ΕΘΝΙΚΟ ΜΕΤΣΟΒΙΟ ΠΟΛΥΤΕΧΝΕΙΟ
ΣΧΟΛΗ ΧΗΜΙΚΩΝ ΜΗΧΑΝΙΚΩΝ
ΤΟΜΕΑΣ (Ι) ΧΗΜΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΟΡΓΑΝΙΚΗΣ ΧΗΜΕΙΑΣ

Σύνθεση και μελέτη βιοδραστικότητας ινδολικών χαλκονών

Διπλωματική εργασία

Μαρία Κουκή

Επιβλέπουσα

Αναστασία Δέτση

Καθηγήτρια Ε.Μ.Π.

Αθήνα, 2024

Ευχαριστίες

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στο εργαστήριο Οργανικής Χημείας της Σχολής Χημικών Μηχανικών του Εθνικού Μετσόβιου Πολυτεχνείου, κατά το ακαδημαϊκό έτος 2023–2024, υπό την επίβλεψη της Δρ. Αναστασίας Δέτση, Καθηγήτριας Ε.Μ.Π.

Πρωτίστως, οφείλω να ευχαριστήσω τη Δρ. Αναστασία Δέτση για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε και για την ευκαιρία που μου έδωσε να ασχοληθώ με ένα τόσο ενδιαφέρον θέμα, καθώς και για τη βοήθεια, τις συμβουλές και την καθοδήγηση που μου προσέφερε καθ' όλη τη διάρκεια εκπόνησης της διπλωματικής μου εργασίας.

Θα ήθελα, επίσης, να ευχαριστήσω θερμά τον υποψήφιο διδάκτορα στο εργαστήριο Οργανικής Χημείας Ε.Μ.Π., Σταύρο Νεοφώτιστο, για την συνεχή υποστήριξή του, τη βοήθειά του σε όλα τα προβλήματα που προέκυπταν, την άψογη συνεργασία που είχαμε και κυρίως για τις γνώσεις που μου προσέφερε, συνιστώντας καθοριστικό παράγοντα στην ολοκλήρωση της παρούσας διπλωματικής εργασίας.

Δεν θα μπορούσα να μην ευχαριστήσω και τα υπόλοιπα μέλη του εργαστηρίου Οργανικής Χημείας Ε.Μ.Π., τόσο τους υποψήφιους διδάκτορες που ήταν πάντα πρόθυμοι να επιλύσουν οποιαδήποτε απορία, όσο και τους συμφοιτητές μου για το ευχάριστο κλίμα στο εργαστήριο.

Τέλος, είμαι ευγνώμων για τη συνεχή συμπαράσταση και υποστήριξη της οικογένειας και των φίλων μου, τόσο κατά την περίοδο εκπόνησης της διπλωματικής μου εργασίας, όσο και κατά τη διάρκεια φοίτησής μου στη σχολή.

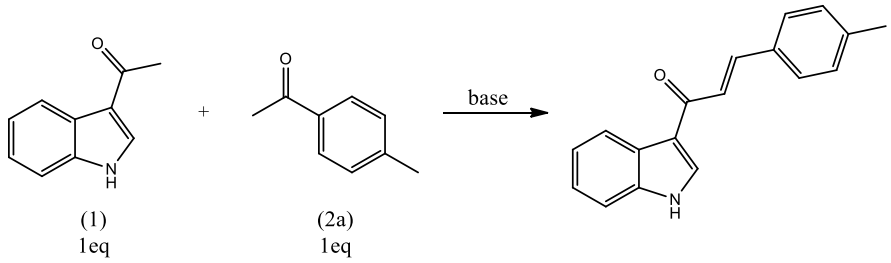
Περίληψη

Σκοπός της παρούσας διπλωματικής εργασίας είναι η ανάπτυξη μιας μεθοδολογίας σύνθεσης ινδολικών χαλκονών μέσω της αντίδρασης συμπύκνωσης Claisen-Schmidt μεταξύ της κετόνης του ινδολίου και μιας αλδεΰδης.

Το ινδόλιο είναι ένα φυσικό προϊόν που ανήκει στην οικογένεια των αλκαλοειδών αποτελούμενο από ένα σύστημα ετεροκυκλικών δακτυλίων, ενός εξαμελούς βενζολίου και ενός πενταμελούς πυρρολικού δακτυλίου, οι οποίοι μοιράζονται έναν διπλό δεσμό. Αυτό, όπως και τα παράγωγά του, έχει αποδειχθεί ότι έχει διάφορες βιολογικές δράσεις, όπως αντικαρκινική, αντιμικροβιακή, αντι-ιική, αντιφλεγμονώδη και αντιοξειδωτική δράση.

Επίσης, οι χαλκόνες αποτελούν μια σημαντική κατηγορία βιοδραστικών ενώσεων που ανήκουν στην οικογένεια των φλαβονοειδών και διαθέτουν δύο αρωματικούς δακτυλίους συνδεδεμένους με ένα α,β-ακόρεστο καρβονυλικό σύστημα τριών ανθράκων. Εμφανίζουν ιδιαίτερα σημαντική βιοδραστικότητα, η οποία περιλαμβάνει αντικαρκινική, αντιφλεγμονώδη, αντιμικροβιακή, αντιδιαβητική και αντιοξειδωτική δράση.

Προκειμένου, λοιπόν, να συντεθούν ινδολικές χαλκόνες ως αντίδραση-μοντέλο θεωρήθηκε η αντίδραση ανάμεσα στο 3-ακετυλο-ινδόλιο **(1)** και την 4-μεθυλοβενζαλδεΰδη **(2a)**, όπως απεικονίζεται παρακάτω:



(1)
1eq

(2a)
1eq

Ειδικότερα, η αντίδραση-μοντέλο πραγματοποιήθηκε χρησιμοποιώντας διαφορετικές βάσεις (NaOH, KOH, *t*-BuOK), διαφορετικούς διαλύτες (EtOH, *i*-PrOH), καθώς και διαφορετικούς τρόπους θέρμανσης (θερμοκρασία δωματίου, με χρήση αναρροής και με χρήση υπερήχων), με μολαρική αναλογία αντιδρώντων **(1)** και **(2a)** ίση με 1:1 και αναλογία βάσης 1:3. Αρχικά, κατά την πραγματοποίηση της αντίδρασης σε θερμοκρασία περιβάλλοντος με διαλύτη EtOH για 24 h βρέθηκε ότι καλύτερα αποτελέσματα προσφέρει η χρήση της βάσης KOH με απόδοση ίση με 48,2%, ενώ στη χαμηλότερη απόδοση (40,4%) οδηγεί η χρήση της βάσης NaOH.

Με χρήση της βάσης KOH και διαφορετικών διαλυτών και τρόπων θέρμανσης, προκειμένου να αυξηθεί η απόδοση της αντίδρασης, προέκυψε ότι η αιθανόλη ως διαλύτης έχει τα βέλτιστα αποτελέσματα με τη μέγιστη απόδοση (60,9%) να επιτυγχάνεται με τη βοήθεια συμβατικής θέρμανσης με αναρροή. Η αντίδραση με αυτό το είδος θέρμανσης ολοκληρώνεται σε 5 h, έναντι των 20 min με χρήση υπερήχων, ωστόσο, προτιμάται η συμβατική θέρμανση, διότι η πραγματοποίηση της αντίδρασης με υπερήχους οδηγεί στην παραγωγή πληθώρας παραπροϊόντων.

Σε μια προσπάθεια γενίκευσης της μεθοδολογίας σύνθεσης ινδολικών χαλκονών, μέσω της βελτιστοποιημένης οδού που προαναφέρθηκε, συντέθηκαν 10 χαλκόνες με χρήση

αλδεϋδών με διαφορετικούς υποκαταστάτες (ενώσεις **3a** – **3j**) και αποδόσεις που κυμαίνονταν από 44,2 έως 80,5%. Η καθαρότητα των τελικών προϊόντων ελέγχθηκε μέσω φασματοσκοπίας NMR και FTIR.

Οι συντιθέμενες ινδολικές χαλκόνες εξετάστηκαν ως προς την ικανότητά τους να αλληλεπιδράσουν με το DNA θύμου αδένα βοοειδούς (CT-DNA) μέσω *in silico* και *in vitro* μελέτης, καθώς η αλληλεπίδραση αυτή μπορεί να οδηγήσει σε αξιοποίηση των ενώσεων σε αντικαρκινικά φάρμακα. Προέκυψε ότι όλες οι ενώσεις μπορούν να συνδεθούν στη μικρή αύλακα του DNA μέσω μη ομοιοπολικών δεσμών, όπως είναι οι αλληλεπιδράσεις van der Waals και οι δεσμοί υδρογόνου. Επιπρόσθετα, οι περισσότερες συντιθέμενες χαλκόνες φαίνεται να αποσταθεροποιούν τη διπλή έλικα του DNA κατά τη δέσμευσή τους με αυτό. Ενδεικτικά, αναφέρεται ότι την ισχυρότερη δέσμευση με το DNA παρουσιάζει η ένωση **(3e)**, η οποία διαθέτει δύο μεθόξυ-ομάδες ως υποκαταστάτες του δακτυλίου Β σε δύο διαδοχικές θέσεις. Βιβλιογραφικά, δεν έχει πραγματοποιηθεί αντίστοιχη συγκριτική μελέτη *in vivo* και *in silico* για το ίδιο εύρος ενώσεων, γεγονός που αποτελεί το καινοτόμο κομμάτι της εργασίας. Επιπλέον, από τη μελέτη προκύπτει μια πρώτη εκτίμηση της σχέσης δομής-δράσης, η οποία μπορεί να συμβάλει στην περαιτέρω ανάπτυξη αυτών των ενώσεων ως πιθανά αντικαρκινικά φάρμακα.

Επιστημονική περιοχή: Οργανική Χημεία, Φαρμακευτική Χημεία

Λέξεις-Κλειδιά: Φυσικά προϊόντα, Ινδόλιο, Χαλκόνες, Υβριδικά μόρια, Ετεροκυκλικές ενώσεις, Αλληλεπίδραση με CT-DNA

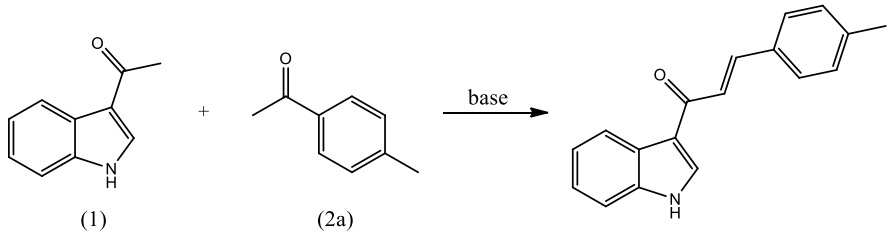
Abstract

The purpose of this diploma thesis is to develop a methodology for the synthesis of indole chalcones through the Claisen-Schmidt reaction and more specifically through the condensation of indole ketone and an aldehyde.

Indole is a natural product belonging to the alkaloid family consisting of a system of heterocyclic rings, a six-membered benzene and a five-membered pyrrole ring, which share a double bond. This, as well as its derivatives, has been shown to have various biological activities, such as anticancer, antimicrobial, antiviral, anti-inflammatory and antioxidant activity.

Also, chalcones are an important class of bioactive compounds belonging to the flavonoid family consisted of two aromatic rings linked by an α,β-unsaturated three-carbon carbonyl system. They display particularly significant bioactivity, which includes anticancer, anti-inflammatory, antimicrobial, antidiabetic and antioxidant activity.

Therefore, to synthesise indole chalcones, the reaction between 3-ketyl-indole **(1)** and 4-methylbenzaldehyde **(2a)** was considered as a model-reaction, as illustrated below:



In particular, the model-reaction was carried out using different bases (NaOH, KOH, *t*-BuOK), different solvents (EtOH, *i*-PrOH), as well as different heating methods (room temperature, reflux and ultrasound), with a 1:1 reactant ratio and a 1:3 base ratio. Initially, when the reaction was carried out at room temperature with EtOH as solvent for 24 h, it was found that the best results were obtained using KOH with a yield equal to 48,2%, while the lowest yield (40,4%) was obtained using NaOH.

Using KOH and different solvents and heating methods to increase the reaction yield, it was found that ethanol as a solvent has the best results with the maximum yield (60,9%) being obtained with the help of conventional reflux heating. The reaction with this type of heating is completed in 5 h, compared to 20 min using ultrasounds as a heating source, however, conventional heating is preferred because carrying out the reaction with ultrasounds leads to the production of a multitude of by-products.

In an attempt to broaden the scope of the optimized methodology for the synthesis of indole chalcones, through the optimized route mentioned above, 10 chalcones were synthesized using aldehydes with different substituents (compounds **3a - 3j**) and yields ranging from 44,2 to 80,5%. The purity of the final products was monitored by NMR and FTIR spectroscopy.

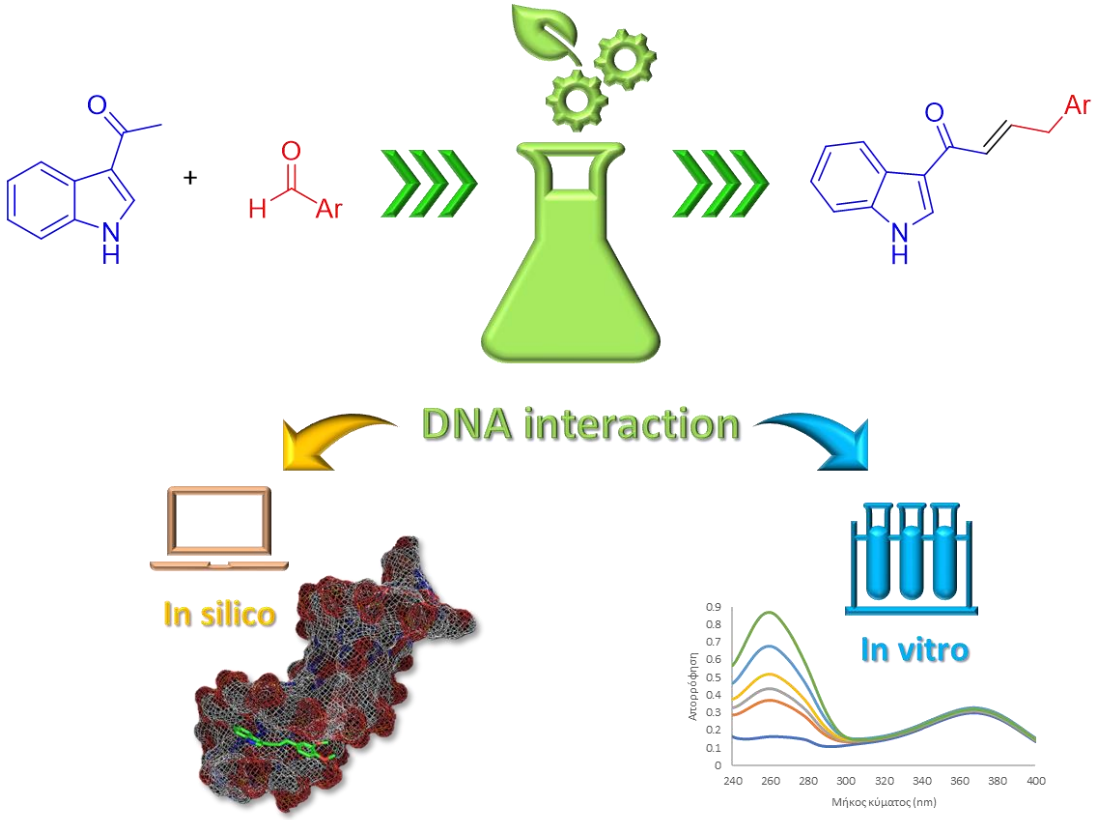
The synthesized indole chalcones were investigated for their ability to interact with calf thymus DNA (CT-DNA) through *in silico* and *in vitro* study, as this interaction may

lead to utilization of these compounds in anti-cancer drugs. It was found that all compounds can bind to the minor groove of DNA through non-covalent bonds, such as van der Waals interactions and hydrogen bonds. In addition, most synthesized chalcones appear to destabilize the double helix of DNA upon binding to it. As an indication, compound **(3e)**, which has two methoxy groups as substituents of the B ring at two consecutive positions, showed the strongest binding to CT-DNA. In literature, no corresponding comparative *in vivo* and *in silico* study has been performed for the same range of compounds, which is the innovative part of this work. Furthermore, the study provides a first assessment of the structure-activity relationship, which may contribute to further development of these compounds as potential anticancer drugs.

Field of study: Organic Chemistry, Pharmaceutical Chemistry

Keywords: Natural products, Indole, Chalcones, Hybrid molecules, Heterocyclic compounds, Interaction with CT-DNA

Graphical abstract



Περιεχόμενα

Ευχαριστίες ... 2
Περίληψη ... 3
Abstract ... 5
Graphical abstract ... 7
Περιεχόμενα ... 8
Ευρετήριο συντομογραφιών ... 11
1. Εισαγωγή ... 13
1.1. Ινδόλια ... 14
1.1.1. Προέλευση ινδολίου ... 14
1.1.2. Χημική δομή ινδολίου και ιδιότητες ... 15
1.1.3. Βιολογική δράση ινδολίου ... 15
1.1.3.1. Αντικαρκινική δράση ... 16
1.1.3.2. Αντιμικροβιακή δράση ... 17
1.1.3.3. Αντι-ιική δράση ... 18
1.1.3.4. Αντιφλεγμονώδη και αναλγητική δράση ... 19
1.1.3.5. Αντιοξειδωτική δράση ... 19
1.1.4. Σύνθεση ινδολίου ... 20
1.1.4.1. Σύνθεση ινδολίου Bartoli ... 20
1.1.4.2. Σύνθεση ινδολίου Bischler- Möhlau ... 21
1.1.4.3. Σύνθεση ινδολίου Fischer ... 21
1.1.4.4. Σύνθεση ινδολίου Fukuyama ... 22
1.1.4.5. Σύνθεση ινδολίου Gassman ... 22
1.1.4.6. Σύνθεση ινδολίου Hemetsberger ... 23
1.1.4.7. Σύνθεση ινδολίου Julia ... 23
1.1.4.8. Σύνθεση ινδολίου Larock ... 24
1.1.4.9. Σύνθεση ινδολίου Leimgruber-Batcho ... 24
1.1.4.10. Σύνθεση ινδολίου Madelung ... 25
1.1.4.11. Σύνθεση ινδολίου Nenitzescu ... 25
1.1.4.12. Σύνθεση ινδολίου Reissert ... 26
1.1.4.13. Σύνθεση ινδολίου Cadogan-Sundberg ... 27
1.1.4.14. Σύνθεση ινδολίου Ullmann ... 27
1.2. Χαλκόνες ... 28
1.2.1. Προέλευση χαλκονών ... 28
1.2.2. Χημική δομή χαλκονών και ιδιότητες ... 29
1.2.3. Βιολογική δράση χαλκονών ... 29

1.2.3.1. Αντικαρκινική δράση 30
1.2.3.2. Αντιφλεγμονώδης δράση 31
1.2.3.3. Αντιμικροβιακή δράση 32
1.2.3.4. Αντιδιαβητική δράση 33
1.2.3.5. Αντιοξειδωτική δράση 35
1.2.4. Σύνθεση χαλκονών 35
1.2.4.1. Αντίδραση συμπύκνωσης Claisen-Schmidt 35
1.2.4.2. Σύνθεση χαλκονών μέσω ακτινοβόλησης με υπερήχους 36
1.2.4.3. Σύνθεση χαλκονών μέσω ακτινοβόλησης με μικροκύματα 36
1.2.4.4. Αντίδραση Heck 37
1.2.4.5. Αντίδραση Suzuki-Miyaura 37
1.2.4.6. Αντίδραση Sonogashira 38
1.2.4.7. Αντίδραση Julia-Kocienski 38
1.2.4.8. Αντίδραση Wittig 39
1.2.4.9. Αντίδραση Friedel-Crafts 39
1.2.4.10. Αναδιάταξη Photo-Fries 39
1.3. Ινδολικές χαλκόνες και αντικαρκινική δράση 40
1.4. Μέθοδοι ταυτοποίησης 42
1.4.1. Φασματοσκοπία Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού (NMR) 42
1.4.2. Φασματοσκοπία Υπερύθρου με μετασχηματισμό Fourier (FTIR) 45
1.5. Προσδιορισμός αλληλεπίδρασης με DNA 47
2. Σκοπός 51
3. Πειραματικό μέρος 52
3.1. Όργανα και συσκευές 52
3.2. Συνθετική πορεία 53
3.2.1. Ανάπτυξη μεθοδολογίας σύνθεσης χαλκονών με αντίδραση συμπύκνωσης Claisen-Schmidt 53
3.2.2. Πραγματοποίηση αντίδρασης σε θερμοκρασία δωματίου 53
3.2.3. Πραγματοποίηση αντίδρασης με χρήση αναρροής 54
3.2.4. Πραγματοποίηση αντίδρασης με χρήση υπερήχων 55
3.2.5. Επιλογή βέλτιστων συνθηκών 56
3.2.6. Γενική μέθοδος σύνθεσης χαλκονών (μέσω βελτιστοποιημένης συνθετικής οδού) 56
3.3. Προσδιορισμός αλληλεπίδρασης με DNA 65
3.3.1. Μελέτη *in silico* 65
3.3.2. Μελέτη *in vitro* 66
4. Αποτελέσματα – Συζήτηση 68

4.1. Ανάπτυξη μεθοδολογίας σύνθεσης χαλκονών με αντίδραση συμπύκνωσης Claisen-Schmidt ... 68
4.2. Γενική μέθοδος σύνθεσης χαλκονών (μέσω βελτιστοποιημένης συνθετικής οδού) ... 69
4.2.1. Ανάλυση φάσματος ^{1}H NMR της ένωσης (3a) (*E*)-1-(1*H*-ινδολ-3-υλ)-3-(p-τολυλ)προπ-2-εν1-όνη ... 69
4.2.2. Ανάλυση φάσματος FTIR της ένωσης (3a) (*E*)-1-(1*H*-ινδολ-3-υλ)-3-(p-τολυλ)προπ-2-εν-1-όνη ... 72
4.3. Προσδιορισμός αλληλεπίδρασης με DNA ... 73
4.3.1. Μελέτη *in silico* ... 73
4.3.2. Μελέτη *in vitro* ... 81
4.3.3. Σύγκριση μεθόδων ... 88
4.3.4. Ανάλυση σχέσης δομής-δράσης ... 90
5. Σύνοψη – Συμπεράσματα ... 92
6. Προτάσεις για μελλοντική έρευνα ... 94
Βιβλιογραφία ... 95
Παράρτημα Ι: Φάσματα ^{1}H NMR, FTIR, UV-Vis ... 101
Παράρτημα ΙΙ – Κατάλογος Εικόνων ... 113
Παράρτημα ΙΙΙ – Κατάλογος Σχημάτων ... 116
Παράρτημα IV – Κατάλογος Πινάκων ... 117

Ευρετήριο συντομογραφιών

Mcl-1: μυελοκυτταρική λευχαιμία-1

Pim: proviral insertion site in moloney murine leukemia virus

DNA: δεσοξυριβονουκλεϊκό οξύ

RNA: ριβονουκλεϊκό οξύ

ATP: τριφωσφορική αδενοσίνη

HIV: ιός της ανθρώπινης ανοσοανεπάρκειας

SARS: σοβαρό οξύ αναπνευστικό σύνδρομο

AIDS: σύνδρομο επίκτητης ανοσολογικής ανεπάρκειας

ΜΣΑΦ: μη στεροειδή αντιφλεγμονώδη φάρμακα

COX: ένζυμο κυκλοοξυγενάσης

AIBN: υδρίδιο της τριβουτιλτίνης με αζωβισοβουτυρονιτρίλιο

NF-κB: πυρηνικός παράγοντας-κάπα Β

IKK: κινάσες αναστολείς κάπα Β

VEGF: αγγειακός ενδοθηλιακός παράγοντας ανάπτυξης

bFGF: βασικός ινοβλαστικός παράγοντας ανάπτυξης

TGF-β: οδός σηματοδότησης του μετασχηματιστικού αυξητικού παράγοντα β

PGE2: προσταγλανδίνη Ε2

nNOS: νευρωνική συνθάση του NO

eNOS: ενδοθηλιακή συνθάση του NO

iNOS: επαγώγιμη ισομορφή συνθάσης NO

IL-1: ιντερλευκίνη-1

TNF-α: παράγοντα νέκρωσης όγκων-α

EP: αντλία εκροής

PTP: πρωτεϊνική φωσφατάση της τυροσίνης

PTP1B: πρωτεϊνική φωσφατάση της τυροσίνης 1Β

ALR: αναγωγάση της αλδόζης

NADPH: Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate

DPP-4: διπεπτιδυλοπεπτιδάση-4

GLP-1: γλυκανόμορφο πεπτίδιο-1

GIP: εξαρτώμενο από τη γλυκόζη ινσουλινότροπο πολυπεπτίδιο

GIT: εντεροενδοκρινικά κύτταρα του γαστρεντερικού σωλήνα

PPAR-γ: υποδοχέας γάμμα που ενεργοποιείται από πολλαπλασιαστή υπεροξεισώματος

PPARs: πυρηνικοί υποδοχείς που ενεργοποιούνται από τον πολλαπλασιαστή υπεροξεισωμάτων

RXR: υποδοχέας ρετινοειδούς Χ

ROS: δραστικά είδη οξυγόνου

RNS: δραστικά είδη αζώτου

HAT: μεταφορά ατόμων υδρογόνου

SPLET: διαδοχική απώλεια πρωτονίου και μεταφορά ηλεκτρονίου

SET-PT: μεταφορά ενός ηλεκτρονίου που ακολουθείται από μεταφορά πρωτονίων

FDA: Αμερικανικός Οργανισμός Τροφίμων και Φαρμάκων

MOMIPP: (2E)-3-(5-methoxy-2-methyl-1H-indol-3-yl)-1-(4-pyridinyl)-2-propen-1-one

NMR: φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού

TMS: τετραμεθυλοσιλάνιο

FT-NMR: φασματόμετρα NMR με μετασχηματισμό Fourier

FTIR: φασματοσκοπία υπερύθρου με μετασχηματισμό Fourier

NIR: εγγύς υπεριώδες φάσμα

MIR: μέσο υπεριώδες φάσμα

FIR: άπω υπεριώδες φάσμα

TLC: χρωματογραφία λεπτής στιβάδας

PE: πετρελαϊκός αιθέρας

EtOAc: οξικός αιθυλεστέρας

UV: υπεριώδης ακτινοβολία

PMA: φωσφομολυβδαινικό οξύ

FCC: χρωματογραφία στήλης ταχείας ανάπτυξης

DMSO: δευτεριωμένο διμεθυλοσουλφοξείδιο

UV-Vis: φασματομετρία υπεριώδους-ορατού

PDB: Protein Data Bank

Tris: τρομεθαμίνη

CT-DNA: DNA από θύμο αδένα βοοειδούς

1. Εισαγωγή

Φυσικά προϊόντα

Τα φυσικά προϊόντα είναι χημικές ενώσεις που παράγονται από ζωντανούς οργανισμούς όπως είναι τα φυτά, τα ζώα και οι μικροοργανισμοί. Ορισμένα από αυτά είναι βιοδραστικά, δηλαδή ασκούν μια βιολογική δράση σε άλλους οργανισμούς. Μπορούν, λοιπόν, να είναι θεραπευτικά ή τοξικά σε ανθρώπους και ζώα, καθώς και να προκαλούν βιοδιασπώμενη τοξικότητα έναντι παρασίτων που είναι επιβλαβή για τις καλλιέργειες. Κάποια από αυτά είναι δευτερογενείς μεταβολίτες που παράγονται από έναν οργανισμό για να τον προστατεύσουν σε δεδομένες περιβαλλοντικές συνθήκες, ενώ πολλά άλλα είναι απαραίτητα για την ανάπτυξη και τη λειτουργία ενός οργανισμού, ωστόσο εμφανίζουν δράση σε εντελώς διαφορετικά βιολογικά συστήματα [1].

Εξαιτίας αυτής της ιδιότητάς τους, τα φυσικά προϊόντα αποτελούν πηγή έμπνευσης για την ανακάλυψη πολλών νέων φαρμάκων. Ιδιαίτερα στο παρελθόν, περίπου το 80% των δραστικών ουσιών των φαρμάκων ήταν φυσικά προϊόντα ή ενώσεις εμπνευσμένες από αυτά [2], [3]. Πιο συγκεκριμένα, τα φυσικά προϊόντα έχουν συμβάλλει στη θεραπεία του καρκίνου, του διαβήτη και σε μολυσματικές ασθένειες [2]. Η δυνατότητα αξιοποίησης των φυσικών προϊόντων ενάντια σε μολυσματικές ασθένειες και τον καρκίνο οφείλεται στη στοχευμένη δομική βελτιστοποίησή τους, η οποία τους επιτρέπει να αναγνωρίζουν συγκεκριμένους βιολογικούς στόχους. Πιο συγκεκριμένα, βοηθούν στη ρύθμιση των ενδογενών μηχανισμών άμυνας του οργανισμού και την αλληλεπίδραση, ή αρκετά συχνά ανταγωνισμό, με άλλους οργανισμούς. Επιπλέον, τα φυσικά προϊόντα έχουν παίξει καθοριστικό ρόλο σε καρδιαγγειακές παθήσεις και σε πλήθος νευρολογικών παθήσεων, όπως στη σκλήρυνση κατά πλάκας [4].

Το ενδιαφέρον για τα φυσικά προϊόντα προκύπτει από τα ιδιαίτερα χαρακτηριστικά τους σε σχέση με αυτά των συμβατικών μορίων. Αρχικά, διαθέτουν μεγάλη ποικιλία και πολυπλοκότητα στη δομή τους. Επίσης, έχουν μεγάλα μοριακά βάρη και μεγαλύτερο αριθμό sp^3 ατόμων άνθρακα και ατόμων οξυγόνου συγκριτικά με τα συμβατικά μόρια. Όμως, διαθέτουν λιγότερα άτομα αλογόνου και αζώτου. Επιπρόσθετα, στη δομή τους υπάρχουν πολλές ομάδες δοτών και δεκτών δεσμών υδρογόνου, ενώ οι συντελεστές κατανομής οκτανόλης-νερού τους (τιμές cLogP) είναι χαμηλοί, με αποτέλεσμα τα φυσικά προϊόντα να είναι αρκετά υδρόφιλα. Ταυτόχρονα, είναι πιο άκαμπτα σε σύγκριση με τα συμβατικά μόρια, γεγονός που είναι αρκετά χρήσιμο για την παρεμπόδιση των αλληλεπιδράσεων πρωτεΐνης-πρωτεΐνης [4]. Πέρα από αυτά, τα φυσικά προϊόντα είναι συνήθως πιο εύκολο να απορροφηθούν από τον ανθρώπινο οργανισμό σε αντίθεση με τα συμβατικά συνθετικά μόρια [2]. Όλα αυτά τα χαρακτηριστικά τους, τα καθιστούν ελκυστικά μόρια για την παραγωγή φαρμάκων, ενώ ιδιαίτερα χρήσιμα είναι τα φυσικά προϊόντα που υπακούν στον εμπειρικό κανόνα των 5 του Lipinski για τη χορήγηση φαρμάκων από το στόμα [2], [4].

Ωστόσο, τα φυσικά προϊόντα διαθέτουν και κάποια μειονεκτήματα όσον αφορά τη χρήση τους για την ανακάλυψη φαρμάκων. Αρχικά, είναι αρκετά δύσκολος ο προσδιορισμός των βιοδραστικών ενώσεων που ενδέχεται να παράγονται από κάποιον οργανισμό. Επίσης, συνιστά πρόκληση η απομόνωση και ο χαρακτηρισμός ενός φυσικού προϊόντος από τον ζωντανό οργανισμό που προέρχεται. Ταυτόχρονα, τα

φυσικά εκχυλίσματα που χρησιμοποιούνται πιθανώς να μην είναι συμβατά με τις αναλύσεις που ακολουθούνται για την ανίχνευση της βιολογικής τους δράσης [4]. Πρέπει επίσης να αναφερθεί το γεγονός πως καθώς η δομή τους δεν έχει προκύψει από στοχευμένο-ορθολογικό σχεδιασμό, είναι πιθανόν να αλληλεπιδρούν με βιολογικούς στόχους, πέραν του επιθυμητού. Συνεπώς, κατά τη χρήση τους δύναται να εμφανιστούν μη επιθυμητές δράσεις ή/και παρενέργειες.

Από τη μεγάλη ποικιλία των φυσικών προϊόντων αντικείμενο της παρακάτω μελέτης θα αποτελέσουν τα ινδόλια, οι χαλκόνες, καθώς και οι ινδολικές χαλκόνες.

1.1. Ινδόλια

1.1.1. Προέλευση ινδολίου

Το ινδόλιο απομονώθηκε και χαρακτηρίστηκε για πρώτη φορά το 1866 από τον Bayer και τους συνεργάτες του, καθώς μελετούσαν την αντίδραση του μορίου indigo με ένα μίγμα θειικού οξέος και θειικού ανυδρίτη [5], [6]. Το μόριο indigo ήταν γνωστό από την αρχαιότητα και χρησιμοποιούταν ως βαφή (βαφή λουλάκι). Η βαφή αυτή παρασκευαζόταν τρίβοντας τα φύλλα του φυτού *Isatis tinctoria* ή του φυτού *Indigofera tinctoria*. Έπειτα από υδρόλυση των φύλλων προκύπτει η αγλυκόνη, η οποία με ενζυμική οξείδωση από το ατμοσφαιρικό οξυγόνο μετατρέπεται στο μόριο indigo. Η βαφή λουλάκι χρησιμοποιείται μέχρι και σήμερα, ωστόσο παράγεται συνθετικά [7]. Το ινδόλιο, μετά την απομόνωσή του, λόγω της ιδιαίτερης δομής του έχει τραβήξει το ενδιαφέρον των ερευνητών, ιδιαίτερα όσων ασχολούνται με την ανάπτυξη νέων φαρμάκων [6].

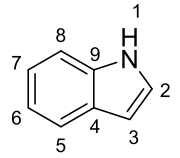
Το ινδόλιο ανήκει στην κατηγορία των αλκαλοειδών, δηλαδή των φυσικών προϊόντων που περιέχουν άζωτο και είναι κατά κύριο λόγο δευτερογενείς μεταβολίτες [8]. Αυτό διαθέτει μεγάλη ποικιλία φυσικών πηγών, καθώς εντοπίζεται σε διάφορα είδη φυτών, ενώ παράγεται και από μια πληθώρα μικροοργανισμών [6]. Πιο συγκεκριμένα, βρίσκεται σε μεγάλη ποσότητα σε λουλούδια, όπως είναι το γιασεμί, ο νάρκισσος, η πασχαλιά και το άνθος της λεμονιάς. Παράλληλα, εντοπίζεται σε ίχνη σε άλλα είδη λουλουδιών, μπαχαρικών και τροφίμων, για παράδειγμα στην ορχιδέα, τη γαρδένια, το καρύκευμα γαρύφαλλο, την ντομάτα και το σουσάμι [5]. Έχει, επίσης, ανιχνευθεί στην πίσσα του λιθάνθρακα και στη μελάσα [9]. Επιπρόσθετα, το ινδόλιο παράγεται από μύκητες, βακτήρια, χιτωνόζωα και βρυόζωα [8]. Όσον αφορά τα βακτήρια, το ινδόλιο παράγεται σε μεγάλες ποσότητες τόσο από θετικά όσο και από αρνητικά κατά Gram βακτήρια. Σε αυτά παίζει το ρόλο ενός μεσοκυττάριου σήματος ρυθμίζοντας το σχηματισμό σπορίων, τη σταθερότητα του πλασμιδίου, την αντοχή στα φάρμακα, το σχηματισμό βιοφίλμ, καθώς και την πιθανή λοιμογόνο δράση τους [10]. Πέρα από αυτά, το ινδόλιο είναι συστατικό της αναπνοής, του ανθρώπινου ιδρώτα και των περιττωμάτων θηλαστικών χωρίς όμως να είναι τοξικό [5]. Ταυτόχρονα, έχει εντοπιστεί στο ήπαρ, το πάγκρεας, τον εγκέφαλο και τη χολή [9].

Η παρουσία του ινδολίου στα φυσικά προϊόντα επεξηγείται από το γεγονός ότι η τρυπτοφάνη, η οποία είναι ένα από τα απαραίτητα αμινοξέα, διαθέτει στο μόριό της τον πυρήνα του ινδολίου. Μέσω αντιδράσεων βιοσύνθεσης, κατά τις οποίες ενώνεται η τρυπτοφάνη με άλλα αμινοξέα, παράγονται διάφορα συστατικά των φυτών και βακτηριακοί μεταβολίτες που περιλαμβάνουν τον πυρήνα του ινδολίου. Για τον ίδιο

λόγο, διάφορες ορμόνες όπως για παράδειγμα η σεροτονίνη και η μελατονίνη εμπεριέχουν τον πυρήνα του ινδολίου [6].

1.1.2. Χημική δομή ινδολίου και ιδιότητες

Το ινδόλιο είναι ένα σύστημα ετεροκυκλικών δακτυλίων, καθώς συνιστά τη σύντηξη ενός εξαμελούς βενζολίου και ενός πενταμελούς πυρρολικού δακτυλίου, οι οποίοι μοιράζονται έναν διπλό δεσμό [6], [11], όπως φαίνεται και στην παρακάτω εικόνα:



Εικόνα 1. *Δομή ινδολίου.*

Γενικότερα, ετεροκυκλικά ονομάζονται τα μόρια εκείνα που είναι κυκλικά και ένα από τα άτομα άνθρακα του δακτυλίου έχει αντικατασταθεί από κάποιο άλλο άτομο, το οποίο σε αυτές τις περιπτώσεις αναφέρεται ως ετεροάτομο. Στην κατηγορία αυτή ανήκει και το ινδόλιο λόγω του ενός ατόμου αζώτου που διαθέτει στον πυρρολικό δακτύλιο [11].

Το ινδόλιο, λοιπόν, έχει μια επίπεδη δικυκλική δομή και διαθέτει 10π ηλεκτρόνια, 8 από τους διπλούς δεσμούς του μορίου και 2 από το μονήρες ζεύγος ηλεκτρονίων του αζώτου [6], [11]. Εξαιτίας αυτών των ιδιοτήτων του, θεωρείται αρωματικό μόριο σύμφωνα με τον κανόνα του Hückel. Είναι μία ασθενής βάση και πρωτονιώνεται μόνο σε περιβάλλον ισχυρού οξέος [6]. Αυτό οφείλεται στη μετατόπιση των ηλεκτρονίων του αζώτου στο σύστημα των π ηλεκτρονίων του δακτυλίου, έχοντας ως αποτέλεσμα τη μείωση της ηλεκτρονιακής πυκνότητας στο άτομο αυτό [12]. Επίσης, το ινδόλιο υφίσταται ηλεκτροφιλική υποκατάσταση κυρίως στον πυρρολικό δακτύλιο, καθώς αυτός διαθέτει μεγαλύτερη ηλεκτρονιακή πυκνότητα σε σύγκριση με τον βενζολικό [6], [12]. Αυτή συμβαίνει στη θέση 3, διότι το θετικό φορτίο του ενδιαμέσου προϊόντος μπορεί να σταθεροποιηθεί μέσω μετατόπισης του μονήρους ζεύγους ηλεκτρονίων του αζώτου. Αντίθετα, δεν μπορεί να συμβεί ηλεκτροφιλική υποκατάσταση στη θέση 2, καθώς το ενδιάμεσο προϊόν δεν γίνεται να σταθεροποιηθεί χωρίς να επηρεαστεί η αρωματικότητα του βενζολικού δακτυλίου [13]. Ταυτόχρονα, σε βασικές συνθήκες μπορούν να προκύψουν αντιδράσεις υποκατάστασης του αζώτου, λόγω του ασθενώς όξινου χαρακτήρα του N-H [6].

Το ινδόλιο είναι άχρωμο κρυσταλλικό στερεό με δυσάρεστη μυρωδιά, ωστόσο σε πολύ μικρές συγκεντρώσεις έχει ευχάριστη οσμή λουλουδιών και χρησιμοποιείται σε αρώματα. Το σημείο τήξης του έχει εύρος 52-54 °C, ενώ το σημείο βρασμού του είναι ίσο με 254 °C. Επίσης, το μοριακό του βάρος υπολογίζεται ίσο με 117,15 g/mol και η πυκνότητά του είναι 1,17 g/cm^3 [6]. Το ινδόλιο διαλύεται στην αιθανόλη, το βενζόλιο και τον αιθέρα, ενώ μπορεί να ανακρυσταλλωθεί με νερό [9].

1.1.3. Βιολογική δράση ινδολίου

Το ινδόλιο, όπως και τα παράγωγά του, έχει αποδειχθεί ότι έχει διάφορες βιολογικές δράσεις. Πιο συγκεκριμένα διαθέτει αντικαρκινική, αντιμικροβιακή, αντι-ιική, αντιφλεγμονώδη και αναλγητική δράση. Παράλληλα, έχει παρατηρηθεί ότι εμφανίζει

αντιοξειδωτική, αντιισταμινική, αντικαταθλιπτική και αντιχολινεργική δράση. Επιπλέον, χρησιμοποιείται έναντι ημικρανιών, εμετού, υπέρτασης, διαβήτη, καθώς και ως ανταγωνιστής οπιούχων [6], [11], [14]. Οι κυριότερες από τις δράσεις αυτές θα αναλυθούν στις ενότητες που παρατίθενται παρακάτω.

1.1.3.1. Αντικαρκινική δράση

Ο καρκίνος είναι η δεύτερη αιτία θνησιμότητας παγκοσμίως, αμέσως μετά τις καρδιοαγγειακές παθήσεις [15]. Έχουν βρεθεί διάφορες ενώσεις με αντικαρκινική δράση, οι οποίες περιέχουν τη χαρακτηριστική δομή του ινδολίου ως κεντρικό τμήμα του σκελετού τους και δρουν μέσω διαφορετικών μηχανισμών [6], [15]. Αρχικά, ορισμένες από αυτές είναι αναστολείς της πρωτεΐνης Mcl-1 (μυελοκυτταρική λευχαιμία-1). Η πρωτεΐνη αυτή έχει παρατηρηθεί ότι υπερεκφράζεται στα καρκινικά κύτταρα, καθώς παίζει καθοριστικό ρόλο στην αποφυγή της απόπτωσης, δηλαδή του προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου. Μείωση των επιπέδων της πρωτεΐνης αυτής ή αποσταθεροποίησή της μπορεί να βοηθήσει στην αντιμετώπιση διαφόρων ειδών καρκίνου όπως είναι ο καρκίνος του παγκρέατος, ο μη μικροκυτταρικός καρκίνος του πνεύμονα και η οξεία μυελοειδής λευχαιμία [15].

Επιπρόσθετα, ορισμένα παράγωγα του ινδολίου δρουν ως αναστολείς των πρωτεϊνών Pim (proviral insertion site in moloney murine leukemia virus). Οι πρωτεΐνες αυτές ανήκουν στην οικογένεια των κινασών και βοηθούν στη μεταγωγή σήματος στα κύτταρα προκειμένου αυτά να επιβιώσουν, να αναπτυχθούν και να διαφοροποιηθούν. Υπερέκφραση αυτών των πρωτεϊνών πραγματοποιείται σε διάφορα είδη καρκινικών κυττάρων, όπως για παράδειγμα στον καρκίνο του παγκρέατος, τον καρκίνο του προστάτη και το πολλαπλό μυέλωμα [15].

Πέρα από αυτά, ενώσεις του ινδολίου συνιστούν αναστολείς των ενζύμων που προκαλούν επιγενετικές τροποποιήσεις. Οι τροποποιήσεις αυτές δεν προκαλούν αλλαγές στην αλληλουχία του δεσοξυριβονουκλεϊνικού οξέως (deoxyribonucleic acid, DNA), όμως επηρεάζουν την ανάπτυξη και εξέλιξη του καρκίνου. Πιο συγκεκριμένα, διάφορα ένζυμα μπορούν να αφαιρέσουν τις ομάδες ακετυλίου από τη λυσίνη στο αμινο-τελικό άκρο των ιστονών με αποτέλεσμα την αποτροπή της έκφρασης κατασταλτικών γονιδίων του καρκινικού όγκου. Επομένως, τα ένζυμα αυτά αποτελούν έναν από τους βασικούς στόχους για τη θεραπεία του καρκίνου [15].

Ένας άλλος βιολογικός στόχος είναι οι μικροσωληνίσκοι, οι οποίοι είναι σημαντικό τμήμα του κυτταροσκελετού και βοηθούν στη μίτωση του κυττάρου. Κατά την κυτταρική διαίρεση οι μικροσωληνίσκοι πολυμερίζονται σε ατράκτους που τραβούν τα όμοια χρωμοσώματα προς τους δύο πόλους ώστε να ολοκληρωθεί η διαδικασία της διαίρεσης. Επομένως, αναστολείς της δράσης των μικροσωληνίσκων μπορούν να καταστείλουν τον πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων. Μια μεγάλη κατηγορία τέτοιων αναστολέων είναι, μεταξύ άλλων και τα παράγωγα του ινδολίου [15].

Υπάρχουν τόσο φυσικές όσο και συνθετικές ενώσεις που περιέχουν τον σκελετό του ινδολίου και εμφανίζουν αντικαρκινική δράση. Όσον αφορά τα φυσικά αλκαλοειδή οι πιο σημαντικές ενώσεις είναι η βινκριστίνη, η βινβλαστίνη και η βιντεσίνη, οι οποίες απομονώθηκαν από το φυτό *Catharanthus roseus* και χρησιμοποιούνται για τη θεραπεία διαφόρων καρκινικών παθήσεων, όπως είναι η λευχαιμία, το λέμφωμα, το μελάνωμα, ο καρκίνος του μαστού και ο μη μικροκυτταρικός καρκίνος του πνεύμονα.

Οι ενώσεις αυτές δρουν μέσω παρεμπόδισης του πολυμερισμού των μικροσωληνίσκων στα καρκινικά κύτταρα. Επιπλέον, υπάρχουν συνθετικές ενώσεις με τον πυρήνα του ινδολίου, οι οποίες περιέχονται σε φάρμακα που κυκλοφορούν για τη θεραπεία του καρκίνου. Τα κυριότερα εξ αυτών είναι το Sunitinib που χρησιμοποιείται για τη θεραπεία του νεφροκυτταρικού καρκινώματος και του γαστρεντερικού στρωματικού όγκου, καθώς και το Osimertinib, το οποίο βοηθά στη θεραπεία του μη μικροκυτταρικού καρκίνου του πνεύμονα [6].

1.1.3.2. Αντιμικροβιακή δράση

Οι μικροβιακές λοιμώξεις προκαλούνται από μία πληθώρα μικροβίων συμπεριλαμβανομένων βακτηρίων, μυκήτων και ορισμένων ζυμών. Η ανθεκτικότητα των μικροβιακών παραγόντων στα ήδη υπάρχοντα φάρμακα λόγω της εκτεταμένης χρήσης τους εγείρει παγκόσμια ανησυχία, συνεπώς καθίσταται επιτακτική η ανάγκη εύρεσης νέων φαρμάκων. Διάφορες ενώσεις που περιέχουν τον πυρήνα του ινδολίου μπορούν να χρησιμοποιηθούν για το σκοπό αυτό [6]. Η αντιμικροβιακή δράση του ινδολίου παρατηρείται κυρίως έναντι των μικροοργανισμών *Enterobacter*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* και *Staphylococcus epidermidis*, ενώ είναι αποτελεσματικό και έναντι της ζύμης *Candida albicans* [14].

Υπάρχουν διάφοροι μηχανισμοί δράσης έναντι των μικροβιακών λοιμώξεων. Αρχικά, οι ενώσεις που περιέχουν το ινδόλιο μπορούν να αποτελέσουν αναστολείς της σύνθεσης του DNA και του ριβονουκλεϊκού οξέως (ribonucleic acid, RNA) των μικροοργανισμών. Ως γνωστόν, το DNA χρησιμοποιείται για την αποθήκευση, αντιγραφή και έκφραση της γενετικής πληροφορίας, ενώ το RNA χρησιμεύει στην πρωτεϊνική σύνθεση. Συνεπώς, η καταστροφή αυτών των νουκλεϊκών οξέων ή η αναστολή της σύνθεσής τους εμποδίζει την έκφραση των γονιδίων των μικροβίων και κατ' επέκταση την ανάπτυξη και τον πολλαπλασιασμό τους [16].

Επιπλέον, κάποιες ενώσεις του ινδολίου επιδρούν καταστρεπτικά στην κυτταρική μεμβράνη και το κυτταρικό τοίχωμα των βακτηρίων. Η κυτταρική αυτή μεμβράνη είναι ημιπερατή και αποτελείται από μία διπλοστιβάδα φωσφολιπιδίων και κάποιες πρωτεΐνες. Είναι υπεύθυνη για τη διατήρηση της σταθερότητας του ενδοκυτταρικού περιβάλλοντος και τη μεταφορά ουσιών εντός και εκτός του κυττάρου. Συνεπώς, η καταστροφή της κυτταρικής μεμβράνης οδηγεί σε απώλεια της άμυνας του κυττάρου, της ικανότητας μεταφοράς των αναγκαίων για την επιβίωσή του ουσιών, καθώς και της μετακίνησής του. Για αυτό το λόγο, ενώσεις του ινδολίου που επιδρούν στην κυτταρική μεμβράνη των βακτηρίων παίζουν καθοριστικό ρόλο έναντι βακτηριακών λοιμώξεων [16].

Παράλληλα, παράγωγα του ινδολίου δρουν ως αναστολείς της σύνθεσης της τριφωσφορικής αδενοσίνης (Adenosine triphosphate, ATP), της βασικότερης πηγής ενέργειας των κυττάρων. Η ATP συντίθεται μέσω της διαδικασίας της αναπνοής και παίζει καθοριστικό ρόλο στο μεταβολισμό του κυττάρου και στην πραγματοποίηση πολλών ενζυμικών αντιδράσεων εντός του κυττάρου. Είναι, λοιπόν, προφανές ότι η αναστολή της σύνθεσης της ATP έχει ως αποτέλεσμα τη διακοπή της σωστής λειτουργίας του μεταβολισμού των κυττάρων, οπότε δεν μπορούν να αναπτυχθούν και να πολλαπλασιαστούν [16].

1.1.3.3. Αντι-ιική δράση

Οι ιογενείς ασθένειες είναι από τις πιο διαδεδομένες λοιμώξεις παγκοσμίως. Το κοινό κρυολόγημα, η γρίπη, η ανεμοβλογιά, ο έρπητας, η γαστρεντερίτιδα, ο ιός της ανθρώπινης ανοσοανεπάρκειας (Human immunodeficiency virus, HIV) και η ηπατίτιδα είναι μόνο μερικά από τα παραδείγματα των ιογενών ασθενειών. Η αντι-ιική θεραπεία διαδραματίζει βασικό ρόλο στον έλεγχο της έξαρσης των ιογενών λοιμώξεων και μέρος αυτής είναι οι ενώσεις που περιλαμβάνουν τον πυρήνα του ινδολίου [6]. Τα πιο γνωστά αντι-ιικά φάρμακα που περιέχουν ινδόλιο είναι το Arbidol που χρησιμοποιείται έναντι του ιού της γρίπης Α και Β, του αναπνευστικού συγκυτιακού ιού και του ιού που προκαλεί το σοβαρό οξύ αναπνευστικό σύνδρομο (severe acute respiratory syndrome, SARS), καθώς και το Delavirdine που χρησιμοποιείται για τη θεραπεία του ιού της ανθρώπινης ανοσοανεπάρκειας τύπου 1 (HIV-1) [17]. Υπάρχουν και φυσικά προϊόντα που περιλαμβάνουν τον πυρήνα του ινδολίου και εμφανίζουν ανάλογη δράση με κυριότερο το Sattazolin, το οποίο χρησιμοποιείται στη θεραπεία του έρπητα [6], [17].

Οι ενώσεις του ινδολίου που χρησιμοποιούνται ως αντι-ιικά φάρμακα δρουν μέσω διαφορετικών μηχανισμών. Αρχικά, ορισμένες από αυτές τις ενώσεις δρουν ως παρεμποδιστές της εισόδου του ιού στα κύτταρα του ξενιστή. Πιο συγκεκριμένα, εμποδίζουν την επαφή και την είσοδο του ιού μέσω αναστολής της σύντηξης της λιπιδικής του μεμβράνης με την κυτταρική μεμβράνη. Με αυτό τον τρόπο δρα και το Arbidol που προαναφέρθηκε, το οποίο επίσης επάγει τη χυμική και κυτταρική ανοσία του οργανισμού διεγείροντας παράλληλα τα μακροφάγα, ώστε να καταπολεμηθεί η λοίμωξη [17].

