέτη της κυτταροτοξικότητας, αρχικά επιστρώνονται 6×10^3 κύτταρα A431 σε κάθε πηγάδι ενός πλακιδίου 96 θέσεων και επωάζονται ($37\text{ }^{\circ}\text{C}$, $5\% \text{ CO}_2$) για 24 h. Στη συνέχεια, πραγματοποιείται αφαίρεση του θρεπτικού υλικού και προσθήκη των κουμαρινικών αναλόγων ($0.5\% \text{ DMSO}$) και ακολουθεί επώαση για άλλες 24 h. Μετά το πέρας αυτού του διαστήματος, αφαιρείται το θρεπτικό υλικό που περιέχει τις εξεταζόμενες ενώσεις και προστίθεται φρέσκο θρεπτικό υλικό. Έπειτα από επώαση για 24 h, προστίθεται κατάλληλη ποσότητα διαλύματος MTT (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) (0.65 mg/mL) και το πλακίδιο επανατοποθετείται στον επωαστήρα για 3 h προκειμένου να σχηματιστούν οι κρύσταλλοι φορμαζάνης. Οι κρύσταλλοι διαλυτοποιούνται στη συνέχεια με την προσθήκη DMSO ($200 \mu\text{L}$) και η απορρόφηση μετράται στα 570 nm . Τα δείγματα αναφοράς περιείχαν DMSO αντί για κουμαρινική ένωση και η βιωσιμότητα των κυττάρων υπολογίστηκε από την ακόλουθη Εξίσωση (6.1).

$$(\%) \text{ Βιωσιμότητα} = \frac{Abs_{sample}}{Abs_{control}} \times 100 \quad (6.1)$$

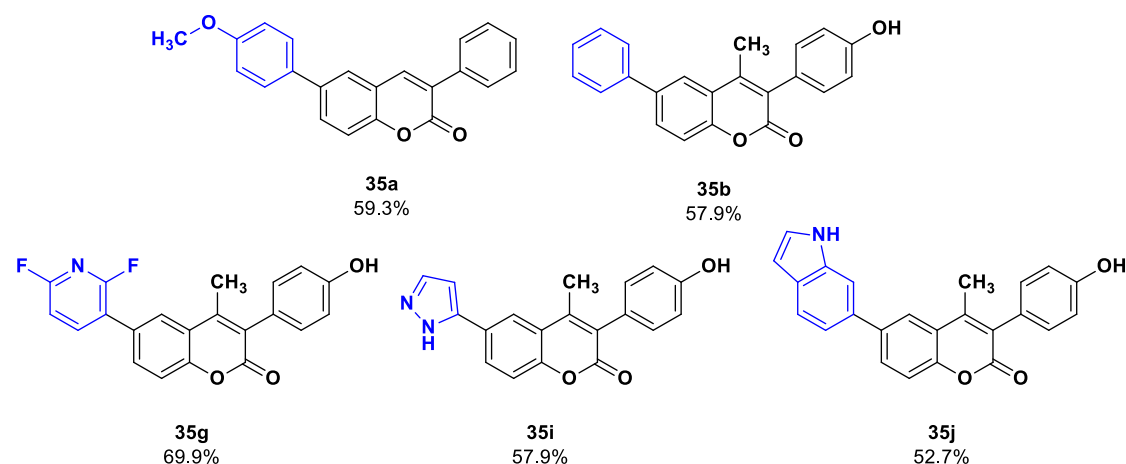
Τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν σε συνεργασία με το Εργαστήριο Βιοϊατρικής Οπτικής και Εφαρμοσμένης Βιοφυσικής της Σχολής Ηλεκτρολόγων Μηχανικών και Μηχανικών Υπολογιστών του Εθνικού Μετσόβιου Πολυτεχνείου και την Δρ. Ελένη Αλεξανδράτου.

6.6 ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Στο παρόν κεφάλαιο πραγματοποιήθηκε επιτυχώς η σύνθεση δέκα νέων 3,6-διυποκατεστημένων κουμαρινικών αναλόγων μέσω αντίδρασης Suzuki-Miyaura. Ύστερα από διερεύνηση βελτιστοποίησης των συνθηκών της αντίδρασης, η σύνθεση των νέων αναλόγων πραγματοποιήθηκε χρησιμοποιώντας ως διαλύτη το NaDES χλωριούχος χολίνη/γλυκερόλη = 1:2, παρουσία βάσης Na_2CO_3 και καταλύτη $\text{Pd}(\text{OAc})_2$ στους 90 °C για 24 h. Στην περίπτωση της χρήσης της 3-(4-ακετυλοξυφαινυλο)-6-βρωμο-4-μεθυλο-κουμαρίνης ως αντιδρών, παρατηρήθηκε ότι το τελικό προϊόν της αντίδρασης Suzuki-Miyaura ήταν απακετυλιωμένο.

Ακόμη, ιδιαίτερα σημαντική παρατήρηση αποτέλεσε η προοδευτική αλλαγή του χρώματος της αντίδρασης σε σκούρο γκρι, το οποίο συνδέθηκε με το σχηματισμό νανοσωματιδίων παλλαδίου (PdNPs). Η μελέτη DLS που πραγματοποιήθηκε υπέδειξε το σχηματισμό νανοσωματιδίων μικρού μεγέθους (<150 nm) στην περίπτωση των NaDES χλωριούχος χολίνη/γλυκερόλη = 1:2 και βεταΐνη/γλυκερόλη = 1:2. Η παρατήρηση αυτή συνάδει με την απόδοση της αντίδρασης στους συγκεκριμένους NaDES, η οποία είναι υψηλή (70-83%), ενώ στην περίπτωση του NaDES L-προλίνη/γλυκερόλη = 1:2 και της καθαρής γλυκερόλης, όπου είτε σχηματίζονται νανοσωματίδια μεγαλύτερου μεγέθους (470 nm) είτε σχηματίζονται σε μικρό ποσοστό, λαμβάνεται μόνο το προϊόν απακετυλίωσης της κουμαρίνης, καθώς η αντίδραση Suzuki-Miyaura δεν προχωρά. Η αντίδραση απακετυλίωσης μελετήθηκε ξεχωριστά, τόσο σε γλυκερόλη όσο και στο NaDES χλωριούχος χολίνη/γλυκερόλη = 1:2, συμβατικά αλλά και με τη χρήση υπερήχων. Σε κάθε περίπτωση ο χρόνος αντίδρασης μειώθηκε σημαντικά με τη χρήση των υπερήχων, ενώ ειδικά στην περίπτωση της γλυκερόλης, ο χρόνος μειώθηκε από 3 h σε 6 min με απόδοση 92%.

Τα νέα κουμαρινικά ανάλογα αξιολογήθηκαν για την κυτταροτοξικότητά τους έναντι της καρκινικής κυτταρικής σειράς A431 στη συγκέντρωση των 100 μM , παρουσιάζοντας στην πλειοψηφία τους αξιόλογη δράση. Τα παράγωγα που παρουσίασαν υψηλότερη δράση παρουσιάζονται στο Σχήμα 6.13.



Σχήμα 6.13 Χημική δομή των αναλόγων **35a**, **35b**, **35g**, **35i** και **35j** που παρουσίασαν την ισχυρότερη κυτταροτοξικότητα έναντι της καρκινικής κυτταρικής σειράς A431.

6.7 ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- [1] M. Rueping, I. Atodiresei, 6.13 C–C Bond Formation: Cascade or Domino Reaction, *Compr. Chirality*. 6 (2012) 345–373. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-095167-6.00614-5>.
- [2] M. Farhang, A.R. Akbarzadeh, M. Rabbani, A.M. Ghadiri, A retrospective-prospective review of Suzuki–Miyaura reaction: From cross-coupling reaction to pharmaceutical industry applications, *Polyhedron*. 227 (2022) 116124. <https://doi.org/10.1016/J.POLY.2022.116124>.
- [3] G. Brahmachari, Design for carbon–carbon bond forming reactions under ambient conditions, *RSC Adv*. 6 (2016) 64676–64725. <https://doi.org/10.1039/C6RA14399G>.
- [4] N. Miyaura, K. Yamada, A. Suzuki, A new stereospecific cross-coupling by the palladium-catalyzed reaction of 1-alkenylboranes with 1-alkenyl or 1-alkynyl halides, *Tetrahedron Lett*. 20 (1979) 3437–3440. [https://doi.org/10.1016/S0040-4039\(01\)95429-2](https://doi.org/10.1016/S0040-4039(01)95429-2).
- [5] X. Guo, H. Dang, S.R. Wisniewski, E.M. Simmons, Nickel-Catalyzed Suzuki–Miyaura Cross-Coupling Facilitated by a Weak Amine Base with Water as a Cosolvent, *Organometallics*. 41 (2022) 1269–1274. <https://doi.org/10.1021/ACS.OR>
- GANOMET.2C00197.
- [6] M.P. Crockett, C.C. Tyrol, A.S. Wong, B. Li, J.A. Byers, Iron-Catalyzed Suzuki–Miyaura Cross-Coupling Reactions between Alkyl Halides and Unactivated Arylboronic Esters, *Org. Lett*. 20 (2018) 5233–5237. <https://doi.org/10.1021/ACS.ORGLETT.8B02184>.
- [7] Y.P. Budiman, A. Friedrich, U. Radius, T.B. Marder, Copper-Catalysed Suzuki–Miyaura Cross-Coupling of Highly Fluorinated Aryl Boronate Esters with Aryl Iodides and Bromides and Fluoroarene–Arene π -Stacking Interactions in the Products, *ChemCatChem*. 11 (2019) 5387–5396. <https://doi.org/10.1002/CCTC.201901220>.
- [8] D.G. Brown, J. Boström, Analysis of Past and Present Synthetic Methodologies on Medicinal Chemistry: Where Have All the New Reactions Gone?, *J. Med. Chem*. 59 (2016) 4443–4458. <https://doi.org/10.1021/ACS.JMEDCHEM.5B01409>.
- [9] R. Martin, S.L. Buchwald, Palladium-catalyzed suzuki-miyaura cross-coupling reactions employing dialkylbiaryl phosphine ligands, *Acc. Chem. Res*. 41 (2008) 1461–1473. <https://doi.org/10.1021/AR800036S>.
- [10] C. Len, Catalysts for Suzuki–Miyaura Coupling Reaction, *Catal*. 10 (2020) 50.

- <https://doi.org/10.3390/CATAL10010050>.
- [11] S. Afewerki, A. Franco, A.M. Balu, C.W. Tai, R. Luque, A. Córdova, Sustainable and recyclable heterogenous palladium catalysts from rice husk-derived biosilicates for Suzuki-Miyaura cross-couplings, aerobic oxidations and stereoselective cascade carbocyclizations, *Sci. Reports* 10 (2020) 1–9. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-63083-8>.
- [12] S.E. Hooshmand, B. Heidari, R. Sedghi, R.S. Varma, Recent advances in the Suzuki–Miyaura cross-coupling reaction using efficient catalysts in eco-friendly media, *Green Chem.* 21 (2019) 381–405. <https://doi.org/10.1039/C8GC02860E>.
- [13] A. Villacampa, L. Duque, O. Juanes, F.J. Palomares, P. Herrasti, N. Menéndez, Improved Suzuki–Miyaura reaction conversion efficiency using magnetic nanoparticles and inductive heating, *J. Mater. Sci.* 57 (2022) 241–253. <https://doi.org/10.1007/S10853-021-06591-W>.
- [14] H. Veisi, A. Amini Manesh, N. Eivazi, A.R. Faraji, Palladium nanoparticles supported on 1,3-dicyclohexylguanidine functionalized mesoporous silica SBA-15 as highly active and reusable catalyst for the Suzuki–Miyaura cross-coupling reaction, *RSC Adv.* 5 (2015) 20098–20107. <https://doi.org/10.1039/C4RA14668A>.
- [15] S. Rohani, G. Mohammadi Ziarani, A. Badiei, A. Ziarati, R. Luque, Mesoporous Hierarchically Hollow Flower-Like CoAl-LDH@N,S-doped Graphene@Pd Nanoarchitectures for Heck Couplings, *Catal. Letters.* 149 (2019) 2984–2993. <https://doi.org/10.1007/S10562-019-02880-X>.
- [16] J.A. Bobb, A.A. Ibrahim, M.S. El-Shall, Laser Synthesis of Carbonaceous TiO₂ from Metal-Organic Frameworks: Optimum Support for Pd Nanoparticles for C-C Cross-Coupling Reactions, *ACS Appl. Nano Mater.* 1 (2018) 4852–4862. <https://doi.org/10.1021/ACSANM.8B01045>.
- [17] V.I. Sokolov, E.G. Rakov, N.A. Bumagin, M.G. Vinogradov, New Method to Prepare Nanopalladium Clusters Immobilized on Carbon Nanotubes: A Very Efficient Catalyst for Forming Carbon-Carbon Bonds and Hydrogenation, *Chem. Commun.* 18 (2010) 558–563. <https://doi.org/10.1080/1536383X.2010.488077>.
- [18] S. Byun, J. Chung, J. Kwon, B. Moon Kim, Mechanistic Studies of Magnetically Recyclable Pd-Fe₃O₄ Heterodimeric Nanocrystal-Catalyzed Organic Reactions, *Chem. – An Asian J.* 10 (2015) 982–988. <https://doi.org/10.1002/ASIA.201403201>.

- [19] S. Jang, S.A. Hira, D. Annas, S. Song, M. Yusuf, J.C. Park, S. Park, K.H. Park, Recent Novel Hybrid Pd-Fe₃O₄ Nanoparticles as Catalysts for Various C-C Coupling Reactions, *Process.* 7 (2019) 422. <https://doi.org/10.3390/PR7070422>.
- [20] V.V. Shinde, D. Jeong, S. Jung, An Amino-Chain Modified β -cyclodextrin: A Supramolecular Ligand for Pd(OAc)₂ Acceleration in Suzuki-Miyaura Coupling Reactions in Water, *Catal.* 9 (2019) 111. <https://doi.org/10.3390/CATAL9020111>.
- [21] A. Dolšak, K. Mrgole, M. Sova, Microwave-assisted regioselective suzuki coupling of 2,4-dichloropyrimidines with aryl and heteroaryl boronic acids, *Catalysts.* 11 (2021) 439. <https://doi.org/10.3390/CATAL11040439/S1>.
- [22] L. Liu, W. Wang, C. Xiao, A simple and efficient protocol for Suzuki coupling reactions of aryl chlorides and aryl bromides in aqueous DMF, *J. Organomet. Chem.* 749 (2014) 83–87. <https://doi.org/10.1016/J.JORGANOCHEM.2013.09.026>.
- [23] F. Ding, Y. Li, P. Yan, Y. Deng, D. Wang, Y. Zhang, I. Dragutan, V. Dragutan, K. Wang, Efficient Suzuki-Miyaura C-C Cross-Couplings Induced by Novel Heterodinuclear Pd-bpydc-Ln Scaffolds, 23 (2018) 2435. <https://doi.org/10.3390/MOLECULES23102435>.
- [24] S.R. Joo, G.T. Kwon, S.H. Kim, A Combination of Biocompatible Room Temperature Ionic Liquid and Palladium Catalyst for Base- and Ligand-Free Suzuki Coupling Reactions, *Asian J. Org. Chem.* 9 (2020) 584–587. <https://doi.org/10.1002/AJOC.202000059>.
- [25] P. Cotugno, M. Casiello, A. Nacci, P. Mastroianni, M.M. Dell'Anna, A. Monopoli, Suzuki coupling of iodo and bromoarenes catalyzed by chitosan-supported Pd-nanoparticles in ionic liquids, *J. Organomet. Chem.* 752 (2014) 1–5. <https://doi.org/10.1016/J.JORGANOCHEM.2013.11.033>.
- [26] P. Thiyagamurthy, F.R.N. Khan, A Base-Free Pd-Precatalyst Mediated Suzuki-Miyaura and Sonogashira Cross-Coupling in Deep Eutectic Solvents, *ChemistrySelect.* 5 (2020) 2610–2617. <https://doi.org/10.1002/SLCT.202000276>.
- [27] V. Pelliccioli, G. Dilauro, S. Grecchi, S. Arnaboldi, C. Graiff, F.M. Perna, P. Vitale, E. Licandro, A. Aliprandi, S. Cauteruccio, V. Capriati, Ligand-Free Suzuki-Miyaura Cross-Coupling Reactions in Deep Eutectic Solvents: Synthesis of Benzodithiophene Derivatives and Study of their Optical and Electrochemical Performance, *European J. Org. Chem.* 2020 (2020) 6981–6988. <https://doi.org/10.1002/EJOC.202000889>.
- [28] B. Karimi, F. Mansouri, H. Vali,

- A highly water-dispersible/magnetically separable palladium catalyst based on a Fe₃O₄@SiO₂ anchored TEG-imidazolium ionic liquid for the Suzuki–Miyaura coupling reaction in water, *Green Chem.* 16 (2014) 2587–2596.
<https://doi.org/10.1039/C3GC42311E>.
- [29] P.R. Boruah, A.A. Ali, B. Saikia, D. Sarma, A novel green protocol for ligand free Suzuki–Miyaura cross-coupling reactions in WEB at room temperature, *Green Chem.* 17 (2015) 1442–1445.
<https://doi.org/10.1039/C4GC02522A>.
- [30] P.R. Boruah, A.A. Ali, M. Chetia, B. Saikia, D. Sarma, Pd(OAc)₂ in WERSA: a novel green catalytic system for Suzuki–Miyaura cross-coupling reactions at room temperature, *Chem. Commun.* 51 (2015) 11489–11492.
<https://doi.org/10.1039/C5CC04561D>.
- [31] G. Imperato, S. Höger, D. Lenoir, B. König, Low melting sugar–urea–salt mixtures as solvents for organic reactions—estimation of polarity and use in catalysis, *Green Chem.* 8 (2006) 1051–1055.
<https://doi.org/10.1039/B603660K>.
- [32] A. da C. Silva, J.D. Senra, L.C.S. Aguiar, A.B.C. Simas, A.L.F. d. Souza, L.F.B. Malta, O.A.C. Antunes, Ligand-free Suzuki–Miyaura reactions in PEG 300, *Tetrahedron Lett.* 51 (2010) 3883–3885.
<https://doi.org/10.1016/J.TETLE.T.2010.04.092>.
- [33] A. Kaur, V. Singh, Efficient Suzuki reaction catalyzed by recyclable clay carbapalladacycle nanocomposite in ionic liquid media, *Tetrahedron Lett.* 56 (2015) 1128–1131.
<https://doi.org/10.1016/J.TETLE.T.2015.01.055>.
- [34] T. Seo, T. Ishiyama, K. Kubota, H. Ito, Solid-state Suzuki–Miyaura cross-coupling reactions: olefin-accelerated C–C coupling using mechanochemistry, *Chem. Sci.* 10 (2019) 8202–8210.
<https://doi.org/10.1039/C9SC02185J>.
- [35] A. Alhaj Zen, J.W. Aylott, W.C. Chan, An appraisal of the Suzuki cross-coupling reaction for the synthesis of novel fluorescent coumarin derivatives, *Tetrahedron Lett.* 55 (2014) 5521–5524.
<https://doi.org/10.1016/J.TETLE.T.2014.08.058>.
- [36] N.S. Sitnikov, A.S. Shavyrin, G.K. Fukin, I.P. Beletskaya, S. Combes, A.Y. Fedorova, Synthesis of 4-(2-hydroxymethylaryl)coumarins, *Russ. Chem. Bull.* 59 (2010) 626–631.
<https://doi.org/10.1007/S11172-010-0130-3>.
- [37] A.M. Hamdy, Z. Khaddour, N.A. Al-Masoudi, Q. Rahman, C. Hering-Junghans, A. Villinger, P. Langer, Synthesis of arylated coumarins by Suzuki–

- Miyaura cross-coupling. Reactions and anti-HIV activity, *Bioorg. Med. Chem.* 24 (2016) 5115–5126. <https://doi.org/10.1016/J.BMC.2016.08.029>.
- [38] M. Roussaki, K. Zelianaios, E. Kavetsou, S. Hamilakis, D. Hadjipavlou-Litina, C. Kontogiorgis, T. Liargkova, A. Detsi, Structural modifications of coumarin derivatives: Determination of antioxidant and lipoxygenase (LOX) inhibitory activity, *Bioorg. Med. Chem.* 22 (2014) 6586–6594. <https://doi.org/10.1016/J.BMC.2014.10.008>.
- [39] P. Shah, M.D. Santana, J. Garcia, J.L. Serrano, M. Naik, S. Pednekar, A.R. Kapdi, [Pd(PPh₃)₂ (saccharinate)₂] - General Catalyst for Suzuki-Miyaura, Negishi Cross-Coupling and C-H Bond Functionalization of Coumaryl and Pyrone Substrates., *ChemInform.* 44 (2013). <https://doi.org/10.1002/CHIN.201326136>.
- [40] C. Len, S. Bruniaux, F. Delbecq, V.S. Parmar, Palladium-Catalyzed Suzuki-Miyaura Cross-Coupling in Continuous Flow, *Catal.* 7 (2017) 146. <https://doi.org/10.3390/CATAL7050146>.
- [41] V. Polshettiwar, A. Decottignies, C. Len, A. Fihri, Suzuki-Miyaura Cross-Coupling Reactions in Aqueous Media: Green and Sustainable Syntheses of Biaryls, *ChemSusChem.* 3 (2010) 502–522. <https://doi.org/10.1002/SSSC.200900221>.
- [42] E.K. Reeves, O.R. Bauman, G.B. Mitchem, S.R. Neufeldt, Solvent Effects on the Selectivity of Palladium-Catalyzed Suzuki-Miyaura Couplings, *Isr. J. Chem.* 60 (2020) 406. <https://doi.org/10.1002/IJCH.201900082>.
- [43] A.M. Sciuto, B.J. Wong, M.E. Martens, H. Hoard-Fruchey, M.W. Perkins, Phosphine toxicity: a story of disrupted mitochondrial metabolism, *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1374 (2016) 41. <https://doi.org/10.1111/NYAS.13081>.
- [44] P.O. Delaye, M. Pénichon, L. Boudesocque-Delaye, C. Enguehard-Gueiffier, A. Gueiffier, Natural Deep Eutectic Solvents as Sustainable Solvents for Suzuki-Miyaura Cross-Coupling Reactions Applied to Imidazo-Fused Heterocycles, *SynOpen.* 2 (2018) 306–311. <https://doi.org/10.1055/S-0037-1610400>.
- [45] N.N. Nam, H.D.K. Do, K.T.L. Trinh, N.Y. Lee, Design Strategy and Application of Deep Eutectic Solvents for Green Synthesis of Nanomaterials, *Nanomater.* 13 (2023) 1164. <https://doi.org/10.3390/NANO13071164>.
- [46] F. Fievet, S. Ammar-Merah, R. Brayner, F. Chau, M. Giraud, F. Mammeri, J. Peron, J.Y. Piquemal, L. Sicard, G. Viau, The polyol process: a unique method for easy access to metal

nanoparticles with tailored sizes, shapes and compositions, *Chem. Soc. Rev.* 47 (2018) 5187–5233. <https://doi.org/10.1039/C7CS00777A>.

- [47] A. Moazzam, F. Jafarpour, Chlorophyll-catalyzed photochemical regioselective coumarin C–H arylation with diazonium salts, *New J. Chem.* 44 (2020) 16692–16696. <https://doi.org/10.1039/D0NJ02012E>.

Κεφάλαιο 7ο

ΕΓΚΛΕΙΣΜΟΣ ΤΗΣ ΦΥΣΙΚΗΣ ΚΟΥΜΑΡΙΝΗΣ
ΔΑΦΝΕΤΙΝΗ ΚΑΙ ΤΟΥ ΣΥΝΘΕΤΙΚΟΥ ΑΝΑΛΟΓΟΥ
ΤΗΣ ΣΕ ΝΑΝΟΣΩΜΑΤΙΔΙΑ ΣΤΕΡΕΩΝ ΛΙΠΙΔΙΩΝ ΚΑΙ
ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΤΗΣ ΒΙΟΔΡΑΣΤΙΚΟΤΗΤΑΣ ΤΟΥΣ

7.1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ

7.1.1 Νανοτεχνολογία

Ο όρος «νανοτεχνολογία» συστήθηκε για πρώτη φορά στην επιστημονική κοινότητα από τον Norio Taniguchi το 1974 [1]. Ως «νανοσωματίδια» ορίζονται τα σωματίδια με διάμετρο από 5 nm έως 1000 nm, τα οποία χαρακτηρίζονται από αυξημένη ειδική επιφάνεια (εμβαδόν ανά μονάδα μάζας) [2]. Τα τελευταία χρόνια η νανοτεχνολογία και οι εφαρμογές της έχουν προσελκύσει το ενδιαφέρον της παγκόσμιας ερευνητικής και βιομηχανικής κοινότητας [3,4].

Ειδικότερα, όσον αφορά τον τομέα της ανακάλυψης νέων φαρμάκων, γίνεται όλο και πιο εμφανές ότι η ανάπτυξη νέων βιοδραστικών μορίων, δεν επαρκεί για την εξασφάλιση επαρκούς προόδου στον τομέα της ανάπτυξης νέων φαρμάκων. Περισσότερο από 75% των νέων υποψήφιων φαρμάκων παρουσιάζουν χαμηλή διαλυτότητα στο νερό, γεγονός που παρεμποδίζει την ενσωμάτωσή τους σε εμπορικά φαρμακευτικά προϊόντα, καθώς λόγω της υδροφοβικότητας τους παρουσιάζουν χαμηλή βιοδιαθεσιμότητα [5]. Πιθανές στρατηγικές για την αντιμετώπιση αυτών των εμποδίων είναι η δομική τροποποίηση των φαρμάκων ή η ενσωμάτωσή τους σε κατάλληλα συστήματα φορέων.

Ειδικότερα, ο εγκλεισμός βιοδραστικών μορίων σε κατάλληλους μικρο/νανοφορείς πραγματοποιείται με σκοπό [6–8]:

- ✓ την προστασία τους από εξωγενείς παράγοντες (θερμοκρασία, οξυγόνο, κ.α.) και τη σταθεροποίησή τους,
- ✓ την ελεγχόμενη αποδέσμευση των μορίων από τη μήτρα εγκλεισμού,
- ✓ την τροποποίηση ορισμένων φυσικοχημικών ιδιοτήτων τους όπως π.χ. η υδατοδιαλυτότητα,
- ✓ να καλύψει ανεπιθύμητες ιδιότητές τους, όπως η δυσάρεστη γεύση ή οσμή.

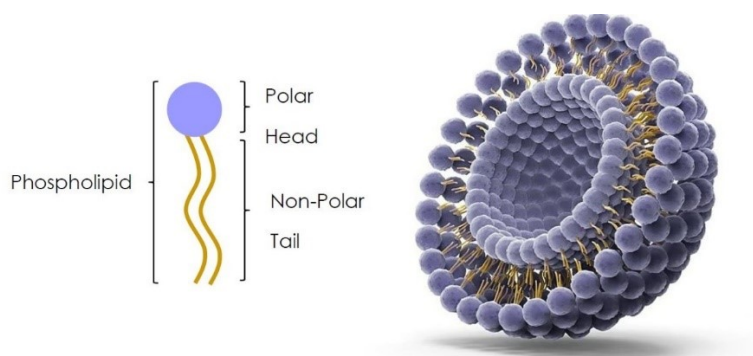
Ο εγκλεισμός βιοδραστικών μορίων βρίσκει εφαρμογή σε τρόφιμα, καλλυντικά, φάρμακα καθώς και σε εντομοαπωθητικά και φυτοπροστατευτικά προϊόντα [9–11]. Για το σκοπό αυτό μπορεί να χρησιμοποιηθεί πλήθος φορέων, όπως πολυμερή (π.χ. χιτοζάνη, αλγινικό, πολυγαλακτικό οξύ), ολιγοσακχαρίτες (π.χ. κυκλοδεξτρίνες), λιπιδικοί φορείς (π.χ. λιπιδώματα), ανόργανα νανοσωματίδια όπως νανοσωματίδια χρυσού κ.α. [12–15]. Ο κάθε φορέας παρουσιάζει και διαφορετικά χαρακτηριστικά και γι' αυτό πρέπει να επιλεγεί κατάλληλα ανάλογα με την επιθυμητή εφαρμογή [16].

7.1.2 Λιπιδικά νανোসυστήματα

Τα λιπιδικά νανোসυστήματα αποτελούν ευρέως χρησιμοποιούμενα συστήματα σε πληθώρα εφαρμογών λόγω της βιοσυμβατότητάς τους και ειδικά σε σκευάσματα που αφορούν διαδερμική χορήγηση λόγω της φύσης τους [17]. Το γεγονός αυτό αποδεικνύεται από το πλήθος των επιστημονικών δημοσιεύσεων και κλινικών δοκιμών που αφορούν λιπιδικά νανোসυστήματα τα τελευταία χρόνια [18].

7.1.2.1 Λιποσώματα

Τα λιποσώματα χρησιμοποιούνται σε πληθώρα εφαρμογών, ενώ αποτελούν τους περισσότερο χρησιμοποιούμενους φορείς σε εφαρμογές μεταφοράς φαρμάκων [19]. Περιγράφηκαν για πρώτη φορά το 1965 από τον Bangham και τους συνεργάτες του και αποτελούνται από μία ή περισσότερες διπλοστιβάδες από αμφίφιλα φωσφολιπίδια, τα οποία χαρακτηρίζονται από την παρουσία μίας υδρόφοβης κεφαλής και μίας υδρόφιλης ουράς (Εικόνα 7.1). Το υδρόφοβο τμήμα τους που απωθείται από το νερό είναι υπεύθυνο για τη διαμόρφωση τους στο χώρο και τη δημιουργία των διπλοστιβάδων λόγω θερμοδυναμικής ισορροπίας [20,21]. Σχηματίζεται λοιπόν μια κοιλότητα-διαμέρισμα μέσα στην οποία εγκλείονται υδρόφιλα μόρια ενώ μεταξύ της διπλοστιβάδας μπορούν να εγκλειστούν και υδρόφοβα μόρια [22,23].



Εικόνα 7.1 Δομή λιποσωμάτων.

Η δυνατότητα παρασκευής των λιποσωμάτων από φυσικά λιπίδια, όπως η φωσφατιδυλοχολίνη που αποτελεί συστατικό των κυτταρικών μεμβρανών, τα καθιστά πλήρως βιοσυμβατά και βιοαποικοδομήσιμα, αλλά και κατάλληλα για να διαπερνούν κυτταρικές μεμβράνες και τη μεταφορά φαρμάκων [23]. Αυτή τη στιγμή στην αγορά, κυκλοφορούν τόσο φαρμακευτικά σκευάσματα (π.χ. δοξορουβικίνη), όσο και συμπληρώματα διατροφής (π.χ. βιταμίνη C, μαγνήσιο) και καλλυντικά που εμπεριέχουν λιποσωμικές διασπορές βιοδραστικών συστατικών [24]. Ωστόσο, ο σημαντικότερος περιορισμός στη χρήση των λιποσωμάτων είναι η περιορισμένη φυσική και χημική σταθερότητά τους [25]. Για το σκοπό αυτό, έχουν αναπτυχθεί διάφορες μέθοδοι προκειμένου να αυξηθεί η σταθερότητά τους όπως η επικάλυψη των λιποσωμάτων με πολυμερή ή και άλλους παράγοντες ή η χρήση μεγαλύτερης αναλογίας χοληστερόλης κατά την παρασκευή τους [25]. Ωστόσο, η μειωμένη σταθερότητά τους οδήγησε και στην ανάπτυξη νεότερων λιπιδικών νανοσυστημάτων, όπως [26,27]:

- τα αιθοσώματα,
- τα φυτοσώματα,
- τα νανογαλακτώματα
- τα νανοσωματίδια στερεών λιπιδίων (Solid Lipid Nanoparticles, SLNs),
- οι νανοδομημένοι λιπιδικοί φορείς (Nanostructured Lipid Carriers, NLCs),
- τα νιοσώματα.

7.1.2.2 Νανοσωματίδια Στερεών Λιπιδίων (SLNs)

Τα νανοσωματίδια στερεών λιπιδίων (Solid Lipid Nanoparticles, SLNs) αποτελούν μια νεότερη γενιά λιπιδικών νανοσυστημάτων, τα οποία αποτελούνται από λιπίδια που παραμένουν στερεά τόσο σε θερμοκρασία περιβάλλοντος όσο και στη θερμοκρασία του σώματος [16]. Τα SLNs αποτελούνται από ένα στερεό λιπόφιλο λιπιδικό πυρήνα που περιβάλλεται από μία στοιβάδα αμφίφιλων (επιφανειοδραστικών) μορίων και έχουν μέγεθος από 50 έως 1000 nm [28].

Για την παρασκευή των SLNs χρησιμοποιούνται λιπίδια όπως τριγλυκερίδια και λιπαρά οξέα φυσικής προέλευσης, γεγονός που τα καθιστά μη-τοξικά, βιοσυμβατά και βιοαποικοδομήσιμα [29]. Ως κύριο συστατικό των SLNs, τα λιπίδια επηρεάζουν σε μεγάλο βαθμό τις ιδιότητες των νανοσωματιδίων, και συγκεκριμένα τη σταθερότητα τους, την απόδοση εγκλεισμού, αλλά και το ρυθμό αποδέσμευσης των βιοδραστικών ουσιών. Επομένως, η επιλογή του κατάλληλου λιπιδίου είναι ζωτικής σημασίας για την παρασκευή των νανοσωματιδίων στερεών λιπιδίων. Χαρακτηριστικά παραδείγματα λιπιδίων που χρησιμοποιούνται για την παρασκευή των SLNs παρουσιάζονται στον Πίνακα 7.1 [30–32].

Πίνακας 7.1 Χαρακτηριστικά λιπίδια που χρησιμοποιούνται για την παρασκευή των SLNs.

Κατηγορία λιπιδίων	Παραδείγματα
Λιπαρά Οξέα	Δωδεκανοϊκό οξύ
	Μυριστικό οξύ
	Παλμιτικό οξύ
Μονογλυκερίδια	Μονοστεατικός εστέρας της γλυκερίνης
	Υδροξυστεατικός εστέρας της γλυκερίνης
Τριγλυκερίδια	Τριμυριστίνη
	Τριστεαρίνη
	Τριπαλμιτίνη
Κεριά	Καρναουβικό κερί
	Μελισσοκέρι

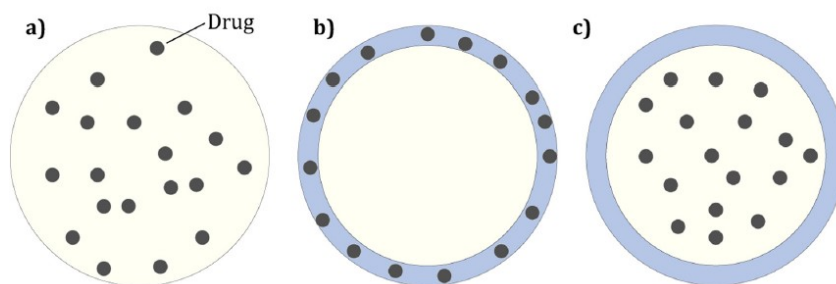
Ο επιφανειοδραστικός παράγοντας σταθεροποιεί τα νανοσωματίδια στερεών λιπιδίων, μειώνοντας την επιφανειακή τάση μεταξύ της υδατικής και της λιπιδικής φάσης και άρα παίζει σημαντικό ρόλο στο σχηματισμό τους. Οι πιο συχνά χρησιμοποιούμενοι είναι οι μη-ιονικοί επιφανειοδραστικοί παράγοντες, ενώ πολλές φορές χρησιμοποιούνται συμπληρωματικά και αμφοτερικοί παράγοντες όπως η φωσφατιδυλοχολίνη. Ακόμη, δύναται να χρησιμοποιηθούν και ιονικοί παράγοντες, όπως το χολικό νάτριο (Πίνακας 7.2) [32].

Πίνακας 7.2 Συχνά χρησιμοποιούμενοι επιφανειοδραστικοί παράγοντες για την παρασκευή των SLNs.

Είδος επιφανειοδραστικού παράγοντα	Παραδείγματα
Μη ιονικοί	Polysorbate 20/Tween 20®
	Polysorbate 60/Tween 60®
	Polysorbate 80/Tween 80®
	Poloxamer 188®
	Poloxamer 40®
Ιονικοί	Χολικό νάτριο (Sodium cholate)
	Γλυκοχολικό νάτριο (Sodium glycocholate)
Αμφοτερικοί	Λεκιθίνη σόγιας
	Λεκιθίνη αυγού
	Φωσφατιδυλοχολίνη σόγιας
	Φωσφατιδυλοχολίνη αυγού

Μοντέλα ενσωμάτωσης βιοδραστικών ενώσεων στα SLNs

Η κατανομή της βιοδραστικής ουσίας στα νανοσωματίδια στερεών λιπιδίων αποτελεί μια σημαντική παράμετρο που επηρεάζει σε μεγάλο βαθμό τις ιδιότητες και τη δράση τους. Έχουν προταθεί τρία μοντέλα ενσωμάτωσης των βιοδραστικών ουσιών στα νανοσωματίδια στερεών λιπιδίων (Εικόνα 7.2): **(a)**: Το μοντέλο ομοιογενούς μήτρας (homogenous matrix), το οποίο προκύπτει όταν τα μόρια είναι ομογενώς διεσπαρμένα στο λιπιδικό πυρήνα ή σε άμορφη μορφή. Συνήθως απαιτούνται ιδιαίτερα λιπόφιλες ουσίες με υψηλή θερμοκρασία κρυστάλλωσης. **(b)**: Το Μοντέλο εμπλουτισμένου περιβλήματος (Drug-enriched shell), το οποίο προκύπτει όταν το λιπίδιο παρουσιάζει υψηλή θερμοκρασία τήξης και κρυστάλλωσης. Τότε κατά την ταχεία ψύξη που ακολουθεί, η θερμοκρασία αυτή επιτυγχάνεται γρήγορα με αποτέλεσμα το λιπίδιο να αρχίζει να κρυσταλλώνεται πριν την βιοδραστική ουσία. Σχηματίζεται επομένως σταδιακά ο στερεός πυρήνας λιπιδίου, ενώ ταυτόχρονα η ουσία συγκεντρώνεται στην επιφάνεια των νανοσωματιδίων, η οποία βρίσκεται ακόμα σε υγρή κατάσταση. **(c)**: Το μοντέλο εμπλουτισμένης μήτρας (Drug-enriched core), το οποίο είναι αποτέλεσμα της κρυστάλλωσης της ένωσης λόγω υπερκορεσμού πριν την κρυστάλλωση του λιπιδίου κατά την ψύξη και το οποίο σχηματίζει περίβλημα γύρω από τον σχηματισμένο πυρήνα της ουσίας [16,33,34].



Εικόνα 7.2 Μοντέλα ενσωμάτωσης της βιοδραστικής ένωσης στα SLNs [16].

Πλεονεκτήματα και μέθοδοι παρασκευής

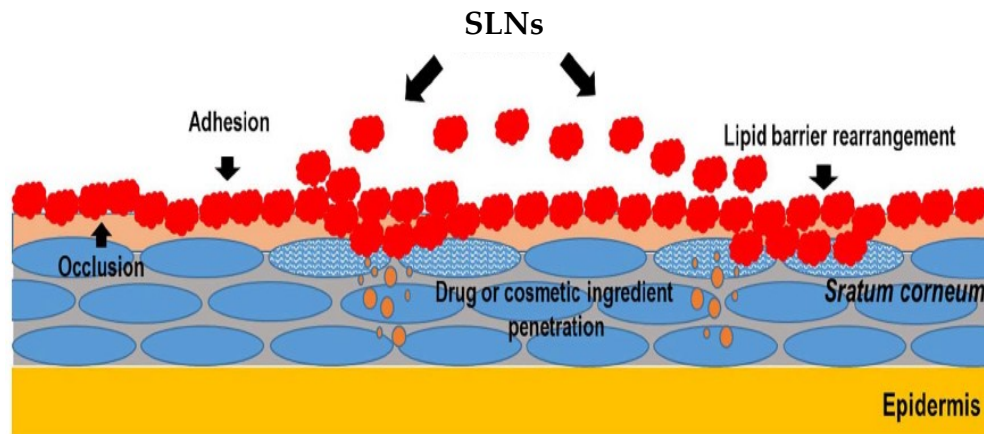
Τα SLNs χρησιμοποιούνται ευρέως για τη μεταφορά βιοδραστικών ενώσεων, όπως αντικαρκινικών [35], αντιφλεγμονωδών [36] και αντιμικροβιακών [37] παραγόντων, διότι παρουσιάζουν αρκετά πλεονεκτήματα, μεταξύ των οποίων:

- ✓ εγκλωβισμό τόσο υδρόφιλων όσο και υδρόφοβων ενώσεων,
- ✓ ευκολία παρασκευής,
- ✓ μη τοξικότητα,
- ✓ υψηλή βιοδιαθεσιμότητα και βιοσυμβατότητα,
- ✓ καλή σταθερότητα,
- ✓ ικανότητα διαπέρασης βιολογικών φραγμών,
- ✓ τροποποιημένη αποδέσμευση των βιοδραστικών ενώσεων [18].

Τα SLNs μπορούν να παρασκευαστούν με μία πληθώρα μεθόδων, όπως η μέθοδος θερμής ομογενοποίησης, ψυχρής ομογενοποίησης, ομογενοποίησης υψηλής πίεσης, διπλής γαλακτωματοποίησης και γαλακτωματοποίησης και εξάτμισης του διαλύτη, οι οποίες πολλές φορές συνοδεύονται από τη χρήση υπερήχων [38–40].

Διαδερμική χορήγηση

Τα SLNs χρησιμοποιούνται ευρέως για τη μεταφορά βιοδραστικών ενώσεων με αντιοξειδωτική [41], φωτοπροστατευτική [42], αντιγηραντική [43], αντιηλιακή [44] δράση κ.ά. καθώς βοηθούν στη διαπέραση του φραγμού του δέρματος [45]. Πιο συγκεκριμένα, η ικανότητα του να διαπερνούν την κεράτινη στιβάδα, αλλά και κατώτερα στρώματα οφείλεται στη σύστασή τους και την ομοιότητά που παρουσιάζουν με τις λιπιδικές μεμβράνες, η οποία τους επιτρέπει να προσκολληθούν σε αυτές και να διαχύσουν τα συστατικά τους (Εικόνα 7.3). Επομένως, τα συστατικά που θα χρησιμοποιηθούν για την παρασκευή των SLNs αλλά και το μέγεθος των νανοσωματιδίων που θα σχηματιστούν επηρεάζουν σημαντικά αυτή την ικανότητα [46,47].

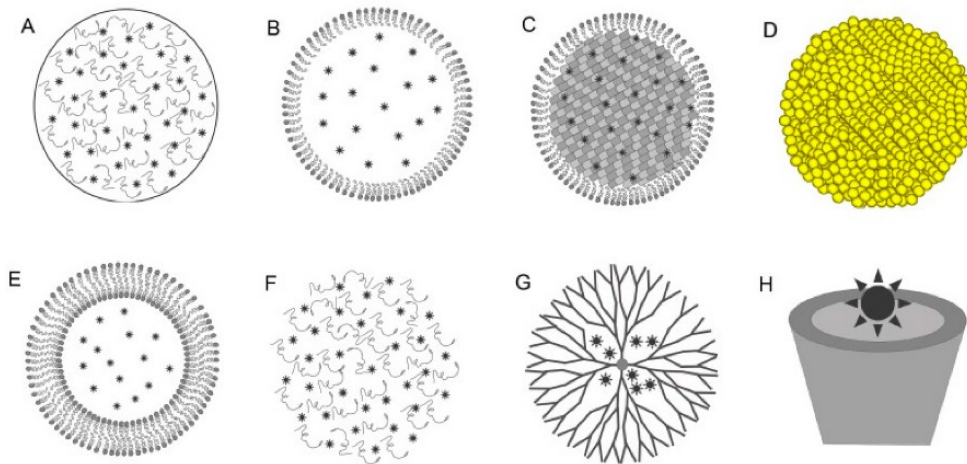


Εικόνα 7.3 Ικανότητα των SLNs να διαπερνούν το φραγμό του δέρματος [45].

7.1.3 Εφαρμογή της νανοτεχνολογίας στη φωτοδυναμική θεραπεία

Όπως ήδη αναφέρθηκε στο Κεφάλαιο 4, η φωτοδυναμική θεραπεία (PDT) θεωρείται μία εναλλακτική προσέγγιση για τη θεραπεία διαφόρων ασθενειών, μεταξύ των οποίων και ο καρκίνος [48]. Οι πιο συχνά χρησιμοποιούμενοι φωτοευαισθητοποιητικοί παράγοντες είναι μόρια τα οποία έχουν πολύ χαμηλή υδατοδιαλυτότητα, ενώ είναι και ιδιαίτερα φωτοευαίσθητα [49].

Συνεπώς, ο εγκλεισμός των φωτοευαισθητοποιητών σε κατάλληλους φορείς αποτελεί μία υποσχόμενη μέθοδο προκειμένου να προστατεύσει τα μόρια από εξωγενείς συνθήκες, να αυξήσει την υδατοδιαλυτότητά τους και πιθανώς και την ικανότητά τους να διαπερνούν την κυτταρική μεμβράνη, συμβάλλοντας με αυτό τον τρόπο στην αύξηση της φωτοτοξικής τους δράσης [50,51]. Ακόμη, με κατάλληλες τροποποιήσεις τα νανοσωματίδια δύνανται να μεταφερθούν στοχευμένα (targeted drug delivery) στα καρκινικά κύτταρα, κάτι το οποίο αποτελεί και θεμελιώδες ζήτημα για τη σωστή εφαρμογή της φωτοδυναμικής θεραπείας [52,53]. Για το σκοπό αυτό, έχει χρησιμοποιηθεί πληθώρα φορέων, μεταξύ των οποίων λιπιδικά νανοσυστήματα όπως λιποσώματα και SLNs, κυκλοδεξτρίνες, δενδριμερή, διάφορα πολυμερή, ακόμα και ανόργανα νανοσωματίδια, όπως νανοσωματίδια χρυσού (Εικόνα 7.4) [49,54–56].



Εικόνα 7.4 Φορείς που έχουν χρησιμοποιηθεί για PDT: **A:** πολυμερή, **B:** NLCs, **C:** SLNs, **D:** νανοσωματίδια χρυσού, **E:** λιπосώματα, **F:** υδρογέλες, **G:** δενδριμερή και **H:** κυκλοδεξτρίνες [57].

Σε αυτό το πλαίσιο, σε μελέτη των Goto et al. [58], μελετήθηκε ο εγκλεισμός της φθαλοκυανίνης χλωριούχου αργιλίου (AICIPc) σε SLNs και βρέθηκε ότι τα SLNs της AICIPc παρουσίασαν ισχυρότερη φωτοτοξική δράση έναντι της καρκινικής σειράς μελανώματος B16-F10 σε σχέση με την ελεύθερη ένωση, ενώ τα SLNs παρουσίασαν ικανοποιητική σταθερότητα για χρονικό διάστημα 12 μηνών.

7.1.4 Αποδέσμευση βιοδραστικών ουσιών

Απώτερος σκοπός του εγκλεισμού βιοδραστικών ενώσεων σε νανοσωματίδια στερεών λιπιδίων είναι η στοχευμένη και ελεγχόμενη αποδέσμευση της ουσίας από αυτά, ενώ για τη δημιουργία ελεγχόμενων συστημάτων αποδέσμευσης είναι απαραίτητη η γνώση των μηχανισμών μεταφοράς μάζας που συμμετέχουν στην αποδέσμευση καθώς και η πρόβλεψη της κινητικής της αποδέσμευσης.

Η αποδέσμευση της βιοδραστικής ουσίας από τα νανοσωματίδια εξαρτάται από παράγοντες όπως:

- η θερμοκρασία του μέσου απελευθέρωσης,
- το ποσοστό φόρτωσης της ουσίας στα νανοσωματίδια,
- το σχήμα και το μέγεθος των νανοσωματιδίων,
- η κρυσταλλική διάταξη της ουσίας και του λιπιδίου στα νανοσωματίδια,
- η χρήση και η φύση των επιφανειοδραστικών παραγόντων,
- η κατανομή της ουσίας στα νανοσωματίδια και
- η μέθοδος παρασκευής των νανοσωματιδίων [59].

7.1.5 Κινητική μοντελοποίηση αποδέσμευσης

Η κινητική μοντελοποίηση της αποδέσμευσης βιοδραστικών ενώσεων από τους φορείς πραγματοποιείται με τη χρήση κατάλληλων μαθηματικών μοντέλων και έχει ως στόχο την πρόβλεψη της αποδέσμευσης των εγκλεισμένων βιοδραστικών

ενώσεων συναρτήσει του χρόνου και την εκτίμηση κάποιων σημαντικών φυσικοχημικών παραμέτρων, όπως του συντελεστή διάχυσης της δραστικής ουσίας. Η μαθηματική αξιολόγηση της κινητικής της αποδέσμευσης μπορεί να συμβάλει στο σχεδιασμό φαρμακευτικών σκευασμάτων ή ναοσυστημάτων καθώς και στην κατανόηση των μηχανισμών αποδέσμευσης. Τα κινητικά μοντέλα απελευθέρωσης με ευρεία εφαρμογή που περιγράφουν καλύτερα τα φαινόμενα που λαμβάνουν χώρα κατά την αποδέσμευση μίας βιοδραστικής ένωσης είναι τα εξής [60–63]:

- i. Μηδενικής τάξης (Zero order)
- ii. Πρώτης τάξης (First order)
- iii. Higuchi
- iv. Korsmeyer-Peppas

i. Μοντέλο μηδενικής τάξης (Zero order)

Η κινητική πρώτης τάξης περιγράφει συστήματα όπου η αποδέσμευση πραγματοποιείται με σταθερό ρυθμό ανεξάρτητα από τη συγκέντρωση της ουσίας. Η εξίσωση που περιγράφει το κινητικό μοντέλο μηδενικής τάξης είναι η εξής (Εξίσωση 7.1):

$$C_t = C_0 + kt \quad (7.1)$$

όπου:

C_0 : Η αρχική ποσότητα του δραστικής ουσίας στο διάλυμα

C_t : Η ποσότητα της δραστικής ουσίας που απελευθερώνεται στο χρόνο t

k_0 : Η σταθερά αποδέσμευσης μηδενικής τάξης

t : χρόνος

ii. Μοντέλο πρώτης τάξης (First order)

Η κινητική πρώτης τάξης αφορά συστήματα όπου ο ρυθμός αποδέσμευσης εξαρτάται από την συγκέντρωση της ουσίας και περιγράφεται από την Εξίσωση 7.2.

$$\text{Log}Q_t = \text{Log}Q_0 + kt/2.303 \quad (7.2)$$

όπου:

Q_0 : Η αρχική ποσότητα της δραστικής ουσίας στο διάλυμα

Q_t : Η ποσότητα της δραστικής ουσίας που απελευθερώνεται στο χρόνο t

k : Η σταθερά αποδέσμευσης πρώτης τάξης

t: χρόνος

Η παραπάνω εξίσωση αντιστοιχεί σε γραμμική συνάρτηση μεταξύ του λογαρίθμου της ποσότητας της αποδεσμευμένης ουσίας και του χρόνου με κλίση $k/2.303$ και με σταθερό όρο $\text{Log}Q_0$.

iii. Μοντέλο Higuchi

Η εξίσωση Higuchi περιγράφει την αποδέσμευση ενός μορίου μέσω διάχυσης, ενώ συσχετίζει τη συγκέντρωση της ουσίας με την τετραγωνική ρίζα του χρόνου. Η απλοποιημένη εξίσωση Higuchi είναι η εξής (Εξίσωση 7.3):

$$Q = k_H t^{1/2} \quad (7.3)$$

όπου:

Q: Η ποσότητα της δραστικής ουσίας που αποδεσμεύεται στο χρόνο t

k_H : Σταθερά Higuchi

t: χρόνος

Η χρήση της εξίσωσης Higuchi βασίζεται στις παρακάτω παραδοχές:

1. Η αρχική συγκέντρωση της δραστικής ουσίας στο μέσο είναι αρκετά υψηλή σε σχέση με τη διαλυτότητά της.
2. Η διάχυση της ουσίας πραγματοποιείται κατά μία μόνο διάσταση.
3. Το πάχος του δισκίου είναι αρκετά μεγαλύτερο από ότι το μέγεθος των μορίων της δραστικής ουσίας.
4. Η διόγκωση ή διαλυτότητα του φορέα είναι αμελητέα.
5. Ο ρυθμός διάχυσης της δραστικής ουσίας είναι σταθερός.
6. Στο περιβάλλον αποδέσμευσης ισχύουν τέλειες συνθήκες βύθισης [61,64].

iv. Μοντέλο Korsmeyer – Peppas

Το μοντέλο Korsmeyer – Peppas είναι ένα ημι-εμπειρικό μοντέλο που περιγράφει την αποδέσμευση της δραστικής ουσίας με βάση την εκθετική σχέση της αποδέσμευσης και του χρόνου. Το μοντέλο μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την ανάλυση του πρώτου 60% των δεδομένων αποδέσμευσης (Εξίσωση 7.4).

$$F = (M_t/M) = k_m t^n \quad (7.4)$$

όπου:

F: Κλάσμα της ουσίας που απελευθερώνεται τη χρονική στιγμή t

Mt: Ποσότητα της ουσίας που αποδεσμεύεται τη χρονική στιγμή t

M: Συνολική ποσότητα της ουσίας σε δοσολογική μορφή ή στην ισορροπία

km: Κινητική σταθερά που ενσωματώνει δομικά και γεωμετρικά χαρακτηριστικά του συστήματος

t: χρόνος

n: Εκθέτης διάχυσης

Η τιμή του εκθέτη διάχυσης ή αποδέσμευσης (n) του κινητικού μοντέλου Korsmeyer-Peppas χρησιμοποιείται για την εκτίμηση του μηχανισμού αποδέσμευσης. Στον Πίνακα 7.3 παρουσιάζονται οι τιμές του εκθέτη διάχυσης που αντιστοιχούν για κάθε μηχανισμό αποδέσμευσης και λαμβάνονται ως γενικός κανόνας. Στην πραγματικότητα, τα όρια των τιμών του δείκτη διάχυσης που υποδεικνύουν κάθε μηχανισμό αποδέσμευσης μπορεί να αλλάζουν ελαφρώς ανάλογα με το σχήμα των νανοσωματιδίων (σφαίρα, κύλινδρος, κ.α.) [60].