Επιπρόσθετα, κάποια παράγωγα του ινδολίου δρουν ως αναστολείς της αντίστροφης μεταγραφάσης των ρετροϊών. Η αντίστροφη μεταγραφάση είναι μία ιική πολυμεράση, η οποία χρησιμοποιείται για να κωδικοποιηθεί η γενετική πληροφορία των ρετροϊών από RNA σε DNA, προκειμένου να μπορέσει να μεταφραστεί και να εκφραστεί στα κύτταρα του ξενιστή. Μέσω αναστολής της δράσης της πρωτεΐνης αυτής παρεμποδίζεται η ανάπτυξη και αναπαραγωγή του ιού στα κύτταρα του ξενιστή. Με αυτό τον τρόπο μπορούν να αντιμετωπιστούν λοιμώξεις που προκαλούνται από ιούς όπως είναι ο ιός HIV, ο οποίος προκαλεί την εμφάνιση του συνδρόμου επίκτητης ανοσολογικής ανεπάρκειας (acquired immune deficiency syndrome, AIDS) [17].

Παράλληλα, ορισμένες ενώσεις που περιλαμβάνουν τον πυρήνα του ινδολίου δρουν ως αναστολείς της πρωτεάσης των ρετροϊών. Η πρωτεάση συνιστά ένα ένζυμο, το οποίο παίζει καθοριστικό ρόλο στον κύκλο της ζωής του ιού, καθώς βοηθά την ωρίμανση των ιικών σωματιδίων. Συνεπώς, η αναστολή της δράσης της παρεμποδίζει την περεταίρω ανάπτυξη του ιού, ενώ τον καθιστά μη μολυσματικό. Για τον λόγο αυτό, η πρωτεάση συνιστά σημαντικό βιολογικό στόχο για τη θεραπεία του AIDS [17].

Πέρα από αυτά, ενώσεις που περιέχουν το ινδόλιο χρησιμοποιούνται και ως αναστολείς της ιντεγκράσης για τη θεραπεία του AIDS, ιδίως τα τελευταία χρόνια. Αυτό συμβαίνει, διότι οι τρέχουσες θεραπείες τους στοχεύουν στην αντίστροφη μεταγραφάση του ιού HIV, την πρωτεάση και την είσοδο του ιού, όπως αναφέρθηκε παραπάνω. Ωστόσο, η ικανότητα των ιών να αναπτύσσουν αντίσταση σε αυτούς τους παράγοντες απαιτεί την ανάπτυξη νέων αντι-ιικών φαρμάκων με νέο τρόπο δράσης. Για το λόγο αυτό η

προσοχή των ερευνητών στράφηκε στην ιντεγκράση, η οποία καταλύει την ενσωμάτωση του γονιδιώματος του ιού στο κυτταρικό χρωμόσωμα, μια βασική διαδικασία για τον πολλαπλασιασμό του. Επιπλέον, η ιντεγκράση χρησιμοποιεί ένα μόνο ενεργό κέντρο για να φιλοξενήσει δύο διαφορετικές διαμορφώσεις υποστρωμάτων DNA, γεγονός που μπορεί να περιορίσει την ικανότητα του ιού να αναπτύξει ανθεκτικότητα στους αναστολείς της ιντεγκράσης [17].

Επιπλέον, ορισμένα παράγωγα του ινδολίου συνιστούν αναστολείς της RNA πολυμεράσης του ιού της ηπατίτιδας C. Η πολυμεράση αυτή είναι ένα ένζυμο που χρησιμοποιείται από τον ιό για την αντιγραφή του γονιδιώματός του, συνεπώς συμβάλει καθοριστικά στην ανάπτυξη του ιού. Συνιστά, λοιπόν, ελκυστικό στόχο για την ανάπτυξη φαρμάκων έναντι του ιού της ηπατίτιδας C. Έχει παρατηρηθεί ότι μικρά μόρια και κυρίως αυτά που περιέχουν τον πυρήνα του ινδολίου είναι αποτελεσματικά έναντι του συγκεκριμένου στόχου [17].

1.1.3.4. Αντιφλεγμονώδη και αναλγητική δράση

Η φλεγμονή είναι μια βιολογική αντίδραση των ιστών του οργανισμού σε επιβλαβή ερεθίσματα, όπως είναι αυτά που προκαλούν τα παθογόνα, ερεθιστικές ουσίες και κατεστραμμένα κύτταρα [6]. Κλασικές ενδείξεις της φλεγμονής είναι ο πυρετός, η ερυθρότητα, το πρήξιμο και ο πόνος. Τα πιο συνηθισμένα φάρμακα που χρησιμοποιούνται για τη θεραπεία της φλεγμονής είναι τα μη στεροειδή αντιφλεγμονώδη φάρμακα (ΜΣΑΦ). Η αποτελεσματικότητά τους οφείλεται στην ικανότητά τους να καταστέλλουν τη δράση των ενζύμων της κυκλοοξυγενάσης, δηλαδή να παρεμποδίζουν τη σύνθεση των προσταγλαδινών. Υπάρχουν δύο ισομερείς μορφές αυτού του ενζύμου, οι COX-1 και COX-2. Η πρώτη εκφράζεται στα φυσιολογικά κύτταρα, ενώ η δεύτερη στα κύτταρα της φλεγμονής και συμβάλλει στην παραγωγή προσταγλαδινών που σχετίζονται με τον πόνο, τον πυρετό και τη φλεγμονή. Η αναστολή του ενζύμου COX-2, λοιπόν, αντιπροσωπεύει το επιθυμητό αποτέλεσμα της αντιφλεγμονώδους, αντιπυρετικής και αναλγητικής δράσης των ΜΣΑΦ [9].

Μέσω αυτού του μηχανισμού δρουν και ορισμένα παράγωγα του ινδολίου που εμφανίζουν αντιφλεγμονώδη και αναλγητική δράση. Οι κυριότερες συνθετικές ενώσεις που ανήκουν σε αυτή την κατηγορία είναι οι indomethacin και tenidap. Το indomethacin ανήκει στην κατηγορία των ΜΣΑΦ και είναι μη επιλεκτικός αναστολέας, δηλαδή καταστέλλει τη δράση και των δύο μορφών του ενζύμου της κυκλοοξυγενάσης. Το tenidap ήταν υποψήφιο αντιφλεγμονώδες φάρμακο με αντιρευματοειδή δραστηριότητα, όμως απορρίφθηκε από τον FDA (Food and Drugs Administration), διότι προκαλούσε τοξικότητα στο ήπαρ και στα νεφρά. Υπάρχουν και φυσικά προϊόντα που περιέχουν τον πυρήνα του ινδολίου και εμφανίζουν αντίστοιχη δράση. Παραδείγματα αυτών είναι οι ενώσεις cycloexpansamine A και B και penicillinolide A, οι οποίες απομονώθηκαν από θαλάσσιες καλλιέργειες των ειδών *Penicillium* [6].

1.1.3.5. Αντιοξειδωτική δράση

Αντιοξειδωτικά ονομάζονται τα φυσικά προϊόντα που μπορούν να δεσμεύσουν τις ελεύθερες ρίζες, οι οποίες είναι καταστρεπτικές για τα κύτταρα του οργανισμού. Κάθε ένωση με αντίστοιχη δράση είναι αποτελεσματική είτε λειτουργώντας με έναν κύριο μηχανισμό είτε με συνδυασμό τους. Οι κύριοι μηχανισμοί είναι η μεταφορά ενός ατόμου υδρογόνου στις ελεύθερες ρίζες, η μεταφορά ενός ηλεκτρονίου, καθώς και η

δυνατότητα χηλίωσης μετάλλων μετάπτωσης, δηλαδή η δημιουργία δεσμών ιόντων ή μορίων με μεταλλοϊόντα [18].

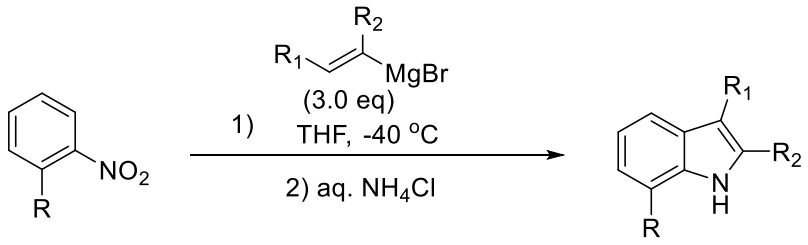
Ορισμένα παράγωγα του ινδολίου εμφανίζουν αντιοξειδωτική δράση, καθώς έχουν τη δυνατότητα να προστατεύουν πρωτεΐνες και λιπίδια από την οξείδωση. Το κυριότερο φυσικό αντιοξειδωτικό είναι η μελατονίνη, η οποία είναι μια ορμόνη που περιέχει τον πυρήνα του ινδολίου. Αυτή παράγεται στον οργανισμό και δρα ανεξάρτητα από τους υποδοχείς έναντι των ελεύθερων ριζών. Πιο συγκεκριμένα, είναι δραστική έναντι του μονήρους οξυγόνου ($^1O_2$), του υπεροξειδίου του υδρογόνου (H_2O_2), της ρίζας ανιόντων υπεροξειδίου (O^{2-*}), της ρίζας του υδροξυλίου (HO^*) και της ρίζας υπεροξυλίου (ROO^*). Η δράση της αυτή οφείλεται στο σύστημα αρωματικών δακτυλίων που διαθέτει, το οποίο είναι πλούσιο ηλεκτρονιακά, οπότε δρα εύκολα ως δότης ηλεκτρονίων. Ανάλογη δράση έχουν κι άλλα φυσικά προϊόντα που περιέχουν τον πυρήνα του ινδολίου, όπως είναι η σεροτονίνη και η τρυπτοφάνη [19].

1.1.4. Σύνθεση ινδολίου

Η σύνθεση του ινδολίου έχει πραγματοποιηθεί με τη χρήση διαφόρων πρώτων υλών και στρατηγικών σε όλες τις βιβλιογραφικές αναφορές της οργανικής χημείας. Μεταξύ αυτών περιλαμβάνονται οι αντιδράσεις Bartoli, Bischler, Fischer, Fukuyama, Gassman, Hemetsberger, Julia, Larock, Leimgruber, Madelung, Nenitzescu, Reissert, Cadogan-Sundberg και Ullmann [6]. Αυτές οι μέθοδοι σύνθεσης θα αναλυθούν στη συνέχεια.

1.1.4.1. Σύνθεση ινδολίου Bartoli

Η αντίδραση Bartoli είναι η χημική αντίδραση ορθο-υποκατεστημένων νιτροαρενών και νιτροζοαρενών με βινυλικά αντιδραστήρια Grignard προς σχηματισμό υποκατεστημένων ινδολίων. Πιο συγκεκριμένα, η μέθοδος αυτή έχει καταστεί μία από τις συντομότερες και πιο ευέλικτες οδούς για την παραγωγή 7-υποκατεστημένων ινδολίων. Πλεονέκτημα της μεθόδου είναι η δυνατότητα παραγωγής υποκατεστημένων ινδολίων τόσο στον βενζολικό όσο και στον πυρρολικό δακτύλιο [20]. Σύμφωνα με την μεθοδολογία της αντίδρασης, τα αντιδραστήρια προστίθενται σε διάλυμα THF, υπό συνεχή ανάδευση και ψύξη στους -40 °C. Μετά το πέρας της αντίδρασης το μίγμα αποχύνεται σε κορεσμένο υδατικό χλωριούχο αμμώνιο και στη συνέχεια απομονώνεται το προϊόν [21], όπως φαίνεται στην παρακάτω εικόνα:



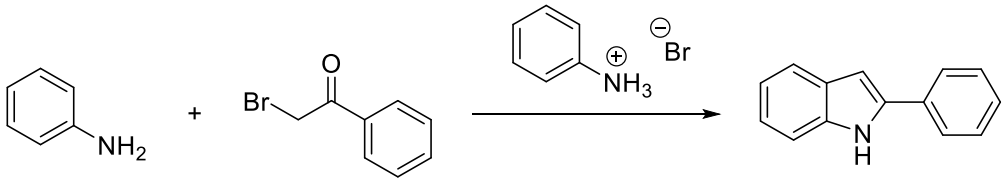
Σχήμα 1. *Σύνθεση ινδολίου Bartoli.*

Η αντίδραση είναι συχνά ανεπιτυχής χωρίς υποκατάσταση της νιτροομάδας στην όρθο-θέση, με τους πιο ογκώδεις όρθο-υποκαταστάτες να οδηγούν σε υψηλότερες αποδόσεις. Η υψηλή στερεοχημική παρεμπόδιση της όρθο-ομάδας βοηθά στην [3,3]-σιγματροπική αναδιάταξη που απαιτείται για το σχηματισμό του προϊόντος. Για την πλήρη μετατροπή, απαιτούνται τρία ισοδύναμα του βινυλικού αντιδραστηρίου

Grignard όταν πραγματοποιείται σε νιτροαρένια, ενώ αντιστοίχως απαιτούνται μόνο δύο ισοδύναμα, όταν πραγματοποιείται σε νιτροζοαρένια [20].

1.1.4.2. Σύνθεση ινδολίου Bischler- Möhlau

Η σύνθεση ινδολίου Bischler-Möhlau, συχνά αναφερόμενη και ως σύνθεση ινδολίου Bischler, αναφέρθηκε για πρώτη φορά το 1892 και πήρε το όνομά της από τους August Bischler και Richard Möhlau. Οι δύο αυτοί ερευνητές αν και δεν συνεργάστηκαν μεταξύ τους, ανέπτυξαν ανεξάρτητα πολύ παρόμοιες διαδικασίες ξεκινώντας από μια δομή αρωματικής κετόνης με περίσσεια κάποιας ανιλίνης, ώστε να παράξουν το τελικό προϊόν. Πρακτικά, είναι μια χημική αντίδραση που σχηματίζει μια 2-αρυλο-ινδόλη από μια α-βρωμο-ακετοφαινόνη και περίσσεια ανιλίνης [22], [23], όπως φαίνεται ακολούθως:

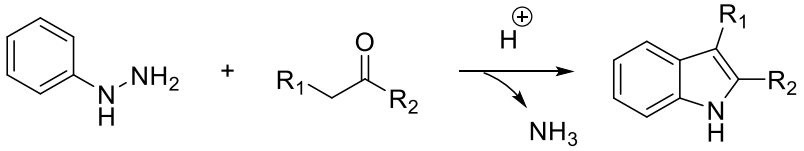


Σχήμα 2. *Σύνθεση ινδολίου Bischler-Möhlau.*

Αυτή συνιστά μία κλασική αντίδραση, όμως είναι περιορισμένη σε πεδίο εφαρμογής σε σύγκριση με άλλες μεθόδους σύνθεσης ινδολίων, λόγω των απαιτητικών συνθηκών της αντίδρασης και των χαμηλών αποδόσεων. Ωστόσο, είναι εφικτό να αξιοποιηθεί για τη σύνθεση σχετικά απλών παραγώγων ινδολίων [24].

1.1.4.3. Σύνθεση ινδολίου Fischer

Η αντίδραση Fischer αναφέρθηκε για πρώτη φορά το 1883 από τον Emil Fischer, από τον οποίο έλαβε και το όνομά της. Μάλιστα, παραμένει η κατεξοχήν μέθοδος για τη σύνθεση ινδολίων από μια υποκατεστημένη φαινυλυδραζίνη και μια αλδεΰδη ή κετόνη σε όξινες συνθήκες με αποβολή αμμωνίας ως παραπροϊόντος [24], όπως φαίνεται στην παρακάτω εικόνα:

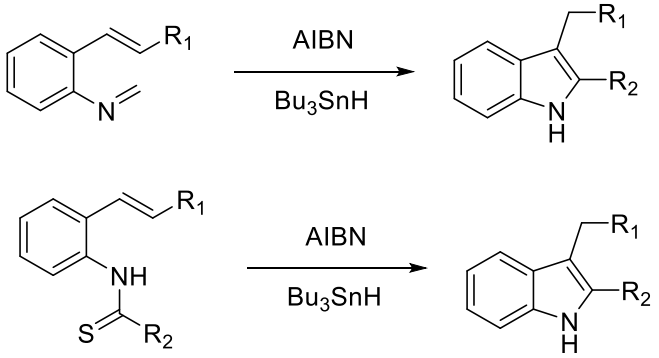


Σχήμα 3. *Σύνθεση ινδολίου Fischer.*

Η αντίδραση αυτή μπορεί να καταλυθεί από οξέα κατά Brønsted, όπως υδροχλώριο, θειϊκό οξύ, πολυφωσφορικό οξύ και p-τολουλενοσουλφονικό οξύ, ή από οξέα Lewis, όπως τριφθοριούχο βόριο, χλωριούχο ψευδάργυρο και χλωριούχο αργίλιο. Γενικότερα, η συγκεκριμένη μέθοδος ανταποκρίνεται σε όλες τις απαιτήσεις μιας σύγχρονης σύνθεσης ινδολίου, καθώς χαρακτηρίζεται από ευκολία και απλότητα. Το κυριότερο πλεονέκτημά της είναι η χρήση αλδεΰδης ή κετόνης, οι οποίες είναι διαθέσιμες εμπορικά [24].

1.1.4.4. Σύνθεση ινδολίου Fukuyama

Η σύνθεση ινδολίου Fukuyama είναι μια πρακτική χημική αντίδραση σε μία φιάλη (one-pot reaction) με τη μεσολάβηση κασσίτερου, η οποία οδηγεί στο σχηματισμό 2,3-διϋποκατεστημένων ινδολίων. Συνήθως χρησιμοποιείται ως αναγωγικός παράγοντας το υδρίδιο της τριβουτιλτίνης με αζωβισοβουτυρονιτρίλιο (AIBN) ή τριαιθυλοβοράνιο ως εκκινητής ριζών. Η αντίδραση μπορεί να εκκινήσει είτε με ένα όρθο-ισοκυανοστυρένιο είτε με ένα παράγωγο 2-αλκενυλοθειοανιλιδίου. Από αυτά το ινδόλιο σχηματίζεται μέσω ριζικής κυκλοποίησης από μια *α*-στανοϊμιδοϋλική ρίζα [25], όπως παρουσιάζεται παρακάτω:

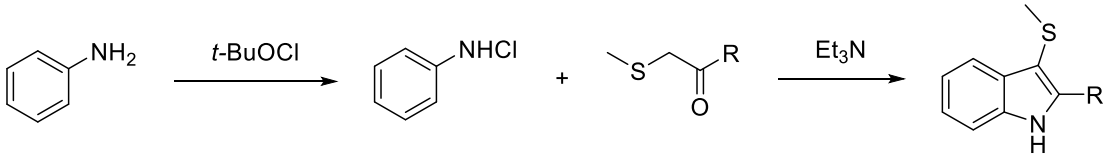


Σχήμα 4. *Σύνθεση ινδολίου Fukuyama.*

Η σύνθεση ινδόλιου Fukuyama μπορεί να δημιουργήσει μια σειρά διαφορετικών υποκαταστατών στη θέση 2 και 3 που ήταν προηγουμένως μη προσεγγίσιμες, χωρίς προστατευτική ομάδα στο άζωτο του δακτυλίου. Συνιστά μάλιστα, μία από τις απλούστερες μεθόδους για τη δημιουργία πολυ-υποκατεστημένων ινδολίων, με αποτέλεσμα να έχει χρησιμοποιηθεί σε πολυάριθμες συνθέσεις φυσικών προϊόντων, συμπεριλαμβανομένων της βινβλαστίνης και της στρυχνίνης. Επιπλέον, η αντίδραση αυτή δεν είναι στερεοειδική, δεδομένου ότι τόσο η cis όσο και η trans ισομορφή μπορούν να χρησιμοποιηθούν για τη λήψη του επιθυμητού προϊόντος [25].

1.1.4.5. Σύνθεση ινδολίου Gassman

Η σύνθεση ινδολίου Gassman περιλαμβάνει μια σειρά αντιδράσεων σε μία φιάλη, στην οποία ο υποαλογονίτης, ένα παράγωγο *β*-καρβονυλοσουλφιδίου και μια βάση προστίθενται διαδοχικά σε μια ανιλίνη για να δώσουν 3-θειοαλκοξυινδόλες με καλή έως εξαιρετική απόδοση. Στη συνέχεια, η αναγωγή με χρήση Raney Nickel αξιοποιείται για την αποθείωση του προϊόντος, οδηγώντας στην παραγωγή του επιθυμητού 3-Η-ινδολίου [26]. Η μέθοδος αυτή απεικονίζεται στη συνέχεια:

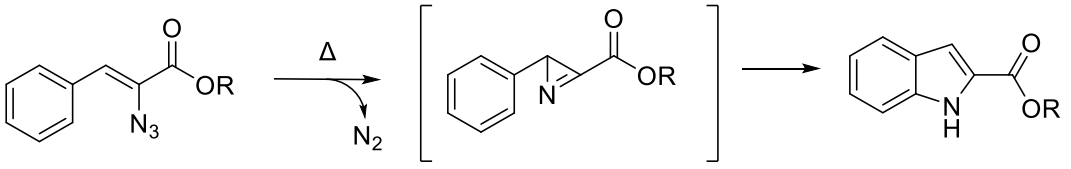


Σχήμα 5. *Σύνθεση ινδολίου Gassman.*

Η μέθοδος περιλαμβάνει αρχικά την οξείδωση της ανιλίνης με υποχλωριώδες *tert*-βουτύλιο (*t*-BuOCl) ή άλλο κατάλληλο αλογονωτικό παράγοντα προς παραγωγή χλωραμίνης. Έπειτα, προστίθεται το σουλφίδιο παράγοντας ένα άλας αζασουλφονίου, το οποίο κατά την κατεργασία με ήπια βάση, συχνότερα τριαιθυλαμίνη, παρέχει ένα υλίδιο θείου. Αυτά τα υλίδια αναδιατάσσονται αυθόρμητα με αναδιάταξη τύπου *Sommelet-Hauser* για να δώσουν κετόνη, η οποία συμπυκνώνεται προς παραγωγή του επιθυμητού ινδολίου. Η σουλφιδική ομάδα, η οποία καταλαμβάνει την 3 θέση του συστήματος ινδολίου, απομακρύνεται αναγωγικά με χρήση του καταλύτη Raney nickel [26].

1.1.4.6. Σύνθεση ινδολίου Hemetsberger

Η σύνθεση ινδολίου Hemetsberger, επίσης αποκαλούμενη σύνθεση Hemetsberger-Knittel, αναφέρθηκε για πρώτη φορά το 1972. Είναι μια χημική αντίδραση που διασπά θερμικά έναν 3-αρυλο-2-αζιδο-προπενικό εστέρα σε έναν ινδολ-2-καρβοξυλικό εστέρα [27], όπως φαίνεται παρακάτω:

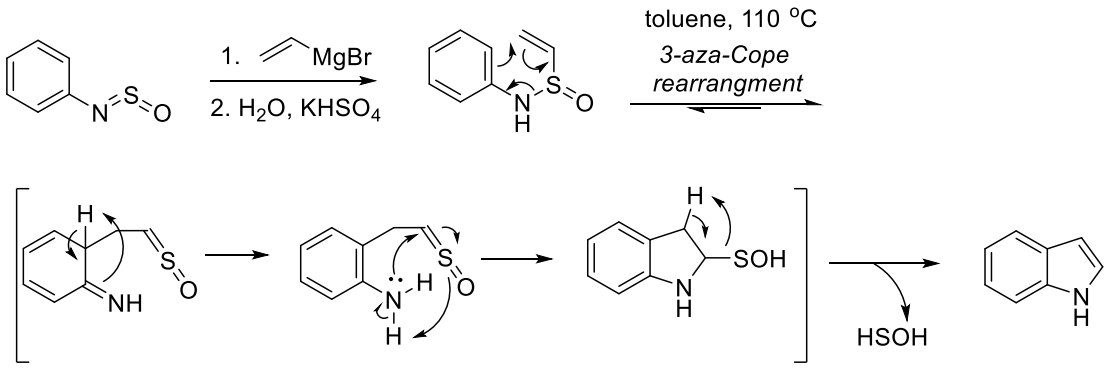


Σχήμα 6. *Μηχανισμός σύνθεσης ινδολίου Hemetsberger.*

Η μέθοδος αυτή είναι κατάλληλη για σύνθεση 4- ή 6-υποκατεστημένων ινδολίων από ορθο- ή παρα-υποκατεστημένες βενζαλδεΰδες. Είναι επίσης χρήσιμη για τη σύνθεση μιας σειράς φυσικών προϊόντων ινδολίου, όπως το συνένζυμο PQQ και τα παράγωγα ινδολίου με πολλούς υποκαταστάτες. Συνήθως η αντίδραση πραγματοποιείται με υψηλές αποδόσεις, ωστόσο λόγω της έλλειψης σταθερότητας και της δυσκολίας σύνθεσης του αρχικού αντιδραστηρίου, δεν είναι ιδιαίτερα διαδεδομένη [24].

1.1.4.7. Σύνθεση ινδολίου Julia

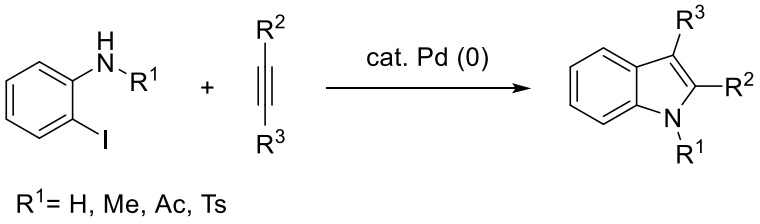
Η σύνθεση ινδολίου Julia ανακαλύφθηκε το 1986 και συνιστά μία γενική μέθοδο παρασκευής ινδολίων, η οποία δεν χρησιμοποιείται ευρέως παρά την απλότητα και τη δυνητική γενικότητα της. Πρακτικά, είναι μία χημική αντίδραση κατά την οποία χρησιμοποιούνται ως αρχικά αντιδραστήρια N-σουλφινυλοανιλίνες. Αυτές οι ενώσεις, μέσω επεξεργασίας με βινυλοβρωμιούχο μαγνήσιο παρουσία $KHSO_4$ μετατρέπονται σε σουλφιναμιδία με υψηλές αποδόσεις. Στη συνέχεια, με θέρμανση πραγματοποιείται η [3,3]-σιγματροπική αναδιάταξη, αναδιάταξη 3-*aza-Cope*, του σουλφιναμιδίου προς ινδόλιο έχοντας ως παραπροϊόν το θειενικό οξύ, το οποίο διασπάται πιθανώς σε θείο, υδρόθειο, διοξείδιο του θείου και θειικό οξύ. Σε αυτό το βήμα της αντίδρασης παρατηρούνται συνήθως χαμηλές αποδόσεις [5]. Παρακάτω παρουσιάζονται τα βήματα της αντίδρασης, καθώς και ο πιθανός μηχανισμός της:



Σχήμα 7. *Μηχανισμός σύνθεσης ινδολίου Julia.*

1.1.4.8. Σύνθεση ινδολίου Larock

Η σύνθεση ινδολίου Larock είναι μια αντίδραση σχηματισμού δακτυλίου, που αξιοποιεί παλλάδιο ως καταλύτη για τη σύνθεση ινδολίων από μια *ορθο*-ιωδοανιλίνη και ένα διϋποκατεστημένο αλκίνιο [28], όπως φαίνεται στην παρακάτω εικόνα:

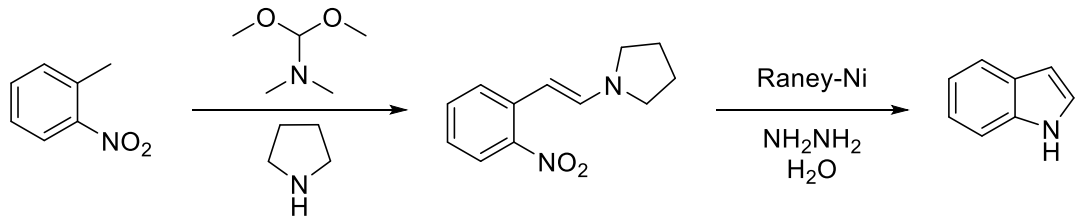


Σχήμα 8. *Σϋνθεση ινδολίου Larock.*

Η αντίδραση είναι εξαιρετικά ευέλικτη και μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την παραγωγή διαφόρων τύπων 2,3-διϋποκατεστημένων ινδολίων σε καλές έως εξαιρετικές αποδόσεις. Πιο συγκεκριμένα, η διαδικασία είναι αρκετά γενική όσον αφορά τους τύπους των υποκαταστατών που μπορούν να υπάρχουν στο άζωτο της ανιλίνης και στα δύο άκρα του τριπλού δεσμού του αλκινίου. Η αντίδραση είναι αρκετά εκλεκτική, τοποθετώντας την αρυλική ομάδα της ανιλίνης στο λιγότερο στερικά παρεμποδισμένο άκρο του τριπλού δεσμού και το τμήμα αζώτου στο περισσότερο στερικά παρεμποδισμένο άκρο [28].

1.1.4.9. Σύνθεση ινδολίου Leimgruber-Batcho

Η σύνθεση ινδολίων Leimgruber-Batcho είναι μια σειρά οργανικών αντιδράσεων που παράγουν ινδόλια και υποκατεστημένα ινδόλια από όρθο-νιτροτολουένια. Αρχικά, με χρήση N,N-διμεθυλοφορμαμιδικής διμεθυλοακετάλης και πυρρολιδίνης σχηματίζεται ένα ενδιάμεσο προϊόν. Το επιθυμητό ινδόλιο παράγεται στη συνέχεια σε ένα δεύτερο βήμα με αναγωγική κυκλοποίηση. Η αναγωγική κυκλοποίηση πραγματοποιείται με αντίδραση Raney nickel, υδραζίνη και νερό [29]. Η μέθοδος απεικονίζεται παρακάτω:

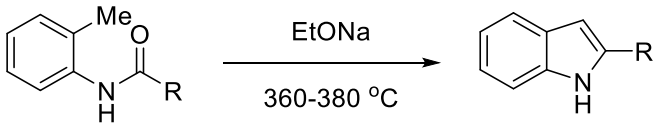


Σχήμα 9. *Σύνθεση ινδολίου Leimgruber-Batcho.*

Η διεργασία είναι μια δημοφιλής εναλλακτική της σύνθεσης ινδολίου Fischer, επειδή πολλά αρχικά όρθο-νιτροτολουένια είναι εμπορικά διαθέσιμα ή παρασκευάζονται εύκολα. Επιπλέον, οι αντιδράσεις πραγματοποιούνται με υψηλή απόδοση υπό ήπιες συνθήκες [29].

1.1.4.10. Σύνθεση ινδολίου Madelung

Η σύνθεση ινδολίου Madelung είναι μια χημική αντίδραση που παράγει υποκατεστημένα και μη ινδόλια με ενδομοριακή κυκλοποίηση N-φαινυλαμιδίων μέσω χρήσης ισχυρής βάσης σε υψηλή θερμοκρασία. Η σύνθεση Madelung αναφέρθηκε το 1912 από τον Walter Madelung, όταν διαπίστωσε για πρώτη φορά ότι τα όρθο-άλκυλο-υποκατεστημένα ανιλίδια χρησιμεύουν ως κατάλληλα υποστρώματα για τη σύνθεση *α*-υποκατεστημένων ινδολίων [30]. Η σύνθεση Madelung παρουσιάζεται στη συνέχεια:



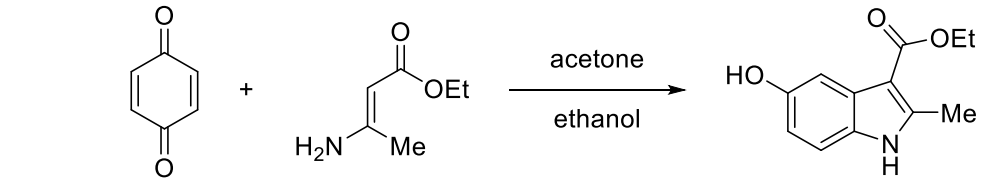
R= Me (50%), Ph (60%)

Σχήμα 10. *Σύνθεση ινδολίου Madelung.*

Το κυριότερο πλεονέκτημα αυτής της μεθόδου είναι η εύκολη προσβασιμότητα των υποστρωμάτων, ωστόσο οι δραστικές συνθήκες αντίδρασης θέτουν ορισμένους περιορισμούς. Το γεγονός αυτό ώθησε τους ερευνητές να αναζητήσουν διαδικαστικές τροποποιήσεις, έρευνα που συνεχίζεται έως σήμερα [30].

1.1.4.11. Σύνθεση ινδολίου Nenitzescu

Η σύνθεση ινδολίου Nenitzescu είναι μία χημική αντίδραση, η οποία σχηματίζει παράγωγα του 5-υδρόξυ-ινδολίου μέσω της αντίδρασης μεταξύ 1,4-βενζοκινονών και 3-αμινοκροτονικών αιθυλεστέρων. Η αντίδραση αυτή αναφέρθηκε πρώτη φορά το 1929 από τον Nenitzescu και έχει αποδειχθεί ότι είναι μια γενική διαδικασία για την παραγωγή 5-υδρόξυ-ινδολίων που φέρουν διαφορετικούς υποκαταστάτες. Η κλασική σύνθεση 5-υδροξυ-ινδολίου Nenitzescu αποτελείται από τη συμπύκνωση μεταξύ 1,4-βενζοκινόνης και β-αμινοκροτονικού αιθυλεστέρα προς σχηματισμό 5-υδροξυ-2-μεθυλο-ινδολίου-3-καρβοξυλικού αιθυλεστέρα [31]. Η αντίδραση αυτή απεικονίζεται παρακάτω:

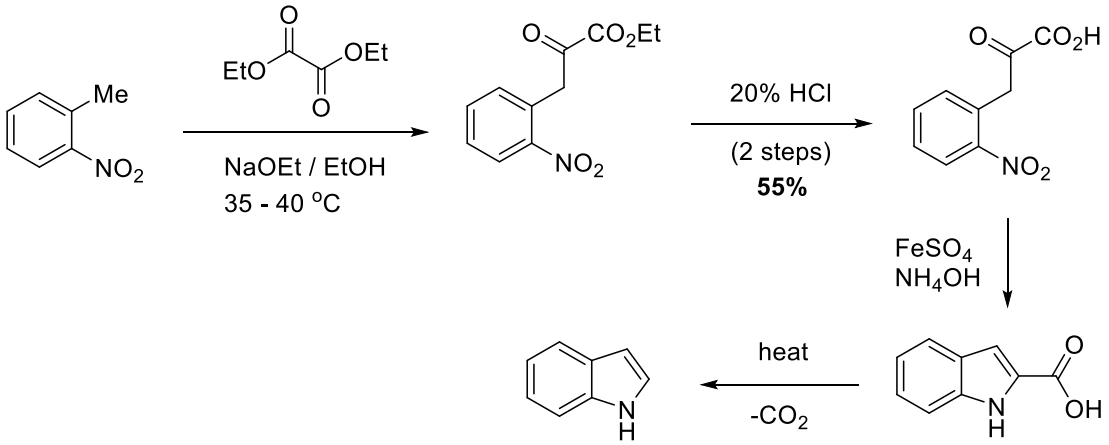


Σχήμα 11. *Σύνθεση ινδολίου Nenitzescu.*

Η αντίδραση Nenitzescu μπορεί, επίσης, να χρησιμοποιηθεί για την παραγωγή 6-υδροξυινδολίων, 5-υδροξυβενζοφουρανίων, 5-υδροξυινδαζολίου, τα οποία είναι δύσκολο να σχηματιστούν μέσω άλλων μεθόδων. Είναι, λοιπόν, δυνατό να εκτελεστεί με διάφορους συνδυασμούς υποκαταστατών, οι οποίοι περιλαμβάνουν μεθυλομάδες, μεθόξυ-ομάδες, αιθυλομάδες, προπυλομάδες και ομάδες πρωτονίων [31].

1.1.4.12. Σύνθεση ινδολίου Reissert

Η σύνθεση ινδολίου Reissert είναι μια σειρά χημικών αντιδράσεων, οι οποίες αναφέρθηκαν για πρώτη φορά το 1897 από τον Arnold Reissert. Για τη σύνθεση χρησιμοποιείται αρχικά όρθο-νιτροτολουόλιο και διαιθυλοξαλικό οξύ, τα οποία με τη βοήθεια βάσης συμπυκνώνονται προς αιθυλο-ο-νιτροφαινυλοπυρουβικό οξύ. Το προϊόν αυτό μέσω όξινης υδρόλυσης μετατρέπεται σε ο-νιτροφαινυλοπυρουβικό οξύ. Στη συνέχεια, αυτό ανάγεται με θειικό σίδηρο και αμμωνία για να σχηματιστεί η αντίστοιχη αμίνη, η οποία κυκλοποιείται, χωρίς απομόνωση, σε ινδολ-2-καρβοξυλικό οξύ. Η θέρμανση του τελευταίου πάνω από το σημείο τήξης του έχει ως αποτέλεσμα την αποκαρβοξυλίωση προς παραγωγή του επιθυμητού ινδολίου [32]. Η παραπάνω διαδικασία παρουσιάζεται στη συνέχεια:

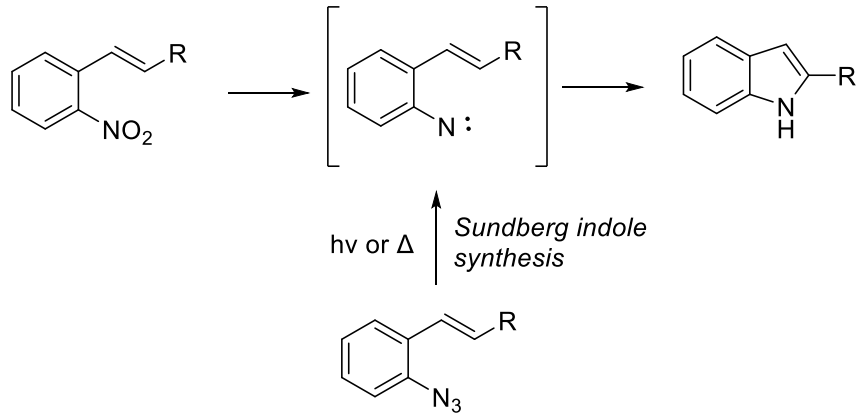


Σχήμα 12. *Σύνθεση ινδολίου Reissert.*

Βέβαια, έχουν δοκιμαστεί και διαφορετικές βάσεις και συνθήκες αναγωγής για τη μέθοδο αυτή. Πιο συγκεκριμένα, το αιθοξείδιο του καλίου σε ξηρό αιθέρα είναι ισχυρότερη βάση από το αιθοξείδιο του νατρίου σε αιθανόλη, ενώ για το στάδιο της αναγωγής έχουν χρησιμοποιηθεί σκόνη σιδήρου σε οξικό οξύ/αιθανόλη, ρινίσματα σιδήρου σε υδροχλωρικό οξύ, σκόνη ψευδαργύρου σε οξικό οξύ και διθειονίτης νατρίου [32].

1.1.4.13. Σύνθεση ινδολίου Cadogan-Sundberg

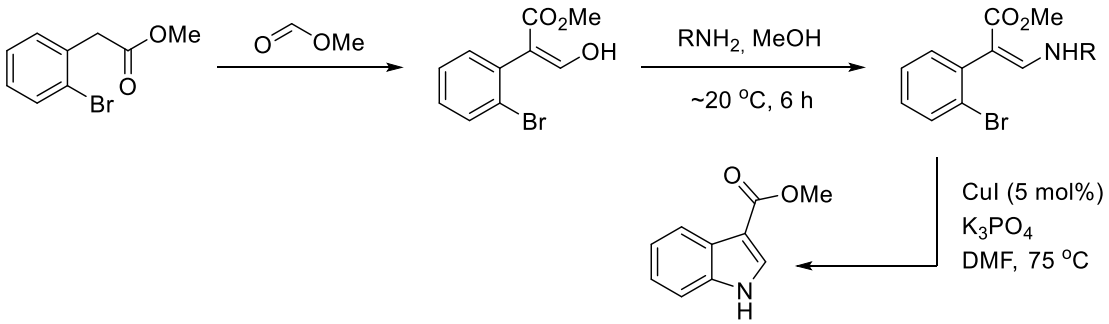
Η αντίδραση Cadogan αναφέρεται στην αφαίρεση οξυγόνου των όρθο-νιτροστυρενίων ή των όρθο-νιτροστυλβενίων με τριαλκυλοφωσφίτη ή τριαλκυλοφωσφίνη και την επακόλουθη κυκλοποίηση του προκύπτοντος ενδιάμεσου νιτρενίου, προς σχηματισμό ινδολίων. Η μέθοδος αυτή έχει, επίσης, αξιοποιηθεί για την παρασκευή ποικίλων ετεροκυκλικών ενώσεων που περιέχουν άζωτο, όπως είναι οι καρβαζόλες, ινδαζόλες, βενζιμιδαζόλες, βενζοτριαζόλες, ανθρανίλες, φαιναζίνες, φαινοθειαζίνες, κινολίνες και συναφείς ενώσεις. Από την άλλη πλευρά, η σύνθεση ινδολίου Sundberg αναφέρεται στην παραγωγή ινδολίων, είτε μέσω θερμόλυσης, είτε μέσω ακτινοβόλησης του όρθο-αζιδοστυρενίου με ενδιάμεσο προϊόν το νιτρένιο. Οι αντιδράσεις αυτές συχνά ομαδοποιούνται ως σύνθεση ινδολίου Cadogan-Sundberg, διότι διαθέτουν κοινό ενδιάμεσο προϊόν [25], όπως φαίνεται παρακάτω:



Σχήμα 13. *Σύνθεση ινδολίου Cadogan-Sundberg.*

1.1.4.14. Σύνθεση ινδολίου Ullmann

Η σύνθεση ινδολίου Ullmann είναι μία χημική μέθοδος για την παραγωγή N-αλκυλιωμένων και N-αρυλιωμένων παραγώγων του 1H-ινδολο-3-καρβοξυλικού μεθυλίου. Αυτά παράγονται με ενδομοριακή αρυλαμίνωση χρησιμοποιώντας CuI ως καταλύτη. Η αντίδραση πραγματοποιείται σε ήπιες συνθήκες και σε καλές έως υψηλές αποδόσεις [30], όπως παρουσιάζεται παρακάτω:



Σχήμα 14. *Σύνθεση ινδολίου Ullmann.*

Υπό βελτιστοποιημένες συνθήκες, η μέθοδος αυτή χρησιμοποιήθηκε για την παρασκευή 1H-ινδολο-3-καρβοξυλικών μεθυλίων με αλειφατικούς και αρωματικούς υποκαταστάτες στο άτομο του αζώτου. Επιπλέον, έχει μελετηθεί η δυνατότητα

αντικατάστασης των καταλυτών που περιέχουν χαλκό από άλατα σιδήρου, με τον χλωριούχο σίδηρο να συνιστά αποτελεσματικό καταλύτη για τη N-αρυλίωση [30].

1.2. Χαλκόνες

1.2.1. Προέλευση χαλκονών

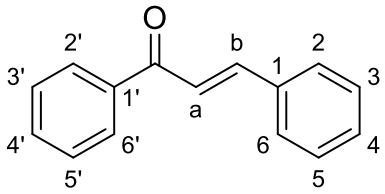
Οι χαλκόνες αποτελούν μια σημαντική κατηγορία βιοδραστικών ενώσεων που ανήκουν στην οικογένεια των φλαβονοειδών [33]. Γενικότερα, τα φλαβονοειδή συνιστούν μία από τις μεγαλύτερες χημικές ομάδες δευτερογενών μεταβολιτών που απαντώνται σε φυτά, φρούτα, λαχανικά, ακόμα και σε φύλλα [34]. Η ονομασία χαλκόνες προέρχεται από τη λέξη χαλκός και αποδόθηκε στις ενώσεις αυτές λόγω του χάλκινου χρώματος που διαθέτει η πλειονότητά τους [35]. Πιο συγκεκριμένα, οι χαλκόνες αποτελούνται από χρωστικές ουσίες των οποίων το χρώμα αλλάζει από κίτρινο σε πορτοκαλί σε ορισμένα είδη των φυτών *Coreopsis* και *Asteraceae* [33]. Τα τελευταία χρόνια έχει ενταθεί η σύνθεση και η απομόνωσή τους από φυσικές πηγές λόγω της ευρείας βιοδραστικότητάς τους [35].

Η πλειονότητα των χαλκονών που απαντώνται στη φύση είναι πολυϋδροξυλιωμένες αρωματικές ενώσεις. Αυτές βρίσκονται σε αφθονία στα λαχανικά, τα φρούτα, τα δημητριακά, τα όσπρια, τα ροφήματα, όπως είναι το τσάι, ο καφές, το κόκκινο κρασί και η μπύρα, καθώς και άλλα αρωματικά φυτά [35], [36]. Ειδικότερα, χαλκόνες έχουν εντοπιστεί στα εσπεριδοειδή, τα μήλα, τις ντομάτες, τα ασκαλώνια, τις πατάτες, τις φύτρες φασολιών και τη γλυκόριζα [37]. Ο μεγαλύτερος αριθμός χαλκονών φυσικής προέλευσης έχει απομονωθεί από είδη των οικογενειών *Leguminosae, Asteraceae* και *Moraceae* [38]. Από την αρχαιότητα ακόμη στην Ασία, την Αφρική και τη Νότιο Αμερική χρησιμοποιούνταν για θεραπευτικούς σκοπούς τα είδη *Glycyrrhiza, Angelica, Ruscus* και *Piper*, τα οποία εμπεριέχουν χαλκόνες [33].

Η παρουσία των χαλκονών στα φυτά οφείλεται στη βιοσύνθεσή τους μέσω της συνθάσης της χαλκόνης (CHS), η οποία είναι ένα ένζυμο που ανήκει στην οικογένεια των πολυκετιδικών συνθασών τύπου ΙΙΙ. Αυτή βρίσκεται σε όλα τα ανώτερα φυτά, ενώ έχει ανιχνευθεί και σε κάποια κατώτερα φυτά [35]. Η αποτελεσματικότητα της CHS ως ένζυμο για το σχηματισμό χαλκόνης οφείλεται στην παρουσία δύο ενεργών κέντρων στη δομή της. Το πρώτο εξ αυτών, που αναφέρεται ως άνω περιοχή, αποτελείται από τέσσερα αμινοξέα, ενώ το δεύτερο ονομάζεται κατώτερη περιοχή. Η φαινυλαλανίνη είναι η κύρια πρόδρομη ουσία για τη βιοσύνθεση των χαλκονών, ενώ αυτές χρησιμοποιούνται για τη βιοσύνθεση φλαβονοειδών, ισοφλαβονοειδών, ανθοκυανιδινών, προανθοκυανιδινών και άλλων πολυφαινολικών ενώσεων [36]. Οι χαλκόνες είναι δευτερογενείς μεταβολίτες που εξυπηρετούν τους αμυντικούς μηχανισμούς των φυτών για την αντιμετώπιση των δραστικών ριζών οξυγόνου και την αποτροπή επιθέσεων από μικροοργανισμούς, έντομα και ζώα. Μετά τη σύνθεσή τους έχουν τρεις κύριους προορισμούς στο μεταβολισμό των φυτών. Μπορούν να χρησιμοποιηθούν είτε για την παραγωγή ωρονών, είτε για την παραγωγή συζευγμάτων γλυκοζυλίου, που είναι κίτρινες χρωστικές των λουλουδιών και στις περισσότερες περιπτώσεις για τη μετατροπή σε ναρινγενίνη μέσω ισομεράσης της χαλκόνης [37].

1.2.2. Χημική δομή χαλκονών και ιδιότητες

Οι χαλκόνες έχουν κοινό χημικό σκελετό την 1,3-διαρυλ-2-προπεν-1-όνη, που είναι γνωστή ως χαλκονοειδές. Στην παρακάτω εικόνα παρουσιάζεται η δομή του σκελετού των χαλκονών όπου ο φαινολικός δακτύλιος, ο οποίος συνδέεται με την ομάδα του καρβονυλίου ορίζεται ως Α, ενώ ο βενζολικός δακτύλιος ονομάζεται δακτύλιος Β [35].



Εικόνα 2. *Δομή χαλκόνης*

Ο χημικός σκελετός τους υπάρχει ως trans και cis ισομερές, με το πρώτο να είναι θερμοδυναμικά πιο σταθερό [35]. Αυτό συμβαίνει, διότι είναι πολύ ισχυρές οι στερικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ της ομάδας του καρβονυλίου και του δακτυλίου Α. Η trans διαμόρφωση της χαλκόνης είναι πλήρως επίπεδη, ενώ η cis αναμένεται να είναι μη επίπεδη λόγω της στερικής παρεμπόδισης μεταξύ του καρβονυλικού οξυγόνου και του φαινολικού δακτυλίου [33]. Από χημική άποψη οι χαλκόνες είναι ανοικτής αλυσίδας φλαβονοειδή στα οποία οι δύο αρωματικοί δακτύλιοι ενώνονται με ένα α,β-ακόρεστο καρβονυλικό σύστημα τριών ανθράκων [37], [38]. Επίσης, διαθέτουν συζευγμένους διπλούς δεσμούς και ένα πλήρως αποκεντρωμένο σύστημα ηλεκτρονίων και στους δύο βενζολικούς δακτυλίους [36]. Λόγω του συζευγμένου συστήματός τους, οι χαλκόνες με τις κατάλληλες λειτουργικές ομάδες έλξης και ώθησης ηλεκτρονίων στους βενζολικούς δακτυλίους μπορούν να είναι φθορίζουσες, καθιστώντας τες με αυτό τον τρόπο δυνητικούς χημικούς ανιχνευτές για απεικόνιση ή διάγνωση [35]. Επιπρόσθετα, οι χαλκόνες μπορούν εύκολα να κυκλοποιηθούν σχηματίζοντας φλαβονοειδή δομή, καθιστώντας τις εξαιρετικές συνθόνες για την σύνθεση αντίστοιχων μορίων [39].

Οι χαλκόνες που απαντώνται στη φύση είναι συνήθως υποκατεστημένες με υδροξύλια ή μεθύλια, όμως απαντώνται κι ως διϋδροχαλκόνες, διμερή (διχαλκόνες) και γλυκοζίτες [39]. Είναι γενικά μικρές ενώσεις, χαμηλού μοριακού βάρους της τάξης των 300-600 g/mol, μη χειρόμορφες και με σχετικά υψηλή λιποφιλικότητα (LogP 5-7). Ως αποτέλεσμα της παρουσίας του χρωμοφόρου -CO-CH=CH-, οι χαλκόνες είναι έγχρωμες ενώσεις [36]. Απαντώνται ως κίτρινα, πορτοκαλί και καφέ κρυσταλλικά στερεά. Ακόμα, διαλύονται εύκολα στις αλκοόλες, τα υδατικά όξινα και αλκαλικά διαλύματα, καθώς και σε οργανικούς διαλύτες, όπως είναι η ακετόνη, το χλωροφόρμιο και το διχλωρομεθάνιο. Επιπλέον, το συζευγμένο σύστημα διπλών δεσμών που διαθέτουν είναι πιθανότατα ο λόγος για το χαμηλό δυναμικό οξειδοαναγωγής τους, τη σταθερότητά τους, τις αντιδράσεις μεταφοράς ηλεκτρονίων και κυρίως για τις πολλά υποσχόμενες βιολογικές δραστηριότητές τους [39].

1.2.3. Βιολογική δράση χαλκονών

Οι χαλκόνες λόγω της παρουσίας ενός *α,β*-ακόρεστου καρβονυλικού συστήματος στη δομή τους επιδεικνύουν πολλές βιολογικές δράσεις [40]. Αυτές περιλαμβάνουν αντικαρκινική, αντιφλεγμονώδη, αντιβακτηριακή, αντιμικροβιακή, αντιδιαβητική και αντιοξειδωτική δράση. Επιπλέον, είναι δραστικές έναντι ελονοσίας, φυματίωσης,

διαφόρων ιών και ειδικότερα του ιού της ανθρώπινης ανοσοανεπάρκειας HIV, ενώ εμφανίζουν και νευροπροστατευτικές επιδράσεις [35], [36], [37], [38], [39], [40]. Επίσης, κάποιες χαλκόνες από φυσικά προϊόντα έχουν χρησιμοποιηθεί για τη θεραπεία καρδιαγγειακών παθήσεων, ενώ άλλες έχουν ενταχθεί σε καλλυντικά [37]. Ταυτόχρονα, λόγω της παρουσίας φαινολικών δακτυλίων, οι χαλκόνες έχουν τη δυνατότητα να αντιμετωπίζουν τις ελεύθερες ρίζες, γεγονός αρκετά χρήσιμο για θεραπεία ασθενειών [36]. Οι βασικότερες από τις δράσεις αυτές θα παρουσιαστούν στη συνέχεια.

1.2.3.1. Αντικαρκινική δράση

Ο καρκίνος προκαλείται από την ανεξέλεγκτη ανάπτυξη των κυττάρων και είναι μια πολυπαραγοντική ασθένεια που απειλεί εκατομμύρια ζωές κάθε χρόνο παγκοσμίως. Ορισμένες χαλκόνες έχουν τη δυνατότητα να στοχεύσουν βασικές μοριακές αντιδράσεις που μπορεί να προκαλέσουν τη γένεση και την εξέλιξη του καρκίνου. Επίσης, έχει αποδειχθεί ότι είναι φθηνές, άμεσα διαθέσιμες και σχετικά μη τοξικές ενώσεις, για αυτό και έχουν κερδίσει το ενδιαφέρον των ερευνητών [41].

Υπάρχουν διάφοροι μηχανισμοί δράσης έναντι του καρκίνου. Αρχικά, κάποιες χαλκόνες αναστέλλουν την αποικοδόμηση της πρωτεΐνης p53, το οποίο αποτελεί κρίσιμη στρατηγική στην αντικαρκινική θεραπεία. Η πρωτεΐνη αυτή ρυθμίζει τον κυτταρικό κύκλο και λειτουργεί ως κατασταλτικός παράγοντας των όγκων. Πιο συγκεκριμένα, διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στη διατήρηση της κυτταρικής και γονιδιωματικής ακεραιότητας και στην πρόληψη του πολλαπλασιασμού των ανερχόμενων καρκινικών κυττάρων. Η πρωτεΐνη p53 αποικοδομείται από διάφορες ενώσεις, όπως το MDM2 και η Sirtuin-1. Έχει αποδειχθεί ότι αρκετές χαλκόνες μπορούν να παρεμποδίσουν την αλληλεπίδραση μεταξύ MDM2 και της πρωτεΐνης p53 συνιστώντας στην αναστολή της ανάπτυξης καρκινικών κυττάρων [41].

Επίσης, οι χαλκόνες μπορούν να δράσουν ως παράγοντες έναντι της μίτωσης. Στη διαδικασία της μίτωσης καθοριστικό ρόλο παίζει η τουμπουλίνη. Αυτή είναι μια διμερής πρωτεΐνη που αποτελείται από δύο παρόμοιες, μη ταυτόσημες υπομονάδες, τις α και β. Ορισμένα παράγωγα των χαλκονών μπορούν να συνδεθούν με τη β-τουμπουλίνη και να εμποδίσουν τον πολυμερισμό της, οδηγώντας σε απότομη διακοπή της συναρμολόγησης της μιτωτικής ατράκτου. Με αυτό τον τρόπο, παρεμβαίνουν στη λειτουργία του κυτταροσκελετού, διακόπτοντας τη διαδικασία της μίτωσης και περιορίζοντας δραστικά τον ανεξέλεγκτο πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων [41].

Πέρα από αυτά, οι χαλκόνες παρεμποδίζουν τη δράση του πυρηνικού παράγοντα-κάπα Β (nuclear factor kappa B, NF-κB). Αυτός είναι ένας κρίσιμος μεταγραφικός παράγοντας που παίζει σημαντικό ρόλο στη φλεγμονή, την έμφυτη ανοσία και την καρκινογένεση. Η σηματοδότηση του NF-κB αποδείχθηκε ότι συμβάλλει στην εξέλιξη του καρκίνου μέσω της ρύθμισης των κυτταροκινών που προάγουν τον όγκο, της αναστολής της απόπτωσης και της προώθησης των αγγειογενετικών παραγόντων. Έτσι, οι αναστολείς του NF-κB μπορούν να οδηγήσουν σε αντικαρκινική απόκριση ή σε πιο ευαίσθητη δράση αντικαρκινικών φαρμάκων. Η δραστηριότητα του NF-κB ρυθμίζεται κυρίως από τις IB κινάσες (inhibitory kappa B kinases, IKK), οι οποίες αναγνωρίζονται ως οι κεντρικοί μεσολαβητές των ανοσολογικών αποκρίσεων και της

φλεγμονής. Συνεπώς, η παρέμβαση της λειτουργίας του NF-κB μέσω της αναστολής των κινασών IB αναμένεται να καταστείλει τη μετατόπιση της πρωτεΐνης NF-κB, οπότε και την ανάπτυξη του καρκίνου. Οι χαλκόνες, λοιπόν, προκαλούν την ομοιοπολική τροποποίηση των πρωτεϊνών IKK λόγω του α,β-ακόρεστου καρβονυλικού συστήματος που διαθέτουν [41].

Επιπλέον, οι χαλκόνες μπορούν να παρεμποδίσουν την αγγειογένεση, η οποία είναι ένας πολλά υποσχόμενος στόχος για τη θεραπεία του καρκίνου. Αυτό συμβαίνει, διότι η καρκινική αγγειογένεση είναι μια παθολογική διαδικασία μέσω της οποίας τα καρκινικά κύτταρα δημιουργούν νέα αγγεία στην περιοχή του όγκου, που είναι απαραίτητο για τη καρκινική αύξηση και τις μεταστάσεις. Έχει αποδειχθεί ότι οι χαλκόνες διαμορφώνουν διάφορα στάδια της αγγειογένεσης. Πιο συγκεκριμένα, επηρεάζουν τον αγγειακό ενδοθηλιακό παράγοντα ανάπτυξης (vascular endothelial factor, VEGF), το βασικό ινοβλαστικό παράγοντα ανάπτυξης (basic fibroblast growth factor, bFGF), την οδό σηματοδότησης του μετασχηματιστικού αυξητικού παράγοντα β (transforming growth factor-β, TGF-β) και τον πολλαπλασιασμό και μετανάστευση των ενδοθηλιακών κυττάρων [41].

1.2.3.2. Αντιφλεγμονώδης δράση

Η φλεγμονή αποτελεί μέρος της ανατροφοδότησης του ανοσοποιητικού συστήματος του οργανισμού. Μια φλεγμονώδης αντίδραση είναι υπεύθυνη για την επούλωση των λοιμώξεων, των τραυματισμών και οποιασδήποτε βλάβης στους ιστούς. Οι χαλκόνες είτε φυσικές είτε συνθετικές μπορούν να εμφανίσουν αντιφλεγμονώδη δράση μέσω διαφόρων μηχανισμών. Αρχικά, ορισμένες από αυτές είναι αναστολείς και των δύο μορφών του ενζύμου της κυκλοοξυγενάσης COX-1 και COX-2. Η καταστολή της δραστηριότητας του ενζύμου COX μπορεί να ανακουφίσει τα φλεγμονώδη συμπτώματα και τον πόνο [42].

Επιπρόσθετα, πολλές χαλκόνες δρουν ως αναστολείς της προσταγλανδίνης E2 (prostaglandin E_2, PGE2) και του μονοξειδίου του αζώτου NO. Η καταστολή της απελευθέρωσης της PGE2 και του NO έχει προταθεί ως πιθανή θεραπεία για διάφορες φλεγμονώδεις ασθένειες. Πρώτα από όλα, το αραχιδονικό οξύ εκκινεί την παραγωγή της PGE2 μέσω του ενζυμικού καταρράκτη που προκαλείται από τα ένζυμα της COX. Η PGE2 είναι ένας σημαντικός φλεγμονώδης μεσολαβητής και είναι εκτενώς κατανεμημένη στο ανθρώπινο σώμα. Είναι το πιο άφθονο μεταβολικό προϊόν, το οποίο παίζει ζωτικό ρόλο στην υπεραλγησία, την πυρετική και την αγγειακή διαπερατότητα. Ως εκ τούτου, η δραστηριότητά της μπορεί να αποτελέσει στόχο για την ανάπτυξη διαφόρων αναστολέων COX ώστε να αντιμετωπιστούν ποικίλες φλεγμονώδεις ασθένειες. Από την άλλη πλευρά, το NO είναι άλλος ένας βασικός φλεγμονώδης μεσολαβητής και συντίθεται με τρεις τρόπους, από τη νευρωνική συνθάση του NO (neural NO Synthase, nNOS), την ενδοθηλιακή συνθάση του NO (endothelium NO Synthase, eNOS) και την επαγώγιμη ισομορφή iNOS σε πολυάριθμα κύτταρα θηλαστικών. Από την παραγωγή μεγάλης ποσότητας NO προκαλείται βλάβη στους ιστούς του οργανισμού. Σε φλεγμονώδεις διαταραχές, όπως για παράδειγμα η ρευματοειδής αρθρίτιδα, παρατηρείται μεγάλη απελευθέρωση NO από ενεργοποιημένα μακροφάγα. Κατά συνέπεια, ισχυροί και επιλεκτικοί αναστολείς του NO μπορούν να χρησιμοποιηθούν για θεραπευτική εφαρμογή έναντι της φλεγμονής [42].

Παράλληλα, οι χαλκόνες, όπως έχει προαναφερθεί, αναστέλλουν τη δράση του πυρηνικού παράγοντα-κάπα Β (NF-κΒ). Ο παράγοντας αυτός είναι ένα πρωτεϊνικό σύμπλεγμα που ρυθμίζει τη μεταγραφή του DNA, την παραγωγή κυτταροκινών (κυτοκινών) και την ύπαρξη κυττάρων. Το μονοπάτι σηματοδότησης του NF-κΒ παίζει καθοριστικό ρόλο στην έκφραση προφλεγμονωδών γονιδίων. Αυτά περιλαμβάνουν κυτταροκίνες, χημειοκίνες και μόρια προσκόλλησης. Ειδικότερα, ο NF-κΒ συσχετίζεται με τα σηματοδοτικά μονοπάτια της ιντερλευκίνης-1 (interleukin-1, IL-1), η οποία δρα ως προφλεγμονώδης κυτταροκίνη και του παράγοντα νέκρωσης όγκων-α (tumor necrosis factor-α, TNF-α), μια πρωτεΐνη κυτταρικής σηματοδότησης που εμπλέκεται στη συστηματική φλεγμονή. Συνεπώς, η αναστολή του NF-κβ μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τη θεραπεία χρόνιων φλεγμονωδών ασθενειών [42].

1.2.3.3. Αντιμικροβιακή δράση

Η αύξηση της ανθεκτικότητας των μικροβίων στα υπάρχοντα φάρμακα καθιστά αναγκαία την ανάπτυξη νέων αντιμικροβιακών παραγόντων. Σε αυτό μπορούν να φανούν χρήσιμες οι χαλκόνες, καθώς χρησιμοποιούν διαφορετικούς μηχανισμούς για την αντιβακτηριακή τους δράση από τα συμβατικά αντιβιοτικά. Συνεπώς, μπορούν να διαδραματίσουν σημαντικό ρόλο στην ενίσχυση της αντιβιοτικής θεραπείας. Πρώτα από όλα, ορισμένες χαλκόνες μπορούν να προκαλέσουν διαταραχή στη βακτηριακή πλασματική μεμβράνη. Αυτή είναι υπεύθυνη για τις διαδικασίες της ανταλλαγής αερίων, της κυκλοφορίας, του οξειδωτικού μεταβολισμού και της διασύνδεσης των πεπτιδογλυκανών, καθώς και του βιοσυνθετικού μεταβολισμού των λιπιδίων. Οι χαλκόνες αλληλεπιδρούν με τα φωσφατίδια προκαλώντας σημαντικές μεταρρυθμίσεις στις ιδιότητες της μεμβράνης, όπως είναι το πάχος της, καθώς και να αλλάξουν την κατανομή των πρωτεϊνών της μεμβράνης [43].

Επίσης, κάποιες χαλκόνες μπορούν να παρεμποδίσουν το σχηματισμό βιοφίλμ των βακτηρίων. Ένα από τα κύρια χαρακτηριστικά που παρουσιάζουν τα βακτήρια που σχηματίζουν βιοφίλμ είναι η σημαντικά υψηλότερη αντοχή τους σε αντιμικροβιακούς παράγοντες. Για το λόγο αυτό καθίσταται επιτακτική η ανάγκη εύρεσης νέων αντιμικροβιακών παραγόντων, προσπάθεια στην οποία μπορούν να συμβάλλουν οι χαλκόνες. Αυτές έχουν τη δυνατότητα να μειώσουν την προσκόλληση των κυττάρων κατά το σχηματισμό βιοφίλμ, καθώς και να αλληλεπιδράσουν με την επιφάνεια της μεμβράνης έχοντας θεραπευτική δράση ενάντια σε διάφορες επιβλαβείς χημικές ουσίες. Ακόμη, σε ένα ήδη εγκατεστημένο βιοφίλμ μπορούν να αδρανοποιήσουν τα βακτήρια πιθανότατα μέσω αναστολής του μεταβολισμού των λιπιδίων και διατάραξης της συνοχής της βακτηριακής κυτταροπλασματικής μεμβράνης [43].

Ταυτόχρονα, οι χαλκόνες μπορούν να επηρεάσουν τη δραστηριότητα των αντλιών εκροής (efflux pump, EP). Αυτές συμβάλλουν σημαντικά στην αντοχή των μικροοργανισμών ενάντια στα φάρμακα, καθώς μεταφέρουν αποτελεσματικά μικρά μόρια έξω από το βακτηριακό κύτταρο, προστατεύοντάς τους. Στα βακτηριακά βιοφίλμ οι αντλίες εκροής είναι ιδιαίτερα δραστικές, γεγονός που τις καθιστά δυνητικό στόχο για φάρμακα που δρουν κατά του βιοφίλμ. Πιο συγκεκριμένα, οι αναστολείς των αντλιών εκροής μειώνουν την ανάπτυξη βιοφίλμ, γεγονός που μπορεί και να το εξαλείψει πλήρως. Σε αυτό το πλαίσιο, έχει αποδειχθεί ότι οι χαλκόνες είναι εξαιρετικοί υποψήφιοι κατά του *Staphylococcus aureus*, ένα θετικό κατά Gram βακτήριο [43].

Επιπλέον, ορισμένες χαλκόνες παίζουν το ρόλο του αναστολέα της δράσης της πρωτεϊνικής φωσφατάσης της τυροσίνης (Protein tyrosine phosphatase, PTP), ειδικότερα του βακτηρίου *Mycobacterium tuberculosis*. Αυτό εκκρίνει δύο πρωτεΐνες, τις PtpA και PtpB, στο κύτταρο του ξενιστή. Οι πρωτεΐνες αυτές παρεμβαίνουν στις οδούς σήματος του ξενιστή, οδηγώντας σε μείωση της ανοσολογικής του απόκρισης. Γενικότερα, οι πρωτεϊνικές φωσφατάσες της τυροσίνης διαδραματίζουν κρίσιμο ρόλο στη ρύθμιση του επιπέδου φωσφορυλίωσης στις πρωτεΐνες. Η διαδικασία αυτή είναι ζωτικής σημασίας για τη μεταγωγή σήματος σε διάφορες κυτταρικές διεργασίες, όπως ο μεταβολισμός, η ανάπτυξη, ο πολλαπλασιασμός και η γονιδιακή μεταγραφή [43].

Πέρα από αυτά, η αντιγραφή του παρεμβατικού DNA χρησιμεύει ως κρίσιμος μηχανισμός στην αντιβακτηριακή δράση. Η γυράση του DNA, η οποία ταξινομείται ως τοποϊσομεράση τύπου ΙΙ, διαδραματίζει κρίσιμο ρόλο στην αντιγραφή του βακτηριακού DNA. Συγκεκριμένα, είναι υπεύθυνη για την εισαγωγή αρνητικών υπερελίξεων σε μόρια DNA που έχουν περιορισμένη ευελιξία στη διαμόρφωσή τους. Αξίζει να σημειωθεί ότι η βακτηριακή γυράση του DNA δεν απαντάται στον άνθρωπο, γεγονός που την καθιστά ελκυστικό στόχο για αντιβακτηριακή θεραπεία. Έναντι αυτής έχει παρατηρηθεί ότι δρα πληθώρα χαλκονών [43].

1.2.3.4. Αντιδιαβητική δράση

Ο σακχαρώδης διαβήτης είναι μια χρόνια μεταβολική διαταραχή του μεταβολισμού των υδατανθράκων, των λιπών και των πρωτεϊνών που χαρακτηρίζεται από υψηλό σάκχαρο στο αίμα. Αυτός οφείλεται σε δύο αιτίες, είτε σε χαμηλή παραγωγή ινσουλίνης από τον οργανισμό που δεν επαρκεί για τη μετατροπή της ζάχαρης, του αμύλου και άλλων τροφών σε ενέργεια, όπως συμβαίνει στην περίπτωση διαβήτη τύπου Ι, είτε επειδή τα κύτταρα δεν χρησιμοποιούν σωστά την ινσουλίνη στο διαβήτη τύπου ΙΙ. Πληθώρα φυσικών και συνθετικών χαλκονών μπορούν να βοηθήσουν στη θεραπεία του διαβήτη που δρουν αλληλεπιδρώντας με διάφορους θεραπευτικούς στόχους [44].

Αρχικά, οι χαλκόνες διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην αναστολή της πρωτεϊνικής φωσφατάσης της τυροσίνης 1Β (Protein tyrosine phosphatase 1B, PTP1B), επομένως χρησιμοποιούνται για τη θεραπεία και τη διαχείριση του διαβήτη. Η PTP1B, ένα διακυτταρικό ένζυμο, παίζει καθοριστικό ρόλο στον διαβήτη τύπου ΙΙ και την παχυσαρκία ως αρνητικός ρυθμιστής της οδού σηματοδότησης της ινσουλίνης και της λεπτίνης. Η δράση του συνίσταται στην αποφωσφορυλίωση συγκεκριμένων κατάλοιπων φωσφοτυροσίνης στον υποδοχέα ινσουλίνης και στις πρωτεΐνες υποστρώματος του υποδοχέα ινσουλίνης. Οι πιο γνωστές χαλκόνες που δρουν ως αναστολείς της PTP1B είναι η ένωση licochalcone a, η οποία απομονώνεται από το φυτό *Glycyrrhiza inflata*, καθώς και τα συνθετικά παράγωγά της [44].

Επιπρόσθετα, οι χαλκόνες μετέχουν στην αναστολή της α-γλυκοσιδάσης. Γενικότερα, οι *α*-γλυκοσιδάσες είναι ένζυμα με εξωγενή δράση, οι οποίες βρίσκονται στο επιθήλιο του βλεννογόνου του λεπτού εντέρου. Αυτές καταλύουν την απελευθέρωση της *α*-D-γλυκοπυρανόζης από τα μη αναγωγικά άκρα των υποστρωμάτων μέσω διάσπασης της τελικής μη αναγωγικής 1,4 συνδεδεμένης αγλουκόζης. Συνεπώς, διαδραματίζουν σημαίνοντα ρόλο στην επεξεργασία των γλυκοπρωτεϊνών και των γλυκολιπιδίων. Η αναστολή των ενζύμων αυτών, λοιπόν, οδηγεί σε μειωμένη πρόσληψη διαιτητικών

υδατανθράκων που καταστέλλουν τη μεταγευματική υπεργλυκαιμία χωρίς να αυξάνουν το επίπεδο ινσουλίνης, γεγονός που είναι χρήσιμο για τη θεραπεία διαβητικών και παχύσαρκων ασθενών. Ο συνεχής αποκλεισμός του ενζύμου έχει ως αποτέλεσμα την ταυτόχρονη μείωση του σωματικού βάρους, του επιπέδου HbA1c και των τριγλυκεριδίων του ορού [44].

Πέρα από αυτά, οι χαλκόνες είναι από τους κυριότερους αναστολείς της αναγωγάσης της αλδόζης (aldose reductase, ALR), ενός ενζύμου της οδού της πολυόλης. Παρουσία του συμπαράγοντα NADPH (Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate) αυτή μετατρέπει τη γλυκόζη σε σορβιτόλη, η οποία μετατρέπεται περαιτέρω σε φρουκτόζη παρουσία αφυδρογονάσης της σορβιτόλης. Η οδός της πολυόλης ενεργοποιείται όταν ο κανονικός γλυκολυτικός κύκλος κορεστεί. Επομένως, είναι εναλλακτική οδός μεταβολισμού, οπότε η υψηλή συγκέντρωση γλυκόζης στο νεύρο και τον αμφιβληστροειδή μεταβολίζεται σε σορβιτόλη απουσία ινσουλίνης, οδηγώντας σε συσσώρευση στους ιστούς. Με αυτόν τον τρόπο επισπεύδονται συμπτώματα όπως η οσμωτική διόγκωση, οι αλλαγές στη διαπερατότητα των μεμβρανών και το οξειδωτικό στρες. Η κατάσταση αυτή επιδεινώνει πολλές διαβητικές επιπλοκές όπως ο καταρράκτης, η αμφιβληστροειδοπάθεια, η νευροπάθεια και η νεφροπάθεια, με αποτέλεσμα οι ασθενείς να υποφέρουν περισσότερο [44].

Ταυτόχρονα, οι χαλκόνες μπορούν να αποτελέσουν αναστολείς του ενζύμου της διπεπτιδυλοπεπτιδάσης-4 (dipeptidyl peptidase-4, DPP-4). Το ένζυμο αυτό αδρανοποιεί τις ορμόνες ινκρετίνης, δηλαδή το γλυκανόμορφο πεπτίδιο-1 (Glucagon-like peptide-1, GLP-1) και το εξαρτώμενο από τη γλυκόζη ινσουλινότροπο πολυπεπτίδιο (Glucose-dependent insulinotropic polypeptide, GIP). Αυτές οι ορμόνες απελευθερώνονται από τα εντεροενδοκρινικά κύτταρα του γαστρεντερικού σωλήνα (Gastrointestinal Tubes, GIT) στην κυκλοφορία του αίματος ως απόκριση στην πρόσληψη τροφής. Η GIP απελευθερώνεται ως απάντηση στα λίπη και σε μικρότερη ποσότητα στη γλυκόζη και πρακτικά διεγείρει την εξαρτώμενη από τη γλυκόζη απελευθέρωση της ινσουλίνης. Η GLP-1 είναι η πιο ισχυρή ορμόνη ινκρετίνης και είναι κυρίως υπεύθυνη για τη ρυθμιστική επίδραση στις λειτουργίες των β-κυττάρων του παγκρέατος, τα οποία εκκρίνουν την ινσουλίνη. Συνεπώς, οι ορμόνες αυτές μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως θεραπεία του σακχαρώδη διαβήτη, όπου ο ρόλος της ινσουλίνης είναι μειωμένος. Σε αυτό μπορούν να συνδράμουν οι χαλκόνες μέσω αναστολής του ενζύμου DPP-4, με αποτέλεσμα να παρατείνεται η δράση των συγκεκριμένων ορμονών [44].

Επιπλέον, οι χαλκόνες έχουν τη δυνατότητα να ενεργοποιήσουν τον υποδοχέα γάμμα που ενεργοποιείται από πολλαπλασιαστή υπεροξεισώματος (peroxisome proliferator–activated receptor-γ, PPAR-γ). Ο υποδοχέας αυτός ανήκει στην οικογένεια των πυρηνικών υποδοχέων που ενεργοποιούνται από τον πολλαπλασιαστή υπεροξεισωμάτων (PPARs) και έχει καθοριστικό ρόλο στην ομοιόσταση της γλυκόζης. Ουσιαστικά, ρυθμίζει τη μεταγραφή γονιδίων που ανταποκρίνονται στην ινσουλίνη με αποτέλεσμα μειωμένα επίπεδα γλυκόζης στο αίμα. Εκφράζεται σε υψηλά επίπεδα στον λιπώδη ιστό και απαιτεί ετεροδιμερισμό με τον υποδοχέα ρετινοειδούς Χ (retinoid X receptor, RXR) για τη βέλτιστη σύνδεση με το DNA και τη μεταγραφική δραστηριότητα. Έχει αποδειχθεί ότι οι χαλκόνες μπορούν να παίξουν το ρόλο επιλεκτικού αγωνιστή στον συγκεκριμένο υποδοχέα [44].

1.2.3.5. Αντιοξειδωτική δράση

Οι ελεύθερες ρίζες είναι άτομα ή μόρια που έχουν ένα ή περισσότερα ασύζευκτα ηλεκτρόνια. Η υπερπαραγωγή δραστικών ειδών, δηλαδή ελεύθερων ριζών, που προέρχονται από διαδικασίες κυτταρικής σηματοδότησης ή περιβαλλοντικές τοξίνες, οδηγεί σε οξειδωτικό στρες, το οποίο μπορεί να προκαλέσει διαταραχές της υγείας. Το οξειδωτικό στρες ορίζεται ως διαταραχή της ισορροπίας μεταξύ προοξειδωτικών και αντιοξειδωτικών υπέρ των πρώτων. Έτσι, τα αντιοξειδωτικά απαιτούνται για την απορρόφηση των υπερβολικά παραγόμενων δραστικών ειδών. Οι χαλκόνες και τα παράγωγά τους είναι γνωστά για τις αντιοξειδωτικές τους ιδιότητες, λόγω της παρουσίας φαινολικών και μεθοξυομάδων στις δομές τους. Αυτές οι ομάδες είναι γνωστό ότι εμπλέκονται σε διάφορες αντιδράσεις για την απομάκρυνση των δραστικών ειδών. Τα δραστικά είδη που έχουν βλαπτικές επιδράσεις στο βιολογικό σύστημα περιλαμβάνουν δραστικά είδη οξυγόνου (Reactive oxygen species, ROS) και αζώτου (reactive nitrogen species, RNS) [45].

Έχουν ερευνηθεί διάφορα μονοπάτια για την απορρύπανση τέτοιων δραστικών ειδών. Τρεις είναι οι κυρίαρχοι μηχανισμοί με τους οποίους δρουν οι χαλκόνες, οι οποίοι είναι η μεταφορά ατόμων υδρογόνου (hydrogen atom transfer, HAT), η διαδοχική απώλεια πρωτονίου και μεταφορά ηλεκτρονίου (sequential proton loss electron transfer, SPLET) και η μεταφορά ενός ηλεκτρονίου που ακολουθείται από μεταφορά πρωτονίων (single electron transfer-proton transfer, SET-PT). Μέσω αυτών των μηχανισμών δημιουργείται η ρίζα του αντιοξειδωτικού μορίου. Έχει παρατηρηθεί ότι ο μηχανισμός μεταφοράς ατόμων υδρογόνου (HAT) ευνοείται στην αέρια φάση και σε μη πολικούς διαλύτες, ενώ σε πολικούς διαλύτες και φυσιολογικό pH προτιμάται η διαδοχική απώλεια πρωτονίου και μεταφορά ηλεκτρονίου (SPLET). Επιπλέον, έχει διαπιστωθεί ότι οι ενώσεις που έχουν γειτονικές ομάδες -OCH_3 ή ομάδες -OH και -OCH_3 μπορούν να υποστούν μηχανισμούς διπλής ή τριπλής απορρόφησης ελεύθερων ριζών. Επίσης, τα παράγωγα των χαλκονών μπορούν να εμφανίσουν αντιοξειδωτική δράση μέσω της δυνατότητας χηλίωσης ιόντων μετάλλων [45].

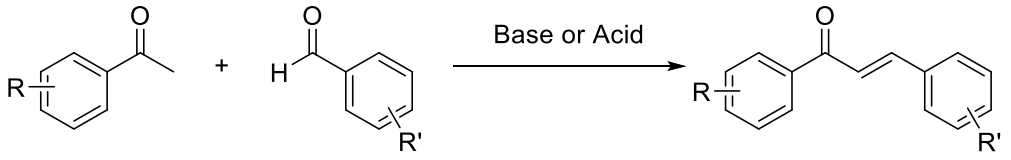
1.2.4. Σύνθεση χαλκονών

Παραδοσιακά, η σύνθεση των χαλκονών πραγματοποιούνταν μέσω αντιδράσεων συμπύκνωσης με τη χρήση οξέος ή βάσης ως καταλύτη. Ωστόσο, λόγω των ποικίλων βιολογικών δράσεων που επιδεικνύουν και του συνεπακόλουθου ενδιαφέροντος των ερευνητών έχουν αναφερθεί διάφορες μέθοδοι σύνθεσης. Αυτές περιλαμβάνουν την αντίδραση συμπύκνωσης Claisen-Schmidt, αντιδράσεις μέσω ακτινοβόλησης με υπερήχους και μικροκύματα, αντιδράσεις σύζευξης, όπως είναι οι αντιδράσεις Heck, Suzuki-Miyaura, Sonogashira, Julia-Kocienski, Wittig και Friedel-Crafts, καθώς και την αναδιάταξη Photo-Fries [39]. Οι μέθοδοι αυτές θα αναπτυχθούν παρακάτω.

1.2.4.1. Αντίδραση συμπύκνωσης Claisen-Schmidt

Η αντίδραση συμπύκνωσης Claisen-Schmidt είναι μια ευρέως χρησιμοποιούμενη και εύκολη μέθοδος για την παρασκευή χαλκονών. Πρακτικά, η χαλκόνη συντίθεται με συμπύκνωση υποκατεστημένης ή μη βενζαλδεΰδης και υποκατεστημένης ή μη ακετοφαινόνης με τη χρήση βάσεων ή οξέων ως καταλυτών σε πολικό διαλύτη στους 50 °C-100 °C για λίγες ώρες [46]. Ο σχηματισμός χαλκόνης παρουσία βάσης πραγματοποιείται από το προϊόν αλδόλης μέσω μηχανισμού αφυδάτωσης του

ενολικού, αλλά στην περίπτωση όξινης κατάλυσης το προϊόν παράγεται από το μηχανισμό της ενόλης. Οι κυριότερες βάσεις που χρησιμοποιούνται για τη συμπύκνωση αυτή είναι το NaOH, το KOH και το NaH, ενώ ως όξινοι καταλύτες χρησιμοποιούνται τα οξέα κατά Brönsted και Lowry και τα οξέα κατά Lewis [39]. Η αντίδραση αυτή απεικονίζεται στη συνέχεια:

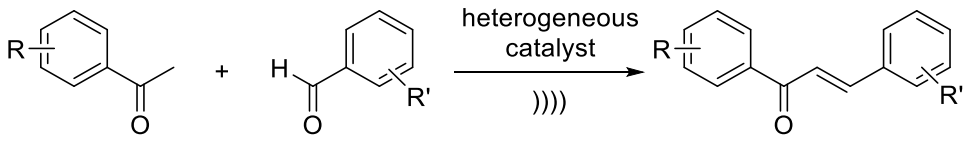


Σχήμα 15. *Σύνθεση χαλκονών μέσω της αντίδρασης Claisen-Schmidt.*

Συνήθως πραγματοποιείται σε υγρή φάση, αλλά ορισμένες συνθέσεις συμβαίνουν σε στερεή φάση, όπου η ρητίνη δεσμεύει ενώσεις ακετοφαινόνης και στη συνέχεια αντιδρά με ενώσεις βενζαλδεΰδης [39], [46]. Η προκύπτουσα χαλκόνη απομακρύνεται από τη ρητίνη μέσω επεξεργασίας με τριφθορооξικό οξύ [39]. Επίσης, υπάρχει η δυνατότητα σύνθεσης χαλκονών χωρίς διαλύτη μέσω καταλυτικής συμπύκνωσης παρουσία τριαζαμπικυκλοδεκενίου [46]. Τα κύρια μειονεκτήματα αυτής της μεθόδου είναι ο αργός ρυθμός αντίδρασης και η πιθανότητα παραγωγής παραπροϊόντων. Ωστόσο, παραμένει η πιο συχνά χρησιμοποιούμενη διαδικασία για τη σύνθεση χαλκονών λόγω της απλής διαδικασίας και των μεγαλύτερων αποδόσεων σε σύγκριση με άλλες συμβατικές μεθόδους [39].

1.2.4.2. Σύνθεση χαλκονών μέσω ακτινοβόλησης με υπερήχους

Η ακτινοβόληση με υπερήχους είναι μια χρήσιμη τεχνική, επειδή έχει σύντομο χρόνο αντίδρασης και υψηλό ποσοστό απόδοσης. Η βασική αρχή αυτής της τεχνικής είναι η ενεργοποίηση των καταλυτικών θέσεων από τα κύματα υπερήχων, η οποία σχετίζεται με την αύξηση της δονητικής κατάστασης του πλέγματος που κάνει τις χημικές αντιδράσεις. Η σύνθεση των χαλκονών πραγματοποιείται, όπως και στην προηγούμενη μέθοδο, μέσω συμπύκνωσης ακετοφαινόνης και βενζαλδεΰδης. Όμως, στην προκειμένη περίπτωση χρησιμοποιούνται ετερογενείς καταλύτες, όπως είναι K_2CO_3, βασικό Al_2O_3, $Ba(OH)_2$, KF-Al_2O_3 και ζεόλιθος εμβολιασμένος με αμινοειδή [39]. Η αντίδραση αυτή παρουσιάζεται παρακάτω:

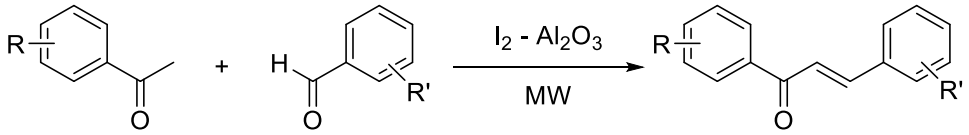


Σχήμα 16. *Σύνθεση χαλκονών μέσω ακτινοβόλησης με υπερήχους.*

1.2.4.3. Σύνθεση χαλκονών μέσω ακτινοβόλησης με μικροκύματα

Η τεχνική της ακτινοβόλησης με μικροκύματα έχει περισσότερα πλεονεκτήματα έναντι άλλων συμβατικών μεθόδων, διότι μειώνει το χρόνο αντίδρασης, τα παραπροϊόντα, την εξάτμιση των διαλυτών και οδηγεί σε αυξημένες αποδόσεις. Μέσω αυτής της μεθόδου μπορούν να παραχθούν πολυ-υδροξυ-χαλκόνες χωρίς τη χρήση ομάδας προστασίας. Ένα παράδειγμα της χρήσης αυτής της τεχνικής για την παραγωγή χαλκονών είναι η αντίδραση ακετοφαινονών με αλδεΰδες χωρίς τη χρήση διαλύτη. Ως καταλύτης της

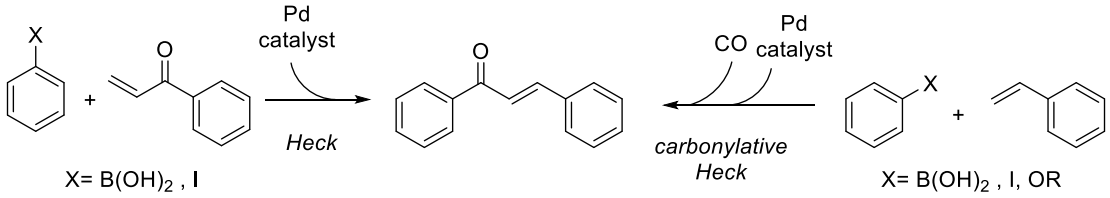
αντίδρασης χρησιμοποιείται εμποτισμένη με μοριακό ιώδιο αλούμινα. Η ουδέτερη αλούμινα δρα ως καταλυτική επιφάνεια και το μοριακό ιώδιο χρησιμεύει ως οξύ Lewis για την ενεργοποίηση της καρβονυλομάδας των αλδεϋδών, ώστε να πραγματοποιηθεί πυρηνόφιλη επίθεση με την υδροξυ-αρυλοκετόνη [39]. Η αντίδραση αυτή απεικονίζεται στη συνέχεια:



Σχήμα 17. *Σύνθεση χαλκονών μέσω ακτινοβόλησης με μικροκύματα.*

1.2.4.4. Αντίδραση Heck

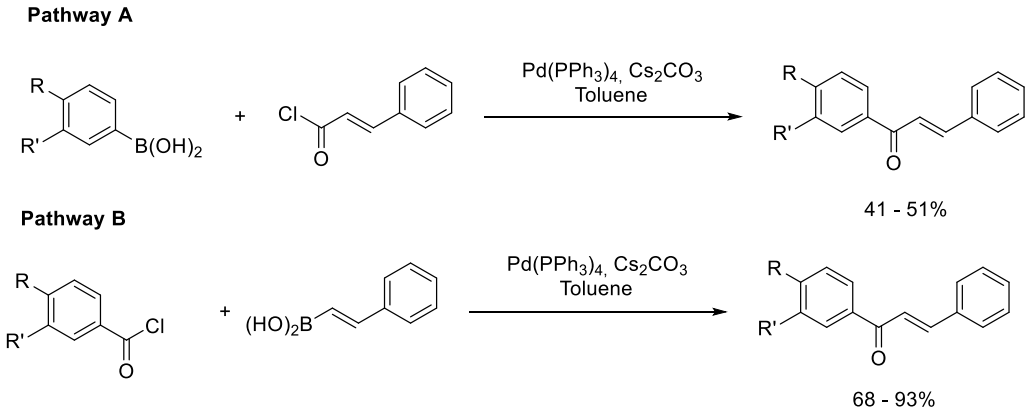
Η αντίδραση σύζευξης Heck μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την παραγωγή χαλκόνης, καθώς δομικά αυτή συνιστά ένα στιλβένιο. Συνεπώς, μπορεί να παρασκευαστεί μέσω αντίδρασης ενός αρυλοβορονικού οξέος ή ενός αρυλοϊωδιδίου και μιας αρυλο-βινυλοκετόνης με σχηματισμό δεσμού C-C. Η αντίδραση αυτή ολοκληρώνεται ταχύτατα και σε εξαιρετικές αποδόσεις υπό καταλυτικές συνθήκες ($Pd(OAc)_2$, Ph_3P, CH_3CN, K_2CO_3, DMF). Επιπλέον, οι χαλκόνες μπορούν να παραχθούν με καρβονυλιωτική βινυλίωση αρυλικών αλογονιδίων με στυρένιο παρουσία μονοξειδίου του άνθρακα και χρησιμοποιώντας καταλύτες παλλαδίου (carbonylative Heck). Παρόλο που η αντίδραση Heck με καταλύτη μέταλλο θεωρείται ιδιαίτερα αποτελεσματική προσέγγιση για τη σύνθεση χαλκονών, η εφαρμογή της είναι περιορισμένη λόγω της μικρής διαθεσιμότητας αρυλοβινυλοκετονών και της ανάγκης για μονοξείδιο του άνθρακα υπό πίεση [35]. Οι δύο εναλλακτικές προσεγγίσεις της αντίδρασης Heck παρουσιάζονται παρακάτω:



Σχήμα 18. *Σύνθεση χαλκονών μέσω σύζευξης Heck.*

1.2.4.5. Αντίδραση Suzuki-Miyaura

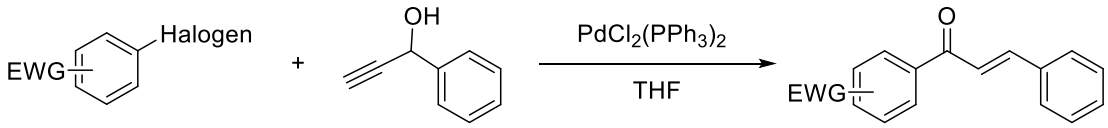
Η σύζευξη Suzuki-Miyaura είναι μια αντίδραση διασταυρούμενης σύζευξης που καταλύεται από μέταλλα, κατά την οποία αντιδρούν δύο ενώσεις που διαφέρουν ηλεκτρονιακά προς παραγωγή χαλκονών μέσω του σχηματισμού δεσμού C-C [39]. Η σύνθεση χαλκονών με την αντίδραση Suzuki-Miyaura πραγματοποιήθηκε για πρώτη φορά από τον Eddarir και τους συνεργάτες του το 2006. Σύμφωνα με αυτή, είναι δυνατόν να πραγματοποιηθεί η σύζευξη αρυλοβορονικών οξέων με κινναμοϋλοχλωρίδια (μέθοδος Α), καθώς και η σύζευξη στυρυλοβορονικού οξέος με βενζοϋλοχλωρίδια (μέθοδος Β). Για τις μεθόδους αυτές απαιτείται η χρήση άνυδρου τολουολίου, $Pd(PPh_3)_4$ και Cs_2CO_3 κατά τη διεξαγωγή των αντιδράσεων. Ωστόσο, από τη μέθοδο Α προέκυψαν χαλκόνες σε μέτριες αποδόσεις, ενώ από τη μέθοδο Β σε εξαιρετικά υψηλές αποδόσεις [47]. Οι δύο αυτές μέθοδοι απεικονίζονται στη συνέχεια:



Σχήμα 19. *Σύνθεση χαλκονών μέσω σύζευξης Suzuki-Miyaura.*

1.2.4.6. Αντίδραση Sonogashira

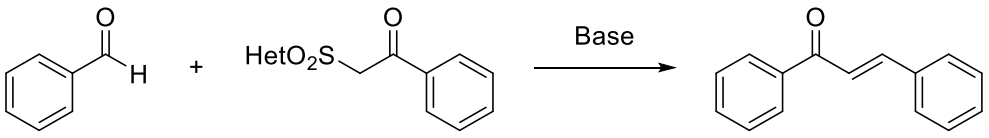
Η αντίδραση Sonogashira ορίζεται ως η σύζευξη τερματικών αλκινίων με αρυλαλογονίδια παρουσία καταλύτη παλλαδίου σε συνδυασμό με μια συν-καταλυτική ποσότητα CuI. Η αντίδραση πραγματοποιείται σε μίγμα τριμεθυλαμίνης και THF, το οποίο βράζει και υπό συνθήκες αδρανούς αερίου για 16-24 ώρες. Σε αυτές τις συνθήκες, οι επιθυμητές χαλκόνες συντίθενται με μέτριες έως εξαιρετικές αποδόσεις. Ωστόσο, η μέθοδος αυτή έχει ορισμένους περιορισμούς, όπως είναι οι εκτεταμένοι χρόνοι αντίδρασης, η περίσσεια βάσης που απαιτείται και η ανάγκη για αρυλαλογονίδια με έλλειψη ηλεκτρονίων. Οι δυσκολίες αυτές μπορούν να αντιμετωπιστούν μέσω πραγματοποίησης της αντίδρασης σύζευξης ισομερισμού με τη βοήθεια μικροκυμάτων, κατά την οποία οι χαλκόνες παράγονται σε λιγότερο από μισή ώρα και σε αξιόλογες αποδόσεις [39]. Η αντίδραση αυτή παρουσιάζεται παρακάτω:



Σχήμα 20. *Σύνθεση χαλκονών μέσω σύζευξης Sonogashira.*

1.2.4.7. Αντίδραση Julia-Kocienski

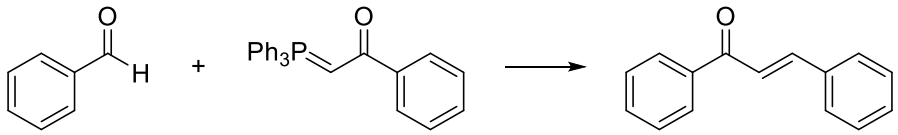
Η αντίδραση ολεφινοποίησης Julia-Kocienski εφαρμόστηκε για πρώτη φορά το 2010 ως μέθοδος σύνθεσης χαλκονών σε υψηλές αποδόσεις. Σύμφωνα με αυτή, οι χαλκόνες παρασκευάζονται μέσω συμπύκνωσης ενός νέου αντιδραστηρίου σύζευξης Julia, της ετεροαρυλο-σουλφονυλο-φαινυλαιθανόνης και αλδεϋδών σε βασικό περιβάλλον. Η πιο αποτελεσματική βάση για αυτή την αντίδραση είναι η ένωση DBU, ενώ το καλύτερο αντιδραστήριο Julia η ένωση 2-(βενζο[d]θειαζολ-2υλοσουλφονυλ)-1-φαινυλαιθανόνη. Επιπλέον, η αντίδραση ευνοείται σε λιγότερο πολικούς διαλύτες και υψηλότερες θερμοκρασίες [48]. Η συγκεκριμένη αντίδραση απεικονίζεται παρακάτω:



Σχήμα 21. *Σύνθεση χαλκονών μέσω σύζευξης Julia-Kocienski.*

1.2.4.8. Αντίδραση Wittig

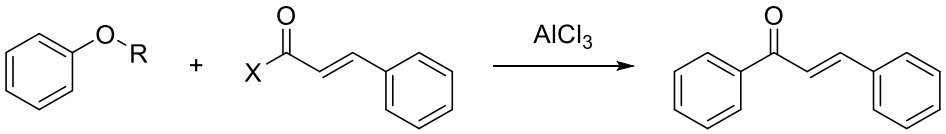
Η αντίδραση σύζευξης Wittig μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την παρασκευή χαλκονών, καθώς αυτές συνιστούν α,β-ακόρεστα καρβονυλικά παράγωγα. Αρχικά, χρησιμοποιήθηκαν τριφαινυλοβενζοϋλομεθυλενοφωσφοράνιο και βενζαλδεΰδη για την παραγωγή χαλκονών σε βενζόλιο για 3 μέρες με χρήση αναρροής (reflux) ή σε THF για 30 ώρες με χρήση αναρροής. Τα κύρια μειονεκτήματα αυτής της μεθόδου είναι ο μεγάλος χρόνος αντίδρασης που απαιτείται, καθώς και οι σχετικά χαμηλές αποδόσεις που επιτυγχάνονται μέσω αυτής. Για αυτό το λόγο, προτάθηκε αργότερα η πραγματοποίηση της αντίδρασης αυτής με τη χρήση μικροκυμάτων, καθώς η αντίδραση ολοκληρώνεται σε 5-6 λεπτά έχοντας εξαιρετικές αποδόσεις [49]. Αυτή η μέθοδος σύνθεσης χαλκονών παρουσιάζεται στη συνέχεια:



Σχήμα 22. *Σύνθεση χαλκονών μέσω σύζευξης Wittig.*

1.2.4.9. Αντίδραση Friedel-Crafts

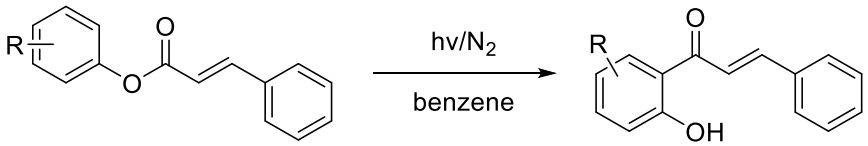
Η αντίδραση ακυλίωσης Friedel-Crafts μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την παραγωγή χαλκονών από αρωματικό αιθέρα και χλωριούχο κινναμοΰλιο. Για τη μέθοδο αυτή απαιτείται η χρήση ενός ισχυρού οξέος κατά Lewis ως καταλύτη, όπως είναι το τριχλωριούχο αργίλιο ($AlCl_3$). Η μέθοδος αυτή αναφέρθηκε πρώτη φορά το 1978 και οδηγεί στη σύνθεση πολύ-υποκατεστημένων χαλκονών με ικανοποιητικές αποδόσεις. Ωστόσο, η αντίδραση αυτή δεν έχει χρησιμοποιηθεί ευρέως για τη σύνθεση χαλκονών [35]. Η μέθοδος αυτή απεικονίζεται παρακάτω:



Σχήμα 23. *Σύνθεση χαλκονών μέσω σύζευξης Friedel-Crafts.*

1.2.4.10. Αναδιάταξη Photo-Fries

Η αναδιάταξη Photo-Fries είναι μια όρθο- ή πάρα- εκλεκτική αντίδραση για την παραγωγή 2-υδροξυ-χαλκονών. Κατά τη μέθοδο αυτή, ο κινναμιδικός φαινυλεστέρας μετατρέπεται σε υδροξυ-αρυλοκετόνη παρουσία οξέων Lewis και ακτινοβολίας. Η απόδοση της αντίδρασης επηρεάζεται σε μεγάλο βαθμό από τις συνθήκες, όπως είναι η θερμοκρασία, η συγκέντρωση, ο τύπος διαλύτη και τα υποστρώματα [50]. Αρχικά, η αντίδραση πραγματοποιήθηκε με διαλύτη το βενζόλιο σε περιβάλλον αζώτου, όμως αργότερα ανακαλύφθηκε ότι μπορούν να χρησιμοποιηθούν η μεθανόλη, η αιθανόλη και το χλωροφόρμιο ως διαλύτες, επιτυγχάνοντας υψηλότερες αποδόσεις [35]. Η μέθοδος αυτή δεν χρησιμοποιείται συνήθως λόγω της χαμηλής απόδοσης, του παρατεταμένου χρόνου αντίδρασης και της πολύπλοκης διαδικασίας [50]. Η αντίδραση αυτή παρουσιάζεται στη συνέχεια:



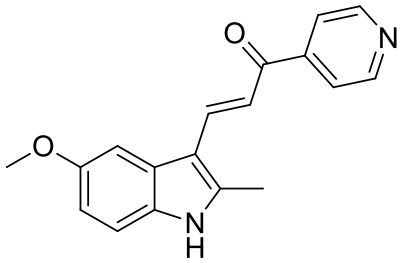
Σχήμα 24. *Σύνθεση χαλκονών μέσω αναδιάταξης Photo-Fries.*

1.3. Ινδολικές χαλκόνες και αντικαρκινική δράση

Όπως προαναφέρθηκε, ο καρκίνος είναι η δεύτερη σημαντικότερη αιτία θανάτου παγκοσμίως μετά τις καρδιακές παθήσεις. Γενικότερα, ο εντοπισμός ισχυρών και εκλεκτικών αντικαρκινικών φαρμάκων με μειωμένες παρενέργειες απαιτεί όλο και πιο εξελιγμένες τεχνικές στη φαρμακευτική χημεία και βρίσκεται στο επίκεντρο του ερευνητικού ενδιαφέροντος [51]. Πιο συγκεκριμένα, πολλές ενώσεις που χρησιμοποιούνται σε κλινικές δοκιμές οδηγούν σε ανάπτυξη ανθεκτικότητας στα φάρμακα, έχουν κακή βιοδιαθεσιμότητα κατά τη χορήγηση από το στόμα, χαμηλή υδατική διαλυτότητα και εξαιρετικά πολύπλοκη σύνθεση. Ως εκ τούτου, τα πρώτα στάδια της ανακάλυψης νέων φαρμάκων είναι η εύρεση και η ανάπτυξη μικρών μοριακών φαρμάκων που είναι φαρμακολογικά δραστικά με αποδεκτές τοξικολογικές και φαρμακοκινητικές ιδιότητες για προκλινική και κλινική ανάπτυξη. Η βιολογική δραστικότητα ενός μορίου μπορεί να συσχετιστεί με τη δομή του, λαμβάνοντας υπόψη το φορτίο, τη λιποφιλία του, καθώς και τα στερεοχημικά χαρακτηριστικά των λειτουργικών του ομάδων. Μόλις προσδιοριστούν οι κατάλληλες λειτουργικές ομάδες και καθοριστεί η φαρμακοφόρος δομή, διερευνώνται στρατηγικές μοριακής τροποποίησης για την εισαγωγή χημικών αλλαγών στη δομή αυτή, που οδηγούν σε βελτιώσεις των φυσικοχημικών ιδιοτήτων και της βιοδιαθεσιμότητάς της [52].