Πίνακας 7.3 Τιμές εκθέτη κινητικού μοντέλου Korsmeyer-Peppas

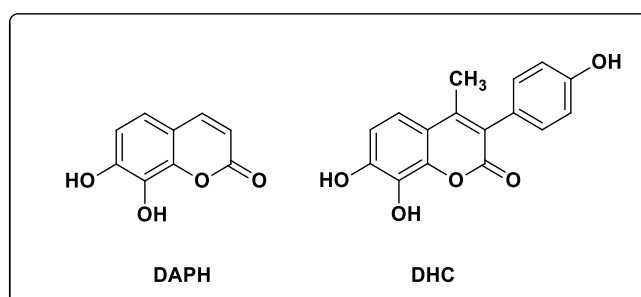
Εκθέτης διάχυσης (n)	Μηχανισμός αποδέσμευσης
$n \leq 0.5$	Fickian διάχυση
$0.5 < n < 1$	Μη Fickian διάχυση/ Ανώμαλη μεταφορά
1	Μη Fickian διάχυση – Case II
$n > 1$	Super Case II

- Για $n \leq 0.5$ (Fickian model), κυριαρχούν τα φαινόμενα διάχυσης.
- Για $0.5 < n < 1$ (μη Fickian ή ανώμαλη μεταφορά), τα φαινόμενα διάχυσης και διόγκωσης είναι ισοδύναμα.
- Για $n=1$ (μη Fickian - Case II), τα φαινόμενα που κυριαρχούν είναι η διόγκωση ή η χαλάρωση.
- Για $n > 1$ (Super Case II), διάσπαση των πολυμερικών αλυσίδων (αν πρόκειται για πολυμερική μήτρα εγκλεισμού) [65].

7.2 ΣΚΟΠΟΣ

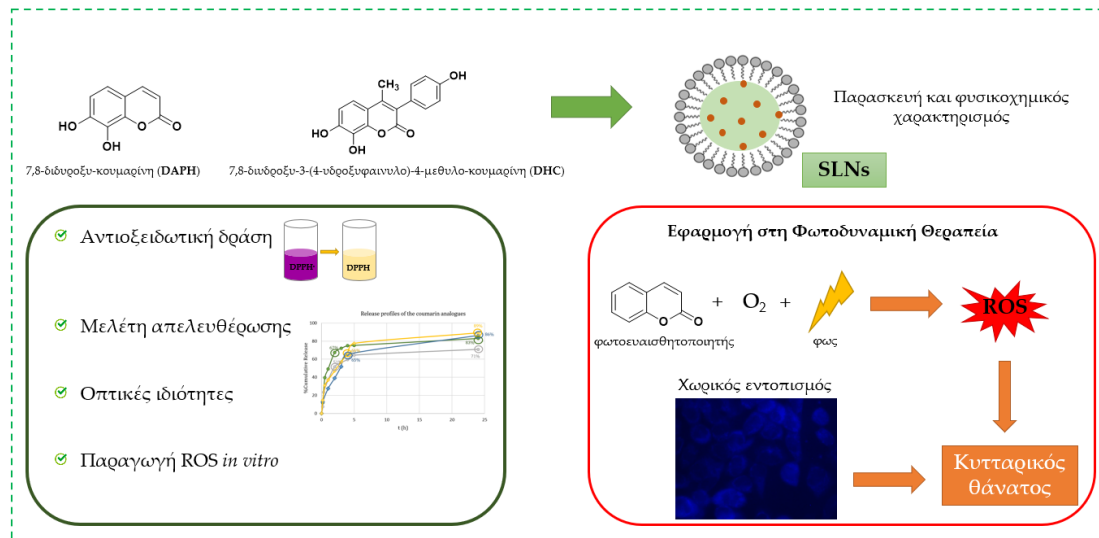
Η 7,8-διυδροξυ-κουμαρίνη ή δαφνετίνη αποτελεί ένα φυσικό προϊόν που απομονώνεται από φυτά του γένους *Daphne* και παρουσιάζει πολλαπλές βιολογικές δράσεις, όπως αντιοξειδωτική [66], αντιαρθρική [67] και νευροπροστατευτική [68]. Η δομική τροποποίηση του σκελετού της δαφνετίνης είναι επομένως ιδιαίτερου ενδιαφέροντος και έχει οδηγήσει πολλές ερευνητικές ομάδες στη σύνθεση αναλόγων της [69,70]. Ωστόσο, η παρουσία πολλαπλών ομάδων υδροξυλίου ή / και κατεχολικού συστήματος στη δομή μιας ένωσης, είναι γνωστό ότι την καθιστά ευοξειδωτή και για αυτό συχνά εφαρμόζονται τεχνικές εγκλεισμού τους σε πληθώρα φορέων [71]. Παρόλα αυτά σύμφωνα με την τρέχουσα βιβλιογραφία, ο εγκλεισμός της δαφνετίνης σε κάποιο φορέα μελετάται για πρώτη φορά.

Σε αυτό το πλαίσιο, σκοπό του παρόντος κεφαλαίου αποτέλεσε η ανάπτυξη της διεργασίας εγκλεισμού της δαφνετίνης (DAPH) και του συνθετικού αναλόγου της, 7,8-διυδροξυ-3-(4-υδροξυφαινυλο)-4-μεθυλο-κουμαρίνη (DHC) (Σχήμα 7.1), σε νανοσωματίδια στερεών λιπιδίων (SLNs), ο χαρακτηρισμός τους και η αξιολόγηση της βιολογικής τους δράσης. Η επιλογή των κουμαρινικών αναλόγων στηρίχθηκε στην τρέχουσα βιβλιογραφία σχετικά με το φαρμακευτικό προφίλ της δαφνετίνης, καθώς σε μόρια οδηγούς (Σειρά Β) που έχουν παρασκευαστεί στο Εργαστήριο Οργανικής Χημείας της σχολής Χημικών Μηχανικών του Εθνικού Μετσόβιου Πολυτεχνείου και έχουν παρουσιάσει αξιόλογη βιολογική δράση.



Σχήμα 7.1 Χημική δομή της δαφνετίνης (DAPH) και της 7,8-διυδροξυ-3-(4-υδροξυφαινυλο)- 4-μεθυλο-κουμαρίνης (DHC).

Τα νανοσωματίδια στερεών λιπιδίων (SLNs) που παρασκευάστηκαν, χαρακτηρίστηκαν στη συνέχεια μέσω μεθόδου Δυναμικής Σκέδασης Φωτός (DLS), φασματοσκοπίας FT-IR και θερμοσταθμικής ανάλυσης (TGA), μελετήθηκαν ως προς το προφίλ αποδέσμευσής τους σε διαφορετικές συνθήκες, ενώ ακολούθησε η μελέτη της αντιοξειδωτικής τους δράσης και της ικανότητάς τους να δρουν ως φωτοευαίσθητοποιητές έναντι της καρκινικής σειράς επιδερμικών κυττάρων A431 (Σχήμα 7.2).

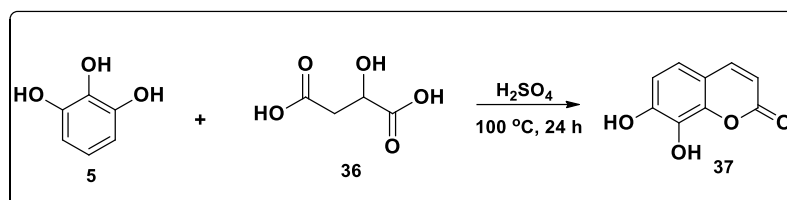


Σχήμα 7.2 Εγκλεισμός των DAPH και DHC σε SLNs, χαρακτηρισμός και μελέτη της βιολογικής δράσης των SLNs.

7.3 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ

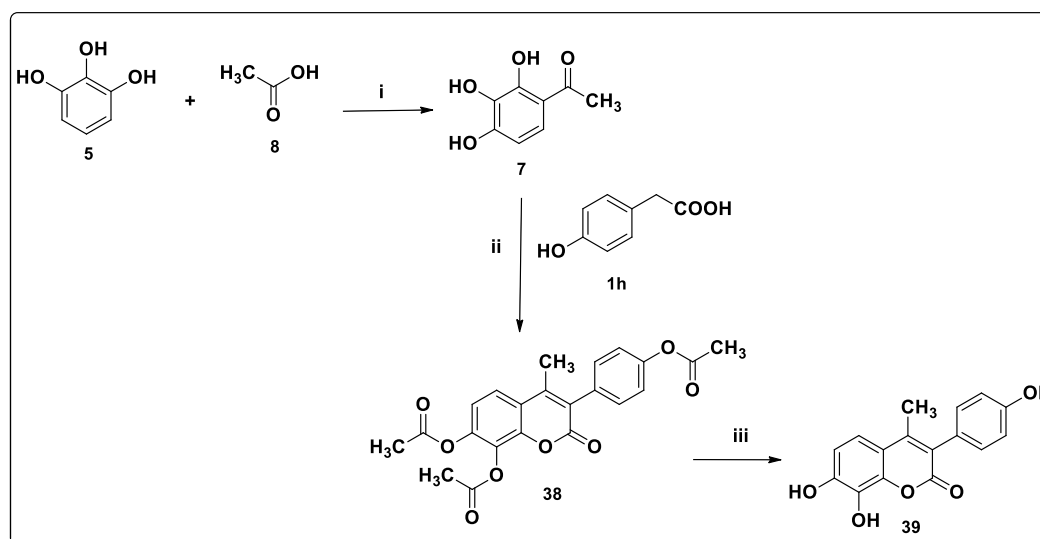
7.3.1 Σύνθεση και φασματοσκοπική μελέτη των κουμαρινικών αναλόγων

Η δαφνετίνη (7,8-διυδροξυ-κουμαρίνη, **37**) συντέθηκε μέσω συμπύκνωσης Pechmann μεταξύ της πυρογαλλόλης (**5**) και του μηλικού οξέος (**36**) σε πυκνό θειικό οξύ (Σχήμα 7.3).



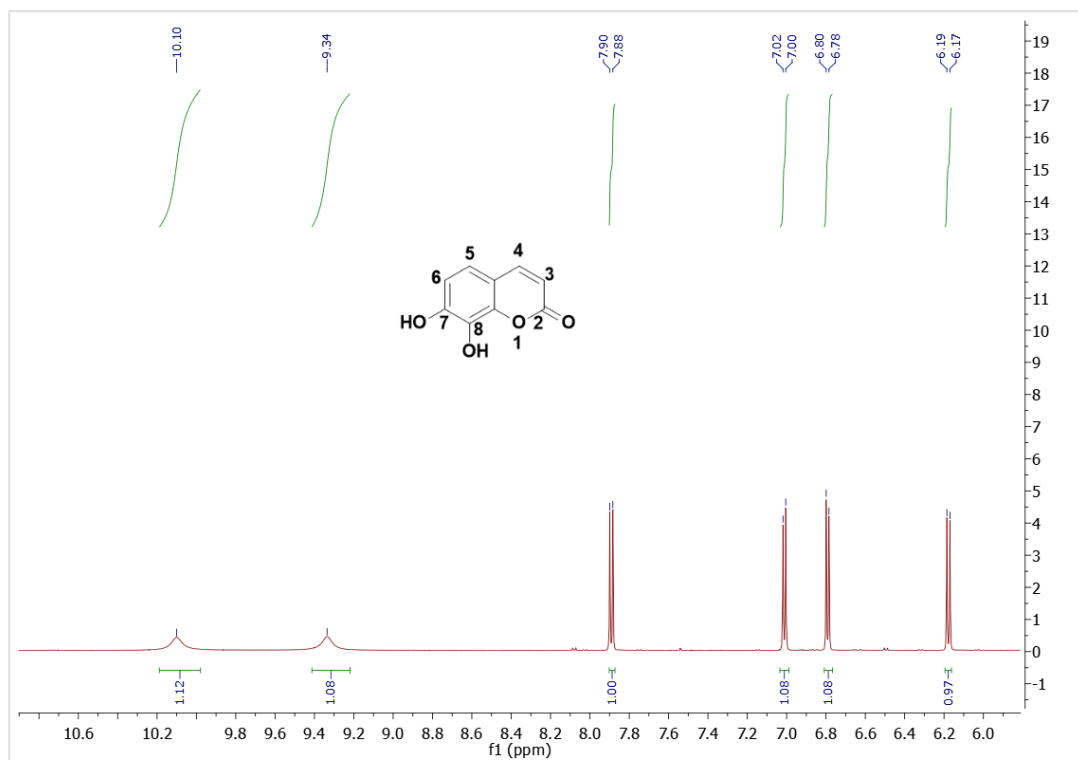
Σχήμα 7.3 Συνθετική πορεία δαφνετίνης (**37**).

Η 7,8-διυδροξυ-4-μεθυλο-3-(4-υδροξυφαινυλο)-κουμαρίνη (**39**) συντέθηκε σε τρία στάδια. Πρώτα απ' όλα, η 2,3,4-τριυδροξυ-ακετοφαινόνη (**7**) συντέθηκε μέσω αναδιάταξης Fries μεταξύ της πυρογαλλόλης (**5**) και του οξικού οξέος (**5**) σε σύμπλοκο τριφθοριούχο βορίου-διαιθυλαιθέρα και στη συνέχεια αντέδρασε με το 4-υδροξυ-φαινυλοξικό οξύ (**1h**) σε οξικό ανυδρίτη και τραιθυλαμίνη μέσω μιας τροποποιημένης Perkin-Oglialoro αντίδρασης προς παραλαβή της 7,8-διακετυλοξυ-4-μεθυλο-3-(4-ακετυλοξυφαινυλο)-κουμαρίνης (**38**). Στο τελευταίο βήμα πραγματοποιήθηκε απομάκρυνση της ακετυλο ομάδας σε μεθανόλη παρουσία μονοένυδρης υδραζίνης προς παραλαβή του επιθυμητού προϊόντος (**39**) (Σχήμα 7.4).



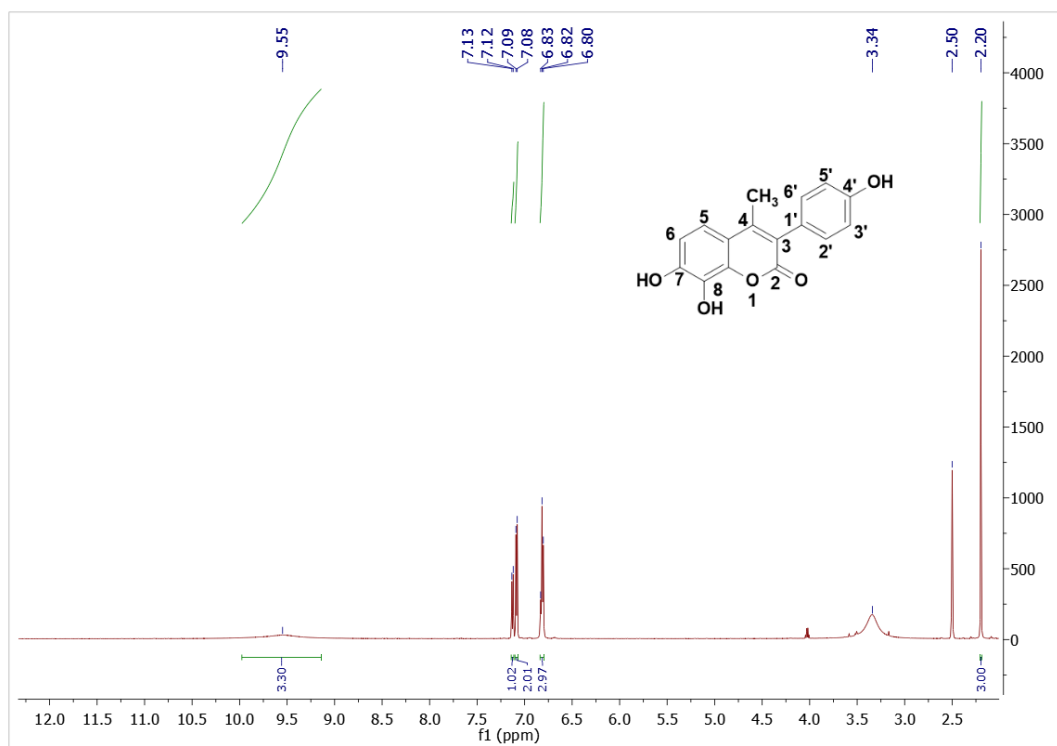
Σχήμα 7.4 Συνθετική πορεία 7,8-διυδροξυ-4-μεθυλο-3-(4-υδροξυφαινυλο)-κουμαρίνης (**39**), χρησιμοποιώντας: (i) BF₃·Et₂O, 90-100 °C, 5 h (ii) [(CH₃CO)₂O], Et₃N, 120 °C, 3 h και (iii) NH₂NH₂·H₂O, MeOH, 42 °C, 1.5 h.

Η δομή της δαφνετίνης (**37**) και της 7,8-διυδροξυ-4-μεθυλο-3-(4-υδροξυφαινυλο)-κουμαρίνης (**39**) ταυτοποιήθηκαν με φασματοσκοπία ¹H και ¹³C NMR (Εικόνες 7.5-7.7).



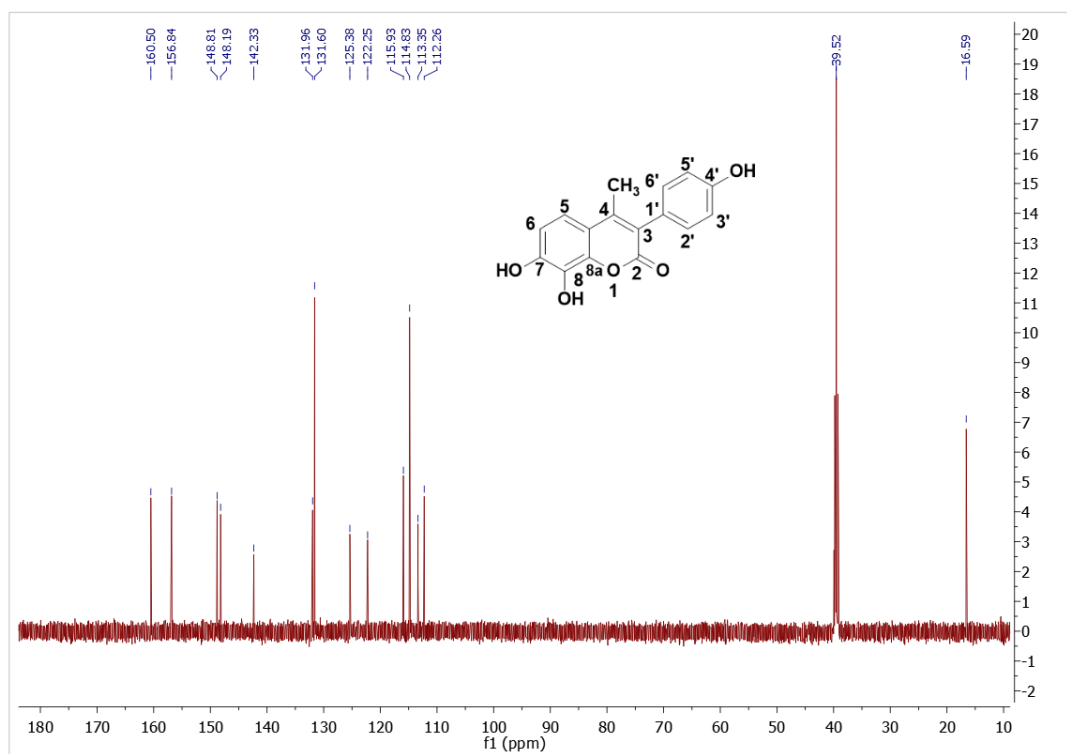
Εικόνα 7.5 Φάσμα ¹H NMR της 7,8-διυδροξυ-κουμαρίνης (**37**).

Στο φάσμα ¹H NMR της 7,8-διυδροξυ-κουμαρίνης (**37**) (Εικόνα 7.5), παρατηρούνται δύο ευρείες κορυφές σε δ_H 10.10 και 9.34 ppm, οι οποίες αποδίδονται στα πρωτόνια των υδροξυλομάδων. Ακολουθεί μία διπλή κορυφή σε δ_H 7.89 ppm με $J = 9.5$ Hz που αποδίδεται στο H-4, ενώ σε δ_H 7.01 και 6.79 ppm εμφανίζονται δύο διπλές κορυφές με $J = 8.4$ Hz που αποδίδονται στα πρωτόνια των θέσεων 5 και 6. Τέλος, σε δ_H 6.18 ppm εμφανίζεται μία διπλή κορυφή με $J = 9.4$ Hz που αποδίδεται στο H-3.



Εικόνα 7.6 Φάσμα ^1H NMR της 7,8-διυδροξυ-4-μεθυλο-3-(4-υδροξυφαινυλο)-κουμαρίνης (**39**).

Στο φάσμα ^1H NMR της **39** (Εικόνα 7.6), παρουσιάζεται αρχικά μία ευρεία κορυφή σε δ_{H} 9.55 ppm, η οποία ολοκληρώνεται για τρία πρωτόνια και αποδίδεται στα πρωτόνια των υδροξυλομάδων. Ακολουθεί μία διπλή κορυφή σε δ_{H} 7.13 ppm με $J = 8.4$ Hz που αποδίδεται στο H-5, ενώ σε δ_{H} 7.09 ppm εμφανίζεται μία διπλή κορυφή με $J = 8.4$ Hz που αποδίδεται στα χημικά ισοδύναμα πρωτόνια των θέσεων 2' και 6'. Στη συνέχεια, μεταξύ 6.83-6.80 ppm εμφανίζεται μία απλή κορυφή που αποδίδεται στα H-6, H-3' και H-5'. Τέλος, σε δ_{H} 2.20 ppm παρουσιάζεται μία απλή κορυφή που ολοκληρώνεται για τρία πρωτόνια και αποδίδεται στα πρωτόνια της μεθυλο-ομάδας.



Εικόνα 7.7 Φάσμα ^{13}C NMR της 7,8-διυδροξυ-4-μεθυλο-3-(4-υδροξυφαινυλο)-κουμαρίνης (**39**).

Στο φάσμα ^{13}C NMR της **39** (Εικόνα 7.7), παρουσιάζονται μεταξύ 160.50 και 142.33 ppm οι περισσότεροι αποθωρακισμένοι άνθρακες των θέσεων 2, 7, 8, 8a και 4'. Στη συνέχεια, μεταξύ 131.96 και 112.26 ppm εμφανίζονται οι κορυφές των υπόλοιπων ανθράκων του κουμαρινικού αναλόγου με χαρακτηριστικές τις κορυφές στα 131.60 και 114.83 ppm, οι οποίες αποδίδονται στους χημικά ισοδύναμους άνθρακες των θέσεων 2', 6' και 3', 5', αντίστοιχα. Τέλος, σε δε 16.59 ppm εμφανίζεται ο άνθρακας της μεθυλο-ομάδας της θέσης 4.

7.3.2 Μέση υδροδυναμική διάμετρος, δείκτης πολυδιασποράς (PDI), ζ-δυναμικό, Απόδοση Διεργασίας και Απόδοση Εγκλεισμού

Τα νανοσωματίδια στερεών λιπιδίων μπορούν να παρασκευαστούν με πολλές μεθόδους [16]. Στη συγκεκριμένη περίπτωση, εξετάστηκε η μέθοδος γαλακτωματοποίησης-εξάτμισης του διαλύτη, τόσο με μαγνητική ανάδευση όσο και με ομογενοποίηση, πάντα σε συνδυασμό με υπερήχους. Η τριμυριστίνη χρησιμοποιήθηκε σαν στερεό λιπίδιο μαζί με Tween 80 και φωσφατιδυλοχολίνη σαν γαλακτωματοποιητές.

7.3.2.1 Μαγνητική ανάδευση

Αρχικά, εξετάστηκε η μέθοδος γαλακτωματοποίησης-εξάτμισης του διαλύτη με μαγνητική ανάδευση όπου χρησιμοποιήθηκαν διαφορετικές αναλογίες μεταξύ των συστατικών με σκοπό τη βελτιστοποίηση των εξής ιδιοτήτων: μέση υδροδυναμική διάμετρος, δείκτης πολυδιασποράς (PDI), ζ-δυναμικό, απόδοση

διεργασίας και απόδοση εγκλεισμού. Η ποσότητα της 7,8-διωδροξυ-4-μεθυλο-3-(4-υδροξυφαινυλο)-κουμαρίνης (DHC, **39**) παρέμεινε σταθερή (20 mg). Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στον Πίνακα 7.4.

Πίνακας 7.4 Ποσότητες των συστατικών, μέση υδροδυναμική διάμετρος, δείκτης πολυδιασποράς (PDI) και ζ-δυναμικό των DHC-SLNs, απόδοση διεργασίας και απόδοση εγκλεισμού κάθε πειράματος.

Πείραμα	Τριμυριστίνη (mg)	Tween 80 (mg)	Φωσφατιδυλοχολίνη (mg)	Μέση υδροδυναμική διάμετρος (nm)	PDI	ζ-δυναμικό (mV)	Απόδοση διεργασίας (%)	Απόδοση εγκλεισμού (%)
1	200	100	-	320.4 ± 23.8	0.501 ± 0.069	-26.3 ± 1.4	59	30
2	200	125	-	180.1 ± 27.5	0.517 ± 0.073	-31.9 ± 3.4	13	10
3	200	150	-	474.2 ± 57.6	0.588 ± 0.056	-30.5 ± 0.7	10	36
4	200	100	100	235 ± 41.8	0.488 ± 0.061	-28.6 ± 2.6	55	31
5	200	125	100	293.6 ± 41.3	0.576 ± 0.05	-27.3 ± 1.7	58	52
6	200	150	100	219.2 ± 48	0.444 ± 0.087	-29.9 ± 4.1	57	39
7	400	100	100	269.4 ± 20.3	0.559 ± 0.075	-28.2 ± 0.9	33	33
8	200	150	50	246.6 ± 25.2	0.424 ± 0.038	-30.1 ± 1.3	47	39
9	200	100	50	230.7 ± 20.3	0.385 ± 0.098	-30.3 ± 2.9	76	44

Στην πρώτη σειρά πειραμάτων (1-3), πραγματοποιήθηκαν δοκιμές με διαφορετικές αναλογίες μεταξύ της τριμυριστίνης και του Tween 80, χωρίς την προσθήκη φωσφατιδυλοχολίνης. Τα νανοσωματίδια που παραλήφθηκαν εμφανίζουν μεγάλη τιμή δείκτη πολυδιασποράς (> 0.5), ενώ στα πειράματα 2 & 3 παρατηρήθηκαν εξαιρετικά χαμηλές τιμές απόδοσης διεργασίας (10% περίπου). Ακόμη, παρατηρήθηκε ότι τα νανοσωματίδια που παραλήφθηκαν σε ξηρή μορφή ύστερα από τη λυοφιλοποίηση ήταν ανομοιογενή και κολλώδους υφής.

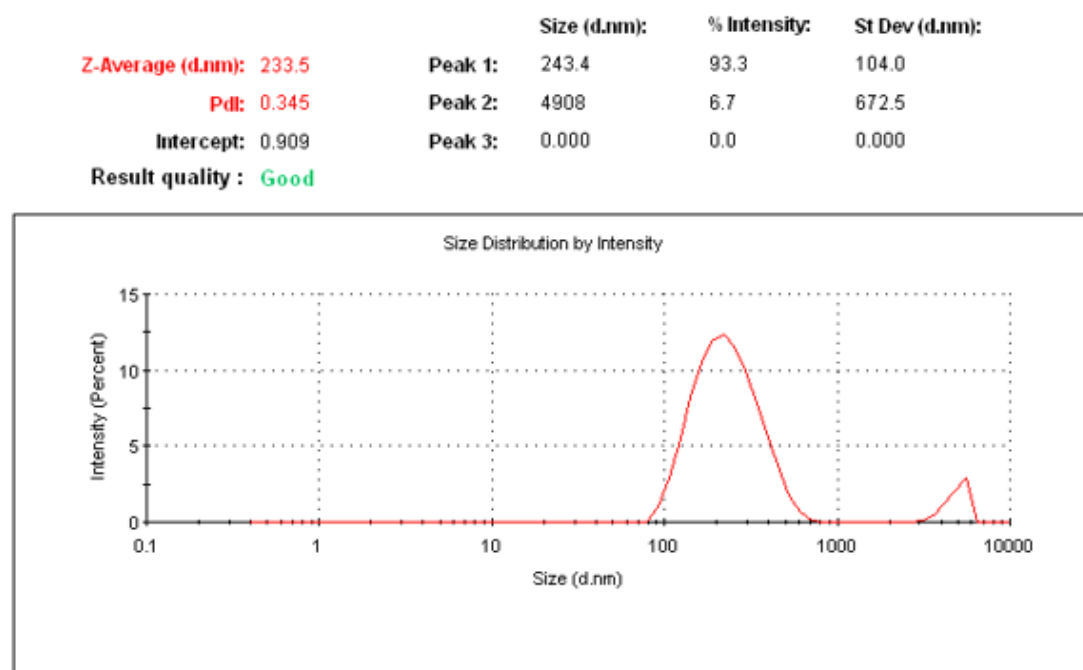
Αντιθέτως, οι δοκιμές παρουσία φωσφατιδυλοχολίνης (πειράματα 4, 5 και 6) εμφανίζουν βελτίωση ως προς το μέγεθος και το δείκτη πολυδιασποράς, καθώς και υψηλές αποδόσεις διεργασίας. Η συνδυαστική χρήση τόσο υδρόφιλων όσο και λιπόφιλων επιφανειοδραστικών παραγόντων έχει βρεθεί ότι βοηθά στη σταθερότητα των νανοσυστημάτων [72]. Συνεπώς, η προσθήκη της φωσφατιδυλοχολίνης στην παρασκευή των SLNs, κρίνεται απαραίτητη. Στη συγκεκριμένη σειρά δοκιμών, η χρήση 125 mg Tween 80 οδήγησε σε υψηλή τιμή μεγέθους και δείκτη πολυδιασποράς (293.6 nm και PDI 0.576) και επομένως η αντίστοιχη αναλογία αποκλείστηκε από περαιτέρω δοκιμές.

Πραγματοποιήθηκε επίσης δοκιμή διπλάσιας ποσότητας τριμυριστίνης, ίσης με 400 mg (πείραμα 7). Η αύξηση της ποσότητας της τριμυριστίνης δεν επέφερε σημαντικές αλλαγές στα αποτελέσματα, με εξαίρεση την απόδοση διεργασίας η οποία είναι εμφανώς χαμηλότερη (33%).

Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκαν δοκιμές (πειράματα 8 και 9) χρησιμοποιώντας τη μισή ποσότητα φωσφατιδυλοχολίνης (50 mg). Για την αναλογία τριμυριστίνη/Tween 80/ φωσφατιδυλοχολίνη = 200:100:50 (w/w/w) (πείραμα 9) παρατηρήθηκε η μικρότερη τιμή του δείκτη PDI (0.385) και η μέγιστη τιμή απόδοσης διεργασίας (76%) μεταξύ όλων των πειραμάτων, καθώς και ικανοποιητική τιμή μεγέθους των νανοσωματιδίων (230 nm) και απόδοσης εγκλεισμού (44%) και επομένως η αναλογία αυτή επιλέγεται ως βέλτιστη. Η τιμή του ζ-δυναμικού είναι κοντά στα -30 mV για όλες τις εξεταζόμενες συνθήκες, υποδηλώνοντας υψηλή σταθερότητα της υδατικής διασποράς των νανοσωματιδίων.

Είναι γνωστό ότι μικρότερο μέγεθος νανοσωματιδίων σχετίζεται με μεγαλύτερη ικανότητα διαπέρασης του φραγμού του δέρματος και νανοσυστήματα με μέγεθος έως 300 nm φαίνεται να έχουν την ικανότητα να διαπερνούν τις στιβάδες του δέρματος [73]. Ακόμη, για τους λιπιδικούς νανοφορείς, τιμές του δείκτη PDI στο 0.3 θεωρούνται αποδεκτές και ενδεικτικές ομοιόμορφου μεγέθους νανοσωματιδίων [74].

Ακολουθεί ενδεικτικό διάγραμμα κατανομής μεγέθους για τα DHC-SLNs που επέδειξαν τα βέλτιστα χαρακτηριστικά ως προς την υδροδυναμική διάμετρο, και δείκτη πολυδιασποράς (Εικόνα 7.8).



Εικόνα 7.8 Ενδεικτικό διάγραμμα κατανομής μεγέθους για τα DHC-SLNs (πείραμα 11) με τη μέθοδο DLS.

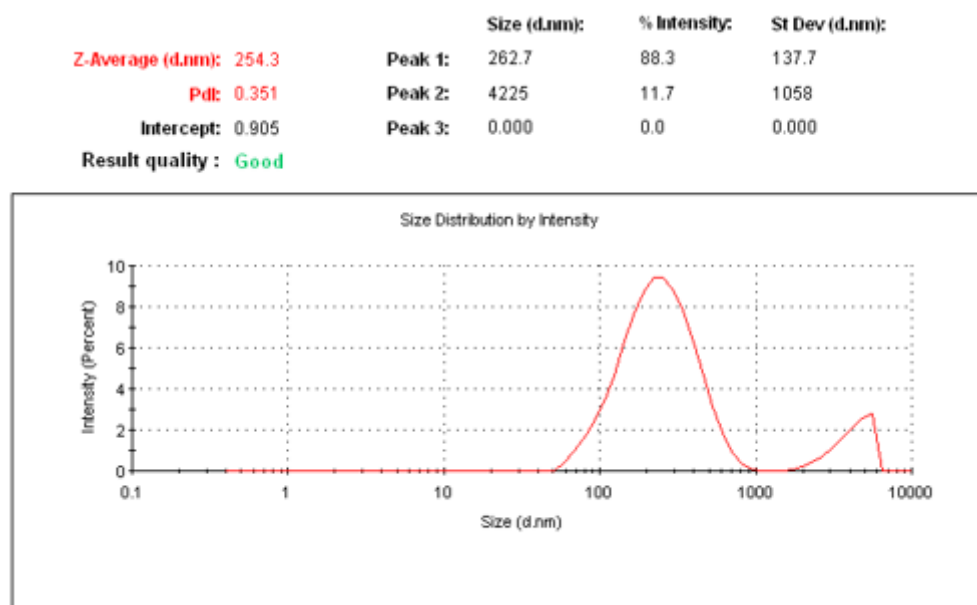
Ακόμη, ύστερα από την εύρεση της βέλτιστης αναλογίας, πραγματοποιήθηκαν δοκιμές οι οποίες αφορούσαν το σχηματισμό των νανοδωματιδίων που δεν περιέχουν εγκλεισμένη ουσία (blank-SLNs), αλλά και τον εγκλεισμό της δαφνετίνης (20 mg) (Πίνακας 7.5).

Πίνακας 7.5 Μέση υδροδυναμική διάμετρος, δείκτης πολυδιασποράς (PDI) και ζ-δυναμικό, απόδοση διεργασίας και απόδοση εγκλεισμού των DAPH-SLNs και Blank-SLNs.

Πείραμα	Τριμυριστίνη (mg)	Tween 80 (mg)	Φωσφατιδυλοχολίνη (mg)	Μέση υδροδυναμική διάμετρος (nm)	PDI	ζ-δυναμικό (mV)	Απόδοση διεργασίας (%)	Απόδοση εγκλεισμού (%)
10	200	100	50	256.2 ± 43.3	0.367 ± 0.063	-41.3 ± 1.5	60	81
11	200	100	50	236.3 ± 24.6	0.380 ± 0.063	-18.5 ± 1.5	80	-

Στην περίπτωση των DAPH-SLNs (πείραμα 10), σχηματίστηκαν νανοσωματίδια με τιμή μέσης υδροδυναμικής διαμέτρου 250 nm και τιμή PDI 0.37, ενώ για τα blank-SLNs (πείραμα 11) σχηματίστηκαν νανοσωματίδια μέσης υδροδυναμικής διαμέτρου 236 nm και με παρόμοια τιμή PDI (0.38). Ωστόσο, είναι αξιοσημείωτο ότι ο εγκλεισμός των κουμαρινικών αναλόγων στα SLNs οδήγησε σε αύξηση (κατ' απόλυτη τιμή) της τιμής του ζ-δυναμικού από -18 mV (blank-SLNs - πειρ. 11) σε -30 mV για τα DHC-SLNs (πειρ. 9) και -40 mV για τα DAPH-SLNs (πειρ. 10).

Ακολουθεί ενδεικτικό διάγραμμα κατανομής μεγέθους για τα DAPH-SLNs (πείραμα 10) (Εικόνα 7.9).



Εικόνα 7.9 Ενδεικτικό διάγραμμα κατανομής μεγέθους για τα DAPH-SLNs (πείραμα 10) με τη μέθοδο DLS.

7.3.2.2 Ομογενοποίηση

Υστερα από την εύρεση της βέλτιστης αναλογίας, εξετάστηκε η παρασκευή των DHC-SLNs με τη μέθοδο γαλακτωματοποίησης και εξάτμισης του διαλύτη μέσω ομογενοποίησης αντί για μαγνητική ανάδευση, σε συνδυασμό με υπερήχους (Πίνακας 7.6).

Πίνακας 7.6 Αποτελέσματα μεθόδου DLS, απόδοσης διεργασίας και απόδοσης εγκλεισμού των DHC-SLNs για τη μέθοδο γαλακτωματοποίησης και εξάτμισης του διαλύτη με ομογενοποίηση υψηλών στροφών.

Πείραμα	Στροφές (rpm)	Χρόνος υπερήχων (min)	Μέση υδροδυναμική διάμετρος (nm)	PDI	ζ-δυναμικό (mV)	Απόδοση Διεργασίας (%)	Απόδοση Εγκλεισμού (%)
12		0	285.0 ± 25.1	0.517 ± 0.022	-19.2 ± 0.9		
13	11000	5	187.3 ± 41.9	0.408 ± 0.068	-24.8 ± 5.4	79	45
14		10	288.7 ± 96.8	0.582 ± 0.072	-39.8 ± 2.4		
15		0	320.3 ± 58.3	0.583 ± 0.147	-24.8 ± 0.8		
16	15000	5	330.1 ± 92.2	0.703 ± 0.151	-33.8 ± 2.2	78	33
17		10	360.8 ± 86.0	0.678 ± 0.093	-31.3 ± 4.0		

Όσον αφορά τις δοκιμές που πραγματοποιήθηκαν με τη χρήση ομογενοποίησης, οι οποίες έγιναν με βάση τη βέλτιστη αναλογία τριμυριστίνη/Tween 80/ φωσφατιδυλοχολίνη = 200:100:50 (w/w/w), εξετάστηκε η επίδραση τόσο των στροφών (rpm) της ομογενοποίησης όσο και του χρόνου υπερήχων στο σχηματισμό των SLNs.

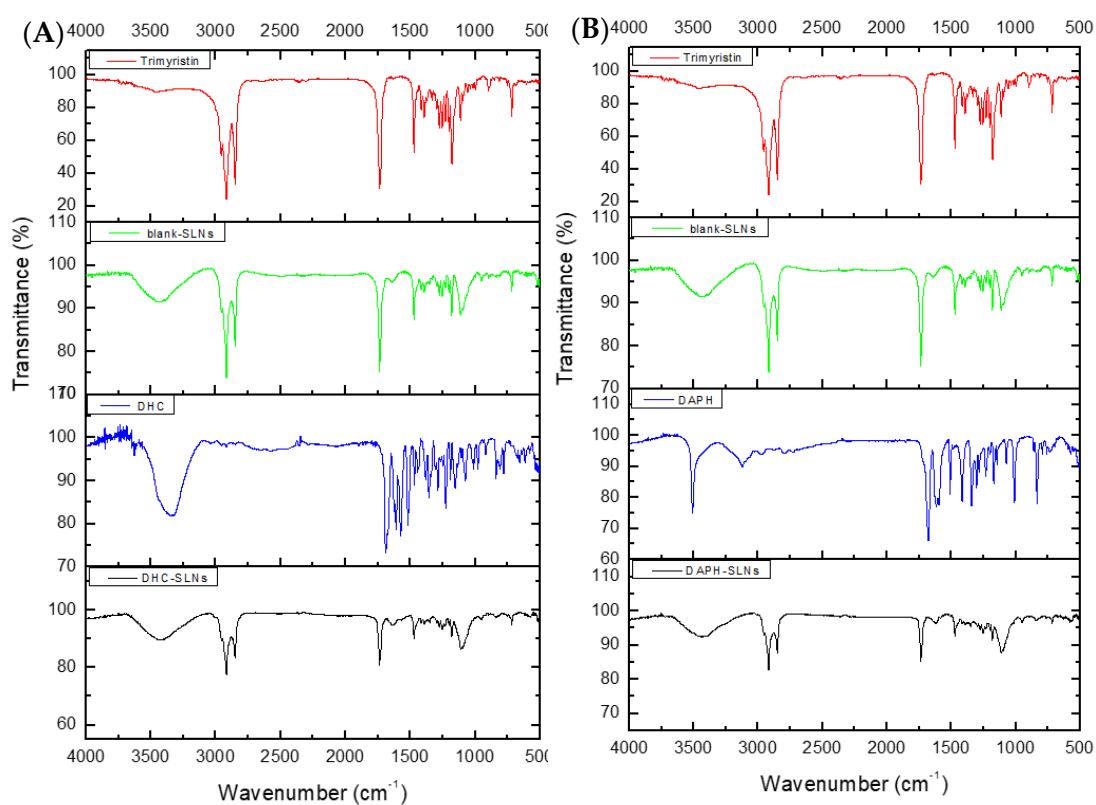
Αρχικά παρατηρείται ότι η χρήση υπερήχων (δοκιμές 13, 14, 16 και 17) συνεισφέρει σημαντικά στην αύξηση της τιμής του ζ-δυναμικού, και άρα στην σταθερότητα των νανοσωματιδίων σε διασπορά, σε σχέση με τις δοκιμές 12 και 15 όπου δεν πραγματοποιήθηκε υπερήχηση (-19.2 και -24.8 mV, αντίστοιχα). Επιπλέον, από τα αποτελέσματα που προκύπτουν στην περίπτωση των χαμηλότερων στροφών (11000 rpm) φαίνεται ότι ιδανική διάρκεια εφαρμογής υπερήχων αποτελούν τα 5 min, καθώς στα 10 min εμφανίζεται σημαντική αύξηση τόσο του μεγέθους των νανοσωματιδίων όσο και του δείκτη πολυδιασποράς. Αυτό πιθανόν οφείλεται στην πρόσδοση πλεονάζουσας ενέργειας στο σύστημα, η οποία προκαλεί τη συσσωμάτωση των νανοσωματιδίων λόγω των υψηλών τιμών κινητικής ενέργειας

που αποκτούν, με αποτέλεσμα την αύξηση τόσο του μεγέθους όσο και του δείκτη πολυδιασποράς [75].

Το συμπέρασμα αυτό επιβεβαιώνεται και στην περίπτωση της πρόσδοσης περίσσειας ενέργειας μέσω της χρήσης υψηλότερων στροφών (πειράματα 15, 16, 17), καθώς αυτές οδηγούν σε σημαντική αύξηση του μεγέθους και του δείκτη PDI, αλλά και σε μείωση της απόδοσης εγκλεισμού, σε σχέση με το πείραμα που πραγματοποιήθηκε στις χαμηλότερες στροφές.

7.3.3 Φασματοσκοπία FT-IR

Τα φάσματα FT-IR των: τριμυριστίνη, DHC (39), DAPH (37), DHC-SLNs και DAPH-SLNs παρουσιάζονται στην Εικόνα 7.10, ενώ οι χαρακτηριστικές δονήσεις παρουσιάζονται στον Πίνακα 7.7.



Εικόνα 7.10 Συγκριτικό φάσμα FT-IR των: (A): τριμυριστίνη, blank SLNs, DHC και DHC-SLNs και (B): τριμυριστίνη, blank SLNs, DAPH και DAPH-SLNs.

Πίνακας 7.7 Χαρακτηριστικές δονήσεις των: τριμυριστίνη, DHC, DAPH, blank SLNs, DHC-SLNs και DAPH-SLNs.

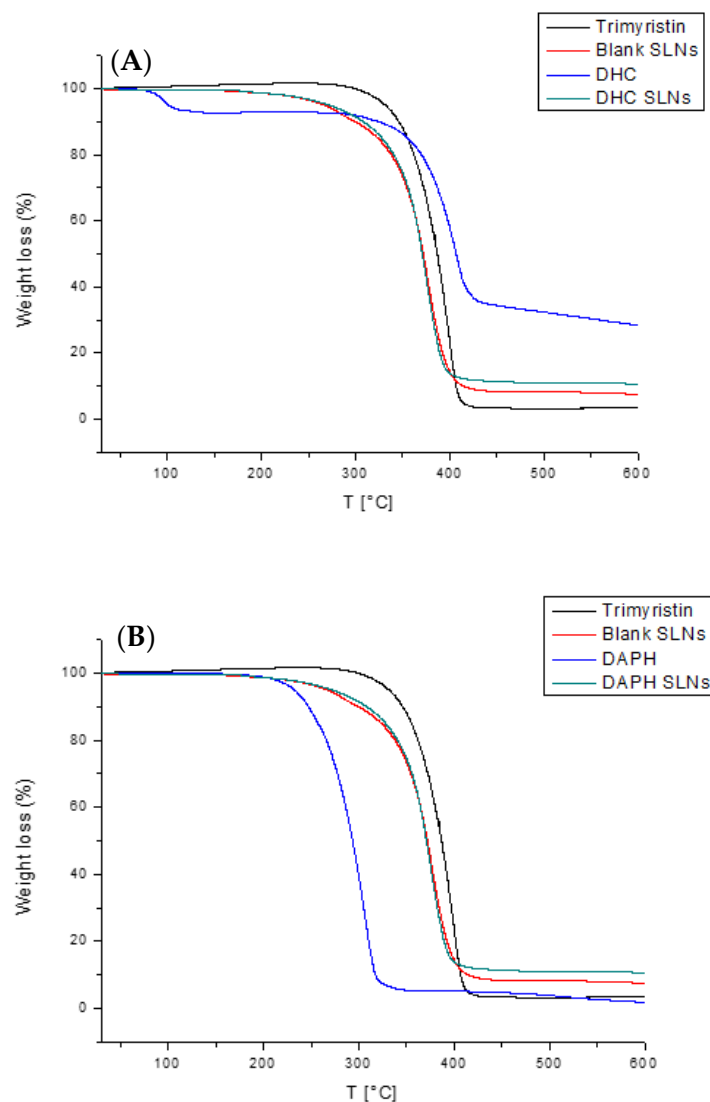
Δείγμα	Χαρακτηριστικές δονήσεις (cm ⁻¹)				
	Δόνηση τάσης O-H	Δόνηση τάσης C-H	Δόνηση τάσης C=O	Δόνηση κάμψης C-H	Δόνηση τάσης C-O
Τριμυριστίνη	-	2956 2911 2849	1737	1472	1179
DHC (39)	3345	-	1687	1470	1190
DAPH (37)	3508	3121 2973 2796	1679	-	1181
Blank SLNs	3437	2916 2849	1737	1472	1182
DHC-SLNs	3425	2916 2849	1737	1471	1182
DAPH-SLNs	3425	2916 2849	1737	1472	1112

Οι χαρακτηριστικές κορυφές του φάσματος FT-IR των Blank-SLNs εμφανίζονται στα 3437 cm⁻¹, η οποία αποδίδεται στη δόνηση τάσης O-H, στα 2916 cm⁻¹ και 2849 cm⁻¹, που αποδίδονται στη C-H δόνηση τάσης των αλειφατικών αλυσίδων της τριμυριστίνης, της φωσφατιδυλοχολίνης και του Tween 80, στα 17367 cm⁻¹, κορυφή η οποία αποδίδεται στην C=O δόνηση τάσης και στα 1472 cm⁻¹ που αποδίδεται στην C-H δόνηση κάμψης. Τέλος, η κορυφή στα 1182 cm⁻¹ αποδίδεται στη C-O δόνηση τάσης εστέρων.

Συγκρίνοντας τα φάσματα των blank-SLNs με αυτά των DHC-SLNs και DAPH-SLNs, παρατηρείται σημαντική ομοιότητα που πιθανώς οφείλεται στη μεγαλύτερη περιεκτικότητα των νανοσωματιδίων σε φορέα (τριμυριστίνη) σε σχέση με βιοδραστική ουσία, υπερκαλύπτοντας με αυτό τον τρόπο τις κορυφές των κουμαρινικών αναλόγων. Ακόμη, η απουσία χαρακτηριστικών κορυφών των κουμαρινών είναι ενδεικτική του επιτυχούς εγκλεισμού τους στα SLNs [76]. Τέλος, η μετατόπιση της κορυφής που αποδίδεται στην O-H δόνηση τάσης, η οποία εμφανίζεται πλέον στα 3425 cm⁻¹ αποτελεί ένδειξη της αλληλεπίδρασης των ομάδων OH των DHC και DAPH, που έχουν εγκλειστεί στα νανοσωματίδια με τα υπόλοιπα συστατικά των SLNs, καθώς είναι γνωστό ότι οι δονήσεις O-H επηρεάζονται σημαντικά από το σχηματισμό δεσμών υδρογόνου [77]. Οι χαρακτηριστικές κορυφές της τριμυριστίνης και των δύο κουμαρινικών αναλόγων παρουσιάζονται στον Πίνακα 7.7.

7.3.4 Θερμοσταθμική Ανάλυση (TGA)

Η θερμοσταθμική ανάλυση (TGA) πραγματοποιήθηκε προκειμένου να διερευνηθεί η θερμική σταθερότητα των SLNs και τα γραφήματα παρουσιάζονται στην Εικόνα 7.11.



Εικόνα 7.11 Συγκριτικά γραφήματα TG των: **(Α)**: τριμυριστίνη, DHC, blank-SLNs και DHC-SLNs και **(Β)**: τριμυριστίνη, DAPH, blank-SLNs και DAPH-SLNs.

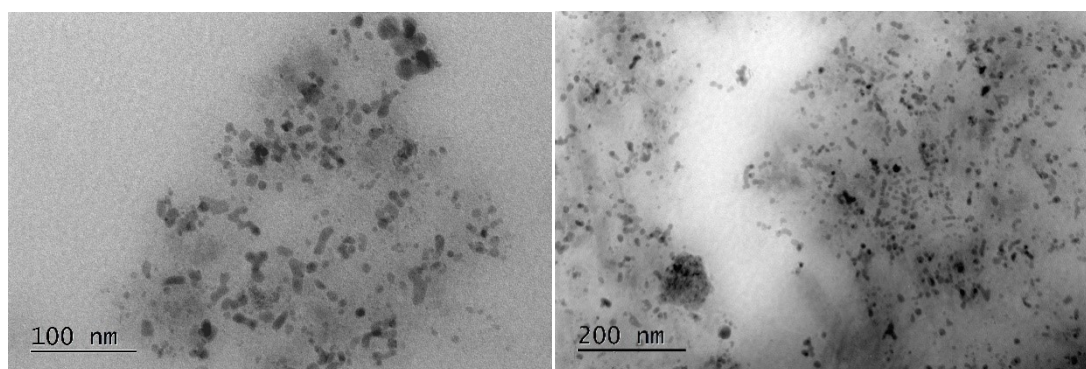
Η θερμοσταθμική ανάλυση υπέδειξε τις ακόλουθες θερμοκρασίες όπου παρουσιάζεται η μέγιστη απώλεια μάζας: (i) για την τριμυριστίνη στους 389 °C με οργανικό υπόλειμμα ίσο με 3% στους 600 °C, (ii) για τη DHC, στους 398 °C με 29% οργανικό υπόλειμμα, (iii) για τη DAPH στους 302 °C με οργανικό υπόλειμμα ίσο με 2%, (iv) για τα blank SLNs στους 369 °C με 7% οργανικό υπόλειμμα, (v) για τα DHC-SLNs στους 367 °C με 10% οργανικό υπόλειμμα, (vi) για τα DAPH-SLNs στους 363 °C με 10% οργανικό υπόλειμμα στους 600 °C.

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της θερμοσταθμικής ανάλυσης, τα σχηματιζόμενα νανοσωματίδια στερεών λιπιδίων παρουσίασαν υψηλή θερμική

σταθερότητα. Ειδικότερα, για τα DHC-SLNs, η θερμοκρασία μέγιστης απώλειας μάζας είναι υψηλή (367 °C), αλλά χαμηλότερη από την DHC σε ελεύθερη μορφή (398 °C), ενώ για τα DAPH-SLNs αυξήθηκε σημαντικά (363 °C), σε σχέση με την DAPH σε ελεύθερη μορφή (302 °C).

7.3.5 Ηλεκτρονική Μικροσκοπία Διερχόμενης Δέσμης (TEM)

Τα SLNs που παρασκευάστηκαν χωρίς προσθήκη κουμαρινικής ένωσης (blank SLNs) εξετάστηκαν ως προς τη μορφολογία τους μέσω Ηλεκτρονικής Μικροσκοπίας Διερχόμενης Δέσμης (Transmission Electron Microscopy, TEM) (Εικόνα 7.12).