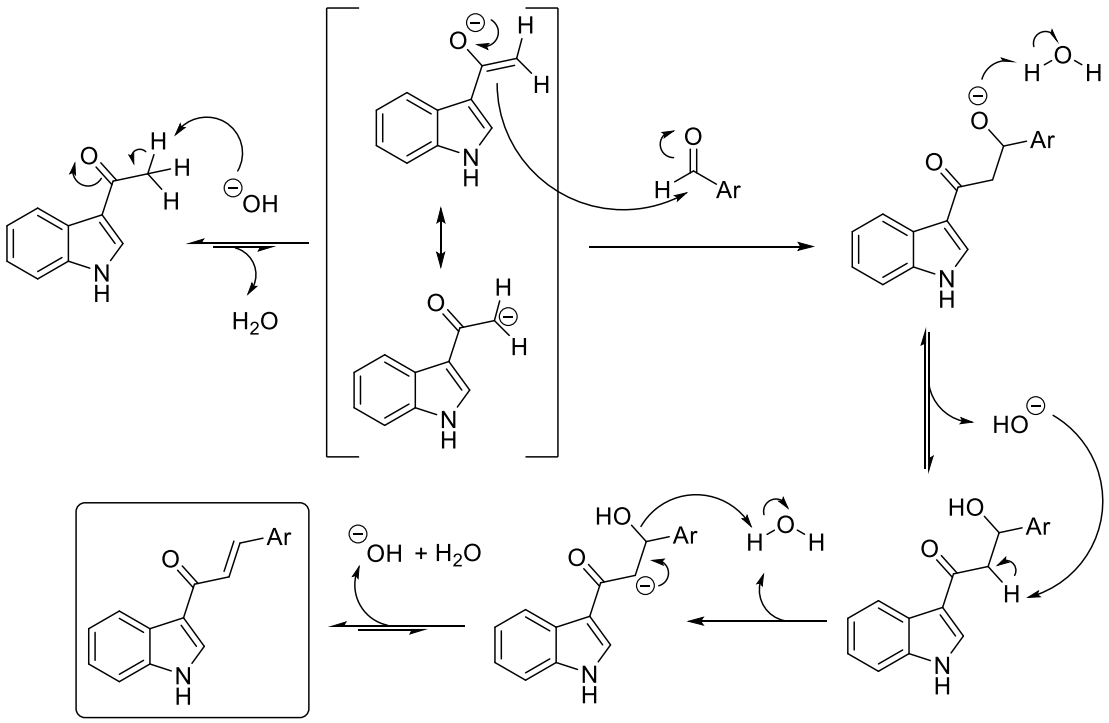
Κατά τη διαδικασία αυτή, μία από τις δομές που ερευνάται είναι αυτή της χαλκόνης, δεδομένου ότι σε πρόσφατη ανάλυση τάσεων αυτή αναφέρθηκε ως η τρίτη πιο δημοφιλής επιλογή στη φαρμακευτική χημεία, μετά το διφαινύλιο και τον διφαινυλαιθέρα. Η χαλκόνη, ένα απλό φυσικό προϊόν, διαθέτει ένα εξαιρετικά προνομιακό σκελετό, με αποτέλεσμα πολλές συνθετικές και φυσικά απαντώμενες χαλκόνες να διαθέτουν πολυάριθμες βιολογικές δράσεις, με την αντικαρκινική να είναι μία εξ αυτών [53]. Κατά το σχεδιασμό νέων παραγώγων με βάση τις χαλκόνες, η μοριακή τροποποίηση περιλαμβάνει την εισαγωγή διαφορετικών υποκαταστατών στο μόριο ή το κλείσιμο του δακτυλίου των χαλκονών οδηγώντας σε νέες ενώσεις με ποικίλες φαρμακολογικές ιδιότητες [52]. Χρήσιμος στο σχεδιασμό αυτό μπορεί να είναι ο πυρήνας του ινδολίου, καθώς ανήκει στα 25 πιο συνηθισμένα ετεροκυκλικά μόρια αζώτου που περιέχονται σε φάρμακα, τα οποία έχουν εγκριθεί από τον Αμερικανικό Οργανισμό Τροφίμων και Φαρμάκων (FDA) [54]. Η οικογένεια των ινδολίων αντιπροσωπεύει μια σημαντική κατηγορία φυσικών μικρών μορίων που παρουσιάζει διάφορες βιολογικές ιδιότητες συμπεριλαμβανομένης της αντικαρκινικής δράσης [52], [53]. Συνεπώς, ο σχεδιασμός παραγώγων των χαλκονών που περιέχουν τον ινδολικό σκελετό θα ευνοούσε σε μεγάλο βαθμό την αύξηση της αντικαρκινικής ισχύος [55]. Πράγματι, πολλοί ερευνητές έχουν αναφέρει ότι ο σκελετός των ινδολικών χαλκονών είναι δραστικός έναντι διαφόρων καρκινικών κυττάρων μέσω ποικίλων μηχανισμών [56].

Παράδειγμα αποτελεί η ένωση (2E)-3-(5-methoxy-2-methyl-1H-indol-3-yl)-1-(4-pyridinyl)-2-propen-1-one (MOMIPP), μια ινδολική χαλκόνη, η οποία μειώνει αποτελεσματικά την ανάπτυξη και βιωσιμότητα του ανθεκτικού στην τεμοζολομίδη (temozolomide) γλοιοβλαστώματος, καθώς και των ανθεκτικών στη δοξορουβικίνη (doxorubicin) κυττάρων του καρκίνου του μαστού σε χαμηλές συγκεντρώσεις. Διαπιστώθηκε ότι η ένωση αυτή δρα μέσω ενός μη-αποπτωτικού μηχανισμού κυτταρικού θανάτου και μπορεί να χρησιμεύσει ως πρωτότυπο φάρμακο κατά του καρκίνου που είναι ανθεκτικός στις συνήθεις μορφές κυτταρικού θανάτου, όπως είναι η απόπτωση [57]. Η ένωση αυτή παρουσιάζεται παρακάτω:



Εικόνα 3. *(2E)-3-(5-methoxy-2-methyl-1H-indol-3-yl)-1-(4-pyridinyl)-2-propen-1-one (MOMIPP).*

Με βάση τα παραπάνω, μεγάλο ενδιαφέρον παρουσιάζει η σύνθεση μιας βιβλιοθήκης ινδολικών χαλκονών με ποικίλους υποκαταστάτες και η περαιτέρω έρευνα της αντικαρκινικής τους δράσης. Πιο συγκεκριμένα, αξίζει να διερευνηθεί η αλληλεπίδρασή τους με το DNA, τόσο πειραματικά με αξιοποίηση τεχνικών *in vitro* όσο και υπολογιστικά με χρήση κατάλληλων λογισμικών *in silico* πρόσδεσης, τα οποία αθροιστικά μπορούν να παρέχουν κάποιες πληροφορίες που ενδιαφέρουν κατά την ανάλυση της σχέσης δομής δράσης. Η σύνθεση της βιβλιοθήκης αυτών των ενώσεων θα πραγματοποιηθεί με βάση την αντίδραση συμπύκνωσης Claisen-Schmidt, όπως αναφέρθηκε στην υποενότητα **1.2.4.1.**, σύμφωνα με το μηχανισμό που απεικονίζεται παρακάτω:



Σχήμα 25. *Μηχανισμός αντίδρασης Claisen-Schmidt για τη σύνθεση ινδολικών χαλκονών.*

1.4. Μέθοδοι ταυτοποίησης

1.4.1. Φασματοσκοπία Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού (NMR)

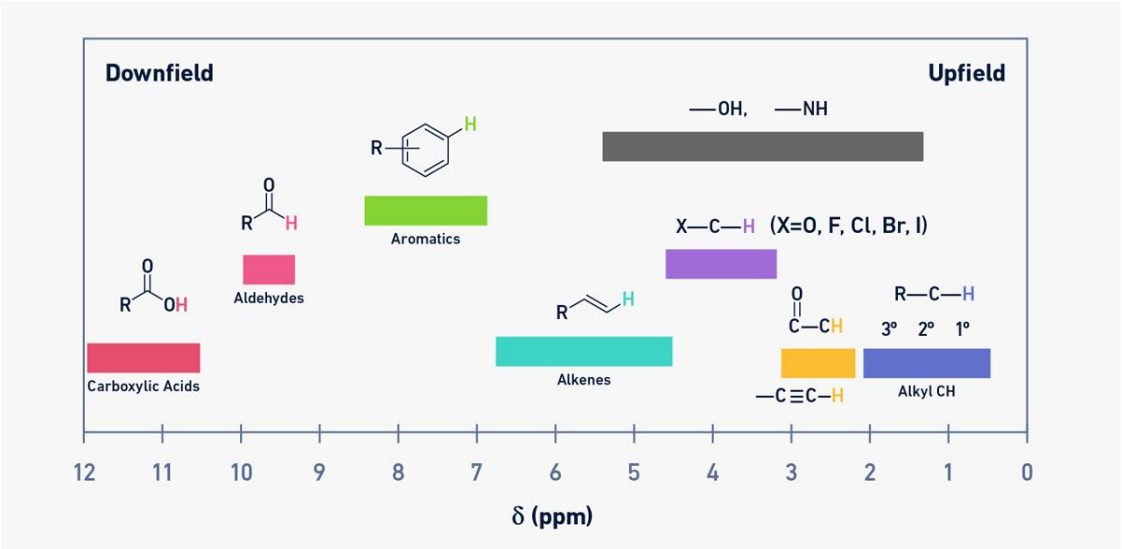
Η φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (Nuclear Magnetic Resonance, NMR) είναι μια ισχυρή αναλυτική τεχνική με ευρύ φάσμα εφαρμογών. Μπορεί να χρησιμοποιηθεί για πολύπλοκες δομικές μελέτες, για την ανάπτυξη πρωτοκόλλων και διαδικασιών ή ως απλή δοκιμή ποιότητας, για την οποία οι δομικές πληροφορίες είναι σημαντικές. Είναι μία μη καταστρεπτική τεχνική, κατά την οποία απαιτείται μικρή ποσότητα της προς ανάλυση ουσίας για τη διεξαγωγή της. Αξίζει να σημειωθεί ότι μόνο η φασματοσκοπία NMR μπορεί να παράσχει τα δεδομένα που είναι απαραίτητα για τον προσδιορισμό της πλήρους δομής ενός μορίου. Επιπλέον, η τεχνική μπορεί να λειτουργήσει για ανάλυση δειγμάτων τόσο σε υγρή όσο και σε στερεή κατάσταση [58].

Το αντικείμενο μελέτης της φασματοσκοπίας NMR είναι οι ατομικοί πυρήνες και η αλληλεπίδρασή τους με ένα εξωτερικό μαγνητικό πεδίο [58]. Σύμφωνα με την κβαντομηχανική, οι πυρήνες περιστρέφονται γύρω από έναν άξονα, συνεπώς έχουν την ιδιότητα της αυτοστροφορμής (spin), με αποτέλεσμα να παρουσιάζουν στροφορμή. Η μέγιστη συνιστώσα της στροφορμής αυτής είναι κβαντισμένη και συνιστά ακέραιο ή ημιακέραιο πολλαπλάσιο του h/2π, όπου h η σταθερά του Planck. Ορίζεται, λοιπόν, ο κβαντικός αριθμός του spin, I, ο οποίος ισούται με το μέγιστο αριθμό των τιμών της στροφορμής για ένα συγκεκριμένο πυρήνα. Επομένως, οι πυρήνες με spin I διαθέτουν 2I+1 διακριτές ενεργειακές καταστάσεις [59].

Βέβαια, μόνο οι πυρήνες που διαθέτουν περιττό μαζικό ή ατομικό αριθμό (π.χ. ^{1}H, ^{13}C, ^{15}N, ^{19}F, ^{29}Si, ^{31}P) μπορούν να αναλυθούν με τη φασματοσκοπία NMR, ενώ αυτοί με ζυγό αριθμό πρωτονίων και νετρονίων (π.χ. ^{12}C και ^{16}O) είναι ανενεργοί για τη μέθοδο αυτή [59]. Οι πιο συνηθισμένοι πυρήνες που αναλύονται με NMR είναι οι ^{1}H και ^{13}C,

οι οποίοι έχουν κβαντικό αριθμό spin I = 1/2 [58], [59]. Συνεπώς, οι πυρήνες αυτοί έχουν δύο ενεργειακές καταστάσεις, οι οποίες αντιστοιχούν σε I = +1/2 (χαμηλότερη ενέργεια) και I = -1/2 (υψηλότερη ενέργεια) [59]. Επίσης, είναι φορτισμένοι και ένα φορτίο περιστροφής δημιουργεί ένα μαγνητικό πεδίο. Πιο συγκεκριμένα, οι πυρήνες συμπεριφέρονται σαν μικροσκοπικοί μαγνήτες που αλληλεπιδρούν με ένα εφαρμοζόμενο, εξωτερικό μαγνητικό πεδίο. Μόλις οι πυρήνες τοποθετηθούν μέσα σε ένα τέτοιο πεδίο (B_0), το spin των πυρήνων θα ευθυγραμμιστεί με αυτό το πεδίο, είτε παράλληλα είτε αντιπαράλληλα. Ο παράλληλος προσανατολισμός έχει ελαφρώς χαμηλότερη ενέργεια που συνδέεται με αυτόν και κατ' επέκταση είναι πιο πιθανός να συμβεί. Μετά την εφαρμογή ενός παλμού ραδιοκυματικής ακτινοβολίας σε στενό εύρος, μεμονωμένοι πυρήνες απορροφούν ενέργεια και μετατοπίζονται σε υψηλότερη ενεργειακή κατάσταση προκαλώντας αντιστροφή του spin. Το φαινόμενο αυτό ονομάζεται συντονισμός και μεγαλύτερη ισχύς εξωτερικού πεδίου οδηγεί σε αυξημένη διαφορά μεταξύ των δύο ενεργειακών καταστάσεων [58].

Όμως, πέρα από τους πυρήνες, από το εφαρμοζόμενο, εξωτερικό πεδίο επηρεάζονται εξίσου και τα ηλεκτρόνια που τους περιβάλλουν. Ειδικότερα, το ηλεκτρονιακό αυτό νέφος δημιουργεί ένα δευτερεύον, επαγόμενο μαγνητικό πεδίο, το οποίο αντιτίθεται στο εφαρμοζόμενο. Συνεπώς, το ηλεκτρονιακό περιβάλλον των πυρήνων τείνει να τους προστατεύσει από το εφαρμοζόμενο πεδίο, γεγονός που αναφέρεται ως φαινόμενο θωράκισης. Ο βαθμός με τον οποίο ένας πυρήνας προστατεύεται εκφράζεται με τη χημική μετατόπιση, η οποία μετριέται σε ppm. Επιπλέον, η χημική μετατόπιση υπολογίζεται ως σχετική διαφορά, χρησιμοποιώντας τη συχνότητα μιας άλλης ένωσης ως αναφορά, της ένωσης TMS (tetramethylsilane, $Si(CH_3)_4$). Εκείνα τα πρωτόνια που έχουν ένα σχετικά πυκνό ηλεκτρονιακό νέφος θεωρούνται θωρακισμένα και οι συντονισμοί θα εμφανιστούν στην αριστερή πλευρά του φάσματος, έχοντας τη χαμηλότερη χημική μετατόπιση. Αντίθετα, όσο μειώνεται η προστασία των πυρήνων οι συντονισμοί μετατοπίζονται περισσότερο προς τα δεξιά με προοδευτικά υψηλότερη χημική μετατόπιση [58]. Οι χημικές μετατοπίσεις ορισμένων χαρακτηριστικών ομάδων σε φάσμα NMR πρωτονίου παρουσιάζονται παρακάτω:

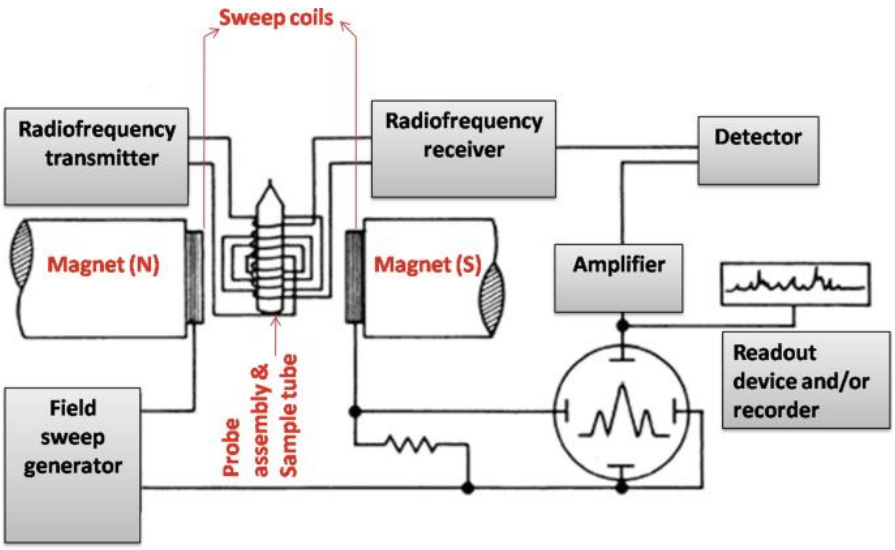


Εικόνα 4. *Χημικές μετατοπίσεις χαρακτηριστικών ομάδων σε ^1H NMR.*

Επιπρόσθετα, το φαινόμενο της σύζευξης των spin (spin-spin coupling) προσφέρει επιπλέον σημαντικές δομικές πληροφορίες. Αυτό προκαλείται από τη σύζευξη spin μεταξύ χημικά διαφορετικών πυρήνων που είναι ορατοί στη φασματοσκοπία NMR. Ειδικότερα, όταν ένας πυρήνας επηρεάζεται ή διαταράσσεται από έναν άλλο κοντινό πυρήνα, τότε οι διαφορετικές καταστάσεις των spin τους αλληλεπιδρούν μέσω των γειτονικών χημικών δεσμών τους, με αποτέλεσμα να παρουσιαστεί αυτή η σύζευξη. Αυτή καθίσταται ορατή σε ένα φάσμα NMR από τη διάσπαση των κορυφών, καθώς n γειτονικοί πυρήνες οδηγούν σε n+1 κορυφές. Το μέγεθος της παρατηρούμενης διάσπασης των κορυφών εκφράζεται από τη σταθερά σύζευξης J, η οποία μετριέται σε μονάδες Hz. Ωστόσο, οι πυρήνες που έχουν την ίδια χημική μετατόπιση δεν σχηματίζουν κορυφές διάσπασης σε ένα φάσμα NMR. Γενικότερα, η σύζευξη επηρεάζεται τόσο από την εγγύτητα των πυρήνων όσο και από τη γεωμετρία των παρεμβαλλόμενων χημικών δεσμών. Βέβαια, η παρουσία ισχυρά ηλεκτρονιόφιλων ομάδων, όπως είναι το οξυγόνο, μπορεί να αποτρέψει τη σύζευξη των spin [60].

Παράλληλα, το ύψος των κορυφών στο φάσμα NMR, ιδίως κατά τη φασματοσκοπία NMR πρωτονίων, μπορεί να δώσει πληροφορίες σχετικά με τον αριθμό των πυρήνων που προκάλεσαν την εν λόγω κορυφή. Αυτό επιτυγχάνεται με τον υπολογισμό του εμβαδού της κορυφής με τη μέθοδο της ολοκλήρωσης. Όμως, ακόμη και το μέγεθος των διαφόρων κορυφών είναι δυνατόν να οδηγήσει σε παρόμοια συμπεράσματα. Για παράδειγμα, μια απλή κορυφή που προκύπτει από τρία άτομα υδρογόνου είναι περίπου τρεις φορές μεγαλύτερη από μια απλή κορυφή που σχετίζεται με ένα πρωτόνιο [60].

Τα συνηθέστερα χρησιμοποιούμενα φασματόμετρα NMR είναι αυτά που χρησιμοποιούν μετασχηματισμό Fourier (FT-NMR). Το βασικότερο τμήμα τους είναι ένας μαγνήτης, στον οποίο τοποθετείται το δείγμα. Η ακτινοβολία ραδιοσυχνοτήτων παράγεται από μία γεννήτρια συχνοτήτων και το σήμα από εκεί οδηγείται σε έναν ενισχυτή, ο οποίος δημιουργεί έναν έντονο παλμό ραδιοσυχνότητας στο πηνίο εκπομπής. Στη συνέχεια, η παραγόμενη ακτινοβολία αλληλεπιδρά με το δείγμα, το οποίο περιβάλλεται από ένα υπεραγώγιμο πηνίο. Η διάρκεια, το πλάτος, η κυματομορφή και η φάση του παλμού επιλέγονται από τον χειριστή και εισάγονται μέσω του ηλεκτρονικού υπολογιστή. Το παραγόμενο σήμα συλλέγεται από το πηνίο, το οποίο λειτουργεί ως δέκτης, ενισχύεται και μεταφέρεται σε ανιχνευτή. Ακολούθως, μέσω του μετασχηματισμού Fourier μετατρέπεται στο τελικό φάσμα και ψηφιοποιείται στον υπολογιστή [59]. Η σχηματική απεικόνιση του φασματόμετρου NMR παρουσιάζεται παρακάτω:



Εικόνα 5. *Σχηματική απεικόνιση φασματόμετρου NMR.*

1.4.2. Φασματοσκοπία Υπερύθρου με μετασχηματισμό Fourier (FTIR)

Η φασματοσκοπία υπερύθρου (IR) είναι μια καθιερωμένη τεχνική για την ταυτοποίηση και δομική ανάλυση χημικών ενώσεων, η οποία βασίζεται στην απορρόφηση της υπέρυθρης ακτινοβολίας από συγκεκριμένες λειτουργικές ομάδες των μορίων τους. Η φασματοσκοπία υπερύθρου είναι, επίσης, ένα ισχυρό εργαλείο για την ποσοτική ανάλυση, καθώς η ποσότητα της υπέρυθρης ενέργειας που απορροφάται από μια ένωση είναι ανάλογη της συγκέντρωσής της. Οι κορυφές στο φάσμα IR ενός δείγματος αντιπροσωπεύουν τις μεταπτώσεις των μορίων από μία δονητική ή περιστροφική κατάσταση σε μία άλλη κατά τη διάρκεια ακτινοβόλησης. Συνεπώς, έχουν άμεση σχέση με τους διάφορους χημικούς δεσμούς και τις λειτουργικές ομάδες που υπάρχουν σε κάθε μόριο. Εξαιτίας του γεγονότος αυτού, το IR φάσμα μιας ένωσης είναι μία από τις πιο χαρακτηριστικές φυσικές ιδιότητές της και μπορεί να θεωρηθεί ως το δακτυλικό «αποτύπωμά» της [61].

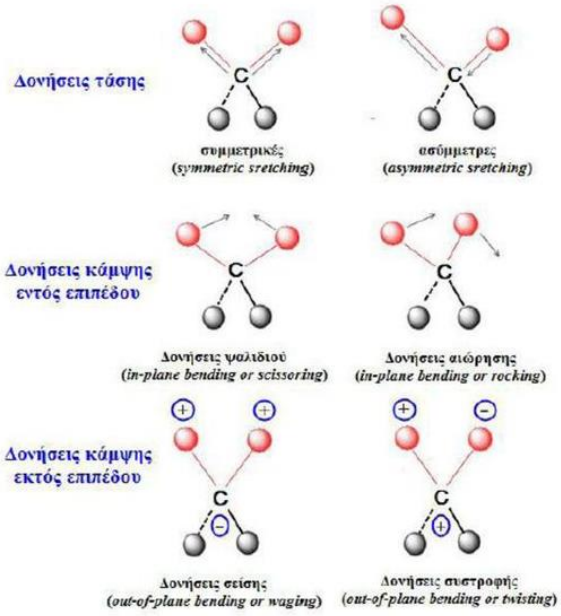
Το ηλεκτρομαγνητικό φάσμα της υπέρυθρης ακτινοβολίας, που βρίσκεται μεταξύ της ορατής και της μικροκυματικής ακτινοβολίας, διακρίνεται σε τρεις επιμέρους περιοχές:

- εγγύς υπεριώδες (Near Infrared Region, NIR) με εύρος κυματαριθμών από 14000 έως 4000 cm^{-1}
- μέσο υπεριώδες (Mid Infrared Region, MIR) με εύρος κυματαριθμών από 4000 έως 400 cm^{-1}
- άπω υπεριώδες (Far Infrared Region, FIR) με εύρος κυματαριθμών από 400 έως 4 cm^{-1} [62], [63].

Με τη φασματοσκοπία υπερύθρου, λοιπόν, μετριέται η απορρόφηση της υπέρυθρης ακτινοβολίας από κάθε δεσμό του μορίου και ως αποτέλεσμα προκύπτει φάσμα το οποίο συνήθως εκφράζεται ως % διαπερατότητα σε σχέση με τον κυματαριθμό, ο οποίος ορίζεται ως 1/λ με μονάδες cm^{-1}. Διάφορες ουσίες που περιέχουν ομοιοπολικό δεσμό απορροφούν ηλεκτρομαγνητική ακτινοβολία στην περιοχή IR. Όμως, για τον προσδιορισμό των λειτουργικών ομάδων σε ένα μόριο, αυτό πρέπει να είναι ενεργό στην υπέρυθρη ακτινοβολία, δηλαδή να έχει διπολική ροπή. Όταν η ακτινοβολία IR αλληλεπιδρά με τον ομοιοπολικό δεσμό ενός μορίου που διαθέτει διπολική ροπή, τότε

αυτό απορροφά ενέργεια και ο δεσμός αρχίζει να ταλαντώνεται. Συνεπώς, ανενεργά στην ακτινοβολία IR είναι τα μεμονωμένα άτομα, καθώς δεν έχουν χημικό δεσμό, όπως επίσης τα συμμετρικά μόρια λόγω μηδενικής διπολικής ροπής [63].

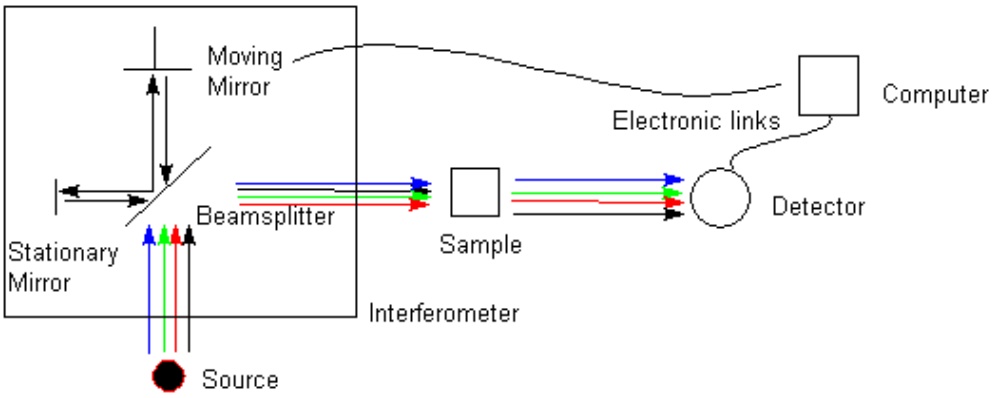
Οι ομοιοπολικοί δεσμοί των μορίων δεν είναι άκαμπτοι, αλλά συμπεριφέρονται σαν ελατήρια και διαρκώς κινούνται σε θερμοκρασία δωματίου. Αυτή η κίνηση των δεσμών στο μόριο δίνει διάφορους τρόπους δόνησης. Οι πιο βασικοί τύποι δόνησης είναι η δόνηση έκτασης (stretching), κατά την οποία η απόσταση των ατόμων μεταβάλλεται κατά μήκος του άξονα του δεσμού τους και η δόνηση κάμψης (bending), όπου η γωνία μεταξύ δύο δεσμών μεταβάλλεται. Ωστόσο, υπάρχουν και πιο πολύπλοκοι τύποι δονήσεων, όπως οι συμμετρικές και οι ασύμμετρες δονήσεις έκτασης, καθώς και η ψαλιδοειδής (scissoring), λικνιζόμενη (rocking), παλλόμενη (wagging) και συστρεφόμενη (twisting) δόνηση κάμψης. Αξίζει να σημειωθεί ότι οι δονήσεις έκτασης εμφανίζονται συνήθως με υψηλότερη ενέργεια σε σύγκριση με τις δονήσεις κάμψης. Ομοίως, μεταξύ των δονήσεων έκτασης, οι ασύμμετρες δονήσεις προκαλούνται σε υψηλότερη ενέργεια από τις συμμετρικές [63]. Όλες οι δονήσεις που αναλύθηκαν προηγουμένως απεικονίζονται στη συνέχεια:



Εικόνα 6. *Δονήσεις έκτασης και κάμψης, όπου το (+) συμβολίζει κίνηση από τη σελίδα προς τον αναγνώστη, ενώ το (-) από τον αναγνώστη προς τη σελίδα.*

Ένα τυπικό φασματόμετρο FTIR αποτελείται από μια πηγή φωτός IR, ένα συμβολόμετρο, ένα χώρο τοποθέτησης του δείγματος, έναν ανιχνευτή, έναν ενισχυτή και έναν υπολογιστή. Το συμβολόμετρο Michelson είναι ο κύριος πυρήνας του φασματόμετρου FTIR. Η πηγή φωτός παράγει ακτινοβολία, η οποία διέρχεται από το συμβολόμετρο και προσπίπτει στο δείγμα, φθάνοντας έπειτα στον ανιχνευτή. Στη συνέχεια, το σήμα ενισχύεται από τον ενισχυτή και μετατρέπεται σε ψηφιακό σήμα από τον αναλογικό-ψηφιακό μετατροπέα. Τελικά, το ψηφιακό αυτό σήμα μετατρέπεται σε φάσμα μέσω του μετασχηματισμού Fourier. Όταν η υπέρυθρη ακτινοβολία προσπίπτει σε ένα δείγμα, αυτό απορροφά το φως και δημιουργεί διάφορους τρόπους δόνησης. Αυτή η απορρόφηση σχετίζεται ακριβώς με τη φύση των δεσμών στο μόριο.

Οι περιοχές συχνοτήτων μετρούνται ως κυματαριθμοί συνήθως στο εύρος 4000 - 600 cm^{-1}, καθώς αυτοί σχετίζονται άμεσα με την ενέργεια και τη συχνότητα, παρέχοντας έναν εύκολο τρόπο για την ερμηνεία του φάσματος. Είναι σημαντικό πριν από την ανάλυση του δείγματος να καταγράφεται το υπόβαθρο, ώστε να αποφεύγεται η εμφάνιση κορυφών από τον αέρα και τους υδρατμούς [63]. Μια σχηματική απεικόνιση του φασματόμετρου FTIR παρατίθεται παρακάτω:



Εικόνα 7. *Σχηματική απεικόνιση φασματόμετρου FTIR.*

Η ταυτοποίηση μιας οργανικής ένωσης από το φάσμα FTIR που λαμβάνεται είναι μια διαδικασία που συνίσταται από δύο στάδια. Το πρώτο εξ αυτών είναι ο προσδιορισμός των χαρακτηριστικών ομάδων, η παρουσία των οποίων εμφανίζεται συνήθως στην περιοχή συχνοτήτων χαρακτηριστικών ομάδων (group frequency region). Η περιοχή αυτή έχει εύρος κυματαριθμών από 3600 έως 1250 cm^{-1}. Το επόμενο στάδιο περιλαμβάνει μια λεπτομερή σύγκριση του φάσματος της ουσίας που αναλύθηκε με φάσματα γνωστών, καθαρών ενώσεων, τα οποία περιέχουν όλες τις λειτουργικές ομάδες που εντοπίστηκαν στο πρώτο στάδιο. Μια ιδιαίτερα χρήσιμη περιοχή στο στάδιο αυτό είναι η περιοχή αποτυπωμάτων (fingerprint region) με εύρος από 1200 έως 600 cm^{-1}, καθώς μικρές αλλαγές στη σύσταση και τη δομή ενός μορίου οδηγούν σε σημαντικές αλλαγές στην εμφάνιση των κορυφών απορρόφησης σε αυτή την περιοχή. Επομένως, η ταύτιση δύο φασμάτων στην περιοχή αποτυπωμάτων, καθώς και στις υπόλοιπες, οδηγεί με ασφάλεια στο συμπέρασμα πως οι ενώσεις που παράγουν τα φάσματα είναι ταυτόσημες [64].

1.5. Προσδιορισμός αλληλεπίδρασης με DNA

Το DNA υπάρχει στο σώμα με τη μορφή διπλής έλικας, η οποία αποτελείται από ένα συνδυασμό τεσσάρων νουκλεοτιδίων, αδενίνης (A), θυμίνης (T), γουανίνης (G) και κυτοσίνης (C). Μέσα σε μια αλυσίδα τα νουκλεοτίδια αυτά συνδέονται μέσω φωσφοδιεστερικών δεσμών και οι δύο αλυσίδες συγκρατούνται μεταξύ τους κυρίως μέσω δεσμών υδρογόνου. Πιο συγκεκριμένα, το A σχηματίζει δύο δεσμούς υδρογόνου με το T και το C σχηματίζει τρεις δεσμούς υδρογόνου με το G. Η περιοχή όπου οι δύο αλυσίδες βρίσκονται κοντά η μία στην άλλη ονομάζεται μικρή αύλακα, ενώ η περιοχή όπου βρίσκονται μακριά η μία από την άλλη ονομάζεται μεγάλη αύλακα [65].

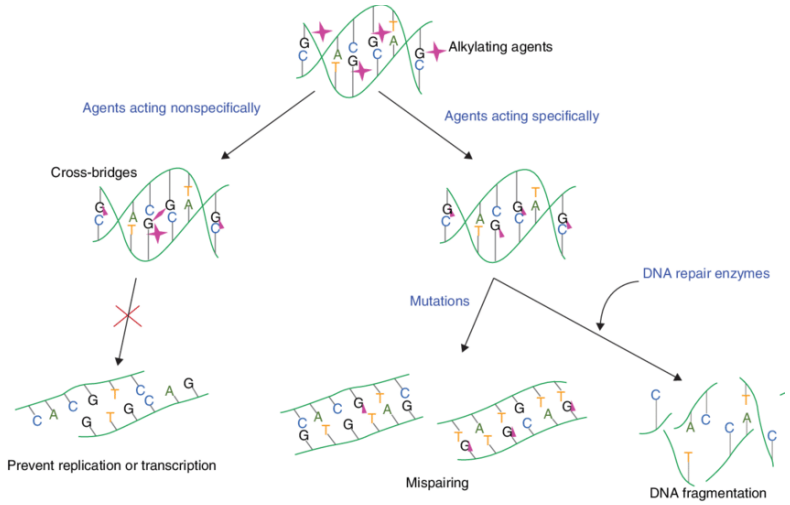
Το DNA είναι ο στόχος πολλών φαρμάκων που αναπτύσσονται ή βρίσκονται ήδη σε προχωρημένες κλινικές δοκιμές. Αυτό συμβαίνει, διότι οι δύο βασικές λειτουργίες του είναι η μεταγραφή, δηλαδή η έκφραση γονιδίων και σύνθεση πρωτεϊνών και η

αντιγραφή που συμβάλει στην ανάπτυξη και τη διαίρεση των κυττάρων. Συνεπώς, για τη θεραπεία ή τον έλεγχο μιας νόσου μπορεί να είναι χρήσιμη η μεταβολή ή αναστολή της λειτουργίας του DNA, το οποίο μπορεί να επιτευχθεί με μόρια που αλληλεπιδρούν με αυτό [65]. Υπάρχουν δύο τρόποι σύνδεσης του φαρμάκου με το DNA, ο ομοιοπολικός και ο μη ομοιοπολικός [65], [66].

Ο ομοιοπολικός τρόπος σύνδεσης του φαρμάκου με το DNA είναι μη αντιστρεπτός και προκαλεί πάντοτε την πλήρη αναστολή των διεργασιών του DNA και τον επακόλουθο κυτταρικό θάνατο. Σημαντικό πλεονέκτημα των ουσιών που συνδέονται με αυτόν τον τρόπο είναι η υψηλή ισχύς σύνδεσης. Επιπλέον, τα ογκώδη ομοιοπολικά προσδέματα μπορούν να προκαλέσουν παραμόρφωση της «ραχοκοκαλιάς» του DNA, γεγονός που επηρεάζει τόσο τη μεταγραφή όσο και την αντιγραφή. Ο ομοιοπολικός τρόπος σύνδεσης πραγματοποιείται είτε μέσω αλκυλίωσης είτε μέσω διασταυρούμενων δεσμών εντός ή διαμέσου των αλυσίδων. Οι αλκυλιωτικοί παράγοντες, μια σημαντική κατηγορία αντικαρκινικών φαρμάκων, έχουν μεθυλικές ή άλλες αλκυλικές (C_nH_{2n+1}) ομάδες στα μόριά τους και δρουν μέσω τριών μηχανισμών:

- πρόσδεση αλκυλικών ομάδων στις βάσεις του DNA, με αποτέλεσμα αυτό να τεμαχίζεται από ένζυμα επιδιόρθωσης κατά τη διάρκεια αντικατάστασης των αλκυλιωμένων βάσεων
- σχηματισμός ενδοκλωνικής ή διακλωνικής διασύνδεσης, όπου δύο βάσεις του DNA συνδέονται μεταξύ τους με έναν αλκυλιωτικό παράγοντα που διαθέτει δύο θέσεις πρόσδεσης, οδηγώντας σε αναστολή της αντιγραφής και της μεταγραφής και, συνεπώς, σε κυτταρικό θάνατο
- λάθος κωδικοποίηση των νουκλεοτιδίων που οδηγεί σε μεταλλάξεις εμποδίζοντας τη σύνθεση του DNA και τον πολλαπλασιασμό του, με αποτέλεσμα να προκαλείται απόπτωση [65], [66].

Οι τρόποι με τους οποίους δρουν οι αλκυλιωτικοί παράγοντες απεικονίζονται παρακάτω:



Εικόνα 8. *Τρόποι δράσης αλκυλιωτικών παραγόντων.*

Αντίθετα, ο μη ομοιοπολικός τρόπος σύνδεσης θεωρείται γενικά λιγότερο κυτταροτοξικός από ότι ο ομοιοπολικός. Είναι αντιστρεπτός και συνήθως προτιμάται

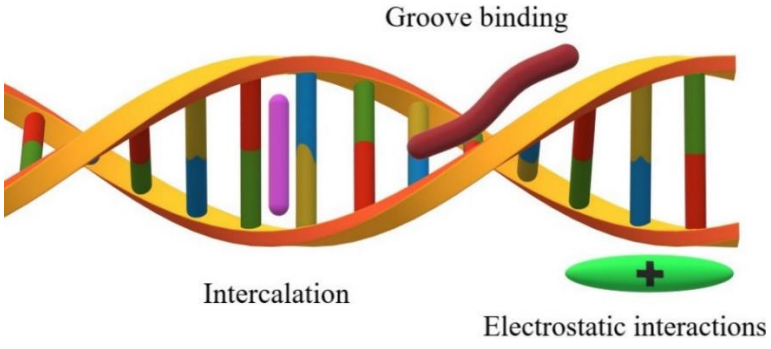
έναντι του σχηματισμού ομοιοπολικών προσδέσεων, λαμβάνοντας υπόψη τον μεταβολισμό του φαρμάκου και τις τοξικές παρενέργειες. Οι μη ομοιοπολικοί παράγοντες αλληλεπίδρασης με το DNA μπορούν να αλλάξουν τη διαμόρφωση του DNA, να μεταβάλουν τη στρεπτική τάση του DNA, να διακόψουν την αλληλεπίδραση πρωτεΐνης-DNA και ενδεχομένως να οδηγήσουν σε θραύση των αλυσίδων του DNA. Ο μη ομοιοπολικός τρόπος πρόσδεσης φαρμάκου-DNA ταξινομείται περαιτέρω σε τρεις τύπους παρεμβολή (intercalation), πρόσδεση στην αύλακα (groove binding) και εξωτερική πρόσδεση (στο εξωτερικό της έλικας) (external binding) [65], [66].

Η παρεμβολή προκαλείται από επίπεδες ετεροκυκλικές ενώσεις που στοιβάζονται μεταξύ γειτονικών ζευγών βάσεων του DNA οδηγώντας σε σημαντική επικάλυψη π-ηλεκτρονίων. Οι ενώσεις αυτές είναι μόρια που στοιβάζονται κάθετα στη ραχοκοκαλιά του DNA χωρίς να σχηματίζουν ομοιοπολικούς δεσμούς και να διασπούν τους δεσμούς υδρογόνου μεταξύ των βάσεων του DNA. Οι μόνες δυνάμεις που σταθεροποιούν το σύμπλοκο DNA-παράγοντα παρεμβολής είναι οι δυνάμεις van der Waals, οι δεσμοί υδρογόνου, οι υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις και οι δυνάμεις μεταφοράς φορτίου. Η παρεμβολή προκαλεί δομικές αλλαγές στο DNA, καθώς σταθεροποιεί, επιμηκύνει, σκληραίνει και ξετυλίγει τη διπλή έλικα του DNA [65].

Άλλες ενώσεις προσδένονται είτε στη μικρή είτε στη μεγάλη αύλακα του DNA μέσω αλληλεπίδρασης van der Walls και δεσμών υδρογόνου. Τα φάρμακα που δεσμεύονται στη μικρή αύλακα έχουν συνήθως μικρό καμπυλωτό σχήμα και πολλούς αρωματικούς δακτυλίους, ενώ με τη μεγάλη αύλακα συνδέονται μόρια μεγάλου μοριακού βάρους. Γενικότερα, τα μόρια αυτά προσδένονται κυρίως σε αλληλουχίες πλούσιες σε αδενίνη-θυμίνη (AT). Αυτό συμβαίνει, διότι υπάρχει πιο ισχυρή αλληλεπίδραση van der Waals μεταξύ του προσδέματος και των τοιχωμάτων της αύλακας σε αυτή την περιοχή, δεδομένου ότι οι περιοχές AT είναι στενότερες από τις περιοχές της αύλακας GC [65].

Τέλος, η πρόσδεση στο εξωτερικό της αύλακας είναι ηλεκτροστατικής φύσης τύπος δέσμευσης. Σε αυτόν ορισμένα προσδέματα σχηματίζουν μη ειδικές, εξωτερικές αλληλεπιδράσεις στοίβαξης με τις φωσφορικές ομάδες στο άκρο του DNA. Αυτός ο τρόπος εμφανίζεται συνήθως όταν το πρόσδεμα είναι σύμπλοκο μετάλλου ή θετικών ιόντων και αυτοοργανώνεται για να σχηματίσει συσσωματώματα. Ακολούθως αυτά στοιβάζονται πάνω στην αρνητικά φορτισμένη ραχοκοκαλιά του DNA προκειμένου να μειωθεί η απώθηση φορτίου-φορτίου μεταξύ των μορίων του συσσωματώματος [65].

Οι τρεις τύποι μη ομοιοπολικής πρόσδεσης παρουσιάζονται σχηματικά στη συνέχεια:



Εικόνα 9. *Οι τρεις τύποι μη ομοιοπολικής πρόσδεσης.*

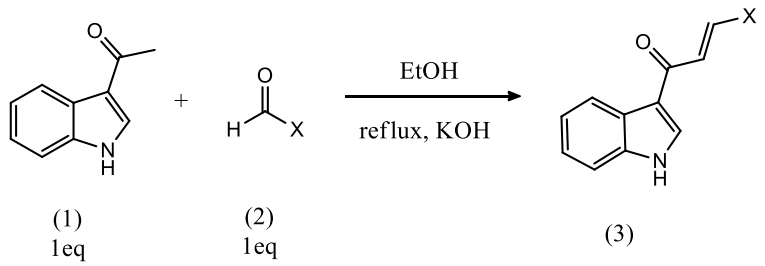
Τα τελευταία χρόνια έχει αναπτυχθεί η μέθοδος του προσδιορισμού της αλληλεπίδρασης διαφόρων ενώσεων με το DNA *in silico* (DNA docking). Η μέθοδος αυτή χρησιμοποιείται για την πρόβλεψη της δομής (ή των δομών) του συμπλόκου που σχηματίζεται μεταξύ μορίων και του DNA. Το πρόγραμμα που χρησιμοποιείται για τη μέθοδο αυτή παράγει μεγάλο αριθμό πιθανών δομών και έτσι απαιτείται η κατάταξή τους ανάλογα με τη βαθμολογία τους για τον εντοπισμό εκείνων που παρουσιάζουν μεγαλύτερο ενδιαφέρον. Τα βασικά βήματα της διαδικασίας είναι:

- αναπαράσταση του συστήματος
- αναζήτηση του χώρου διαμόρφωσης μέσω ενός αλγορίθμου αναζήτησης
- κατάταξη των δυνητικών λύσεων με τη χρήση της συνάρτησης βαθμολόγησης

Στόχος της μεθόδου αυτής είναι η υπολογιστική προσομοίωση της διαδικασίας μοριακής ταυτοποίησης και η επίτευξη μιας βελτιστοποιημένης διαμόρφωσης, ώστε να ελαχιστοποιηθεί η ελεύθερη ενέργεια του συνολικού συμπλόκου. Όμως, η μέθοδος περιλαμβάνει πολλούς βαθμούς ελευθερίας, με αποτέλεσμα να έχουν αναπτυχθεί διάφοροι αλγόριθμοι για τον περιορισμό τους, οι οποίοι χαρακτηρίζονται ανάλογα με τον αριθμό των βαθμών ελευθερίας που αγνοούν. Ο αλγόριθμος αναζήτησης δημιουργεί έναν αριθμό διαφορετικών διαμορφώσεων για ένα συγκεκριμένο πρόσδεμα και ακολούθως εφαρμόζονται συναρτήσεις για τον εντοπισμό της ενεργειακά ευνοϊκότερης θέσης πρόσδεσης στο μόριο του DNA [66].

2. Σκοπός

Σκοπός της παρούσας διπλωματικής εργασίας αποτέλεσε η σύνθεση και ο χαρακτηρισμός υβριδικών μορίων χαλκόνης και ινδολίου προς μελέτη της αντικαρκινικής τους δράσης. Ο σχεδιασμός και η σύνθεση των ινδολικών χαλκονών στηρίχθηκε σε μια σειρά παράγωγων των χαλκονών που έχουν συντεθεί στο Εργαστήριο Οργανικής Χημείας της Σχολής Χημικών Μηχανικών ΕΜΠ [67], [68], [69], [70], [71]. Τα μόρια αυτά προέκυψαν μέσω της αντίδρασης συμπύκνωσης Claisen-Schmidt μεταξύ της κετόνης του ινδολίου και μιας αλδεΰδης, σύμφωνα με την αντίδραση που απεικονίζεται παρακάτω:



Σχήμα 26. *Γενική μορφή αντίδρασης σύνθεσης χαλκονών με συμπύκνωση Claisen-Schmidt, ακολουθώντας τη βελτιστοποιημένη μεθοδολογία, όπου (1): 3-ακετυλο-ινδόλιο, (2): αλδεΰδη με υποκαταστάτη X και (3): χαλκόνη.*

Η καθαρότητα των μορίων που συντέθηκαν ελέγχθηκε μέσω Φασματοσκοπίας Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού (NMR), καθώς και Φασματοσκοπίας Υπερύθρου με μετασχηματισμό Fourier (FTIR). Στη συνέχεια, οι συντιθέμενες ινδολικές χαλκόνες εξετάστηκαν ως προς την ικανότητά τους να αλληλεπιδράσουν με το DNA θύμου αδένα βοοειδούς (CT-DNA) μέσω *in silico* και *in vitro* μελέτης, καθώς η αλληλεπίδραση αυτή μπορεί να οδηγήσει σε αξιοποίηση των ενώσεων σε αντικαρκινικά φάρμακα.

3. Πειραματικό μέρος

3.1. Όργανα και συσκευές

Παρακάτω παρουσιάζεται ο εξοπλισμός, τα όργανα και οι συσκευές που χρησιμοποιήθηκαν για την πραγματοποίηση των αντιδράσεων, την παρακολούθηση της πορείας τους, την επεξεργασία των τελικών προϊόντων, τον έλεγχο της καθαρότητάς τους, αλλά και τη μελέτη των ιδιοτήτων τους.

Η παρακολούθηση της πορείας των αντιδράσεων, καθώς και ο έλεγχος της καθαρότητας των προϊόντων πραγματοποιήθηκε μέσω χρωματογραφίας λεπτής στιβάδας (Thin Layer Chromatography, TLC). Για τη διεξαγωγή της χρησιμοποιήθηκαν πλάκες αλουμινίου, οι οποίες ήταν επιστρωμένες με Silica Gel με φθορίζοντα δείκτη F254 της εταιρίας Merck. Η ανάπτυξη των χρωματογραφημάτων TLC έγινε με κατάλληλες αναλογίες συστήματος διαλυτών PE:EtOAc (πετρελαϊκού αιθέρα: οξικού αιθυλεστέρα). Οι κηλίδες (spots) των χρωματογραφημάτων TLC παρατηρήθηκαν υπό το φωτισμό λάμπας υπεριώδους (UV) ακτινοβολίας στα 254 nm και στη συνέχεια, με εμποτισμό των πλακών σε διάλυμα φωσφομολυβδαινικού οξέος (PMA) αναλογίας 1:2 (αιθανολικό διάλυμα PMA 7% : EtOH) και θέρμανσή τους.

Για τις αντιδράσεις που πραγματοποιήθηκαν μέσω ακτινοβόλησης με υπερήχους χρησιμοποιήθηκε η συσκευή υπερήχων probe (άμεσης ακτινοβόλησης) “Vibra-Cell VCX 750” (κατασκευαστής Sonics and Materials Inc) του εργαστηρίου Οργανικής Χημείας.

Για τον καθαρισμό των προϊόντων πραγματοποιήθηκαν τεχνικές ανακρυστάλλωσης και χρωματογραφίας στήλης. Η ανακρυστάλλωση έγινε σε δυαδικά συστήματα διαλυτών, ανάλογα με τη διαλυτότητα του επιθυμητού προϊόντος και των παραπροϊόντων της αντίδρασης. Η χρωματογραφία στήλης ταχείας ανάπτυξης (Flash Column Chromatography, FCC) πραγματοποιήθηκε με χρήση Silica Gel (γέλης πυριτίου) 60 (40-63 Microns) της εταιρίας Merck.

Η εξάτμιση των οργανικών διαλυτών πραγματοποιήθηκε σε περιστροφικό εξατμιστήρα Büchi Rotavapor® R-210 υπό ελαττωμένη πίεση και σε θερμοκρασίες 40-50 °C. Η τελική ξήρανση των στερεών ενώσεων πραγματοποιήθηκε σε αντλία υψηλού κενού Edwards (RV-5).

Η δομική ταυτοποίηση των συντιθέμενων μορίων και ο έλεγχος της καθαρότητάς τους πραγματοποιήθηκαν μέσω φασματοσκοπίας Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού ^{1}H NMR. Τα φάσματα ^{1}H (πρωτονίου) καταγράφηκαν με τα όργανα Varian Gemini 300 MHz και 600 MHz του Εθνικού Ιδρύματος Ερευνών. Ως διαλύτης χρησιμοποιήθηκε το δευτεριωμένο διμεθυλοσουλφοξείδιο (DMSO, d_6). Οι τιμές των χημικών μετατοπίσεων δίνονται σε ppm ως προς τη συχνότητα συντονισμού της ένωσης αναφοράς TMS (τετραμεθυλοσιλάνιο), ενώ οι τιμές των σταθερών συζεύξεων (J) σε Hz. Οι πολλαπλότητες των σημάτων στα φάσματα ^{1}H NMR περιγράφονται ως εξής:

- s (singlet, απλό)
- d (doublet, διπλό)
- t (triplet, τριπλό)
- q (quartet, τετραπλό)

- m (multiplet, πολλαπλό)
- dd (double of doublets, διπλό διπλών)
- br (broad, ευρύ)

Τα φάσματα υπερύθρου FTIR καταγράφηκαν με χρήση του φασματομέτρου JASCO FT/IR – 4200 (Easton, MD, USA) σε εύρος 4000 – 400 cm^{-1}.

Το φασματοφωτόμετρο UV-Vis που χρησιμοποιήθηκε ήταν το «V – 770» της Jasco.

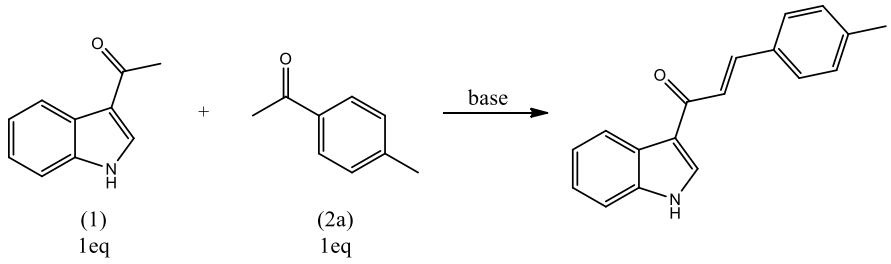
Τέλος, ο προσδιορισμός του σημείου τήξης των στερεών προϊόντων πραγματοποιήθηκε σε ανοιχτούς τριχοδιαμετρικούς σωλήνες, με χρήση της συσκευής MANUAL MEL-TEMP® της εταιρίας Barnstead-Electrothermal (model: 1002DQ) και οι τιμές δεν έχουν διορθωθεί.

3.2. Συνθετική πορεία

Η συνθετική πορεία των επιθυμητών μορίων αφορά τη σύνθεση ινδολικών χαλκονών.

3.2.1. Ανάπτυξη μεθοδολογίας σύνθεσης χαλκονών με αντίδραση συμπύκνωσης Claisen-Schmidt

Ως αντίδραση-μοντέλο για την ανάπτυξη της μεθοδολογίας σύνθεσης χαλκονών με αντίδραση συμπύκνωσης Claisen-Schmidt θεωρήθηκε η ακόλουθη:



Σχήμα 27. *Αντίδραση-μοντέλο σύνθεσης χαλκονών με συμπύκνωση Claisen-Schmidt, όπου (1): 3-ακετυλο-ινδόλιο, (2a): 4-μεθυλοβενζαλδεΰδη.*

Ειδικότερα, η αντίδραση-μοντέλο πραγματοποιήθηκε χρησιμοποιώντας διαφορετικές βάσεις (NaOH, KOH, *t*-BuOK), διαφορετικούς διαλύτες (EtOH, *i*-PrOH), καθώς και διαφορετικούς τρόπους θέρμανσης (θερμοκρασία δωματίου, με χρήση αναρροής και με χρήση υπερήχων), με μολαρική αναλογία αντιδρώντων **(1)** και **(2a)** ίση με 1:1 για λόγους οικονομίας ατόμου.

3.2.2. Πραγματοποίηση αντίδρασης σε θερμοκρασία δωματίου

Αρχικά, η αντίδραση πραγματοποιήθηκε σε θερμοκρασία δωματίου με διαλύτη την αιθανόλη, χρησιμοποιώντας κάθε φορά διαφορετική βάση, ώστε να διαπιστωθεί ποια βάση οδηγεί σε μεγαλύτερη απόδοση τελικού προϊόντος. Οι ποσότητες των αντιδραστηρίων που χρησιμοποιήθηκαν παρουσιάζονται στον παρακάτω πίνακα:

Πίνακας 1. *Οι απαιτούμενες ποσότητες αντιδραστηρίων, όπως υπολογίστηκαν, για τη διεξαγωγή της αντίδρασης-μοντέλο με τρεις διαφορετικές βάσεις και διαλύτη EtOH σε θερμοκρασία δωματίου.*

	3-ακετυλο-ινδόλιο	**4-μεθυλο-βενζαλδεΰδη**	**NaOH**	**KOH**	***t*-BuOK**
Γραμμομοριακή αναλογία	1 eq	1 eq	3 eq	3 eq	3 eq
mmol	0,5	0,5	1,5	1,5	1,5
MW (g/mol)	159,188	120,15	40,00	56,11	112,21
Πυκνότητα (kg/L)	-	1,016	-	-	-
Ποσότητα	79,6 mg	59 μL	60 mg	84,2 mg	168,3 mg

Σε σφαιρική φιάλη των 5 mL προστέθηκαν 1,5 mmol από την εκάστοτε βάση και μερικές σταγόνες νερού προκειμένου να διαλυτοποιηθεί. Στη συνέχεια, προστέθηκαν 0,5 mmol 3-ακετυλο-ινδολίου **(1)** και 1 mL καθαρής αιθανόλης ως διαλύτη. Έπειτα, προστέθηκαν στάγδην 0,5 mmol 4-μεθυλοβενζαλδεΰδης **(2a)** και το διάλυμα αφέθηκε σε θερμοκρασία δωματίου, υπό συνεχή ανάδευση με μαγνητάκι. Η πορεία της αντίδρασης, καθώς και η καθαρότητα του τελικού προϊόντος παρακολουθούνταν με TLC και αναλογία κινητής φάσης PE:EtOAc 7:3. Μετά το πέρας της αντίδρασης, προστέθηκε μικρή ποσότητα υπερκάθαρου νερού και 2 mL MeOH και πραγματοποιήθηκε εξουδετέρωση με διάλυμα HCl 10% v/v έως τιμή pH ίση με 6, με αποτέλεσμα να καταβυθιστεί στερεό. Αυτό παραλήφθηκε με διήθηση υπό κενό και πραγματοποιήθηκε ανακρυστάλλωσή του με MeOH/H_2O 6:4, σύμφωνα με τη μέθοδο δύο διαλυτών εν θερμώ. Ακολούθως, το τελικό προϊόν παραλήφθηκε με διήθηση υπό κενό ως κίτρινο στερεό.

Από την παραπάνω πειραματική διαδικασία, προέκυψε ότι η μεγαλύτερη απόδοση τελικού προϊόντος επιτυγχάνεται όταν χρησιμοποιείται η βάση KOH. Επομένως, η επίδραση των διαφορετικών διαλυτών και τεχνικών θέρμανσης στην απόδοση της αντίδρασης-μοντέλο ερευνήθηκε χρησιμοποιώντας τη συγκεκριμένη βάση για τη διεξαγωγή της.

3.2.3. Πραγματοποίηση αντίδρασης με χρήση αναρροής

Για την πραγματοποίηση της αντίδρασης-μοντέλο μεταξύ των αντιδρώντων **(1)** και **(2a)** σε μοναρική αναλογία 1:1, χρησιμοποιώντας τη βάση KOH, διαλύτες EtOH και *i*-PrOH και θέρμανση με χρήση αναρροής, χρησιμοποιήθηκαν οι ποσότητες αντιδραστηρίων που φαίνονται στη συνέχεια:

Πίνακας 2. *Οι απαιτούμενες ποσότητες αντιδραστηρίων, όπως υπολογίστηκαν, για τη διεξαγωγή της αντίδρασης-μοντέλο με βάση ΚΟΗ, δύο διαφορετικούς διαλύτες και χρήση αναρροής.*

	3-ακετυλο-ινδόλιο	**4-μεθυλο-βενζαλδεΰδη**	**ΚΟΗ**
Γραμμομοριακή αναλογία	1 eq	1 eq	3 eq
mmol	0,5	0,5	1,5
MW (g/mol)	159,188	120,15	56,11
Πυκνότητα (kg/L)	-	1,016	-
Ποσότητα	79,6 mg	59 μL	84,2 mg

Σε σφαιρική φιάλη των 5 mL προστέθηκαν 1,5 mmol ΚΟΗ και μερικές σταγόνες νερού προκειμένου να διαλυτοποιηθεί. Στη συνέχεια, προστέθηκαν 0,5 mmol 3-ακετυλο-ινδολίου **(1)** και 1 mL από τον εκάστοτε διαλύτη (EtOH και *i*-PrOH). Έπειτα, προστέθηκαν στάγδην 0,5 mmol 4-μεθυλοβενζαλδεΰδης **(2a)** και το διάλυμα αφέθηκε στους 80 °C, υπό συνεχή ανάδευση με μαγνητάκι και reflux για 5 ώρες. Η πορεία της αντίδρασης, καθώς και η καθαρότητα του τελικού προϊόντος παρακολουθούνταν με TLC και αναλογία κινητής φάσης PE:EtOAc 7:3. Μετά το πέρας της αντίδρασης, προστέθηκε μικρή ποσότητα υπερκάθαρου νερού και 2 mL MeOH και πραγματοποιήθηκε εξουδετέρωση με διάλυμα HCl 10% v/v έως τιμή pH ίση με 6, με αποτέλεσμα να καταβυθιστεί στερεό. Αυτό παραλήφθηκε με διήθηση υπό κενό και πραγματοποιήθηκε ανακρυστάλλωσή του με MeOH/H_2O 6:4, σύμφωνα με τη μέθοδο δύο διαλυτών εν θερμώ. Ακολούθως, το τελικό προϊόν παραλήφθηκε με διήθηση υπό κενό ως κίτρινο στερεό.

3.2.4. Πραγματοποίηση αντίδρασης με χρήση υπερήχων

Για την πραγματοποίηση της αντίδρασης-μοντέλο μεταξύ των αντιδρώντων **(1)** και **(2a)** σε μοναρική αναλογία 1:1, χρησιμοποιώντας τη βάση ΚΟΗ, διαλύτες EtOH και *i*-PrOH και θέρμανση με χρήση υπερήχων, χρησιμοποιήθηκαν οι ποσότητες αντιδραστηρίων που παρουσιάζονται στον παρακάτω πίνακα:

Πίνακας 3. *Οι απαιτούμενες ποσότητες αντιδραστηρίων, όπως υπολογίστηκαν, για τη διεξαγωγή της αντίδρασης-μοντέλο με βάση ΚΟΗ, δύο διαφορετικούς διαλύτες και χρήση υπερήχων*

	3-ακετυλο-ινδόλιο	**4-μεθυλο-βενζαλδεΰδη**	**ΚΟΗ**
Γραμμομοριακή αναλογία	1 eq	1 eq	3 eq
mmol	0,5	0,5	1,5
MW (g/mol)	159,188	120,15	56,11
Πυκνότητα (kg/L)	-	1,016	-
Ποσότητα	79,6 mg	59 μL	84,2 mg

Αρχικά, σε γυάλινο φιαλίδιο των 10 mL προστέθηκαν 1,5 mmol KOH και μερικές σταγόνες νερού προκειμένου να διαλυτοποιηθεί. Στη συνέχεια, προστέθηκαν 0,5 mmol 3-ακετυλο-ινδολίου **(1)** και 1 mL από τον εκάστοτε διαλύτη (EtOH και *i*-PrOH). Έπειτα, προστέθηκαν στάγδην 0,5 mmol 4-μεθυλοβενζαλδεΰδης **(2a)** και το γυάλινο φιαλίδιο μεταφέρθηκε στη συσκευή υπερήχων, ώστε να πραγματοποιηθεί η αντίδραση.

Οι παράμετροι λειτουργίας της συσκευής ορίστηκαν ως εξής:

- Ισχύς: 40% (160 W)
- Διάρκεια λειτουργίας (μεταξύ των παύσεων): 10 min (x2)
- Παλμός: 8” on, 2” off

Στη συνέχεια, το γυάλινο φιαλίδιο τοποθετήθηκε μέσα σε παγόλουτρο, ώστε να προστατευτεί από την απότομη αύξηση της θερμοκρασίας, γεγονός που παρατηρείται κατά τη λειτουργία των υπερήχων, αλλά και για να μην πραγματοποιηθεί εξάτμιση του διαλύτη, καθώς και υπερθέρμανση του μίγματος της αντίδρασης.

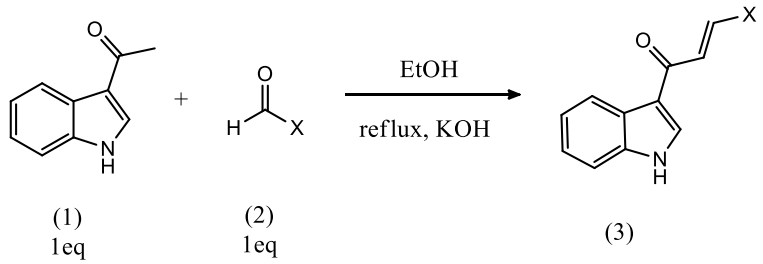
Η πορεία της αντίδρασης, καθώς και η καθαρότητα του τελικού προϊόντος παρακολουθούνταν με TLC και αναλογία κινητής φάσης PE:EtOAc 7:3. Μετά το πέρας της αντίδρασης, προστέθηκε μικρή ποσότητα υπερκάθαρου νερού και 2 mL MeOH και πραγματοποιήθηκε εξουδετέρωση με διάλυμα HCl 10% v/v έως τιμή pH ίση με 6, με αποτέλεσμα να καταβυθιστεί στερεό. Αυτό παραλήφθηκε με διήθηση υπό κενό και πραγματοποιήθηκε ανακρυστάλλωσή του με MeOH/H_2O 6:4, σύμφωνα με τη μέθοδο δύο διαλυτών εν θερμώ. Ακολούθως, το τελικό προϊόν παραλήφθηκε με διήθηση υπό κενό ως κίτρινο στερεό.

3.2.5. Επιλογή βέλτιστων συνθηκών

Αρχικά, παρατηρήθηκε ότι χρησιμοποιώντας αναρροή και υπερήχους, έναντι της πραγματοποίησης της αντίδρασης σε θερμοκρασία δωματίου, ο απαιτούμενος χρόνος αντίδρασης μειώθηκε σημαντικά. Ωστόσο, η υψηλότερη απόδοση επιτεύχθηκε στην περίπτωση της συμβατικής θέρμανσης με χρήση αναρροής. Επιπλέον, κατάλληλος διαλύτης για την πραγματοποίηση της αντίδρασης-μοντέλο βρέθηκε ότι είναι η αιθανόλη, καθώς στην περίπτωση χρήσης ισοπροπανόλης παραλήφθηκε μικρή ποσότητα του τελικού προϊόντος. Επομένως, οι βέλτιστες συνθήκες διεξαγωγής της αντίδρασης σύνθεσης χαλκονών, μέσω συμπύκνωσης μιας κετόνης και μιας αλδεΰδης με αντίδραση Claisen-Schmidt, είναι αυτές στις οποίες χρησιμοποιείται το **KOH ως βάση (καταλύτης)**, **EtOH ως διαλύτης** και **συμβατική θέρμανση με χρήση αναρροής** με **αναλογία αντιδρώντων 1:1** και **αναλογία βάσης 1:3**.

3.2.6. Γενική μέθοδος σύνθεσης χαλκονών (μέσω βελτιστοποιημένης συνθετικής οδού)

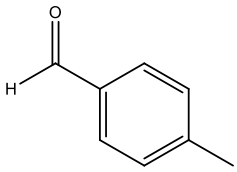
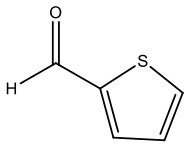
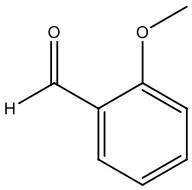
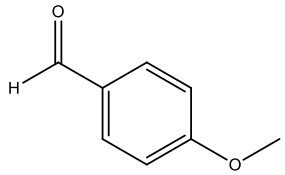
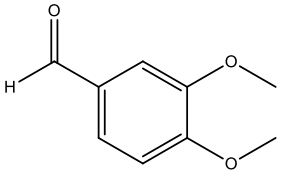
Προκειμένου να γενικευθεί η μεθοδολογία σύνθεσης χαλκονών, η οποία αναπτύχθηκε παραπάνω, η αντιδραση συμπύκνωσης Claisen-Schmidt πραγματοποιήθηκε ανάμεσα στο 3-ακετυλο-ινδόλιο και ένα πλήθος αλδεϋδών σε ισομοριακές ποσότητες, σύμφωνα με τις βέλτιστες συνθήκες που περιεγράφηκαν παραπάνω. Η γενική μορφή της αντίδρασης, καθώς και οι συνθήκες πραγματοποίησής της απεικονίζονται παρακάτω:

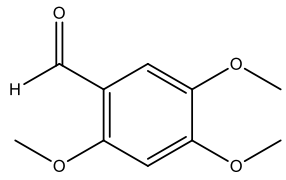
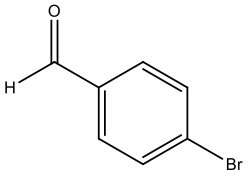
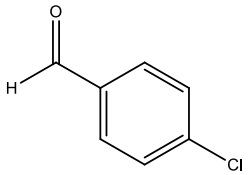
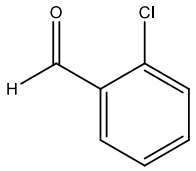
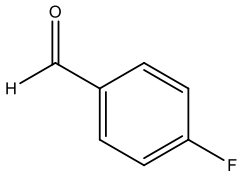


Σχήμα 28. *Γενική μορφή αντίδρασης σύνθεσης χαλκονών με συμπύκνωση Claisen-Schmidt, ακολουθώντας τη βελτιστοποιημένη μεθοδολογία, όπου (1): 3-ακετυλο-ινδόλιο, (2): αλδεΰδη με υποκαταστάτη X και (3): χαλκόνη.*

Τα διαφορετικά είδη των αλδεϋδών που χρησιμοποιήθηκαν, το μοριακό τους βάρος, καθώς και η πυκνότητά τους παρουσιάζονται στον παρακάτω πίνακα:

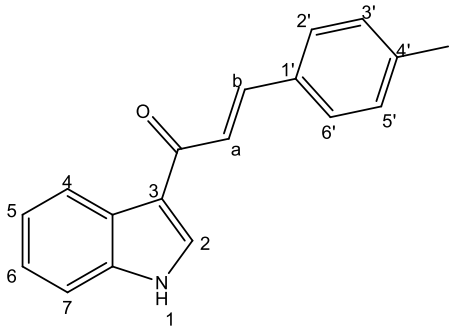
Πίνακας 4. *Οι διαφορετικές αλδεΰδες, τα μοριακά βάρη και οι πυκνότητές τους.*

Αλδεΰδη	**Ονομασία**	**MW (g/mol)**	**Πυκνότητα (kg/L)**
	4-μεθυλοβενζαλδεΰδη (2a)	120,15	1,016
	2-θειοφαινοκαρβοξαλδεΰδη (2b)	112,15	1,223
	2-μεθοξυβενζαλδεΰδη (2c)	136,15	-
	4-μεθοξυβενζαλδεΰδη (2d)	136,15	1,121
	3,4-διμεθοξυβενζαλδεΰδη (2e)	166,18	-

	2,4,5-τριμεθοξυβενζαλδεΰδη (2f)	196,20	-
	4-βρωμοβενζαλδεΰδη (2g)	185,02	-
	4-χλωροβενζαλδεΰδη (2h)	140,57	-
	2-χλωροβενζαλδεΰδη (2i)	140,57	1,250
	4-φθοροβενζαλδεΰδη (2j)	124,11	1,157

Παρακάτω φαίνονται οι χαλκόνες που παράχθηκαν, η απόδοση της κάθε αντίδρασης σε προϊόν, η αποτίμηση των ^{1}H NMR φασμάτων των ενώσεων, καθώς και το Μοριακό Βάρος και το σημείο τήξεώς τους:

(3a) (*E*)-1-(1*H*-ινδολ-3-υλ)-3-(p-τολυλ)προπ-2-εν-1-όνη



Η σύνθεση της ένωσης **(3a)** πραγματοποιήθηκε ακολουθώντας τη γενική βελτιστοποιημένη μέθοδο που αναφέρθηκε παραπάνω. Σε σφαιρική φιάλη των 10 mL προστέθηκαν 7,5 mmol KOH (420,8 mg) και μερικές σταγόνες νερού προκειμένου να διαλυτοποιηθεί. Στη συνέχεια, προστέθηκαν 2,5 mmol 3-ακετυλο-ινδολίου (398 mg) **(1)** και 5 mL καθαρής αιθανόλης ως διαλύτη. Έπειτα, προστέθηκαν στάγδην 2,5 mmol 4-μεθυλοβενζαλδεΰδης (295,6 μL) **(2a)** και το διάλυμα αφέθηκε στους 80 °C, υπό συνεχή ανάδευση με μαγνητάκι και reflux για 5 ώρες. Μετά το πέρας της αντίδρασης, προστέθηκε μικρή ποσότητα υπερκάθαρου νερού και 2 mL MeOH και πραγματοποιήθηκε εξουδετέρωση με διάλυμα HCl 10% v/v έως τιμή pH ίση με 6, με αποτέλεσμα να καταβυθιστεί στερεό. Αυτό παραλήφθηκε με διήθηση υπό κενό και

πραγματοποιήθηκε ανακρυστάλλωσή του με MeOH/H_2O 6:4, σύμφωνα με τη μέθοδο δύο διαλυτών εν θερμώ. Ακολούθως, παραλήφθηκε το στερεό με διήθηση υπό κενό και προκειμένου να αυξηθεί η καθαρότητά του πραγματοποιήθηκε στήλη χρωματογραφίας με αναλογία κινητής φάσης PE:EtOAc 7:3 αρχικά, ενώ στη συνέχεια μεταβλήθηκε σε αναλογία PE:EtOAc 3:7. Μετά την παραλαβή των επιθυμητών κλασμάτων αυτά συμπυκνώθηκαν σε περιστροφικό εξατμιστήρα και το τελικό προϊόν παραλήφθηκε ως κίτρινο στερεό. Η καθαρότητά του παρακολουθήθηκε με TLC και αναλογία κινητής φάσης PE:EtOAc 7:3 (Rf=0,58).

Μοριακός τύπος: $C_{18}H_{15}NO$

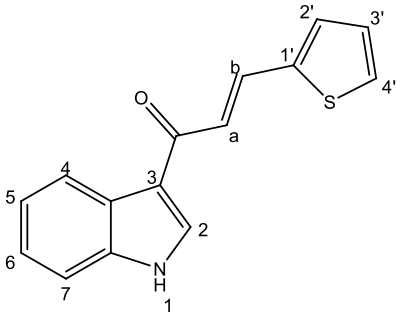
Μοριακό Βάρος: 261,32 g/mol

Σημείο τήξεως: 214-218 °C

Απόδοση αντίδρασης: 44,2% (288,6 mg)

^{1}H NMR (300 MHz, DMSO, d_6) δ (ppm) 12.085 (s, 1H, H-1), 8.718 (d, *J* = 2.4 Hz, 1H, H-2), 8.337 (d, *J* = 7.3 Hz, 1H, H-4), 7.786 (d, *J* = 16.3 Hz, 2H, H-2΄, H-6΄), 7.730 (s, 1H, H-a), 7.599 (d, *J* = 15.6 Hz, 1H, H-b), 7.494 (d, *J* = 7.6 Hz, 1H, H-7), 7.276 – 7.207 (m, 4H, H-5, H-6 ή H-3΄, H-5΄), 2.350 (s, 3H, -C**H**$_3$)

(3b) (*E*)-1-(1*H*-ινδολ-3-υλ)-3-(θειοφαιν-3-υλ)προπ-2-εν-1-όνη



Η σύνθεση της ένωσης **(3b)** πραγματοποιήθηκε ακολουθώντας τη γενική βελτιστοποιημένη μέθοδο που αναφέρθηκε παραπάνω. Σε σφαιρική φιάλη των 10 mL προστέθηκαν 7,5 mmol KOH (420,8 mg) και μερικές σταγόνες νερού προκειμένου να διαλυτοποιηθεί. Στη συνέχεια, προστέθηκαν 2,5 mmol 3-ακετυλο-ινδολίου (398 mg) **(1)** και 5 mL καθαρής αιθανόλης ως διαλύτη. Έπειτα, προστέθηκαν στάγδην 2,5 mmol 2-θειοφαινοκαρβοξαλδεΰδης (229,25 μL) **(2b)** και το διάλυμα αφέθηκε της 80 °C, υπό συνεχή ανάδευση με μαγνητάκι και reflux για 5 ώρες. Μετά το πέρας της αντίδρασης, προστέθηκε μικρή ποσότητα υπερκάθαρου νερού και 2 mL MeOH και πραγματοποιήθηκε εξουδετέρωση με διάλυμα HCl 10% v/v έως τιμή pH ίση με 6, με αποτέλεσμα να καταβυθιστεί στερεό. Αυτό παραλήφθηκε με διήθηση υπό κενό και πραγματοποιήθηκε ανακρυστάλλωσή του με MeOH/H_2O 6:4, σύμφωνα με τη μέθοδο δύο διαλυτών εν θερμώ. Ακολούθως, παραλήφθηκε το τελικό προϊόν με διήθηση υπό κενό ως καφέ-πράσινο στερεό. Η καθαρότητά του παρακολουθήθηκε με TLC και αναλογία κινητής φάσης PE:EtOAc 7:3 και 5 σταγόνες MeOH (Rf=0,36).

Μοριακός τύπος: $C_{15}H_{11}NOS$

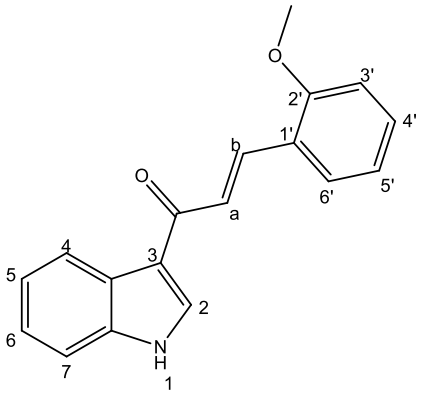
Μοριακό Βάρος: 253,32 g/mol

Σημείο τήξεως: 180-184 °C

Απόδοση αντίδρασης: 48,3% (305,9 mg)

^{1}H NMR (300 MHz, DMSO, d_6) δ (ppm) 12.088 (s, 1H, H-1), 8.660 (s, 1H, H-2), 8.319 (d, J = 6.8 Hz, 1H, H-2'), 7.794 (d, J = 15.3 Hz, 1H, H-a), 7.703 (d, J = 4.2 Hz, 1H, H-4΄), 7.596 (s, 1H, H-3΄), 7.496 (d, J = 11.4 Hz, 2H, H-4, H-7), 7.323 – 7.095 (m, 3H, H-5, H-6, H-b)

(3c) (*E*)-1-(1*H*-ινδολ-3-υλ)-3-(2-μεθοξυφαινυλ)προπ-2-εν-1-όνη



Η σύνθεση της ένωσης **(3c)** πραγματοποιήθηκε ακολουθώντας τη γενική βελτιστοποιημένη μέθοδο που αναφέρθηκε παραπάνω. Σε σφαιρική φιάλη των 10 mL προστέθηκαν 7,5 mmol KOH (420,8 mg) και μερικές σταγόνες νερού προκειμένου να διαλυτοποιηθεί. Στη συνέχεια, προστέθηκαν 2,5 mmol 3-ακετυλο-ινδολίου (398 mg) **(1)** και 5 mL καθαρής αιθανόλης ως διαλύτη. Έπειτα, προστέθηκαν 2,5 mmol 2-μεθοξυβενζαλδεΰδης (340,4 mg) **(2c)** και το διάλυμα αφέθηκε στους 80 °C, υπό συνεχή ανάδευση με μαγνητάκι και reflux για 5 ώρες. Μετά το πέρας της αντίδρασης, προστέθηκε μικρή ποσότητα υπερκάθαρου νερού και 2 mL MeOH και πραγματοποιήθηκε εξουδετέρωση με διάλυμα HCl 10% v/v έως τιμή pH ίση με 6, με αποτέλεσμα να καταβυθιστεί στερεό. Αυτό παραλήφθηκε με διήθηση υπό κενό και πραγματοποιήθηκε ανακρυστάλλωσή του με MeOH/H_2O 6:4, σύμφωνα με τη μέθοδο δύο διαλυτών εν θερμώ. Ακολούθως, παραλήφθηκε το τελικό προϊόν με διήθηση υπό κενό ως πορτοκαλί-καφέ στερεό. Η καθαρότητά του παρακολουθήθηκε με TLC και αναλογία κινητής φάσης PE:EtOAc 7:3 (Rf=0,35).

Μοριακός τύπος: $C_{18}H_{15}NO_2$

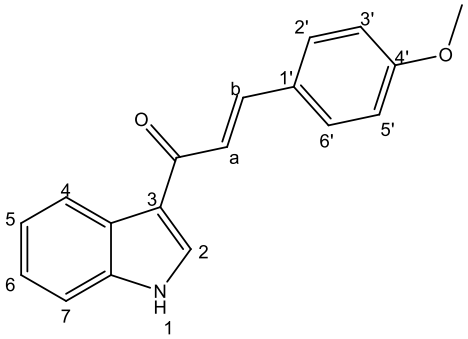
Μοριακό Βάρος: 277,32 g/mol

Σημείο τήξεως: 124-128 °C

Απόδοση αντίδρασης: 69,6% (482,6 mg)

^{1}H NMR (300 MHz, DMSO, d_6) δ (ppm) 12.071 (s, 1H, H-1), 8.677 (d, J = 2.7 Hz, 1H, H-2), 8.335 (d, J = 6.7 Hz, 1H, H-4), 8.025 – 7.933 (m, 2H, H-b, H-6΄), 7.767 (d, J = 15.8 Hz, 1H, H-a), 7.495 (d, J = 6.9 Hz, 1H, H-3΄), 7.415 (t, J = 7.8 Hz, 1H, H-7), 7.275 – 7.182 (m, 2H, H-5, H-6), 7.125 – 7.004 (m, 2H, H-4΄, H-5΄), 3.902 (s, 3H, -OC**H**$_3$)

(3d) (*E*)-1-(1*H*-ινδολ-3-υλ)-3-(4-μεθοξυφαινυλ)προπ-2-εν-1-όνη



Η σύνθεση της ένωσης **(3d)** πραγματοποιήθηκε ακολουθώντας τη γενική βελτιστοποιημένη μέθοδο που αναφέρθηκε παραπάνω. Σε σφαιρική φιάλη των 25 mL προστέθηκαν 15 mmol KOH (841,7 mg) και μερικές σταγόνες νερού προκειμένου να διαλυτοποιηθεί. Στη συνέχεια, προστέθηκαν 5 mmol 3-ακετυλο-ινδολίου (795,9 mg) **(1)** και 10 mL καθαρής

αιθανόλης ως διαλύτη. Έπειτα, προστέθηκαν στάγδην 5 mmol 4-μεθοξυβενζαλδεΰδης (607,27 μL) **(2d)** και το διάλυμα αφέθηκε στους 80 °C, υπό συνεχή ανάδευση με μαγνητάκι και reflux για 5 ώρες. Μετά το πέρας της αντίδρασης, προστέθηκε μικρή ποσότητα υπερκάθαρου νερού και 2 mL MeOH και πραγματοποιήθηκε εξουδετέρωση με διάλυμα HCl 10% v/v έως τιμή pH ίση με 6, με αποτέλεσμα να καταβυθιστεί στερεό. Αυτό παραλήφθηκε με διήθηση υπό κενό και πραγματοποιήθηκε ανακρυστάλλωσή του με MeOH/H_2O 6:4, σύμφωνα με τη μέθοδο δύο διαλυτών εν θερμώ. Ακολούθως, παραλήφθηκε το τελικό προϊόν με διήθηση υπό κενό ως πορτοκαλί-κίτρινο στερεό. Η καθαρότητά του παρακολουθήθηκε με TLC και αναλογία κινητής φάσης PE:EtOAc 7:3 (Rf=0,26).

Μοριακός τύπος: $C_{18}H_{15}NO_2$

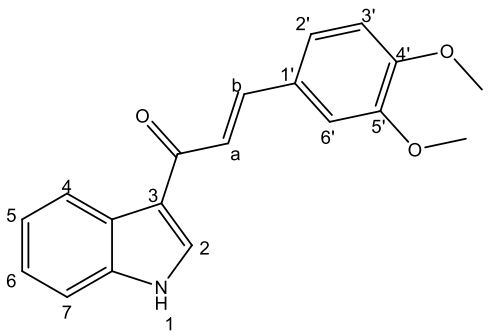
Μοριακό Βάρος: 277,32 g/mol

Σημείο τήξεως: 144-150 °C

Απόδοση αντίδρασης: 80,5% (1116,3 mg)

^{1}H NMR (600 MHz, DMSO, d_6) δ (ppm) 12.055 (s, 1H, H-1), 8.695 (d, *J* = 3.0 Hz, 1H, H-2), 8.331 (d, *J* = 7.6 Hz, 1H, H-4), 7.806 (d, *J* = 8.6 Hz, 2H, H-2′, H-6′), 7.703 (d, *J* = 15.5 Hz, 1H, H-b), 7.591 (d, *J* = 15.5 Hz, 1H, H-a), 7.488 (d, *J* = 7.7 Hz, 1H, H-7), 7.263 – 7.184 (m, 2H, H-5, H-6), 7.014 (d, *J* = 8.5 Hz, 2H, H-3′, H-5′), 3.819 (s, *J* = 11.0 Hz, 3H, -OC**H**$_3$)

(3e) (*E*)-3-(3,4-διμεθοξυφαινυλ)-1-(1*H*-ινδολ-3-υλ)προπ-2-εν-1-όνη



Η σύνθεση της ένωσης **(3e)** πραγματοποιήθηκε ακολουθώντας τη γενική βελτιστοποιημένη μέθοδο που αναφέρθηκε παραπάνω. Σε σφαιρική φιάλη των 10 mL προστέθηκαν 7,5 mmol KOH (420,8 mg) και μερικές σταγόνες νερού προκειμένου να διαλυτοποιηθεί. Στη συνέχεια, προστέθηκαν 2,5 mmol 3-ακετυλο-ινδολίου (398 mg) **(1)** και 5 mL καθαρής αιθανόλης ως διαλύτη. Έπειτα, προστέθηκαν 2,5 mmol 3,4-διμεθοξυβενζαλδεΰδης (415,5 mg) **(2e)** και το διάλυμα αφέθηκε στους 80 °C, υπό συνεχή ανάδευση με μαγνητάκι και reflux για 5 ώρες. Μετά το πέρας της αντίδρασης, προστέθηκε μικρή ποσότητα υπερκάθαρου νερού και 2 mL MeOH και πραγματοποιήθηκε εξουδετέρωση με διάλυμα HCl 10% v/v έως τιμή pH ίση με 6, με αποτέλεσμα να καταβυθιστεί στερεό. Αυτό παραλήφθηκε με διήθηση υπό κενό και πραγματοποιήθηκε ανακρυστάλλωσή του με MeOH/H_2O 6:4, σύμφωνα με τη μέθοδο δύο διαλυτών εν θερμώ. Ακολούθως, παραλήφθηκε το τελικό προϊόν με διήθηση υπό κενό ως πορτοκαλί-κίτρινο στερεό. Η καθαρότητά του παρακολουθήθηκε με TLC και αναλογία κινητής φάσης PE:EtOAc 7:3 (Rf=0,16).

Μοριακός τύπος: $C_{19}H_{17}NO_3$

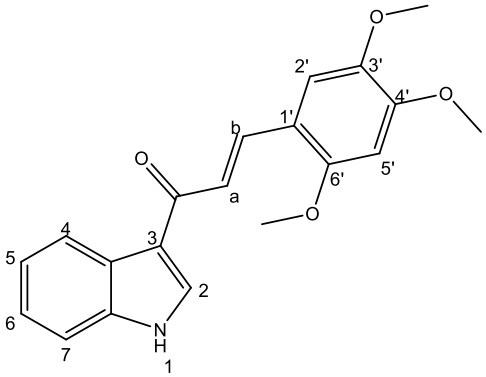
Μοριακό Βάρος: 307,34 g/mol

Σημείο τήξεως: 202-206 °C

Απόδοση αντίδρασης: 56,3% (432,6 mg)

^{1}H NMR (600 MHz, DMSO, d_6) δ (ppm) 12.069 (s, 1H, H-1), 8.714 (d, *J* = 3.1 Hz, 1H, H-2), 8.333 (d, *J* = 7.6 Hz, 1H, H-7), 7.692 (d, *J* = 15.5 Hz, 1H, H-a), 7.576 (d, *J* = 15.5 Hz, 1H, H-b), 7.498 (d, *J* = 6.6 Hz, 1H, H-2΄ ή H-6΄), 7.490 (s, 1H, H-2΄ ή H-6΄), 7.334 (dd, *J* = 8.2, 1.7 Hz, 1H, H-3΄), 7.222 (dtd, *J* = 8.1, 7.6, 1.1 Hz, 2H, H-5, H-6), 7.013 (d, *J* = 8.3 Hz, 1H, H-4), 3.873 (s, 3H, -OC**H**$_3$), 3.811 (s, 3H, -OC**H**$_3$)

(3f) (*E*)-1-(1*H*-ινδολ-3-υλ)-3-(2,4,5-τριμεθοξυφαινυλ)προπ-2-εν-1-όνη



Η σύνθεση της ένωσης **(3f)** πραγματοποιήθηκε ακολουθώντας τη γενική βελτιστοποιημένη μέθοδο που αναφέρθηκε παραπάνω. Σε σφαιρική φιάλη των 10 mL προστέθηκαν 3 mmol KOH (168,3 mg) και μερικές σταγόνες νερού προκειμένου να διαλυτοποιηθεί. Στη συνέχεια, προστέθηκαν 1 mmol 3-ακετυλο-ινδολίου (159,2 mg) **(1)** και 2 mL καθαρής αιθανόλης ως διαλύτη. Έπειτα, προστέθηκαν 1 mmol 2,4,5-τριμεθοξυβενζαλδεΰδης (196,2 mg) **(2f)** και το διάλυμα αφέθηκε στους 80 °C, υπό συνεχή ανάδευση με μαγνητάκι και reflux για 5 ώρες. Μετά το πέρας της αντίδρασης, προστέθηκε μικρή ποσότητα υπερκάθαρου νερού και 2 mL MeOH και πραγματοποιήθηκε εξουδετέρωση με διάλυμα HCl 10% v/v έως τιμή pH ίση με 6, με αποτέλεσμα να καταβυθιστεί στερεό. Αυτό παραλήφθηκε με διήθηση υπό κενό και πραγματοποιήθηκε ανακρυστάλλωσή του με MeOH/H_2O 6:4, σύμφωνα με τη μέθοδο δύο διαλυτών εν θερμώ. Ακολούθως, παραλήφθηκε το τελικό προϊόν με διήθηση υπό κενό ως πορτοκαλί-καφέ στερεό. Η καθαρότητά του παρακολουθήθηκε με TLC και αναλογία κινητής φάσης PE:EtOAc 7:3 (Rf=0,11).

Μοριακός τύπος: $C_{20}H_{19}NO_4$

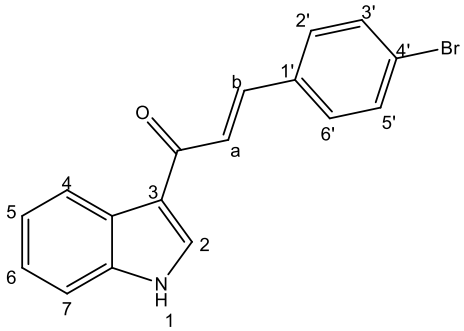
Μοριακό Βάρος: 337,37 g/mol

Σημείο τήξεως: 192-198 °C

Απόδοση αντίδρασης: 56,1% (189,3 mg)

^{1}H NMR (600 MHz, DMSO, d_6) δ (ppm) 12.035 (s, 1H, H-1), 8.677 (d, J = 2.1 Hz, 1H, H-2), 8.331 (d, J = 7.4 Hz, 1H, H-7), 7.950 (d, J = 15.6 Hz, 1H, H-b), 7.622 (d, J = 15.6 Hz, 1H, H-a), 7.507 (s, 1H, H-2΄), 7.494 (d, J = 8.1 Hz, 1H, H-4), 7.221 (tdd, J = 14.7, 10.5, 4.1 Hz, 2H, H-5, H-6), 6.743 (s, 1H, H-5΄), 3.895 (s, 3H, -OC**H**$_3$), 3.862 (s, 3H, -OC**H**$_3$), 3.836 (s, 3H, -OC**H**$_3$).

(3g) (*E*)-3-(4-βρωμοφαινυλ)-1-(1*H*-ινδολ-3-υλ)προπ-2-εν-1-όνη



Η σύνθεση της ένωσης **(3g)** πραγματοποιήθηκε ακολουθώντας τη γενική βελτιστοποιημένη μέθοδο που αναφέρθηκε παραπάνω. Σε σφαιρική φιάλη των 10 mL προστέθηκαν 3 mmol KOH (168,3 mg) και μερικές σταγόνες νερού προκειμένου να διαλυτοποιηθεί. Στη συνέχεια, προστέθηκαν 1 mmol 3-ακετυλο-ινδολίου (159,2 mg) **(1)** και 2 mL καθαρής αιθανόλης ως διαλύτη. Έπειτα, προστέθηκαν 1 mmol 4-βρωμοβενζαλδεΰδης (185 mg) **(2g)** και το διάλυμα αφέθηκε στους 80 °C, υπό συνεχή ανάδευση με μαγνητάκι και reflux για 5 ώρες. Μετά το πέρας της αντίδρασης, προστέθηκε μικρή ποσότητα υπερκάθαρου νερού και 2 mL MeOH και πραγματοποιήθηκε εξουδετέρωση με διάλυμα HCl 10% v/v έως τιμή pH ίση με 6, με αποτέλεσμα να καταβυθιστεί στερεό. Αυτό παραλήφθηκε με διήθηση υπό κενό και πραγματοποιήθηκε ανακρυστάλλωσή του με MeOH/H_2O 6:4, σύμφωνα με τη μέθοδο δύο διαλυτών εν θερμώ. Ακολούθως, παραλήφθηκε το τελικό προϊόν με διήθηση υπό κενό ως κίτρινο στερεό. Η καθαρότητά του παρακολουθήθηκε με TLC και αναλογία κινητής φάσης PE:EtOAc 7:3 (Rf=0,37).

Μοριακός τύπος: $C_{17}H_{12}BrNO$

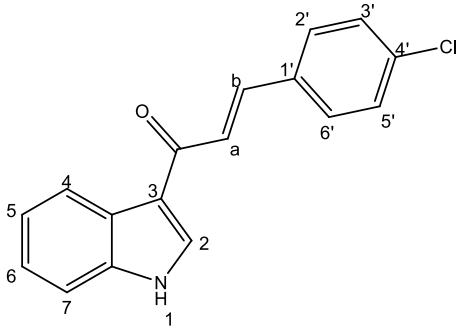
Μοριακό Βάρος: 326,19 g/mol

Σημείο τήξεως: 180-184 °C

Απόδοση αντίδρασης: 45,7% (149,1 mg)

^{1}H NMR (600 MHz, DMSO, d_6) δ (ppm) 12.124 (s, 1H, H-1), 8.743 (d, *J* = 3.2 Hz, 1H, H-2), 8.324 (d, *J* = 7.5 Hz, 1H, H-4), 7.875 (d, *J* = 15.6 Hz, 1H, H-a), 7.824 (d, *J* = 8.3 Hz, 2H, H-3΄, H-5΄), 7.657 (d, *J* = 8.3 Hz, 2H, H-2΄, H-6΄), 7.594 (d, *J* = 15.6 Hz, 1H, H-b), 7.500 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H, H-7), 7.229 (dtd, *J* = 18.9, 7.2, 1.2 Hz, 2H, H-5, H-6)

(3h) (*E*)-3-(4-χλωροφαινυλ)-1-(1*H*-ινδολ-3-υλ)προπ-2-εν-1-όνη



Η σύνθεση της ένωσης **(3h)** πραγματοποιήθηκε ακολουθώντας τη γενική βελτιστοποιημένη μέθοδο που αναφέρθηκε παραπάνω. Σε σφαιρική φιάλη των 10 mL προστέθηκαν 3 mmol KOH (168,3 mg) και μερικές σταγόνες νερού προκειμένου να διαλυτοποιηθεί. Στη συνέχεια, προστέθηκαν 1 mmol 3-ακετυλο-ινδολίου (159,2 mg) **(1)** και 2 mL καθαρής αιθανόλης ως διαλύτη. Έπειτα, προστέθηκαν 1 mmol 4-χλωροβενζαλδεΰδης (140,6 mg) **(2h)** και το διάλυμα αφέθηκε στους 80 °C, υπό συνεχή ανάδευση με μαγνητάκι και reflux για 5 ώρες. Μετά το πέρας της αντίδρασης, προστέθηκε μικρή ποσότητα υπερκάθαρου νερού και 2 mL MeOH και πραγματοποιήθηκε εξουδετέρωση με διάλυμα HCl 10% v/v έως τιμή pH ίση με 6, με

αποτέλεσμα να καταβυθιστεί στερεό. Αυτό παραλήφθηκε με διήθηση υπό κενό και πραγματοποιήθηκε ανακρυστάλλωσή του με MeOH/H_2O 6:4, σύμφωνα με τη μέθοδο δύο διαλυτών εν θερμώ. Ακολούθως, παραλήφθηκε το τελικό προϊόν με διήθηση υπό κενό ως κίτρινο στερεό. Η καθαρότητά του παρακολουθήθηκε με TLC και αναλογία κινητής φάσης PE:EtOAc 7:3 (Rf=0,50).

Μοριακός τύπος: $C_{17}H_{12}ClNO$

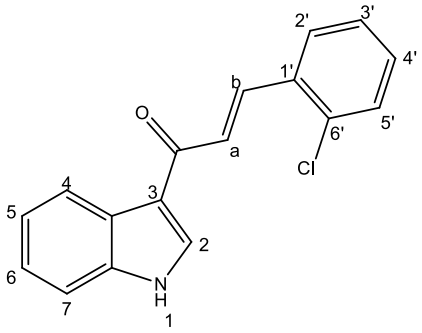
Μοριακό Βάρος: 281,74 g/mol

Σημείο τήξεως: 250-254 °C

Απόδοση αντίδρασης: 58,9% (165,9 mg)

^{1}H NMR (600 MHz, DMSO, d_6) δ (ppm) 12.125 (s, 1H, H-1), 8.742 (d, *J* = 3.1 Hz, 1H, H-2), 8.325 (d, *J* = 7.4 Hz, 1H, H-4), 7.895 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H, H-2΄, H-6΄), 7.861 (d, *J* = 15.6 Hz, 1H, H-a), 7.612 (d, *J* = 15.6 Hz, 1H, H-b), 7.522 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H, H-3΄, H-5΄), 7.500 (d, *J* = 7.9 Hz, 1H, H-7), 7.235 (tdd, *J* = 14.6, 7.3, 1.0 Hz, 2H, H-5, H-6)

(3i) (*E*)-3-(2-χλωροφαινυλ)-1-(1*H*-ινδολ-3-υλ)προπ-2-εν-1-όνη



Η σύνθεση της ένωσης **(3i)** πραγματοποιήθηκε ακολουθώντας τη γενική βελτιστοποιημένη μέθοδο που αναφέρθηκε παραπάνω. Σε σφαιρική φιάλη των 10 mL προστέθηκαν 3 mmol KOH (168,3 mg) και μερικές σταγόνες νερού προκειμένου να διαλυτοποιηθεί. Στη συνέχεια, προστέθηκαν 1 mmol 3-ακετυλο-ινδολίου (159,2 mg) **(1)** και 2 mL καθαρής αιθανόλης ως διαλύτη. Έπειτα, προστέθηκαν στάγδην 1 mmol 2-χλωροβενζαλδεΰδης (112,5 μL) **(2i)** και το διάλυμα αφέθηκε στους 80 °C, υπό συνεχή ανάδευση με μαγνητάκι και reflux για 5 ώρες. Μετά το πέρας της αντίδρασης, προστέθηκε μικρή ποσότητα υπερκάθαρου νερού και 2 mL MeOH και πραγματοποιήθηκε εξουδετέρωση με διάλυμα HCl 10% v/v έως τιμή pH ίση με 6, με αποτέλεσμα να καταβυθιστεί στερεό. Αυτό παραλήφθηκε με διήθηση υπό κενό και πραγματοποιήθηκε ανακρυστάλλωσή του με MeOH/H_2O 6:4, σύμφωνα με τη μέθοδο δύο διαλυτών εν θερμώ. Ακολούθως, παραλήφθηκε το τελικό προϊόν με διήθηση υπό κενό ως κίτρινο στερεό. Η καθαρότητά του παρακολουθήθηκε με TLC και αναλογία κινητής φάσης PE:EtOAc 7:3 (Rf=0,28).

Μοριακός τύπος: $C_{17}H_{12}ClNO$

Μοριακό Βάρος: 281,74 g/mol

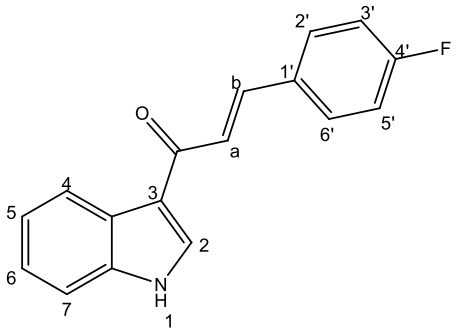
Σημείο τήξεως: 192-200 °C

Απόδοση αντίδρασης: 65,2% (183,7 mg)

^{1}H NMR (600 MHz, DMSO, d_6) δ (ppm) 12.137 (s, 1H, H-1), 8.738 (d, *J* = 3.1 Hz, 1H, H-2), 8.301 (d, *J* = 7.4 Hz, 1H, H-4), 8.187 – 8.155 (m, 1H, H-2΄), 7.942 (d, *J* = 15.5 Hz, 1H, H-a), 7.861 (d, *J* = 15.5 Hz, 1H, H-b), 7.555 – 7.516 (m, 1H, H-5΄), 7.481 (d,

J = 7.6 Hz, 1H, H-7), 7.445 – 7.412 (m, 2H, H-3′, H-4′), 7.219 (dtd, *J* = 15.9, 7.2, 1.1 Hz, 2H, H-5, H-6)

(3j) (*E*)-3-(4-φλουοροφαινυλ)-1-(1*H*-ινδολ-3-υλ)προπ-2-εν-1-όνη



Η σύνθεση της ένωσης **(3j)** πραγματοποιήθηκε ακολουθώντας τη γενική βελτιστοποιημένη μέθοδο που αναφέρθηκε παραπάνω. Σε σφαιρική φιάλη των 10 mL προστέθηκαν 6 mmol KOH (336,7 mg) και μερικές σταγόνες νερού προκειμένου να διαλυτοποιηθεί. Στη συνέχεια, προστέθηκαν 2 mmol 3-ακετυλο-ινδολίου (318,4 mg) **(1)** και 4 mL καθαρής αιθανόλης ως διαλύτη. Έπειτα, προστέθηκαν στάγδην 2 mmol 4-φθοροβενζαλδεΰδης (214,5 μL) **(2j)** και το διάλυμα αφέθηκε στους 80 °C, υπό συνεχή ανάδευση με μαγνητάκι και reflux για 5 ώρες. Μετά το πέρας της αντίδρασης, προστέθηκε μικρή ποσότητα υπερκάθαρου νερού και 2 mL MeOH και πραγματοποιήθηκε εξουδετέρωση με διάλυμα HCl 10% v/v έως τιμή pH ίση με 6, με αποτέλεσμα να καταβυθιστεί στερεό. Αυτό παραλήφθηκε με διήθηση υπό κενό και πραγματοποιήθηκε ανακρυστάλλωσή του με MeOH/H_2O 6:4, σύμφωνα με τη μέθοδο δύο διαλυτών εν θερμώ. Ακολούθως, παραλήφθηκε το τελικό προϊόν με διήθηση υπό κενό ως κίτρινο στερεό. Η καθαρότητά του παρακολουθήθηκε με TLC και αναλογία κινητής φάσης PE:EtOAc 7:3 (Rf=0,44).

Μοριακός τύπος: $C_{17}H_{12}FNO$

Μοριακό Βάρος: 265,28 g/mol

Σημείο τήξεως: 216-220 °C

Απόδοση αντίδρασης: 53,3% (282,8 mg)

^{1}H NMR (600 MHz, DMSO, d_6) δ (ppm) 12.108 (s, 1H, H-1), 8.729 (d, *J* = 3.1 Hz, 1H, H-2), 7.930 (dd, *J* = 8.6, 5.7 Hz, 2H, H-2′, H-6′), 7.805 (d, *J* = 15.6 Hz, 1H, H-a), 7.626 (d, *J* = 15.6 Hz, 1H, H-b), 7.300 (t, *J* = 8.8 Hz, 2H, H-3′, H-5′), 7.268 – 7.184 (m, 4H, H-4, H-5, H-6, H-7)

3.3. Προσδιορισμός αλληλεπίδρασης με DNA

3.3.1. Μελέτη *in silico*

Για τη μελέτη *in silico* της αλληλεπίδρασης των συντιθέμενων χαλκονών με το DNA, αρχικά, επιλέγεται ο στόχος της αλληλεπίδρασης, το DNA, η κρυσταλλική μορφή του οποίου παραλαμβάνεται από την RSCB Protein Data Bank (PDB) με την ονομασία 1BNA. Οι ενώσεις που συντέθηκαν συνιστούν τα επιθυμητά προσδέματα, τα οποία σχεδιάζονται με χρήση του προγράμματος ChemDraw Ultra 12.0 software (version 12.0, CambridgeSoft Corporation). Αξίζει να σημειωθεί ότι μέσω του AutoDock Tools προστίθενται μόνο πολικά υδρογόνα στο DNA και στις συντιθέμενες ενώσεις. Η βελτιστοποίηση των παραμέτρων σύνδεσης πραγματοποιείται μέσω του AutoDock Vina software [72], [73], καθώς και του AutoDock 4 software [74] (The Scripps

Research Institute, La Jolla, CA, USA), εφαρμόζοντας εμπειρική λειτουργία ελεύθερης ενέργειας. Τέλος, για την απεικόνιση της αλληλεπίδρασης του DNA με τις ινδολικές χαλκόνες γίνεται χρήση του λογισμικού PyMol.

3.3.2. Μελέτη *in vitro*

Για τη μελέτη *in vitro* της αλληλεπίδρασης των συντιθέμενων ενώσεων με το DNA, πρώτα από όλα, παρασκευάστηκαν τα εξής διαλύματα:

- Tris-HCl buffer (pH=7,4)

Αρχικά, παρασκευάστηκε υδατικό διάλυμα τρομεθαμίνης (Tris, Mr=121,136 g/mol) συγκέντρωσης C=10 mM διαλύοντας 605,7 mg της ουσίας σε 500 mL υπερκάθαρου νερού. Έπειτα, το pH του διαλύματος ρυθμίζεται ίσο με 7,4 προσθέτοντας μερικές σταγόνες διαλύματος HCl 10% v/v.

- Διάλυμα DNA

Το διάλυμα DNA (deoxyribonucleic acid sodium salt) συγκέντρωσης C=10 mM παρασκευάστηκε μέσω διάλυσης 2 mg ινών φυσικού DNA από θύμο αδένα βοοειδούς (Calf Thymus DNA, CT-DNA) σε 2 mL ρυθμιστικού διαλύματος Tris-HCl. Το διάλυμα αυτό αναδεύεται υπό ψύξη (T=4 °C) έως ότου να διαλυτοποιηθούν πλήρως οι ίνες του DNA.

Στη συνέχεια, παρασκευάστηκαν αραιά διαλύματα διαφορετικών συγκεντρώσεων DNA, ίσες με 100 μM, 75 μM, 50 μM, 40 μM και 30 μM, λαμβάνοντας κατάλληλες ποσότητες από το αρχικό διάλυμα DNA συγκέντρωσης C=10 mM και αραιώνοντάς τες με διάλυμα Tris-HCl buffer έως τελικό όγκο ίσο με 10 mL.

Τα προς ανάλυση δείγματα παρασκευάστηκαν με διάλυση κατάλληλης ποσότητας της κάθε συντιθέμενης ινδολικής χαλκόνης σε διαλύτη DMSO έχοντας τελική συγκέντρωση 10 mM.