Εικόνα 7.12 Εικόνες TEM των blank-SLNs.

Από τις εικόνες TEM παρατηρείται ότι τα σωματίδια παρουσιάζουν αρκετά ομοιόμορφη σφαιρική μορφολογία με μέγεθος 20 – 50 nm και ελάχιστες συσσωματώσεις. Σε αυτό το σημείο πρέπει να σημειωθεί ότι η μέθοδος Δυναμικής Σκέδασης Φωτός και η Ηλεκτρονική Μικροσκοπία Διερχόμενης Δέσμης αποτελούν δύο διαφορετικές μεθόδους. Η μέθοδος DLS χρησιμοποιείται για τον προσδιορισμό της υδροδυναμικής διαμέτρου των σωματιδίων, στηριζόμενη στη μέτρηση της έντασης της σκεδαζόμενης ακτινοβολίας σε σχέση με το χρόνο, ενώ φέρει αρκετές παραδοχές και επηρεάζεται σημαντικά από την παρουσία συσσωμάτων [78,79]. Ακόμη, κατά τη μέθοδο TEM, είναι δυνατόν λόγω της απουσίας διαλύτη (H₂O) και των συνθηκών κενού που επικρατούν κατά τη μέτρηση να προκαλείται μείωση του μεγέθους των σωματιδίων και ενδεχομένως και συσσωμάτωση [80].

7.3.6 Μελέτη σταθερότητας

Η υδροδυναμική διάμετρος, ο δείκτης πολυδιασποράς, το ζ-δυναμικό και η απόδοση εγκλεισμού των DHC-SLNs και DAPH-SLNs μελετήθηκαν μετά από έναν και έξι μήνες αποθήκευσης υπό ψύξη (Πίνακας 7.8).

Πίνακας 7.8 Μέση υδροδυναμική διάμετρος, δείκτης πολυδιασποράς (PDI), ζ-δυναμικό και απόδοση απόδοση εγκλεισμού των SLNs μετά από αποθήκευση για έναν και έξι μήνες.

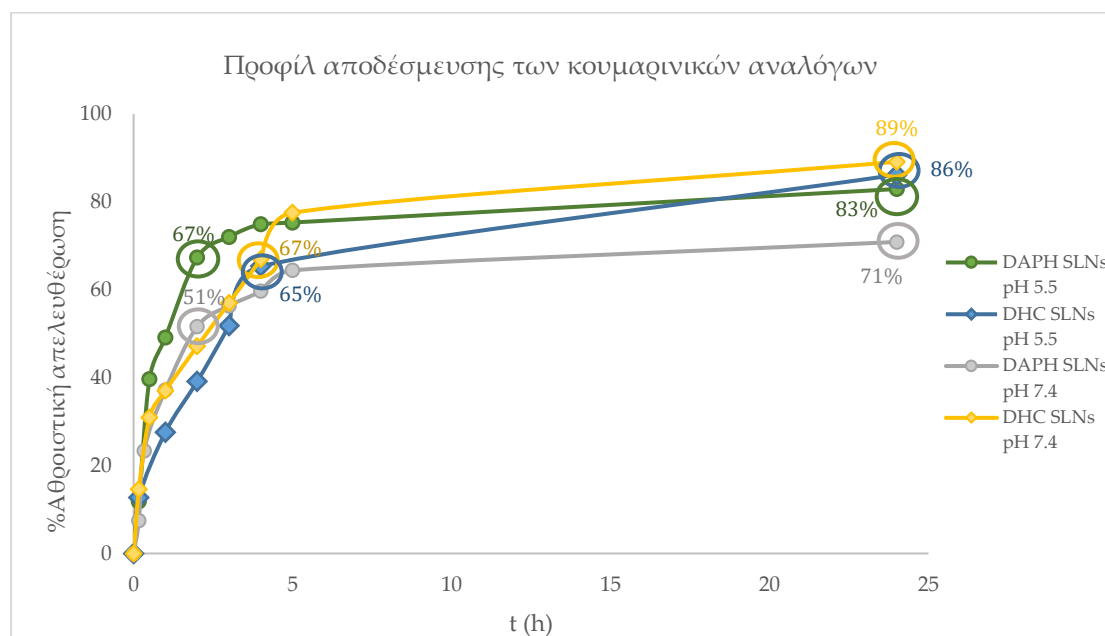
Χρόνος	Μέση υδροδυναμική διάμετρος (nm)	PDI	ζ-δυναμικό (mV)	Απόδοση εγκλεισμού (%)
DHC-SLNs				
Ημέρα 1 ^η	209.1 ± 13.8	0.420 ± 0.077	-29.9 ± 0.7	40
Ημέρα 30 ^η	228.3 ± 22.2	0.420 ± 0.048	-30.4 ± 1.3	40
Ημέρα 180 ^η	259.7 ± 55.8	0.465 ± 0.052	-30.1 ± 2.4	31
DAPH-SLNs				
Ημέρα 1 ^η	236.2 ± 43.3	0.367 ± 0.063	-41.3 ± 1.5	82
Ημέρα 30 ^η	219.1 ± 20.3	0.385 ± 0.052	-38.9 ± 1.4	82
Ημέρα 180 ^η	226.0 ± 33.2	0.468 ± 0.081	-34.8 ± 4.2	74

Όσον αφορά τα DHC-SLNs, παρατηρείται μια μικρή αύξηση στο μέγεθος των σωματιδίων κατά τις δύο χρονικές περιόδους αποθήκευσης, ενώ το ζ-δυναμικό παρέμεινε σταθερό. Για τα DAPH-SLNs, όλες οι παράμετροι βρέθηκαν σταθερές μετά από ένα μήνα αποθήκευσης, ενώ μετά από έξι μήνες, η τιμή PDI παρουσίασε μικρή αύξηση, γεγονός που μαζί με τη μείωση στην τιμή του ζ-δυναμικού υποδεικνύει μερική συσσωμάτωση. Συνολικά, τα δείγματα παρουσίασαν ικανοποιητική σταθερότητα μετά από 6 μήνες και άρα η συγκέντρωση των επιφανειοδραστικών παραγόντων ήταν επαρκής ώστε να καλύψει αποτελεσματικά την επιφάνεια των νανοσωματιδίων και να αποτρέψει τη συσσωμάτωσή τους κατά την αποθήκευση [72]. Επιπλέον, οι υδατικές διασπορές των SLNs επαναφυγοκεντρίθηκαν μετά από αποθήκευση στο ψυγείο για περίοδο ενός μήνα χωρίς ωστόσο να ανιχνευθεί ελεύθερη κουμαρίνη στο ίζημα και άρα η απόδοση εγκλεισμού παρέμεινε σταθερή. Μετά από έξι μήνες αποθήκευσης, η απόδοση εγκλεισμού μετρήθηκε εκ νέου και βρέθηκε ελαφρώς μειωμένη, γεγονός που υποδηλώνει πολύ καλή σταθερότητα των νανοσυστημάτων. Η καλή σταθερότητα των SLNs κατά την αποθήκευση σε συνθήκες ψύξης έχει παρουσιαστεί και σε άλλες μελέτες [81,82].

7.3.7 Μελέτη αποδέσμευσης και κινητική μοντελοποίηση

Η μελέτη αποδέσμευσης των κουμαρινικών αναλόγων από τα SLNs πραγματοποιήθηκε σε δύο διαφορετικές συνθήκες: i) στους 37 °C και σε pH 7.4 ώστε να προσομοιάζει τις φυσιολογικές συνθήκες του ανθρώπινου οργανισμού και ii) στους 35 °C και σε pH 5.5 ώστε να προσομοιάζει τις συνθήκες του δέρματος [15]. Τα προφίλ αποδέσμευσης παρουσιάζονται στην Εικόνα 7.13, ενώ στη συνέχεια τα δεδομένα προσαρμόστηκαν σε τέσσερα διαφορετικά κινητικά

μοντέλα (μηδενικής τάξης, πρώτης τάξης, Higuchi and Korsmeyer-Peppas) και τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στον Πίνακα 7.9.



Εικόνα 7.13 Προφίλ αποδέσμευσης των κουμαρινικών αναλόγων από τα SLNs, σε διαφορετικές συνθήκες (37 °C, pH 7.4 και 35 °C, pH 5.5).

Πίνακας 7.9 Αποτελέσματα κινητικής μοντελοποίησης.

	Μηδενικής τάξης R^2	Πρώτης τάξης R^2	Higuchi R^2	Korsmeyer-Peppas R^2	Εξίσωση Higuchi	Εξίσωση Korsmeyer-Peppas
DHC-SLNs pH 7.4	0.5116	0.1915	0.8026	0.8797	$y=18.136x+17.682$	$y=0.6104x+0.3534$
DHC-SLNs pH 5.5	0.6184	0.2433	0.8604	0.9187	$y=17.373x+11.964$	$y=0.618x+0.2547$
DAPH-SLNs pH 7.4	0.376	0.1778	0.7854	0.8934	$y=14.618x+18.046$	$y=0.6233x+0.2624$
DAPH-SLNs pH 5.5	0.3087	0.1428	0.7123	0.8439	$y=16.204x+26.642$	$y=0.6227x+0.3754$

Το προφίλ απελευθέρωσης της 7,8-διυδροξυ-3-(4-υδροξυφαινυλ)-4-μεθυλοκουμαρίνης (DHC, **39**) και στις δύο εξεταζόμενες συνθήκες εμφάνισε ταχεία αποδέσμευση ("burst effect") κατά τις πρώτες 4 h (66% περίπου), ενώ η ένωση συνέχισε να αποδεσμεύεται σταδιακά μέχρι τις 24 h. Από τις τιμές του συντελεστή προσδιορισμού (R^2) παρατηρείται ότι τα δεδομένα της αποδέσμευσης προσαρμόζονται καλύτερα στο μοντέλο Higuchi, ενώ η τιμή του εκθέτη διάχυσης ($n>0,5$) στο μοντέλο Korsmeyer-Peppas υπέδειξε το μηχανισμό μη-ομαλής (μη-fickian) διάχυσης [44].

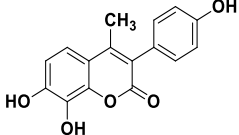
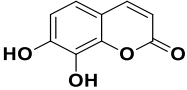
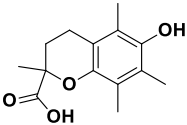
Όσον αφορά το προφίλ απελευθέρωσης της δαφνετίνης (DAPH, 37), παρατηρείται ταχεία αποδέσμευση στις πρώτες 2 h τόσο σε pH 5.5 όσο και σε pH 7.4 (67% και 51%, αντίστοιχα), η οποία συνεχίζεται σταδιακά μέχρι τις 24 h. Το συντομότερο “burst effect” της δαφνετίνης σε σχέση με τη DHC θα μπορούσε πιθανώς να αποδοθεί στην υψηλότερη υδροφιλικότητα της και επομένως στην ισχυρότερη τάση της να μεταναστεύει στην εξωτερική επιφάνεια των νανοσωματιδίων [83], γεγονός που θα μπορούσε επίσης να εξηγήσει τις υψηλότερες τιμές απόδοσης εγκλεισμού και ζ-δυναμικού των DAPH-SNLs. Όσον αφορά τις μελέτες κινητικής μοντελοποίησης, τα δεδομένα αποδέσμευσης ταιριάζουν καλύτερα στο μοντέλο Higuchi, ενώ το μοντέλο Korsmeyer-Peppas υπέδειξε τον μηχανισμό μη-ομαλής διάχυσης (Πίνακας 7.9).

7.3.8 Αντιοξειδωτική δράση

Η αντιοξειδωτική δράση των κουμαρινικών αναλόγων καθώς και των νανοσυστημάτων τους (SLNs) μελετήθηκε με δύο διαφορετικές δοκιμές: i) την ικανότητα δέσμευσης της ελεύθερης ρίζας 2,2-διφαινυλ-1-πικρυλυδραζύλιο (DPPH) και ii) την ικανότητα αναστολής της λιπιδικής υπεροξειδωσης του λινελαϊκού οξέος υποκινούμενη από τον εκκινητή ελευθέρων ριζών διϋδροχλωρικό άλας του 2,2'-αζοδισ-(2-αμιδινοπροπανίου, AAPH (Πίνακες 7.10 & 7.11).

7.3.8.1 Ικανότητα δέσμευσης της ελεύθερης ρίζας DPPH

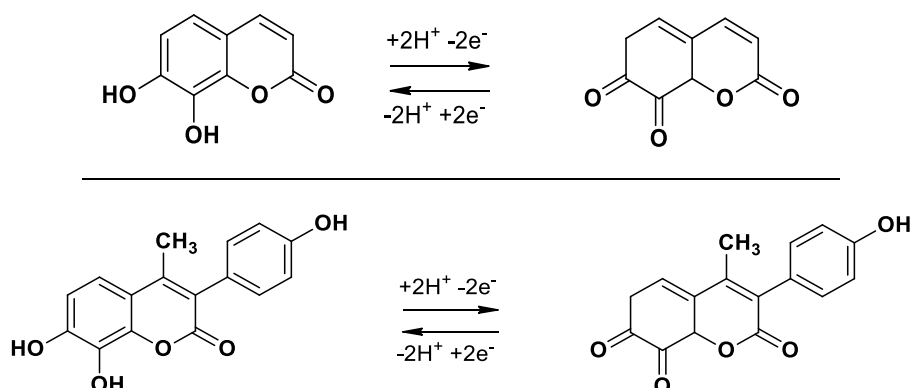
Πίνακας 7.10 Αποτελέσματα δέσμευσης της ελεύθερης ρίζας DPPH.

Δείγμα	Δομή	Δέσμευση DPPH 30 min IC ₅₀ (μM)	Δέσμευση DPPH 60 min IC ₅₀ (μM)
DHC		28.8 ± 5.8	12.8 ± 4.1
DHC-SLNs		36.7 ± 3.3	7.1 ± 0.8
DAPH		18.3 ± 3.0	9.1 ± 0.1
DAPH-SLNs		9.5 ± 1.7	4.8 ± 1.5
Blank-SLNs	-	no	no
Trolox		17.1 ± 0.5	9.6 ± 0.7

no: Δεν έδειξε δράση στις συγκεκριμένες πειραματικές συνθήκες

Όσον αφορά την ικανότητα των ενώσεων να δεσμεύουν την ελεύθερη ρίζα DPPH, παρατηρείται ότι τόσο η δαφνετίνη (DAPH), όπως είναι γνωστό από τη βιβλιογραφία [69], όσο και το συνθετικό της ανάλογο (DHC) εμφάνισαν αξιοσημείωτη αντιοξειδωτική δράση στα 60 min με τιμές IC₅₀ 9.1 μM και 12.8 μM, αντίστοιχα. Είναι γνωστό ότι οι ενώσεις που φέρουν ορθο-διυδροξυ

υποκατάσταση (κατεχολικό σύστημα) στη δομή τους παρουσιάζουν υψηλή ικανότητα δέσμευσης της ελεύθερης ρίζας DPPH λόγω της μετατροπής τους στις αντίστοιχες σταθερές ο-κινόνες [84] (Σχήμα 7.5).



Σχήμα 7.5 Μετατροπή των DAPH και DHC στις αντίστοιχες ο-κινόνες.

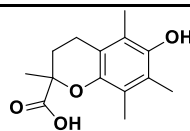
Όσον αφορά τα νανοσωματίδια στερεών λιπιδίων, τα DHC-SLNs εμφάνισαν βελτιωμένη αντιοξειδωτική δράση σε σχέση με την ελεύθερη ένωση στα 60 min, ενώ τα DAPH-SLNs παρουσίασαν υψηλότερη αντιοξειδωτική δράση από τη DAPH στην ελεύθερη μορφή της, τόσο στα 30 min όσο και στα 60 min. Αυτή η παρατήρηση είναι σύμφωνη με τις μελέτες απελευθέρωσης που υποδεικνύουν τον ταχύτερο ρυθμό απελευθέρωσης DAPH από τα SLNs. Συγκεκριμένα, στα 30 min τα DAPH-SLNs παρουσίασαν περίπου την ίδια ικανότητα δέσμευσης του DPPH (IC_{50} 9.5 μ M) με τη DAPH στα 60 min (IC_{50} 9.1 μ M). Ωστόσο, και τα δύο κουμαρινικά ανάλογα παρουσίασαν βελτιωμένη αντιοξειδωτική δράση στα 60 min στην εγκλεισμένη τους μορφή (DAPH-SLNs: IC_{50} 4.8 μ M και DHC-SLNs: IC_{50} 7.1 μ M) σε σχέση με την ελεύθερη μορφή (DAPH: IC_{50} 9.1 μ M και DHC: IC_{50} 12.8 μ M), η οποία θα μπορούσε να αποδοθεί σε συνεργιστική δράση μεταξύ των κουμαρινικών παραγώγων και των λιπιδίων που περιέχονται στα SLNs (τριμυριστίνη και φωσφατιδυλοχολίνη). Οι παρατηρήσεις αυτές είναι σύμφωνες και με άλλες αντίστοιχες δημοσιευμένες μελέτες [85].

7.3.8.2 Ικανότητα αναστολής της λιπιδικής υπεροξειδωσης

Πίνακας 7.11 Αποτελέσματα αναστολής της λιπιδικής υπεροξειδωσης.

Δείγμα	Δομή	(%) Αναστολή της λιπιδικής υπεροξειδωσης (100 μ M)
DHC		50
DHC-SLNs		74
DAPH		57
DAPH-SLNs		76
Blank-SLNs	-	20

Trolox



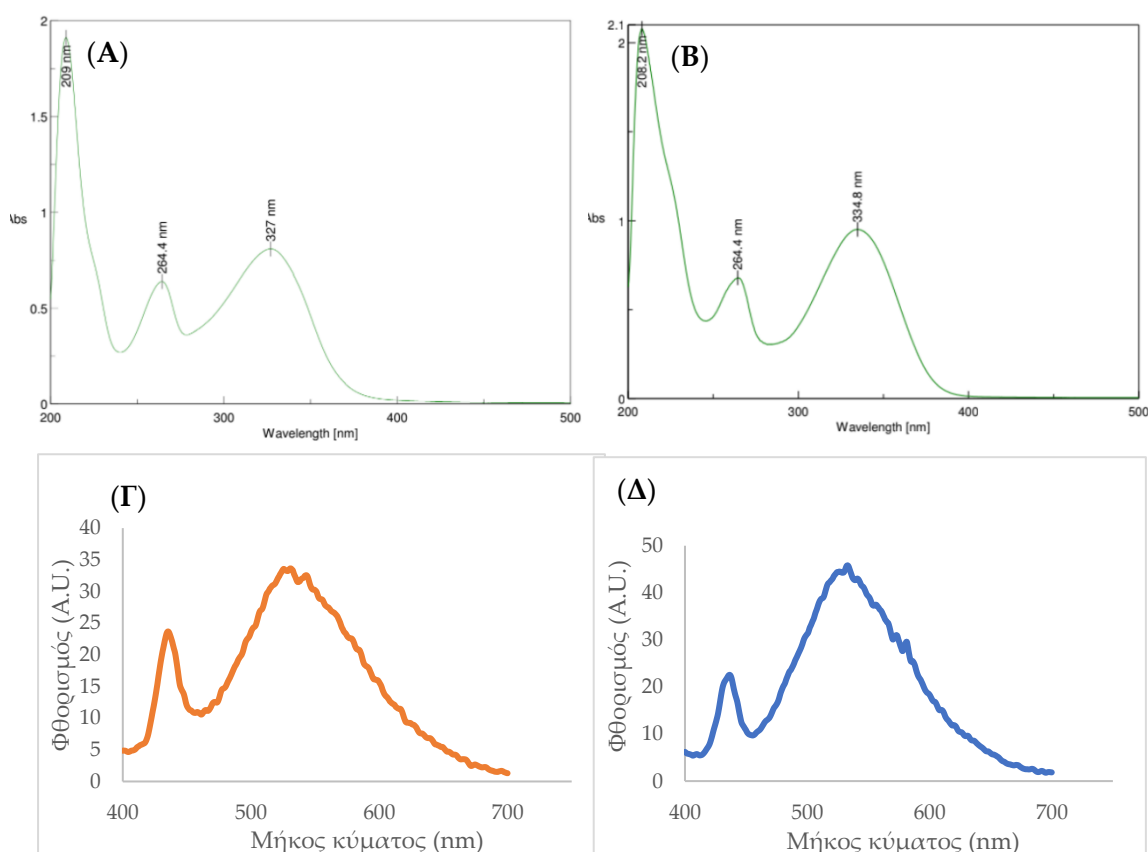
81

Η λιπιδική υπεροξειδωση αποτελεί μια αλυσιδωτή αντίδραση που οδηγεί στην παραγωγή λιπιδικών υπεροξειδίων και άλλων επικίνδυνων προϊόντων (π.χ. εποξειδία, κετόνες, αλδεΰδες) και σχετίζεται με κυτταρικές βλάβες [86]. Όσον αφορά την ικανότητα των κουμαρινικών παραγώγων να αναστέλλουν τη λιπιδική υπεροξειδωση *in vitro*, παρατηρείται ότι και τα δύο ανάλογα παρουσίασαν χαμηλή δράση (50-60%) σε συγκέντρωση 100 μM . Ωστόσο, είναι αξιοσημείωτο ότι η δράση τους ενισχύθηκε σημαντικά μετά τον εγκλεισμό τους στα νανοσωματίδια στερεών λιπιδίων (74% και 76%).

7.3.9 Φωτοφυσικές ιδιότητες

7.3.9.1 Απορρόφηση και φθορισμός

Τα φάσματα απορρόφησης και φθορισμού των κουμαρινικών αναλόγων παρουσιάζονται στην Εικόνα 7.14.

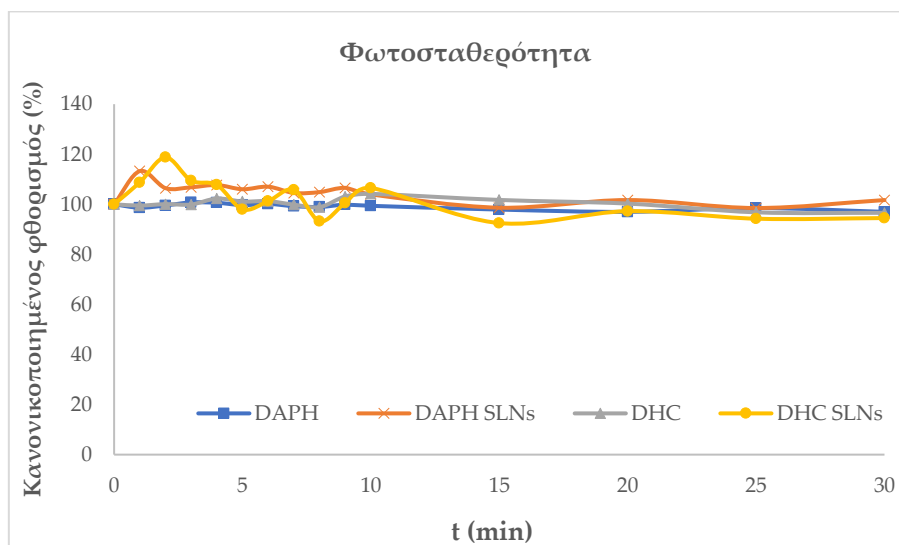


Εικόνα 7.14 Φάσματα απορρόφησης των: (Α): DAPH και (Β): DHC σε αιθανόλη (70 μM) και φάσματα φθορισμού των: (Γ): DAPH και (Δ): DHC σε PBS (50 μM).

Τα δύο κουμαρινικά ανάλογα παρουσιάζουν παρόμοια φάσματα απορρόφησης με κορυφή στα 327 nm για τη DAPH και 335 nm για τη DHC, σε αιθανόλη. Τα φάσματα φθορισμού τους σε PBS είναι επίσης παρόμοια όσον αφορά το μέγιστο μήκος κύματος εκπομπής (530 nm και 535 nm για τη DAPH και τη DHC, αντίστοιχα), ενώ η DAPH διεγείρεται στα 400 nm και η DHC στα 380 nm.

7.3.9.2 Μελέτη φωτοσταθερότητας

Η φωτοσταθερότητα των κουμαρινικών αναλόγων σε συγκέντρωση 10 μM μελετάται μέσω της λήψης φασμάτων φθορισμού μετά από ακτινοβολία με κατάλληλη πηγή φωτός με 13 mW/cm^2 για 30 min συνολικά (Εικόνα 7.15).

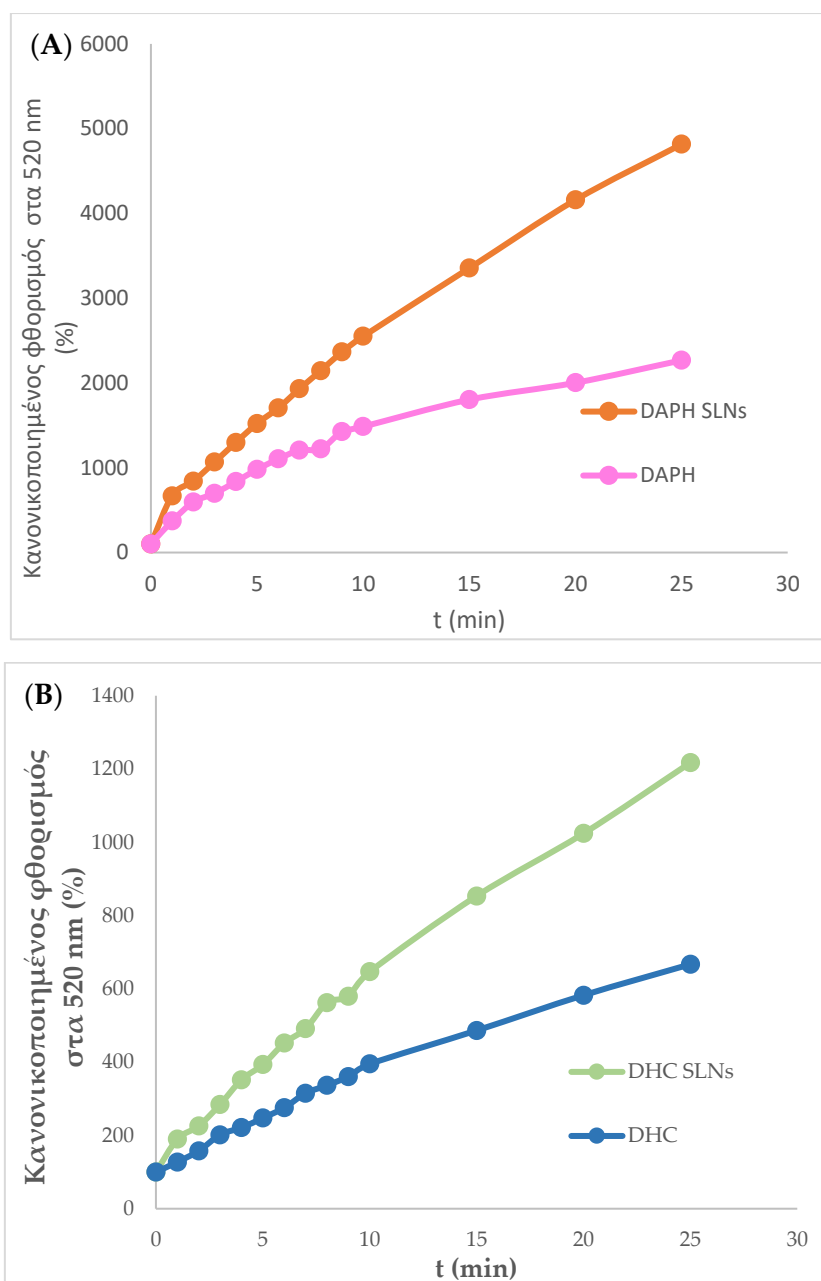


Εικόνα 7.15 (%) Κανονικοποιημένος φθορισμός των κουμαρινικών αναλόγων σε ελεύθερη και εγκλεισμένη μορφή σε σχέση με το χρόνο ακτινοβολίας.

Η σταθερότητα ενός φωτοευαίσθητοποιητή αποτελεί κρίσιμη παράμετρο καθώς φαινόμενα φωτοκαταστροφής (photobleaching) μπορούν να περιορίσουν τη δράση του [87]. Επομένως, είναι σημαντικό ότι τα κουμαρινικά ανάλογα βρέθηκαν σταθερά υπό τις εξεταζόμενες συνθήκες ακτινοβολίας τόσο στην ελεύθερη όσο και στην εγκλεισμένη μορφή τους.

7.3.10 Παραγωγή Δραστικών Μορφών Οξυγόνου (ROS)

Η ικανότητα των κουμαρινικών αναλόγων και των SLNs να παράγουν ελεύθερες ρίζες έπειτα από ακτινοβολία με ισχύ 13 mW/cm^2 για 25 min μελετήθηκε χρησιμοποιώντας την ουσία CM-H2DCFDA (Εικόνα 7.16).

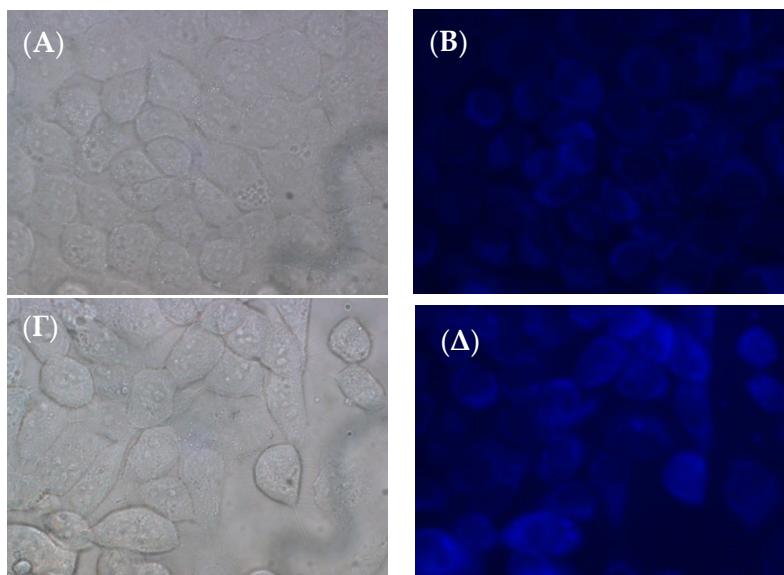


Εικόνα 7.16 (%) Κανονικοποιημένος φθορισμός στα 520 nm σε σχέση με το χρόνο ακτινοβολήσης για τα: **(A)**: DAPH και DAPH-SLN_s (10 μM) και **(B)**: DHC και DHC-SLN_s (10 nM).

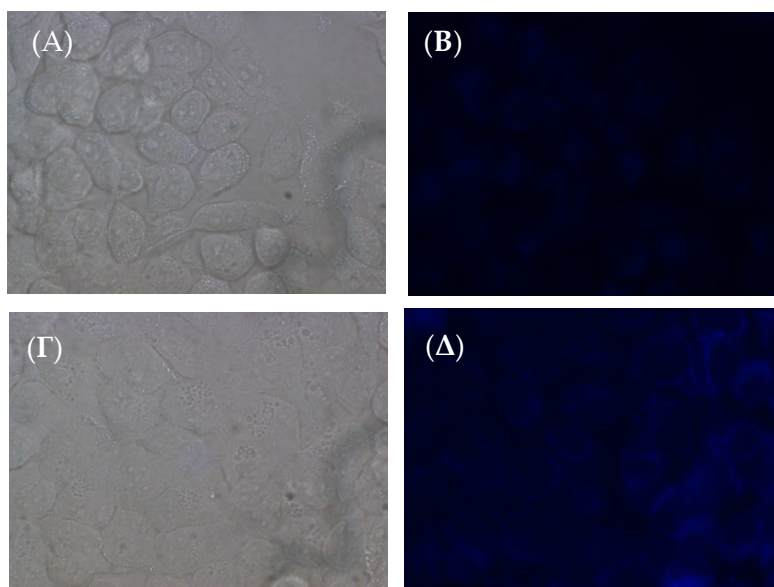
Παρατηρείται ότι και στις δύο περιπτώσεις, τα SLN_s των κουμαρινικών αναλόγων παρουσιάζουν μεγαλύτερη ικανότητα παραγωγής ελευθέρων ριζών από τις αντίστοιχες κουμαρινικές ενώσεις σε ελεύθερη μορφή, το οποίο πιθανόν οφείλεται στην αυξημένη υδατοδιαλυτότητα των κουμαρινικών ενώσεων όταν βρίσκονται σε υδατική διασπορά στα SLN_s [88]. Ακόμη, είναι σημαντικό να σημειωθεί ότι η DHC εξετάστηκε στη συγκέντρωση των 10 nM καθώς στη συγκέντρωση των 10 μM που χρησιμοποιήθηκε για τη DAPH, παρήγαγε πολύ μεγάλο αριθμό ROS, εκτός των ορίων ανίχνευσης του φθορισόμετρου.

7.3.11 Μελέτες χωρικού εντοπισμού

Οι μελέτες χωρικού εντοπισμού πραγματοποιήθηκαν χρησιμοποιώντας μικροσκοπία φθορισμού και τα αποτελέσματα έπειτα από επώαση των κυττάρων A431 για 1 ώρα με 3 μ M των κουμαρινικών αναλόγων είτε στην εγκλεισμένη είτε στην ελεύθερη μορφή παρουσιάζονται στις Εικόνες 7.17 & 7.18.



Εικόνα 7.17 Μικροσκοπία A431 κυττάρων. Αριστερά: εικόνες των κυττάρων από οπτικό μικροσκόπιο έπειτα από επώαση με: (A): DAPI και (Γ): DAPI-SLNs, Δεξιά: εικόνες μικροσκοπίας φθορισμού των κυττάρων έπειτα από επώαση με: (B): DAPI και (Δ): DAPI-SLNs.



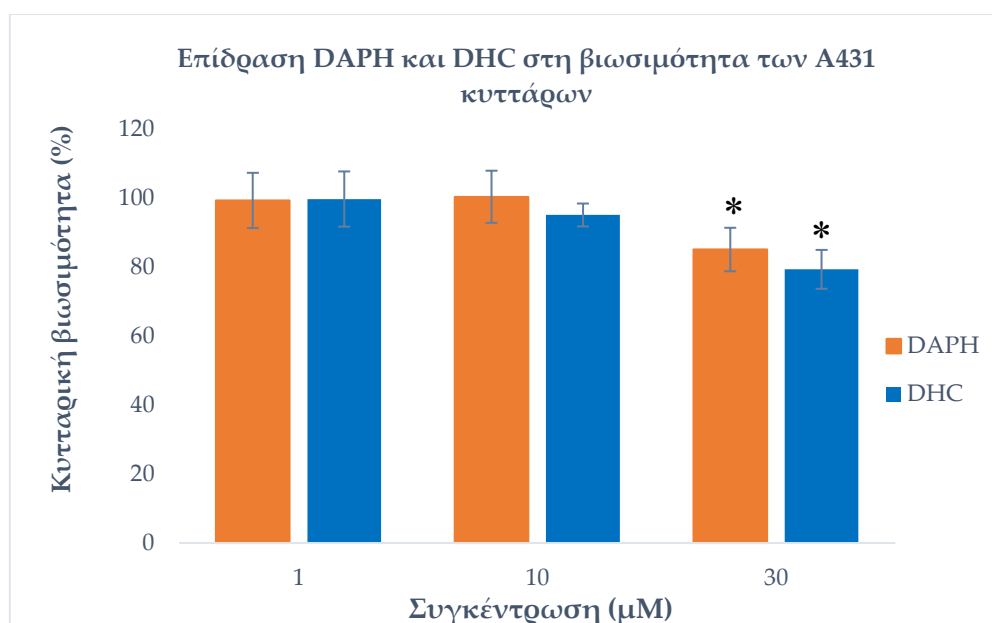
Εικόνα 7.18 Μικροσκοπία A431 κυττάρων. Αριστερά: εικόνες των κυττάρων από οπτικό μικροσκόπιο έπειτα από επώαση με: (A): DHC και (Γ): DHC-SLNs, Δεξιά: εικόνες μικροσκοπίας φθορισμού των κυττάρων έπειτα από επώαση με: (B): DHC και (Δ): DHC-SLNs.

Η μελέτη μικροσκοπίας φθορισμού υπέδειξε ότι τα κουμαρινικά ανάλογα έχουν εισέλθει στο εσωτερικό των κυττάρων χωρίς ωστόσο να έχουν εισχωρήσει στον πυρήνα ή να επιφέρουν οποιαδήποτε αλλαγή στην κυτταρική δομή. Στην περίπτωση της επώασης με τα DHC-SLNs και DAPH-SLNs παρατηρείται αυξημένος φθορισμός κι άρα μεγαλύτερη ενδοκυττάρια συγκέντρωση των κουμαρινικών αναλόγων σε σχέση με την επώαση με την ελεύθερη μορφή τους. Επομένως, ο εγκλεισμός των κουμαρινικών αναλόγων στα SLNs οδήγησε σε αυξημένη κυτταρική διαπερατότητα [89].

7.3.12 Φωτοδυναμική θεραπεία

7.3.12.1 Μελέτη κυτταροτοξικότητας απουσία φωτός

Η επίδραση διαφορετικών συγκεντρώσεων (1 μM , 10 μM και 30 μM) των κουμαρινικών αναλόγων στη βιωσιμότητα των κυττάρων της καρκινικής σειράς A431 παρουσιάζεται στην Εικόνα 7.19.



Εικόνα 7.19 Επίδραση διαφορετικών συγκεντρώσεων των DAPH και DHC στη βιωσιμότητα της καρκινικής σειράς A431, * $p < 0.05$ ως προς τα control.

Παρατηρείται ότι και η δαφνετίνη και η DHC μείωσαν την κυτταρική βιωσιμότητα κατά 15% και 21%, αντίστοιχα, στη συγκέντρωση των 30 μM , ενώ βρέθηκαν μη τοξικές στις συγκεντρώσεις των 10 μM και 1 μM . Επομένως, η συγκέντρωση των 10 μM επιλέχθηκε για τις μελέτες φωτοδυναμικής θεραπείας.

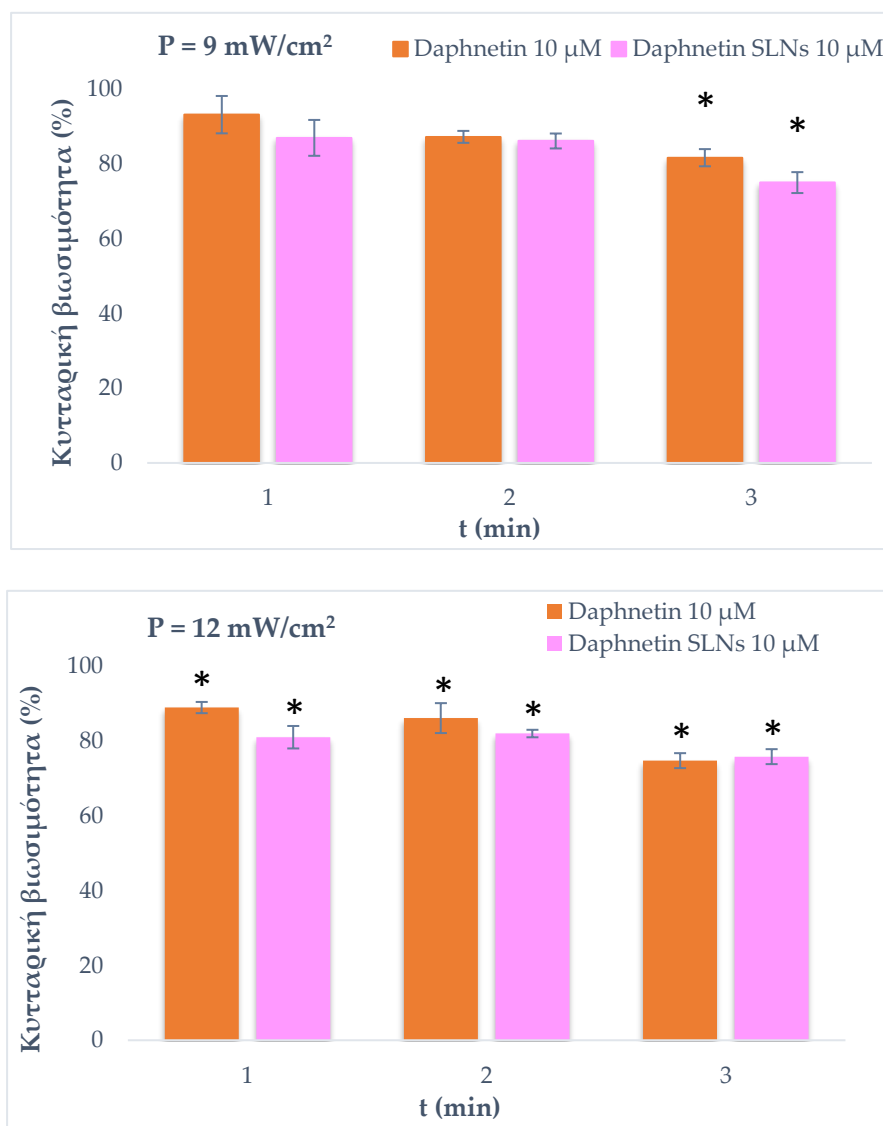
7.3.12.2 Επίδραση φωτός διέγερσης στην κυτταρική βιωσιμότητα

Η μελέτη επίδρασης του φωτός στην κυτταρική βιωσιμότητα είναι εξίσου σημαντική ώστε να προσδιοριστεί η κατάλληλη δόση ενέργειας φωτός διέγερσης που δεν οδηγεί σε κυτταρικό θάνατο. Εξετάστηκαν τρεις διαφορετικές τιμές ισχύος, 6 mW/cm^2 , 9 mW/cm^2 και 12 mW/cm^2 για 1, 2 και 3 min. Οι εξεταζόμενες

συνθήκες ακτινοβολήσης δε μείωσαν την κυτταρική βιωσιμότητα κι επομένως μπορούν να χρησιμοποιηθούν στη μελέτη της φωτοδυναμικής θεραπείας.

7.3.12.3 Φωτοδυναμική θεραπεία των κουμαρινικών αναλόγων και των SLNs τους

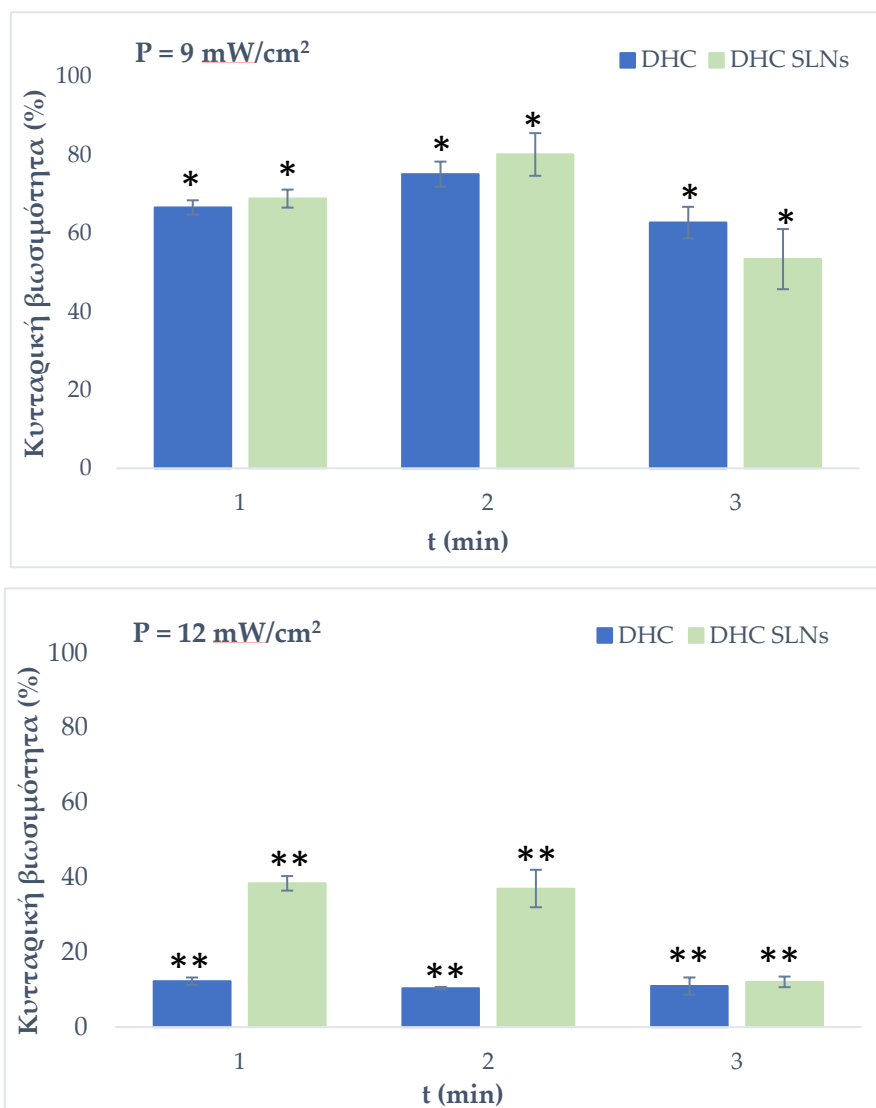
Τα κουμαρινικά ανάλογα και τα αντίστοιχα SLNs ως προς την ικανότητά τους να δρουν ως φωτοευαισθητοποιητές έναντι της καρκινικής σειράς A431. Τα κύτταρα ακτινοβολήθηκαν με 9 mW/cm² και 12 mW/cm² για 60 s, 120 s και 180 s έπειτα από επώαση με συγκέντρωση 10 μM των κουμαρινικών παραγώγων για 4 h. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στις Εικόνες 7.20 & 7.21.



Εικόνα 7.20 Φωτοευαισθητοποιητική δράση της DAPH υπό διαφορετικές συνθήκες ακτινοβολήσης (9 και 12 mW/cm²), *p < 0.05 ως προς τα control.

Παρατηρείται ότι η δαφνετίνη (DAPH) παρουσίασε χαμηλή φωτοτοξικότητα έπειτα από ακτινοβολήση με 9 mW/cm², ενώ μετά από ακτινοβολήση με 12

mW/cm² για 3 min, μείωσε την κυτταρική βιωσιμότητα κατά 25% και στην ελεύθερη και στην εγκλεισμένη μορφή της.



Εικόνα 7.21 Φωτοευαισθητοποιητική δράση της DHC υπό διαφορετικές συνθήκες ακτινοβολίας (9 και 12 mW/cm²), *p < 0.05, **p < 0.005 ως προς τα control.

Η 7,8-διυδροξυ-4-μεθυλο-3-(4-υδροξυφαινυλο)-κουμαρίνη (DHC) παρουσίασε σημαντική φωτοευαισθητοποιητική ικανότητα έπειτα από ακτινοβολία με ισχύ 9 mW/cm² και στην ελεύθερη και στην εγκλεισμένη μορφή της. Ωστόσο, η ακτινοβολία με ισχύ 12 mW/cm² οδήγησε σε ακόμη μεγαλύτερη μείωση της κυτταρικής βιωσιμότητας (11% βιωσιμότητα). Παρατηρείται επομένως ότι η φωτοτοξική δράση της DHC είναι σημαντικά ισχυρότερη από της DAPH, τόσο σε ελεύθερη όσο και σε εγκλεισμένη μορφή, παρόλο που σύμφωνα με τις μελέτες χωρικού εντοπισμού, η δαφνετίνη φαίνεται να εισχωρεί στο εσωτερικό των κυττάρων σε μεγαλύτερη συγκέντρωση. Αυτό υποδεικνύει ότι η DHC αποτελεί έναν εξαιρετικό φωτοευαισθητοποιητή, καθώς η μειωμένη ικανότητα της να εισχωρεί εντός των κυττάρων αντισταθμίζεται από την πολύ υψηλή ικανότητά της να παράγει ελεύθερες ρίζες.

Ενδιαφέρουσα παρατήρηση αποτελεί ότι τα DHC-SLNs παρουσίασαν χαμηλότερη φωτοτοξικότητα από την DHC στην ελεύθερη μορφή της έπειτα από ακτινοβολήση με 12 mW/cm² για 1 και 2 min, ενώ έπειτα από ακτινοβολήση για 3 min κατάφεραν να μειώσουν εξίσου τη βιωσιμότητα (στο 12%). Αυτό θα μπορούσε να αποδοθεί στην αυξημένη απελευθέρωση του κουμαρινικού αναλόγου από τα SLNs έπειτα από την ακτινοβολήση για περισσότερο χρόνο και άρα με μεγαλύτερη δόση ενέργειας. Ακόμη, αυτό πιθανόν οφείλεται στην αυξημένη ικανότητα δέσμευσης ελευθέρων ριζών που παρουσιάζουν τα DHC-SLNs σε σχέση με την καθαρή DHC όπως παρατηρήθηκε και στις δοκιμές αντιοξειδωτικής δράσης, το οποίο ενδεχομένως οδηγεί στην απαίτηση πρόσδοσης μεγαλύτερου ποσού ενέργειας ώστε οι ελεύθερες ρίζες που παράγονται να μη δεσμεύονται από το ίδιο το μόριο αλλά να οδηγούν σε κυτταρικό θάνατο.

Ακόμη, είναι αξιοσημείωτο για τη DHC ότι ενώ η ακτινοβολήση με 9 mW/cm² για 3 min (1.62 J/cm²) μείωσε την κυτταρική βιωσιμότητα στο 62%, η ακτινοβολήση με 12 mW/cm² για 1 min (0.72 J/cm²) οδήγησε σε 10% κυτταρική βιωσιμότητα. Η φωτοευαισθητοποιητική δράση ενός μορίου στηρίζεται στον αριθμό των φωτονίων που απορροφούνται από τον φωτοευαισθητοποιητή, το οποίο μπορεί να υπολογιστεί μέσω του λόγου της συνολικής ενέργειας ως προς την ενέργεια ενός φωτονίου στα 661 nm (Πίνακας 7.12) [90,91]. Στην περίπτωση της ακτινοβολήσης με 9 mW/cm² για 3 min, παρόλο που ο συνολικός αριθμός φωτονίων είναι μεγαλύτερος ($54 \cdot 10^{17}$ έναντι $24 \cdot 10^{17}$), αυτά διαχέονται στα κύτταρα για 3 min, ενώ στην περίπτωση των 12 mW/cm² για 1 min. Συνεπώς, η πυκνότητα φωτονιακής ροής, ο αριθμός δηλαδή των φωτονίων που προσπίπτει σε μία επιφάνεια ανά δευτερόλεπτο, είναι υψηλότερος στην περίπτωση της ακτινοβολήσης με 12 mW/cm² για 1 min ($4 \cdot 10^{16}$ έναντι $3 \cdot 10^{16}$). Η υψηλότερη πυκνότητα φωτονιακής ροής υποδεικνύει μεγαλύτερο αριθμό φωτονίων στο εσωτερικό ενός κυττάρου σε μία συγκεκριμένη χρονική στιγμή και άρα αυξάνει την πιθανότητα αλληλεπίδρασης μεταξύ φωτονίου και φωτοευαισθητοποιητή. Η πυκνότητα φωτονιακής ροής αποτελεί εξαιρετικά σημαντικό παράγοντα, καθώς όταν είναι η τιμή της είναι μικρή, αυξάνεται η πιθανότητα οι αντιοξειδωτικοί μηχανισμοί του κυττάρου να δεσμεύσουν τις ελεύθερες ρίζες και το κύτταρο να επανέλθει σε ισορροπία. Αντίθετα, όταν λαμβάνει υψηλή τιμή, παράγεται μεγάλος αριθμός ROS που δε μπορεί να δεσμευτεί από τους αντιοξειδωτικούς μηχανισμούς του κυττάρου, οδηγώντας επιτυχώς σε κυτταρικό θάνατο [92].

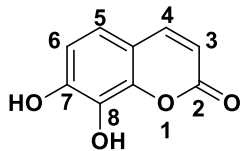
Πίνακας 7.12 Ενέργεια, συνολικός αριθμός φωτονίων και πυκνότητα φωτονιακής ροής για τις διαφορετικές συνθήκες ακτινοβολήσης.

	1 ^η συνθήκη ακτινοβολήσης	2 ^η συνθήκη ακτινοβολήσης
Ισχύς (mW/cm ²)	9	12
Χρόνος (min)	3	1
Ενέργεια (J/cm ²)	1.62	0.72
Συνολικός αριθμός φωτονίων	$54 \cdot 10^{17}$	$24 \cdot 10^{17}$
Πυκνότητα φωτονιακής ροής	$3 \cdot 10^{16}$	$4 \cdot 10^{16}$

7.4 ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟΣ ΜΕΡΟΣ

7.4.1 Σύνθεση των κουμαρινικών αναλόγων

7,8-δινδροξυ-κουμαρίνη (37):



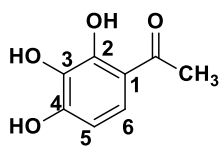
Σε σφαιρική φιάλη προστίθενται 18.86 mmol (2 g) πυρογαλλόλης και 12.16 mmol (1.6 g) μηλικού οξέος σε 3.7 mL θειϊκού οξέος (H₂SO₄). Η αντίδραση αφήνεται υπό συνεχή ανάδευση για περίπου 1.5 ώρα στους 100 °C, παρουσία κάθετου ψυκτήρα, υπό αδρανείς συνθήκες.

Έπειτα προστίθεται νερό και ακολουθεί εκχύλιση με διαιθυλαιθέρα. Η οργανική φάση ξηραίνεται με θειϊκό νάτριο (Na₂SO₄) και εξατμίζεται υπό ελαττωμένη πίεση. Το τελικό προϊόν παραλαμβάνεται, αφού έχει προηγηθεί εν ψυχρώ επεξεργασία με διαλύτη μεθανόλη, με διήθηση. Παραλαμβάνεται υπόλευκο στερεό.

Απόδοση: 47%, **Σ.Τ.:** 250 °C (Σ.Τ. βιβλιογραφίας: 253 °C [93])

¹H NMR (600 MHz, DMSO-d₆): δ (ppm) 10.01 (s, 1H, OH), 9.34 (s, 1H, OH), 7.89 (d, J = 9.5 Hz, 1H, H-4), 7.01 (d, J = 8.4 Hz, 1H, H-5), 6.79 (d, J = 8.4 Hz, 1H, H-6), 6.18 (d, J = 9.4 Hz, 1H, H-3)

2,3,4-δινδροξυ-ακετοφαινόνη (7):

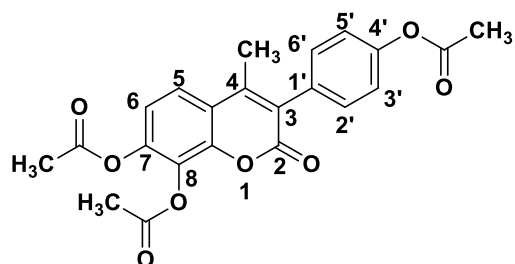


Σε σφαιρική φιάλη προστίθενται 3.96 mmol (500 mg) πυρογαλλόλης και 4.40 mmol (0.25 mL) οξικού οξέος, καθώς και 1.5 mL συμπλόκου τριφθοριούχου βορίου-διαιθυλαιθέρα και θερμαίνονται στους 90-100 °C για 5 h υπό συνεχή ανάδευση, παρουσία κάθετου ψυκτήρα κι υπό αδρανείς συνθήκες. Στη συνέχεια, αφήνονται να έρθουν σε θερμοκρασία περιβάλλοντος, όπου προστίθενται 24 mL οξικού νατρίου 10% και η αντίδραση παραμένει να αναδεύεται όλο το βράδυ. Μετά το πέρας της αντίδρασης ακολουθεί εκχύλιση με διαιθυλαιθέρα και εξάτμιση υπό ελαττωμένη πίεση για απομάκρυνση του διαλύτη έως ότου παρατηρηθεί εναπόθεση στερεού προϊόντος στα τοιχώματα της σφαιρικής φιάλης. Τέλος, το προϊόν που προκύπτει ανακρυσταλλώνεται με περίσσεια διχλωρομεθανίου και κατάλληλη ποσότητα μεθανόλης και λαμβάνεται υπό τη μορφή κίτρινου στερεού.

Απόδοση: 83%, **Σ.Τ.:** 167-169°C (Σ.Τ. βιβλιογραφίας: 171-173°C [94])

¹H NMR (600 MHz, DMSO-d₆): δ (ppm) 12.59 (s, 1H, 2-OH), 10.07 (s, 1H, 4-OH), 8.59 (s, 1H, 3-OH), 7.30 (d, J = 9 Hz, 1H, H-6), 6.40 (d, J = 9 Hz, 1H, H-5) 2.52 (s, 3H, CH₃)

7,8-διακετυλοξυ-3-(4-ακετυλοξυφαινυλο)-4-μεθυλο-κουμαρίνη (**38**):



Σε 3.1 mL οξικού ανυδρίτη και 1.2 mL Et₃N προστίθενται 2.83 mmol (430.9 mg) 4-υδροξυ-φαινυλοξικού οξέος και 2.97 mmol (500 mg) 2,3,4-τριυδροξυ-ακετοφαινόνης (7). Ακολουθεί προσθήκη νερού και εκχύλιση της υδατικής φάσης με διχλωρομεθάνιο. Η οργανική φάση

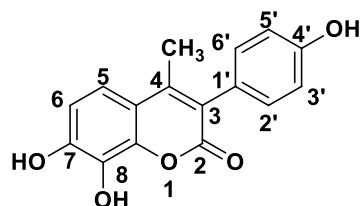
ξηραίνεται με θειϊκό νάτριο (Na₂SO₄) και εξατμίζεται υπό ελαττωμένη πίεση. Το τελικό προϊόν παραλαμβάνεται ύστερα από ανακρυστάλλωση από μεθανόλη και διχλωρομεθάνιο. Παραλαμβάνεται υποκίτρινο στερεό.

Απόδοση: 54%, **Σ.Τ.:** 198 °C

¹H NMR (600 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 7.57 (d, *J* = 9 Hz, 1H, H-5), 7.30 (d, *J* = 9 Hz, 2H, H-2', H-6'), 7.19 (d, *J* = 9 Hz, 2H, H-3', H-5'), 7.18 (d, *J* = 9 Hz, 1H, H-6), 2.42 (s, 3H, CH₃), 2.35 (s, 3H, CH₃), 2.33 (s, 3H, CH₃), 2.32 (s, 3H, CH₃), ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 169.39, 167.97, 167.69, 159.50, 150.74, 147.67, 145.99, 145.00, 131.56, 131.36, 130.29, 126.42, 122.46, 121.77, 119.57, 118.73, 21.35, 20.81, 20.52, 17.08

HRMS calcd for C₂₂H₁₉O₈ (M+H)⁺: *m/z*: 411.1002, found: 411.1074

7,8-διυδροξυ-3-(4-υδροξυφαινυλο)-4-μεθυλο-κουμαρίνη (**39**):



Σε σφαιρική φιάλη προστίθενται 0.73 mmol (300 mg) 7,8-διακετυλοξυ-3-(4-ακετυλοξυ-φαινυλο)-4-μεθυλο-κουμαρίνης (**38**), 21.93 mmol (1.05 mL) μονοένυδρης υδραζίνης και 11.86 mL μεθανόλης. Ακολουθεί προσθήκη νερού και εκχύλιση της υδατικής φάσης με οξικό αιθυλεστέρα. Η οργανική φάση ξηραίνεται με

θειϊκό νάτριο (Na₂SO₄) και εξατμίζεται υπό ελαττωμένη πίεση. Το τελικό προϊόν παραλαμβάνεται ύστερα κατεργασία εν ψυχρώ με μεθανόλη. Παραλαμβάνεται καφέ στερεό.

Απόδοση: 59%, **Σ.Τ.:** > 250 °C

¹H NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆): δ (ppm) 9.55 (br, 3H, OH), 7.13 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H, H-5), 7.09 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H, H-2', H-6'), 6.83-6.80 (m, 3H, H-6, H-3', H-5'), 2.20 (s, 3H, CH₃), ¹³C NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆): δ (ppm) 160.50, 156.84, 148.81, 148.19, 142.33, 131.96, 131.60, 125.38, 122.25, 115.93, 114.83, 113.35, 112.26, 16.59

HRMS calcd for C₁₆H₁₁O₅ (M-H)⁻: *m/z*: 283.0665, found: 283.0604

7.4.2 Απομόνωση της τριμυριστίνης από μοσχοκάρυδο

Σε σφαιρική φιάλη προστίθενται 25g κονιοποιημένου μοσχοκάρυδου και 65 mL διαιθυλαιθέρα και το μίγμα θερμαίνεται ήπια με τη βοήθεια υδρόλουτρου για χρονικό διάστημα μίας ώρας. Ακολουθεί διήθηση με το διήθημα να συλλέγεται και να εξατμίζεται υπό ελαττωμένη πίεση προς παραλαβή της ακάθαρτης

τριμυριστίνης. Στη συνέχεια, πραγματοποιούνται τρεις κύκλοι ανακρουστάλλωσης από ακετόνη. Παραλαμβάνεται λευκό προϊόν.

Ανάκτηση: 30%, , **Σ.Τ.:** 55-58 °C (Σ.Τ. βιβλιογραφίας 56-58 °C [95]).

7.4.3 Παρασκευή των νανοσωματιδίων στερεών λιπιδίων (SLNs)

Η μέθοδος που επιλέχθηκε για την παρασκευή των SLNs είναι η μέθοδος γαλακτωματοποίησης-εξάτμισης του διαλύτη σε συνδυασμό με υπερήχους, χρησιμοποιώντας την τριμυριστίνη ως λιπίδιο, το Tween 80 και τη φωσφατιδυλοχολίνη (προαιρετικά) ως γαλακτωματοποιητές.

Σε ένα τυπικό πείραμα, 200 mg τριμυριστίνης τήκονται σε θερμοκρασία 70 °C και στη συνέχεια προστίθενται η βιοδραστική ένωση (20 mg), καθώς και η φωσφατιδυλοχολίνη (50 mg), τα οποία διαλύονται σε αιθανόλη. Μόλις διαλυθούν πλήρως, ακολουθεί η προσθήκη της θερμής υδατικής φάσης (10 mL), η οποία περιέχει 10% w/v Polysorbate 80 και έχει προθερμανθεί στους 70 °C.

7.4.3.1 Με μαγνητική ανάδευση

Ύστερα από την προσθήκη της θερμής υδατικής φάσης, το διάλυμα αφήνεται υπό έντονη ανάδευση για μία ώρα.

Η προκύπτουσα υδατική διασπορά οδηγείται προς υπερήχηση για 5 min σε 120 W και στη συνέχεια αφήνεται υπό ανάδευση για 24 h στα 20 rpm και σε θερμοκρασία 30 °C σε συσκευή Shaker (Temperature Controlled Shaker Gallenkamp), προκειμένου να γίνει ήπια και πλήρης εξάτμιση του οργανικού διαλύτη.

Για την παρασκευή των νανοσωματιδίων στερεών λιπιδίων χωρίς βιοδραστική ένωση (blank-SLNs) ακολουθείται η ίδια διαδικασία χωρίς την προσθήκη του κουμαρινικού αναλόγου.

7.4.3.2 Με ομογενοποίηση

Ύστερα από την προσθήκη της θερμής υδατικής φάσης, το μίγμα οδηγείται προς ομογενοποίηση (Polytron PT2100, Kinematica) σε συγκεκριμένες στροφές (11000 rpm και 15000 rpm) για 10 min.

Η προκύπτουσα διασπορά οδηγείται προς υπερήχηση (Vibra Cell probe sonicator (400 W), Sonics & Materials Inc. Company) σε 120 W για 5 ή 10 min και στη συνέχεια αφήνεται υπό ανάδευση για εικοσιτέσσερις h στα 20 rpm και σε θερμοκρασία 30 °C σε συσκευή Shaker (Temperature Controlled Shaker Gallenkamp).

7.4.4 Απόδοση διεργασίας

Η υδατική διασπορά νανοσωματιδίων φυγοκεντρείται (SORVALL LYNX 6000, Thermo Scientific) στα 4.000 rpm για 20 min και στους 15 °C, απ' όπου παραλαμβάνονται τα νανοσωματίδια ως το υπερκείμενο φυγοκέντρισης, το οποίο στη συνέχεια οδηγείται προς λυοφιλοποίηση (Frozen In Time Lablyo Mini) και

παραλαμβάνεται υπόλευκο στερεό αφράτης υφής. Η απόδοση διεργασίας υπολογίζεται από την ακόλουθη εξίσωση (Εξίσωση 7.5):

$$(\%) \text{ Απόδοση διεργασίας} = \frac{\text{ξηρή μάζα νανοσωματιδίων}}{\text{αρχική μάζα όλων των συστατικών}} \times 100 \quad (7.5)$$

7.4.5 Απόδοση εγκλεισμού

Για τον προσδιορισμό της ποσότητας της ένωσης που εγκλείστηκε στα νανοσωματίδια στερεών λιπιδίων, χρησιμοποιήθηκε η φασματοφωτομετρία υπεριώδους-ορατού (V-770 UV-VIS, Jasco).

Η υδατική διασπορά νανοσωματιδίων φυγοκεντρείται (SORVALL LYNX 6000, Thermo Scientific) στα 4.000 rpm για 20 min και στους 15 °C, απ' όπου παραλαμβάνονται τα νανοσωματίδια ως το υπερκείμενο φυγοκέντρωσης. Το ίζημα της φυγοκέντρωσης, το οποίο αποτελείται από την ένωση που δεν εγκλείστηκε καθώς και μικρή ποσότητα των υπόλοιπων συστατικών, διαλύεται σε σύστημα διαλυτών διχλωρομεθανίου / μεθανόλης = 1:1 και λαμβάνεται το φάσμα απορρόφησης σε εύρος 200-500 nm με χρήση κυψελίδας χαλαζία.

Από την τιμή της απορρόφησης που προκύπτει, η οποία αντιστοιχεί στην ποσότητα της ένωσης που δεν εγκλείστηκε, και μέσω της πρότυπης καμπύλης αναφοράς της ένωσης, προσδιορίζεται τελικά η ποσότητα της ένωσης που εγκλείστηκε στα νανοσωματίδια με βάση την εξίσωση (Εξίσωση 7.6):

$$(\%) \text{ Απόδοση εγκλεισμού} = 1 - \frac{\text{μάζα ουσίας που δεν εγκλείστηκε (mg)}}{\text{αρχική μάζα ένωσης (mg)}} \times 100 \quad (7.6)$$

7.4.6 Υδροδυναμική διάμετρος, δείκτης πολυδιασποράς (PDI) και ζ-δυναμικό

Τα νανοσωματίδια χαρακτηρίστηκαν ως προς την υδροδυναμική διάμετρο και το δείκτη πολυδιασποράς μέσω της μεθόδου δυναμικής σκέδασης φωτός (DLS) και το ζ-δυναμικό μέσω ηλεκτροφόρησης με χρήση του οργάνου Zetasizer Nano ZS, Malvern. Οι υδατικές διασπορές εισάγονται σε τριχοειδείς κυψελίδες τύπου U (DTS 1070, Malvern, UK) και οι μετρήσεις πραγματοποιούνται σε θερμοκρασία 25 °C σε υπερκάθαρο νερό (pH 7.0). Οι τιμές για το κάθε μέγεθος προκύπτουν ως ο μέσος όρος τριών τιμών.

7.4.7 Μελέτη σταθερότητας υδατικών διασπορών

Η σταθερότητα των κουμαρινικών SLNs αξιολογήθηκε τόσο ως προς την υδροδυναμική διάμετρο, το δείκτη πολυδιασποράς και το ζ-δυναμικό, όσο και ως προς την απόδοση εγκλεισμού σε βάθος ενός και έξι μηνών.

7.4.7.1 Μελέτη σταθερότητας ως προς τη μέση υδροδυναμική διάμετρο, το δείκτη πολυδιασποράς (PDI) και το ζ-δυναμικό

Τα SLNs των κουμαρινικών αναλόγων αξιολογήθηκαν εκ νέου μέσω της μεθόδου DLS ως προς τη μέση τιμή υδροδυναμικής διαμέτρου, το δείκτη πολυδιασποράς και το ζ-δυναμικό τους, έπειτα από αποθήκευση εντός ψυγείου για χρονικό διάστημα ενός και έξι μηνών.

7.4.7.2 Μελέτη σταθερότητας ως προς την απόδοση εγκλεισμού

Τα παρασκευαζόμενα SLNs αξιολογήθηκαν επίσης ως προς τη σταθερότητα της απόδοσης εγκλεισμού. Για το σκοπό αυτό, παρασκευάστηκαν νανοσωματίδια των οποίων η απόδοση εγκλεισμού προσδιορίστηκε σύμφωνα με την μέθοδο που περιγράφεται στην παράγραφο 7.4.4. Στη συνέχεια, οι υδατικές διασπορές τους αποθηκεύτηκαν εντός ψυγείου για χρονικό διάστημα ενός και έξι μηνών, οπότε και επαναφυγοκεντρίθηκαν και μετρήθηκε εκ νέου η απόδοση εγκλεισμού, με στόχο τον ποσοτικό προσδιορισμό της ένωσης που απελευθερώθηκε στο διάστημα αυτό.

7.4.8 Υπέρυθρη Φασματομετρία (FT-IR)

Τα νανοσωματίδια στερεών λιπιδίων (blank SLNs, DHC-SLNs, DAPH-SLNs), η τριμυριστίνη και τα κουμαρινικά ανάλογα (DHC και DAPH) μελετήθηκαν με χρήση φασματοσκοπίας υπερύθρου (FT-IR). Για τη λήψη των φασμάτων παρασκευάστηκαν ταμπλέτες βρωμιούχου καλίου (KBr) με ανάμειξη της εξεταζόμενης ουσίας και του KBr σε αναλογία περίπου 1:100. Τα φάσματα καταγράφηκαν με το όργανο FT-IR-4200 (Jasco) στο εύρος 500–4000 cm^{-1} .

7.4.9 Θερμοσταθμική ανάλυση (TGA)

Η θερμική συμπεριφορά των παρασκευαζόμενων SLNs, της τριμυριστίνης και των κουμαρινικών αναλόγων μελετήθηκε με τη χρήση της μεθόδου θερμοσταθμικής ανάλυσης (TGA) με το όργανο TGA/DSC 1 STARe System thermobalance, Mettler Toledo company. Τα δείγματα θερμαίνονται από τους 25 °C μέχρι τους 600 °C με ρυθμό θέρμανσης 10 °C/min και ροής αζώτου 10 mL/min.

7.4.10 Ηλεκτρονική Μικροσκοπία Διερχόμενης Δέσμης (TEM)

Για τη μελέτη TEM χρησιμοποιήθηκε ηλεκτρονικό μικροσκόπιο διερχόμενης δέσμης JEOL JEM-2100 LaB6 υψηλής ανάλυσης (HRTEM), που λειτουργεί στα 200 kV. Η υδατική διασπορά των blank SLNs υποβλήθηκε σε υπερήχους ώστε διασπαστούν τυχόν συσσωματωμένα σωματίδια. Στη συνέχεια, μία σταγόνα διασποράς τοποθετήθηκε σε πλέγμα χαλκού επικαλυμμένο με άνθρακα 300 mesh και ξηράνθηκε σε αέρα όλη τη νύχτα.

7.4.11 Μελέτη αποδέσμευσης των κουμαρινικών αναλόγων από τα SLNs και κινητική μοντελοποίηση

Για τη μελέτη της αποδέσμευσης των κουμαρινικών αναλόγων από τα SLNs, κατάλληλος όγκος υδατικής διασποράς των νανοσωματιδίων ώστε να περιέχει 4 mg ένωσης, προστίθεται σε μεμβράνη διάλυσης η οποία εμβαπτίζεται σε 125 mL ρυθμιστικού διαλύματος είτε με pH 7.4 στους 37 °C ώστε να προσομοιάζει τις φυσιολογικές συνθήκες του ανθρώπινου οργανισμού είτε με pH 5.5 στους 35 °C ώστε να προσομοιάζει τις συνθήκες του δέρματος.

Σε προκαθορισμένα χρονικά διαστήματα, λαμβάνονται δείγματα 2 mL από το διάλυμα, φιλτράρονται και αναλύονται με φασματοφωτομετρία υπεριώδους ορατού (UV-Vis), έτσι ώστε να υπολογιστεί η ποσότητα της ένωσης που απελευθερώθηκε σε συνάρτηση με το χρόνο, μετρώντας την απορρόφηση. Κάθε χρονική στιγμή που αφαιρούνταν 2 mL δείγματος από το σύστημα, επιστρέφονταν 2 mL ρυθμιστικού διαλύματος. Τέλος, τα δεδομένα απ' τις μελέτες απελευθέρωσης προσαρμόστηκαν σε διαφορετικά κινητικά μοντέλα.

7.4.12 Μελέτη αντιοξειδωτικής δράσης

7.4.12.1 Δέσμευση της ελεύθερης ρίζας DPPH

Παρασκευάζεται διάλυμα DPPH (0.025 mg/mL) σε αιθανόλη, το οποίο αφήνεται υπό μαγνητική ανάδευση για 20 min απουσία φωτός. Σε κάθε πηγάδι ενός πλακιδίου 96 θέσεων (96 well plate) προστίθενται 195 μ L DPPH καθώς και 5 μ L από διαφορετικές συγκεντρώσεις κάθε δείγματος. Συγκεκριμένα η αξιολόγηση της αντιοξειδωτικής δράσης πραγματοποιήθηκε τόσο στα νανοσωματίδια υπό μορφή υδατικής διασποράς, όσο και στις καθαρές ενώσεις σε DMSO. Επίσης, παρασκευάζονται δείγματα control τα οποία περιέχουν διαλύτη αντί για κουμαρινική ένωση.

Το plate αναδεύεται ελαφρώς και αφήνεται σε σκοτάδι. Με τη χρήση της συσκευής Epoch 2 Microplate Reader της εταιρείας Bio Tek Instruments, λαμβάνεται η τιμή της απορρόφησης στα 515 nm στα 30 min και 60 min και εξετάζεται ως προς τα control. Η %δέσμευση της ελεύθερης ρίζας DPPH υπολογίζεται από την εξίσωση (Εξίσωση 7.7):

$$(\%) \text{ Δέσμευση} = \frac{A_{\text{control}} - A_{\text{sample}}}{A_{\text{control}}} \times 100 \quad (7.7)$$

7.4.12.2 Αναστολή της λιπιδικής υπεροξειδωσης

Η αντιοξειδωτική δράση των κουμαρινικών αναλόγων μελετήθηκε και μέσω της ικανότητά τους να αναστέλλουν τη λιπιδική υπεροξειδωση όπως επάγεται από τον εκκινητή ελευθέρων ριζών AAPH. Σε κυψελίδα χαλαζία προστίθενται 1302 μ L ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών αλάτων 0.05 M pH 7.4 (προθερμασμένο στους 37 °C), 14 μ L άλατος νατρίου λινελαϊκού οξέος (16 mM) και 14 μ L κουμαρινικού αναλόγου ή διασποράς SLNs (σε DMSO ή H₂O αντίστοιχα). Τα δείγματα control περιέχουν διαλύτη αντί για βιοδραστική ένωση. Ακολουθεί η

προσθήκη του εκκινήτη, 70 μL AAPH (40 mM), και αμέσως μετράται η απορρόφηση στα 234 nm ($t = 0 \text{ min}$), καθώς και μετά από ένα λεπτό ($t = 1 \text{ min}$) και η αναστολή της λιπιδικής υπεροξειδωσής (LP) υπολογίζεται από την εξίσωση (Εξίσωση 7.8):

$$(\%) \text{ Αναστολή} = \left(1 - \frac{A_{\text{sample}_{t=1\text{min}}} - A_{\text{sample}_{t=0\text{min}}}}{A_{\text{control}_{t=1\text{min}}} - A_{\text{control}_{t=0\text{min}}}} \right) \times 100 \quad (7.8)$$

7.4.13 Μέτρηση οπτικών ιδιοτήτων

7.4.13.1 Φασματοσκοπία υπεριώδους-ορατού (UV-Vis)

Τα φάσματα απορρόφησης των κουμαρινικών αναλόγων λήφθηκαν στη συγκέντρωση των 70 μM σε αιθανόλη (EtOH) σε εύρος 200–500 nm σε φωτοφασματομέτρο V-770 UV-Vis Jasco.

7.4.13.2 Φασματοσκοπία φθορισμού

Τα φάσματα φθορισμού των κουμαρινικών αναλόγων λήφθηκαν σε συγκέντρωση 50 μM σε διάλυμα φωσφορικών αλάτων (PBS) χρησιμοποιώντας το φασματομέτρο LS 45 Luminence, PerkinElmer. Η διέγερση για τη δαφνετίνη (DAPH) πραγματοποιήθηκε στα 400 nm, ενώ για την 7,8-διυδροξυ-4-μεθυλο-3-(4-υδροξυφαινυλο)-κουμαρίνη (DHC) στα 380 nm.

7.4.13.3 Μελέτη φωτοσταθερότητας

Η σταθερότητα των κουμαρινικών αναλόγων καθώς και των νανοσυστημάτων τους μελετήθηκε στη συγκέντρωση των 10 μM σε PBS έπειτα από διέγερση με κατάλληλη πηγή φωτός με 13 mW cm^{-2} για 30 min. Τα φάσματα φθορισμού λαμβάνονται κάθε 1 min μεταξύ 0 και 10 min και στη συνέχεια κάθε 5 min μεταξύ 10 και 30 min.

7.4.14 Παραγωγή ελευθέρων ριζών

Για τη μελέτη της ικανότητας των κουμαρινικών παραγώγων και των SLNs τους να παράγουν ελεύθερες ρίζες χρησιμοποιήθηκε η ουσία 5-(and-6)-chloromethyl-2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate, acetyl ester, CM-H₂DCFDA, η οποία όταν αντιδρά με ελεύθερες ρίζες μετατρέπεται σε φθορίζον προϊόν.

Αρχικά πραγματοποιείται η υδρόλυση της ουσίας. Για το σκοπό αυτό, 15 μL διαλύματος CM-H₂DCFDA σε DMSO (0.87 μM) και 5 μL από το διάλυμα υδρόλυσης (NaOH 4N) προστίθενται σε 40 μL EtOH και επωάζονται για μισή ώρα. Στη συνέχεια, σε κυψελίδα χαλαζία προστίθενται 2955 μL PBS, 35 μL από την υδρολυμένη ποσότητα του εστέρα, καθώς και 30 μL από διάλυμα των κουμαρινικών ενώσεων ή τη διασπορά των SLNs. Ακολουθεί ακτινοβολήση με ισχύ 12 mW/cm^2 για συνολικά 30 min. Τα φάσματα φθορισμού λαμβάνονται κάθε 1 min μεταξύ 0 και 10 min και στη συνέχεια κάθε 5 min μεταξύ 10 και 30 min. Η

διέγερση πραγματοποιήθηκε στα 488 nm με μήκη κύματος εκπομπής φθορισμού μεταξύ 510 nm και 650 nm.

7.4.15 Δοκιμασία κυτταρικής βιωσιμότητας – MTT

Η βιωσιμότητα των κυττάρων προσδιορίστηκε μέσω της δοκιμασίας MTT (3-(4,5-διμεθυλοθειαζολ-2-υλ)-2,5-διφαινυλο τετραζόλιο βρωμίδιο, 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT), Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). Αρχικά, επιστρώθηκαν 7000 κύτταρα επιδερμικού καρκινώματος (A431) σε κάθε πηγάδι ενός πλακιδίου 96 θέσεων για 24 h. Στη συνέχεια, πραγματοποιείται κατάλληλη επεξεργασία ανάλογα με την επιθυμητή μέθοδο (επίδραση ενώσεων ή φωτός ή φωτοδυναμική θεραπεία). Την επόμενη ημέρα, το θρεπτικό μέσο αφαιρείται και προστίθενται 115 μ L διαλύματος MTT σε πλήρες θρεπτικό (0.65 mg/mL), ενώ ακολουθεί επώαση για 3 h. Το θρεπτικό μέσο απομακρύνεται και οι κρύσταλλοι φορμαζάνης που σχηματίστηκαν από τα μιτοχόνδρια των μεταβολικώς ενεργών κυττάρων, διαλύονται σε 200 μ L DMSO και μετράται η απορρόφηση στα 570 nm. Η κυτταρική βιωσιμότητα υπολογίζεται μέσω της Εξίσωσης 7.9:

$$(\%) \text{ Βιωσιμότητα} = \frac{Abs_{sample}}{Abs_{control}} \times 100 \quad (7.9)$$

Τα καρκινικά κύτταρα A431 καλλιεργήθηκαν σε θρεπτικό υλικό Dulbecco's Modified Eagle Medium high glucose, no glutamine (DMEM), εμπλουτισμένο με 10% ορό εμβρύου βοός (FBS) και αντιβιοτικά. Οι κυτταρικές σειρές διατηρήθηκαν σε τυπικές συνθήκες καλλιέργειας (37 °C και 5% CO₂). Η απορρόφηση στα 570 nm μετρήθηκε με τη συσκευή plate reader Epoch 2 Microplate Reader της εταιρείας Bio Tek Instruments.

7.4.15.1 Κυτταροτοξικότητα απουσία φωτός

Για τη μελέτη της επίδρασης των ενώσεων στην κυτταρική βιωσιμότητα, 24 h μετά την επιστροφή των κυττάρων, το θρεπτικό υλικό αφαιρείται και προστίθενται διαφορετικές συγκεντρώσεις των κουμαρινικών αναλόγων (0.5% DMSO). Έπειτα από 24 h, το θρεπτικό απομακρύνεται και ακολουθεί η διαδικασία κυτταρικής βιωσιμότητας MTT.

7.4.15.2 Κυτταροτοξικότητα παρουσία φωτός

Για τη μελέτη της επίδρασης του φωτός στην κυτταρική βιωσιμότητα, 24 h μετά την επιστροφή των κυττάρων, το θρεπτικό υλικό αφαιρείται και 40 μ L PBS (Phosphate Buffer Solution) προστίθενται σε κάθε πηγάδι ενώ ακολουθεί ακτινοβολήση με 6 mW/cm², 9 mW/cm² και 12 mW/cm² για 1, 2 και 3 min. Στη συνέχεια, το PBS αφαιρείται και προστίθεται φρέσκο θρεπτικό υλικό σε κάθε πηγάδι για 24 h. Έπειτα, το θρεπτικό αφαιρείται και ακολουθεί η διαδικασία κυτταρικής βιωσιμότητας MTT.

7.4.15.3 Φωτοδυναμική θεραπεία

Για τη μελέτη της φωτοδυναμικής θεραπείας, 24 h μετά την επίστρωση των κυττάρων, το θρεπτικό υλικό αφαιρείται και προστίθενται 100 μL θρεπτικού υλικού που περιέχει 10 μM των κουμαρινικών αναλόγων σε ελεύθερη ή εγκλεισμένη μορφή και πραγματοποιείται επώαση για 4 h. Στη συνέχεια, το θρεπτικό υλικό απομακρύνεται και 40 μL PBS (Phosphate Buffer Solution) προστίθενται σε κάθε πηγάδι ενώ ακολουθεί ακτινοβολήση με 9 mW/cm^2 και 12 mW/cm^2 για 1, 2 και 3 min. Το PBS αφαιρείται και προστίθεται φρέσκο θρεπτικό υλικό σε κάθε πηγάδι για 24 h. Τέλος, ακολουθεί η διαδικασία κυτταρικής βιωσιμότητας MTT.

7.4.16 Μελέτες χωρικού εντοπισμού

Σε τρυβλία που περιέχουν καλυπτρίδα επιστρώνονται 10×10^4 κύτταρα (A431) και επωάζονται για 24 h. Έπειτα, προστίθενται 2.5 mL πλήρους θρεπτικού υλικού τα οποία περιέχουν 3 μM των κουμαρινικών αναλόγων σε ελεύθερη ή εγκλεισμένη μορφή κι επωάζονται για μία ώρα. Τα κύτταρα παρατηρούνται στη συνέχεια μέσω μικροσκοπίου Olympus BX-50 (Olympus Optical Co., GmbH), οπτικό και φθορισμού, με φωτισμό πρόσπτωσης (epifluorescent microscope), χρησιμοποιώντας ένα 40x UPlanFl (NA=0.75) αντικειμενικό φακό, ενώ η διάταξη είναι συνδεδεμένη με CCD camera (Olympus, XC30). Για τη λήψη των εικόνων χρησιμοποιείται το λογισμικό analySIS getIT (Olympus Soft Imaging Solutions GmbH).

Τα πειράματα οπτικών ιδιοτήτων και οι κυτταρικές δοκιμές πραγματοποιήθηκαν σε συνεργασία με το Εργαστήριο Βιοϊατρικής Οπτικής και Εφαρμοσμένης Βιοφυσικής της Σχολής Ηλεκτρολόγων Μηχανικών και Μηχανικών Υπολογιστών του Εθνικού Μετσόβιου Πολυτεχνείου και την Δρ. Ελένη Αλεξανδράτου.

7.5 ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Τα νανοσωματίδια στερεών λιπιδίων (SLNs) των κουμαρινικών αναλόγων συντέθηκαν μέσω της μεθόδου γαλακτωματοποίησης-εξάτμισης του διαλύτη σε συνδυασμό με υπερήχους. Μελετήθηκε ακόμη η παρασκευή των SLNs μέσω ομογενοποίησης σε συνδυασμό με υπερήχους, η οποία ωστόσο οδήγησε σε αυξημένες τιμές μέσης υδροδυναμικής διαμέτρου, το οποίο πιθανόν οφείλεται στην πρόσδοση πλεονάζουσας ενέργειας που προκαλεί τη συσσωμάτωση των SLNs λόγω των υψηλών τιμών κινητικής ενέργειας που αποκτούν και γι' αυτό αποκλείστηκε.

Για τη βελτιστοποίηση της παρασκευής των DHC-SLNs πραγματοποιήθηκε διερεύνηση της κατάλληλης αναλογίας των συστατικών ώστε να προκύψουν νανοσωματίδια με τα βέλτιστα χαρακτηριστικά. Βέλτιστη αναλογία κρίθηκε η τριμυριστίνη/Tween 80/φωσφατιδυλοχολίνη = 200:100:50 (w/w/w). Τα DHC-SLNs που συντέθηκαν με τη μέθοδο αυτή παρουσίασαν απόδοση διεργασίας 76% και απόδοση εγκλεισμού 44%. Ακόμη, ύστερα από την εύρεση της βέλτιστης αναλογίας, πραγματοποιήθηκε η παρασκευή των DAPH-SLNs και των Blank-SLNs. Για τα DAPH-SLNs υπολογίστηκε απόδοση εγκλεισμού 81% και απόδοση διεργασίας 60%, ενώ η απόδοση διεργασίας των Blank-SLNs υπολογίστηκε στο 80%.

Τα νανοσωματίδια που σχηματίστηκαν, χαρακτηρίστηκαν στη συνέχεια μέσω της μεθόδου Δυναμικής Σκέδασης Φωτός (DLS) ως προς την υδροδυναμική διάμετρο, το δείκτη πολυδιασποράς και το ζ-δυναμικό τους. Προέκυψαν νανοσωματίδια με μέση τιμή υδροδυναμικής διαμέτρου 250 nm περίπου, τιμή PDI μεταξύ 0.3 και 0.4 και τιμές ζ-δυναμικού -18 mV για τα blank SLNs, -30 mV για τα DHC-SLNs και -40 mV για τα DAPH-SLNs. Ακόμη, η μελέτη των νανοσωματιδίων ως προς την υδροδυναμική διάμετρο, δείκτη PDI, ζ-δυναμικό και την απόδοση εγκλεισμού σε βάθος ενός και έξι μηνών, υπέδειξε ικανοποιητική σταθερότητα των υδατικών διασπορών υπό συνθήκες ψύξης.

Ακολούθησε η μελέτη αποδέσμευσης των κουμαρινικών αναλόγων από τα SLNs, υποδεικνύοντας την εμφάνιση "burst effect" στις πρώτες 2 h για τη δαφνετίνη (περίπου 50-70% απελευθέρωση), ενώ βραδύτερη απελευθέρωση (εμφάνιση περίπου 66% απελευθέρωσης στις 4 h) παρατηρήθηκε για την περίπτωση της DHC. Σε όλες τις περιπτώσεις, η απελευθέρωση ολοκληρώθηκε στις 24 h, ενώ προέκυψε ότι το κινητικό μοντέλο το οποίο περιγράφει καλύτερα τα προφίλ απελευθέρωσης είναι το μοντέλο Higuchi και ο μηχανισμός απελευθέρωσης η μη-ομαλή διάχυση.

Τα νανοσωματίδια μελετήθηκαν στη συνέχεια ως προς την αντιοξειδωτική τους δράση μέσω διαφορετικών μεθόδων και προέκυψε ότι εμφανίζουν ισχυρότερη δράση σε σχέση με τις καθαρές ενώσεις, πιθανώς λόγω συνεργιστικής δράσης με τα λιπίδια των SLNs. Ακολούθησε, η μελέτη των οπτικών ιδιοτήτων τους και της ικανότητάς τους να παράγουν ελεύθερες ρίζες *in vitro*, όπου παρατηρήθηκε ότι η DHC επέδειξε σημαντική ικανότητα παραγωγής ROS, υψηλότερη από τη δαφνετίνη. Τέλος, μελετήθηκε η ικανότητα των κουμαρινικών αναλόγων και των

SLNs τους να δρουν ως φωτοευαισθητοποιητές έναντι της καρκινικής σειράς A431. Και τα δύο κουμαρινικά παράγωγα παρουσίασαν φωτοτοξική δράση, με τη DHC ωστόσο να παρουσιάζει ισχυρότερη δράση καθώς έπειτα από ακτινοβολήση με 2.16 J/cm^2 μείωσε την κυτταρική βιωσιμότητα στο 11% τόσο σε εγκλεισμένη όσο και σε ελεύθερη μορφή. Ακόμη, οι μελέτες χωρικού εντοπισμού υπέδειξαν αυξημένη ενδοκυττάρια συγκέντρωση των κουμαρινικών αναλόγων έπειτα από επώαση με τα SLNs τους, σε σχέση με την ελεύθερη μορφή.

7.6 ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- [1] L. Leon, E.J. Chung, C. Rinaldi, A brief history of nanotechnology and introduction to nanoparticles for biomedical applications, *Nanoparticles Biomed. Appl. Fundam. Concepts, Biol. Interact. Clin. Appl.* (2020) 1–4. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-816662-8.00001-1>.
- [2] M. Aschner, Nanoparticles: Transport across the olfactory epithelium and application to the assessment of brain function in health and disease, *Prog. Brain Res.* 180 (2009) 141–152. [https://doi.org/10.1016/S0079-6123\(08\)80008-8](https://doi.org/10.1016/S0079-6123(08)80008-8).
- [3] S. Malik, K. Muhammad, Y. Waheed, Nanotechnology: A Revolution in Modern Industry, *Molecules.* 28 (2023) 661. <https://doi.org/10.3390/MOLECULES28020661>.
- [4] T. Rambaran, R. Schirhagl, Nanotechnology from lab to industry – a look at current trends, *Nanoscale Adv.* 4 (2022) 3664–3675. <https://doi.org/10.1039/D2NA00439A>.
- [5] A. Deshpande, M. Mohamed, S.B. Daftardar, M. Patel, S.H.S. Boddu, J. Nesamony, Solid Lipid Nanoparticles in Drug Delivery: Opportunities and Challenges, *Emerg. Nanotechnologies Diagnostics, Drug Deliv. Med. Devices.* (2017) 291–330. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-42978-8.00012-7>.
- [6] A. Detsi, E. Kavetsou, I. Kostopoulou, I. Pitterou, A.R.N. Pontillo, A. Tzani, P. Christodoulou, A. Siliachli, P. Zoumpoulakis, Nanosystems for the encapsulation of natural products: The case of chitosan biopolymer as a matrix, *Pharmaceutics.* 12 (2020) 1–68. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics12070669>.
- [7] M. Kotronia, E. Kavetsou, S. Loupassaki, S. Kikionis, S. Vouyiouka, A. Detsi, Encapsulation of oregano (*Origanum onites* L.) essential oil in β -cyclodextrin (β -CD): Synthesis and characterization of the inclusion complexes, *Bioengineering.* 4 (2017). <https://doi.org/10.3390/bioengineering4030074>.
- [8] E. Kavetsou, I. Pitterou, A. Katopodi, G. Petridou, A. Adjali, S. Grigorakis, A. Detsi, Preparation, Characterization, and Acetylcholinesterase Inhibitory Ability of the Inclusion Complex of beta-Cyclodextrin-Cedar (*Juniperus phoenicea*) Essential Oil, *Micro.* 1 (2021) 250–266. <https://doi.org/10.3390/MICRO1020019>.
- [9] Z.H. Mohammad, F. Ahmad, S.A. Ibrahim, S. Zaidi, Application of nanotechnology in different aspects of the food industry, *Discov. Food.* 2 (2022) 1–21. <https://doi.org/10.1007/S44187-022-00013-9>.
- [10] S. Anjum, S. Ishaque, H. Fatima, W. Farooq, C. Hano, B.H. Abbasi, I. Anjum, Emerging

- Applications of Nanotechnology in Healthcare Systems: Grand Challenges and Perspectives, *Pharmaceuticals*. 14 (2021). <https://doi.org/10.3390/PH14080707>.
- [11] Y. Shang, M. Kamrul Hasan, G.J. Ahammed, M. Li, H. Yin, J. Zhou, Applications of Nanotechnology in Plant Growth and Crop Protection: A Review, 24 (2019) 2558. <https://doi.org/10.3390/MOLECULES24142558>.
- [12] S. Priya, V.M. Desai, G. Singhvi, Surface Modification of Lipid-Based Nanocarriers: A Potential Approach to Enhance Targeted Drug Delivery, *ACS Omega*. (2022). <https://doi.org/10.1021/ACSOMEGA.2C05976>.
- [13] S. Gorantla, V.K. Rapalli, T. Waghule, P.P. Singh, S.K. Dubey, R.N. Saha, G. Singhvi, Nanocarriers for ocular drug delivery: current status and translational opportunity, *RSC Adv*. 10 (2020) 27835–27855. <https://doi.org/10.1039/D0RA04971A>.
- [14] A. Sharma, N. Jain, R. Sareen, Nanocarriers for diagnosis and targeting of breast cancer, *Biomed Res. Int*. 2013 (2013). <https://doi.org/10.1155/2013/960821>.
- [15] A. Adjali, A.R.N. Pontillo, E. Kavetsou, A. Katopodi, A. Tzani, S. Grigorakis, S. Loupassaki, A. Detsi, Clove Essential Oil-Hydroxypropyl- β -Cyclodextrin Inclusion Complexes: Preparation, Characterization and Incorporation in Biodegradable Chitosan Films, *Micro*. 2 (2022) 212–224. <https://doi.org/10.3390/MICRO2010014>.
- [16] A. Katopodi, A. Detsi, Solid Lipid Nanoparticles and Nanostructured Lipid Carriers of natural products as promising systems for their bioactivity enhancement: The case of essential oils and flavonoids, *Colloids Surfaces A Physicochem. Eng. Asp*. 630 (2021) 127529. <https://doi.org/10.1016/J.COLSU RFA.2021.127529>.
- [17] N. Akombaetwa, A.B. Ilangala, L. Thom, P.B. Memvanga, B.A. Witika, A.B. Buya, Current Advances in Lipid Nanosystems Intended for Topical and Transdermal Drug Delivery Applications, *Pharmaceutics*. 15 (2023). <https://doi.org/10.3390/PHARMACEUTICS15020656>.
- [18] N. Dhiman, R. Awasthi, B. Sharma, H. Kharkwal, G.T. Kulkarni, Lipid Nanoparticles as Carriers for Bioactive Delivery, *Front. Chem*. 9 (2021) 268. <https://doi.org/10.3389/FCHEM.2021.580118>.
- [19] H. Nsairat, D. Khater, U. Sayed, F. Odeh, A. Al Bawab, W. Alshaer, Liposomes: structure, composition, types, and clinical applications, *Heliyon*. 8 (2022) e09394. <https://doi.org/10.1016/J.HELIIYON.2022.E09394>.
- [20] M. Alavi, N. Karimi, M. Safaei,

- Application of Various Types of Liposomes in Drug Delivery Systems, *Adv. Pharm. Bull.* 7 (2017) 3. <https://doi.org/10.15171/APB.2017.002>.
- [21] J. Weng, M. Yang, W. Wang, X. Xu, Z. Tian, Revealing Thermodynamics and Kinetics of Lipid Self-Assembly by Markov State Model Analysis, *J. Am. Chem. Soc.* 142 (2020) 21344–21352. <https://doi.org/10.1021/JACS.0C09343>.
- [22] M. Li, C. Du, N. Guo, Y. Teng, X. Meng, H. Sun, S. Li, P. Yu, H. Galons, Composition design and medical application of liposomes, *Eur. J. Med. Chem.* 164 (2019) 640–653. <https://doi.org/10.1016/J.EJMECH.2019.01.007>.
- [23] D. Guimarães, A. Cavaco-Paulo, E. Nogueira, Design of liposomes as drug delivery system for therapeutic applications, *Int. J. Pharm.* 601 (2021) 120571. <https://doi.org/10.1016/J.IJPHARM.2021.120571>.
- [24] D. Pasarin, A.I. Ghizdareanu, C.E. Enascuta, C.B. Matei, C. Bilbie, L. Paraschiv-Palada, P.A. Veres, Coating Materials to Increase the Stability of Liposomes, *Polymers (Basel)*. 15 (2023). <https://doi.org/10.3390/POLYM15030782>.
- [25] P. Nakhaei, R. Margiana, D.O. Bokov, W.K. Abdelbasset, M.A. Jadidi Kouhbanani, R.S. Varma, F. Marofi, M. Jarahian, N. Beheshtkhoo, Liposomes: Structure, Biomedical Applications, and Stability Parameters With Emphasis on Cholesterol, *Front. Bioeng. Biotechnol.* 9 (2021) 748. <https://doi.org/10.3389/FBIOE.2021.705886>.
- [26] U. Umaimah, M. Nordin, N. Ahmad, N. Salim, N. Saadah, M. Yusof, Lipid-based nanoparticles for psoriasis treatment: a review on conventional treatments, recent works, and future prospects, (2021). <https://doi.org/10.1039/d1ra06087b>.
- [27] A. Pucek, B. Tokarek, E. Waglewska, U. Bazylińska, Recent Advances in the Structural Design of Photosensitive Agent Formulations Using “Soft” Colloidal Nanocarriers, *Pharm.* 12 (2020) 587. <https://doi.org/10.3390/PHARMACEUTICS12060587>.
- [28] S. Srivastava, S. Srivastava, M.R. Singh, D. Singh, B.L. Tekwani, Novel perspectives for delivery of bioactives through blood-brain barrier and treatment of brain diseases, *Adv. Ave. Dev. Nov. Carriers Bioact. Biol. Agents.* (2020) 317–341. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-819666-3.00011-0>.
- [29] M.K. Satapathy, T.L. Yen, J.S. Jan, R.D. Tang, J.Y. Wang, R. Taliyan, C.H. Yang, Solid Lipid Nanoparticles (SLNs): An Advanced Drug Delivery System Targeting Brain through

- BBB, Pharm. 2021, Vol. 13, Page 1183. 13 (2021) 1183. <https://doi.org/10.3390/PHARMACEUTICS13081183>.
- [30] A. Borges, V. de Freitas, N. Mateus, I. Fernandes, J. Oliveira, Solid Lipid Nanoparticles as Carriers of Natural Phenolic Compounds, *Antioxidants*. 9 (2020) 998. <https://doi.org/10.3390/ANTIOX9100998>.
- [31] J. Basso, M. Mendes, T. Cova, J. Sousa, A. Pais, A. Fortuna, R. Vitorino, C. Vitorino, A Stepwise Framework for the Systematic Development of Lipid Nanoparticles, *Biomol*. 12 (2022) 223. <https://doi.org/10.3390/BIOM12020223>.
- [32] R. Shah, D. Eldridge, E. Palombo, I. Harding, Lipid Nanoparticles: Production, Characterization and Stability, (2015). <https://doi.org/10.1007/978-3-319-10711-0>.
- [33] L. Xu, X. Wang, Y. Liu, G. Yang, R.J. Falconer, C.-X. Zhao, Lipid Nanoparticles for Drug Delivery, *Adv. NanoBiomed Res*. 2 (2022) 2100109. <https://doi.org/10.1002/ANBR.202100109>.
- [34] C.H. Tang, H. Le Chen, J.R. Dong, Solid Lipid Nanoparticles (SLNs) and Nanostructured Lipid Carriers (NLCs) as Food-Grade Nanovehicles for Hydrophobic Nutraceuticals or Bioactives, *Appl. Sci*. 13 (2023) 1726. <https://doi.org/10.3390/APP13031726>.
- [35] L. Bayón-Cordero, I. Alkorta, L. Arana, Application of Solid Lipid Nanoparticles to Improve the Efficiency of Anticancer Drugs, *Nanomater.* (Basel, Switzerland). 9 (2019). <https://doi.org/10.3390/NANO9030474>.
- [36] C. Dianzani, F. Foglietta, B. Ferrara, A. Carolina Rosa, E. Muntoni, P. Gasco, C. Della Pepa, R. Canaparo, L. Serpe, Solid lipid nanoparticles delivering anti-inflammatory drugs to treat inflammatory bowel disease: Effects in an in vivo model, *World J. Gastroenterol*. 23 (2017) 4200. <https://doi.org/10.3748/WJG.V23.I23.4200>.
- [37] L. Arana, L. Gallego, I. Alkorta, Incorporation of Antibiotics into Solid Lipid Nanoparticles: A Promising Approach to Reduce Antibiotic Resistance Emergence, *Nanomaterials*. 11 (2021). <https://doi.org/10.3390/NANO11051251>.
- [38] E.B. Souto, S. Doktorovova, A. Zielinska, A.M. Silva, Key production parameters for the development of solid lipid nanoparticles by high shear homogenization, 24 (2019) 1181–1185. <https://doi.org/10.1080/10837450.2019.1647235>.
- [39] V.A. Duong, T.T.L. Nguyen, H.J. Maeng, Preparation of Solid Lipid Nanoparticles and Nanostructured Lipid Carriers for Drug Delivery and the

- Effects of Preparation Parameters of Solvent Injection Method, *Molecules*. 25 (2020). <https://doi.org/10.3390/MOLECULES25204781>.
- [40] S. V. Khairnar, P. Pagare, A. Thakre, A.R. Nambiar, V. Junnuthula, M.C. Abraham, P. Kolimi, D. Nyavanandi, S. Dyawanapelly, Review on the Scale-Up Methods for the Preparation of Solid Lipid Nanoparticles, *Pharmaceutics*. 14 (2022). <https://doi.org/10.3390/PHARMACEUTICS14091886>.
- [41] K. Oehlke, D. Behsnlian, E. Mayer-Miebach, P.G. Weidler, R. Greiner, Edible solid lipid nanoparticles (SLN) as carrier system for antioxidants of different lipophilicity, *PLoS One*. 12 (2017) e0171662. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0171662>.
- [42] J. Jose, G. Netto, Role of solid lipid nanoparticles as photoprotective agents in cosmetics, *J. Cosmet. Dermatol*. 18 (2019) 315–321. <https://doi.org/10.1111/jocd.12504>.
- [43] F. Suter, D. Schmid, F. Wandrey, F. Züllli, Heptapeptide-loaded solid lipid nanoparticles for cosmetic anti-aging applications, *Eur. J. Pharm. Biopharm*. 108 (2016) 304–309. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2016.06.014>.
- [44] L.R. Rodrigues, J. Jose, Exploring the photo protective potential of solid lipid nanoparticle-based sunscreen cream containing Aloe vera, *Environ. Sci. Pollut. Res*. 27 (2020) 20876–20888. <https://doi.org/10.1007/s11356-020-08543-4>.
- [45] A. Garcês, M.H. Amaral, J.M. Sousa Lobo, A.C. Silva, Formulations based on solid lipid nanoparticles (SLN) and nanostructured lipid carriers (NLC) for cutaneous use: A review, *Eur. J. Pharm. Sci*. 112 (2018) 159–167. <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2017.11.023>.
- [46] K. Khezri, M. Saeedi, S. Maleki Dizaj, Application of nanoparticles in percutaneous delivery of active ingredients in cosmetic preparations, *Biomed. Pharmacother*. 106 (2018) 1499–1505. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2018.07.084>.
- [47] A. Zeb, S.T. Arif, M. Malik, F.A. Shah, F.U. Din, O.S. Qureshi, E.S. Lee, G.Y. Lee, J.K. Kim, Potential of nanoparticulate carriers for improved drug delivery via skin, *J. Pharm. Investig*. 49 (2019) 485–517. <https://doi.org/10.1007/s40005-018-00418-8>.
- [48] K. Muniyandi, B. George, T. Parimelazhagan, H. Abrahamse, Role of Photoactive Phytocompounds in Photodynamic Therapy of Cancer, *Mol*. 25 (2020) 4102. <https://doi.org/10.3390/MOLECULES25184102>.
- [49] E. Kavetsou, C. Tsoukalas-Koulas, A. Katopodi, A. Kalospyros, E. Alexandratou, A. Detsi, Inclusion Complexes of

- Magnesium Phthalocyanine with Cyclodextrins as Potential Photosensitizing Agents, *Bioengineering*. 10 (2023) 244. <https://doi.org/10.3390/BIOENGINEERING10020244>.
- [50] N.W. Nkune, H. Abrahamse, Nanoparticle-Based Drug Delivery Systems for Photodynamic Therapy of Metastatic Melanoma: A Review, *Int. J. Mol. Sci.* 22 (2021) 12549. <https://doi.org/10.3390/IJMS22212549>.
- [51] F. Adnane, E. El-Zayat, H.M. Fahmy, The combinational application of photodynamic therapy and nanotechnology in skin cancer treatment: A review, *Tissue Cell*. 77 (2022) 101856. <https://doi.org/10.1016/J.TICE.2022.101856>.
- [52] E.P. Chizenga, H. Abrahamse, Nanotechnology in Modern Photodynamic Therapy of Cancer: A Review of Cellular Resistance Patterns Affecting the Therapeutic Response, *Pharm.* 12 (2020) 632. <https://doi.org/10.3390/PHARMACEUTICS12070632>.
- [53] D.R. Hu, M. Pan, Y. Yu, A. Sun, K. Shi, Y. Qu, Z.Y. Qian, Application of nanotechnology for enhancing photodynamic therapy via ameliorating, neglecting, or exploiting tumor hypoxia, *View*. 1 (2020) e6. <https://doi.org/10.1002/VIW2.6>.
- [54] H. Montaseri, C.A. Kruger, H. Abrahamse, Inorganic Nanoparticles Applied for Active Targeted Photodynamic Therapy of Breast Cancer, *Pharmaceutics*. 13 (2021) 1–33. <https://doi.org/10.3390/PHARMACEUTICS13030296>.
- [55] S.A. Fahmy, H.M.E.S. Azzazy, J. Schaefer, Liposome Photosensitizer Formulations for Effective Cancer Photodynamic Therapy, *Pharmaceutics*. 13 (2021). <https://doi.org/10.3390/PHARMACEUTICS13091345>.
- [56] C. Conte, S. Maiolino, D.S. Pellosi, A. Miro, F. Ungaro, F. Quaglia, Polymeric Nanoparticles for Cancer Photodynamic Therapy, *Top. Curr. Chem.* 370 (2016) 61–112. https://doi.org/10.1007/978-3-319-22942-3_3.
- [57] G.M.F. Calixto, J. Bernegossi, L.M. De Freitas, C.R. Fontana, M. Chorilli, A.M. Grumezescu, Nanotechnology-based drug delivery systems for photodynamic therapy of cancer: A review, *Molecules*. 21 (2016). <https://doi.org/10.3390/MOLECULES21030342>.
- [58] P.L. Goto, M.P. Siqueira-Moura, A.C. Tedesco, Application of aluminum chloride phthalocyanine-loaded solid lipid nanoparticles for photodynamic inactivation of melanoma cells, *Int. J. Pharm.* 518 (2017) 228–241. <https://doi.org/10.1016/J.IJPHARM.2017.01.004>.
- [59] A. Gordillo-Galeano, C.E. Mora-Huertas, Solid lipid nanoparticles and nanostructured lipid carriers: A