Η συγκέντρωση του διαλύματος DNA ανά νουκλεοτίδιο υπολογίστηκε με φασματομετρία απορρόφησης, από το πηλίκο της απορρόφησης του διαλύματος στα 260 nm προς τον συντελεστή μοριακής απορρόφησης της κορυφής στα 260 nm, που είναι ίσος με 6600 $M^{-1}cm^{-1}$. Ο λόγος της UV απορρόφησης στα 260:280 nm είναι ίσος με 1,8-1,9:1, γεγονός που υποδηλώνει ότι το DNA είναι ελεύθερο από πρωτεΐνες. Το διάλυμα αυτό μπορεί να παραμείνει στο ψυγείο το πολύ για 4 ημέρες και πριν την επαναχρησιμοποίησή του ελέγχεται με φάσμα ηλεκτρονικής απορρόφησης.

Για την πραγματοποίηση των μετρήσεων χρησιμοποιήθηκε φασματοφωτόμετρο UV-Vis λαμβάνοντας το φάσμα της απορρόφησης στα 240-400 nm και χρησιμοποιώντας ως blank δείγμα το διάλυμα Tris-HCl buffer. Πριν από τη φωτομέτρηση των συμπλόκων των ενώσεων με το DNA, φωτομετρήθηκαν οι καθαρές ενώσεις διαλύοντας 1 μL διαλύματος της κάθε ένωσης συγκέντρωσης C=10 mM σε 999 μL Tris-HCl buffer. Στη συνέχεια, αραιώθηκε 1 μL από το διάλυμα της κάθε ένωσης με 999 μL διαλύματος DNA συγκέντρωσης C=100 μM. Το τελικό διάλυμα αφέθηκε να επωαστεί σε incubator για 5 λεπτά στους 37 °C και σε ανάδευση στις 100 rpm. Μετά την πάροδο αυτού του χρονικού διαστήματος, το διάλυμα τοποθετήθηκε στο όργανο UV-Vis και καταγράφηκε η μέγιστη απορρόφηση του δείγματος, καθώς και το μήκος

κύματος στο οποίο αυτή εμφανίζεται, λ_{max}. Η ίδια διαδικασία ακολουθήθηκε για κάθε ένωση και για τα υπόλοιπα διαλύματα DNA με διαφορετικές κάθε φορά συγκεντρώσεις. Συνεπώς, είναι δυνατό να εξεταστεί η επίδραση της συγκέντρωσης του DNA στην απορρόφηση του τελικού συμπλόκου, μέσω της οποίας μπορούν να εξαχθούν αξιόπιστα αποτελέσματα για το είδος της αλληλεπίδρασης κάθε ουσίας με το DNA. Προκειμένου να υπολογιστεί η σταθερά σύνδεσης K_b της κάθε ένωσης με το DNA χρησιμοποιήθηκε η εξίσωση Benesi-Hildebrand, η οποία είναι η εξής:

$$\frac{1}{A - A_0} = \frac{1}{K_b * (A_{max} - A_0)} * \frac{1}{[DNA]} + \frac{1}{A_{max} - A_0} \quad (1),$$

όπου A η παρατηρούμενη απορρόφηση του συμπλόκου της ένωσης με το DNA, A_0 η απορρόφηση της ελεύθερης ένωσης, K_b η σταθερά ισχύος σύνδεσης της ένωσης με το DNA, A_{max} η απορρόφηση κορεσμού και [DNA] η συγκέντρωση του διαλύματος DNA. Με βάση την εξίσωση (1) κατασκευάστηκαν διαγράμματα του λόγου $\frac{1}{A-A_0}$ (y) ως προς το λόγο $\frac{1}{[DNA]}$ (x) και σχεδιάστηκαν οι γραμμές τάσης με τη βοήθεια ελαχίστων τετραγώνων. Η σταθερά Kb, λοιπόν, ισούται με το πηλίκο του σταθερού όρου προς την κλίση της εξίσωσης της γραμμής τάσης. Από την σταθερά K_b είναι δυνατόν να εξαχθεί και η ενέργεια σύνδεσης μέσω της παρακάτω εξίσωσης:

$$\Delta G = -RTln\left(\frac{K_b}{c^{\ominus}}\right) \quad (2),$$

όπου R είναι η παγκόσμια σταθερά των αερίων (8.314 J/mol·K), T είναι η θερμοκρασία σε μονάδες Κέλβιν (K) και λαμβάνεται ίση με 298,15 K (θερμοκρασία περιβάλλοντος) και $c^{\ominus}$= 1.0 mol/L. Είναι συνεπώς εφικτό να υπάρξει σύγκριση μεταξύ των αποτελεσμάτων, τα οποία προκύπτουν από τις *in silico* και τις *in vitro* τεχνικές ανάλυσης.

4. Αποτελέσματα – Συζήτηση

4.1. Ανάπτυξη μεθοδολογίας σύνθεσης χαλκονών με αντίδραση συμπύκνωσης Claisen-Schmidt

Αρχικά, από τη μελέτη της επίδρασης των τριών διαφορετικών βάσεων (KOH, NaOH, *t*-BuOK) στην απόδοση της αντίδρασης-μοντέλο, η οποία πραγματοποιήθηκε σε θερμοκρασία δωματίου με διαλύτη EtOH, προέκυψαν τα αποτελέσματα που φαίνονται στον παρακάτω πίνακα:

Πίνακας 5. *Η απόδοση της αντίδρασης-μοντέλο σε τελικό προϊόν για κάθε μία από τις τρεις διαφορετικές βάσεις που χρησιμοποιήθηκαν στις ίδιες συνθήκες.*

Βάση	Συνθήκες	Διαλύτης	Χρόνος	Απόδοση (%)
NaOH	rt	EtOH	24 h	40,4
KOH				48,2
t-BuOK				45,7

Από τα δεδομένα του παραπάνω πίνακα προκύπτει ότι γενικά οι τρεις βάσεις στις συγκεκριμένες συνθήκες οδηγούν σε σχετικά χαμηλές αποδόσεις. Πιο συγκεκριμένα, με χρήση της βάσης KOH επιτυγχάνεται η υψηλότερη επί τοις εκατό απόδοση σε προϊόν, ενώ η χαμηλότερη με χρήση της βάσης NaOH. Δεδομένων των αρκετά χαμηλών αποδόσεων, κρίθηκε απαραίτητη η διερεύνηση της επίδρασης διαφορετικών τρόπων θέρμανσης (συμβατική με χρήση αναρροής, χρήση υπερήχων), καθώς και διαφορετικών διαλυτών (EtOH, *i*-PrOH). Τα αποτελέσματα της μελέτης αυτής παρατίθενται στη συνέχεια:

Πίνακας 6. *Συνθήκες θέρμανσης, διαλύτης, χρόνος αντίδρασης και απόδοση σε τελικό προϊόν για την πραγματοποίηση της αντίδρασης-μοντέλο με χρήση της βάσης KOH.*

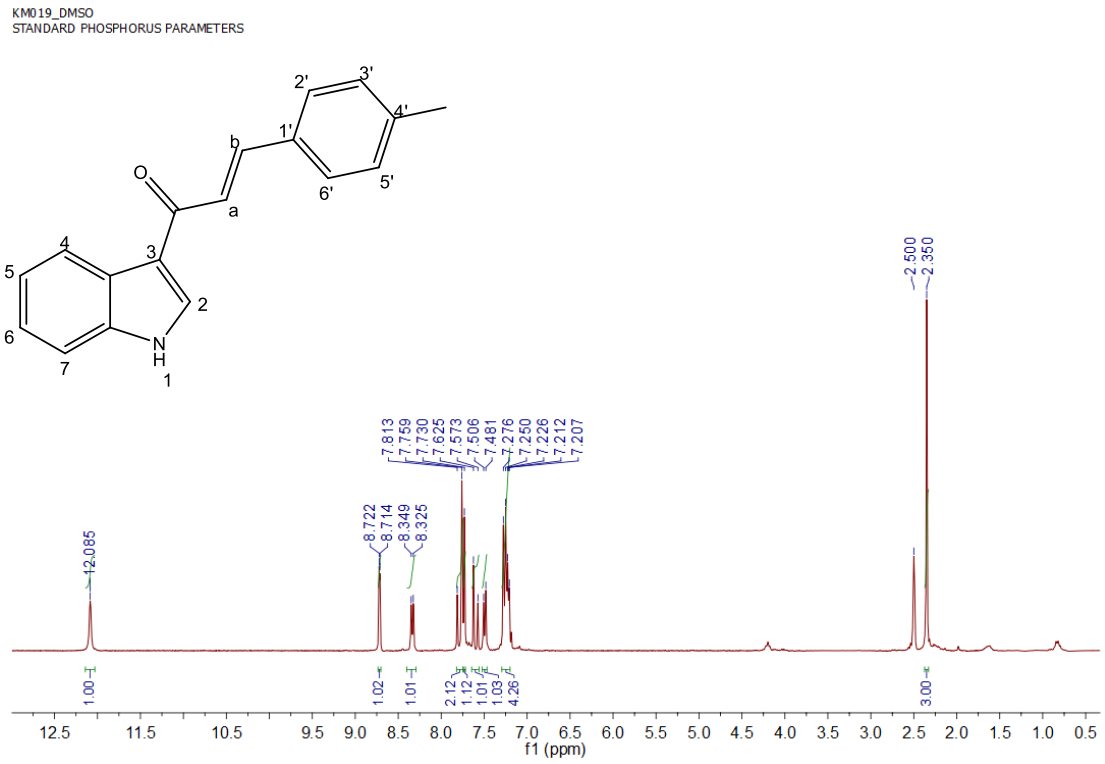
Βάση	Συνθήκες	Διαλύτης	Χρόνος	Απόδοση (%)
KOH	reflux	EtOH	5 h	60,9
	reflux	*i*-PrOH	5 h	52,7
	)))	EtOH	20 min	55,4
	)))	*i*-PrOH	20 min	50,5

Από τα παραπάνω πειραματικά αποτελέσματα προκύπτει ότι τόσο η χρήση συμβατικής θέρμανσης με αναρροή όσο και η χρήση υπερήχων μειώνουν σημαντικά τη διάρκεια της αντίδρασης, αυξάνοντας παράλληλα την απόδοσή της σε προϊόν. Ειδικότερα, η χρήση της αιθανόλης ως διαλύτη φαίνεται να ευνοεί την αντίδραση, καθώς με χρήση αυτής το προϊόν παραλήφθηκε με μεγαλύτερη απόδοση. Αξίζει να σημειωθεί ότι η χρήση υπερήχων, ενώ οδηγεί την αντίδραση σε ολοκλήρωση στο μικρότερο δυνατό χρονικό διάστημα, συντελεί στην παραγωγή μιας πληθώρας παραπροϊόντων, με αποτέλεσμα να απαιτείται πιο δύσκολη και χρονοβόρα κατεργασία για τη λήψη καθαρού επιθυμητού προϊόντος. Για τους παραπάνω λόγους, συμπεραίνεται ότι οι βέλτιστες συνθήκες διεξαγωγής της αντίδρασης-μοντέλο είναι αυτές στις οποίες χρησιμοποιείται το KOH ως βάση (καταλύτης), EtOH ως διαλύτης και συμβατική θέρμανση με χρήση αναρροής με αναλογία αντιδρώντων 1:1 και αναλογία βάσης 1:3.

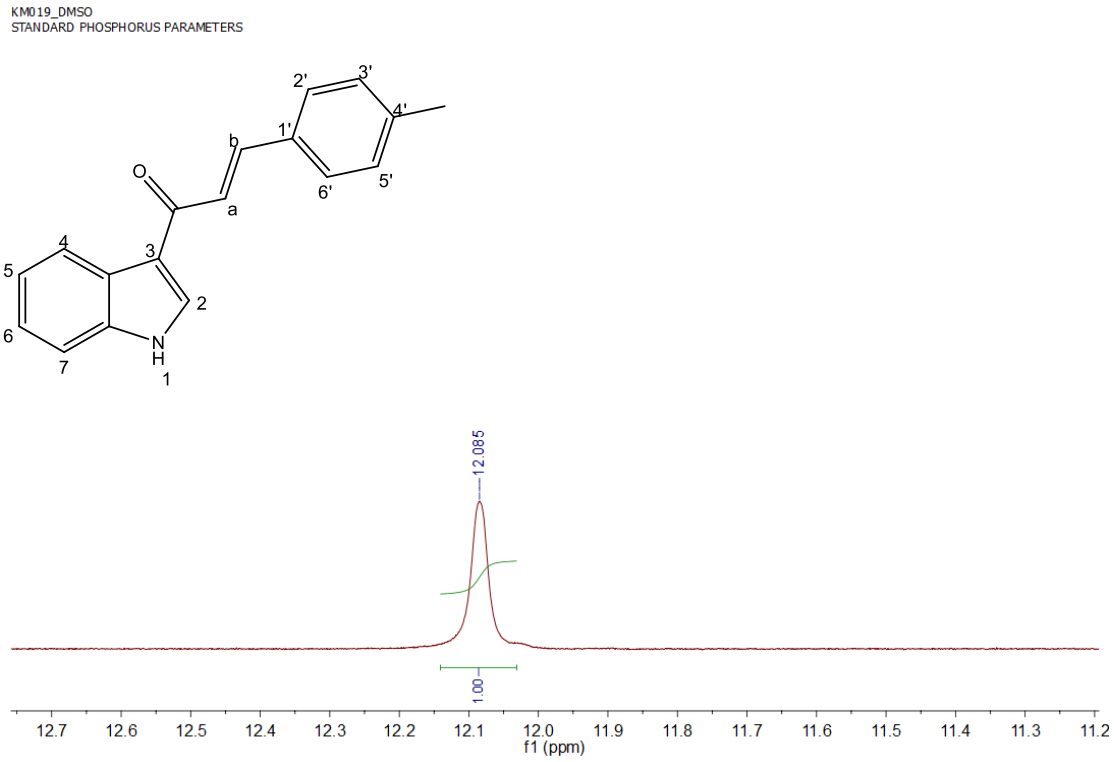
4.2. Γενική μέθοδος σύνθεσης χαλκονών (μέσω βελτιστοποιημένης συνθετικής οδού)

Σύμφωνα με την πειραματική διαδικασία, συντέθηκαν 10 χαλκόνες με διαφορετικούς υποκαταστάτες και αποδόσεις που κυμαίνονταν από 44,2 έως 80,5%. Η καθαρότητα των τελικών προϊόντων ελέγχθηκε μέσω φασματοσκοπίας NMR και FTIR. Ενδεικτικά, παρουσιάζεται ακολούθως η ανάλυση του φάσματος ^{1}H NMR και FTIR για την ένωση (*E*)-1-(1*H*-ινδολ-3-υλ)-3-(p-τολυλ)προπ-2-εν-1-όνη **(3a)**.

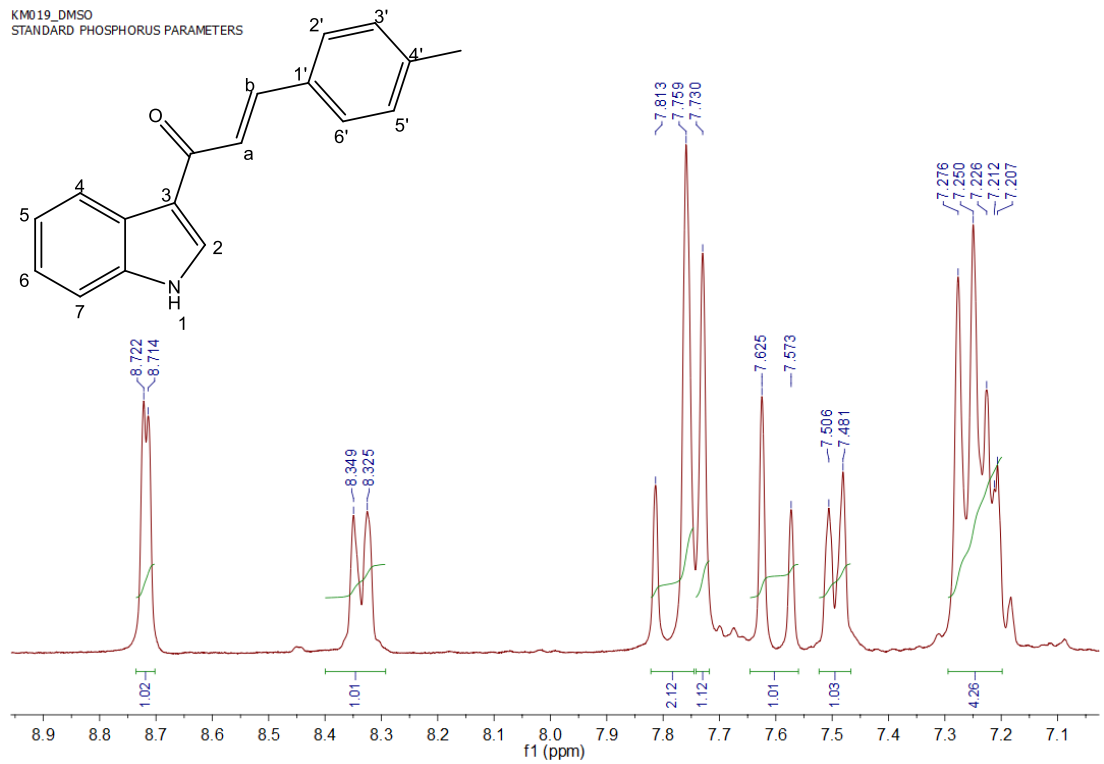
4.2.1. Ανάλυση φάσματος ^{1}H NMR της ένωσης (3a) (*E*)-1-(1*H*-ινδολ-3-υλ)-3-(p-τολυλ)προπ-2-εν1-όνη



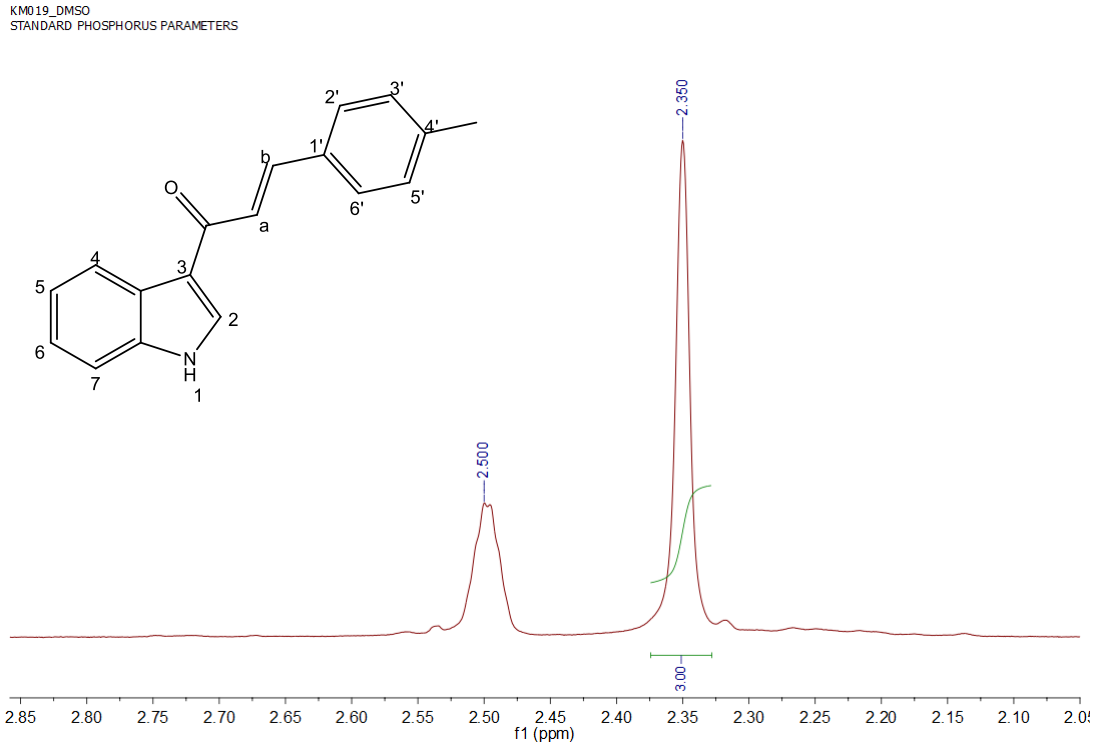
Εικόνα 10. *Φάσμα ^{1}H NMR της (E)-1-(1H-ινδολ-3-υλ)-3-(p-τολυλ)προπ-2-εν-1-όνη* ***(3α)*** *(300 MHz, DMSO, d_6).*



Εικόνα 11. *Φάσμα ^{1}H NMR (σε μεγέθυνση) της (E)-1-(1H-ινδολ-3-υλ)-3-(p-τολυλ)προπ-2-εν-1-όνη* ***(3α)*** *(300 MHz, DMSO, d_6).*



Εικόνα 12. *Φάσμα ^{1}H NMR (σε μεγέθυνση) της (E)-1-(1H-ινδολ-3-υλ)-3-(p-τολυλ)προπ-2-εν-1-όνη* ***(3α)*** *(300 MHz, DMSO, d_6).*



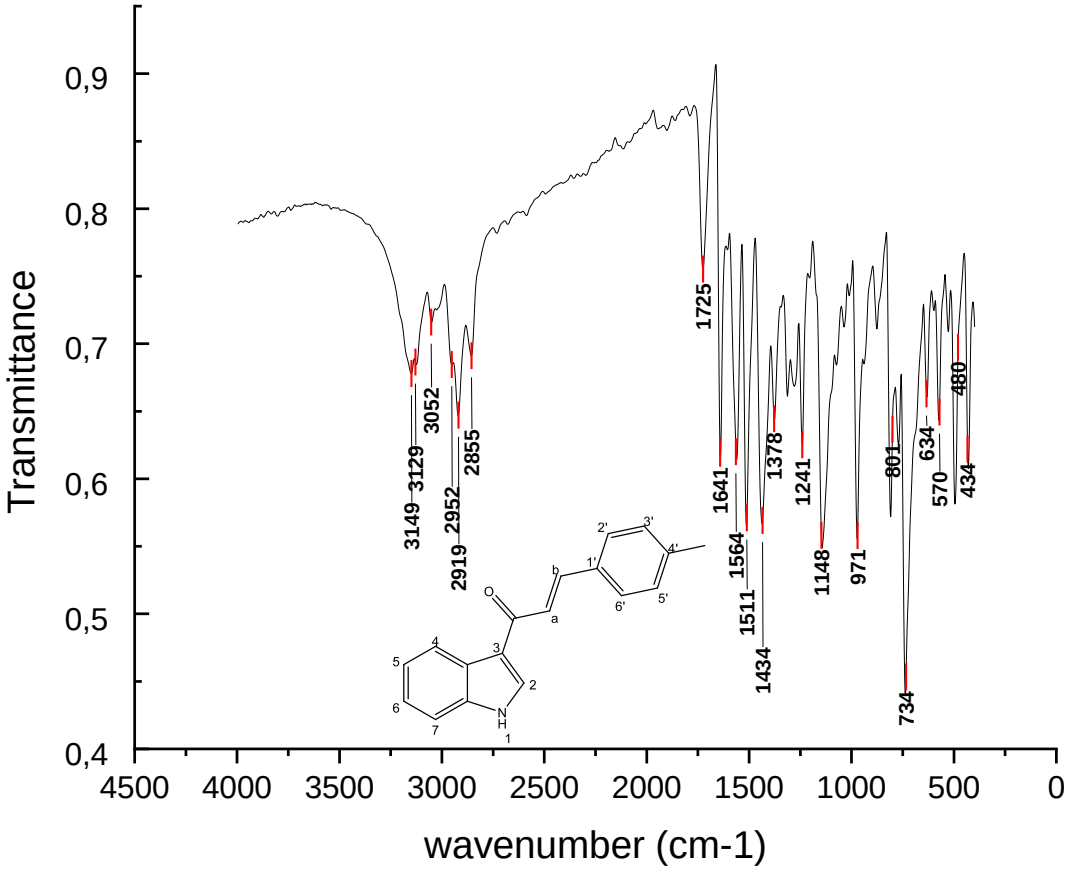
Εικόνα 13. *Φάσμα ^{1}H NMR (σε μεγέθυνση) της (Ε)-1-(1Η-ινδολ-3-υλ)-3-(p-τολυλ)προπ-2-εν-1-όνη* ***(3α)*** *(300 MHz, DMSO, d_6).*

Στα υψηλά πεδία του φάσματος εμφανίζονται τα πρωτόνια της ένωσης, που είναι πιο αποπροστατευμένα λόγω παρουσίας ετεροατόμων που τροποποιούν το χημικό περιβάλλον κοντά στους πυρήνες, ενώ στα χαμηλά πεδία του φάσματος τα πρωτόνια που εμφανίζονται είναι τα πιο προστατευμένα.

Ειδικότερα, στα 12.085 ppm εμφανίζεται μια απλή κορυφή, που ολοκληρώνει για ένα πρωτόνιο και αντιστοιχεί στο πρωτόνιο που είναι ενωμένο με το άζωτο στον πενταμελή δακτύλιο του ινδολίου (**H-1**). Έπειτα, στα 8.718 ppm παρουσιάζεται μια διπλή κορυφή (J=2.4 Hz), όπου συντονίζεται το πρωτόνιο στον άνθρακα του ινδολίου που είναι συνδεδεμένος με το άζωτο (**H-2**), καθώς αλληλεπιδρά με το ανταλλάξιμο πρωτόνιο του αζώτου. Στη συνέχεια, στα 8.337 ppm εμφανίζεται μια διπλή κορυφή (J=7.3 Hz), που ολοκληρώνει για ένα πρωτόνιο του αρωματικού δακτυλίου του ινδολίου δίπλα από τη γέφυρα ανθράκων κοντά στο καρβονύλιο (**H-4**), η οποία προέρχεται από την αλληλεπίδραση με ένα γειτονικό πρωτόνιο. Ακολουθεί στα 7.813-7.730 ppm ένα σύστημα το οποίο παρατηρείται να ολοκληρώνει για τρία πρωτόνια και στην πραγματικότητα αντιστοιχεί σε δύο αθροιζόμενες διπλές κορυφές (J_1=16.3 Hz και J_2=8.7 Hz). Αυτές, αντιστοίχως, προέρχονται από το ένα πρωτόνιο του trans διπλού δεσμού (**H-a**), το οποίο αλληλεπιδρά με ένα πρωτόνιο και από τα δύο πρωτόνια του Β-βενζολικού δακτυλίου (**H-2΄ & H-6΄**), τα οποία είναι ισοδύναμα και αλληλεπιδρούν με τα άλλα δύο ισοδύναμα πρωτόνια του Β-βενζολικού δακτυλίου. Στα 7.599 ppm παρατηρείται μία διπλή κορυφή (J=15.6 Hz) που ολοκληρώνει για ένα πρωτόνιο, το οποίο αντιστοιχεί στο άλλο πρωτόνιο του διπλού δεσμού (**H-b**) που αλληλεπιδρά με ένα γειτονικό πρωτόνιο. Στα 7.494 ppm παρατηρείται μια διπλή κορυφή (J=7.6 Hz)

που ολοκληρώνει για ένα πρωτόνιο του αρωματικού δακτυλίου του ινδολίου δίπλα από τη γέφυρα ανθράκων κοντά στο άζωτο (**H-7**), η οποία προέρχεται από την αλληλεπίδραση με ένα γειτονικό πρωτόνιο. Στο εύρος 7.276-7.207 ppm παρατηρείται μια πολλαπλή κορυφή η οποία αντιστοιχεί στα δύο πρωτόνια του Α-βενζολικού δακτυλίου (**H-5 & H-6**) και στα δύο πρωτόνια του Β-βενζολικού δακτυλίου (**H-3΄ & H-5΄**). Έπειτα, στα 2.350 ppm συντονίζονται τα τρία πρωτόνια του μεθυλίου (-C**H**$_3$), τα οποία εμφανίζονται ως μια απλή κορυφή.

4.2.2. Ανάλυση φάσματος FTIR της ένωσης (3a) (*E*)-1-(1*H*-ινδολ-3-υλ)-3-(p-τολυλ)προπ-2-εν-1-όνη



Εικόνα 14. *Φάσμα FTIR της (E)-1-(1H-ινδολ-3-υλ)-3-(p-τολυλ)προπ-2-εν-1-όνη* ***(3α)***

Παρακάτω παρουσιάζονται οι πιο χαρακτηριστικές κορυφές του φάσματος και τα είδη των δονήσεων στα οποία αυτές αποδίδονται [75]:

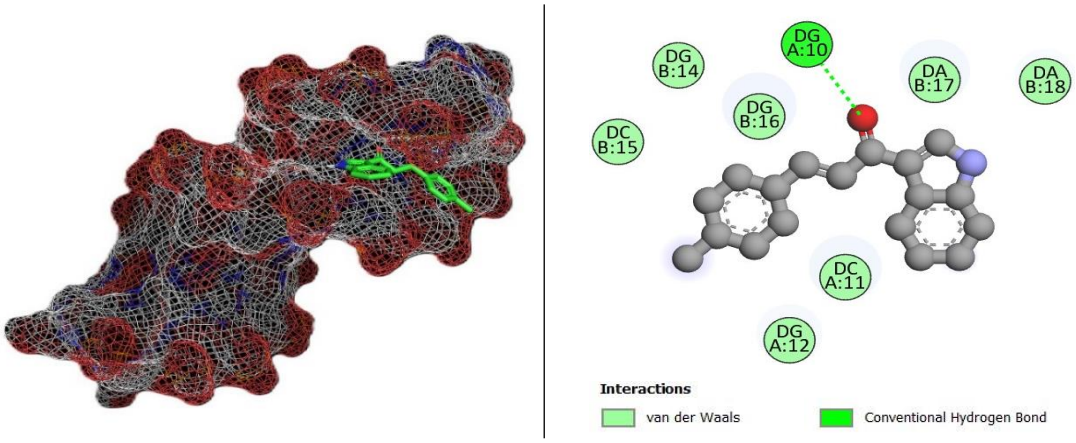
- 3149 cm^{-1} και 3129 cm^{-1}, που αποδίδονται στη δόνηση τάσης του δεσμού N-H
- 1641 cm^{-1}, η οποία αποδίδεται στη δόνηση τάσης της ομάδας του καρβονυλίου C=O
- 1564 cm^{-1}, η οποία αποδίδεται στη δόνηση τάσης του διπλού δεσμού C=C
- 1511 cm^{-1} και 1434 cm^{-1}, που αποδίδονται στις σκελετικές δονήσεις του πυρήνα του ινδολίου, οι οποίες προέρχονται από τη σύζευξη κινήσεων των ατόμων του δακτυλίου
- 1148 cm^{-1}, η οποία αποδίδεται στη δόνηση κάμψης του δεσμού N-H

- 971 cm^{-1}, η οποία αποδίδεται στη δόνηση κάμψης εκτός επιπέδου της ομάδας CH=CH που έχει trans διαμόρφωση υποκαταστατών

4.3. Προσδιορισμός αλληλεπίδρασης με DNA

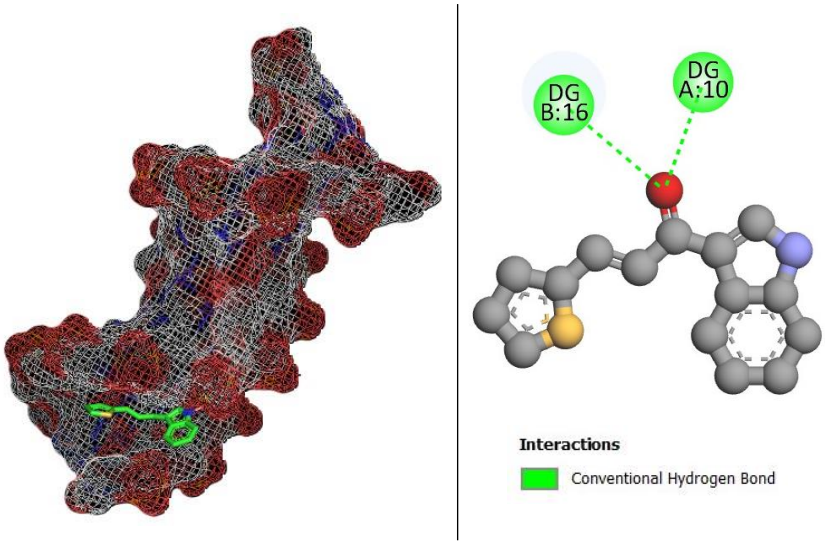
4.3.1. Μελέτη *in silico*

Αρχικά, εξετάστηκε θεωρητικά η αλληλεπίδραση των ενώσεων που συντέθηκαν με το DNA με τη χρήση υπολογιστικών εργαλείων (molecular docking). Ειδικότερα, υπολογίστηκε η ενέργεια αλληλεπίδρασης (binding energy) κάθε μορίου με το DNA και έγινε μια πρόβλεψη του τρόπου σύνδεσης και του είδους των δεσμών που δημιουργούνται. Τα αποτελέσματα αυτά, όπως προέκυψαν από το πρόγραμμα AutoDock Vina, αναλύονται στη συνέχεια.



Εικόνα 15. *Σχηματική απεικόνιση της δέσμευσης της ένωσης* ***(3a)*** *στην κρυσταλλική δομή του DNA (αριστερά) και απεικόνιση των αλληλεπιδράσεων της ένωσης με το DNA (δεξιά).*

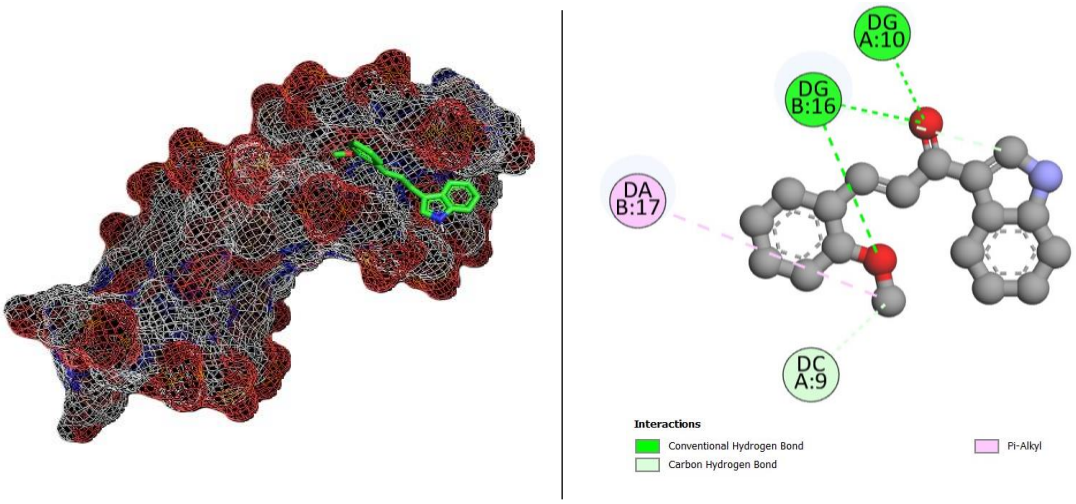
Όσον αφορά την ένωση **(3a)**, με βάση την παραπάνω εικόνα, παρατηρείται ότι πραγματοποιείται σύνδεση στη μικρή αύλακα του DNA και η ενέργεια αλληλεπίδρασης προκύπτει ίση με -7,3 kcal/mol, γεγονός που υποδεικνύει ισχυρή σύνδεση. Επιπλέον, το σύμπλοκο του μορίου με το DNA σταθεροποιείται μέσω μη ομοιοπολικών δεσμών και πιο συγκεκριμένα μέσω αλληλεπιδράσεων van der Waals με νουκλεοτίδια τόσο της Α όσο και της Β αλυσίδας του DNA. Παράλληλα, σχηματίζεται και ένας δεσμός υδρογόνου μεταξύ του οξυγόνου του καρβονυλίου της ένωσης **(3a)** και της γουανίνης που ανήκει στη θέση 10 της Α αλυσίδας του DNA (**εικόνα 15**).



Εικόνα 16. *Σχηματική απεικόνιση της δέσμευσης της ένωσης* ***(3b)*** *στην κρυσταλλική δομή του DNA (αριστερά) και απεικόνιση των αλληλεπιδράσεων της ένωσης με το DNA (δεξιά).*

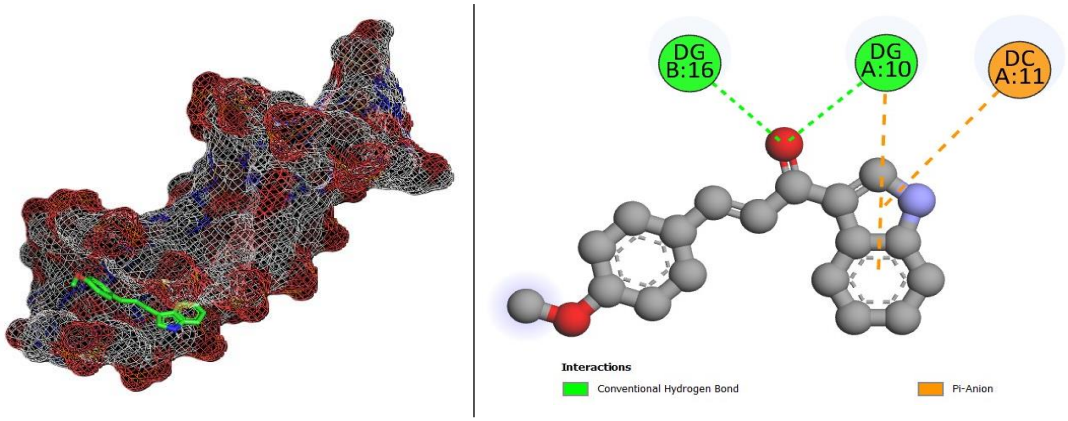
Σχετικά με την ένωση **(3b)**, αυτή πραγματοποιεί σύνδεση στη μικρή αύλακα του DNA και η ενέργεια αλληλεπίδρασης ισούται με -7,0 kcal/mol, υποδεικνύοντας σχετικά ισχυρή σύνδεση. Επιπλέον, φαίνεται ότι μόνο η δημιουργία δεσμών υδρογόνου συμβάλλει στη σταθεροποίηση του συμπλόκου του DNA με την ένωση **(3b)**. Πιο συγκεκριμένα, το οξυγόνο του καρβονυλίου της ινδολικής χαλκόνης σχηματίζει δύο δεσμούς υδρογόνου με δύο γουανίνες, αυτή της θέσης 10 της Α αλυσίδας κι αυτή της θέσης 16 της Β αλυσίδας του DNA (**εικόνα 16**).

Όσον αφορά την ένωση **(3c)**, με βάση την παρακάτω εικόνα (**εικόνα 17**), παρατηρείται ότι πραγματοποιείται σύνδεση στη μικρή αύλακα του DNA και η ενέργεια αλληλεπίδρασης προκύπτει ίση με -7,3 kcal/mol, γεγονός που υποδεικνύει ισχυρή σύνδεση. Πιο συγκεκριμένα, σχηματίζονται δύο δεσμοί υδρογόνου με τις γουανίνες που βρίσκονται στις θέσεις 10 της Α αλυσίδας και 16 της Β αλυσίδας του DNA, αντίστοιχα. Η πρώτη αλληλεπιδρά με το οξυγόνου του καρβονυλίου της **(3c)**, ενώ η δεύτερη με το ίδιο οξυγόνο, καθώς και το οξυγόνο της μεθόξυ-ομάδας (-OCH_3) της ένωσης. Παράλληλα, εμφανίζονται κι άλλοι δεσμοί, όπως είναι ο δεσμός της γουανίνης της θέσης 16 στη Β αλυσίδα του DNA με το υδρογόνο Η-2 του πυρήνα του ινδολίου, καθώς και ο αντίστοιχος δεσμός μεταξύ της κυτοσίνης που βρίσκεται στη θέση 9 της Α αλυσίδας του DNA με υδρογόνο της μεθόξυ-ομάδας (-OCH_3) της ένωσης. Τέλος, το μεθύλιο της ίδιας ομάδας αλληλεπιδρά και με το ηλεκτρονιακό νέφος της αδενίνης που ανήκει στη θέση 17 της Β αλυσίδας του DNA.



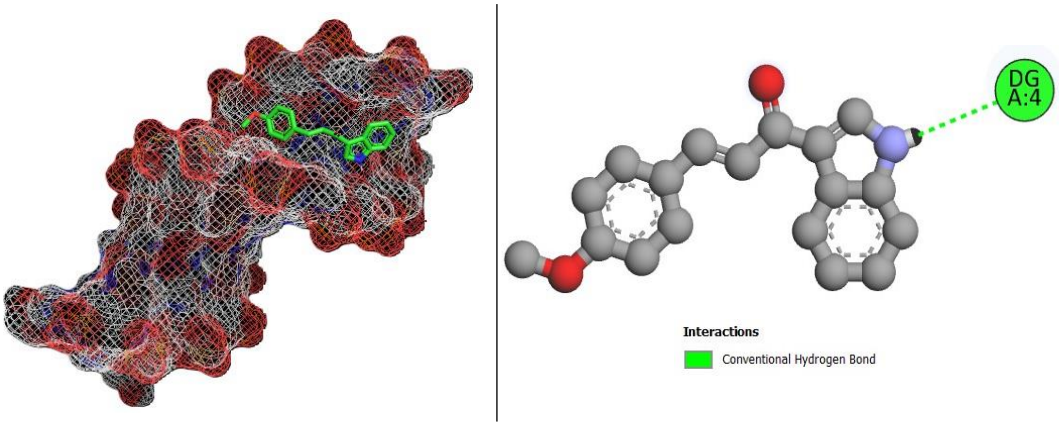
Εικόνα 17. *Σχηματική απεικόνιση της δέσμευσης της ένωσης* ***(3c)*** *στην κρυσταλλική δομή του DNA (αριστερά) και απεικόνιση των αλληλεπιδράσεων της ένωσης με το DNA (δεξιά).*

Σχετικά με την ένωση **(3d)**, αυτή πραγματοποιεί σύνδεση στη μικρή αύλακα του DNA, σε δύο διαφορετικές, εξίσου πιθανές θέσεις, καθώς σε κάθε μία από αυτές η ενέργεια αλληλεπίδρασης ισούται με -7,1 kcal/mol, υποδεικνύοντας ισχυρή σύνδεση. Αυτοί οι τρόποι σύνδεσης αναλύονται στη συνέχεια (**εικόνες 18-19**):



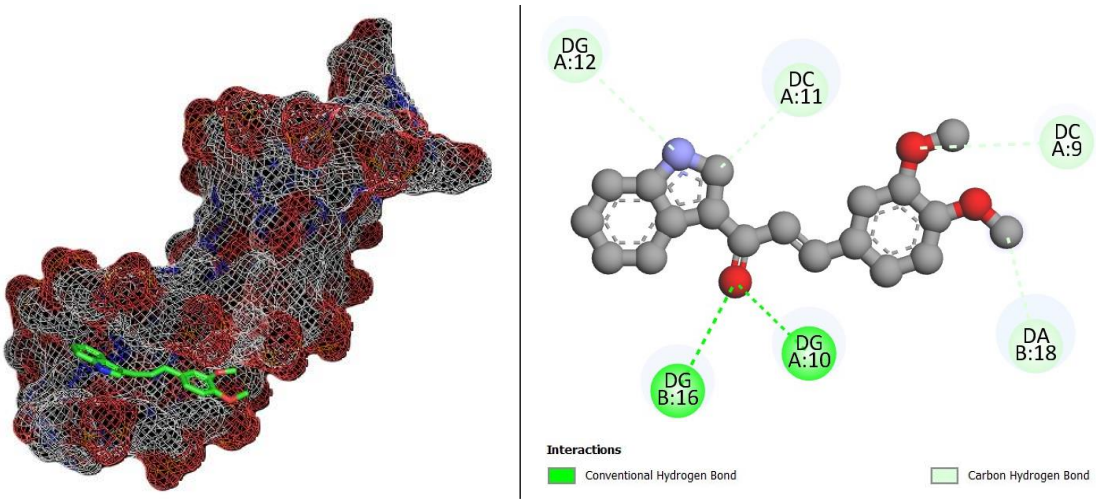
Εικόνα 18. *Σχηματική απεικόνιση της δέσμευσης της ένωσης* ***(3d)*** *στην κρυσταλλική δομή του DNA (αριστερά) και απεικόνιση των αλληλεπιδράσεων της ένωσης με το DNA (δεξιά) για την πρώτη δυνατή θέση.*

Στην πρώτη θέση σύνδεσης (**εικόνα 18**) υπάρχουν δύο είδη δεσμών που σταθεροποιούν το σύμπλοκο της ένωσης **(3d)** με το DNA. Αρχικά, το οξυγόνο του καρβονυλίου της ένωσης σχηματίζει δύο δεσμούς υδρογόνου, έναν με τη γουανίνη της θέσης 16 της Β αλυσίδας του DNA κι έναν με τη γουανίνη που εντοπίζεται στη θέση 10 της Α αλυσίδας του DNA. Ταυτόχρονα, το ανιόν της ίδιας γουανίνης αλληλεπιδρά με το ηλεκτρονιακό νέφος του βενζολικού δακτυλίου του πυρήνα του ινδολίου της ένωσης, ενώ παρόμοια αλληλεπίδραση εμφανίζεται μεταξύ της κυτοσίνης της θέσης 11 της Α αλυσίδας του DNA με τον πενταμελή δακτύλιο του πυρήνα του ινδολίου της **(3d)**.



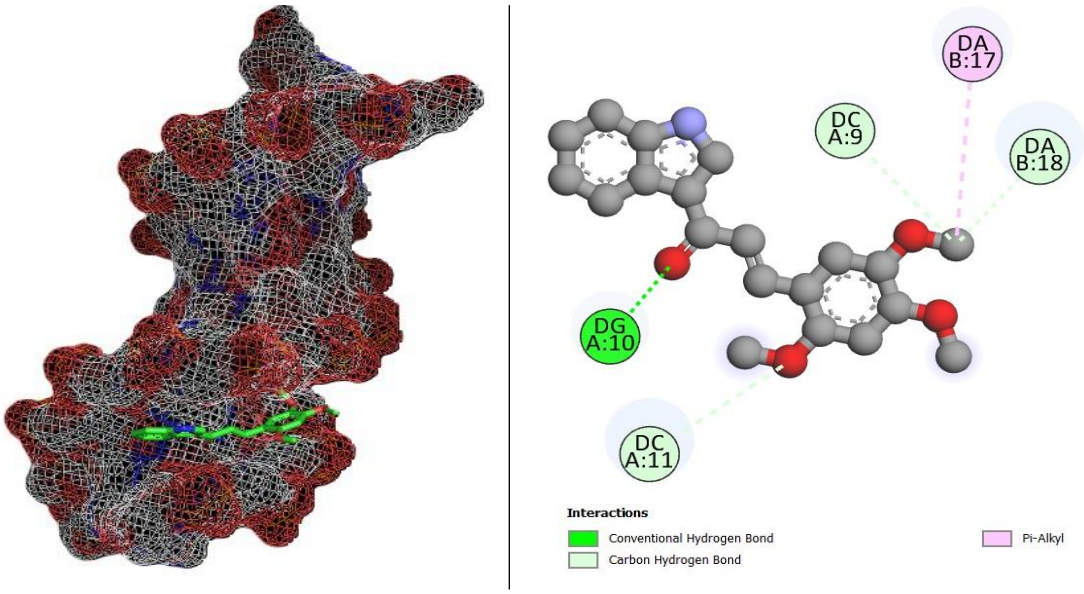
Εικόνα 19. *Σχηματική απεικόνιση της δέσμευσης της ένωσης* ***(3d)*** *στην κρυσταλλική δομή του DNA (αριστερά) και απεικόνιση των αλληλεπιδράσεων της ένωσης με το DNA (δεξιά) για τη δεύτερη δυνατή θέση.*

Όσον αφορά τη δεύτερη θέση σύνδεσης της ένωσης **(3d)** στη μικρή αύλακα του DNA (**εικόνα 19**), αυτή σταθεροποιείται μόνο μέσω ενός μη-ομοιοπολικού δεσμού. Ο δεσμός αυτός είναι δεσμός υδρογόνου, ο οποίος σχηματίζεται μεταξύ του υδρογόνου του αζώτου στον πυρήνα του ινδολίου της ένωσης **(3d)** και της γουανίνης που βρίσκεται στη θέση 4 της Α αλυσίδας του DNA.



Εικόνα 20. *Σχηματική απεικόνιση της δέσμευσης της ένωσης* ***(3e)*** *στην κρυσταλλική δομή του DNA (αριστερά) και απεικόνιση των αλληλεπιδράσεων της ένωσης με το DNA (δεξιά).*

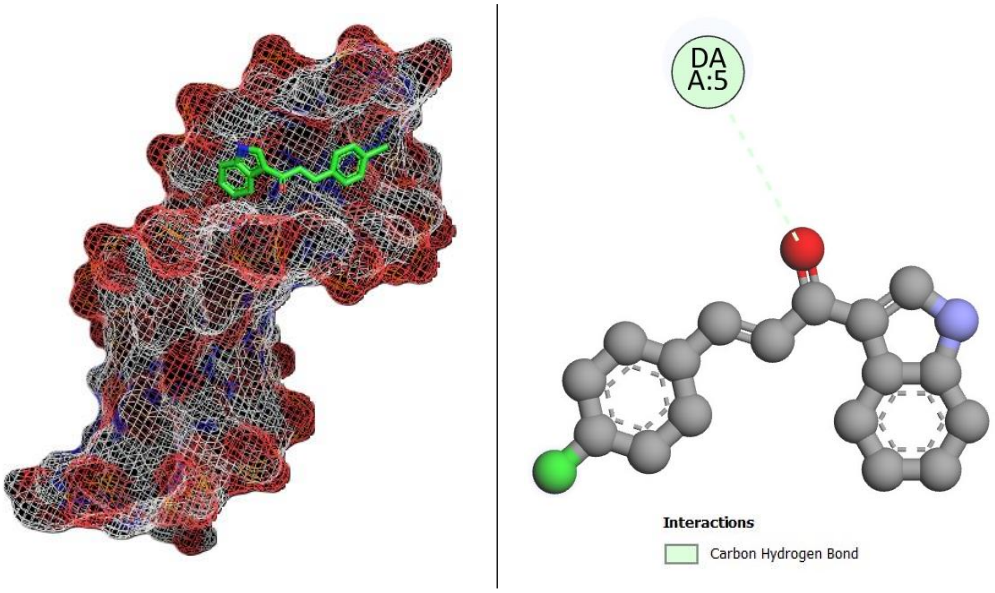
Σχετικά με την ένωση **(3e)**, με βάση την παραπάνω εικόνα (**εικόνα 20**), παρατηρείται ότι πραγματοποιείται σύνδεση στη μικρή αύλακα του DNA και η ενέργεια αλληλεπίδρασης είναι ίση με -7,6 kcal/mol, γεγονός που υποδεικνύει ισχυρή σύνδεση. Επιπλέον, το σύμπλοκο του μορίου με το DNA σταθεροποιείται μέσω μη ομοιοπολικών δεσμών και πιο συγκεκριμένα μέσω δεσμών υδρογόνου συνδεδεμένου σε άνθρακα με νουκλεοτίδια τόσο της Α όσο και της Β αλυσίδας του DNA. Παράλληλα, σχηματίζονται και δύο δεσμοί υδρογόνου μεταξύ του οξυγόνου του καρβονυλίου της ένωσης **(3e)** και δύο νουκλεοτιδίων γουανίνης, που ανήκουν στις θέσεις 16 της Β αλυσίδας και 10 της Α αλυσίδας του DNA, αντίστοιχα.