- review emphasizing on particle structure and drug release, Elsevier B.V., 2018. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2018.10.017>.
- [60] N. Malekjani, S.M. Jafari, Modeling the release of food bioactive ingredients from carriers/nanocarriers by the empirical, semiempirical, and mechanistic models, *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* 20 (2021) 3–47. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12660>.
- [61] J. Siepman, N.A. Peppas, Modeling of drug release from delivery systems based on hydroxypropyl methylcellulose (HPMC), *Adv. Drug Deliv. Rev.* 48 (2001) 139–157. [https://doi.org/10.1016/S0169-409X\(01\)00112-0](https://doi.org/10.1016/S0169-409X(01)00112-0).
- [62] N.A. Peppas, B. Narasimhan, Mathematical models in drug delivery: How modeling has shaped the way we design new drug delivery systems, *J. Control. Release.* 190 (2014) 75–81. <https://doi.org/10.1016/J.JCONREL.2014.06.041>.
- [63] S. Wang, R. Liu, Y. Fu, W.J. Kao, Release mechanisms and applications of drug delivery systems for extended-release, (2020). <https://doi.org/10.1080/17425247.2020.1788541>.
- [64] P. Trucillo, Drug Carriers: A Review on the Most Used Mathematical Models for Drug Release, *Process.* 10 (2022) 1094. <https://doi.org/10.3390/PR10061094>.
- [65] C.H.M. Jacques, H.B. Hopfenberg, V. Stannett, Super case II transport of organic vapors in glassy polymers. (1974) 73–86. https://doi.org/10.1007/978-1-4684-2877-3_6.
- [66] A. Witaicenis, L.N. Seito, A. Da Silveira Chagas, L.D. De Almeida, A.C. Luchini, P. Rodrigues-Orsi, S.H. Cestari, L.C. Di Stasi, Antioxidant and intestinal anti-inflammatory effects of plant-derived coumarin derivatives, *Phytomedicine.* 21 (2014) 240–246. <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2013.09.001>.
- [67] X. Zhang, J. Yao, Z. Wu, K. Zou, Z. Yang, X. Huang, Z. Luan, J. Li, Q. Wei, Chondroprotective and antiarthritic effects of Daphnetin used in vitro and in vivo osteoarthritis models, *Life Sci.* 240 (2020) 116857. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2019.116857>.
- [68] L. Yang, Q. Yang, K. Zhang, Y.J. Li, Y.M. Wu, S.B. Liu, L.H. Zheng, M.G. Zhao, Neuroprotective Effects of Daphnetin against NMDA Receptor-Mediated Excitotoxicity, *Molecules.* 19 (2014) 14542. <https://doi.org/10.3390/MOLECULES190914542>.
- [69] Y. Xia, C. Chen, Y. Liu, G. Ge, T. Dou, P. Wang, Synthesis and Structure-Activity Relationship of Daphnetin Derivatives as Potent Antioxidant Agents,

- Molecules. 23 (2018) 2476.
<https://doi.org/10.3390/molecules23102476>.
- [70] Y. Wang, J. Wang, Z. Fu, R. Sheng, W. Wu, J. Fan, R. Guo, Syntheses and evaluation of daphnetin derivatives as novel G protein-coupled receptor inhibitors and activators, *Bioorg. Chem.* 104 (2020) 104342. <https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2020.104342>.
- [71] J. Grgić, G. Šelo, M. Planinić, M. Tišma, A. Bucić-Kojić, Role of the Encapsulation in Bioavailability of Phenolic Compounds, *Antioxidants*. 9 (2020) 1–36. <https://doi.org/10.3390/ANTIOX9100923>.
- [72] R.P. Thatipamula, C.R. Palem, R. Gannu, S. Mudragada, M.R. Yamsani, Formulation and in vitro characterization of domperidone loaded solid lipid nanoparticles and nanostructured lipid carriers, *DARU, J. Pharm. Sci.* 19 (2011) 23–32.
- [73] M. Danaei, M. Dehghankhold, S. Ataei, F. Hasanzadeh Davarani, R. Javanmard, A. Dokhani, S. Khorasani, M.R. Mozafari, Impact of Particle Size and Polydispersity Index on the Clinical Applications of Lipidic Nanocarrier Systems, *Pharmaceutics*. 10 (2018). <https://doi.org/10.3390/PHARMACEUTICS10020057>.
- [74] R. Kamel, D.M. Mostafa, Rutin nanostructured lipid cosmeceutical preparation with sun protective potential, *J. Photochem. Photobiol. B Biol.* 153 (2015) 59–66. <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2015.09.002>.
- [75] L. Becker Peres, L. Becker Peres, P.H.H. de Araújo, C. Sayer, Solid lipid nanoparticles for encapsulation of hydrophilic drugs by an organic solvent free double emulsion technique, *Colloids Surfaces B Biointerfaces*. 140 (2016) 317–323. <https://doi.org/10.1016/J.COLLSURFB.2015.12.033>.
- [76] S. Daneshmand, M.R. Jaafari, J. Movaffagh, B. Malaekhe-Nikouei, M. Iranshahi, A. Seyedian Moghaddam, Z. Tayarani Najaran, S. Golmohammadzadeh, Preparation, characterization, and optimization of auraptene-loaded solid lipid nanoparticles as a natural anti-inflammatory agent: In vivo and in vitro evaluations, *Colloids Surfaces B Biointerfaces*. 164 (2018) 332–339. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2018.01.054>.
- [77] Y. Erdogdu, Investigations of FT-IR, FT-Raman, FT-NMR spectra and quantum chemical computations of Esculetin molecule, *Spectrochim. Acta Part A Mol. Biomol. Spectrosc.* 106 (2013) 25–33. <https://doi.org/10.1016/J.SAA.2012.12.043>.
- [78] J. Stetefeld, S.A. McKenna, T.R. Patel, Dynamic light scattering: a practical guide and applications in biomedical sciences, *Biophys.*

- Rev. 8 (2016) 409.
<https://doi.org/10.1007/S12551-016-0218-6>.
- [79] L.N.D.M. Ribeiro, V.M. Couto, L.F. Fraceto, E. De Paula, Use of nanoparticle concentration as a tool to understand the structural properties of colloids, *Sci. Rep.* 8 (2018).
<https://doi.org/10.1038/S41598-017-18573-7>.
- [80] B.K. Wilson, R.K. Prud'homme, Nanoparticle size distribution quantification from transmission electron microscopy (TEM) of ruthenium tetroxide stained polymeric nanoparticles, *J. Colloid Interface Sci.* 604 (2021) 208–220.
<https://doi.org/10.1016/J.JCIS.2021.04.081>.
- [81] T. Gupta, J. Singh, S. Kaur, S. Sandhu, G. Singh, I.P. Kaur, Enhancing Bioavailability and Stability of Curcumin Using Solid Lipid Nanoparticles (CLEN): A Covenant for Its Effectiveness, *Front. Bioeng. Biotechnol.* 8 (2020) 879.
<https://doi.org/10.3389/FBIOE.2020.00879>.
- [82] R. Osanlou, M. Emtjazoo, A. Banaei, M.A. Hesarinejad, F. Ashrafi, Preparation of solid lipid nanoparticles and nanostructured lipid carriers containing zeaxanthin and evaluation of physicochemical properties, *Colloids Surfaces A Physicochem. Eng. Asp.* 641 (2022) 128588.
<https://doi.org/10.1016/J.COLSURFA.2022.128588>.
- [83] P.N. Ezhilarasi, S.P. Muthukumar, C. Anandharamakrishnan, Solid lipid nanoparticle enhances bioavailability of hydroxycitric acid compared to a microparticle delivery system, *RSC Adv.* 6 (2016) 53784–53793.
<https://doi.org/10.1039/c6ra04312g>.
- [84] S. Saito, J. Kawabata, Effects of electron-withdrawing substituents on DPPH radical scavenging reactions of protocatechuic acid and its analogues in alcoholic solvents, *Tetrahedron.* 61 (2005) 8101–8108.
<https://doi.org/10.1016/J.TET.2005.06.040>.
- [85] I. Lacatusu, N. Badea, A. Murariu, O. Oprea, D. Bojin, A. Meghea, Antioxidant Activity of Solid Lipid Nanoparticles Loaded with Umbelliferone, 11 (2012) 75–84.
<https://doi.org/10.1080/1539445X.2011.582914>.
- [86] M. Repetto, J. Semprine, A. Boveris, M. Repetto, J. Semprine, A. Boveris, Lipid Peroxidation: Chemical Mechanism, Biological Implications and Analytical Determination, *Lipid Peroxidation.* (2012).
<https://doi.org/10.5772/45943>.
- [87] K.T. Kazantzis, K. Koutsonikoli, B. Mavroidi, M. Zachariadis, P. Alexiou, M. Pelecanou, K. Politopoulos, E. Alexandratou, M. Sagnou, Curcumin derivatives as photosensitizers in photodynamic therapy: photophysical properties and in vitro studies with prostate

- cancer cells, *Photochem. Photobiol. Sci.* 19 (2020) 193–206. <https://doi.org/10.1039/C9PP00375D>.
- [88] S. Parvez, A. Karole, S.L. Mudavath, Fabrication, physicochemical characterization and In vitro anticancer activity of nerolidol encapsulated solid lipid nanoparticles in human colorectal cell line, *Colloids Surfaces B Biointerfaces*. 215 (2022) 112520. <https://doi.org/10.1016/J.COLSUB.2022.112520>.
- [89] F. Veider, Z.B. Akkuş-Dağdeviren, P. Knoll, A. Bernkop-Schnürch, Design of nanostructured lipid carriers and solid lipid nanoparticles for enhanced cellular uptake, *Int. J. Pharm.* 624 (2022) 122014. <https://doi.org/10.1016/J.IJPHARM.2022.122014>.
- [90] J.F. Algorri, M. Ochoa, P. Roldán-Varona, L. Rodríguez-Cobo, J.M. López-Higuera, Light Technology for Efficient and Effective Photodynamic Therapy: A Critical Review, *Cancers* 2021, Vol. 13, Page 3484. 13 (2021) 3484. <https://doi.org/10.3390/CANCERS13143484>.
- [91] P. Phasupan, T.D. Le, L.T. Nguyen, Assessing the photodynamic efficacy of different photosensitizer-light treatments against foodborne bacteria based on the number of absorbed photons, *J. Photochem. Photobiol. B Biol.* 221 (2021) 112249. <https://doi.org/10.1016/J.JPHOTOBIOL.2021.112249>.
- [92] C. Donohoe, M.O. Senge, L.G. Arnaut, L.C. Gomes-da-Silva, Cell death in photodynamic therapy: From oxidative stress to anti-tumor immunity, *Biochim. Biophys. Acta - Rev. Cancer*. 1872 (2019) 188308. <https://doi.org/10.1016/J.BBCAN.2019.07.003>.
- [93] H. Shimomura, Y. Sashida, Y. Ohshima, The Chemical Components of *Artemisia apiacea* HANCE. II. More Coumarins from the Flower Heads, *Chem. Pharm. Bull.* 28 (1980) 347–348. <https://doi.org/10.1248/CPB.28.347>.
- [94] J. Lin, W. Zhang, N. Jiang, Z. Niu, K. Bao, L. Zhang, D. Liu, C. Pan, X. Yao, Total synthesis of bulbophylol-B, *J. Nat. Prod.* 71 (2008) 1938–1941. <https://doi.org/10.1021/NP800226N>.
- [95] F.N. Lugemwa, Extraction of Betulin, Trimyrustin, Eugenol and Carnosic Acid Using Water-Organic Solvent Mixtures, *Molecules*. 17 (2012) 9274. <https://doi.org/10.3390/MOLECULES17089274>.

Κεφάλαιο 8^ο

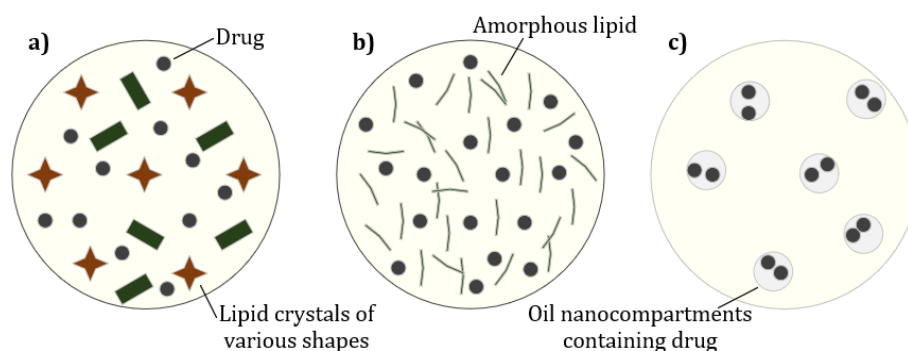
ΕΓΚΛΕΙΣΜΟΣ ΤΗΣ 7,8-ΔΙΥΔΡΟΕΥ-4-ΜΕΘΥΛΟ-
ΚΟΥΜΑΡΙΝΗΣ ΣΕ ΛΙΠΙΔΙΚΑ ΝΑΝΟΣΥΣΤΗΜΑΤΑ
ΝΕΟΤΕΡΗΣ ΓΕΝΙΑΣ ΚΑΙ ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ
ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΗΣ ΤΟΥΣ ΔΡΑΣΗΣ

8.1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ

8.1.1 Νανοδομημένοι λιπιδικοί φορείς λιπιδίων (NLCs)

Οι νανοδομημένοι λιπιδικοί φορείς (Nanostructured Lipid Carriers, NLCs) αποτελούν νεότερης γενιάς λιπιδικά νανοσυστήματα και ανάλογα των νανοσωματιδίων στερεών λιπιδίων (SLNs). Τα NLCs αποτελούνται από μίγμα στερεών και υγρών λιπιδίων [1–3]. Η προσθήκη υγρού λιπιδίου ταπεινώνει το σημείο τήξεως του νανοσυστήματος, ωστόσο και πάλι παραμένει υψηλότερο από τη θερμοκρασία του ανθρώπινου σώματος [4]. Τα NLCs σχηματίζονται χρησιμοποιώντας τα ίδια στερεά λιπίδια που χρησιμοποιούνται για τα SLNs, όπως λιπαρά οξέα και τριγλυκερίδια και επιφανειοδραστικούς παράγοντες όπως το Tween 80[®] και Poloxamer 188[®] [5]. Ως υγρά λιπίδια, χρησιμοποιούνται διάφορα λιπίδια, όπως ελαιόλαδο, αμυγδαλέλαιο, το ολεϊκό οξύ, έλαιο καρύδας κ.α., ενώ αρκετές φορές τα συστατικά που εγκλωβίζονται όπως αιθέρια έλαια, παίζουν τόσο το ρόλο του υγρού λιπιδίου όσο και των βιοδραστικών ενώσεων [6–8]. Η αναλογία στερεού προς υγρό λιπίδιο συνήθως αποτελεί έως 30% του στερεού λιπιδίου, με συνολική περιεκτικότητα λιπιδίων μεταξύ 1 και 30% (w/v), ενώ ο επιφανειοδραστικός παράγοντας προστίθεται σε περιεκτικότητα από 0.25% έως 6% (w/v) [7,9,10]. Τα NLCs παρασκευάζονται με τις ίδιες μεθόδους όπως και τα SLNs, όπως με θερμή και ψυχρή ομογενοποίηση, γαλακτωματοποίηση κι εξάτμιση του διαλύτη κ.α. [11].

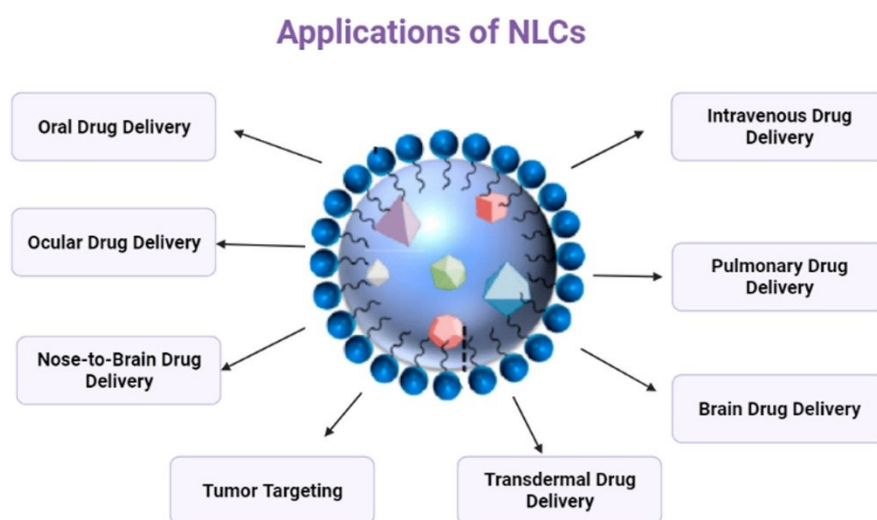
Υπάρχουν τρεις διαφορετικοί τύποι NLCs, ανάλογα με την κατανομή της βιοδραστικής ένωσης στο εσωτερικό τους (Εικόνα 8.1): (a): Το μοντέλο ατελούς τύπου (imperfect type), που σχηματίζεται όταν ο συνδυασμός υγρού και στερεού λιπιδίου δημιουργεί ένα ατελές κρυσταλλικό πλέγμα, γεγονός που οδηγεί σε μεγαλύτερες αποδόσεις εγκλεισμού. (b): Το μοντέλο άμορφου τύπου (amorphous type), το οποίο προκύπτει όταν χρησιμοποιούνται συγκεκριμένα λιπίδια όπως, τα οποία οδηγούν σε μία μη κρυσταλλική δομή ευνοώντας τη σταθερότητα των νανοσωματιδίων. (c): Το μοντέλο πολλαπλού τύπου (multiple type) που δημιουργείται όταν η διαλυτότητα της ένωσης προς εγκλωβισμό είναι μεγαλύτερη στο υγρό από ότι στο στερεό λιπίδιο [9,12].



Εικόνα 8.1 Μοντέλα ενσωμάτωσης της βιοδραστικής ένωσης στα NLCs [7].

Σημαντικό πλεονέκτημα των NLCs είναι η περισσότερο «άτακτη» κρυσταλλική δομή τους σε σχέση με τα SLNs, η οποία επιτρέπει υψηλότερες αποδόσεις εγκλεισμού καθώς και αποτρέπει την αποβολή της βιοδραστικής ένωσης (drug expulsion) έπειτα από κάποιο χρονικό διάστημα αποθήκευσης, το οποίο αποτελεί βασικό μειονέκτημα των SLNs [13–16].

Τα NLCs χρησιμοποιούνται ευρέως για τη μεταφορά βιοδραστικών ενώσεων για φαρμακευτικές (Εικόνα 8.2) και καλλυντικές εφαρμογές, σε εντομοαπωθητικά, ακόμη και στον τομέα των τροφίμων [17–19], ενώ χρησιμοποιούνται για τον εγκλεισμό πλήθους ενώσεων όπως φλαβονοειδή [20], πολυφαινόλες [21], πρωτεΐνες [22], ακόμη και πολυσυστατικά φυτικά εκχυλίσματα [23].



Εικόνα 8.2 Εφαρμογή των NLCs για τη μεταφορά φαρμακευτικών μορίων.

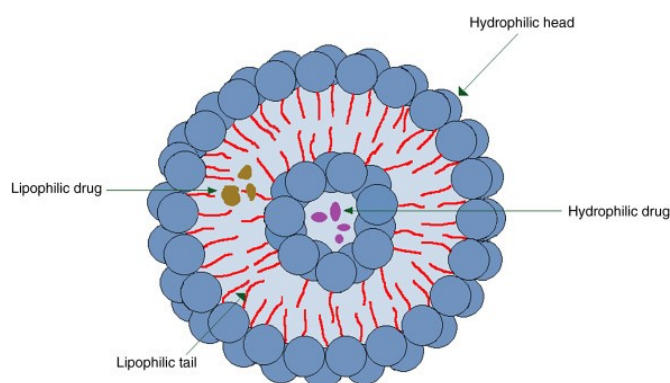
Πολλαπλές μελέτες έχουν δείξει την ικανότητά τους να προστατεύουν τις βιοδραστικές ενώσεις που εγκλωβίζονται στο εσωτερικό τους από εξωτερικές συνθήκες, καθώς και να αυξάνουν την υδατοδιαλυτότητά τους, οδηγώντας σε βελτίωση της βιολογικής τους δράσης ή και σε καλύτερη διατήρησή της έπειτα από αποθήκευση [7,24,25]. Ακόμη, τα συστατικά που χρησιμοποιούνται για την παρασκευή τους φαίνεται να διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο, καθώς μελέτες έχουν δείξει ότι η χρήση ελαιόλαδου ως υγρό λιπίδιο οδηγεί σε συνεργιστική δράση με τις βιοδραστικές ενώσεις που εγκλείονται, επιφέροντας αυξημένη βιολογική δράση, όπως αντιοξειδωτική ή επουλωτική ικανότητα [26,27].

Για παράδειγμα, σε μελέτη των Saporito et al. [27], παρασκευάστηκαν NLCs αιθερίων ελαίων ευκαλύπτου (*Myrtaceae*) και τριαντάφυλλου (*Rosmarinus officinalis*) με τη μέθοδο ομογενοποίησης υψηλής πίεσης, ακολουθούμενη από υπερήχους. Ως στερεό λιπίδιο χρησιμοποιήθηκε βούτυρο από κακό και ως υγρό λιπίδιο ελαιόλαδο ή σησαμέλαιο σε συνδυασμό με λεκιθίνη. Παρατηρήθηκε ότι τα NLCs που σχηματίστηκαν χρησιμοποιώντας το ελαιόλαδο ως υγρό λιπίδιο και το αιθέριο έλαιο ευκαλύπτου, παρουσίασαν βελτιωμένη επουλωτική ικανότητα *in vitro*, σε σχέση με τα υπόλοιπα παρασκευαζόμενα νανοσυστήματα, αυξάνοντας τη βιωσιμότητα των υγιών ανθρώπινων ινοβλαστών, το οποίο πιθανώς

αποδίδεται σε συνεργιστική δράση μεταξύ του ολεϊκού οξέος και του αιθερίου ελαίου. Ακόμη, παρουσίασαν αυξημένη αντιμικροβιακή δράση έναντι του παθογόνου *Streptococcus pyogenes* (MIC 0.75 mg/mL) σε σχέση με το αιθέριο έλαιο σε ελεύθερη μορφή (MIC 1.5 mg/mL).

8.1.2 Νισσώματα

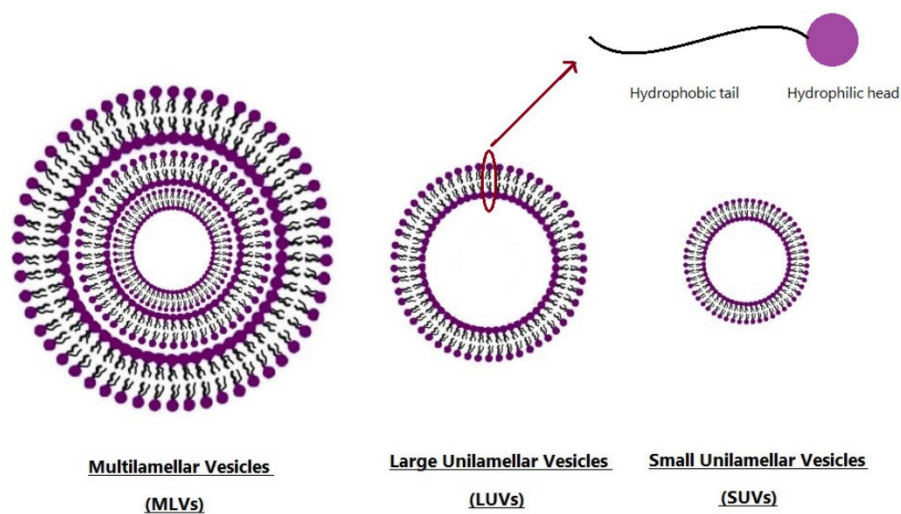
Τα νισσώματα (niosomes) αποτελούν ένα νεότερο λιπιδικό νανοσύστημα μεταφοράς βιοδραστικών ουσιών, τα οποία παρουσιάζουν σημαντικές δομικές ομοιότητες με τα λιποσώματα [28]. Τα νισσώματα σχηματίζονται με τη χρήση χοληστερόλης συνήθως ως λιπίδιο, καθώς και με τη βοήθεια μη-ιονικών επιφανειοδραστικών παραγόντων (Εικόνα 8.3). Συχνά χρησιμοποιούμενοι επιφανειοδραστικοί παράγοντες είναι οι εστέρες σορβιτόλης (Glycerol Monostearate, Tween 20, 40, 60, 80, Span 20, 40, 60) και οι εστέρες γλυκερόλης (μονοστεατικός εστέρας της γλυκερίνης, Glycerol monostearate). Η επιλογή του κατάλληλου επιφανειοδραστικού παράγοντα εξαρτάται από την τοξικότητα, συμβατότητα, βιοαποικοδομησιμότητα κ.α. και την τιμή HLB του παράγοντα (hydrophilic-lipophilic balance) [29–31]. Η τιμή αυτή εκφράζει την ισορροπία μεταξύ των λιπόφιλων και υδρόφιλων ομάδων του επιφανειοδραστικού παράγοντα, είναι δηλαδή ενδεικτική του υδρόφιλου ή λιπόφιλου χαρακτήρα του. Όταν η τιμή HLB του επιφανειοδραστικού είναι μεγαλύτερη του 10, τότε σημαίνει ότι υπερτερεί ο υδρόφιλος χαρακτήρας ενώ όταν η τιμή HLB είναι μικρότερη του 10, τότε σημαίνει ότι υπερτερεί ο λιπόφιλος χαρακτήρας [32]. Όσον αφορά τα λιπίδια, η χοληστερόλη προτιμάται για την παρασκευή τους, καθώς προσδίδει την απαραίτητη μηχανική αντοχή, ακαμψία και σταθερότητα στη δομή τους [33–35]. Ακόμη, έχει βρεθεί ότι ο συνδυασμός χοληστερόλης με επιφανειοδραστικούς παράγοντες με χαμηλές τιμές HLB οδηγεί σε μικρότερα μεγέθη νανοσωματιδίων [36].



Εικόνα 8.3 Δομή νισσωμάτων.

Όσον αφορά τη δομή των νισσωμάτων, όπως και τα λιποσώματα, ανάλογα με την διάταξη και αυτό-οργάνωση των λιπιδίων, κατηγοριοποιούνται σε μικρά μονοστρωματικά (small unilamellar), μεγάλα μονοστρωματικά (large unilamellar),

και πολυστρωματικά (multilamellar), γεγονός που καθορίζει το μέγεθός τους και επηρεάζεται από τη μέθοδο παρασκευής τους (Εικόνα 8.4). Ειδικότερα, τα μεγέθη για κάθε κατηγορία κυμαίνονται μεταξύ 10-100 nm, 100-250 nm και >250 nm, αντίστοιχα [29]. Το μέγεθος των νανοσωματιδίων αποτελεί κρίσιμο και καθοριστικό παράγοντα για τις ιδιότητες τους και συνδέεται άμεσα με την επιθυμητή εφαρμογή [37]. Επομένως, κάθε είδος από τα διαφορετικά νιοσώματα μπορεί να χρησιμοποιηθεί και αξιοποιηθεί σωστά σε διαφορετικές εφαρμογές. Παραδείγματος χάριν, σε περιπτώσεις οφθαλμικής, ενδοφλέβιας ή ενδομυϊκής χορήγησης, προτιμώνται μεγαλύτερα μεγέθη (>200 nm), ενώ η στόχευση του αιματοεγκεφαλικού φραγμού απαιτεί μεγέθη μικρότερα από 200 nm [38].



Εικόνα 8.4 Κατηγοριοποίηση νιοσωμάτων ανάλογα με τη δομή τους [39].

Τα νιοσώματα προσφέρουν πολλά πλεονεκτήματα έναντι των λιποσωμάτων, όπως μεγαλύτερη χημική και φυσική σταθερότητα και μεγαλύτερη διάρκεια ζωής. Τα κυριότερα πλεονεκτήματα των νιοσωμάτων είναι [29,40–42]:

- ✓ βιοσυμβατότητα, βιοαποικοδομησιμότητα και χαμηλή τοξικότητα,
- ✓ ευκολία παρασκευής και
- ✓ δυνατότητα εγκλωβισμού υδρόφιλων, υδρόφοβων και αμφοτερικών βιοδραστικών ουσιών λόγω της ιδιαίτερης δομής τους, καθώς και εγκλωβισμού δύο ή και περισσότερων διαφορετικών βιοδραστικών ουσιών ταυτόχρονα [43].

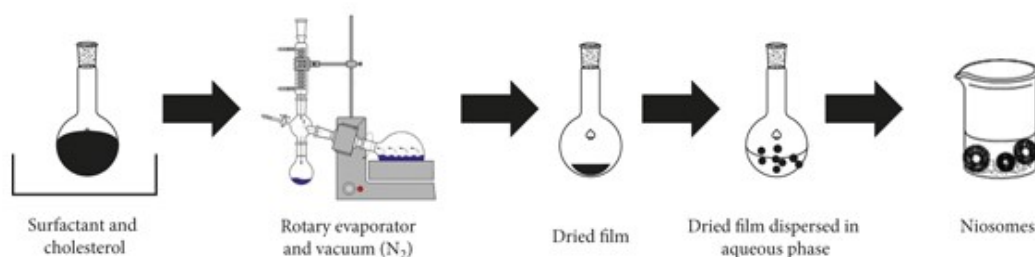
Επιπλέον, μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως φορείς βιοδραστικών ουσιών για τη μεταφορά ενώσεων στον οφθαλμικό, πνευμονικό και εγκεφαλικό ιστό, ενώ είναι πολύ σημαντικό ότι μπορούν να αυξήσουν τη διαπερατότητα του φραγμού του δέρματος [44–47].

Μέθοδοι παρασκευής των νιοσωμάτων

Ορισμένες από τις πλέον χρησιμοποιούμενες μεθόδους παρασκευής των νιοσωμάτων αποτελούν οι εξής:

i. Μέθοδος λεπτού φιλμ-ενυδάτωσης

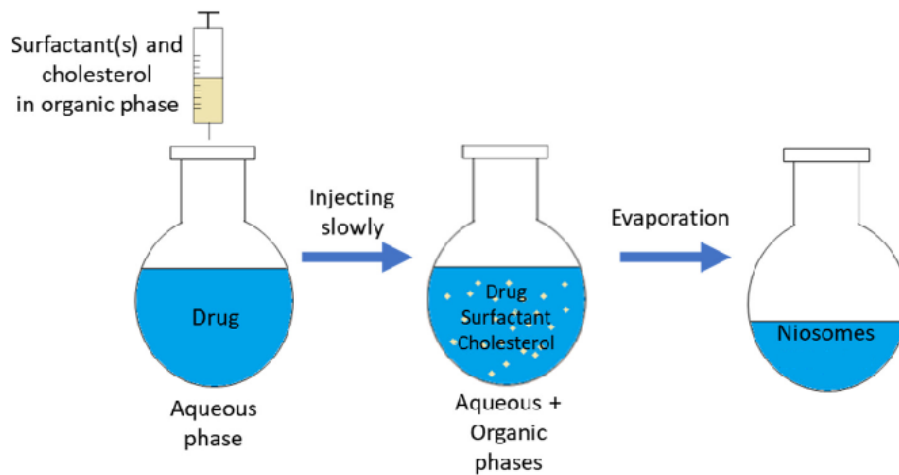
Η μέθοδος λεπτού φιλμ-ενυδάτωσης αποτελεί μία από τις πιο συχνά χρησιμοποιούμενες μεθόδους για την παρασκευή λιπιδικών νανοσυστημάτων. Ειδικότερα, το λιπίδιο και ο επιφανειοδραστικός παράγοντας διαλύονται σε κατάλληλο διαλύτη (συνήθως χλωροφόρμιο ή διχλωρομεθάνιο) ή και σε σύστημα διαλυτών και στη συνέχεια εξατμίζονται προς την παρασκευή ενός λεπτού φιλμ. Στη συνέχεια, το φιλμ ενυδατώνεται με την προσθήκη της υδατικής φάσης, η οποία περιέχει και τη βιοδραστική ένωση, ενώ ακολουθεί ανάδευση υπό θέρμανση για την παραλαβή της υδατικής διασποράς των νανοσωματιδίων (Εικόνα 8.5) [29,48].



Εικόνα 8.5 Μέθοδος λεπτού φιλμ-ενυδάτωσης [29].

ii. Έγχυση με αιθέρα (ether injection)

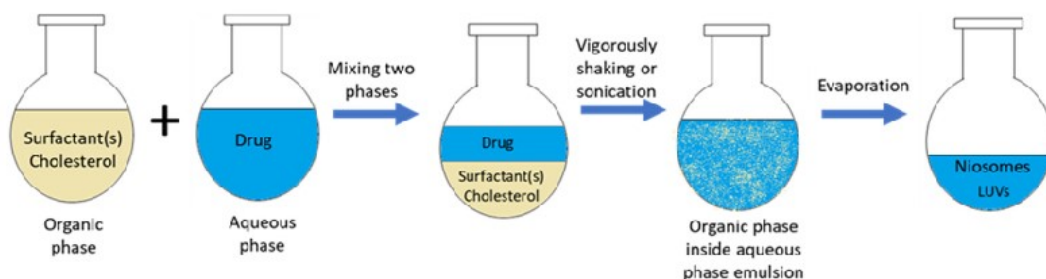
Ο επιφανειοδραστικός παράγοντας, η χοληστερόλη και η βιοδραστική ένωση διαλύονται σε διαιθυλαιθέρα και στη συνέχεια προστίθενται στάγδην στην υδατική φάση. Τέλος, ο αιθέρας εξατμίζεται προς παραλαβή πολυστρωματικών (multilamellar) νιοσωμάτων, για τα οποία απαιτείται περαιτέρω επεξεργασία προκειμένου να μειωθούν σε μέγεθος (μονοστρωματικά νιοσώματα) [29]. Εναλλακτικά, η υδατική φάση είναι προθερμασμένη στους 60 °C, οπότε ταυτόχρονα με την παρασκευή των νιοσωμάτων πραγματοποιείται και εξάτμιση του διαλύτη (Εικόνα 8.6) [49].



Εικόνα 8.6 Μέθοδος έγχυσης αιθέρα [39].

iii. Τεχνική εξάτμισης αντίστροφης φάσης

Ο επιφανειοδραστικός παράγοντας και το λιπίδιο διαλύεται σε μίγμα αιθέρα και χλωροφορμίου και προστίθεται στην υδατική φάση προς παραλαβή γαλακτώματος τύπου water-in-oil (w/o). Ακολουθεί ομογενοποίηση και εξάτμιση της οργανικής φάσης που οδηγεί στο σχηματισμό της τελικής διασποράς νιοσωμάτων [50] (Εικόνα 8.7).



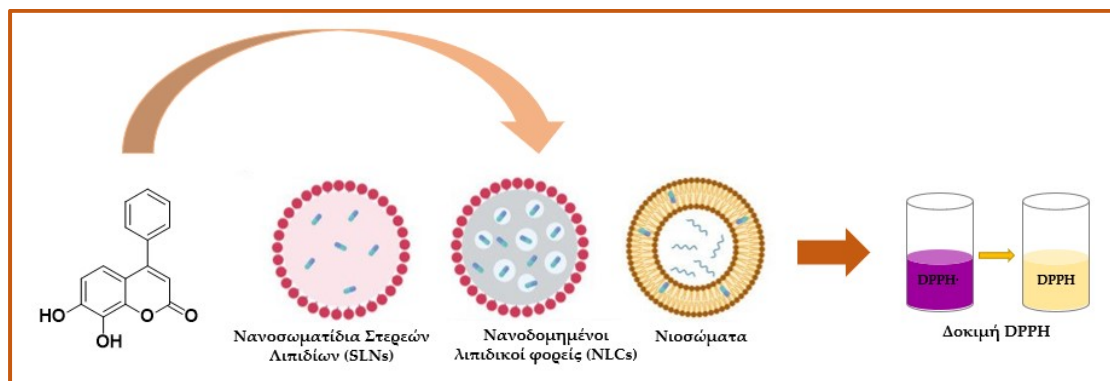
Εικόνα 8.7 Τεχνική εξάτμισης αντίστροφης φάσης [39].

iv. Υπερήχηση

Η μέθοδος της υπερήχησης συνήθως συνδυάζεται με άλλες μεθόδους και χρησιμοποιείται για την ομογενοποίηση της διασποράς των νανοσωματιδίων και τη μείωση του μεγέθους [36,51]. Ωστόσο, σε ορισμένες περιπτώσεις η υπερήχηση από μόνη της έχει οδηγήσει στο σχηματισμό νιοσωμάτων. Η βιοδραστική ένωση μαζί με το λιπίδιο και τον επιφανειοδραστικό παράγοντα προστίθενται στην υδατική δράση και ακολουθεί υπερήχηση, συνήθως σε υψηλή θερμοκρασία (60 °C) [52].

8.2 ΣΚΟΠΟΣ

Σκοπό του παρόντος κεφαλαίου αποτελεί η ανάπτυξη νεότερων λιπιδικών νανοσυστημάτων για τον εγκλεισμό της 7,8-διυδροξυ-4-φαινυλο-κουμαρίνης (**40**) (Σχήμα 8.1) και η μελέτη της αντιοξειδωτικής τους δράσης. Είναι γνωστό ότι παρά την αξιόλογη βιολογική τους δράση, τα κουμαρινικά ανάλογα φέρουν χαμηλή υδατοδιαλυτότητα, η οποία επιδιώκεται να βελτιωθεί μέσω του εγκλεισμού τους σε κατάλληλους φορείς.



Σχήμα 8.1 Εγκλεισμός της 7,8-διυδροξυ-4-φαινυλο-κουμαρίνης (**40**) σε νέα λιπιδικά νανοσυστήματα και μελέτη της αντιοξειδωτικής τους δράσης.

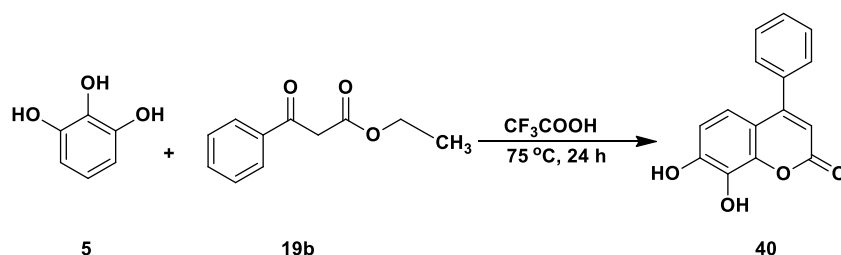
Τα νανοσωματίδια στερεών λιπιδίων (SLNs) αποτελούν ένα νεότερης γενιάς λιπιδικό σύστημα το οποίο μελετήθηκε εκτενώς στο Κεφάλαιο 7, ενώ οι νανοδομημένοι λιπιδικοί φορείς (NLCs) αποτελούν εξέλιξη τους και η ανάπτυξη τους στηρίχθηκε στη μελέτη παρασκευής των SLNs που έχει ήδη πραγματοποιηθεί στο Εργαστήριο Οργανικής Χημείας ΕΜΠ. Ακόμη, πραγματοποιήθηκε η μελέτη ανάπτυξης νιοσωμάτων, τα οποία αποτελούν ακόμη νεότερα λιπιδικά νανοσυστήματα που αποτελούνται από χοληστερόλη και μη-ιονικούς επιφανειοδραστικούς παράγοντες, με στόχο τη συγκριτική μελέτη όλων των λιπιδικών νανοφορέων ως προς την ικανότητα εγκλεισμού του κουμαρινικού αναλόγου καθώς και ως προς τα χαρακτηριστικά τους.

Τόσο η ελεύθερη κουμαρίνη όσο και τα νανοσωματίδια που παρασκευάστηκαν χαρακτηρίστηκαν μέσω φασματοσκοπίας FT-IR και θερμοσταθμικής ανάλυσης TG. Η μελέτη αποδέσμευσης της κουμαρίνης από τα διαφορετικά νανοσυστήματα πραγματοποιήθηκε στους 37 °C και σε pH 7.4 και ακολούθησε κινητική μοντελοποίηση, ενώ πραγματοποιήθηκε και μελέτη της αντιοξειδωτικής τους δράσης μέσω της ικανότητάς τους να δεσμεύουν την ελεύθερη ρίζα DPPH.

8.3 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ-ΣΥΖΗΤΗΣΗ

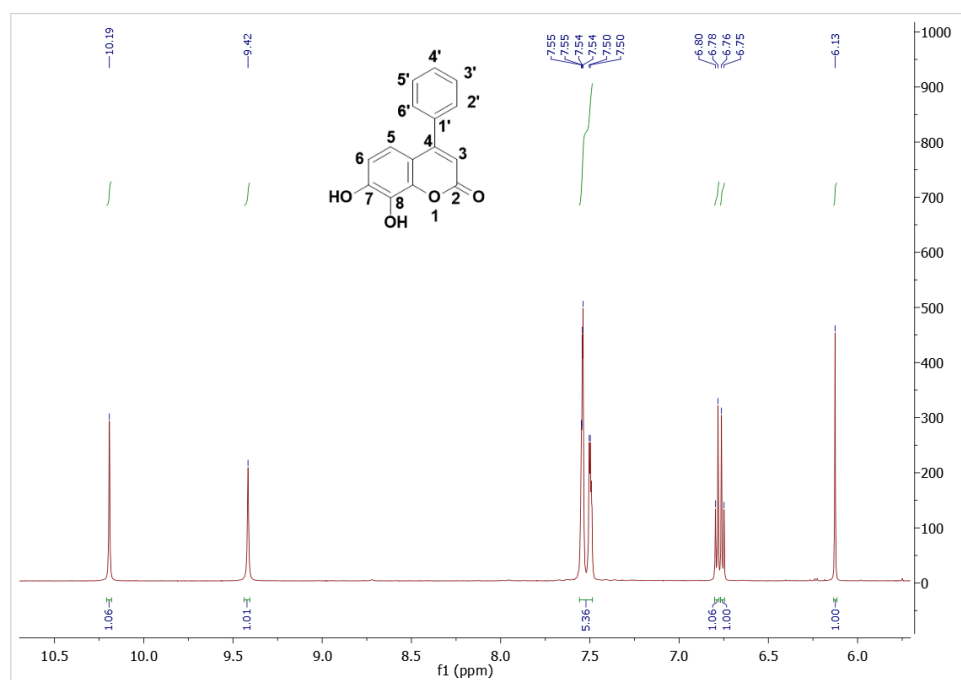
8.3.1 Σύνθεση και φασματοσκοπική μελέτη της 7,8-διυδροξυ-4-φαινυλο-κουμαρίνης (40)

Η σύνθεση της 7,8-διυδροξυ-4-φαινυλο-κουμαρίνης (40) πραγματοποιήθηκε μέσω αντίδρασης Pechmann, μεταξύ της πυρογαλλόλης και του βενζοΐλοξικού αιθυλεστέρα παρουσία τριφθοροξικού οξέος (CF_3COOH) στους $75\text{ }^\circ\text{C}$ για 24 h (Σχήμα 8.2).



Σχήμα 8.2 Συνθετική πορεία της 7,8-διυδροξυ-4-φαινυλο-κουμαρίνης (40).

Ακολουθεί το φάσμα ^1H NMR της 7,8-διυδροξυ-4-φαινυλο-κουμαρίνης προκειμένου να πραγματοποιηθεί ταυτοποίηση της δομής της και έλεγχος καθαρότητας (Εικόνα 8.8).



Εικόνα 8.8 Φάσμα ^1H NMR της 7,8-διυδροξυ-4-φαινυλο-χρωμεν-2-όνης (40).

Στο φάσμα ^1H NMR της 7,8-διυδροξυ-4-φαινυλο-χρωμεν-2-όνης (40), από τα χαμηλά προς τα υψηλά πεδία, παρουσιάζονται δύο απλές κορυφές στα 10.19 και 9.42 ppm, οι οποίες αποδίδονται στα πρωτόνια των υδροξυλομάδων των θέσεων 7 και 8. Ακολουθούν τα αρωματικά πρωτόνια και συγκεκριμένα μεταξύ 7.55 και 7.50 ppm εμφανίζεται μία πολλαπλή κορυφή που ολοκληρώνεται για πέντε πρωτόνια,

τα πρωτόνια των θέσεων 2'-6'. Στη συνέχεια, εμφανίζονται δύο διπλές κορυφές στα 6.79 και 6.76 ppm που αποδίδονται στα H-5 και H-6, ενώ στα 6.13 ppm παρουσιάζεται μία απλή κορυφή που αποδίδεται στο πρωτόνιο της θέσης 3 του κουμαρινικού σκελετού.

8.3.2 Μέση υδροδυναμική διάμετρος, δείκτης πολυδιασποράς (PDI), ζ-δυναμικό, Απόδοση Διεργασίας και Απόδοση Εγκλεισμού

Τα αποτελέσματα της μεθόδου DLS καθώς και της απόδοσης διεργασίας και εγκλεισμού για τα παρασκευαζόμενα SLNs και NLCs παρουσιάζονται στον Πίνακα 8.1. Αξίζει να σημειωθεί ότι για την παρασκευή των NLCs εξετάστηκε αναλογία στερεού προς υγρό λιπίδιο 85:15 και 70:30 (w/w). Ωστόσο, η υδατική διασπορά των NLCs με αναλογία 70:30 (w/w) παρουσίασε υψηλή ανομοιογένεια, οπότε δεν προχώρησε σε χαρακτηρισμό. Συνεπώς, τα αποτελέσματα των NLCs που παρουσιάζονται στον Πίνακα 8.1 αφορούν την αναλογία 85:15 (w/w).

Πίνακας 8.1 Μέση υδροδυναμική διάμετρος, δείκτης πολυδιασποράς (PDI), ζ-δυναμικό απόδοση διεργασίας και απόδοση εγκλεισμού των παρασκευαζόμενων SLNs και NLCs.

Δείγμα	Μέση υδροδυναμική διάμετρος (nm)	PDI	ζ-δυναμικό (mV)	Απόδοση διεργασίας (%)	Απόδοση εγκλεισμού (%)
SLNs	265.2 ± 12.6	0.368 ± 0.05	-26.1 ± 1.0	49	79
Κενά SLNs	219.4 ± 18.9	0.398 ± 0.06	-22.8 ± 4.9	39	-
NLCs	260.0 ± 10.8	0.436 ± 0.04	-29.5 ± 1.0	52	84
Κενά NLCs	277.2 ± 9.6	0.459 ± 0.08	-28.6 ± 0.4	63	-

Παρατηρείται ότι τα παρασκευαζόμενα SLNs με εγκλεισμένη κουμαρινική ένωση παρουσίασαν μέση τιμή υδροδυναμικής διαμέτρου 265 nm και τιμή δείκτη πολυδιασποράς 0.368, ενδεικτική καλής ομοιομορφίας διασποράς για τα λιπιδικά νανοσυστήματα, ενώ η τιμή του ζ-δυναμικού υποδεικνύει πολύ καλή σταθερότητα διασποράς με τιμή -26.1 mV. Ακόμη παρουσίασαν ικανοποιητική απόδοση διεργασίας (49%) και υψηλή απόδοση εγκλεισμού (79%). Τα κενά SLNs παρουσίασαν χαμηλότερη τιμή υδροδυναμικής διαμέτρου (219 nm), παρόμοια τιμή PDI (0.398) και χαμηλότερες τιμές ζ-δυναμικού (-22.8 mV) και απόδοσης διεργασίας (39%).

Όσον αφορά τα NLCs με εγκλεισμένη ένωση, παρουσιάζουν παρόμοια χαρακτηριστικά με τα αντίστοιχα SLNs. Ειδικότερα, παρουσιάζουν υδροδυναμική διάμετρο 260 nm, τιμή δείκτη PDI ελαφρώς μεγαλύτερη, 0.398, εξαιρετική ομοιομορφία διασποράς (-29.5 mV), απόδοση διεργασίας 52% και απόδοση εγκλεισμού 84%. Τα κενά NLCs εμφάνισαν ελαφρώς αυξημένη τιμή

υδροδυναμικής διαμέτρου (277 nm), δείκτη PDI (0.459) και απόδοσης διεργασίας (63%) και επίσης εξαιρετική ομοιομορφία διασποράς (-28.6 mV).

Στη συνέχεια, παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της μεθόδου DLS καθώς και της απόδοσης διεργασίας και εγκλεισμού για τα παρασκευαζόμενα νιοσώματα στον Πίνακα 8.2.

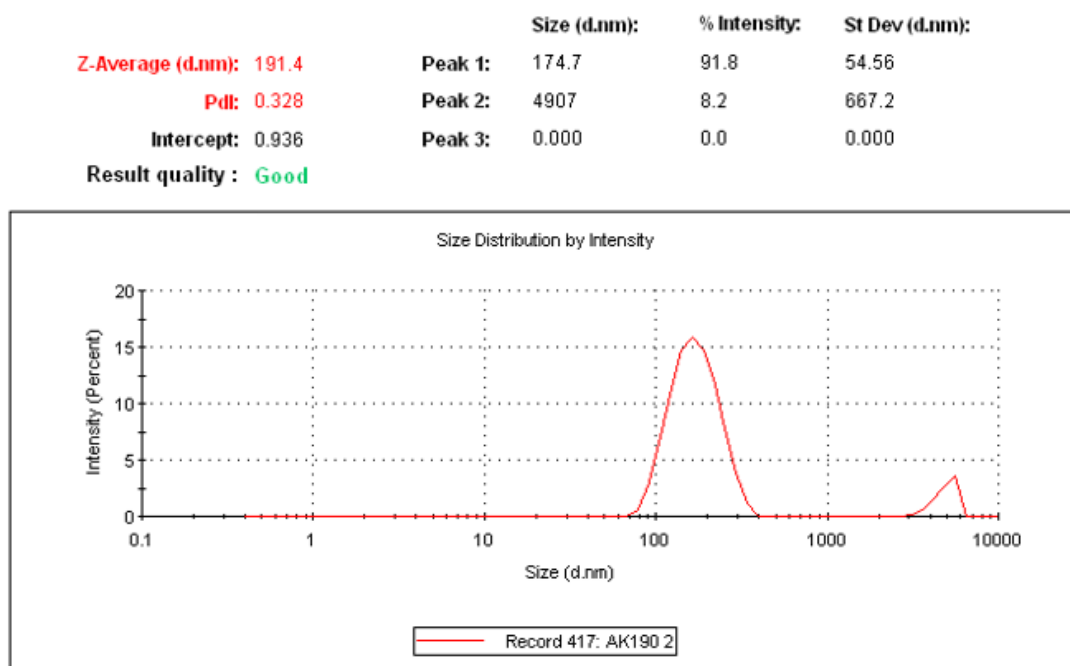
Πίνακας 8.2 Ποσότητες των συστατικών, μέση υδροδυναμική διάμετρος, δείκτης πολυδιασποράς (PDI), ζ-δυναμικό, απόδοση διεργασίας και απόδοση εγκλεισμού των παρασκευαζόμενων νιοσωμάτων.

Δείγμα	Αναλογία συστατικών	Μέση υδροδυναμική διάμετρος (nm)	PDI	ζ-δυναμικό (mV)	Απόδοση διεργασίας (%)	Απόδοση εγκλεισμού (%)
Νιοσώματα 1	Χοληστερόλη/Span 60/κουμαρίνη = 100:100:10 (w/w/w) σε 45 mL H ₂ O	310.5 ± 15.2	584.2 ± 0.08	-25.7 ± 1.1	47	35
Νιοσώματα 2	Χοληστερόλη/Span 60/κουμαρίνη = 100:200:10 (w/w/w) σε 45 mL H ₂ O	238.2 ± 13.8	0.507 ± 0.06	-28.1 ± 0.8	33	33
Νιοσώματα 3	Χοληστερόλη/Span 60/κουμαρίνη = 100:200:20 (w/w/w) σε 45 mL H ₂ O	430.9 ± 14.6	0.341 ± 0.05	-26.5 ± 0.05	46	45
Νιοσώματα 4	Χοληστερόλη/Span 60/Κουμαρίνη 100:200:20 (w/w/w) σε 10 mL H ₂ O	191.4 ± 9.7	0.296 ± 0.05	-34.9 ± 0.8	43	36
Κενά Νιοσώματα	Χοληστερόλη/Span 60 = 100:200 (w/w) σε 10 mL H ₂ O	241.9 ± 17.1	0.480 ± 0.05	-27.1 ± 0.9	48	-

Όσον αφορά τα παρασκευαζόμενα νιοσώματα, εξετάστηκαν διαφορετικές αναλογίες χοληστερόλης, Span 60 και κουμαρίνης σε διαφορετικές ποσότητες υδατικής φάσης. Αρχικά για τις δύο πρώτες εξεταζόμενες συνθήκες (νιοσώματα 1 & 2) παρατηρείται ότι σχηματίζονται νανοσωματίδια με χαμηλή ομοιομορφία διασποράς (PDI 0.5-0.6). Τα νιοσώματα που παρασκευάστηκαν χρησιμοποιώντας Χοληστερόλη/Span 60/κουμαρίνη = 100:200:20 (w/w/w) σε 45 mL H₂O (νιοσώματα 3) παρουσίασαν την υψηλότερη απόδοση εγκλεισμού (45%), αλλά μεγάλη τιμή υδροδυναμικής διαμέτρου νανοσωματιδίων (430 nm), ενώ τα νιοσώματα 4, τα οποία παρασκευάστηκαν με την ίδια αναλογία σε 10 mL H₂O παρουσίασαν τα βέλτιστα αποτελέσματα στη μέθοδο DLS. Πιο συγκεκριμένα, σχηματίστηκαν νανοσωματίδια υδροδυναμικής διαμέτρου 191 nm, με δείκτη PDI μόλις 0.296 και τιμή ζ-δυναμικού -34.9 mV, τα οποία είναι ενδεικτικά εξαιρετικά ομοιόμορφης και σταθερής διασποράς, αντίστοιχα και επομένως επιλέγονται ως βέλτιστα. Τα κενά

νισώματα που παρασκευάστηκαν με την ίδια μέθοδο εμφάνισαν αυξημένες τιμές μεγέθους (242 nm) και δείκτη PDI (0.48), καθώς και χαμηλότερη τιμή ζ-δυναμικού (-27.1 mV).

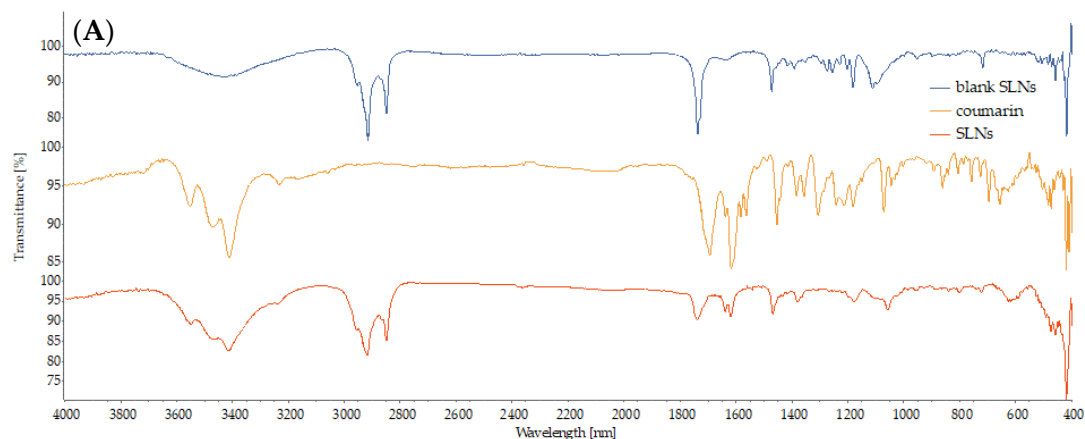
Ακολούθως, παρατίθεται ενδεικτικό διάγραμμα κατανομής μεγέθους για τα νισώματα που επέδειξαν τα βέλτιστα χαρακτηριστικά ως προς την υδροδυναμική διάμετρο και το δείκτη πολυδιασποράς (νισώματα 4) (Εικόνα 8.9).

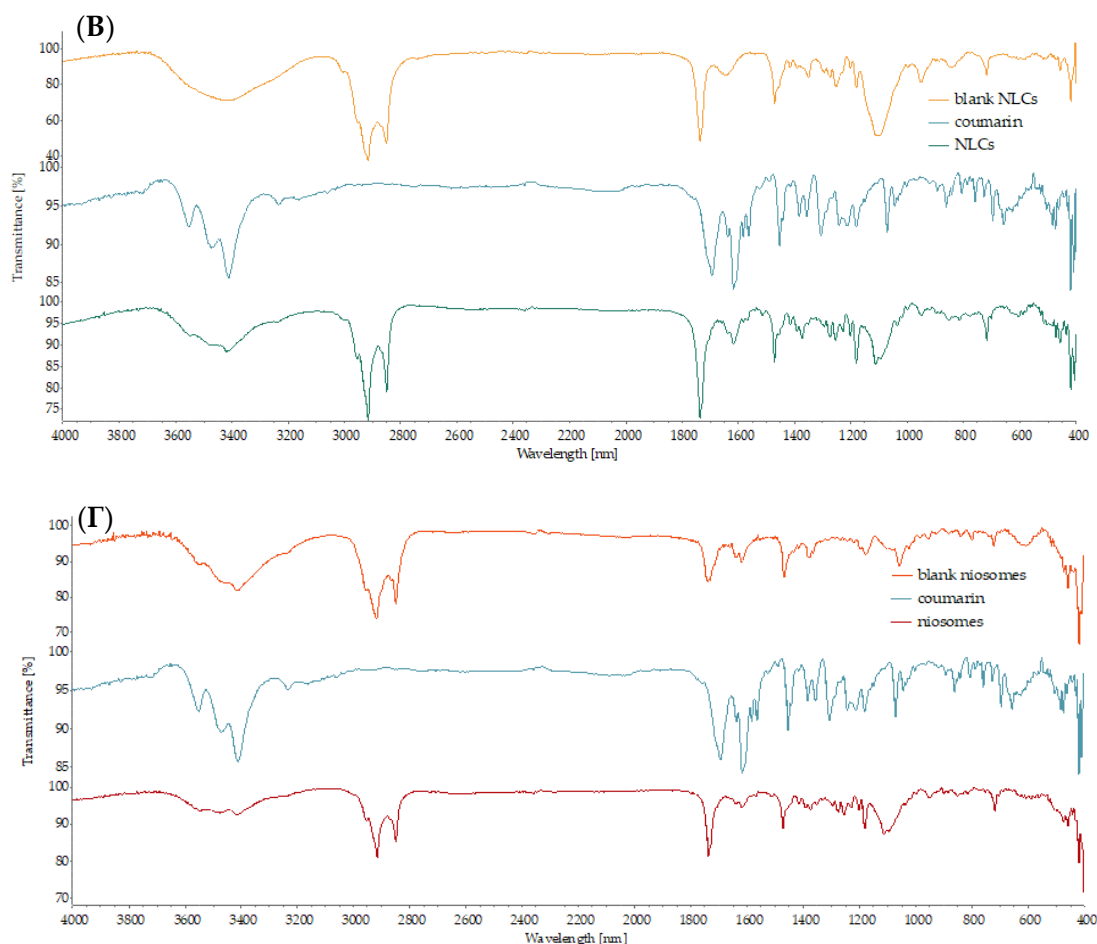


Εικόνα 8.9 Ενδεικτικό διάγραμμα κατανομής μεγέθους για τα βέλτιστα νισώματα σύμφωνα με τη μέθοδο DLS.

8.3.3 Φασματοσκοπία FT-IR

Τα φάσματα FT-IR του κουμαρινικού αναλόγου (**40**) σε ελεύθερη και εγκλεισμένη μορφή, καθώς και των κενών νανοσυστημάτων παρουσιάζονται στην Εικόνα 8.10, ενώ οι χαρακτηριστικές δονήσεις παρουσιάζονται στον Πίνακα 8.3.





Εικόνα 8.10 Συγκριτικά φάσματα FT-IR των: **(Α)**: κενών SLNs, κουμαρίνης, SLNs, **(Β)**: κενών NLCs, κουμαρίνης, NLCs και **(Γ)**: κενών νιοσωμάτων, κουμαρίνης, νιοσωμάτων.

Πίνακας 8.3 Χαρακτηριστικές δονήσεις του κουμαρινικού αναλόγου σε ελεύθερη και εγκλεισμένη μορφή, καθώς και των κενών νανοσυστημάτων.

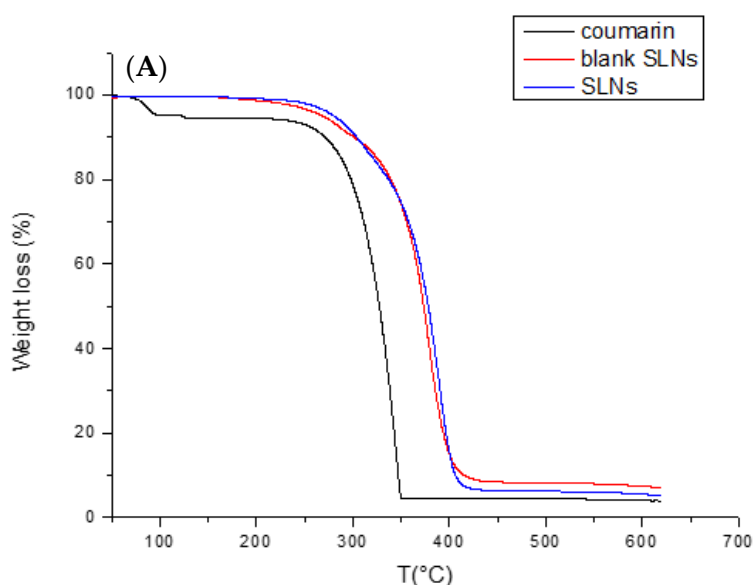
Δείγμα	Χαρακτηριστικές δονήσεις (cm ⁻¹)				
	Δόνηση τάσης O-H	Δόνηση τάσης C-H	Δόνηση τάσης C=O	Δόνηση κάμψης C-H	Δόνηση τάσης C-O
Κενά SLNs	3437	2916 2849	1737	1472	1182
Κενά NLCs	3415	2916 2850	1736	1471	1181
Κενά νιοσώματα	3544 3459 3413	2918 2849	1739	1468	1177
Κουμαρίνη (40)	3511 3471 3410	-	1694	-	1181
SLNs	3551 3470 3414	2919 2849	1739	1468	1179

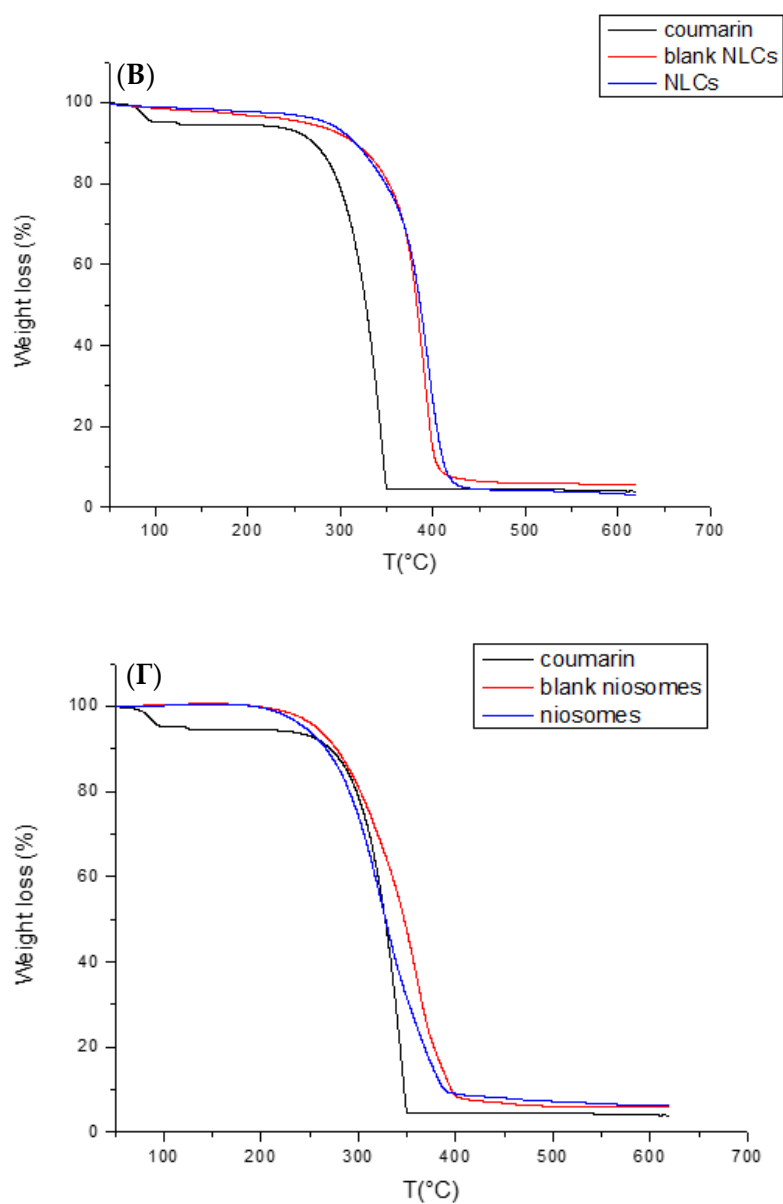
NLCs	3549	2915 2849	1736	1472	1181
	3468				
	3419				
Νιοσώματα	3554	2918 2849	1733	1472	1180
	3487				
	3411				

Χαρακτηριστικότερες κορυφές του φάσματος FT-IR του κουμαρινικού αναλόγου (40) αποτελούν οι δονήσεις τάσης O-H στα 3511, 3471 και 3410 cm^{-1} , η δόνηση τάσης του καρβονυλίου στα 1694 και η δόνηση τάσης C-O στα 1181 cm^{-1} . Στα φάσματα FT-IR των νανοσυστημάτων με εγκλεισμένη κουμαρίνη παρατηρούνται αρκετές κορυφές μεταξύ 1800-400 cm^{-1} που αποδίδονται στο κουμαρινικό ανάλογο, ενώ οι μικρές μετατοπίσεις των κυριότερων κορυφών σε σχέση με τα κενά νανοσωματίδια είναι επίσης ενδεικτικές των αλληλεπιδράσεων μεταξύ του κουμαρινικού αναλόγου και των λιπιδίων. Ακόμη, η παρουσία περισσότερων κορυφών στο εύρος 3600-3400 cm^{-1} στα φάσματα των SLNs και NLCs με εγκλεισμένη κουμαρίνη σε σχέση με τα κενά νανοσωματίδια, είναι ενδεικτικές της παρουσίας του κουμαρινικού αναλόγου και του επιτυχούς εγκλεισμού της ένωσης σε αυτά.

8.3.4 Θερμοσταθμική ανάλυση (TGA)

Η θερμοσταθμική ανάλυση (TGA) πραγματοποιήθηκε προκειμένου να διερευνηθεί η θερμική σταθερότητα των SLNs με τα γραφήματα να παρουσιάζονται στην Εικόνα 8.11 και τις θερμοκρασίες όπου παρουσιάζεται η μέγιστη απώλεια μάζας, καθώς και το οργανικό υπόλειμμα στους 600 °C να παρουσιάζονται στον Πίνακα 8.4.





Εικόνα 8.11 Συγκριτικά γραφήματα TG των: (Α): κενών SLNs, κουμαρίνης, SLNs, (Β): κενών NLCs, κουμαρίνης, NLCs και (Γ): κενών νιοσωμάτων, κουμαρίνης, νιοσωμάτων.

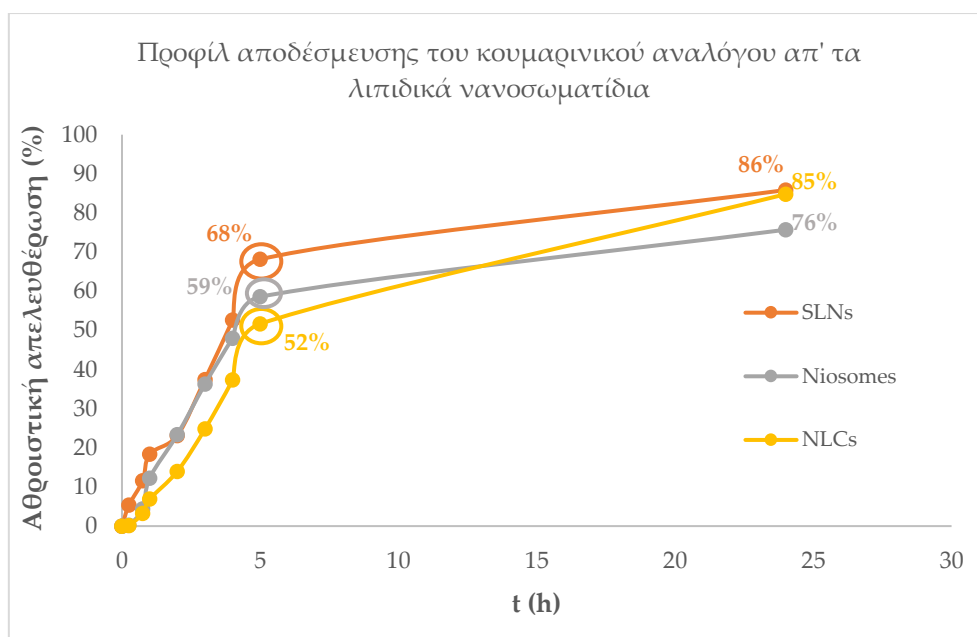
Πίνακας 8.4 Συγκριτικά αποτελέσματα θερμοσταθμικής ανάλυσης (TGA): **(Α)**: κενών SLNs, κουμαρίνης, SLNs, **(Β)**: κενών NLCs, κουμαρίνης, NLCs και **(Γ)**: κενών νιοσωμάτων, κουμαρίνης, νιοσωμάτων.

Δείγμα	Θερμοκρασία μέγιστης απώλειας μάζας (°C)	Οργανικό υπόλειμμα στους 600 °C (%)
Κενά SLNs	361	8
Κενά NLCs	372	6
Κενά νιοσώματα	335	6
Κουμαρίνη (40)	320	5
SLNs	366	6
NLCs	376	4
Νιοσώματα	317	7

Παρατηρείται ότι η μέγιστη απώλεια μάζας για τα SLNs και τα NLCs πραγματοποιείται στους 361-376 °C τόσο για τα κενά νανοσωματίδια όσα και για αυτά που περιέχουν εγκλεισμένη κουμαρίνη, θερμοκρασία υψηλότερη από αυτή του κουμαρινικού αναλόγου σε ελεύθερη μορφή (320 °C). Για τα νιοσώματα η θερμοκρασία μέγιστης απώλειας μάζας είναι 317 °C και 335 °C για τα νιοσώματα με εγκλεισμένη κουμαρίνη και τα κενά, αντίστοιχα. Επομένως, σε κάθε περίπτωση, το κουμαρινικό ανάλογο διατηρεί τη θερμική του σταθερότητα. Τέλος, το οργανικό υπόλειμμα στους 600 °C είναι χαμηλό, μεταξύ 4-8% σε κάθε εξεταζόμενο σύστημα.

8.3.5 Μελέτη αποδέσμευσης και κινητική μοντελοποίηση

Η μελέτη αποδέσμευσης των κουμαρινικών αναλόγων από τα λιπιδικά νανοσυστήματα πραγματοποιήθηκε στους 37 °C και σε pH 7.4 ώστε να προσομοιάζει τις φυσιολογικές συνθήκες του ανθρώπινου οργανισμού. Τα προφίλ αποδέσμευσης παρουσιάζονται στην Εικόνα 8.12, ενώ στη συνέχεια τα δεδομένα προσαρμόστηκαν σε τέσσερα διαφορετικά κινητικά μοντέλα (μηδενικής τάξης, πρώτης τάξης, Higuchi and Korsmeyer-Peppas) και τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στον Πίνακα 8.5 και στις Εικόνες 8.13 & 8.14.



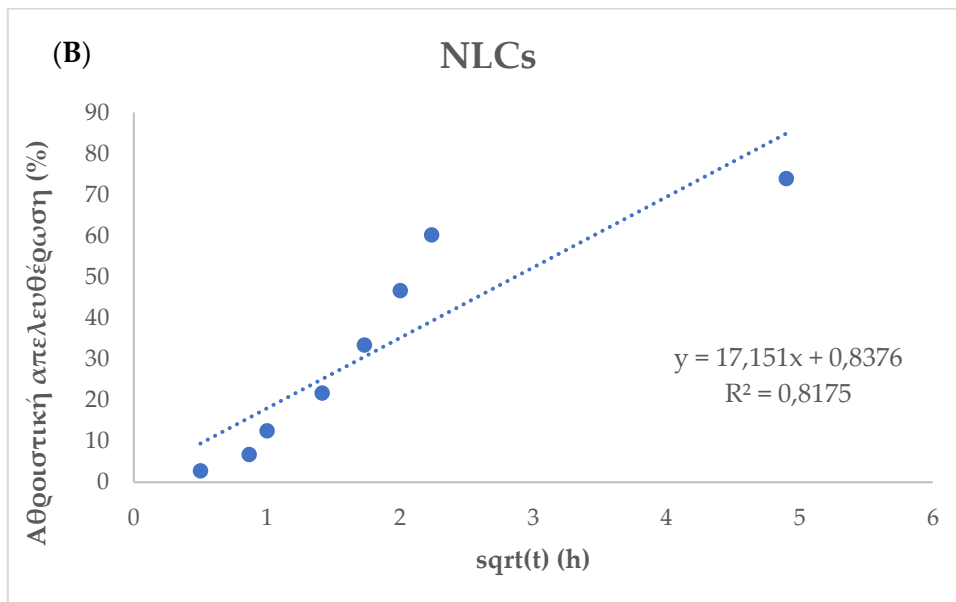
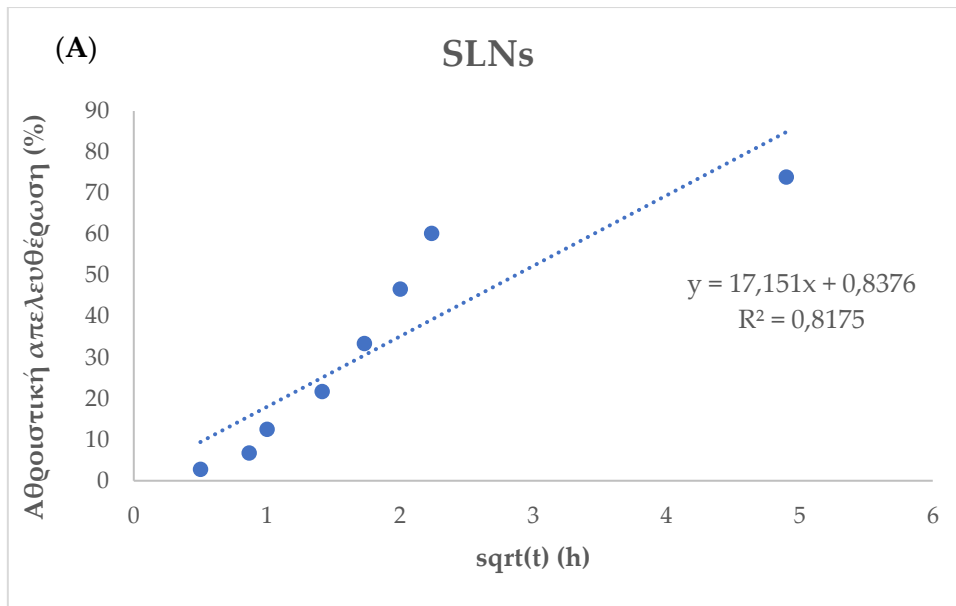
Εικόνα 8.12 Προφίλ αποδέσμευσης του κουμαρινικού αναλόγου από τα λιπιδικά νανοσυστήματα στους 37 °C και pH 7.4.

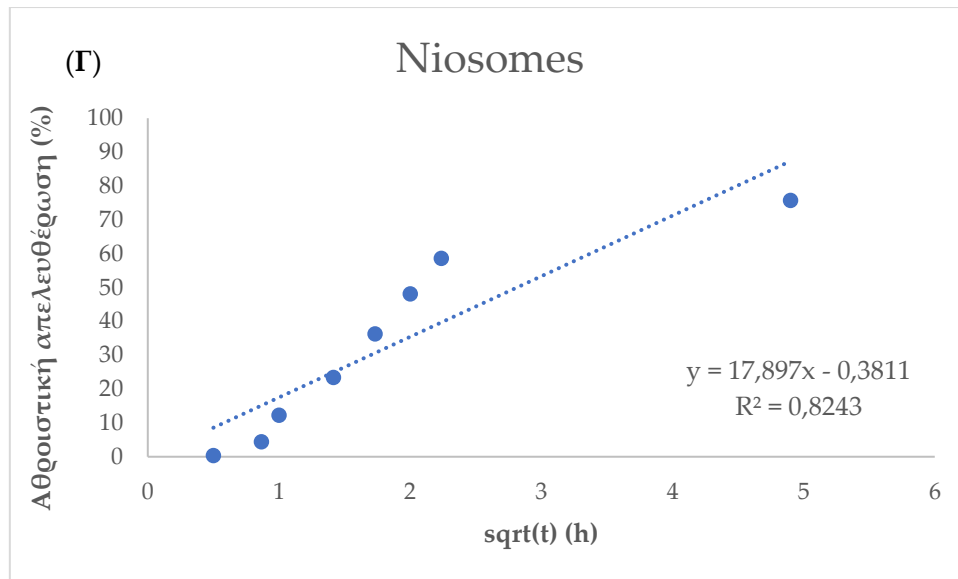
Η 7,8-διυδροξυ-4-φαινυλο-κουμαρίνη παρουσίασε παρόμοιο προφίλ απελευθέρωσης και από τα τρία διαφορετικά λιπιδικά νανοσυστήματα στα οποία εγκλειστήκε. Ειδικότερα, παρατηρείται ταχεία αποδέσμευση ("burst effect") του κουμαρινικού αναλόγου κατά τις πρώτες 5 h (50-70% περίπου), ενώ η ένωση συνεχίζει να απελευθερώνεται σταδιακά μέχρι τις 24 h. Πιο συγκεκριμένα, μεγαλύτερο ποσοστό απελευθέρωσης στις 5 h παρουσιάζουν τα SLNs (68%), ενώ η απελευθέρωση ολοκληρώνεται στις 24 h με ποσοστό 86%. Μικρότερο ποσοστό απελευθέρωσης στις 5 h παρουσιάστηκε για τα NLCs (52%), με την απελευθέρωση ωστόσο να ολοκληρώνεται επίσης στις 24 h με ποσοστό 85%, το οποίο επιδεικνύει περισσότερο σταδιακή αποδέσμευση της ένωσης από τα NLCs. Τέλος, η απελευθέρωση από τα νιοσώματα έφτασε ποσοστό 59% στις 5 h και 76% στις 24 h.

Τα δεδομένα από τα προφίλ απελευθέρωσης προσαρμόστηκαν στη συνέχεια στα κινητικά μοντέλα μηδενικής τάξης, πρώτης τάξης, Higuchi και Korsmeyer-Peppas, με τα αποτελέσματα να παρουσιάζονται στον Πίνακα 8.5, ενώ στις Εικόνες 8.13 & 8.14 παρουσιάζονται οι γραφικές παραστάσεις της προσαρμογής στα μοντέλα Higuchi και Korsmeyer-Peppas, αντίστοιχα.

Πίνακας 8.5 Αποτελέσματα κινητικής μοντελοποίησης.

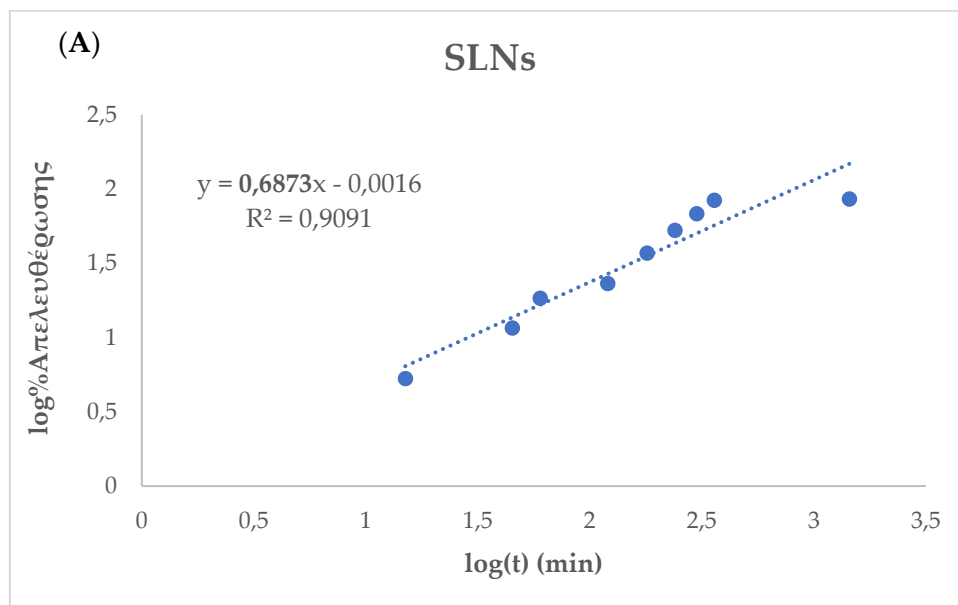
	Μηδενικής τάξης	Πρώτης τάξης	Higuchi	Korsmeyer-Peppas	Εξίσωση Higuchi	Εξίσωση Korsmeyer-Peppas
	R ²	R ²	R ²	R ²		
SLNs	0.5311	0.3824	0.7472	0.9091	$y=17.151x+0.8175$	$y=0.6873x+0.0016$
NLCs	0.6281	0.3758	0.8175	0.7378	$y=17.151x+0.8376$	$y=0.4791x+0.6419$
Νιοσώματα	0.6277	0.255	0.8243	0.901	$y=17.897x+0.3811$	$y=0.7868x+0.3494$

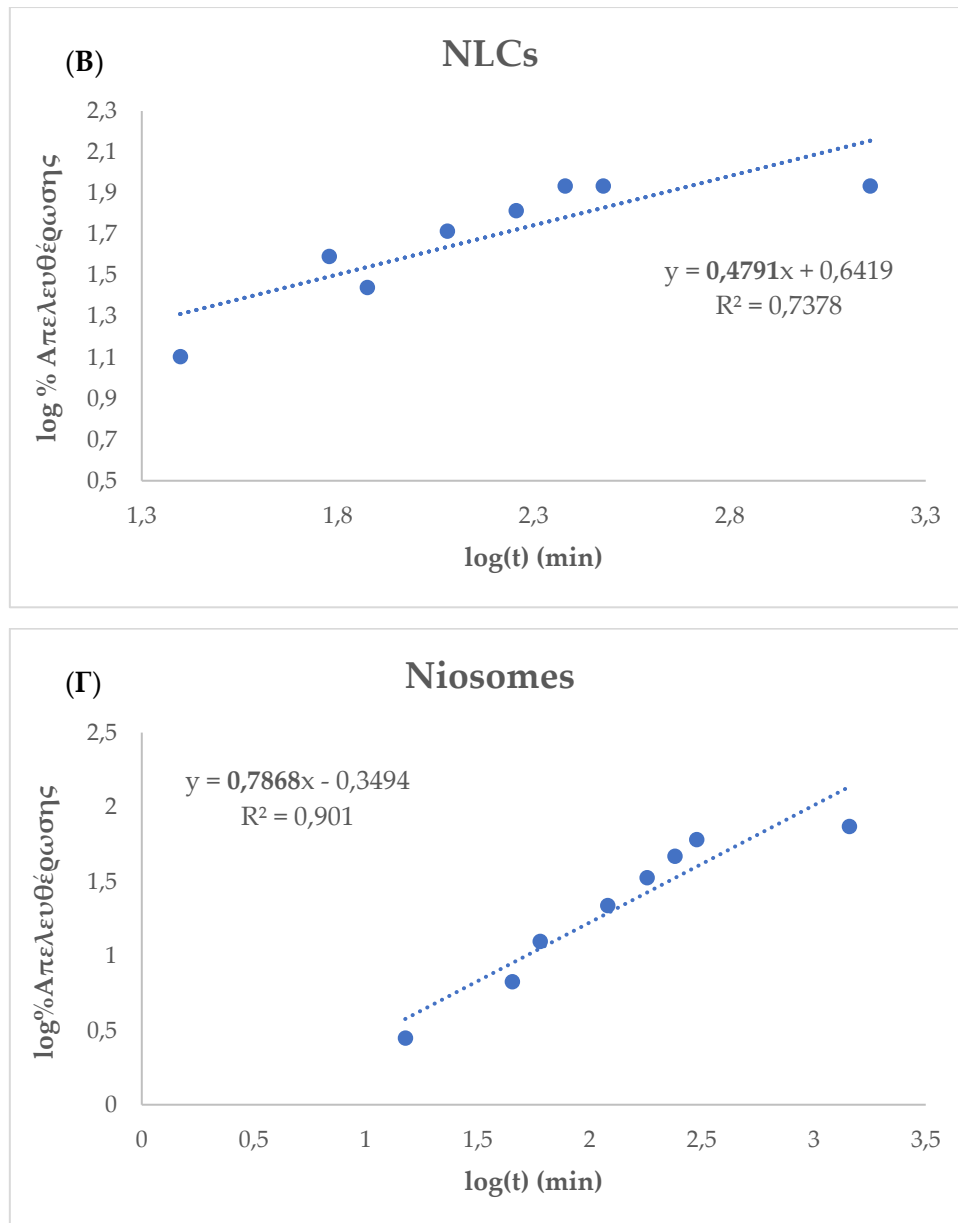




Εικόνα 8.13 Γραφική παράσταση του κινητικού μοντέλου Higuchi για τη μελέτη απελευθέρωσης της 7,8-διυδροξυ-4-φαινυλο-κουμαρίνης από τα: (Α): SLNs, (Β) NLCs και (Γ): νιοσώματα.

Από τα αποτελέσματα της κινητικής μοντελοποίησης και τις τιμές των συντελεστών προσδιορισμού (R^2) για κάθε κινητικό μοντέλο, παρατηρείται ότι και τα τρία προφίλ απελευθέρωσης παρουσιάζουν καλύτερη προσαρμογή στο μοντέλο Higuchi.





Εικόνα 8.14 Γραφική παράσταση του κινητικού μοντέλου Korsmeyer-Peppas για τη μελέτη απελευθέρωσης της 7,8-διυδροξυ-4-φαινυλο-κουμαρίνης από τα: (Α): SLNs, (Β): NLCs και (Γ): νιοσώματα.

Ακόμη, από το ημιεμπειρικό μοντέλο Korsmeyer-Peppas και την τιμή του εκθέτη διάχυσης συμπεραίνουμε ότι ο μηχανισμός απελευθέρωσης για τα συστήματα των SLNs και των νιοσωμάτων είναι η μη-ομαλή (μη-fickian) διάχυση ($n > 0.5$), ενώ για τα NLCs ο μηχανισμός είναι η ομαλή διάχυση κατά Fick ($n = 0.4791$), το οποίο συνάδει και με την παρατήρηση της περισσότερο σταδιακής απελευθέρωσης σε σχέση με τα SLNs.

8.3.6 Δέσμευση της ελεύθερης ρίζας DPPH

Τα αποτελέσματα της μελέτης αντιοξειδωτικής δράσης τόσο της 7,8-διυδροξυ-4-φαινυλο-κουμαρίνης (**40**) όσο και των λιπιδικών νανοσυστημάτων με εγκλεισμένη κουμαρίνη παρουσιάζονται στον Πίνακα 8.6.

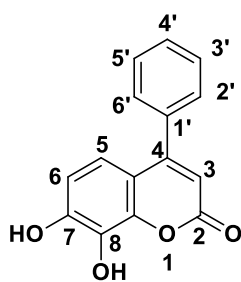
Πίνακας 8.6 Ικανότητα δέσμευσης της ελεύθερης ρίζας DPPH.

Δείγμα	Δέσμευση DPPH 30 min IC ₅₀ (μM)	Δέσμευση DPPH 60 min IC ₅₀ (μM)
Κουμαρίνη (40)	20.1 ± 0.3	12.7 ± 0.7
SLNs	26.8 ± 1.4	15.7 ± 1.0
NLCs	23.8 ± 2.5	13.2 ± 0.8
Νιοσώματα	30.2 ± 0.5	19.7 ± 0.8
Trolox	17.1 ± 0.5	9.6 ± 0.7

Παρατηρείται ότι η 7,8-διυδροξυ-4-φαινυλο-κουμαρίνη (**40**) παρουσιάζει αξιόλογη ικανότητα δέσμευσης της ελεύθερης ρίζας DPPH με τιμές IC₅₀ 20.1 και 12.7 μM, στα 30 και 60 min, αντίστοιχα, λόγω του κατεχολικού συστήματος που διαθέτει. Όσον αφορά την αντιοξειδωτική δράση των λιπιδικών νανοσυστημάτων, οι νανοδομημένοι λιπιδικοί φορείς (NLCs) παρουσίασαν την ισχυρότερη δράση με τιμές IC₅₀ 23.8 και 13.2 μM, στα 30 και 60 min, αντίστοιχα, οι οποίες προσεγγίζουν την αντιοξειδωτική δράση του κουμαρινικού αναλόγου σε ελεύθερη μορφή. Ακολουθούν τα νανοσωματίδια στερεών λιπιδίων (SLNs), τα οποία παρουσίασαν εξίσου ικανοποιητική ικανότητα δέσμευσης της ρίζας DPPH, με τιμές IC₅₀ 26.8 και 15.7 μM, ενώ τα νιοσώματα παρουσίασαν τη χαμηλότερη δράση (IC₅₀ 26.8 και 15.7 μM). Είναι σημαντικό να αναφερθεί ότι για τη μελέτη της αντιοξειδωτικής δράσης της καθαρής ένωσης χρησιμοποιήθηκε το διμεθυλοσουλφοξείδιο (DMSO) ως διαλύτης, όπως και στην περίπτωση της διασποράς των νιοσωμάτων, ενώ τα SLNs και τα NLCs μελετήθηκαν υπό τη μορφή υδατικής διασποράς. Η αύξηση της υδατοδιαλυτότητας της ένωσης μέσω του εγκλωβισμού της σε κατάλληλο φορέα, καθώς και η διατήρηση της δράσης της σε υδατικό μέσο αποτελούν βασικούς στόχους της τεχνολογίας του εγκλεισμού βιοδραστικών ενώσεων και η επίτευξή τους αποτελεί ορόσημο της συγκεκριμένης μελέτης.

8.4 ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

8.4.1 Σύνθεση της 7,8-διυδροξυ-4-φαινυλο-κουμαρίνης (40)



Σε σφαιρική φιάλη προστίθενται 4.11 mmol πυρογαλλόλης (518.7 mg) και 4.11 mmol βενζοϋλοξικού αιθυλεστέρα (709 μ L) σε 1 mL τριφθοροξικού οξέος (CF_3COOH) υπό ψύξη. Στη συνέχεια, το μίγμα της αντίδρασης θερμαίνεται υπό ανάδευση σε ελαιόλουτρο στους 75 $^\circ\text{C}$ για 24 h. Η εξέλιξη της αντίδρασης παρακολουθείται μέσω χρωματογραφίας λεπτής στιβάδας (TLC) σε σύστημα διαλυτών πετρελαϊκός αιθέρας (PE)/οξικός αιθυλεστέρας (EtOAc) = 70 : 30. Το προϊόν λαμβάνεται έπειτα από απόχυση σε πάγο και διήθηση υπό κενό. Ακολουθεί ανακρυστάλλωση με κατάλληλη ποσότητα μεθανόλης και διχλωρομεθανίου και παραλαμβάνεται στερεό καφέ χρώματος.

Απόδοση: 70%, **Σ.Τ.:** 188-189 $^\circ\text{C}$ (**Σ.Τ. βιβλιογραφίας:** 194-197 $^\circ\text{C}$) [53]

$^1\text{H NMR}$ (600 MHz, DMSO-d_6): δ (ppm) 10.19 (s, 1H, OH), 9.42 (s, 1H, OH), 7.55-7.50 (m, 5H, H-2', H-3', H-4', H-5', H-6'), 6.79 (d, $J = 8.4$ Hz, 1H, H-5), 6.76 (d, $J = 9.0$ Hz, 1H, H-6), 6.13 (s, 1H, H-3)

8.4.2 Παρασκευή των νανοσυστημάτων

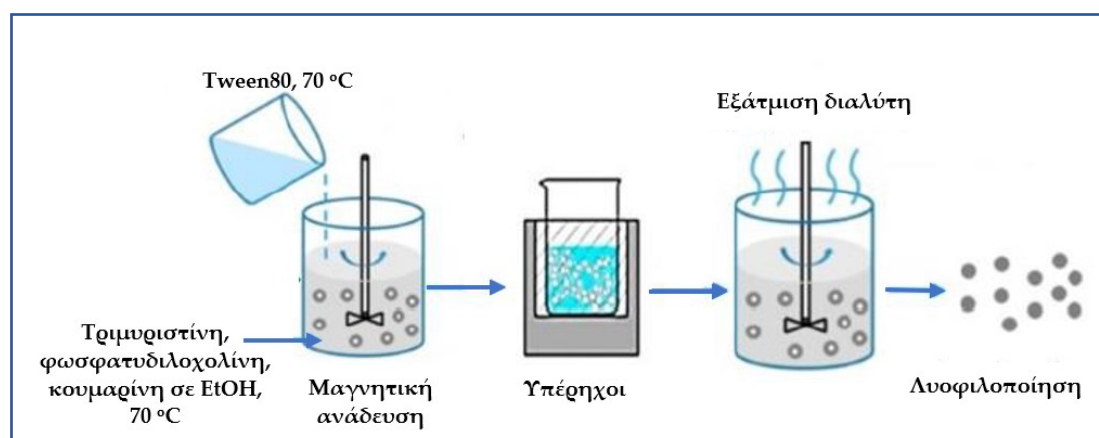
Η παρασκευή των λιπιδικών νανοσυστημάτων (SLNs, NLCs, νιοσώματα) πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο γαλακτωματοποίησης-εξάτμισης του διαλύτη σε συνδυασμό με υπερήχους.

8.4.2.1 Παρασκευή των νανοσωματιδίων στερεών λιπιδίων (SLNs)

Τα SLNs παρασκευάστηκαν με τη μέθοδο γαλακτωματοποίησης-εξάτμισης του διαλύτη σε συνδυασμό με υπερήχους, χρησιμοποιώντας την τριμυριστίνη ως λιπίδιο, το Tween 80 και τη φωσφατιδυλοχολίνη ως γαλακτωματοποιητές. Για την παρασκευή των SLNs, σε σφαιρική φιάλη προστίθενται 200 mg τριμυριστίνης, τα οποία τήκονται στους 70 $^\circ\text{C}$. Στη συνέχεια προστίθενται 20 mg της 7,8-διυδροξυ-4-φαινυλο-κουμαρίνης, καθώς και 50 mg φωσφατιδυλοχολίνης, τα οποία διαλύονται σε αιθανόλη. Μόλις διαλυθούν πλήρως, ακολουθεί η προσθήκη της θερμής υδατικής φάσης (10 mL), η οποία περιέχει 10% w/v Polysorbate 80 και έχει προθερμανθεί στους 70 $^\circ\text{C}$. Ύστερα από την προσθήκη της θερμής υδατικής φάσης, το διάλυμα αφήνεται υπό έντονη ανάδευση για μία ώρα.

Η προκύπτουσα υδατική διασπορά οδηγείται προς υπερήχηση για 5 min σε 120 W (Vibra Cell probe sonicator (400 W), Sonics & Materials Inc. Company) και στη συνέχεια αφήνεται υπό ανάδευση για εικοσιτέσσερις h στα 80 rpm και σε θερμοκρασία 30 $^\circ\text{C}$ σε συσκευή Shaker (Temperature Controlled Shaker Gallenkamp), προκειμένου να γίνει ήπια και πλήρης εξάτμιση του οργανικού διαλύτη (Σχήμα 8.3).

Για την παρασκευή των νανοσωματιδίων στερεών λιπιδίων χωρίς βιοδραστική ένωση (blank-SLNs) ακολουθείται η ίδια διαδικασία χωρίς την προσθήκη του κουμαρινικού αναλόγου.



Σχήμα 8.3 Μέθοδος σχηματισμού των SLNs.

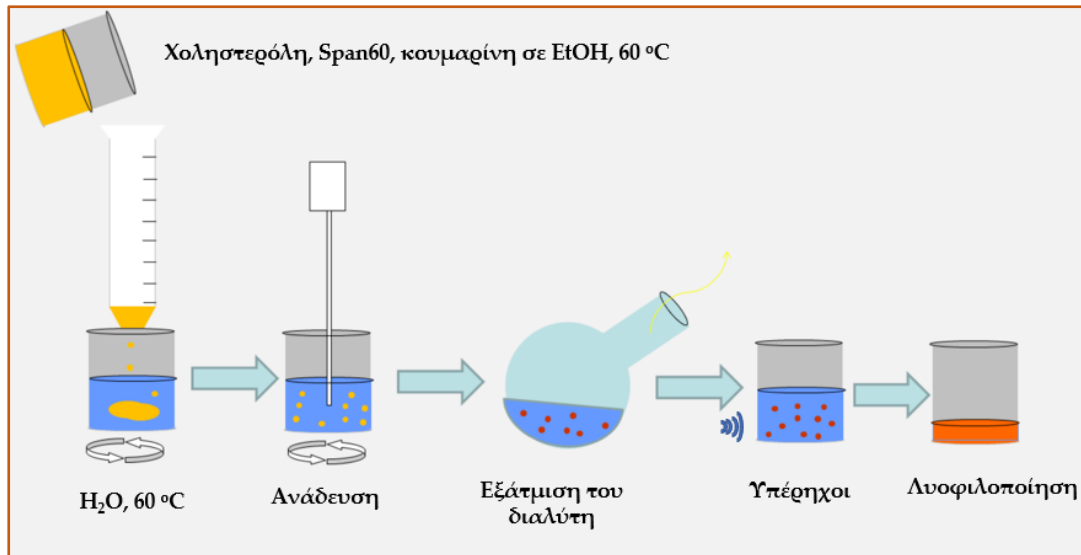
8.4.2.2 Παρασκευή των νανοδομημένων λιπιδικών φορέων (NLCs)

Για τη σύνθεση των NLCs ακολουθήθηκε η πειραματική διαδικασία της σύνθεσης των SLNs, όπως περιγράφεται στην παράγραφο 8.4.2.1, με τη λιπιδική φάση (200 mg) ωστόσο να αποτελείται τόσο από τριμυριστίνη (στερεό λιπίδιο) όσο και από αμυγδαλέλαιο (υγρό λιπίδιο) σε διαφορετικές αναλογίες, είτε 140:60 είτε 170:30 (w/w).

8.4.2.3 Παρασκευή των νιοσωμάτων

Για την παρασκευή των νιοσωμάτων (Σχήμα 8.4), σε σφαιρική φιάλη προστίθεται κατάλληλη ποσότητα υπερκάθαρου νερού και αφήνεται προς θέρμανση στους 60 °C. Ακολουθεί στάγδην προσθήκη αιθανολικού διαλύματος χοληστερόλης (100 mg) και επιφανειοδραστικού παράγοντα Span 60 καθώς και κατάλληλης ποσότητας της κουμαρίνης. Με την ολοκλήρωση προσθήκης, το γαλάκτωμα τίθεται σε έντονη ανάδευση για μία ώρα, ενώ στη συνέχεια η διασπορά αφήνεται προς εξάτμιση του διαλύτη σε συσκευή Shaker στους 30 °C στα 80 rpm για μία ημέρα. Τέλος, εφαρμόστηκαν υπέρηχοι για χρονικό διάστημα 5 λεπτών (120 Watt).

Πιο συγκεκριμένα, εξετάστηκαν οι εξής αναλογίες: Χοληστερόλη/Span 60/κουμαρίνη = 100:100:10 (w/w/w) σε υδατική φάση των 45 mL (νιοσώματα 1), Χοληστερόλη/Span 60/κουμαρίνη = 100:200:10 (w/w/w) σε υδατική φάση των 45 mL (νιοσώματα 2), Χοληστερόλη/Span 60/κουμαρίνη = 100:200:20 (w/w/w) σε υδατική φάση των 10mL (νιοσώματα 3), καθώς και σε υδατική φάση των 10 mL (νιοσώματα 4).



Σχήμα 8.4 Μέθοδος σχηματισμού των νιοσωμάτων.

8.4.3 Απόδοση διεργασίας

Η υδατική διασπορά των λιπιδικών νανοσυστημάτων φυγοκεντρείται (SORVALL LYNX 6000, Thermo Scientific) στα 4.000 rpm για 20 min και στους 15 °C, απ' όπου παραλαμβάνονται τα νανοσωματίδια ως το υπερκείμενο φυγοκέντρωσης, το οποίο στη συνέχεια οδηγείται προς λυοφιλοποίηση (Frozen In Time Lablyo Mini) και παραλαμβάνεται υπόλευκο στερεό αφράτης υφής. Η απόδοση διεργασίας υπολογίζεται από την ακόλουθη εξίσωση (8.1):

$$\text{Απόδοση διεργασίας (\%)} = \frac{\text{ξηρή μάζα νανοσωματιδίων}}{\text{αρχική μάζα όλων των συστατικών}} \times 100 \quad (8.1)$$

8.4.4 Απόδοση εγκλεισμού

Για τον προσδιορισμό της ποσότητας της ένωσης που εγκλείστηκε στα νανοσωματίδια στερεών λιπιδίων, χρησιμοποιήθηκε η φασματοφωτομετρία υπεριώδους-ορατού (V-770 UV-VIS, Jasco).

Η υδατική διασπορά των λιπιδικών νανοσυστημάτων φυγοκεντρείται (SORVALL LYNX 6000, Thermo Scientific) στα 4.000 rpm για 20 min και στους 15 °C, απ' όπου παραλαμβάνονται τα νανοσωματίδια ως το υπερκείμενο φυγοκέντρωσης. Το ίζημα της φυγοκέντρωσης, το οποίο αποτελείται από την ένωση που δεν εγκλείστηκε καθώς και μικρή ποσότητα των υπόλοιπων συστατικών, διαλύεται σε σύστημα διαλυτών διχλωρομεθανίου / μεθανόλης = 1:1 και λαμβάνεται το φάσμα απορρόφησης σε εύρος 200-500 nm με χρήση κυψελίδας χαλαζία.

Από την τιμή της απορρόφησης που προκύπτει, η οποία αντιστοιχεί στην ποσότητα της ένωσης που δεν εγκλείστηκε, και μέσω της πρότυπης καμπύλης

αναφοράς της ένωσης, προσδιορίζεται τελικά η ποσότητα της ένωσης που εγκλείστηκε στα νανοσωματίδια με βάση την εξίσωση (8.2):

$$\text{Απόδοση εγκλεισμού (\%)} = 1 - \frac{\text{μάζα ουσίας που δεν εγκλείστηκε (mg)}}{\text{αρχική μάζα ένωσης (mg)}} \times 100 \quad (8.2)$$

8.4.5 Μέση υδροδυναμική διάμετρος, δείκτης πολυδιασποράς (PDI) και ζ-δυναμικό

Τα νανοσωματίδια χαρακτηρίστηκαν ως προς τη μέση υδροδυναμική διάμετρο και το δείκτη πολυδιασποράς τους μέσω της μεθόδου δυναμικής σκέδασης φωτός (DLS) και ως προς το ζ-δυναμικό μέσω ηλεκτροφόρησης με χρήση του οργάνου Zetasizer Nano ZS, Malvern. Οι υδατικές διασπορές εισάγονται σε τριχοειδείς κυψελίδες τύπου U (DTS 1070, Malvern, UK) και οι μετρήσεις πραγματοποιούνται σε θερμοκρασία 25 °C σε υπερκάθαρο νερό (pH 7.0). Οι τιμές για το κάθε μέγεθος προκύπτουν ως ο μέσος όρος τριών τιμών.

8.4.6 Μελέτη Υπέρουθρης Φασματομετρίας (FT-IR)

Τα νανοσωματίδια στερεών λιπιδίων (blank SLNs, DHC-SLNs, DAPH-SLNs), η τριμυριστίνη και τα κουμαρινικά ανάλογα (DHC και DAPH) μελετήθηκαν με χρήση φασματοσκοπίας υπερέυθρου (FT-IR). Για τη λήψη των φασμάτων παρασκευάστηκαν ταμπλέτες βρωμιούχου καλίου (KBr) με ανάμειξη της εξεταζόμενης ουσίας και του KBr σε αναλογία περίπου 1:100. Τα φάσματα καταγράφηκαν με το όργανο FT-IR-4200 (Jasco) στο εύρος 500–4000 cm⁻¹.

8.4.7 Θερμοσταθμική ανάλυση (TGA)

Η θερμική συμπεριφορά των παρασκευαζόμενων SLNs, της τριμυριστίνης και των κουμαρινικών αναλόγων μελετήθηκε με τη χρήση της μεθόδου θερμοσταθμικής ανάλυσης (TGA) με το όργανο TGA/DSC 1 STARe System thermobalance, Mettler Toledo company. Τα δείγματα θερμαίνονται από τους 25 °C μέχρι τους 600 °C με ρυθμό θέρμανσης 10 °C/min και ροής αζώτου 10 mL/min.

8.4.8 Μελέτη αποδέσμευσης των κουμαρινικών αναλόγων από τα SLNs και κινητική μοντελοποίηση

Για τη μελέτη της αποδέσμευσης της 7,8-διυδροξυ-4-φαινυλο-κουμαρίνης από τα λιπιδικά νανοσωματίδια, κατάλληλος όγκος υδατικής διασποράς των νανοσωματιδίων ώστε να περιέχει 4 mg ένωσης, προστίθεται σε μεμβράνη διάλυσης κυτταρίνης, με μοριακό βάρος αποκοπής (Molecular Weight Cut-off (MWCO) 12000-14000, η οποία εμβαπτίζεται σε 125 mL ρυθμιστικού διαλύματος pH 7.4 στους 37 °C.