Εικόνα 21. *Σχηματική απεικόνιση της δέσμευσης της ένωσης* ***(3f)*** *στην κρυσταλλική δομή του DNA (αριστερά) και απεικόνιση των αλληλεπιδράσεων της ένωσης με το DNA (δεξιά).*

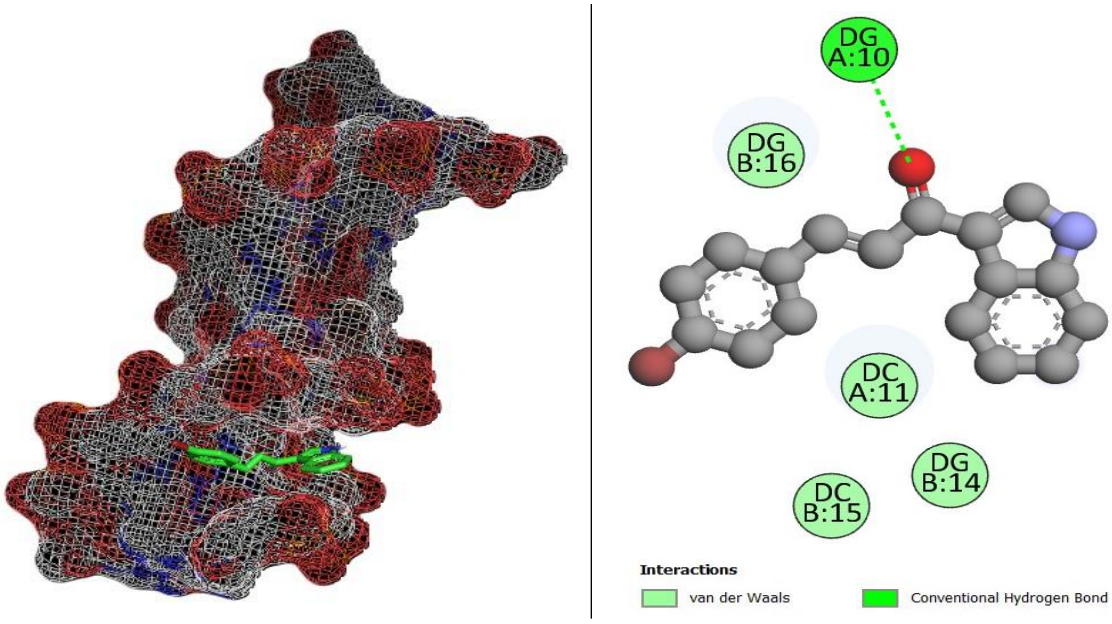
Παρατηρείται ότι η ένωση **(3f)** πραγματοποιεί κι αυτή σύνδεση στη μικρή αύλακα του DNA και η ενέργεια αλληλεπίδρασης ισούται με -7,8 kcal/mol, γεγονός που υποδεικνύει ισχυρή σύνδεση (**εικόνα 21**). Επίσης, το σύμπλοκο του μορίου με το DNA σταθεροποιείται μέσω μη ομοιοπολικών δεσμών και ειδικότερα μέσω δεσμών υδρογόνου συνδεδεμένου σε άνθρακα με νουκλεοτίδια της Α και της Β αλυσίδας του DNA. Ταυτόχρονα, σχηματίζεται ένας δεσμός υδρογόνου μεταξύ του οξυγόνου του καρβονυλίου της ένωσης **(3f)** και της γουανίνης της θέσης 10 της Α αλυσίδας του DNA, ενώ ένα μεθύλιο της μεθόξυ-ομάδας (-OCH_3) αλληλεπιδρά με το ηλεκτρονιακό νέφος της αδενίνης της θέσης 17 της Β αλυσίδας του DNA.

Σχετικά με την ένωση **(3g)**, με βάση την παρακάτω εικόνα (**εικόνα 22**), παρατηρείται ότι πραγματοποιείται σύνδεση στη μικρή αύλακα του DNA και η ενέργεια αλληλεπίδρασης προκύπτει ίση με -7,0 kcal/mol, γεγονός που υποδεικνύει σχετικά ισχυρή σύνδεση. Το σύμπλοκο της ένωσης **(3g)** με το DNA σταθεροποιείται μόνο μέσω ενός δεσμού, ο οποίος σχηματίζεται μεταξύ του οξυγόνου του καρβονυλίου της ένωσης κι ενός υδρογόνου συνδεδεμένου σε άνθρακα στην αδενίνη που εντοπίζεται στη θέση 5 της Α αλυσίδας του DNA. Ο δεσμός αυτός είναι ένα είδος δεσμού υδρογόνου, όμως δεν είναι ο συμβατικός δεσμός υδρογόνου, διότι το υδρογόνο που συμμετέχει στο δεσμό δεν είναι ενωμένο με ισχυρά ηλεκτραρνητικό άτομο.



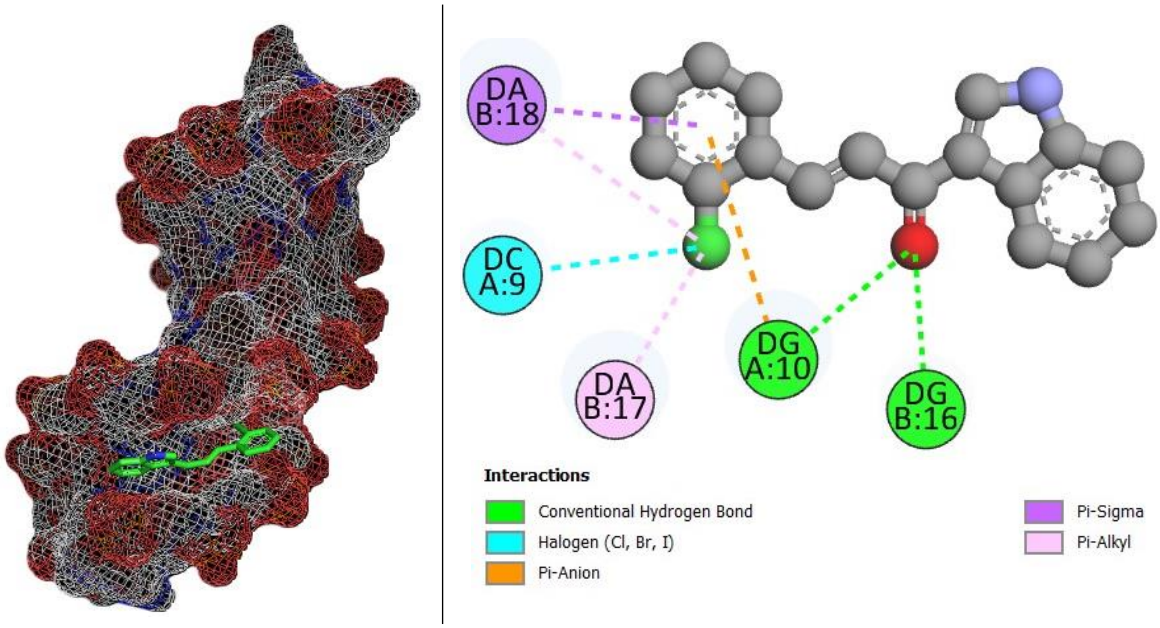
Εικόνα 22. *Σχηματική απεικόνιση της δέσμευσης της ένωσης* ***(3g)*** *στην κρυσταλλική δομή του DNA (αριστερά) και απεικόνιση των αλληλεπιδράσεων της ένωσης με το DNA (δεξιά).*

Με βάση την **εικόνα 23**, είναι εμφανές ότι η ένωση **(3h)** συνδέεται στη μικρή αύλακα του DNA και η ενέργεια αλληλεπίδρασης ισούται με -7,2 kcal/mol, γεγονός που υποδεικνύει ισχυρή σύνδεση. Επιπλέον, το σύμπλοκο του μορίου με το DNA σταθεροποιείται μέσω μη ομοιοπολικών δεσμών και πιο συγκεκριμένα μέσω αλληλεπιδράσεων van der Waals με νουκλεοτίδια τόσο της Α όσο και της Β αλυσίδας του DNA. Παράλληλα, σχηματίζεται και ένας δεσμός υδρογόνου μεταξύ του οξυγόνου του καρβονυλίου της ένωσης **(3h)** και της γουανίνης που ανήκει στη θέση 10 της Α αλυσίδας του DNA.



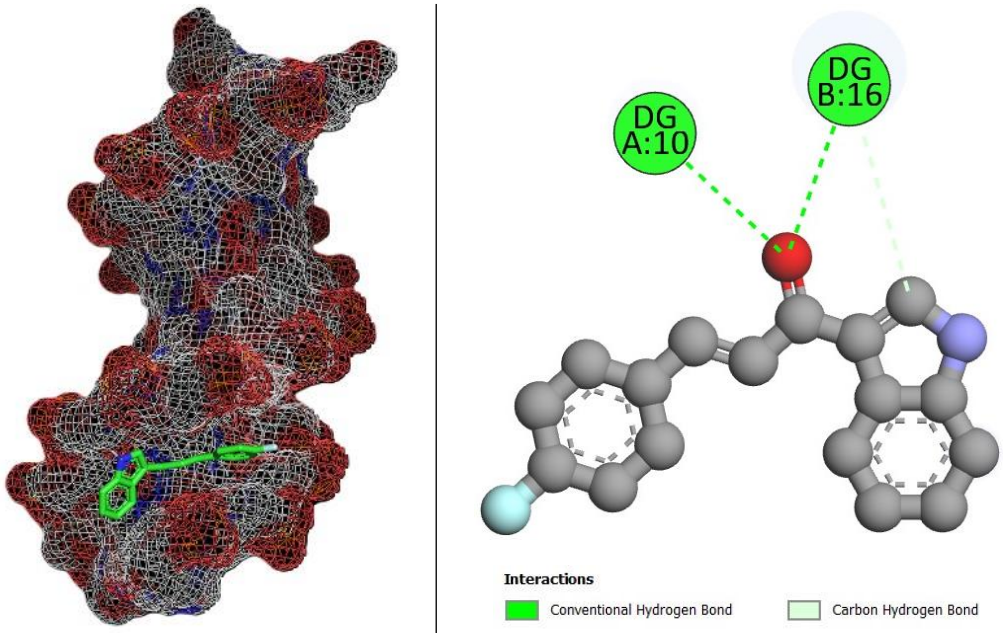
Εικόνα 23. *Σχηματική απεικόνιση της δέσμευσης της ένωσης* ***(3h)*** *στην κρυσταλλική δομή του DNA (αριστερά) και απεικόνιση των αλληλεπιδράσεων της ένωσης με το DNA (δεξιά).*

Όσον αφορά την ένωση **(3i)**, σύμφωνα με την παρακάτω εικόνα (**εικόνα 24**), παρατηρείται ότι πραγματοποιείται σύνδεση στη μικρή αύλακα του DNA και η ενέργεια αλληλεπίδρασης είναι ίση με -7,5 kcal/mol, γεγονός που υποδεικνύει σχετικά ισχυρή σύνδεση. Υπάρχουν διάφορα είδη δεσμών που σταθεροποιούν το σύμπλοκο της ένωσης **(3i)** με το DNA. Πρώτα από όλα, το οξυγόνο του καρβονυλίου της ένωσης σχηματίζει δύο δεσμούς υδρογόνου, έναν με τη γουανίνη της θέσης 16 της Β αλυσίδας κι έναν με τη γουανίνη της θέσης 10 της Α αλυσίδας του DNA. Το ανιόν της ίδιας γουανίνης παρουσιάζει και αλληλεπίδραση με το ηλεκτρονιακό νέφος του Β-βενζολικού δακτυλίου της ένωσης. Παράλληλα, τα π-ηλεκτρόνια αυτού του αρωματικού δακτυλίου αλληλεπιδρούν με σ-ηλεκτρόνια της αδενίνης της θέσης 18 της Β έλικας του DNA. Η αδενίνη αυτή, καθώς και η αδενίνη που βρίσκεται στη θέση 17 της Β αλυσίδας του DNA διαθέτουν αλκυλομάδες, οι οποίες αλληλεπιδρούν με τα π-ηλεκτρόνια του χλωρίου της ένωσης. Τέλος, η κυτοσίνη που εντοπίζεται στη θέση 9 της Α αλυσίδας του DNA παρουσιάζει αλληλεπίδραση με το αλογόνο αυτό.



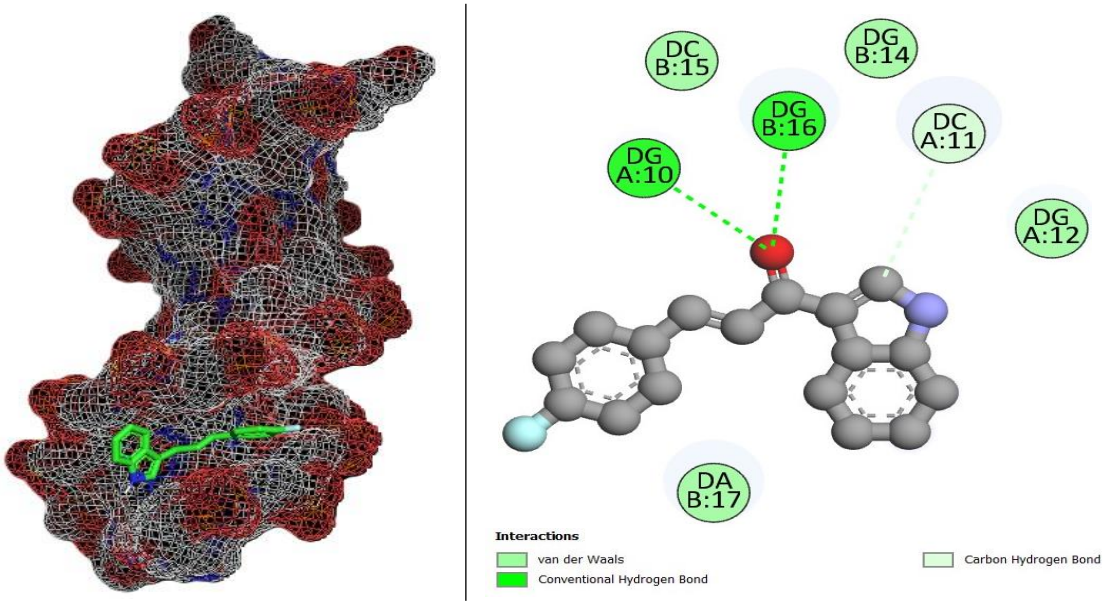
Εικόνα 24. *Σχηματική απεικόνιση της δέσμευσης της ένωσης* ***(3i)*** *στην κρυσταλλική δομή του DNA (αριστερά) και απεικόνιση των αλληλεπιδράσεων της ένωσης με το DNA (δεξιά).*

Σχετικά με την ένωση **(3j)**, αυτή πραγματοποιεί σύνδεση στη μικρή αύλακα του DNA, σε δύο διαφορετικές, εξίσου πιθανές θέσεις, καθώς σε κάθε μία από αυτές η ενέργεια αλληλεπίδρασης ισούται με -7,0 kcal/mol, υποδεικνύοντας σχετικά ισχυρή σύνδεση. Αυτοί οι τρόποι σύνδεσης παρουσιάζονται παρακάτω (**εικόνες 25-26**):



Εικόνα 25. *Σχηματική απεικόνιση της δέσμευσης της ένωσης* ***(3j)*** *στην κρυσταλλική δομή του DNA (αριστερά) και απεικόνιση των αλληλεπιδράσεων της ένωσης με το DNA (δεξιά) για την πρώτη δυνατή θέση.*

Στην πρώτη δυνατή θέση σύνδεσης παρατηρείται ότι το σύμπλοκο της ένωσης **(3j)** με το DNA σταθεροποιείται κυρίως μέσω σχηματισμού δεσμών υδρογόνου (**εικόνα 25**). Αναλυτικότερα, δημιουργούνται δύο δεσμοί υδρογόνου μεταξύ του οξυγόνου του καρβονυλίου της ένωσης με δύο γουανίνες, που βρίσκονται στις θέσεις 10 της Α αλυσίδας και 16 της Β αλυσίδας του DNA, αντίστοιχα. Η τελευταία εξ αυτών σχηματίζει, επίσης, δεσμό και με το υδρογόνο Η-2 της ένωσης **(3j)**.

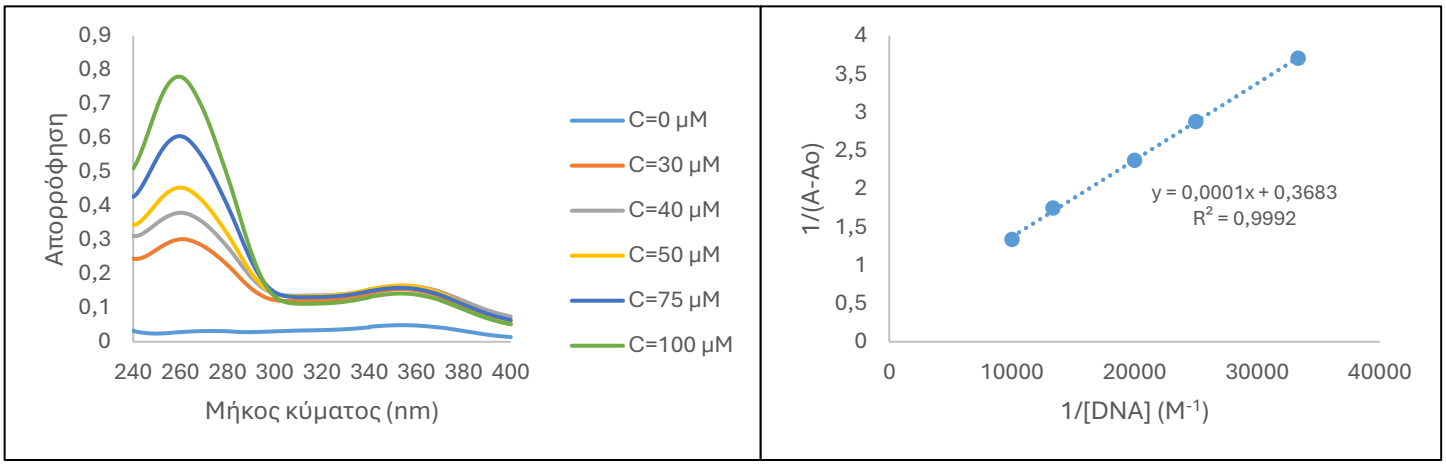


Εικόνα 26. *Σχηματική απεικόνιση της δέσμευσης της ένωσης* ***(3j)*** *στην κρυσταλλική δομή του DNA (αριστερά) και απεικόνιση των αλληλεπιδράσεων της ένωσης με το DNA (δεξιά) για τη δεύτερη δυνατή θέση.*

Στη δεύτερη θέση σύνδεσης (**εικόνα 26**) το σύμπλοκο του μορίου με το DNA σταθεροποιείται μέσω μη ομοιοπολικών δεσμών και πιο συγκεκριμένα μέσω αλληλεπιδράσεων van der Waals με νουκλεοτίδια τόσο της A όσο και της B αλυσίδας του DNA. Ταυτόχρονα, σχηματίζονται δύο δεσμοί υδρογόνου μεταξύ του οξυγόνου του καρβονυλίου της ένωσης με δύο γουανίνες, που βρίσκονται στις θέσεις 10 της A αλυσίδας και 16 της B αλυσίδας του DNA, αντίστοιχα. Επιπρόσθετα, η κυτοσίνη που εντοπίζεται στη θέση 11 της A αλυσίδας του DNA σχηματίζει δεσμό με το υδρογόνο H-2 της ένωσης **(3j)**.

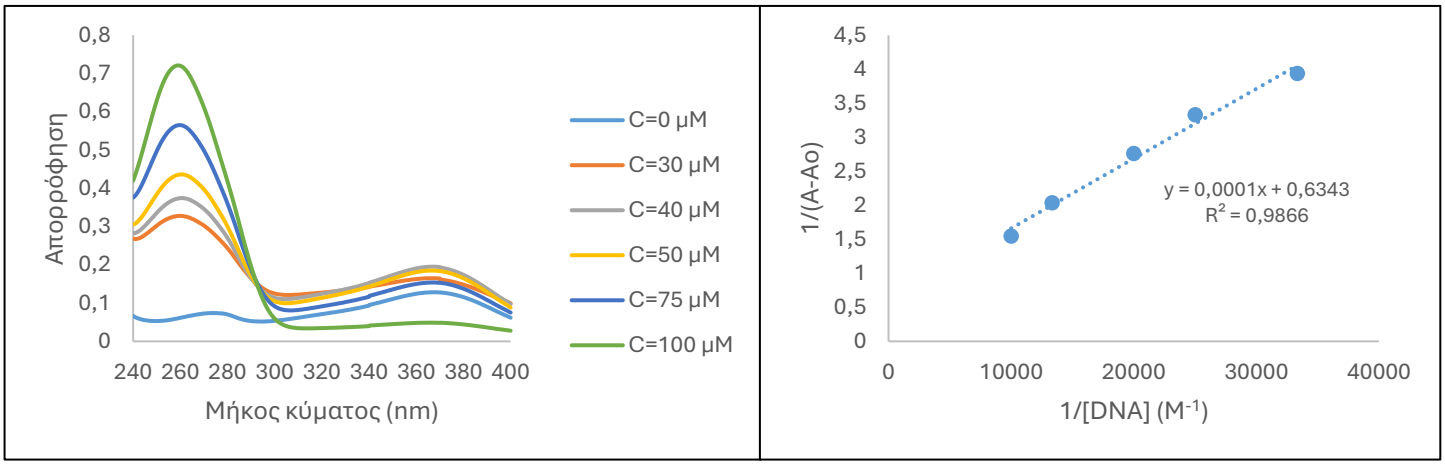
4.3.2. Μελέτη *in vitro*

Παράλληλα, μελετήθηκε πειραματικά η αλληλεπίδραση των συντιθέμενων ενώσεων με το DNA μέσω φωτομέτρησης υπεριώδους-ορατού διαλυμάτων της κάθε ένωσης για διαφορετικές συγκεντρώσεις CT-DNA. Τα φάσματα που προέκυψαν εξετάστηκαν τόσο ως προς τη μεταβολή της έντασης της απορρόφησης (υποχρωμικό ή υπερχρωμικό φαινόμενο) όσο και ως προς τη μεταβολή του μήκους κύματος στο οποίο σημειώνεται η μέγιστη απορρόφηση, λ_{max} (ερυθρή ή κυανή μετατόπιση). Γενικότερα, υποχρωμικό φαινόμενο παρατηρείται όταν με αύξηση της συγκέντρωσης του CT-DNA μειώνεται η ένταση της απορρόφησης, ενώ το αντίθετο χαρακτηρίζεται ως υπερχρωμικό φαινόμενο. Επιπλέον, ερυθρή μετατόπιση ή βαθυχρωμία εμφανίζεται όταν το λ_{max} μετατοπίζεται προς μεγαλύτερα μήκη κύματος, ενώ όταν μετατοπίζεται προς μικρότερα το φαινόμενο ονομάζεται κυανή μετατόπιση ή υψοχρωμία. Συνηθέστερα, η υποχρωμία συνδέεται με αλληλεπίδραση μιας ένωσης με το DNA μέσω παρεμβολής, σε αντίθεση με την υπερχρωμία, η οποία υποδηλώνει ηλεκτροστατική αλληλεπίδραση ή σύνδεση της ένωσης στην αύλακα του DNA. Η κυανή μετατόπιση υποδεικνύει ότι η ένωση αποσταθεροποιεί τη διπλή έλικα του DNA, ενώ αν παρατηρείται ερυθρή μετατόπιση τότε πιθανότατα παρουσία της ένωσης η δομή του DNA σταθεροποιείται. Επομένως, τα φάσματα που ελήφθησαν δίνουν πληροφορίες για το είδος της αλληλεπίδρασης και τη σταθεροποίηση ή μη του DNA. Ταυτόχρονα, μέσω των εξισώσεων (1) και (2) μπορούν να υπολογιστούν η σταθερά σύνδεσης K_b και η ενέργεια σύνδεσης ΔG, αντίστοιχα. Τα αποτελέσματα αναλύονται παρακάτω.



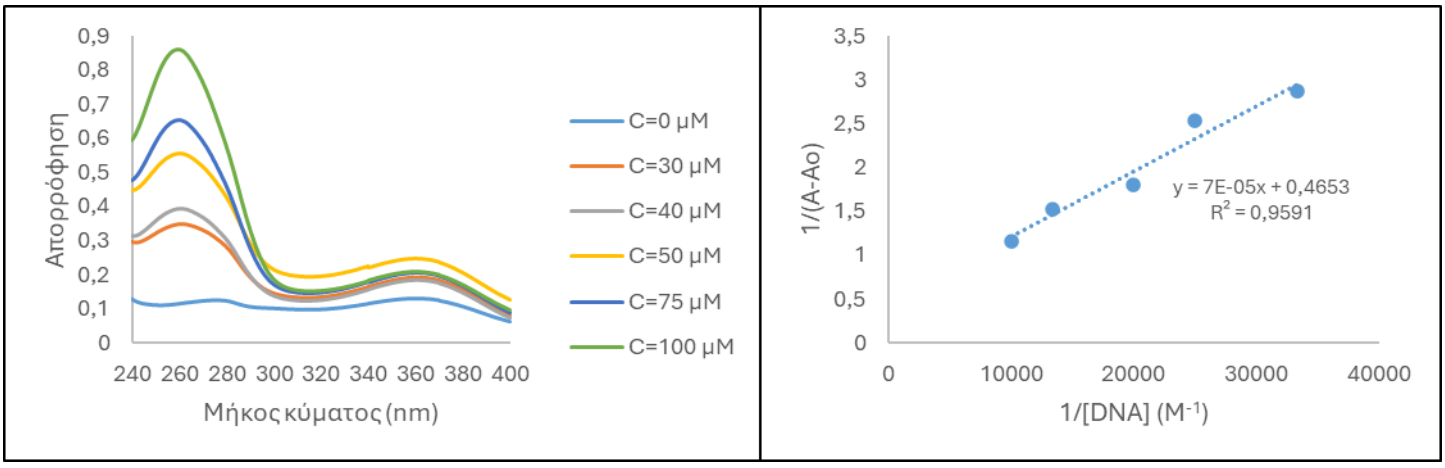
Εικόνα 27. *Φάσμα UV-Vis της ένωσης* ***(3a)*** *σε διαφορετικές συγκεντρώσεις CT-DNA (0-100 μM) (αριστερά) και διάγραμμα του λόγου* $\frac{1}{A-A_0}$ *ως προς το λόγο* $\frac{1}{[DNA]}$ *(δεξιά).*

Σχετικά με την ένωση **(3a)**, είναι εμφανές ότι αύξηση της συγκέντρωσης του DNA οδηγεί σε αυξημένη απορρόφηση του συμπλόκου, επομένως εμφανίζεται το φαινόμενο της υπερχρωμίας. Αυτό υποδεικνύει πως η ένωση **(3a)** συνδέεται στην αύλακα του DNA ή αλληλεπιδρά με αυτό μέσω ηλεκτροστατικών δυνάμεων. Επίσης, παρατηρείται το φαινόμενο της κυανής μετατόπισης, καθώς το λ_{max} μετατοπίζεται προς μικρότερα μήκη κύματος υποδηλώνοντας αποσταθεροποίηση της ελικοειδούς μορφής του DNA. Παράλληλα, από το διάγραμμα του λόγου $\frac{1}{A-A_0}$ ως προς το λόγο $\frac{1}{[DNA]}$ και με χρήση της εξίσωσης (1) είναι δυνατόν να εξαχθεί η τιμή της σταθεράς σύνδεσης K_b, η οποία ισούται με $0{,}37 \cdot 10^4\ M^{-1}$. Επιπρόσθετα, η ενέργεια σύνδεσης με βάση την εξίσωση (2) υπολογίζεται ίση με $\Delta G = -4{,}86$ kcal/mol, οπότε η σύνδεση της ένωσης με το DNA είναι σχετικά ασθενής (**εικόνα 27**).



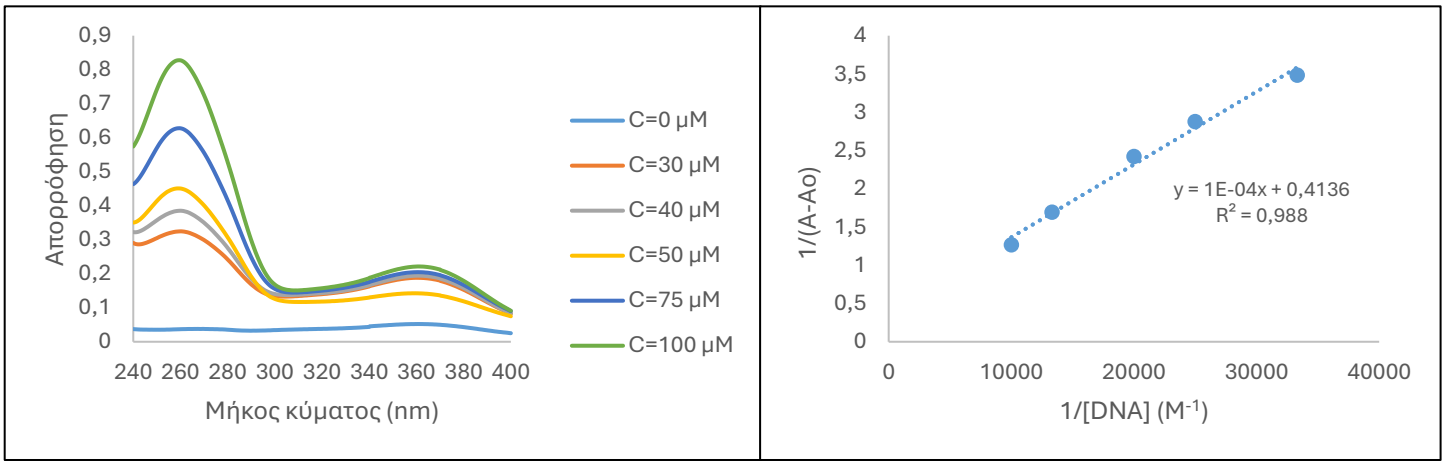
Εικόνα 28. *Φάσμα UV-Vis της ένωσης* ***(3b)*** *σε διαφορετικές συγκεντρώσεις CT-DNA (0-100 μM) (αριστερά) και διάγραμμα του λόγου* $\frac{1}{A-A_0}$ *ως προς το λόγο* $\frac{1}{[DNA]}$ *(δεξιά).*

Όσον αφορά την ένωση **(3b)**, είναι εμφανές ότι αύξηση της συγκέντρωσης του DNA οδηγεί σε αυξημένη απορρόφηση του συμπλόκου, επομένως εμφανίζεται το φαινόμενο της υπερχρωμίας. Αυτό υποδεικνύει πως η ένωση **(3b)** συνδέεται στην αύλακα του DNA ή αλληλεπιδρά με αυτό μέσω ηλεκτροστατικών δυνάμεων. Επιπλέον, παρατηρείται το φαινόμενο της κυανής μετατόπισης, καθώς το λ_{max} μετατοπίζεται προς μικρότερα μήκη κύματος υποδηλώνοντας αποσταθεροποίηση της ελικοειδούς μορφής του DNA. Παράλληλα, από το διάγραμμα του λόγου $\frac{1}{A-A_0}$ ως προς το λόγο $\frac{1}{[DNA]}$ και με χρήση της εξίσωσης (1) είναι δυνατόν να εξαχθεί η τιμή της σταθεράς σύνδεσης K_b, η οποία ισούται με $0{,}62 \cdot 10^4\ M^{-1}$. Τέλος, η ενέργεια σύνδεσης με βάση την εξίσωση (2) υπολογίζεται ίση με $\Delta G = -5{,}17$ kcal/mol, οπότε η σύνδεση της ένωσης με το DNA είναι σχετικά ασθενής (**εικόνα 28**).



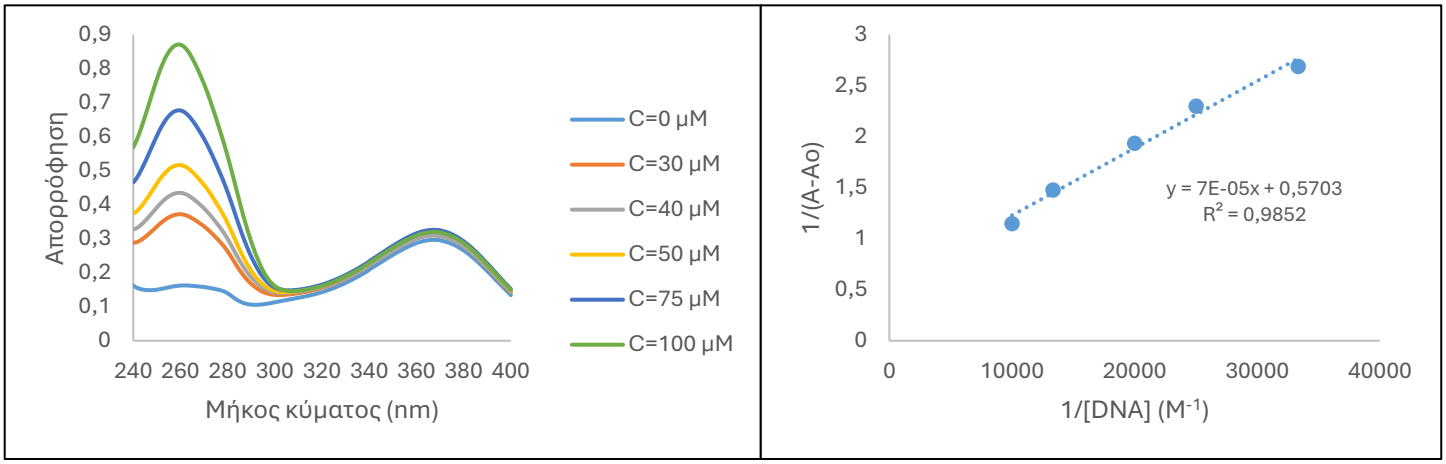
Εικόνα 29. *Φάσμα UV-Vis της ένωσης* ***(3c)*** *σε διαφορετικές συγκεντρώσεις CT-DNA (0-100 μM) (αριστερά) και διάγραμμα του λόγου* $\frac{1}{A-A_0}$ *ως προς το λόγο* $\frac{1}{[DNA]}$ *(δεξιά).*

Είναι εμφανές ότι και στο σύμπλοκο της ένωσης **(3c)** με το DNA αύξηση της συγκέντρωσης του DNA οδηγεί σε αυξημένη απορρόφηση, επομένως εμφανίζεται το φαινόμενο της υπερχρωμίας (**εικόνα 29**). Αυτό υποδεικνύει πως η ένωση **(3c)** συνδέεται στην αύλακα του DNA ή αλληλεπιδρά με αυτό μέσω ηλεκτροστατικών δυνάμεων. Επίσης, παρατηρείται το φαινόμενο της κυανής μετατόπισης, καθώς το λ_{max} μετατοπίζεται προς μικρότερα μήκη κύματος υποδηλώνοντας αποσταθεροποίηση της ελικοειδούς μορφής του DNA. Παράλληλα, από το διάγραμμα του λόγου $\frac{1}{A-A_0}$ ως προς το λόγο $\frac{1}{[DNA]}$ και με χρήση της εξίσωσης (1) είναι δυνατόν να εξαχθεί η τιμή της σταθεράς σύνδεσης K_b, η οποία ισούται με $0{,}63 \cdot 10^4$ M^{-1}. Επιπλέον, η ενέργεια σύνδεσης με βάση την εξίσωση (2) υπολογίζεται ίση με $\Delta G = -5{,}18$ kcal/mol, οπότε η σύνδεση της ένωσης με το DNA είναι σχετικά ασθενής.



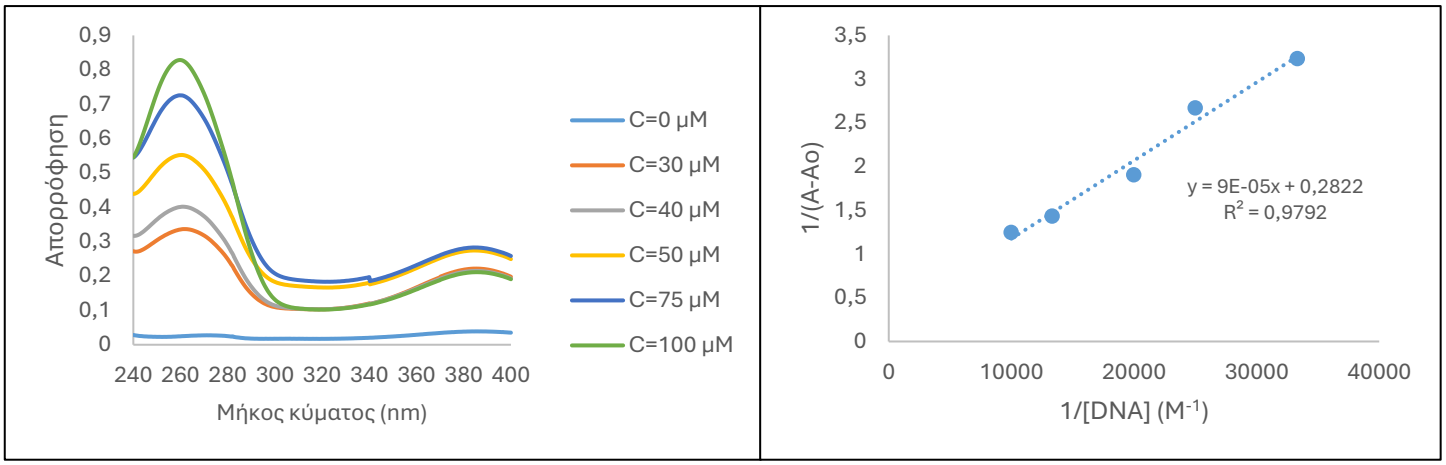
Εικόνα 30. *Φάσμα UV-Vis της ένωσης* ***(3d)*** *σε διαφορετικές συγκεντρώσεις CT-DNA (0-100 μM) (αριστερά) και διάγραμμα του λόγου* $\frac{1}{A-A_0}$ *ως προς το λόγο* $\frac{1}{[DNA]}$ *(δεξιά).*

Σχετικά με την ένωση **(3d)**, είναι εμφανές ότι αύξηση της συγκέντρωσης του DNA οδηγεί σε αυξημένη απορρόφηση του συμπλόκου, επομένως εμφανίζεται το φαινόμενο της υπερχρωμίας (**εικόνα 30**). Αυτό υποδεικνύει πως η ένωση **(3d)** συνδέεται στην αύλακα του DNA ή αλληλεπιδρά με αυτό μέσω ηλεκτροστατικών δυνάμεων. Επίσης, παρατηρείται το φαινόμενο της κυανής μετατόπισης, καθώς το λ_{max} μετατοπίζεται προς μικρότερα μήκη κύματος υποδηλώνοντας αποσταθεροποίηση της ελικοειδούς μορφής του DNA. Παράλληλα, από το διάγραμμα του λόγου $\frac{1}{A-A_0}$ ως προς το λόγο $\frac{1}{[DNA]}$ και με χρήση της εξίσωσης (1) είναι δυνατόν να εξαχθεί η τιμή της σταθεράς σύνδεσης K_b, η οποία ισούται με $0{,}43 \cdot 10^4\ M^{-1}$. Επιπρόσθετα, η ενέργεια σύνδεσης με βάση την εξίσωση (2) υπολογίζεται ίση με $\Delta G = -4{,}96\ \text{kcal/mol}$, , οπότε η σύνδεση της ένωσης με το DNA είναι σχετικά ασθενής.



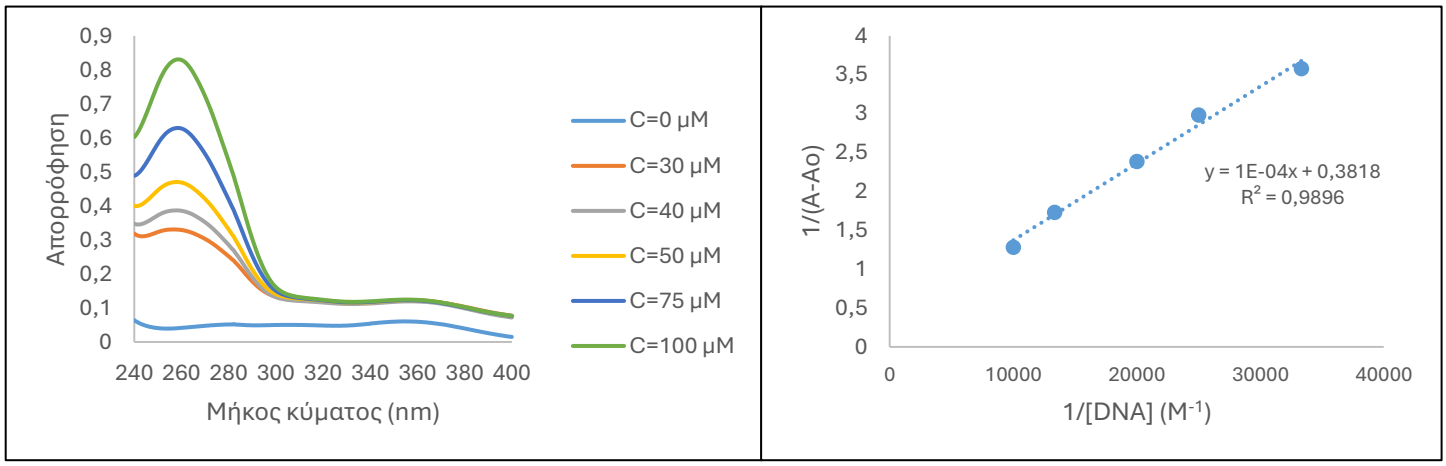
Εικόνα 31. *Φάσμα UV-Vis της ένωσης* ***(3e)*** *σε διαφορετικές συγκεντρώσεις CT-DNA (0-100 μM) (αριστερά) και διάγραμμα του λόγου* $\frac{1}{A-A_0}$ *ως προς το λόγο* $\frac{1}{[DNA]}$ *(δεξιά).*

Όσον αφορά την ένωση **(3e)**, είναι εμφανές ότι αύξηση της συγκέντρωσης του DNA οδηγεί σε αυξημένη απορρόφηση του συμπλόκου, επομένως εμφανίζεται το φαινόμενο της υπερχρωμίας. Αυτό υποδεικνύει πως η ένωση **(3e)** συνδέεται στην αύλακα του DNA ή αλληλεπιδρά με αυτό μέσω ηλεκτροστατικών δυνάμεων (**εικόνα 31**). Επιπλέον, παρατηρείται ότι το λ_{max} παραμένει σχεδόν σταθερό υποδηλώνοντας πως η ένωση αλληλεπιδρά με το DNA μέσω σχετικά ασθενών ηλεκτροστατικών δυνάμεων. Παράλληλα, από το διάγραμμα του λόγου $\frac{1}{A-A_0}$ ως προς το λόγο $\frac{1}{[DNA]}$ και με χρήση της εξίσωσης (1) είναι δυνατόν να εξαχθεί η τιμή της σταθεράς σύνδεσης K_b, η οποία ισούται με $0{,}87 \cdot 10^4\ M^{-1}$. Τέλος, η ενέργεια σύνδεσης με βάση την εξίσωση (2) υπολογίζεται ίση με $\Delta G = -5{,}37\ \text{kcal/mol}$, οπότε η σύνδεση της ένωσης με το DNA είναι σχετικά ασθενής.



Εικόνα 32. *Φάσμα UV-Vis της ένωσης* ***(3f)*** *σε διαφορετικές συγκεντρώσεις CT-DNA (0-100 μM) (αριστερά) και διάγραμμα του λόγου* $\frac{1}{A-A_0}$ *ως προς το λόγο* $\frac{1}{[DNA]}$ *(δεξιά)*

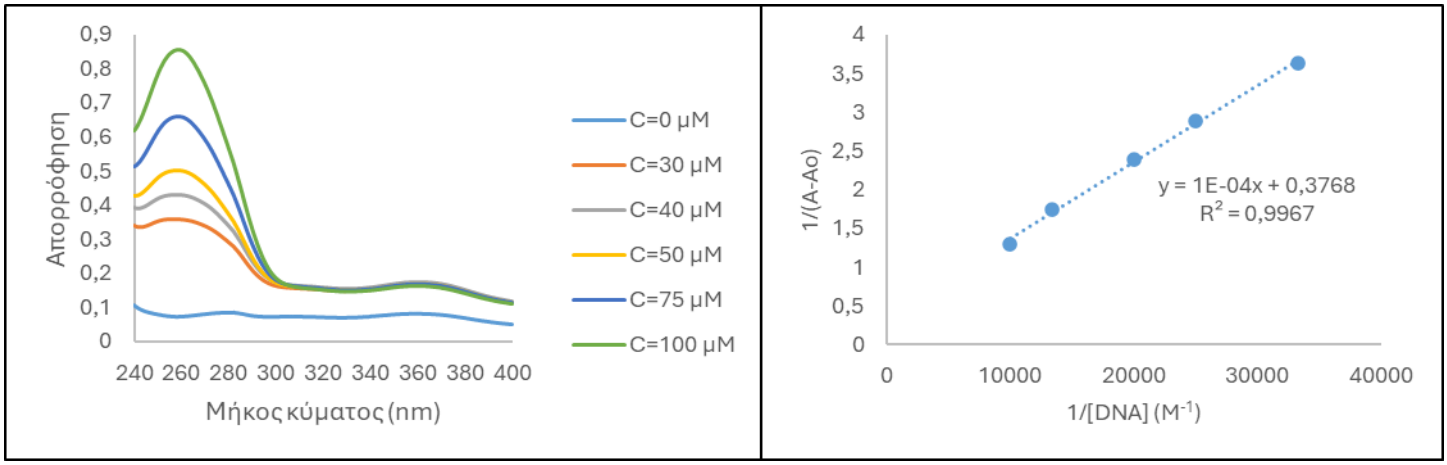
Είναι εμφανές ότι και στο σύμπλοκο της ένωσης **(3f)** με το DNA αύξηση της συγκέντρωσης του DNA οδηγεί σε αυξημένη απορρόφηση, επομένως εμφανίζεται το φαινόμενο της υπερχρωμίας. Αυτό υποδεικνύει πως η ένωση **(3f)** συνδέεται στην αύλακα του DNA ή αλληλεπιδρά με αυτό μέσω ηλεκτροστατικών δυνάμεων (**εικόνα 32**). Επίσης, παρατηρείται το φαινόμενο της κυανής μετατόπισης, καθώς το λ_{max} μετατοπίζεται προς μικρότερα μήκη κύματος υποδηλώνοντας αποσταθεροποίηση της ελικοειδούς μορφής του DNA. Παράλληλα, από το διάγραμμα του λόγου $\frac{1}{A-A_0}$ ως προς το λόγο $\frac{1}{[DNA]}$ και με χρήση της εξίσωσης (1) είναι δυνατόν να εξαχθεί η τιμή της σταθεράς σύνδεσης K_b, η οποία ισούται με $0{,}32 \cdot 10^4$ M^{-1}. Επιπλέον, η ενέργεια σύνδεσης με βάση την εξίσωση (2) υπολογίζεται ίση με $\Delta G = -4{,}77$ kcal/mol, οπότε η σύνδεση της ένωσης με το DNA είναι σχετικά ασθενής.



Εικόνα 33. *Φάσμα UV-Vis της ένωσης* ***(3g)*** *σε διαφορετικές συγκεντρώσεις CT-DNA (0-100 μM) (αριστερά) και διάγραμμα του λόγου* $\frac{1}{A-A_0}$ *ως προς το λόγο* $\frac{1}{[DNA]}$ *(δεξιά).*

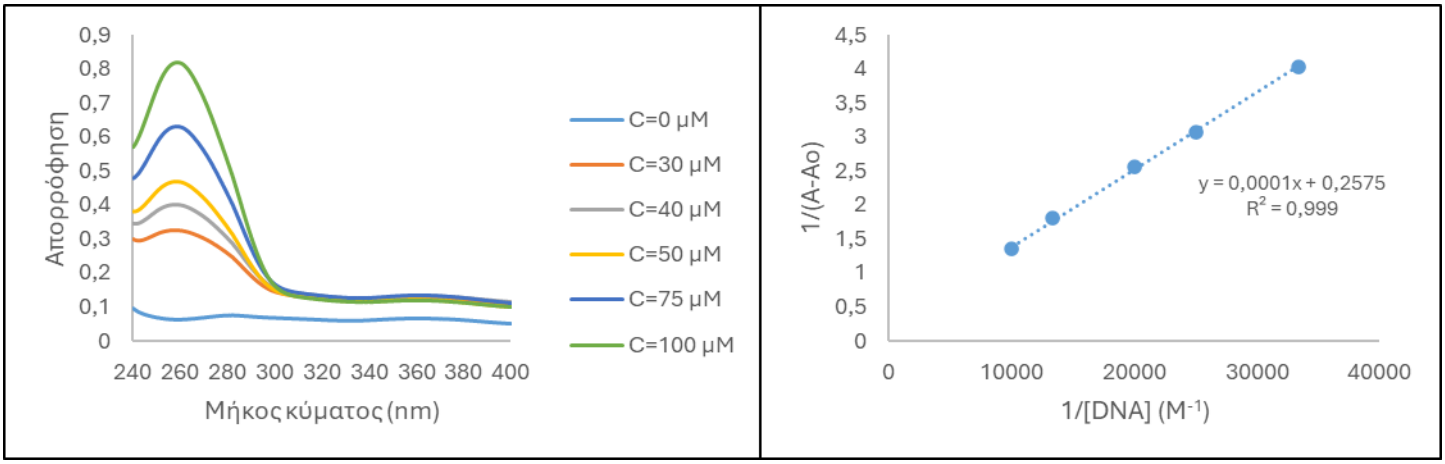
Σχετικά με την ένωση **(3g)**, είναι εμφανές ότι αύξηση της συγκέντρωσης του DNA οδηγεί σε αυξημένη απορρόφηση του συμπλόκου, επομένως εμφανίζεται το φαινόμενο της υπερχρωμίας. Αυτό υποδεικνύει πως η ένωση **(3g)** συνδέεται στην αύλακα του

DNA ή αλληλεπιδρά με αυτό μέσω ηλεκτροστατικών δυνάμεων. Επίσης, παρατηρείται ότι το λ_{max} παραμένει σχεδόν σταθερό υποδηλώνοντας πως η ένωση αλληλεπιδρά με το DNA μέσω σχετικά ασθενών ηλεκτροστατικών δυνάμεων (**εικόνα 33**). Παράλληλα, από το διάγραμμα του λόγου $\frac{1}{A-A_0}$ ως προς το λόγο $\frac{1}{[DNA]}$ και με χρήση της εξίσωσης (1) είναι δυνατόν να εξαχθεί η τιμή της σταθεράς σύνδεσης K_b, η οποία υπολογίζεται ίση με $0{,}39 \cdot 10^4$ M^{-1}. Επιπρόσθετα, η ενέργεια σύνδεσης με βάση την εξίσωση (2) προκύπτει ίση με $\Delta G = -4{,}89$ kcal/mol, οπότε η σύνδεση της ένωσης με το DNA είναι σχετικά ασθενής.



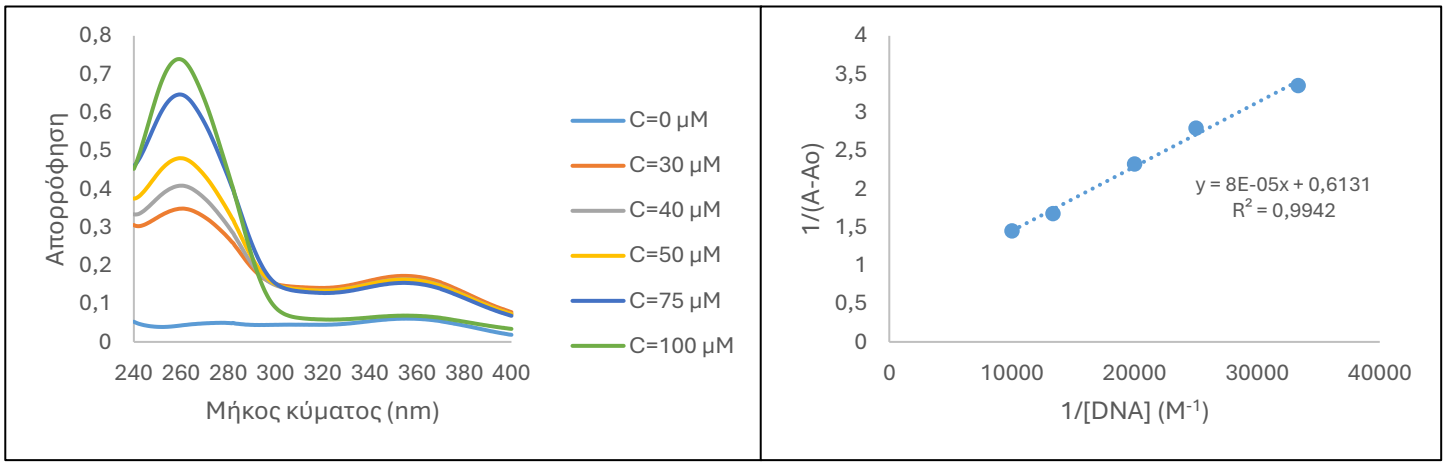
Εικόνα 34. *Φάσμα UV-Vis της ένωσης* ***(3h)*** *σε διαφορετικές συγκεντρώσεις CT-DNA (0-100 μM) (αριστερά) και διάγραμμα του λόγου* $\frac{1}{A-A_0}$ *ως προς το λόγο* $\frac{1}{[DNA]}$ *(δεξιά).*

Όσον αφορά την ένωση **(3h)**, είναι εμφανές ότι αύξηση της συγκέντρωσης του DNA οδηγεί σε αυξημένη απορρόφηση του συμπλόκου, επομένως εμφανίζεται το φαινόμενο της υπερχρωμίας. Αυτό υποδεικνύει πως η ένωση **(3h)** συνδέεται στην αύλακα του DNA ή αλληλεπιδρά με αυτό μέσω ηλεκτροστατικών δυνάμεων (**εικόνα 34**). Επιπλέον, παρατηρείται ότι το λ_{max} παραμένει σχεδόν σταθερό υποδηλώνοντας πως η ένωση αλληλεπιδρά με το DNA μέσω σχετικά ασθενών ηλεκτροστατικών δυνάμεων. Παράλληλα, από το διάγραμμα του λόγου $\frac{1}{A-A_0}$ ως προς το λόγο $\frac{1}{[DNA]}$ και με χρήση της εξίσωσης (1) είναι δυνατόν να εξαχθεί η τιμή της σταθεράς σύνδεσης K_b, η οποία ισούται με $0{,}38 \cdot 10^4$ M^{-1}. Τέλος, η ενέργεια σύνδεσης με βάση την εξίσωση (2) υπολογίζεται ίση με $\Delta G = -4{,}89$ kcal/mol, οπότε η σύνδεση της ένωσης με το DNA είναι σχετικά ασθενής.