Σε προκαθορισμένα χρονικά διαστήματα, λαμβάνονται δείγματα 2 mL από το διάλυμα, φιλτράρονται και αναλύονται με φασματοφωτομετρία υπεριώδους ορατού (UV-Vis), έτσι ώστε να υπολογιστεί η ποσότητα της ένωσης που απελευθερώθηκε σε συνάρτηση με το χρόνο, μετρώντας την απορρόφηση. Κάθε χρονική στιγμή που αφαιρούνταν 2 mL δείγματος από το σύστημα, επιστρέφονταν 2 mL ρυθμιστικού διαλύματος. Τέλος, τα δεδομένα απ' τις μελέτες απελευθέρωσης προσαρμόστηκαν σε διαφορετικά κινητικά μοντέλα.

8.4.9 Δέσμευση της ελεύθερης ρίζας DPPH

Αρχικά, παρασκευάζεται διάλυμα DPPH (0.025 mg/mL) σε αιθανόλη, το οποίο αφήνεται υπό μαγνητική ανάδευση για 20 min απουσία φωτός. Σε κάθε πηγάδι ενός πλακιδίου 96 θέσεων (96 well plate) προστίθενται 195 μ L DPPH καθώς και 5 μ L από διαφορετικές συγκεντρώσεις κάθε δείγματος. Συγκεκριμένα, η αξιολόγηση της αντιοξειδωτικής δράσης πραγματοποιήθηκε τόσο για την καθαρή ένωση και τα νιοσώματα σε DMSO, όσο και για τα SLNs και τα NLCs με τη μορφή υδατικής διασποράς. Επίσης, παρασκευάζονται δείγματα control τα οποία περιέχουν κατάλληλο διαλύτη αντί για κουμαρινική ένωση ή διασπορά νανοσωματιδίων.

Το plate αναδεύεται ελαφρώς και αφήνεται σε σκοτάδι. Με τη χρήση της συσκευής Epoch 2 Microplate Reader της εταιρείας Bio Tek Instruments, λαμβάνεται η τιμή της απορρόφησης στα 515 nm στα 30 min και 60 min και εξετάζεται ως προς τα control. Η %δέσμευση της ελεύθερης ρίζας DPPH υπολογίζεται από την εξίσωση (8.3):

$$(\%) \text{ Δέσμευση} = \frac{A_{\text{control}} - A_{\text{sample}}}{A_{\text{control}}} \times 100 \quad (8.3)$$

8.5 ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Στην παρούσα μελέτη πραγματοποιήθηκε η σύνθεση της 7,8-διυδροξυ-4-φαινυλοκουμαρίνης (**40**) μέσω συμπύκνωσης Pechmann, η οποία στη συνέχεια εγκλειστήκε σε τρεις διαφορετικούς λιπιδικούς φορείς: νανοσωματίδια στερεών λιπιδίων (SLNs), νανοδομημένους λιπιδικούς φορείς (NLCs) και νιοσώματα. Για την παρασκευή των SLNs, ακολουθήθηκε η μέθοδος που αναπτύχθηκε στο Κεφάλαιο 7, χρησιμοποιώντας την αναλογία τριμυριστίνη/Tween 80/φωσφατιδυλοχολίνη = 200:100:50 (w/w/w), ενώ για τα NLCs η ποσότητα του λιπιδικού φορέα διατηρήθηκε μεν σταθερή (200 mg), αλλά διαμοιράστηκε μεταξύ στερεού λιπιδίου (τριμυριστίνη – 170 mg) και υγρού λιπιδίου (αμυγδαλέλαιο – 30 mg). Οι αποδόσεις εγκλεισμού βρέθηκαν 79% και 84%, για τα δύο συστήματα, αντίστοιχα. Τέλος, για τα νιοσώματα εξετάστηκαν αρκετές διαφορετικές αναλογίες ενώ βέλτιστη βρέθηκε η αναλογία Χοληστερόλη/Span 60/κουμαρίνη = 100:200:20 (w/w/w) σε υδατική φάση των 10 mL, με απόδοση εγκλεισμού 30%.

Τα λιπιδικά νανοσυστήματα εξετάστηκαν ως προς την υδροδυναμική διάμετρο, το δείκτη πολυδιασποράς και το ζ-δυναμικό, με τα SLNs και τα NLCs να παρουσιάζουν μέγεθος που κυμαίνεται από 240 έως 265 nm, τιμές PDI μεταξύ 0.33-0.44, οι οποίες επιδεικνύουν καλή ομοιομορφία διασποράς και εξαιρετική σταθερότητα με τιμές ζ-δυναμικού μεταξύ -26 και -29 mV. Η βέλτιστη αναλογία νιοσώματων παρουσίασε μέση τιμή υδροδυναμικής διαμέτρου 191 nm, τιμή δείκτη PDI 0.30 και ζ-δυναμικό -34.9 mV. Στη συνέχεια, τόσο η ελεύθερη κουμαρίνη όσο και τα λιπιδικά νανοσυστήματα (κενά ή με εγκλωβισμένη κουμαρίνη) χαρακτηρίστηκαν μέσω φασματοσκοπίας FT-IR, η οποία υπέδειξε αλληλεπιδράσεις μεταξύ του κουμαρινικού αναλόγου και των φορέων ως ένδειξη του επιτυχούς εγκλεισμού της. Ακολούθησε η μελέτη θερμοσταθμικής ανάλυσης (TGA) των λιπιδικών νανοσυστημάτων, με τα SLNs, τα NLCs και τα νιοσώματα να παρουσιάζουν θερμοκρασία μέγιστης απώλειας μάζας 366, 375 και 316 °C αντιστοίχως, διατηρώντας τη θερμοκή σταθερότητα της κουμαρινικής ένωσης (320 °C) έπειτα από τον εγκλεισμό της.

Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκε η μελέτη αποδέσμευσης της κουμαρινικής ένωσης από το κάθε λιπιδικό σύστημα στους 37 °C και σε pH 7.4. Παρατηρήθηκε ταχεία απελευθέρωση της ένωσης στις πρώτες 5 h (52-68%), η οποία ολοκληρώθηκε στις 24 h (76-86%), ενώ όλα τα προφίλ απελευθέρωσης προσαρμόζονται καλύτερα στο μοντέλο κινητικής απελευθέρωσης Higuchi. Τέλος, ο μηχανισμός απελευθέρωσης της ένωσης από τα SLNs και τα νιοσώματα είναι η μη-ομαλή διάχυση, ενώ για τα NLCs η διάχυση κατά Fick όπως υπέδειξε το ημι-εμπειρικό μοντέλο Korsmeyer-Peppas.

Ακόμη, πραγματοποιήθηκε η μελέτη της αντιοξειδωτικής δράσης του κουμαρινικού αναλόγου σε ελεύθερη και εγκλεισμένη μορφή μέσω της ικανότητας δέσμευσης της ελεύθερης ρίζας DPPH. Η 7,8-διυδροξυ-4-φαινυλοκουμαρίνη (**40**) παρουσίασε τιμή IC₅₀ 12.7 μM στα 60 min, ενώ τα SLNs, NLCs και νιοσώματα της **40** παρουσίασαν τιμές IC₅₀ 15.7 μM, 13.2 μM και 19.7 μM, αντίστοιχα. Συνεπώς, τα NLCs φαίνεται να αποτελούν το βέλτιστο λιπιδικό νανοφορέα για τον εγκλωβισμό της 7,8-διυδροξυ-4-φαινυλοκουμαρίνης, καθώς

παρουσίασαν την υψηλότερη απόδοση εγκλεισμού (84%), ενώ διατήρησαν καλύτερα και την αντιοξειδωτική δράση του κουμαρινικού αναλόγου, με τη μορφή μάλιστα υδατικής διασποράς.

8.6 ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- [1] I. Chauhan, M. Yasir, M. Verma, A.P. Singh, Nanostructured Lipid Carriers: A Groundbreaking Approach for Transdermal Drug Delivery, *Adv. Pharm. Bull.* 10 (2020) 150. <https://doi.org/10.34172/APB.2020.021>.
- [2] R. Varela-Fernández, X. García-Otero, V. Díaz-Tomé, U. Regueiro, M. López-López, M. González-Barcia, M. Isabel Lema, F. Javier Otero-Espinar, Lactoferrin-loaded nanostructured lipid carriers (NLCs) as a new formulation for optimized ocular drug delivery, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 172 (2022) 144–156. <https://doi.org/10.1016/J.EJPB.2022.02.010>.
- [3] V.K. Rapalli, V. Kaul, T. Waghule, S. Gorantla, S. Sharma, A. Roy, S.K. Dubey, G. Singhvi, Curcumin loaded nanostructured lipid carriers for enhanced skin retained topical delivery: optimization, scale-up, in-vitro characterization and assessment of ex-vivo skin deposition, *Eur. J. Pharm. Sci.* 152 (2020) 105438. <https://doi.org/10.1016/J.EJPS.2020.105438>.
- [4] R.H. Müller, U. Alexiev, P. Sinambela, C.M. Keck, Nanostructured lipid carriers (NLC): The second generation of solid lipid nanoparticles, in: *Percutaneous Penetration Enhanc. Chem. Methods Penetration Enhanc. Nanocarriers*, Springer Berlin Heidelberg, 2016 161–185. https://doi.org/10.1007/978-3-662-47862-2_11.
- [5] J. Garg, K. Pathania, S.P. Sah, S. V. Pawar, Nanostructured lipid carriers: a promising drug carrier for targeting brain tumours, *Futur. J. Pharm. Sci.* 8 (2022) 1–31. <https://doi.org/10.1186/S43094-022-00414-8>.
- [6] M. Elmowafy, M.M. Al-Sanea, Nanostructured lipid carriers (NLCs) as drug delivery platform: Advances in formulation and delivery strategies, *Saudi Pharm. J.* 29 (2021) 999–1012. <https://doi.org/10.1016/J.JSPS.2021.07.015>.
- [7] A. Katopodi, A. Detsi, Solid Lipid Nanoparticles and Nanostructured Lipid Carriers of natural products as promising systems for their bioactivity enhancement: The case of essential oils and flavonoids, *Colloids Surfaces A Physicochem. Eng. Asp.* 630 (2021) 127529. <https://doi.org/10.1016/J.COLSURFA.2021.127529>.
- [8] M. Imran, M.K. Iqbal, K. Imtiyaz, S. Saleem, S. Mittal, M.M.A. Rizvi, J. Ali, S. Baboota, Topical nanostructured lipid carrier gel of quercetin and resveratrol: Formulation, optimization, in vitro and ex vivo study for the treatment of skin cancer, *Int. J. Pharm.* 587 (2020) 119705. <https://doi.org/10.1016/J.IJPHARM.2020.119705>.

- [9] V. Gugleva, V. Andonova, Recent Progress of Solid Lipid Nanoparticles and Nanostructured Lipid Carriers as Ocular Drug Delivery Platforms, *Pharmaceuticals*. 16 (2023) 474. <https://doi.org/10.3390/PH16030474/S1>.
- [10] M. Rizwanullah, M.Z. Ahmad, A. Garg, J. Ahmad, Advancement in design of nanostructured lipid carriers for cancer targeting and theranostic application, *Biochim. Biophys. Acta - Gen. Subj.* 1865 (2021) 129936. <https://doi.org/10.1016/J.BBAGEN.2021.129936>.
- [11] C. Tapeinos, M. Battaglini, G. Ciofani, Advances in the design of solid lipid nanoparticles and nanostructured lipid carriers for targeting brain diseases, *J. Control. Release*. 264 (2017) 306–332. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2017.08.033>.
- [12] N. Naseri, H. Valizadeh, P. Zakeri-Milani, Solid lipid nanoparticles and nanostructured lipid carriers: Structure preparation and application, *Adv. Pharm. Bull.* 5 (2015) 305–313. <https://doi.org/10.15171/apb.2015.043>.
- [13] V.R. Salvi, P. Pawar, Nanostructured lipid carriers (NLC) system: A novel drug targeting carrier, *J. Drug Deliv. Sci. Technol.* 51 (2019) 255–267. <https://doi.org/10.1016/J.JDDST.2019.02.017>.
- [14] M. Haider, S.M. Abdin, L. Kamal, G. Orive, Nanostructured Lipid Carriers for Delivery of Chemotherapeutics: A Review, *Pharm.* 12 (2020) 288. <https://doi.org/10.3390/PHARMACEUTICS12030288>.
- [15] P. Mura, F. Maestrelli, M. D’Ambrosio, C. Luceri, M. Cirri, Evaluation and Comparison of Solid Lipid Nanoparticles (SLNs) and Nanostructured Lipid Carriers (NLCs) as Vectors to Develop Hydrochlorothiazide Effective and Safe Pediatric Oral Liquid Formulations, *Pharm.* 13 (2021) 437. <https://doi.org/10.3390/PHARMACEUTICS13040437>.
- [16] C.P. Costa, S. Barreiro, J.N. Moreira, R. Silva, H. Almeida, J.M. Sousa Lobo, A.C. Silva, In Vitro Studies on Nasal Formulations of Nanostructured Lipid Carriers (NLC) and Solid Lipid Nanoparticles (SLN), *Pharm.* 14 (2021) 711. <https://doi.org/10.3390/PH14080711>.
- [17] S. Nasirizadeh, B. Malaekhe-Nikouei, Solid lipid nanoparticles and nanostructured lipid carriers in oral cancer drug delivery, *J. Drug Deliv. Sci. Technol.* 55 (2020) 101458. <https://doi.org/10.1016/J.JDDST.2019.101458>.
- [18] F.A. Nobari Azar, A. Pezeshki, B. Ghanbarzadeh, H. Hamishehkar, M. Mohammadi, Nanostructured lipid carriers: Promising delivery systems for

- encapsulation of food ingredients, *J. Agric. Food Res.* 2 (2020) 100084. <https://doi.org/10.1016/J.JAFR.2020.100084>.
- [19] L. Montenegro, F. Lai, A. Offerta, M.G. Sarpietro, L. Micicchè, A.M. Maccioni, D. Valenti, A.M. Fadda, From nanoemulsions to nanostructured lipid carriers: A relevant development in dermal delivery of drugs and cosmetics, *J. Drug Deliv. Sci. Technol.* 32 (2016) 100–112. <https://doi.org/10.1016/J.JDDST.2015.10.003>.
- [20] P. Mittal, H. Vrdhan, G. Ajmal, G. Bonde, R. Kapoor, B. Mishra, Formulation and Characterization of Genistein-loaded Nanostructured Lipid Carriers: Pharmacokinetic, Biodistribution and In vitro Cytotoxicity Studies, *Curr. Drug Deliv.* 16 (2018) 215–225. <https://doi.org/10.2174/1567201816666181120170137>.
- [21] K. Bhise, S.K. Kashaw, S. Sau, A.K. Iyer, Nanostructured lipid carriers employing polyphenols as promising anticancer agents: Quality by design (QbD) approach, *Int. J. Pharm.* 526 (2017) 506–515. <https://doi.org/10.1016/J.IJPHARM.2017.04.078>.
- [22] O. Gartziandia, E. Herran, J.L. Pedraz, E. Carro, M. Igartua, R.M. Hernandez, Chitosan coated nanostructured lipid carriers for brain delivery of proteins by intranasal administration, *Colloids Surfaces B Biointerfaces.* 134 (2015) 304–313. <https://doi.org/10.1016/J.COLSUB.2015.06.054>.
- [23] E. Markova, L. Taneska, M. Kostovska, D. Shalabalija, L. Mihailova, M. Glavas Dodov, P. Makreski, N. Geskovski, M. Petrushevska, A. N. Taravari, M. Simonoska Crcarevska, Design and evaluation of nanostructured lipid carriers loaded with *Salvia officinalis* extract for Alzheimer’s disease treatment, *J. Biomed. Mater. Res. Part B Appl. Biomater.* 110 (2022) 1368–1390. <https://doi.org/10.1002/JBM.B.35006>.
- [24] R. Vieira, P. Severino, L.A. Nalone, S.B. Souto, A.M. Silva, M. Lucarini, A. Durazzo, A. Santini, E.B. Souto, Sucupira Oil-Loaded Nanostructured Lipid Carriers (NLC): Lipid Screening, Factorial Design, Release Profile, and Cytotoxicity, *Mol.* 25 (2020) 685. <https://doi.org/10.3390/MOLECULES25030685>.
- [25] R.K. Shirodkar, L. Kumar, S. Mutalik, S. Lewis, Solid Lipid Nanoparticles and Nanostructured Lipid Carriers: Emerging Lipid Based Drug Delivery Systems, *Pharm. Chem. J.* 53 (2019) 440–453. <https://doi.org/10.1007/S11094-019-02017-9>.
- [26] F. Keivani Nahr, B. Ghanbarzadeh, H. Samadi Kafil, H. Hamishehkar, M. Hoseini, The colloidal and release properties of cardamom oil

- encapsulated nanostructured lipid carrier, *J. Dispers. Sci. Technol.* 42 (2020) 1–9. <https://doi.org/10.1080/01932691.2019.1658597>.
- [27] F. Saporito, G. Sandri, M.C. Bonferoni, S. Rossi, C. Boselli, A.I. Cornaglia, B. Mannucci, P. Grisoli, B. Vigani, F. Ferrari, Essential oil-loaded lipid nanoparticles for wound healing, *Int. J. Nanomedicine*. 13 (2018) 175–186. <https://doi.org/10.2147/IJN.S152529>.
- [28] D.B. G, V.L. P, Recent advances of non-ionic surfactant-based nano-vesicles (niosomes and proniosomes): a brief review of these in enhancing transdermal delivery of drug, *Futur. J. Pharm. Sci.* 6 (2020) 1–18. <https://doi.org/10.1186/S43094-020-00117-Y>.
- [29] M. Gharbavi, J. Amani, H. Kheiri-Manjili, H. Danafar, A. Sharafi, Niosome: A Promising Nanocarrier for Natural Drug Delivery through Blood-Brain Barrier, *Adv. Pharmacol. Sci.* 2018 (2018). <https://doi.org/10.1155/2018/6847971>.
- [30] S. Yasamineh, P. Yasamineh, H. Ghafouri Kalajahi, O. Gholizadeh, Z. Yekanipour, H. Afkhami, M. Eslami, A. Hossein Kheirkhah, M. Taghizadeh, Y. Yazdani, M. Dadashpour, A state-of-the-art review on the recent advances of niosomes as a targeted drug delivery system, *Int. J. Pharm.* 624 (2022) 121878. <https://doi.org/10.1016/J.IJPHAR>
- M.2022.121878.
- [31] A. Saleh, M.K. Pirouzifard, M. Alizadeh khaledabad, H. Almasi, Optimization and Characterization of Lippia citriodora Essential Oil Loaded Niosomes: A Novel Plant-based Food Nano Preservative, *Colloids Surfaces A Physicochem. Eng. Asp.* 650 (2022) 129480. <https://doi.org/10.1016/J.COLSURFA.2022.129480>.
- [32] M. Hakemi-Vala, H. Rafati, A. Aliahmadi, A. Ardalan, Nanoemulsions: A Novel Antimicrobial Delivery System, *Nano- Microscale Drug Deliv. Syst. Des. Fabr.* (2017) 245–266. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-52727-9.00013-3>.
- [33] M.H. Nematollahi, A. Pardakhty, M. Torkzadeh-Mahanai, M. Mehrabani, G. Asadikaram, Changes in physical and chemical properties of niosome membrane induced by cholesterol: a promising approach for niosome bilayer intervention, *RSC Adv.* 7 (2017) 49463–49472. <https://doi.org/10.1039/C7RA07834J>.
- [34] D.B. Momekova, V.E. Gugleva, P.D. Petrov, Nanoarchitectonics of Multifunctional Niosomes for Advanced Drug Delivery, *ACS Omega.* 6 (2021) 33265–33273. <https://doi.org/10.1021/ACSOMEGA.1C05083/>.
- [35] P. Aparajay, A. Dev, Functionalized niosomes as a smart delivery device in cancer

- and fungal infection, *Eur. J. Pharm. Sci.* 168 (2022) 106052. <https://doi.org/10.1016/J.EJPS.2021.106052>.
- [36] F. Nowroozi, A. Almasi, J. Javidi, A. Haeri, S. Dadashzadeh, Effect of Surfactant Type, Cholesterol Content and Various Downsizing Methods on the Particle Size of Niosomes, *Iran. J. Pharm. Res. IJPR.* 17 (2018) 1.
- [37] J. Dolai, K. Mandal, N.R. Jana, Nanoparticle Size Effects in Biomedical Applications, *ACS Appl. Nano Mater.* 4 (2021) 6471–6496. <https://doi.org/10.1021/ACSANM.1C00987>.
- [38] M. Danaei, M. Dehghankhold, S. Ataei, F. Hasanzadeh Davarani, R. Javanmard, A. Dokhani, S. Khorasani, M.R. Mozafari, Impact of Particle Size and Polydispersity Index on the Clinical Applications of Lipidic Nanocarrier Systems, *Pharmaceutics.* 10 (2018). <https://doi.org/10.3390/PHARMACEUTICS10020057>.
- [39] S. Durak, M.E. Rad, A.A. Yetisgin, H.E. Sutova, O. Kutlu, S. Cetinel, A. Zarrabi, Niosomal Drug Delivery Systems for Ocular Disease—Recent Advances and Future Prospects, *Nanomater.* 10 (2020) 1191. <https://doi.org/10.3390/NANO10061191>.
- [40] P. Bhardwaj, P. Tripathi, R. Gupta, S. Pandey, Niosomes: A review on niosomal research in the last decade, *J. Drug Deliv. Sci. Technol.* 56 (2020) 101581. <https://doi.org/10.1016/J.JDDST.2020.101581>.
- [41] E.I. Diskaeva, O.V. Vecher, I.A. Bazikov, A.N. Maltsev, Dispersion analysis of niosomes different composition, *J. Nanoparticle Res.* 21 (2019) 1–7. <https://doi.org/10.1007/S11051-018-4453-6>.
- [42] F. Heidari, I. Akbarzadeh, D. Nourouzian, A. Mirzaie, H. Bakhshandeh, Optimization and characterization of tannic acid loaded niosomes for enhanced antibacterial and anti-biofilm activities, *Adv. Powder Technol.* 31 (2020) 4768–4781. <https://doi.org/10.1016/J.APT.2020.11.008>.
- [43] A. Alemi, J. Zavar Reza, F. Haghirsadat, H. Zarei Jaliani, M. Haghi Karamallah, S.A. Hosseini, S. Haghi Karamallah, Paclitaxel and curcumin coadministration in novel cationic PEGylated niosomal formulations exhibit enhanced synergistic antitumor efficacy, *J. Nanobiotechnology.* 16 (2018) 1–20. <https://doi.org/10.1186/S12951-018-0351-4>.
- [44] A. Verma, A. Tiwari, S. Saraf, P.K. Panda, A. Jain, S.K. Jain, Emerging potential of niosomes in ocular delivery, 18 (2020) 55–71. <https://doi.org/10.1080/17425247.2020.1822322>.
- [45] J. Akbari, M. Saeedi, R. Enayatifard, K. Morteza-Semnani, S.M. Hassan Hashemi, A. Babaei, S.M. Rahimnia, S.S. Rostamkalaei, A. Nokhodchi, Curcumin Niosomes

- (curcuses) as an alternative to conventional vehicles: A potential for efficient dermal delivery, *J. Drug Deliv. Sci. Technol.* 60 (2020) 102035. <https://doi.org/10.1016/J.JDDST.2020.102035>.
- [46] R. Muzzalupo, L. Tavano, Niosomal drug delivery for transdermal targeting: recent advances, *Res. Reports Transdermal Drug Deliv.* 4 (2015) 23. <https://doi.org/10.2147/RRTD.S64773>.
- [47] M. Masjedi, T. Montahaei, An illustrated review on nonionic surfactant vesicles (niosomes) as an approach in modern drug delivery: Fabrication, characterization, pharmaceutical, and cosmetic applications, *J. Drug Deliv. Sci. Technol.* 61 (2021) 102234. <https://doi.org/10.1016/J.JDDST.2020.102234>.
- [48] Y. Thabet, M. Elsabahy, N.G. Eissa, Methods for preparation of niosomes: A focus on thin-film hydration method, *Methods.* 199 (2022) 9–15. <https://doi.org/10.1016/J.YMETH.2021.05.004>.
- [49] K. Karim, A. Mandal, N. Biswas, A. Guha, S. Chatterjee, M. Behera, K. Kuotsu, Niosome: A future of targeted drug delivery systems, *J. Adv. Pharm. Technol. Res.* 1 (2010) 374. <https://doi.org/10.4103/0110-5558.76435>.
- [50] X. Ge, M. Wei, S. He, W.E. Yuan, Advances of Non-Ionic Surfactant Vesicles (Niosomes) and Their Application in Drug Delivery, *Pharm.* 2019, Vol. 11, Page 55. 11 (2019) 55. <https://doi.org/10.3390/PHARMACEUTICS11020055>.
- [51] D. Pando, G. Gutiérrez, J. Coca, C. Pazos, Preparation and characterization of niosomes containing resveratrol, *J. Food Eng.* 117 (2013) 227–234. <https://doi.org/10.1016/J.JFOODENG.2013.02.020>.
- [52] N. Samed, V. Sharma, A. Sundaramurthy, Hydrogen bonded niosomes for encapsulation and release of hydrophilic and hydrophobic anti-diabetic drugs: An efficient system for oral anti-diabetic formulation, *Appl. Surf. Sci.* 449 (2018) 567–573. <https://doi.org/10.1016/J.APSUSC.2017.11.055>.
- [53] B. Bahramnezhad, D. Ghazanfari, E. Sheikhhosseini, M.R. Akhgar, S.A. Ahmadi, MnSb₂O₆-chitosan nanocomposite: An efficient catalyst for the synthesis of coumarins via Pechmann reaction, *J. Heterocycl. Chem.* 57 (2020) 173–181. <https://doi.org/10.1002/JHET.3763>.

Κεφάλαιο 9ο

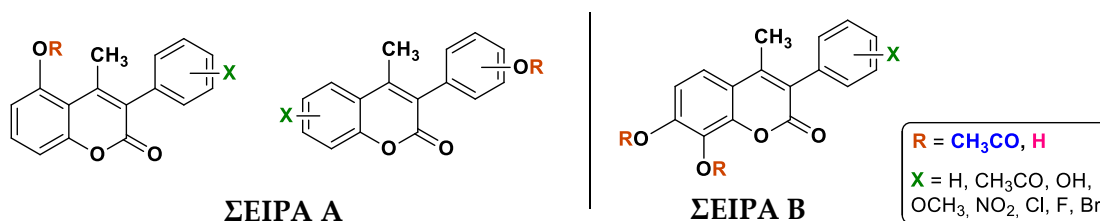
ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΠΡΟΤΑΣΕΙΣ ΓΙΑ
ΜΕΛΛΟΝΤΙΚΗ ΕΡΕΥΝΑ

9.1 ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Στην παρούσα διδακτορική διατριβή πραγματοποιήθηκε η σύνθεση και ο χαρακτηρισμός νέων κουμαρινικών αναλόγων, τα οποία ταυτοποιήθηκαν δομικά μέσω φασματοσκοπίας Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού πρωτονίου και άνθρακα (^1H και ^{13}C NMR), καθώς και Φασματομετρίας Μάζας Υψηλής Ανάλυσης (HR-MS). Τα νέα παράγωγα αξιολογήθηκαν για διάφορες βιολογικές δράσεις *in vitro*, ενώ πραγματοποιήθηκαν και *in silico* μελέτες μοριακής πρόσδεσης στα έζνυμα λιποξυγονάση και ακετυλοχολινεστεράση.

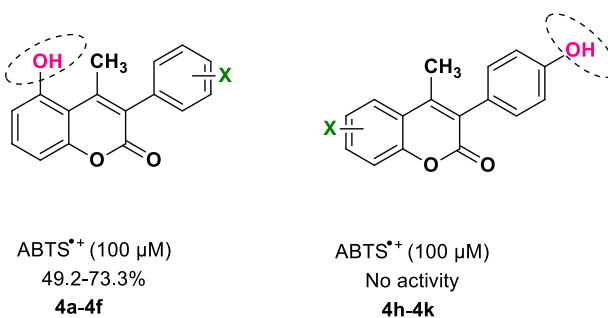
❖ ΣΕΙΡΕΣ A & B

Πραγματοποιήθηκε ο σχεδιασμός και η σύνθεση νέων 3-αρυλο-κουμαρινικών παραγώγων με ακετυλοξυ- ή υδροξυ- υποκαταστάτες, στηριζόμενοι σε προηγούμενα αποτελέσματα του Εργαστηρίου Οργανικής Χημείας Ε.Μ.Π. Σε αυτό το πλαίσιο, επιτεύχθηκε η σύνθεση δεκαπέντε ακετυλοξυ- (**3a-3k**) και δέκα υδροξυ- (**4a-4k**) κουμαρινικών αναλόγων που ανήκουν στη Σειρά A, καθώς και είκοσι διακετυλοξυ- (**9a-9j**) και διυδροξυ- (**10a-10j**) κουμαρινικών αναλόγων που ανήκουν στη Σειρά B, η πλειοψηφία εκ των οποίων παρουσιάζεται για πρώτη φορά στη βιβλιογραφία (Σχήμα 9.1). Τα νέα κουμαρινικά ανάλογα παραλήφθηκαν σε υψηλή καθαρότητα σε ικανοποιητικές έως υψηλές αποδόσεις μεταξύ 35-95%.



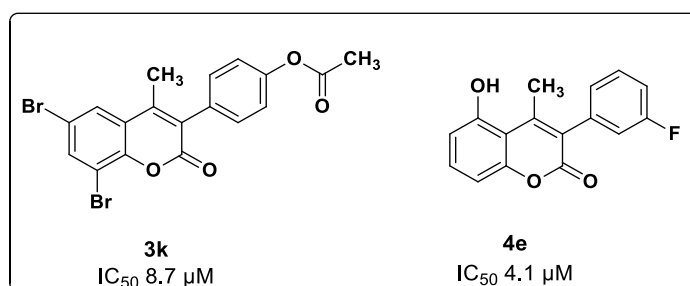
Σχήμα 9.1 Γενική δομή κουμαρινικών αναλόγων Σειρών A και B.

Τα μόρια της Σειράς A αξιολογήθηκαν για την αντιοξειδωτική τους δράση μέσω τεσσάρων διαφορετικών δοκιμών, για την ικανότητά τους να αναστέλλουν τη δράση της λιποξυγονάσης (LOX) από σόγια ως ένδειξη αντιφλεγμονώδους δράσης, καθώς και για την επίδρασή τους στη βιωσιμότητα τόσο καρκινικών όσο και υγιών ανθρώπινων κυτταρικών σειρών. Όσον αφορά τη δοκιμή δέσμευσης της ρίζας ABTS^{•+} είναι αξιοσημείωτο ότι η υποκατάσταση με υδροξυλομάδα στη θέση 4' του 3-φαινολικού δακτυλίου (**4h-4k**) έναντι της θέσης 5 του κουμαρινικού σκελετού (**4a-4f**), οδηγεί σε απώλεια της αντιοξειδωτικής δράσης, υποδεικνύοντας τη σημασία της θέσης του υποκαταστάτη στη βιολογική δράση (Σχήμα 9.2).



Σχήμα 9.2 Επίδραση της θέσης υποκατάστασης της υδροξυλομάδας στην ικανότητα αναγωγής της ρίζας ABTS^{•+}.

Αναφορικά με την αναστολή της LOX, ικανότερους αναστολείς αποτέλεσαν τα μόρια **3k** (IC₅₀ 8.7 μM) και **4e** (IC₅₀ 4.1 μM), για τα οποία πραγματοποιήθηκαν και *in silico* δοκιμές μοριακής πρόσδεσης, οι οποίες υπέδειξαν αλλοστερική δέσμευση με το ένζυμο (Σχήμα 9.3).



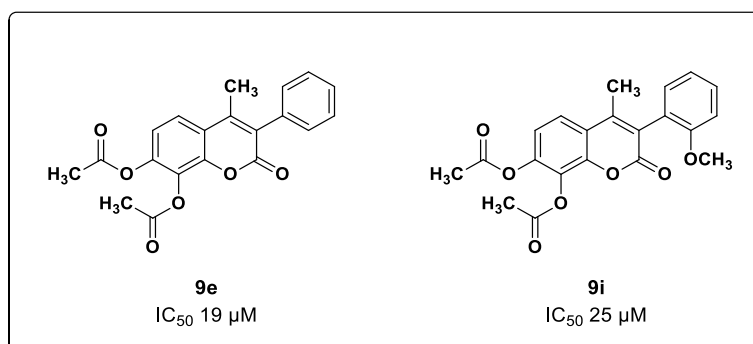
Σχήμα 9.3 Ικανότεροι αναστολείς της λιποξυγονάσης από τη Σειρά A.

Η μελέτη της κυτταροτοξικότητας έναντι της καρκινικής σειράς A375, υπέδειξε τη σημασία του ακετυλοξυ δομικού χαρακτηριστικού στην ενίσχυση της δράσης, ενώ υψηλότερη κυτταροτοξικότητα έναντι της σειράς A549, επέδειξαν τα φθορο υποκατεστημένα παράγωγα **4d** (75.7%) και **4f** (62.5%). Είναι εξίσου σημαντικό ότι η πλειοψηφία των κουμαρινικών αναλόγων δε μείωσε σημαντικά τη βιωσιμότητα των υγιών κερατινοκυττάρων HaCaT.

Τέλος, μέσω της αναλυτικής μεθόδου της βιομιμητικής χρωματογραφίας εκτιμήθηκε η απορρόφηση από το στόμα και η σύνδεση με τις πρωτεΐνες του πλάσματος των κουμαρινών της Σειράς A, απ' όπου προέκυψε ότι οι εξεταζόμενες ενώσεις παρουσίασαν υψηλά ποσοστά απορρόφησης και επομένως μπορούν να θεωρηθούν κατάλληλες για φαρμακευτικά σκευάσματα που προορίζονται για χορήγηση εκ του στόματος, καθώς και αρκετά υψηλά ποσοστά πρωτεϊνικής σύνδεσης.

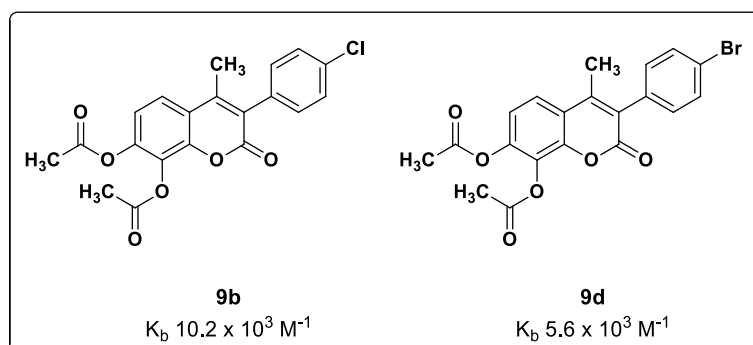
Τα μόρια της Σειράς B αξιολογήθηκαν για την αντιοξειδωτική τους δράση μέσω των δοκιμών δέσμευσης της ελεύθερης ρίζας DPPH και αναστολής της λιπιδικής υπεροξειδωσης, για την ικανότητά τους να αναστέλλουν τη δράση της λιποξυγονάσης από σόγια, για την κυτταροτοξικότητά τους έναντι της καρκινικής σειράς A431, καθώς και για την ικανότητα πρόσδεσής τους στο ctDNA. Όλα τα 7,8-διυδροξυ κουμαρινικά ανάλογα παρουσίασαν ισχυρή ικανότητα δέσμευσης της ελεύθερης ρίζας DPPH (>82%), λόγω της παρουσίας του κατεχολικού συστήματος

στη δομή τους, ενώ τα διακετυλοξυ-παράγωγα αποτέλεσαν ισχυρότερους αναστολείς της λιπιδικής υπεροξειδωσης (41.1-95.3%). Επιπλέον, τα διακετυλοξυ-παράγωγα **9e** και **9i** παρουσίασαν καλύτερη δράση έναντι της LOX με τιμές IC₅₀ 19 και 25 μM, αντίστοιχα (Σχήμα 9.4).



Σχήμα 9.4 Ικανότεροι αναστολείς της λιποξυγονάσης από τη Σειρά Β.

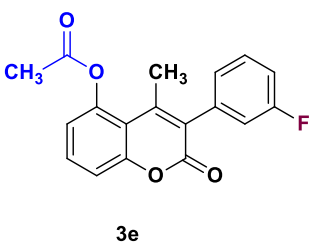
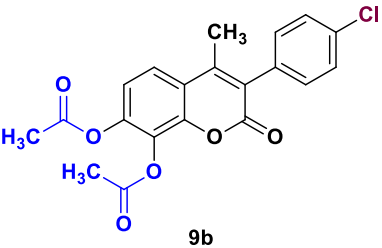
Όσον αφορά τις μελέτες κυτταροτοξικότητας, παρατηρήθηκε ότι τα διακετυλοξυ-παράγωγα επέδειξαν ισχυρότερη δράση από τα διυδροξυ-παράγωγα και μάλιστα το ανάλογο **9d** που φέρει ομάδα βρωμίου στο φαινολικό δακτύλιο της θέσης 3 του κουμαρινικού σκελετού επέφερε τη μεγαλύτερη μείωση στη βιωσιμότητα των καρκινικών κυττάρων (61.2%). Ακόμη, μελετήθηκε η ικανότητα πρόσδεσης των ενώσεων που επέδειξαν ισχυρότερη κυτταροτοξικότητα έναντι της καρκινικής σειράς A431 στο ctDNA και βρέθηκε ότι τα παράγωγα **9b** και **9d** που παρουσίασαν ισχυρότερη κυτταροτοξική δράση στη συγκέντρωση των 100 μM εμφάνισαν και την υψηλότερη τιμή σταθεράς σύνδεσης με το ctDNA ($10.2 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$ και $5.6 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$, αντίστοιχα) προκαλώντας την αποσταθεροποίησή του (Σχήμα 9.5).



Σχήμα 9.5 Χημική δομή κουμαρινικών αναλόγων **9b** και **9d**, τα οποία παρουσίασαν τις υψηλότερες τιμές σταθεράς σύνδεσης με το ctDNA.

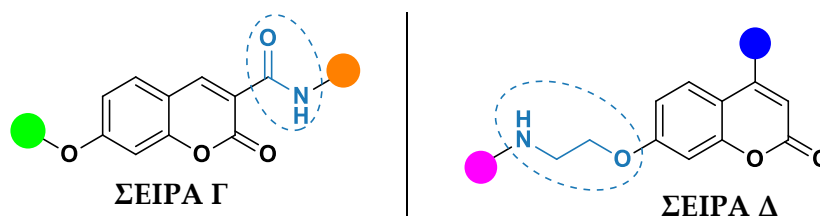
Συνολικά, οι ενώσεις που παρουσίασαν συνδυασμένη βιολογική δράση και μπορούν να αποτελέσουν μόρια-οδηγούς για το σχεδιασμό νέων κουμαρινικών αναλόγων είναι τα ακετυλοξυ-παράγωγα **3e** και **9b**, που παρουσιάζονται στον Πίνακα 9.1.

Πίνακας 9.1 Συνδυασμένη βιολογική δράση κουμαρινικών αναλόγων **3e** και **9b**.

Δομή:	 3e	 9b
Αναστολή της LOX (IC ₅₀):	11.4 μM	100 μM
Αντιοξειδωτική δράση:	Δέσμευση ·OH (100 μM): 85.2%	Αναστολή της λιπιδικής υπεροξειδωσης (100 μM): 95.3%
Κυτταροτοξικότητα έναντι των σειρών:	A375 (100 μM): 60.7%	A431 (100 μM): 45.9%
Σταθερά σύνδεσης με το ctDNA:	-	K _b = 10.2 10 ³ M ⁻¹

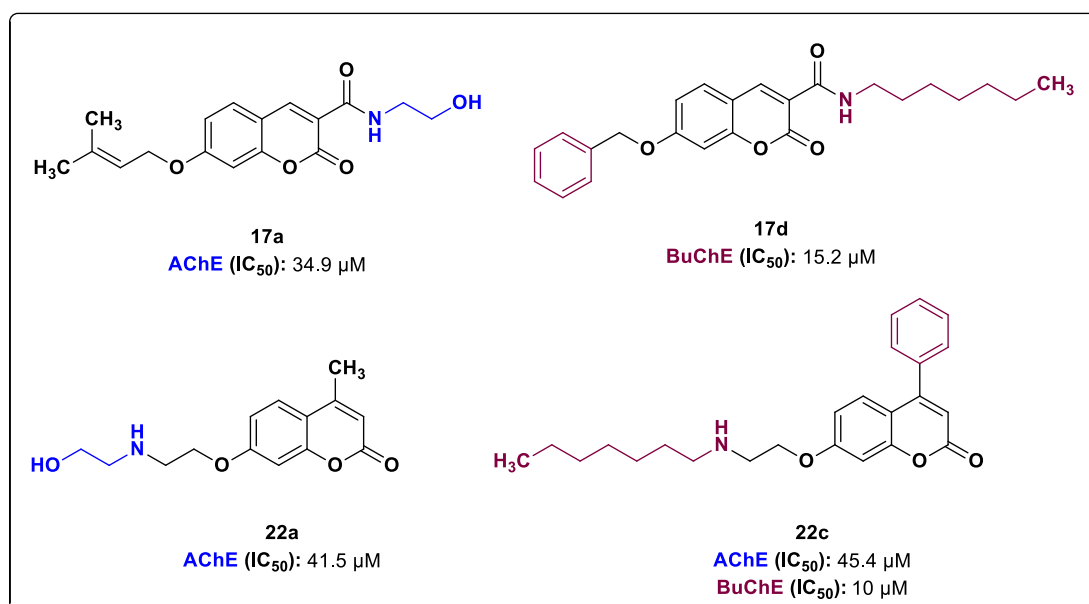
❖ ΣΕΙΡΕΣ Γ & Δ

Πέντε νέα κουμαρινικά καρβοξαμίδια (**17a-17e**, Σειρά Γ) και τρία νέα αμινοαιθοξυκουμαρινικά παράγωγα (**22a-22c**, Σειρά Δ) συντέθηκαν σε ικανοποιητικές αποδόσεις (40-60%) (Σχήμα 9.6). Ο σχεδιασμός των νέων αναλόγων των Σειρών Γ και Δ στηρίχτηκε στην παρατήρηση ότι η ύπαρξη αμιδικού δεσμού ή αμινομάδας φαίνεται να διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην ενίσχυση της ανασταλτικής δράσης έναντι των χολινεστερασών.



Σχήμα 9.6 Γενική δομή κουμαρινικών αναλόγων Σειρών Γ και Δ.

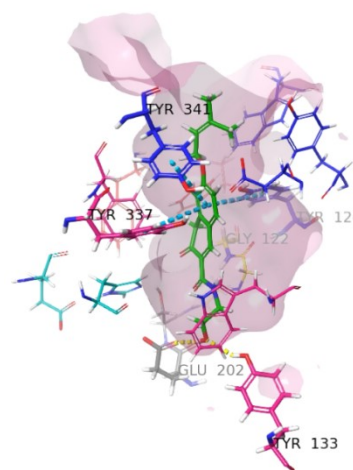
Τα νέα κουμαρινικά παράγωγα εξετάστηκαν ως προς την ικανότητά τους να αναστέλλουν τη δράση των ενζύμων ακετυλοχολινεστεράση (AChE) και βουτυρυλοχολινεστεράση (BuChE), τα οποία σχετίζονται με την ανάπτυξη νευροεκφυλιστικών παθήσεων όπως η νόσος Αλτσχάιμερ. Τα περισσότερα από τα εξεταζόμενα κουμαρινικά ανάλογα επέδειξαν σημαντική ανασταλτική δράση έναντι των δύο ενζύμων, με τιμές IC₅₀ 34.9-94.2 μM και 10-100 μM, αντίστοιχα. Τα παράγωγα που έδειξαν ισχυρότερη ανασταλτική δράση παρουσιάζονται στο Σχήμα 9.7.



Σχήμα 9.7 Χημική δομή των ισχυρότερων αναστολέων των AChE και BuChE.

Η παρουσία ορισμένων δομικών χαρακτηριστικών στον κουμαρινικό σκελετό φαίνεται να συσχετίζεται άμεσα με την ικανότητα αναστολής της δράσης των χολινεστερασών. Πιο συγκεκριμένα, τα μόρια **17a** και **22a** που συντέθηκαν μέσω αντίδρασης με αιθανολαμίνη, παρουσίασαν ισχυρότερη αναστολή της AChE με τιμές IC₅₀ 34.9 και 41.5 μM, αντίστοιχα. Όσον αφορά την αναστολή της BuChE, σημαντικό ρόλο έχει η συνδυαστική παρουσία φαινυλο- και επτυλο-ομάδας στον κουμαρινικό σκελετό (**17d** και **22c**), με το παράγωγο **22c** να αποτελεί ωστόσο, ισχυρό αναστολέα και των δύο ενζύμων. Σύμφωνα με την εκτίμηση του παράγοντα logBB από το υπολογιστικό εργαλείο pkCSm, όλες οι ενώσεις θεωρούνται ικανές να διαπεράσουν τον αιματοεγκεφαλικό φραγμό.

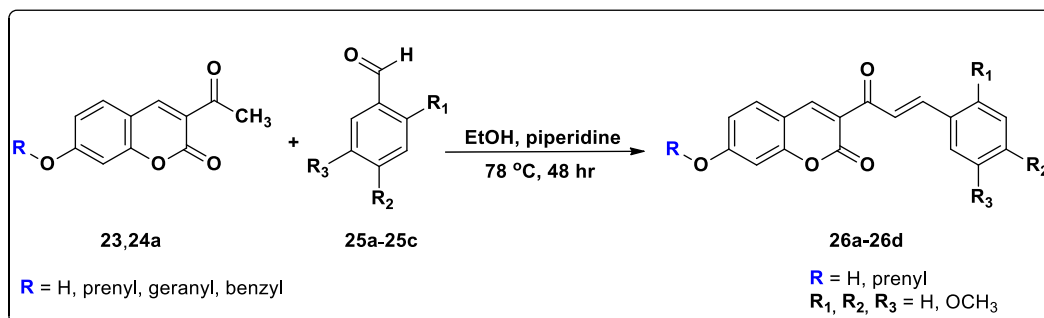
Τέλος, οι μελέτες μοριακής πρόσδεσης των κουμαρινικών αναλόγων που παρουσίασαν ανασταλτική δράση έναντι της AChE, στο φαράγγι εισόδου του ενζύμου στο βάθος του οποίου διευθετείται το καταλυτικό κέντρο, υπέδειξε πληθώρα αλληλεπιδράσεων με υψηλές τιμές ενέργειας πρόσδεσης, συγκρίσιμες ή και υψηλότερες σε σχέση με τη γαλανταμίνη. Όλα τα κουμαρινικά ανάλογα παρουσίασαν αλληλεπίδραση με το κρίσιμο αμινοξύ TYR337, καθώς και με ένα ή και περισσότερα αμινοξέα του Περιφερειακού Ανιονικού Κέντρου (PAS), καθιστώντας τα πιθανούς αναστολείς διπλής πρόσδεσης (dual binding site inhibitors). Η τριδιάστατη απεικόνιση της πρόσδεσης της **17a**, η οποία παρουσίασε την ισχυρότερη δράση, στο ενεργό κέντρο της AChE, παρουσιάζεται στην Εικόνα 9.1.



Εικόνα 9.1 Τριδιάστατη απεικόνιση της πρόσδεσης της **17a** στο ενεργό κέντρο της AChE ανθρώπινης προέλευσης.

❖ ΣΕΙΡΑ Ε

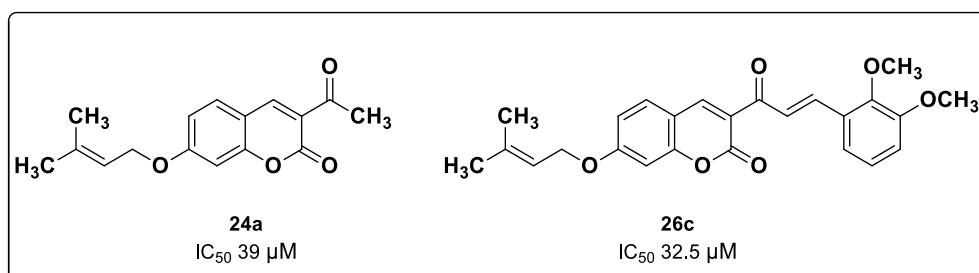
Η Σειρά Ε αποτελείται από τέσσερα νέα υβριδικά μόρια κουμαρινών-χαλκονών (**26a-26d**) τα οποία συντέθηκαν σε αποδόσεις της τάξης του 30%, μέσω αντίδρασης 7-υποκατεστημένων-3-ακετυλο-κουμαρινών (**23**, **24a-24c**) με διαφορετικές βενζαλδεΐδες που φέρουν μεθοξυ ομάδες, σε αιθανόλη παρουσία πιπεριδίνης (Σχήμα 9.8).



Σχήμα 9.8 Συνθετική πορεία υβριδικών μορίων κουμαρινών-χαλκονών.

Η βιολογική δράση των υβριδικών μορίων καθώς και των 3-ακετυλο-κουμαρινών **23** και **24a-24c** εξετάστηκε μέσω διαφορετικών μεθόδων. Πιο συγκεκριμένα, τα παράγωγα μελετήθηκαν ως προς την αντιοξειδωτική τους δράση μέσω της ικανότητάς τους να αναστέλλουν τη λιπιδική υπεροξειδωση, ως προς την αντιφλεγμονώδη δράση τους μέσω της ικανότητάς τους να αναστέλλουν τη δράση της λιποξυγονάσης από σόγια καθώς και ως προς την κυτταροτοξικότητά τους έναντι της καρκινικής σειράς ανθρώπινου προστάτη LNCaP.

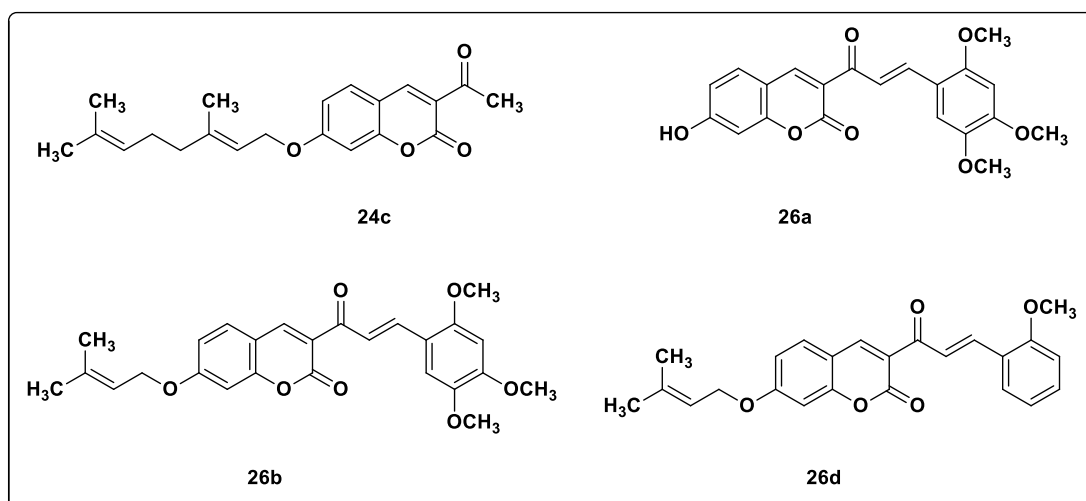
Η 3-ακετυλο-7-υδροξυ-κουμαρίνη (**23**) παρουσίασε την ισχυρότερη ικανότητα αναστολής της λιπιδικής υπεροξειδωσης (94%), παρόμοια με το πρότυπο Trolox (95%), ενώ σημαντική παρατήρηση αποτελεί ότι η αύξηση του αριθμού των μεθοξυ ομάδων στο δακτύλιο Β των πρενυλοξυ υβριδικών μορίων (**26b-26d**), φαίνεται να ενισχύει την αντιοξειδωτική τους δράση. Ωστόσο, αντίθετη επίδραση παρατηρείται για την κυτταροτοξική δράση έναντι της σειράς LNCaP όπου η αύξηση του αριθμού μεθοξυ ομάδων φαίνεται να σχετίζεται με μειωμένη κυτταροτοξική δράση για τα πρενυλοξυ υβριδικά μόρια. Ισχυρότερο κυτταροτοξικό παράγοντα αποτελεί το υδροξυ υβριδικό μόριο **26a** με τιμή IC_{50} 56 μM . Όσον αφορά την ικανότητα αναστολής της λιποξυγονάσης, ικανότερους αναστολείς αποτέλεσαν οι ενώσεις **24a** και **26c** με τιμές IC_{50} 39 μM και 32.5 μM , αντίστοιχα (Σχήμα 9.9).



Σχήμα 9.9 Ικανότεροι αναστολείς της λιποξυγονάσης της Σειράς Ε.

Στη συνέχεια, τα κουμαρινικά παράγωγα της Σειράς Ε μελετήθηκαν ως προς τις φωτοφυσικές τους ιδιότητες και πιο συγκεκριμένα, την απορρόφησή τους σε τρεις διαφορετικούς διαλύτες (DMSO, EtOH και PBS), το φθορισμό και τη φωτοσταθερότητά τους. Είναι σημαντικό ότι η πλειοψηφία των κουμαρινικών αναλόγων εμφανίζει αξιόλογη σταθερότητα κατά τα πρώτα λεπτά ακτινοβολήσης καθώς ισχυρή ικανότητα φθορισμού σε μικρή συγκέντρωση, επιτρέποντας τη χρήση τους και στον τομέα της διάγνωσης. Ακόμη, μελετήθηκε η ικανότητα των εξεταζόμενων ενώσεων να παράγουν ελεύθερες ρίζες με δύο διαφορετικές *in vitro* μεθόδους, ανάλογα με τα φωτοφυσικά χαρακτηριστικά κάθε ένωσης, με την 3-ακετυλο-7-γερανυλοξυ-κουμαρίνη (**24b**) να παρουσιάζει ικανοποιητική δράση.

Τέλος, μελετήθηκε η ικανότητα των ενώσεων να δρουν ως φωτοευαισθητοποιητές έναντι της καρκινικής σειράς επιδερμικού καρκινώματος A431 με την ένωση **24c** καθώς και τα εξεταζόμενα υβριδικά μόρια κουμαρινών-χαλκονών (**26a**, **26b** και **26d**) να παρουσιάζουν ισχυρή φωτοευαισθητοποιητική δράση, μειώνοντας την κυτταρική βιωσιμότητα στο 57%, 41%, 23% και 56%, αντίστοιχα (Σχήμα 9.10).

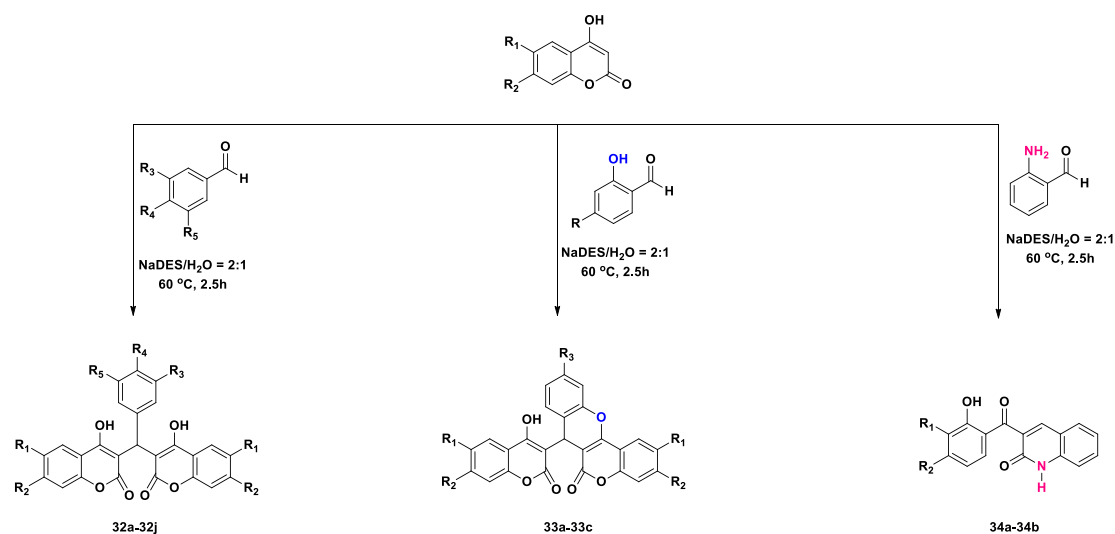


Σχήμα 9.10 Ισχυρότεροι φωτοευαισθητοποιητικοί παράγοντες.

❖ ΣΕΙΡΑ ΣΤ

Δέκα νέα δικουμαρινικά ανάλογα (**32a-32j**) συντέθηκαν χρησιμοποιώντας το φυσικό βαθέως ευτηκτικό διαλύτη (NaDES) L-προλίνη/γαλακτικό οξύ = 1:2 σε αναλογία NaDES/H₂O = 2:1 (w/w) και παραλήφθηκαν σε υψηλές αποδόσεις μεταξύ 50-95%. Η χρήση του NaDES L-προλίνη/γαλακτικό οξύ στην αντίδραση Domino Michael-Knoevenagel αναφέρεται για πρώτη φορά στη βιβλιογραφία. Ωστόσο, είναι αξιοσημείωτο ότι η χρήση διαφορετικών σαλικυλαλδεΰδων οδήγησε στη σύνθεση τριών βενζοπυρανοκουμαρινικών αναλόγων (**33a-33c**), σε αποδόσεις μεταξύ 40-95%, ενώ η χρήση της 2-αμινο-βενζαλδεΰδης οδήγησε στη σύνθεση δύο νέων κινολινονικών παραγώγων (**34a-34b**) σε χαμηλές αποδόσεις (30-40%), όπως βρέθηκε έπειτα από διερεύνηση με φασματοσκοπία ¹H και ¹³C NMR, καθώς και 2D NMR, αλλά και φασματομετρίας HR-MS. Ακόμη, η σύνθεση των νέων

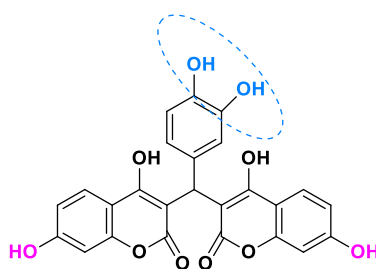
κινολινονών με την παρούσα μέθοδο αναφέρεται επίσης πρώτη φορά στη βιβλιογραφία (Σχήμα 9.11).



Σχήμα 9.11 Σύνθεση δικουμαρινικών και κινολινονικών αναλόγων Σειράς ΣΤ.

Επιπλέον, μελετήθηκε η δυνατότητα ανάκτησης και επαναχρησιμοποίησης του NaDES και βρέθηκε ότι μπορεί να επαναχρησιμοποιηθεί επιτυχώς, χωρίς δηλαδή να μειώνεται σημαντικά η απόδοση της αντίδρασης, τουλάχιστον μέχρι και τρεις φορές, ενισχύοντας τον πράσινο χαρακτήρα της προτεινόμενης συνθετικής πορείας.

Τέλος, τα νέα κουμαρινικά και κινολινονικά ανάλογα μελετήθηκαν ως προς την αντιοξειδωτική τους δράση, με τα παράγωγα **32c** (Σχήμα 9.11) και **32e** (IC₅₀ 8.1 μM και 12.7 μM, στα 60 min, αντίστοιχα) τα οποία διαθέτουν κατεχολικό σύστημα στη δομή τους, και τα παράγωγα **32d**, **32f** και **32i** τα οποία διαθέτουν υδροξυ και μεθοξυ ομάδα σε γειτονικές θέσεις στο φαινολικό δακτύλιο της θέσης 1'' (IC₅₀ 51.6, 63.5 και 37.0 μM, στα 60 min, αντίστοιχα) να παρουσιάζουν αξιόλογη δράση. Όσον αφορά την ικανότητα αναστολής της λιπιδικής υπεροξειδωσης (LP) υποκινούμενη από τον εκκινητή ελευθέρων ριζών AAPH, η πλειοψηφία των δικουμαρινικών αναλόγων παρουσίασε ισχυρή δράση (>80%) ενώ τα κινολινονικά ανάλογα **34a** και **34b**, παρουσίασαν ικανοποιητική, αλλά χαμηλότερη ανασταλτική δράση (70.1% και 68.9%, αντίστοιχα), οδηγώντας στο συμπέρασμα ότι κυριότερη επίδραση στην αντιοξειδωτική δράση φαίνεται να έχει η παρουσία του κουμαρινικού σκελετού, ενώ η ύπαρξη διαφορετικών υποκαταστατών στον δικουμαρινικό σκελετό δε φαίνεται να επιδρά σημαντικά.



32c

DPPH (IC₅₀): 8.1 μM

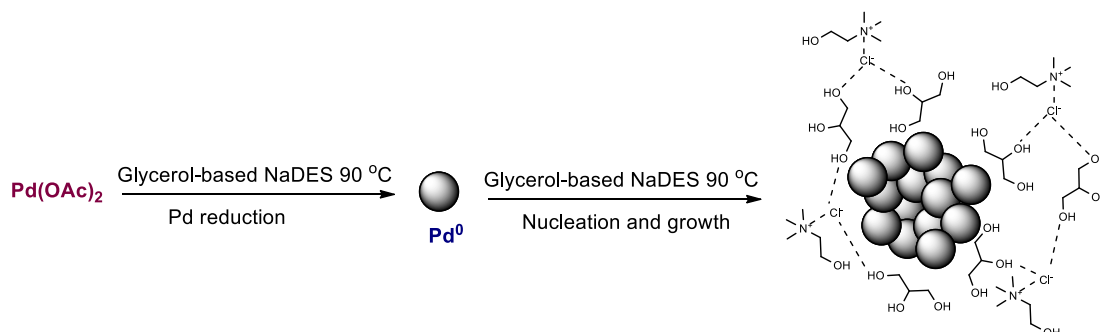
%LP (100 μM): 99.8%

Σχήμα 9.12 Χημική δομή του δικουμαρινικού αναλόγου **32c** που επέδειξε την καλύτερη αντιοξειδωτική δράση.

❖ ΣΕΙΡΑ Ζ

Δέκα νέα 3,6-διυποκατεστημένα κουμαρινικά ανάλογα συντέθηκαν σε υψηλές αποδόσεις (50-97%) μέσω αντίδρασης Suzuki-Miyaura. Αρχικά πραγματοποιήθηκε βελτιστοποίηση των συνθηκών της αντίδρασης, κατά την οποία χρησιμοποιήθηκαν διαφορετικοί διαλύτες (NaDES καθώς και καθαρή γλυκερόλη), βάσεις (Na₂CO₃, K₂CO₃) και καταλύτες (Pd(OAc)₂, PdCl₂) στους 90 °C για 24 h. Βρέθηκε ότι βέλτιστες συνθήκες ως προς την απόδοση αλλά και την καθαρότητα αποτελούν η χρήση του NaDES χλωριούχου χολίνης/γλυκερόλης = 1:2 ως διαλύτη, του Na₂CO₃ ως βάση και καταλύτη Pd(OAc)₂. Στην περίπτωση της χρήσης της 3-(4-ακετυλοξυφαινυλο)-6-βρωμο-4-μεθυλο-κουμαρίνης ως αντιδρώντος, παρατηρήθηκε ότι το τελικό προϊόν της αντίδρασης Suzuki-Miyaura ήταν απακετυλιωμένο.

Ακόμη, ιδιαίτερα σημαντική παρατήρηση αποτέλεσε η προοδευτική αλλαγή του χρώματος της αντίδρασης σε σκούρο γκρι, το οποίο συνδέθηκε με *in situ* σχηματισμό νανοσωματιδίων παλλαδίου (PdNPs). Η μελέτη DLS που πραγματοποιήθηκε υπέδειξε το σχηματισμό νανοσωματιδίων μικρού μεγέθους (<150 nm) στην περίπτωση των NaDES χλωριούχος χολίνη/γλυκερόλη = 1:2 (Σχήμα 9.13) και βεταΐνη/γλυκερόλη = 1:2.



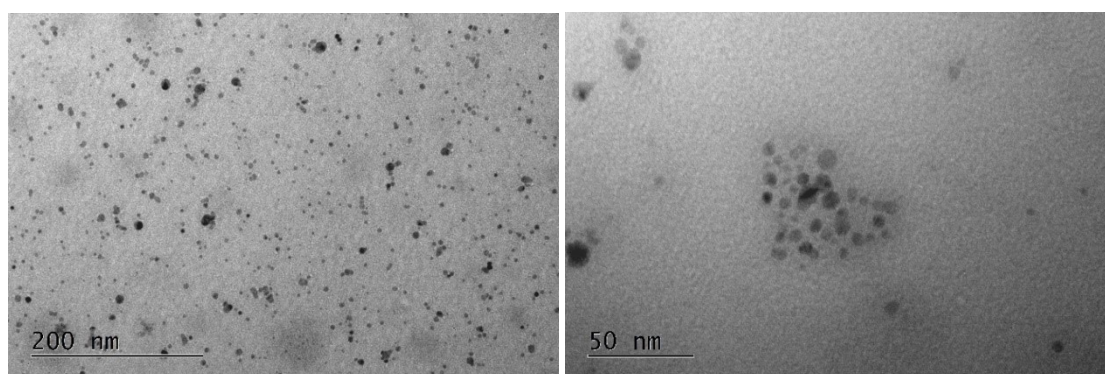
Σχήμα 9.13 Σχηματισμός PdNPs στο NaDES Χλωριούχος χολίνη/Γλυκερόλη = 1:2.

Η παρατήρηση αυτή συνάδει με την απόδοση της αντίδρασης στους συγκεκριμένους NaDES, η οποία είναι υψηλή (70-83%), ενώ στην περίπτωση του NaDES L-προλίνη/γλυκερόλη = 1:2 και της καθαρής γλυκερόλης, όπου είτε σχηματίζονται νανοσωματίδια μεγαλύτερου μεγέθους (470 nm) είτε σχηματίζονται σε μικρό ποσοστό, λαμβάνεται μόνο το προϊόν απακετυλίωσης της κουμαρίνης, καθώς η αντίδραση Suzuki-Miyaura δεν προχωρά (Πίνακας 9.2).

Πίνακας 9.2 Μέγεθος PdNPs στους διαφορετικούς διαλύτες και απόδοση αντίδρασης.

Διαλύτης	Μέση υδροδυναμική διάμετρος (nm)	Απόδοση (%)
Χλωριούχος χολίνη/γλυκερόλη = 1:2	140.6 ± 14.8	70-81
Βεταΐνη/γλυκερόλη = 1:2	128.4 ± 40.0	72-83
L-προλίνη/γλυκερόλη = 1:2	467.1 ± 54.3	ίχνη
Γλυκερόλη	180 nm (25%) > 1 μm (75%)	ίχνη

Τα PdNPs που σχηματίστηκαν σε NaDES χλωριούχος χολίνη/γλυκερόλη = 1:2 εξετάστηκαν ως προς τη μορφολογία τους μέσω Ηλεκτρονικής Μικροσκοπίας Διερχόμενης Δέσμης (Εικόνα 9.2).



Εικόνα 9.2 Εικόνες TEM των PdNPs.

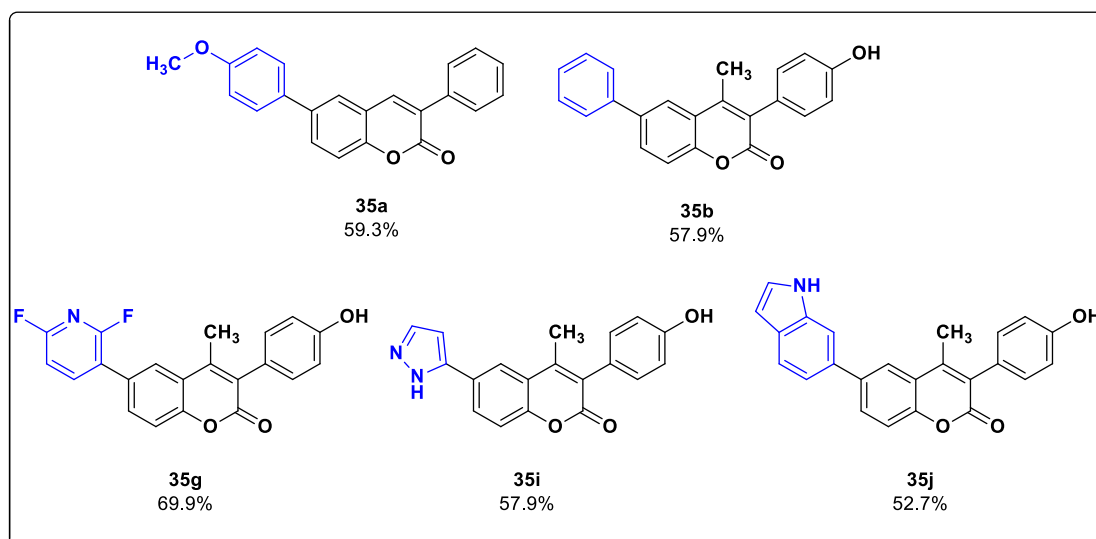
Από τις Εικόνες TEM επιβεβαιώνεται ο σχηματισμός των PdNPs στον NaDES χλωριούχος χολίνη/γλυκερόλη = 1:2, τα οποία έχουν σφαιρικό σχήμα και μέγεθος 5 - 10 nm.

Στη συνέχεια, η αντίδραση απακετυλίωσης μελετήθηκε ξεχωριστά, τόσο σε γλυκερόλη όσο και στο NaDES χλωριούχος χολίνη/γλυκερόλη = 1:2, συμβατικά αλλά και με τη χρήση υπερήχων (Πίνακας 9.3). Σε κάθε περίπτωση ο χρόνος αντίδρασης μειώθηκε σημαντικά με τη χρήση των υπερήχων, ενώ ειδικά στην περίπτωση της γλυκερόλης, ο χρόνος μειώθηκε από 3 h σε 6 min με απόδοση 92%.

Πίνακας 9.3 Εξεταζόμενες συνθήκες της αντίδρασης απακετυλίωσης.

Διαλύτης	Μέθοδος	Χρόνος	Απόδοση (%)
Χλωριούχος χολίνη/γλυκερόλη = 1:2	Συμβατική θέρμανση	3 h	79
Χλωριούχος χολίνη/γλυκερόλη = 1:2	Υπέρηχοι	15 min	73
Γλυκερόλη	Συμβατική θέρμανση	3 h	72
Γλυκερόλη	Υπέρηχοι	6 min	92

Τα νέα κουμαρινικά ανάλογα αξιολογήθηκαν για την κυτταροτοξικότητά τους έναντι της καρκινικής κυτταρικής σειράς A431 στη συγκέντρωση των 100 μM , παρουσιάζοντας στην πλειοψηφία τους αξιόλογη δράση. Τα παράγωγα που παρουσίασαν υψηλότερη δράση παρουσιάζονται στο Σχήμα 9.14.



Σχήμα 9.14 Χημική δομή των αναλόγων **35a**, **35b**, **35g**, **35i** και **35j** που παρουσίασαν την ισχυρότερη κυτταροτοξικότητα έναντι της καρκινικής κυτταρικής σειράς A431.

Τέλος, πραγματοποιήθηκε ο εγκλεισμός επιλεγμένων κουμαρινικών αναλόγων σε λιπιδικούς νανοφορείς νεότερης γενιάς. Τα νανοσυστήματα που παρασκευάστηκαν χαρακτηρίστηκαν με διάφορες μεθόδους (DLS, TEM, FT-IR, TGA), μελετήθηκαν ως προς το προφίλ αποδέσμευσής τους από τους φορείς σε διάφορες συνθήκες και εξετάστηκαν ως προς τη βιολογική τους δράση.

Ειδικότερα, αρχικά, πραγματοποιήθηκε ο εγκλεισμός της φυσικής κουμαρίνης, δαφνετίνη (DAPH) και του συνθετικού αναλόγου της (DHC), σε νανοσωματίδια στερεών λιπιδίων (SLNs) μέσω της μεθόδου γαλακτωματοποίησης-εξάτμισης του διαλύτη σε συνδυασμό με υπερήχους. Η παρασκευή των SLNs μέσω ομογενοποίησης σε συνδυασμό με υπερήχους οδήγησε σε αυξημένες τιμές μεγεθών, το οποίο πιθανώς οφείλεται στην πρόσδοση πλεονάζουσας ενέργειας

που προκαλεί τη συσσωμάτωση τους λόγω των υψηλών τιμών κινητικής ενέργειας που αποκτούν και γι' αυτό αποκλείστηκε.

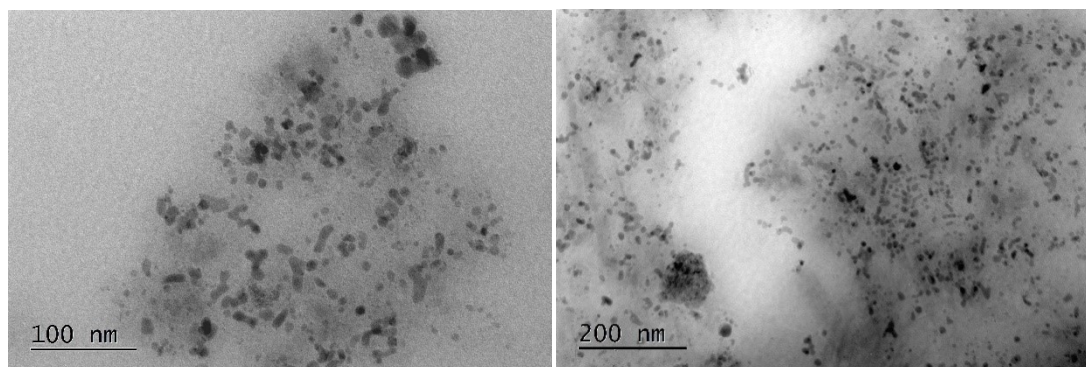
Ακόμη, για τη βελτιστοποίηση της παρασκευής των DHC-SLNs πραγματοποιήθηκε διερεύνηση της αναλογίας των συστατικών. Βέλτιστη αναλογία κρίθηκε η τριμυριστίνη/Tween 80/φωσφατιδυλοχολίνη = 200:100:50 (w/w/w). Τα αποτελέσματα της μεθόδου DLS και οι αποδόσεις διεργασίας και εγκλεισμού για τα DHC-SLNs έπειτα από τη βελτιστοποίηση καθώς και για τα DAPH-SLNs και τα blank SLNs, παρουσιάζονται στον Πίνακα 9.4.

Πίνακας 9.4 Μέση υδροδυναμική διάμετρος, δείκτης πολυδιασποράς (PDI) και ζ-δυναμικό, απόδοση διεργασίας και απόδοση εγκλεισμού των SLNs.

Δείγμα	Μέση υδροδυναμική διάμετρος (nm)	PDI	ζ-δυναμικό	Απόδοση Εγκλεισμού (%)	Απόδοση διεργασίας (%)
DHC-SLNs	230.7 ± 20.3	0.385 ± 0.098	-30.3 ± 2.9	76	44
DAPH-SLNs	256.2 ± 43.3	0.367 ± 0.063	-41.3 ± 1.5	81	60
Blank-SLNs	236.3 ± 24.6	0.380 ± 0.063	-18.5 ± 1.5	-	80

Ακόμη, η μελέτη των νανοσωματιδίων ως προς την υδροδυναμική διάμετρο, το δείκτη PDI, το ζ-δυναμικό και την απόδοση εγκλεισμού σε βάθος ενός και έξι μηνών, υπέδειξε ικανοποιητική σταθερότητα των υδατικών διασπορών υπό συνθήκες ψύξης.

Τα SLNs που παρασκευάστηκαν χωρίς την προσθήκη κουμαρινικού αναλόγου (blank SLNs) εξετάστηκαν στη συνέχεια μορφολογικά μέσω Ηλεκτρονικής Μικροσκοπίας Διερχόμενης Δέσμης (TEM), η οποία υπέδειξε σφαιρική μορφολογία των SLNs με μέγεθος 20-50 nm (Εικόνα 9.3).

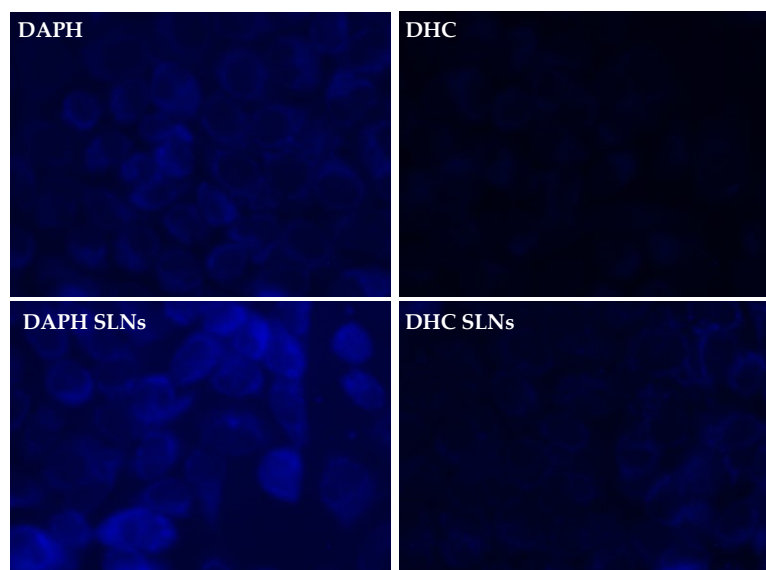


Εικόνα 9.3 Εικόνες TEM των blank SLNs.

Ακολούθησε η μελέτη αποδέσμευσης των κουμαρινικών αναλόγων από τα SLNs, υποδεικνύοντας την εμφάνιση “burst effect” στις πρώτες 2 h για τη δαφνετίνη (περίπου 50-70% απελευθέρωση), ενώ βραδύτερη απελευθέρωση (εμφάνιση περίπου 66% απελευθέρωσης στις 4 h) παρατηρήθηκε για την περίπτωση της

DHC. Σε όλες τις περιπτώσεις, η απελευθέρωση ολοκληρώθηκε στις 24 h, ενώ προέκυψε ότι το κινητικό μοντέλο το οποίο περιγράφει καλύτερα τα προφίλ απελευθέρωσης είναι το μοντέλο Higuchi και ο μηχανισμός απελευθέρωσης η μη-ομαλή διάχυση.

Τα νανοσωματίδια μελετήθηκαν στη συνέχεια ως προς την αντιοξειδωτική τους δράση μέσω διαφορετικών μεθόδων (DPPH και αναστολή της λιπιδικής υπεροξειδωσης) και προέκυψε ότι εμφανίζουν ισχυρότερη δράση σε σχέση με τις καθарές ενώσεις, πιθανώς λόγω συνεργιστικής δράσης με τα λιπίδια των SLNs. Ακολούθησε, η μελέτη των οπτικών ιδιοτήτων τους και της ικανότητάς τους να παράγουν δραστικές μορφές οξυγόνου *in vitro*, όπου παρατηρήθηκε ότι η DHC επέδειξε σημαντική ικανότητα παραγωγής ROS, υψηλότερη από τη δαφνετίνη. Ακόμη, οι μελέτες χωρικού εντοπισμού υπέδειξαν αυξημένη ενδοκυττάρια συκέντρωση των κουμαρινικών αναλόγων έπειτα από επώαση με τα SLNs τους, σε σχέση με την ελεύθερη μορφή (Εικόνα 9.4).



Εικόνα 9.4 Μικροσκοπία φθορισμού των κυττάρων A431 έπειτα από επώαση με τα κουμαρινικά ανάλογα σε εγκλεισμένη και ελεύθερη μορφή.

Τέλος, μελετήθηκε η ικανότητα των κουμαρινικών αναλόγων και των SLNs τους να δρουν ως φωτοευαίσθητοποιητές έναντι της καρκινικής σειράς A431. Και τα δύο κουμαρινικά παράγωγα παρουσίασαν φωτοτοξική δράση, με τη DHC ωστόσο να παρουσιάζει ισχυρή δράση καθώς έπειτα από ακτινοβολήση με 2.16 J/cm² μείωσε την κυτταρική βιωσιμότητα στο 11% τόσο σε εγκλεισμένη όσο και σε ελεύθερη μορφή.

Επιπλέον, πραγματοποιήθηκε ο εγκλεισμός της 7,8-διυδροξυ-4-φαινυλοκουμαρίνης (40), η οποία συντέθηκε μέσω συμπύκνωσης Pechmann, σε τρεις διαφορετικούς λιπιδικούς φορείς: νανοσωματίδια στερεών λιπιδίων (SLNs), νανοδομημένους λιπιδικούς φορείς (NLCs) και νιοσώματα. Για την παρασκευή των SLNs, ακολουθήθηκε εκ νέου η μέθοδος γαλακτωματοποίησης-εξάτμισης του διαλύτη σε συνδυασμό με υπερήχους, χρησιμοποιώντας την αναλογία

τριμυριστίνη/Tween 80/φωσφατιδυλοχολίνη = 200:100:50 (w/w/w), ενώ για τα NLCs χρησιμοποιήθηκε η αναλογία τριμυριστίνη/αμυγδαλέλαιο/Tween 80/φωσφατιδυλοχολίνη = 170:30:100:50 (w/w/w/w). Τέλος, για την παρασκευή των νιοσωμάτων εξετάστηκαν αρκετές διαφορετικές αναλογίες ενώ βέλτιστη βρέθηκε η αναλογία χοληστερόλη/Span 60/κουμαρίνη = 100:200:20 (w/w/w) σε υδατική φάση των 10 mL. Τα αποτελέσματα της μεθόδου DLS, καθώς και των αποδόσεων εγκλεισμού και διεργασίας για τα βέλτιστα νανοσυστήματα παρουσιάζονται στον Πίνακα 9.5.

Πίνακας 9.5 Μέση υδροδυναμική διάμετρος, δείκτης πολυδιασποράς (PDI) και ζ-δυναμικό, απόδοση διεργασίας και απόδοση εγκλεισμού των SLNs, NLCs και νιοσωμάτων.

Δείγμα	Μέση υδροδυναμική διάμετρος (nm)	PDI	ζ-δυναμικό	Απόδοση Εγκλεισμού (%)	Απόδοση διεργασίας (%)
SLNs	265.2 ± 12.6	0.368 ± 0.05	-26.1 ± 1.0	49	79
NLCs	260.0 ± 10.8	0.436 ± 0.04	-29.5 ± 1.0	52	84
Νιοσώματα	191.4 ± 9.7	0.296 ± 0.05	-34.9 ± 0.8	43	36

Στη συνέχεια, τόσο η ελεύθερη κουμαρίνη όσο και τα λιπιδικά νανοσυστήματα με εγκλωβισμένη κουμαρίνη ή χωρίς (blank) χαρακτηρίστηκαν μέσω φασματοσκοπίας FT-IR, η οποία υπέδειξε αλληλεπιδράσεις μεταξύ του κουμαρινικού αναλόγου και των φορέων ως ένδειξη του επιτυχούς εγκλεισμού της. Ακόμη, πραγματοποιήθηκε η μελέτη απεδέσμησης της κουμαρινικής ένωσης από το κάθε λιπιδικό σύστημα στους 37 °C και σε pH 7.4. Παρατηρήθηκε ταχεία απελευθέρωση της ένωσης στις πρώτες 5 h (52-68%), η οποία ολοκληρώθηκε στις 24 h (76-86%), ενώ όλα τα προφίλ απελευθέρωσης προσαρμόζονται καλύτερα στο μοντέλο κινητικής απελευθέρωσης Higuchi. Τέλος, ο μηχανισμός απελευθέρωσης της ένωσης από τα SLNs και τα νιοσώματα είναι η μη-ομαλή διάχυση, ενώ για τα NLCs η διάχυση κατά Fick όπως υπέδειξε το ημι-εμπειρικό μοντέλο Korsmeyer-Peppas.

Επιπλέον, πραγματοποιήθηκε μελέτη της αντιοξειδωτικής δράσης του κουμαρινικού αναλόγου σε ελεύθερη και εγκλεισμένη μορφή μέσω της ικανότητας δέσμησης της ελεύθερης ρίζας DPPH. Η 7,8-διυδροξυ-4-φαινυλοκουμαρίνη παρουσίασε τιμή IC₅₀ 12.7 μM στα 60 min, ενώ τα SLNs, NLCs και νιοσώματά της παρουσίασαν τιμές IC₅₀ 15.7 μM, 13.2 μM και 19.7 μM, αντίστοιχα. Συνεπώς, τα NLCs φαίνεται να αποτελούν το βέλτιστο λιπιδικό νανοφορέα για τον εγκλωβισμό της 7,8-διυδροξυ-4-φαινυλοκουμαρίνης, καθώς διατήρησαν καλύτερα την αντιοξειδωτική δράση του κουμαρινικού αναλόγου, με τη μορφή μάλιστα υδατικής διασποράς, ενώ παρουσίασαν και την υψηλότερη απόδοση εγκλεισμού (84%).

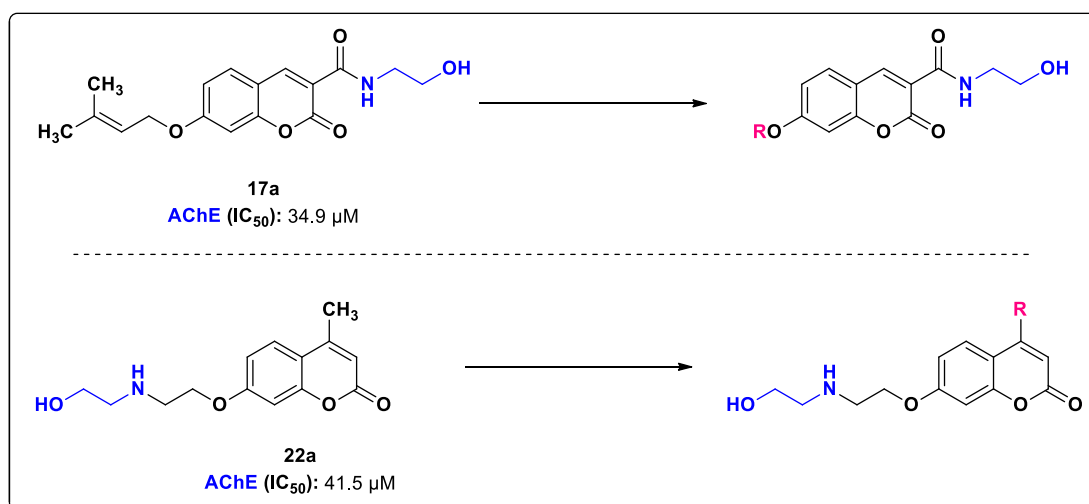
9.2 ΜΕΛΛΟΝΤΙΚΕΣ ΠΡΟΤΑΣΕΙΣ

Η παρούσα διδακτορική διατριβή οδήγησε στην ανάπτυξη μίας «χημικής βιβλιοθήκης» νέων κουμαρινικών αναλόγων, τα οποία παρουσιάζουν ένα ευρύ φάσμα βιολογικών δράσεων, ενώ αναπτύχθηκαν και νέες συνθετικές πορείες. Ακόμη, πραγματοποιήθηκε επιτυχώς ο εγκλεισμός κουμαρινικών αναλόγων φυσικής ή και συνθετικής προέλευσης σε λιπιδικά νανοσυστήματα. Τα αποτελέσματα αυτά μπορούν να αποτελέσουν έναυσμα καθώς και να θέσουν τα θεμέλια για περαιτέρω έρευνα στους τομείς της Φαρμακευτικής και Πράσινης Χημείας, αλλά και της Νανοτεχνολογίας.

Αρχικά, όσον αφορά τα μόρια των Σειρών Γ και Δ, προτείνεται η μελέτη της ικανότητάς τους να αναστέλλουν *in vitro* τη δράση των χολινεστερασών AChE και BuChE, ανθρώπινης προέλευσης. Ακόμη, θα ήταν χρήσιμο να πραγματοποιηθούν *in silico* πειράματα μοριακής πρόσδεσης στο ενεργό κέντρο της AChE από τον οργανισμό *electrophorus electricus*, και στο ενεργό κέντρο της BuChE ανθρώπινης προέλευσης ή / και αλόγου.

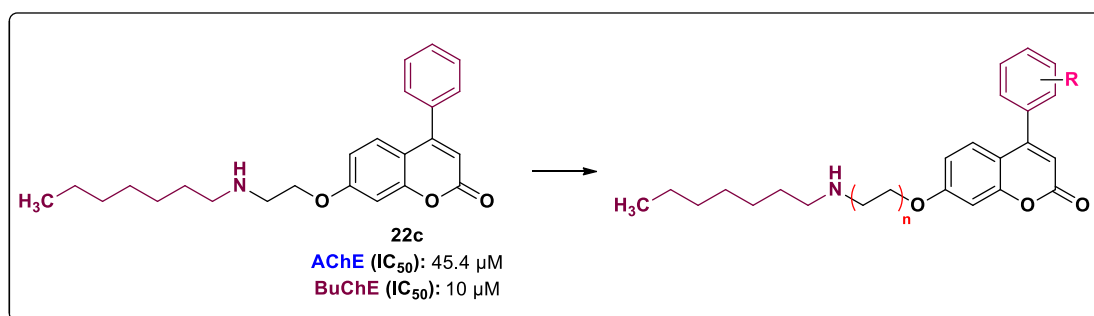
Όσον αφορά τη δομική τροποποίηση του κουμαρινικού σκελετού, προέκυψαν σημαντικά συμπεράσματα σχέσης δομής-δράσης και ενδεικτικά όσον αφορά την ικανότητα αναστολής της δράσης των χολινεστερασών, προτείνεται:

- ✓ η σύνθεση νέων μορίων που θα περιέχουν το δομικό χαρακτηριστικό της αιθανολαμίνης αλλά θα φέρουν διαφορετικές ομάδες στη θέση 4 ή 7 του κουμαρινικού σκελετού (Σχήμα 9.15),



Σχήμα 9.15 Προτεινόμενες δομικές τροποποιήσεις του κουμαρινικού σκελετού για την αναστολή της AChE.

- ✓ η σύνθεση νέων μορίων που θα περιέχουν το δομικό συστατικό της επτυλαμίνης αλλά θα φέρουν διάφορους υποκαταστάτες στο φαινολικό δακτύλιο της θέσης 4, καθώς και διαφορετικό μήκος της αλιφατικής αλυσίδας της θέσης 7, όπως φαίνεται στο Σχήμα 9.16.



Σχήμα 9.16 Προτεινόμενες δομικές τροποποιήσεις του κουμαρινικού σκελετού για την αναστολή των AChE και BuChE.

Σχετικά με τη σύνθεση των βενζοπυρανοκουμαρινών και των κινολινονών που πραγματοποιήθηκε με τη χρήση του NaDES L-προλίνη/γαλακτικό οξύ = 1:2, θα μπορούσε να πραγματοποιηθεί η διεξαγωγή των αντιδράσεων σε διαφορετικούς NaDES, αλλά και συμβατικούς διαλύτες προκειμένου να διαπιστωθεί η επίδραση του διαλύτη στην εξέλιξη της αντίδρασης.

Ακόμη, προτείνεται να διερευνηθεί περαιτέρω ο σχηματισμός νανοσωματιδίων παλλαδίου στους NaDES, αφού δεν υπάρχει αρκετή σχετική βιβλιογραφία, και να εξεταστούν παράγοντες που πιθανώς επηρεάζουν τη σύνθεσή τους, όπως το ιξώδες του διαλύτη. Ακόμη, θα ήταν χρήσιμο να διερευνηθεί η χρήση εναλλακτικών NaDES που θα αποτελούνται από διαφορετικά συστατικά, όπως η πολυαιθυλενογλυκόλη ή ακόμη και χωρίς πολυόλες, στη σύνθεση των PdNPs.

Επιπρόσθετα, θα μπορούσε να εξεταστεί η σύνθεση των κουμαρινικών αναλόγων που παρουσίασαν χαμηλές αποδόσεις με τεχνικές υψηλής ενέργειας όπως η υπερήχηση και η μικροκυματική ακτινοβολία, οι οποίες συχνά οδηγούν σε συντομότερους χρόνους και υψηλότερες αποδόσεις αντίδρασης.

Τέλος, όσον αφορά τον εγκλεισμό των κουμαρινικών αναλόγων σε κατάλληλους νανοφορείς, θα είχε ιδιαίτερο ενδιαφέρον η ανάπτυξη νέων συστημάτων με τα κουμαρινικά ανάλογα της παρούσας διατριβής που παρουσίασαν αξιολογη βιολογική δράση με σκοπό την αύξηση της υδατοδιαλυτότητάς τους και πιθανώς τη βελτίωση της βιοδραστικότητάς τους. Ακόμη, εκτός από τα λιπιδικά συστήματα προτείνεται και ο εγκλεισμός των ενώσεων σε διαφορετικούς φορείς όπως οι κυκλοδεξτρίνες, η χιτοζάνη, το αλγινικό κ.α. ανάλογα με την επιθυμητή εφαρμογή.

ΕΠΙΣΤΗΜΟΝΙΚΕΣ ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ ΠΟΥ ΠΡΟΕΚΥΨΑΝ ΑΠΟ ΤΗΝ
ΠΑΡΟΥΣΑ ΔΙΑΤΡΙΒΗ ΣΕ ΔΙΕΘΝΗ ΠΕΡΙΟΔΙΚΑ ΜΕ ΚΡΙΤΕΣ

1. **Katopodi A.**, Safari, K., Kalospyros, A., Politopoulos, K., Eleni Alexandratou, E., Detsi, A. Preparation and characterization of solid lipid nanoparticles incorporating bioactive coumarin analogues as photosensitizing agents, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, **2023**, 229, 113439; <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2023.113439>
2. Kavetsou, E., Tsoukalas-Koulas C., **Katopodi A.**, Kalospyros, A., Alexandratou, E. and Detsi, A. Inclusion Complexes of Magnesium Phthalocyanine with Cyclodextrins as Potential Photosensitizing Agents. *Bioengineering*, **2023**, 10(2), 244; <https://doi.org/10.3390/bioengineering10020244>
3. Giannakopoulos, E., **Katopodi, A.**, Rallis, M., Politopoulos, K., & Alexandratou, E. The effects of low power laser light at 661 nm on wound healing in a scratch assay fibroblast model. *Lasers in Medical Science*, 2023, 38(1), 1-9; <https://doi.org/10.1007/s10103-022-03670-5>
4. Adjali, A., Pontillo, A. R. N., Kavetsou, E., **Katopodi, A.**, Tzani, A., Grigorakis, S., Loupassaki, S., & Detsi, A. Clove Essential Oil–Hydroxypropyl-β-Cyclodextrin Inclusion Complexes: Preparation, Characterization and Incorporation in Biodegradable Chitosan Films. *Micro*, **2022**, 2(1), 212-224; <https://doi.org/10.3390/micro2010014>
5. Kavetsou, E., Pitterou, I., **Katopodi, A.**, Petridou, G., Adjali, A., Grigorakis, S., & Detsi, A. Preparation, Characterization, and Acetylcholinesterase Inhibitory Ability of the Inclusion Complex of β-Cyclodextrin–Cedar (*Juniperus phoenicea*) Essential Oil. *Micro*, **2021**, 1(2), 250-266; <https://doi.org/10.3390/micro1020019>
6. **Katopodi, A.**, Tsotsou, E., Iliou, T., Deligiannidou, G.E., Pontiki, E., Kontogiorgis, C., Tsopelas, F., & Detsi, A. Synthesis, bioactivity, pharmacokinetic and biomimetic properties of multi-substituted coumarin analogues. *Molecules*, **2021**, 26(19), 5999; <https://doi.org/10.3390/molecules26195999> (Highlighted on the main page of Molecules)
7. **Katopodi, A.**, & Detsi, A. Solid Lipid Nanoparticles and Nanostructured Lipid Carriers of natural products as promising systems for their bioactivity enhancement: The case of essential oils and flavonoids. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, **2021**, 127529; <https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2021.127529>
8. Kavetsou, E., **Katopodi, A.**, Argyri, L., Chainoglou, E., Pontiki, E., Hadjipavlou-Litina, D., Chroni, A., & Detsi, A. Novel 3-aryl-5-substituted-coumarin analogues: Synthesis and bioactivity profile. *Drug development research*, **2020**, 81(4), 456-469; <https://doi.org/10.1002/ddr.21639>

ΑΝΑΚΟΙΝΩΣΕΙΣ ΣΕ ΔΙΕΘΝΗ ΕΠΙΣΤΗΜΟΝΙΚΑ ΣΥΝΕΔΡΙΑ

1. E. Kavetsou, A. Liati, G. M. aladino, **A. Katopodi**, A. Kalospyros, E. Alexandratou, M. S. Toprak, A. Detsi, Novel hybrid, chemically crosslinked hydrogel networks and their application in photodynamic therapy, International Meeting of Young Researchers, INNOGLY & GLYCONanoPROBES, Iași, Romania, 20-21 April 2023,
2. **A. Katopodi**, K. Safari, K. Politopoulos, E. Alexandratou, A. Detsi, Development of solid lipid nanoparticles incorporating bioactive coumarin analogues as photosensitizing agents, 10th oxidative stress conference, Andros, Greece, 15-18 September 2022 (oral presentation)
3. E. Giannakopoulos, **A. Katopodi**, M. Rallis, K. Politopoulos, E. Alexandratou, Investigation of the effect of low level red light and photodynamic therapy in a fibroblast scratch wound model, 10th oxidative stress conference, Andros, Greece, 15-18 September 2022
4. A. Kalospyros, E. Kavetsou, **A. Katopodi**, E. Alexandratou, D. Hadjipavlou-Litina, E. Pontiki, A. Detsi, Synthesis and bioactivity evaluation of novel coumarin – phenolic acid hybrids, 10th oxidative stress conference, Andros, Greece, 15-18 September 2022
5. A. Georgiadi, **A. Katopodi**, E. Kavetsou, K. Politopoulos, A. Detsi, E. Alexandratou, Curcumin loaded niosomes in photodynamic therapy of skin cancer, 10th oxidative stress conference, Andros, Greece, 15-18 September 2022
6. **A. Katopodi**, A. Detsi, A greener approach towards coumarin analogues via Natural Deep Eutectic Solvent-mediated Suzuki-Miyaura coupling, IUPAC International Conference on Green Chemistry (9th ICGC), Athens, Greece 5-9 September 2022
7. A. Tzani, S. Kalafateli, M.A. Karadendrou, **A. Katopodi**, I. Kostopoulou, D. Bobolou, A. Bon, D. Nanou, S. Kalantzi, Z. Lemoni, D. Mamma, E. Maloupa, K. Papanastasi, K. Grigoriadou, N. Krigas, A. Papadopoulou, D. Kletsas, I. Samanidis, K. Aggeli, G. Stavropoulos, A. Detsi. Natural Deep Eutectic Solvents (NADES) as green alternative solvents for the extraction of bioactive compounds from Greek wild rose (*Rosa canina* L.) rosehip shells (hypanthia), IUPAC International Conference on Green Chemistry (9th ICGC), Athens, Greece 5-9 September 2022
8. **A. Katopodi**, N. Nikolaou, A. Detsi, Screening of Natural Deep Eutectic Solvents as media for the Suzuki-Miyaura coupling for the synthesis of 3,6-diaryl-coumarin analogues, Athens Summer School on Organic Synthesis 2022, Athens, Greece 7-9 July 2022 (oral presentation)
9. **A. Katopodi**, G. Eressiou, N. Nikolaou, A. Detsi, Natural Deep Eutectic Solvents as a tool for the development of novel synthetic strategies towards coumarin analogues, 22nd Tetrahedron Symposium: Catalysis for a sustainable world, Lisbon, Portugal, June 28 - July 1, 2022
10. **A. Katopodi**, E. Kavetsou, A. Kalospyros, E. Georgiopoulou, K. Politopoulos, E. Alexandratou, A. Detsi, Design and synthesis of new bioactive and photosensitive compounds based on the coumarin scaffold, 9th International Conference on Oxidative Stress in Skin Medicine and Biology, Virtual Symposium, September 9 - 12, 2021

11. E. Kavetsou, **A. Katopodi**, H. Tsoukalas, E. Alexandratou, A. Detsi, Preparation of magnesium phthalocyanine- β - cyclodextrins inclusion complexes as potential photosensitizing agents, 9th International Conference on Oxidative Stress in Skin Medicine and Biology, Virtual Symposium, September 9 - 12, 2021
12. A. Kalospyros, **A. Katopodi**, P. Panousaki, G. Eressiou, A. Detsi, Design, Synthesis and Biological Evaluation of Novel Coumarin Analogues as Potent Acetylcholinesterase Inhibitors, Athens Summer School on Organic Synthesis 2021(ASSOS2021), Virtual Symposium, August 25-27, 2021
13. **A. Katopodi**, A. Kalospyros, G. Erresiou, P. Panousaki, E. Kritsi Eftichia, M. Zervou, A. Detsi, Design, synthesis and molecular docking studies of acetylcholinesterase inhibitors based on the coumarin scaffold, European Symposium on Organic Chemistry, Virtual Symposium, July 5-6, 2021
14. **A. Katopodi**, A. Kalospyros, P. Panousaki, F. Marinou, A. Detsi, Design and synthesis of novel coumarin analogues as potent acetylcholinesterase inhibitors, XXIX European Colloquium on Heterocyclic Chemistry. Virtual Event, 26-28 April 2021
15. I. Pitterou, **A. Katopodi**, A. Tsami, E. Kavetsou, T. Lympelopoulou, A. Detsi, Encapsulation of citrus and cedar essential oils in β -cyclodextrins and evaluation of their ability to inhibit acetylcholinesterase, XXIX European Colloquium on Heterocyclic Chemistry. Virtual Event, 26-28 April 2021
16. 12. E. Kavetsou, **A. Katopodi**, I. Pitterou, A. Kalospyros, E. Pontiki, D. Hadjipavlou-Litina, A. Detsi, Improving the biological activity of natural and synthetic coumarin analogues via complexation with β -cyclodextrin, XXIX European Colloquium on Heterocyclic Chemistry. Virtual Event, 26-28 April 2021
17. 13. **A. Katopodi**, K. Safari, A. Spanou, E. Kavetsou, A. Detsi, Enhancing the antioxidant activity of the natural coumarin daphnetin and its substituted analogues by their encapsulation in solid lipid nanoparticles, Applied Nanotechnology and Nanoscience International Conference, 24-26 March 2021, Online Conference
18. 14. **A. Katopodi**, I. Pitterou, G. Petridou, R. Spanou, E. Kavetsou, A. Detsi, Cedar essential oil- β -cyclodextrin nanocomplex formation for the effective inhibition of acetylcholinesterase, Applied Nanotechnology and Nanoscience International Conference, 24-26 March 2021, Online Conference
19. 15. I. Pitterou, **A. Katopodi**, E. Kavetsou, A. Detsi, Development of solid lipid nanoparticles (SLNs) and nanostructured lipid carriers (NLCs) for the encapsulation and sustained release of the flavonoid naringin, Applied Nanotechnology and Nanoscience International Conference, 24-26 March 2021, Online Conference
20. 16. **A. Katopodi**, E. Kavetsou, A. Kalospyros, E. Pontiki, D. Hadjipavlou-Litina, A. Chroni, A. Detsi, 3-aryl-coumarins and coumarin-chalcone hybrids possessing dual bioactivity, Athens Conference on Advances in Chemistry 2018, Athens, Greece, October 30 to November 2, 2018
21. 17. **A. Katopodi**, E. Kavetsou, A. Kalospyros, E. Pontiki, D. Hadjipavlou-Litina, A. Chroni, A. Detsi, New bioactive compounds sharing the coumarin framework as a common structural feature, 8th International Conference on Oxidative Stress in Skin Medicine and Biology, Andros, Greece, 6-9 September 2018

22. 18. E. Kavetsou, **A. Katopodi**, I. Pitterou, A. Gousseau, A. Detsi, Encapsulation of bioactive coumarin analogues in various nanocarriers, 8th International Conference on Oxidative Stress in Skin Medicine and Biology, Andros, Greece, 6-9 September 2018
23. 19. E. Kavetsou, **A. Katopodi**, L. Argyri, E. Pontiki, D. Hadjipavlou-Litina, A. Chroni, A. Detsi, Novel multi-substituted coumarin analogues: Synthesis and bioactivity profile, 4th International Conference on Current Trends in Cancer Theranostics, TonyResort, Lithuania, 1-5 July 2018
24. 20. E. Kavetsou, **A. Katopodi**, I. Pitterou, T. Liargkova, E. Pontiki, D. Hadjipavlou-Litina, A. Detsi, Design and synthesis of novel substituted coumarins and assessment of their antioxidant and lipoxygenase inhibitory activity, 19th Tetrahedron Symposium, Rive del Garda, Lake Garda, Italy, 26-29 June 2018
25. 21. E. Kavetsou, **A. Katopodi**, I. Pitterou, C. Gkolfinopoulou, L. Argyri, S. Kikionis, E. Pontiki, D. Hadjipavlou-Litina, A. Chroni, A. Detsi, Improving the biological activity of natural products via complexation with β -Cyclodextrin: the case of 4-methyl-umbelliferone, 15th European Symposium on Controlled Drug Delivery, Hotel Zuiderduin in Egmond aan Zee, The Netherlands, 11-13 April 2018

ΑΝΑΚΟΙΝΩΣΕΙΣ ΣΕ ΠΑΝΕΛΛΗΝΙΑ ΕΠΙΣΤΗΜΟΝΙΚΑ ΣΥΝΕΔΡΙΑ

1. E. Kavetsou, A. Liati, **A. Katopodi**, A. Kalospyros, E. Alexandratou, A. Detsi, Novel photosensitizers for the chemically crosslinked hydrogel networks and their application in photodynamic therapy 19th Hellenic Symposium on Medicinal Chemistry, Patras, Greece 9-11 March 2023
2. I. Vassos, M.-A. Karadendrou, I. Kostopoulou, **A. Katopodi**, A. Kalospyros, E. Alexandratou, A. Detsi, Synthesis of multisubstituted 2'-hydroxy chalcones and evaluation of their photophysical properties, 19th Hellenic Symposium on Medicinal Chemistry Patras, Greece 9-11 March 2023
3. **A. Katopodi**, E. Tsotsou, T. Iliou, E. Deligiannidou, C. Kontogiorgis, F. Tsopelas, A. Detsi, Synthesis of novel coumarin derivatives and evaluation of their biomimetic and cytotoxic properties, 18th Hellenic Symposium on Medicinal Chemistry, 25-27 February 2021, Online Conference.
4. **A. Katopodi**, E. Kavetsou, F. Marinou, E. Pontiki, D. Hadjipavlou-Litina, A. Chroni, A. Detsi, Synthesis of novel 3-aryl-coumarins with combined anti-inflammatory and cytotoxic activity, 12th Panhellenic Scientific Conference of Chemical Engineering, Athens, Greece 29-31 May 2019 (AWARDED as the best poster presentation in the "Applied Chemistry" section).