Εικόνα 35. *Φάσμα UV-Vis της ένωσης* ***(3i)*** *σε διαφορετικές συγκεντρώσεις CT-DNA (0-100 μM) (αριστερά) και διάγραμμα του λόγου* $\frac{1}{A-A_0}$ *ως προς το λόγο* $\frac{1}{[DNA]}$ *(δεξιά).*

Είναι εμφανές ότι και στο σύμπλοκο της ένωσης **(3i)** με το DNA αύξηση της συγκέντρωσης του DNA οδηγεί σε αυξημένη απορρόφηση, επομένως εμφανίζεται το φαινόμενο της υπερχρωμίας. Αυτό υποδεικνύει πως η ένωση **(3i)** συνδέεται στην αύλακα του DNA ή αλληλεπιδρά με αυτό μέσω ηλεκτροστατικών δυνάμεων (**εικόνα 35**). Επίσης, παρατηρείται ότι το λ_{max} παραμένει σχεδόν σταθερό υποδηλώνοντας πως η ένωση αλληλεπιδρά με το DNA μέσω σχετικά ασθενών ηλεκτροστατικών δυνάμεων. Παράλληλα, από το διάγραμμα του λόγου $\frac{1}{A-A_0}$ ως προς το λόγο $\frac{1}{[DNA]}$ και με χρήση της εξίσωσης (1) είναι δυνατόν να εξαχθεί η τιμή της σταθεράς σύνδεσης K_b, η οποία ισούται με $0{,}23 \cdot 10^4\ M^{-1}$. Επιπλέον, η ενέργεια σύνδεσης με βάση την εξίσωση (2) υπολογίζεται ίση με $\Delta G = -4{,}58\ \text{kcal/mol}$, οπότε η σύνδεση της ένωσης με το DNA είναι σχετικά ασθενής.



Εικόνα 36. *Φάσμα UV-Vis της ένωσης* ***(3j)*** *σε διαφορετικές συγκεντρώσεις CT-DNA (0-100 μM) (αριστερά) και διάγραμμα του λόγου* $\frac{1}{A-A_0}$ *ως προς το λόγο* $\frac{1}{[DNA]}$ *(δεξιά).*

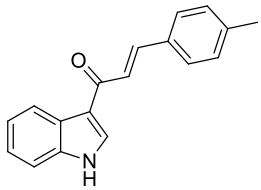
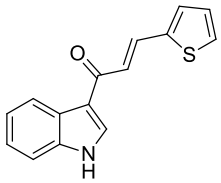
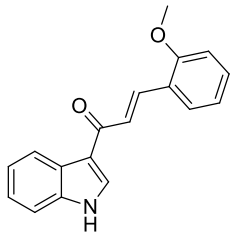
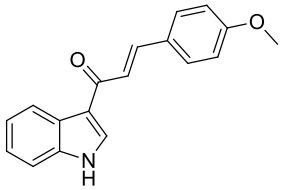
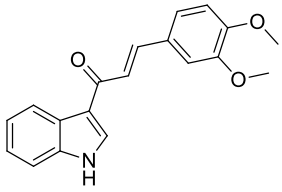
Σχετικά με την ένωση **(3j)**, είναι εμφανές ότι αύξηση της συγκέντρωσης του DNA οδηγεί σε αυξημένη απορρόφηση του συμπλόκου, επομένως εμφανίζεται το φαινόμενο της υπερχρωμίας. Αυτό υποδεικνύει πως η ένωση **(3j)** συνδέεται στην αύλακα του DNA ή αλληλεπιδρά με αυτό μέσω ηλεκτροστατικών δυνάμεων (**εικόνα 36**). Επίσης,

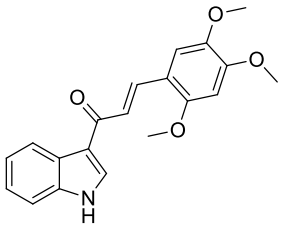
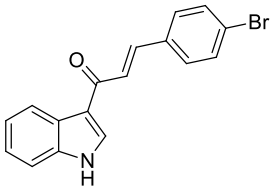
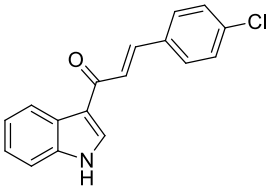
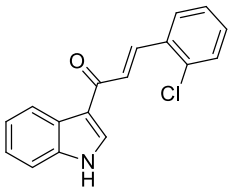
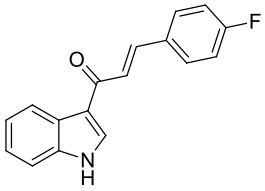
παρατηρείται το φαινόμενο της κυανής μετατόπισης, καθώς το λ_{max} μετατοπίζεται προς μικρότερα μήκη κύματος υποδηλώνοντας αποσταθεροποίηση της ελικοειδούς μορφής του DNA. Παράλληλα, από το διάγραμμα του λόγου $\frac{1}{A-A_0}$ ως προς το λόγο $\frac{1}{[DNA]}$ και με χρήση της εξίσωσης (1) είναι δυνατόν να εξαχθεί η τιμή της σταθεράς σύνδεσης K_b, η οποία ισούται με $0{,}73 \cdot 10^4$ M^{-1}. Επιπρόσθετα, η ενέργεια σύνδεσης με βάση την εξίσωση (2) υπολογίζεται ίση με $\Delta G = -5{,}27$ kcal/mol, οπότε η σύνδεση της ένωσης με το DNA είναι σχετικά ασθενής.

4.3.3. Σύγκριση μεθόδων

Επιπλέον, καθίσταται δυνατή η σύγκριση των αποτελεσμάτων της υπολογιστικής και της πειραματικής μελέτης της αλληλεπίδρασης των συντιθέμενων ενώσεων με το DNA, τα οποία παρουσιάζονται συνοπτικά στον παρακάτω πίνακα:

Πίνακας 7. *Σύγκριση της ενέργειας σύνδεσης ΔG και της σταθεράς σύνδεσης K_b κάθε ένωσης με το DNA, όπως αυτή προκύπτει από in silico και in vitro μελέτη*

Ονομασία	**Δομή χαλκόνης**	**AutoDock 4**		**AutoDock Vina**		***In vitro***	
		ΔG (kcal/mol)	**$K_b \cdot 10^4$ (M^{-1})**	**ΔG (kcal/mol)**	**$K_b \cdot 10^4$ (M^{-1})**	**ΔG (kcal/mol)**	**$K_b \cdot 10^4$ (M^{-1})**
(3a)		-8,97	375,89	-7,3	22,44	-4,86	0,37
(3b)		-8,59	197,93	-7,0	13,52	-5,17	0,62
(3c)		-8,88	322,91	-7,3	22,44	-5,18	0,63
(3d)		-8,91	339,68	-7,1	16,01	-4,96	0,43
(3e)		-9,17	526,81	-7,6	37,23	-5,37	0,87

(3f)		-8,85	306,97	-7,8	52,17	-4,77	0,32
(3g)		-8,98	382,28	-7,0	13,52	-4,89	0,39
(3h)		-9,36	725,98	-7,2	18,95	-4,89	0,38
(3i)		-8,56	188,16	-7,5	31,44	-4,58	0,23
(3j)		-8,26	113,40	-7,0	13,52	-5,27	0,73

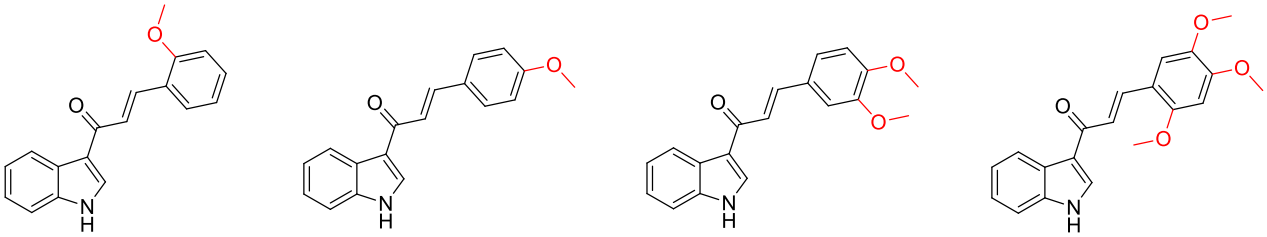
Από τα δεδομένα του παραπάνω πίνακα συμπεραίνεται ότι η ενέργεια σύνδεσης των συντιθέμενων ενώσεων με το DNA προκύπτει μικρότερη από την υπολογιστική μελέτη σε σχέση με αυτή που υπολογίζεται με βάση τα πειραματικά αποτελέσματα. Συνεπώς, η μελέτη *in silico* προβλέπει πιο ισχυρή σύνδεση των ενώσεων με το DNA. Επίσης, μεταξύ των δύο υπολογιστικών προγραμμάτων καθίσταται φανερό ότι το AutoDock Vina παρέχει αποτελέσματα που συμβαδίζουν περισσότερο με αυτά της *in vitro* μελέτης, σε αντίθεση με το AutoDock 4, του οποίου οι προβλέψεις εμφανίζουν μεγαλύτερη απόκλιση με τα πειραματικά αποτελέσματα. Το γεγονός αυτό επιβεβαιώνεται βιβλιογραφικά, καθώς έχει αναφερθεί πως το AutoDock Vina παρέχει πιο έμπιστα αποτελέσματα για μεγαλύτερους στόχους, όπως είναι το DNA, διότι χρησιμοποιεί και εμπειρικά δεδομένα για τους υπολογισμούς του [76], [77].

Αναλυτικότερα, από την υπολογιστική μελέτη αλληλεπίδρασης με το DNA μέσω AutoDock Vina προκύπτει ότι όλες οι ινδολικές χαλκόνες μπορούν να συνδεθούν στη μικρή αύλακα του DNA μέσω μη ομοιοπολικών δεσμών, όπως είναι οι αλληλεπιδράσεις van der Waals και οι δεσμοί υδρογόνου. Το συμπέρασμα αυτό επαληθεύεται από την *in vitro* μελέτη, καθώς η απορρόφηση των συμπλόκων όλων των ενώσεων με το DNA χαρακτηρίζεται από το υπερχρωμικό φαινόμενο, γεγονός που

υποδηλώνει πως οι ενώσεις συνδέονται στην αύλακα του DNA ή αλληλεπιδρούν με αυτό μέσω ηλεκτροστατικών δυνάμεων. Επιπρόσθετα, οι περισσότερες συντιθέμενες χαλκόνες φαίνεται να αποσταθεροποιούν τη διπλή έλικα του DNA κατά τη δέσμευσή τους με αυτό.

4.3.4. Ανάλυση σχέσης δομής-δράσης

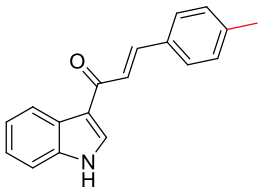
Με βάση τα αποτελέσματα του **Πίνακα 7** είναι δυνατόν να εξαχθούν κάποια συμπεράσματα αναφορικά με τη σχέση δομής-ικανότητας αλληλεπίδρασης των ενώσεων που συντέθηκαν με το DNA. Αρχικά, την ισχυρότερη δέσμευση με το DNA παρουσιάζει η ένωση **(3e)**, η οποία διαθέτει δύο μεθόξυ-ομάδες ως υποκαταστάτες του δακτυλίου Β σε δύο διαδοχικές θέσεις. Γενικότερα, φαίνεται πως η παρουσία τέτοιων ομάδων επηρεάζει σημαντικά την ικανότητα των ενώσεων να αλληλεπιδράσουν με το DNA, καθώς αρκετά καλή σύνδεση με αυτό εμφανίζουν και οι ενώσεις **(3c)** και **(3d)** που διαθέτουν μια μεθόξυ-ομάδα ως υποκαταστάτη. Σημαντικό ρόλο παίζει και η θέση στην οποία βρίσκεται ο υποκαταστάτης, διότι καλύτερη δράση εμφανίζει η ένωση **(3c)**, όπου η μεθόξυ-ομάδα βρίσκεται σε όρθο θέση σε σχέση με την **(3d)** στην οποία βρίσκεται σε πάρα θέση. Ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι η ύπαρξη τριών μεθόξυ-ομάδων ως υποκαταστατών μειώνει σημαντικά την ικανότητα δέσμευσης με το DNA, όπως συμβαίνει στην ένωση **(3f)**.



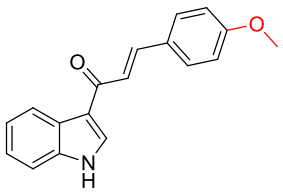
(3c)	**(3d)**	**(3e)**	**(3f)**
ΔG = -5,18 kcal/mol, $K_b = 0{,}63 \cdot 10^4\ M^{-1}$	ΔG = -4,96 kcal/mol, $K_b = 0{,}43 \cdot 10^4\ M^{-1}$	ΔG = -5,37 kcal/mol, $K_b = 0{,}87 \cdot 10^4\ M^{-1}$	ΔG = -4,77 kcal/mol, $K_b = 0{,}32 \cdot 10^4\ M^{-1}$

Εικόνα 37. *Σύγκριση των ενώσεων* ***(3c)****,* ***(3d)****,* ***(3e)*** *και* ***(3f)*** *ως προς την ικανότητα αλληλεπίδρασης με το DNA*

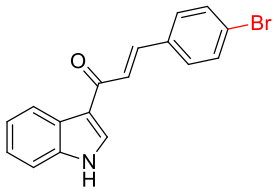
Επιπλέον, καθοριστικό είναι το είδος του υποκαταστάτη σε μία συγκεκριμένη θέση, όπως καθίσταται εμφανές από τις ενώσεις που διαθέτουν διαφορετικό υποκαταστάτη σε πάρα θέση. Αναλυτικότερα, ισχυρότερη δέσμευση με το DNA παρουσιάζει η ένωση **(3j)** που διαθέτει ως υποκαταστάτη το φθόριο έναντι των υπόλοιπων ενώσεων με υποκαταστάτες στην ίδια θέση. Ακολουθεί η ένωση **(3d)** με μεθόξυ-ομάδα σε πάρα θέση, ενώ την αμέσως καλύτερη δράση εμφανίζουν οι ενώσεις **(3g)** και **(3h)**, οι οποίες έχουν ως υποκαταστάτες βρώμιο και χλώριο αντίστοιχα. Τέλος, από αυτή την κατηγορία ενώσεων μικρότερη δράση εμφανίζει η ένωση **(3a)**, με αποτέλεσμα η παρουσία μεθυλίου ως υποκαταστάτη σε πάρα θέση να μην ευνοεί την αλληλεπίδραση με το DNA.



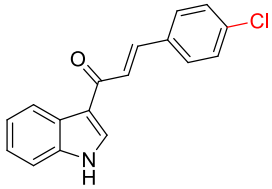
(3a)
ΔG = -4,86 kcal/mol,
$K_b = 0,37 \cdot 10^4\ M^{-1}$



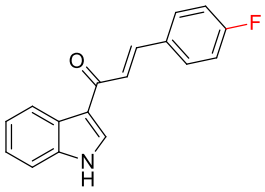
(3d)
ΔG = -4,96 kcal/mol,
$K_b = 0,43 \cdot 10^4\ M^{-1}$



(3g)
ΔG = -4,89 kcal/mol,
$K_b = 0,39 \cdot 10^4\ M^{-1}$



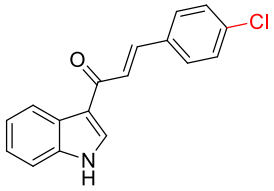
(3h)
ΔG = -4,89 kcal/mol,
$K_b = 0,38 \cdot 10^4\ M^{-1}$



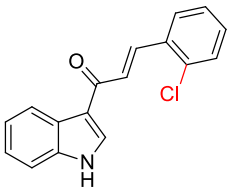
(3j)
ΔG = -5,27 kcal/mol,
$K_b = 0,73 \cdot 10^4\ M^{-1}$

Εικόνα 38. *Σύγκριση των ενώσεων **(3a)**, **(3d)**, **(3g)**, **(3h)** και **(3j)** ως προς την ικανότητα αλληλεπίδρασης με το DNA*

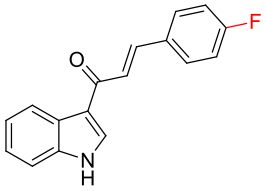
Συγκρίνοντας μόνο τα αλογόνα ως υποκαταστάτες του δακτυλίου Β προκύπτει ότι μικρότερο μέγεθος αλογόνου οδηγεί σε σημαντικά βελτιωμένη δράση, καθώς την ισχυρότερη δέσμευση με το DNA εμφανίζει η ένωση **(3j)** με υποκαταστάτη το φθόριο, έναντι ενώσεων με βρώμιο και χλώριο ως υποκαταστάτες. Επιπρόσθετα, μεταξύ των ενώσεων που έχουν χλώριο στη δομή τους συμπεραίνεται ότι βελτιωμένη δράση παρουσιάζει η ένωση **(3h)** στην οποία το χλώριο βρίσκεται σε πάρα θέση, έναντι της **(3i)** στην οποία είναι σε όρθο θέση. Καταληκτικά, σχετικά ισχυρή δέσμευση με το DNA εμφανίζει η ένωση **(3b)**, στο μόριο της οποίας υπάρχει ένας πενταμελής ετεροκυκλικός δακτύλιος με θείο. Αξίζει να αναφερθεί ότι όλα τα παραπάνω συμπεράσματα προκύπτουν από τα αποτελέσματα της πειραματικής μελέτης αλληλεπίδρασης των συντιθέμενων ενώσεων με το DNA, καθώς είναι πιο αξιόπιστα σε σύγκριση με αυτά της υπολογιστικής μελέτης, η οποία προσφέρει μια πρόβλεψη της ενέργειας σύνδεσης ΔG εμπεριέχοντας αρκετές προσεγγίσεις κατά τον υπολογισμό της.



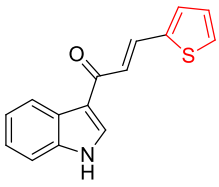
(3h)
ΔG = -4,89 kcal/mol,
$K_b = 0,38 \cdot 10^4\ M^{-1}$



(3i)
ΔG = -4,58 kcal/mol,
$K_b = 0,23 \cdot 10^4\ M^{-1}$



(3j)
ΔG = -5,27 kcal/mol,
$K_b = 0,73 \cdot 10^4\ M^{-1}$

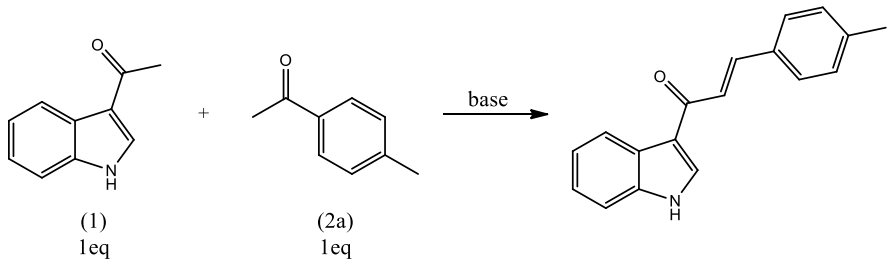


(3b)
ΔG = -5,17 kcal/mol,
$K_b = 0,62 \cdot 10^4\ M^{-1}$

Εικόνα 39*. Σύγκριση των ενώσεων **(3h)**, **(3i)**, **(3j)** και **(3b)** ως προς την ικανότητα αλληλεπίδρασης με το DNA*

5. Σύνοψη – Συμπεράσματα

Στην παρούσα διπλωματική εργασία μελετήθηκε η σύνθεση ινδολικών χαλκονών μέσω της αντίδρασης συμπύκνωσης Claisen-Schmidt μεταξύ της κετόνης του ινδολίου και μιας αλδεΰδης. Πιο συγκεκριμένα, αντίδραση-μοντέλο αποτελεί η αντίδραση ανάμεσα στο 3-ακετυλο-ινδόλιο **(1)** και την 4-μεθυλοβενζαλδεΰδη **(2a)**, όπως απεικονίζεται παρακάτω:



(1) 1eq (2a) 1eq

Ειδικότερα, η αντίδραση-μοντέλο πραγματοποιήθηκε χρησιμοποιώντας διαφορετικές βάσεις (NaOH, KOH, *t*-BuOK), διαφορετικούς διαλύτες (EtOH, *i*-PrOH), καθώς και διαφορετικούς τρόπους θέρμανσης (θερμοκρασία δωματίου, με χρήση αναρροής και με χρήση υπερήχων), με μολαρική αναλογία αντιδρώντων **(1)** και **(2a)** ίση με 1:1 για λόγους οικονομίας ατόμου. Αρχικά, συγκρίνοντας την απόδοση σε προϊόν που προέκυψε για κάθε μία από τις τρεις βάσεις κατά την πραγματοποίηση της αντίδρασης σε θερμοκρασία περιβάλλοντος με διαλύτη EtOH βρέθηκε ότι καλύτερα αποτελέσματα προσφέρει η χρήση της βάσης KOH με απόδοση ίση με 48,2%, ενώ στη χαμηλότερη απόδοση (40,4%) οδηγεί η χρήση της βάσης NaOH. Σημειώνεται ότι ο χρόνος που απαιτείται για την ολοκλήρωση της αντίδρασης σε θερμοκρασία περιβάλλοντος είναι ίσος με 24 h.

Προκειμένου να αυξηθεί η απόδοση της αντίδρασης, εξετάστηκε η επίδραση διαφορετικών τρόπων θέρμανσης (συμβατική με χρήση αναρροής και υπερήχων), καθώς και διαφορετικών διαλυτών (EtOH, *i*-PrOH) σε αυτή. Προέκυψε ότι η χρήση της αιθανόλης ως διαλύτη οδηγεί σε αυξημένη απόδοση αντίδρασης τόσο με χρήση συμβατικής θέρμανσης με αναρροή (60,9%) όσο και με χρήση υπερήχων (55,4%). Όμως, η χρήση συμβατικής θέρμανσης οδηγεί σε ολοκλήρωση της αντίδρασης σε 5 h, έναντι των 20 min με χρήση υπερήχων. Ωστόσο, προτιμάται η συμβατική θέρμανση, διότι η πραγματοποίηση της αντίδρασης με υπερήχους οδηγεί στην παραγωγή πληθώρας παραπροϊόντων, με αποτέλεσμα η διεργασία για τη λήψη καθαρού προϊόντος να καθίσταται πιο δύσκολη και χρονοβόρα. Συνεπώς, οι βέλτιστες συνθήκες διεξαγωγής της αντίδρασης-μοντέλο είναι αυτές στις οποίες χρησιμοποιείται το KOH ως βάση (καταλύτης), EtOH ως διαλύτης και συμβατική θέρμανση με χρήση αναρροής με αναλογία αντιδρώντων 1:1 και αναλογία βάσης 1:3.

Σε μια προσπάθεια γενίκευσης της μεθοδολογίας σύνθεσης ινδολικών χαλκονών, μέσω της βελτιστοποιημένης οδού που προαναφέρθηκε, συντέθηκαν 10 χαλκόνες με χρήση αλδεϋδών με διαφορετικούς υποκαταστάτες (ενώσεις **3a** – **3j**) και αποδόσεις που κυμαίνονταν από 44,2 έως 80,5%. Η καθαρότητα των τελικών προϊόντων ελέγχθηκε μέσω φασματοσκοπίας NMR και FTIR.

Οι συντιθέμενες ινδολικές χαλκόνες εξετάστηκαν ως προς την ικανότητά τους να αλληλεπιδράσουν με το DNA μέσω *in silico* και *in vitro* μελέτης. Από την πρώτη

μέθοδο προέκυψε ότι όλες οι ενώσεις μπορούν να συνδεθούν στη μικρή αύλακα του DNA μέσω μη ομοιοπολικών δεσμών, όπως είναι οι αλληλεπιδράσεις van der Waals και οι δεσμοί υδρογόνου. Αυτό επαληθεύεται από την *in vitro* μελέτη, μέσω της οποίας συμπεραίνεται πως οι ενώσεις συνδέονται στην αύλακα του DNA ή αλληλεπιδρούν με αυτό μέσω ηλεκτροστατικών δυνάμεων. Επιπρόσθετα, οι περισσότερες συντιθέμενες χαλκόνες φαίνεται να αποσταθεροποιούν τη διπλή έλικα του DNA κατά τη δέσμευσή τους με αυτό. Ωστόσο, η υπολογιστική μελέτη φαίνεται να υπερεκτιμά την ισχύ σύνδεσης των ενώσεων με το DNA, με τα αποτελέσματα του AutoDock Vina να έχουν μικρότερη απόκλιση από τα πειραματικά σε σχέση με αυτά του AutoDock 4.

Θεωρώντας πιο αξιόπιστα τα δεδομένα της πειραματικής μελέτης είναι δυνατόν να εξαχθούν κάποια χρήσιμα συμπεράσματα σχετικά με τη σχέση δομής-ικανότητας αλληλεπίδρασης των ενώσεων με το DNA. Αρχικά, την ισχυρότερη δέσμευση με το DNA παρουσιάζει η ένωση **(3e)**, η οποία διαθέτει δύο μεθόξυ-ομάδες ως υποκαταστάτες του δακτυλίου Β σε δύο διαδοχικές θέσεις. Επίσης, αρκετά καλή σύνδεση με αυτό εμφανίζουν και οι ενώσεις **(3c)** και **(3d)** που διαθέτουν μια μεθόξυ-ομάδα ως υποκαταστάτη, με την καλύτερη δράση να παρατηρείται όταν ο υποκαταστάτης αυτός βρίσκεται σε όρθο θέση αντί για πάρα. Όμως, η ύπαρξη τριών μεθόξυ-ομάδων ως υποκαταστατών μειώνει σημαντικά την ικανότητα δέσμευσης με το DNA, όπως συμβαίνει στην ένωση **(3f)**. Συγκρίνοντας διαφορετικούς υποκαταστάτες σε πάρα θέση, προκύπτει ότι καλύτερη δράση παρουσιάζει η ένωση **(3j)** που διαθέτει ως υποκαταστάτη το φθόριο, ακολουθεί η ένωση **(3d)** με μεθόξυ-ομάδα στην ίδια θέση, ενώ την αμέσως καλύτερη δράση εμφανίζουν οι ενώσεις **(3g)** και **(3h)**, οι οποίες έχουν ως υποκαταστάτες βρώμιο και χλώριο αντίστοιχα. Από αυτή την κατηγορία ενώσεων μικρότερη δράση εμφανίζει η ένωση **(3a)**, επομένως η παρουσία μεθυλίου ως υποκαταστάτη σε πάρα θέση δεν ευνοεί την αλληλεπίδραση με το DNA. Αναφορικά με τα αλογόνα ως υποκαταστάτες του δακτυλίου Β προκύπτει ότι μικρότερο μέγεθος αλογόνου οδηγεί σε σημαντικά βελτιωμένη δράση, καθώς η ισχυρότερη σύνδεση με το DNA εμφανίζεται με υποκαταστάτη το φθόριο (**3j**), έναντι βρωμίου και χλωρίου. Επιπρόσθετα, η παρουσία χλωρίου σε πάρα θέση (**3h**) αυξάνει την ισχύ σύνδεσης της ένωσης με το DNA σε σχέση με την όρθο θέση (**3i**). Καταληκτικά, σχετικά ισχυρή δέσμευση με το DNA εμφανίζει η ένωση **(3b)**, στο μόριο της οποίας υπάρχει ένας πενταμελής ετεροκυκλικός δακτύλιος με θείο.

6. Προτάσεις για μελλοντική έρευνα

Αρχικά, είναι δυνατό να μελετηθεί περαιτέρω η αντικαρκινική δράση των συντιθέμενων ινδολικών χαλκονών εκτελώντας μελέτη της δράσης τους σε ζωντανές καρκινικές κυτταρικές σειρές. Επίσης, μπορούν να μελετηθούν κάποιες από τις υπόλοιπες ιδιότητες που συνήθως εμφανίζουν τόσο οι χαλκόνες όσο και ο πυρήνας του ινδολίου, όπως είναι η αντιμικροβιακή και η αντιφλεγμονώδης δράση τους. Με αυτό τον τρόπο είναι πιθανό να βρεθεί κάποιο νέο μόριο-στόχος, χρήσιμο για την ανάπτυξη φαρμάκων.

Επιπλέον, αντικείμενο μελλοντικής έρευνας θα μπορούσε να αποτελέσει ο εγκλεισμός των συντιθέμενων ενώσεων σε νανοσωματίδια και η μελέτη της αποδέσμευσής τους, ώστε να ελεγχθεί εάν με αυτό τον τρόπο βελτιώνεται η δραστικότητά τους.

Επιπρόσθετα, υπάρχουν διάφορες προοπτικές στο κομμάτι της σύνθεσης, καθώς είναι δυνατό να δοκιμαστεί η σύνθεση επιπλέον ινδολικών χαλκονών, είτε χρησιμοποιώντας αλδεΰδες με διαφορετικούς υποκαταστάτες από αυτούς που αναφέρθηκαν είτε χρησιμοποιώντας την αλδεΰδη του ινδολίου και μια πληθώρα κετονών με διαφορετικούς υποκαταστάτες.

Τέλος, οι συντιθέμενες ινδολικές χαλκόνες μπορούν να αποτελέσουν τη βάση για τη σύνθεση νέων πυραζολινών χρησιμοποιώντας το καρβονύλιο των χαλκονών για τη δημιουργία ενός πενταμελούς δακτυλίου που εμπεριέχει δύο άζωτα. Με αυτό τον τρόπο, είναι δυνατό να εξεταστεί αν οι ινδολικές πυραζολίνες εμφανίζουν αυξημένη ή ελλατωμένη ενέργεια σύνδεσης με το DNA και να βρεθεί ο τρόπος σύνδεσής τους με αυτό.

Βιβλιογραφία

[1] S. M. Colegate and R. J. Molyneux, Eds., *Bioactive Natural Products*. CRC Press, 2007. doi: 10.1201/9781420006889.

[2] A. L. Harvey, "Natural products in drug discovery," Oct. 2008. doi: 10.1016/j.drudis.2008.07.004.

[3] D. J. Newman and G. M. Cragg, "Natural Products as Sources of New Drugs over the Nearly Four Decades from 01/1981 to 09/2019," Mar. 27, 2020, *American Chemical Society*. doi: 10.1021/acs.jnatprod.9b01285.

[4] A. G. Atanasov *et al.*, "Natural products in drug discovery: advances and opportunities," Mar. 01, 2021, *Nature Research*. doi: 10.1038/s41573-020-00114-z.

[5] G. W. Gribble, *Indole Ring Synthesis*. Wiley, 2016. doi: 10.1002/9781118695692.

[6] N. Chadha and O. Silakari, "Indoles as therapeutics of interest in medicinal chemistry: Bird's eye view," 2017, *Elsevier Masson s.r.l.* doi: 10.1016/j.ejmech.2017.04.003.

[7] E. G. Brown, "Indoles," in *Ring Nitrogen and Key Biomolecules*, Dordrecht: Springer Netherlands, 1998, pp. 192–207. doi: 10.1007/978-94-011-4906-8_9.

[8] S. M. Umer, M. Solangi, K. M. Khan, and R. S. Z. Saleem, "Indole-Containing Natural Products 2019–2022: Isolations, Reappraisals, Syntheses, and Biological Activities," Nov. 01, 2022, *MDPI*. doi: 10.3390/molecules27217586.

[9] M. Patel, V. Kashaw, A. D. Shivhare, and V. D. Shivhare, "A REVIEW OF ANTI INFLAMMATORY POTENTIAL OF INDOLE AND ITS DERIVATIVES," *Certified Journal | 1040 World Journal of Pharmaceutical Research SJIF Impact Factor 8.084*, vol. 12, pp. 1040–1053, 2023, doi: 10.20959/wjpr20233-27141.

[10] J. H. Lee and J. Lee, "Indole as an intercellular signal in microbial communities," 2010, *Blackwell Publishing Ltd*. doi: 10.1111/j.1574-6976.2009.00204.x.

[11] V. Sharma, P. Kumar, and D. Pathaka, "Biological importance of the indole nucleus in recent years: A comprehensive review," *J Heterocycl Chem*, vol. 47, no. 3, pp. 491–502, May 2010, doi: 10.1002/jhet.349.

[12] H. Plieninger, "The Chemistry of Indoles. Organic Chemistry, a Series of Monographs, Vol. 18. VonR. J. Sundberg. Academic Press, New York–London 1970. 1. Aufl., X, 489 S., s229/—," *Angewandte Chemie*, vol. 83, no. 9, pp. 338–338, May 1971, doi: 10.1002/ange.19710830918.

[13] J. A. Joule, K. Mills, and G. F. Smith, *Heterocyclic Chemistry*. CRC Press, 2020. doi: 10.1201/9781003072850.

[14] S. Biswal *et al.*, "INDOLE: THE MOLECULE OF DIVERSE BIOLOGICAL ACTIVITIES," 2012. [Online]. Available: https://www.researchgate.net/publication/283857931

[15] Y. Wan, Y. Li, C. Yan, M. Yan, and Z. Tang, “Indole: A privileged scaffold for the design of anti-cancer agents,” Dec. 01, 2019, *Elsevier Masson SAS*. doi: 10.1016/j.ejmech.2019.111691.

[16] Y. Yan, X. Li, C. Zhang, L. Lv, B. Gao, and M. Li, “antibiotics Review Research Progress on Antibacterial Activities and Mechanisms of Natural Alkaloids: A Review,” 2021, doi: 10.3390/antibiotics.

[17] M. Z. Zhang, Q. Chen, and G. F. Yang, “A review on recent developments of indole-containing antiviral agents,” 2015, *Elsevier Masson SAS*. doi: 10.1016/j.ejmech.2014.10.065.

[18] E. Shalaby, Ed., *Antioxidants*. IntechOpen, 2019. doi: 10.5772/intechopen.77838.

[19] M. S. Estevão, L. C. Carvalho, L. M. Ferreira, E. Fernandes, and M. M. B. Marques, “Analysis of the antioxidant activity of an indole library: Cyclic voltammetry versus ROS scavenging activity,” *Tetrahedron Lett*, vol. 52, no. 1, pp. 101–106, Jan. 2011, doi: 10.1016/j.tetlet.2010.10.172.

[20] R. Dalpozzo and G. Bartoli, “Bartoli Indole Synthesis,” *Curr Org Chem*, vol. 9, no. 2, pp. 163–178, Jan. 2005, doi: 10.2174/1385272053369204.

[21] G. Bartoli, G. Palmieri, M. Bosco, and R. Dalpozzo, “The reaction of vinyl grignard reagents with 2-substituted nitroarenes: A new approach to the synthesis of 7-substituted indoles,” *Tetrahedron Lett*, vol. 30, no. 16, pp. 2129–2132, Jan. 1989, doi: 10.1016/S0040-4039(01)93730-X.

[22] Aug. Bischler, “Ueber die Entstehung einiger substituirter Indole,” *Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft*, vol. 25, no. 2, pp. 2860–2879, Jul. 1892, doi: 10.1002/cber.189202502123.

[23] R. Möhlau, “Ueber die Einwirkung primärer aromatischer Aminbasen auf Acetophenonbromid,” *Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft*, vol. 14, no. 1, pp. 171–175, Jan. 1881, doi: 10.1002/cber.18810140146.

[24] M. Inman and C. J. Moody, “Indole synthesis – something old, something new,” *Chem. Sci.*, vol. 4, no. 1, pp. 29–41, 2013, doi: 10.1039/C2SC21185H.

[25] “Indoles,” in *Name Reactions in Heterocyclic Chemistry II*, Wiley, 2011, pp. 83–212. doi: 10.1002/9781118092828.ch3.

[26] P. G. Gassman, T. J. Van Bergen, D. P. Gilbert, and B. W. Cue, “General method for the synthesis of indoles,” *J Am Chem Soc*, vol. 96, no. 17, pp. 5495–5508, Aug. 1974, doi: 10.1021/ja00824a028.

[27] H. Hemetsberger and D. Knittel, “Synthese und Thermolyse von α-Azidoacrylestern,” *Monatsh Chem*, vol. 103, no. 1, pp. 194–204, 1972, doi: 10.1007/BF00912944.

[28] R. C. Larock, E. K. Yum, and M. D. Refvik, “Synthesis of 2,3-Disubstituted Indoles via Palladium-Catalyzed Annulation of Internal Alkynes,” *J Org Chem*, vol. 63, no. 22, pp. 7652–7662, Oct. 1998, doi: 10.1021/jo9803277.

[29] A. David Batcho and W. Leimgruber, “U.S. patent 3,976,639,” 1961.

[30] D. I. Bugaenko, A. V. Karchava, and M. A. Yurovskaya, “Synthesis of indoles: recent advances,” *Russian Chemical Reviews*, vol. 88, no. 2, pp. 99–159, Feb. 2019, doi: 10.1070/RCR4844.

[31] F. Dumitrascu and M. A. Ilies, “Recent advances in the Nenitzescu indole synthesis (1990–2019),” 2021, pp. 65–157. doi: 10.1016/bs.aihch.2020.03.001.

[32] G. W. Gribble, “Reissert Indole Synthesis,” in *Indole Ring Synthesis*, Wiley, 2016, pp. 332–337. doi: 10.1002/9781118695692.ch40.

[33] B. E. Aksöz and R. Ertan, “Chemical and Structural Properties of Chalcones I,” 2011.

[34] A. Ullah *et al.*, “Important Flavonoids and Their Role as a Therapeutic Agent,” *Molecules*, vol. 25, no. 22, p. 5243, Nov. 2020, doi: 10.3390/molecules25225243.

[35] C. Zhuang, W. Zhang, C. Sheng, W. Zhang, C. Xing, and Z. Miao, “Chalcone: A Privileged Structure in Medicinal Chemistry,” *Chem Rev*, vol. 117, no. 12, pp. 7762–7810, Jun. 2017, doi: 10.1021/acs.chemrev.7b00020.

[36] M. Rudrapal *et al.*, “Chalcone scaffolds, bioprecursors of flavonoids: Chemistry, bioactivities, and pharmacokinetics,” Dec. 01, 2021, *MDPI*. doi: 10.3390/molecules26237177.

[37] R. Kuber Banoth and A. Thatikonda, “A REVIEW ON NATURAL CHALCONES AN UPDATE,” *Int J Pharm Sci Res*, vol. 11, no. 2, p. 546, 2020, doi: 10.13040/IJPSR.0975-8232.11(2).546-55.

[38] Z. Rozmer and P. Perjési, “Naturally occurring chalcones and their biological activities,” *Phytochemistry Reviews*, vol. 15, no. 1, pp. 87–120, Feb. 2016, doi: 10.1007/s11101-014-9387-8.

[39] A. Rammohan, J. S. Reddy, G. Sravya, C. N. Rao, and G. V. Zyryanov, “Chalcone synthesis, properties and medicinal applications: a review,” Mar. 01, 2020, *Springer*. doi: 10.1007/s10311-019-00959-w.

[40] M. N. Gomes *et al.*, “Chalcone derivatives: Promising starting points for drug design,” Aug. 01, 2017, *MDPI AG*. doi: 10.3390/molecules22081210.

[41] Y. Ouyang, J. Li, X. Chen, X. Fu, S. Sun, and Q. Wu, “Chalcone derivatives: Role in anticancer therapy,” Jun. 01, 2021, *MDPI AG*. doi: 10.3390/biom11060894.

[42] H. ur Rashid, Y. Xu, N. Ahmad, Y. Muhammad, and L. Wang, “Promising anti-inflammatory effects of chalcones via inhibition of cyclooxygenase, prostaglandin E 2 , inducible NO synthase and nuclear factor κb activities,” Jun. 01, 2019, *Academic Press Inc.* doi: 10.1016/j.bioorg.2019.03.033.

[43] T. Nawaz, A. Tajammal, and A. W. Qurashi, “Chalcones As Broad-Spectrum Antimicrobial Agents: A Comprehensive Review And Analysis Of Their Antimicrobial Activities,” Dec. 05, 2023, *John Wiley and Sons Inc*. doi: 10.1002/slct.202302798.

[44] D. K. Mahapatra, V. Asati, and S. K. Bharti, “Chalcones and their therapeutic targets for the management of diabetes: Structural and pharmacological

perspectives," Mar. 06, 2015, *Elsevier Masson SAS*. doi: 10.1016/j.ejmech.2015.01.051.

[45] A. Mittal, V. K. Vashistha, and D. K. Das, "Recent advances in the antioxidant activity and mechanisms of chalcone derivatives: a computational review," 2022, *Taylor and Francis Ltd.* doi: 10.1080/10715762.2022.2120396.

[46] G. Kamya, K. Rajwinder, G. Anju, and A. Rajendra, "Chalcones: A review on synthesis and pharmacological activities," *J Appl Pharm Sci*, Mar. 2021, doi: 10.7324/JAPS.2021.11s101.

[47] M. Selepe and F. Van Heerden, "Application of the Suzuki-Miyaura Reaction in the Synthesis of Flavonoids," *Molecules*, vol. 18, no. 4, pp. 4739–4765, Apr. 2013, doi: 10.3390/molecules18044739.

[48] A. Kumar, S. Sharma, V. D. Tripathi, and S. Srivastava, "Synthesis of chalcones and flavanones using Julia–Kocienski olefination," *Tetrahedron*, vol. 66, no. 48, pp. 9445–9449, Nov. 2010, doi: 10.1016/j.tet.2010.09.089.

[49] C. Xu, G. Chen, and X. Huang, "CHALCONES BY THE WITTIG REACTION OF A STABLE YLIDE WITH ALDEHYDES UNDER MICROWAVE IRRADIATION," *Org Prep Proced Int*, vol. 27, no. 5, pp. 559–561, Oct. 1995, doi: 10.1080/00304949509458500.

[50] M. A. Shalaby, S. A. Rizk, and A. M. Fahim, "Synthesis, reactions and application of chalcones: a systematic review," *Org Biomol Chem*, vol. 21, no. 26, pp. 5317–5346, 2023, doi: 10.1039/D3OB00792H.

[51] F. A. Badria *et al.*, "Anticancer Indole-Based Chalcones: A Structural and Theoretical Analysis," *Molecules*, vol. 24, no. 20, p. 3728, Oct. 2019, doi: 10.3390/molecules24203728.

[52] M. Jumaah *et al.*, "Design, synthesis, characterization and cytotoxic activity of new ortho-hydroxy and indole-chalcone derivatives against breast cancer cells (MCF-7)," *Medicinal Chemistry Research*, vol. 31, no. 3, pp. 517–532, Mar. 2022, doi: 10.1007/s00044-021-02834-2.

[53] J. Kode *et al.*, "Synthesis, biological evaluation, and molecular docking analysis of phenstatin based indole linked chalcones as anticancer agents and tubulin polymerization inhibitors," *Bioorg Chem*, vol. 105, p. 104447, Dec. 2020, doi: 10.1016/j.bioorg.2020.104447.

[54] I. Baramaki *et al.*, "Design, Synthesis, and *In Vivo* Evaluation of a New Series of Indole-Chalcone Hybrids as Analgesic and Anti-Inflammatory Agents," *ACS Omega*, vol. 9, no. 10, pp. 12175–12183, Mar. 2024, doi: 10.1021/acsomega.4c00026.

[55] B. Du, X. Liu, X. Luan, W. Zhang, and C. Zhuang, "Structure optimization of an F-indole-chalcone (FC116) on 4-methoxyphenyl group and therapeutic potential against colorectal cancers with low cytotoxicity," *Bioorg Chem*, vol. 135, p. 106531, Jun. 2023, doi: 10.1016/j.bioorg.2023.106531.

[56] B. Aneja *et al.*, “N-Substituted 1,2,3-Triazolyl-Appended Indole-Chalcone Hybrids as Potential DNA Intercalators Endowed with Antioxidant and Anticancer Properties,” *ChemistrySelect*, vol. 3, no. 9, pp. 2638–2645, Mar. 2018, doi: 10.1002/slct.201702913.

[57] Z. Kudličková *et al.*, “Design, Synthesis, and Evaluation of Novel Indole Hybrid Chalcones and Their Antiproliferative and Antioxidant Activity,” *Molecules*, vol. 28, no. 18, p. 6583, Sep. 2023, doi: 10.3390/molecules28186583.

[58] B. L. Reuhs and S. Simsek, “Nuclear Magnetic Resonance,” 2017, pp. 151–163. doi: 10.1007/978-3-319-45776-5_10.

[59] D. A. Skoog, J. F. Holler, and S. R. Crouch, “Φασματοσκοπία Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού,” in *Αρχές Ενόργανης Ανάλυσης*, vol. 6η, M. I. Καραγιάννης, Ed., Εκδόσεις Κωσταράκη, 2007, ch. 19, pp. 568–599.

[60] P. M. V. Raja and A. R. Barron, “NMR Spectroscopy,” in *Physical Methods in Chemistry and Nanoscience*, LibreTexts, 2021, ch. 4.7.

[61] A. A. Ismail, F. R. van de Voort, and J. Sedman, “Chapter 4 Fourier transform infrared spectroscopy: Principles and applications,” 1997, pp. 93–139. doi: 10.1016/S0167-9244(97)80013-3.

[62] B. C. Smith, *Fundamentals of Fourier Transform Infrared Spectroscopy*, 2nd ed. Taylor and Francis Group, LLC, 2011.

[63] S. A. Khan, S. B. Khan, L. U. Khan, A. Farooq, K. Akhtar, and A. M. Asiri, “Fourier Transform Infrared Spectroscopy: Fundamentals and Application in Functional Groups and Nanomaterials Characterization,” in *Handbook of Materials Characterization*, Cham: Springer International Publishing, 2018, pp. 317–344. doi: 10.1007/978-3-319-92955-2_9.

[64] D. A. Skoog, J. F. Holler, and S. R. Crouch, “Εφαρμογές της Φασματομετρίας Υπερύθρου,” in *Αρχές Ενόργανης Ανάλυσης*, vol. 6η, M. I. Καραγιάννης, Ed., Εκδόσεις Κωσταράκη, 2007, ch. 17, pp. 520–545.

[65] M. Sirajuddin, S. Ali, and A. Badshah, “Drug–DNA interactions and their study by UV–Visible, fluorescence spectroscopies and cyclic voltametry,” *J Photochem Photobiol B*, vol. 124, pp. 1–19, Jul. 2013, doi: 10.1016/j.jphotobiol.2013.03.013.

[66] R. Mishra, B. Bhimrao, A. K. Yadav, D. Kumar, A. Kumar, and R. Chandra, “A Review on the Theoretical Studies of various types of Drug-DNA Interactions A review on theoretical studies of various types of Drug-DNA Interaction,” *International Journal of Science*, vol. 3, no. 2, pp. 11–27, 2017, doi: 10.18091/ijsts.v3i02.11408.

[67] A. Tzani *et al.*, “Synthesis, Conformational Analysis and ctDNA Binding Studies of Flavonoid Analogues Possessing the 3,5-di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl Moiety,” *Antioxidants*, vol. 11, no. 11, p. 2273, Nov. 2022, doi: 10.3390/antiox11112273.

[68] I. Kostopoulou *et al.*, “Exploring the 2'-Hydroxy-Chalcone Framework for the Development of Dual Antioxidant and Soybean Lipoxygenase Inhibitory Agents,” *Molecules*, vol. 26, no. 9, p. 2777, May 2021, doi: 10.3390/molecules26092777.

[69] M. Roussaki, B. Hall, S. C. Lima, A. C. da Silva, S. Wilkinson, and A. Detsi, “Synthesis and anti-parasitic activity of a novel quinolinone–chalcone series,” *Bioorg Med Chem Lett*, vol. 23, no. 23, pp. 6436–6441, Dec. 2013, doi: 10.1016/j.bmcl.2013.09.047.

[70] O. Serifi, F. Tsopelas, A. Kypreou, M. Ochsenkühn-Petropoulou, P. Kefalas, and A. Detsi, “Antioxidant behaviour of 2'-hydroxy-chalcones: a study of their electrochemical properties,” *J Phys Org Chem*, vol. 26, no. 3, pp. 226–231, Mar. 2013, doi: 10.1002/poc.3071.

[71] A. Detsi, M. Majdalani, C. A. Kontogiorgis, D. Hadjipavlou-Litina, and P. Kefalas, “Natural and synthetic 2'-hydroxy-chalcones and aurones: Synthesis, characterization and evaluation of the antioxidant and soybean lipoxygenase inhibitory activity,” *Bioorg Med Chem*, vol. 17, no. 23, pp. 8073–8085, Dec. 2009, doi: 10.1016/j.bmc.2009.10.002.

[72] J. Eberhardt, D. Santos-Martins, A. F. Tillack, and S. Forli, “AutoDock Vina 1.2.0: New Docking Methods, Expanded Force Field, and Python Bindings,” *J Chem Inf Model*, vol. 61, no. 8, pp. 3891–3898, Aug. 2021, doi: 10.1021/acs.jcim.1c00203.

[73] O. Trott and A. J. Olson, “AutoDock Vina: Improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading,” *J Comput Chem*, vol. 31, no. 2, pp. 455–461, Jan. 2010, doi: 10.1002/jcc.21334.

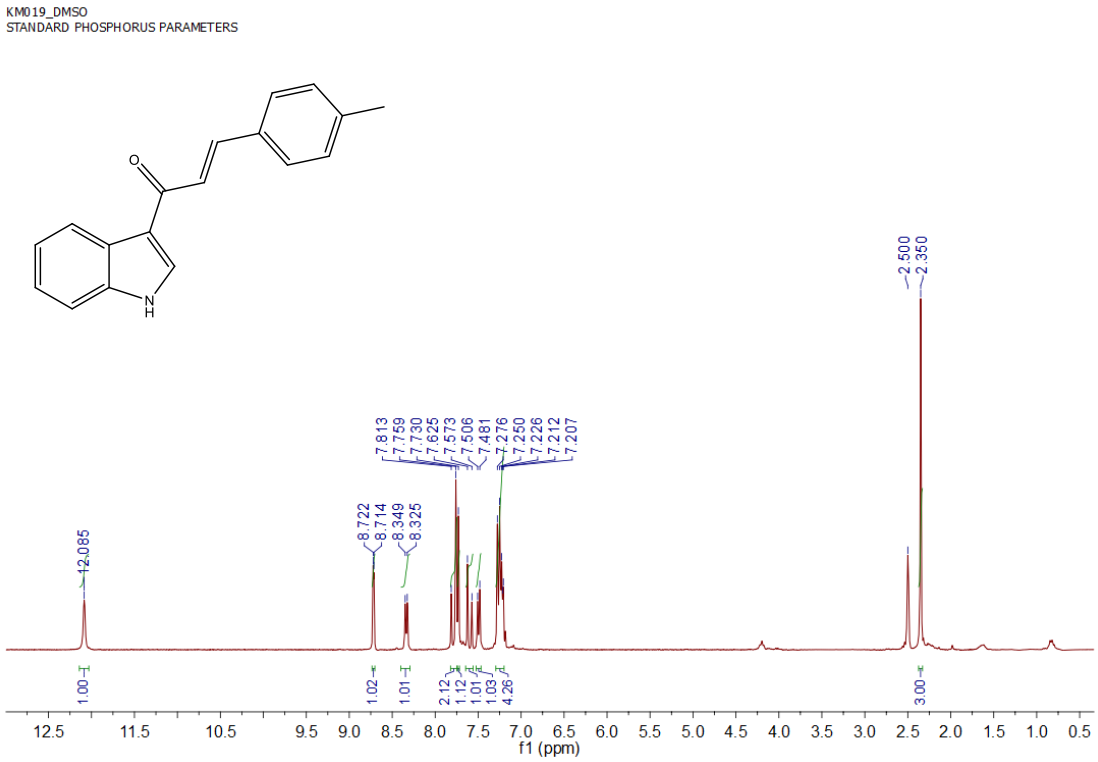
[74] G. M. Morris *et al.*, “AutoDock4 and AutoDockTools4: Automated docking with selective receptor flexibility,” *J Comput Chem*, vol. 30, no. 16, pp. 2785–2791, Dec. 2009, doi: 10.1002/jcc.21256.

[75] S. V Tsukerman, A. I. Bugai, Y. N. Surov, V. P. Lavrushin, and N. S. Pivnenko, “INDOLE ANALOGS OF CHALCONES IN THE IR SPECTROSCOPY METHOD,” Nauka, 1975.

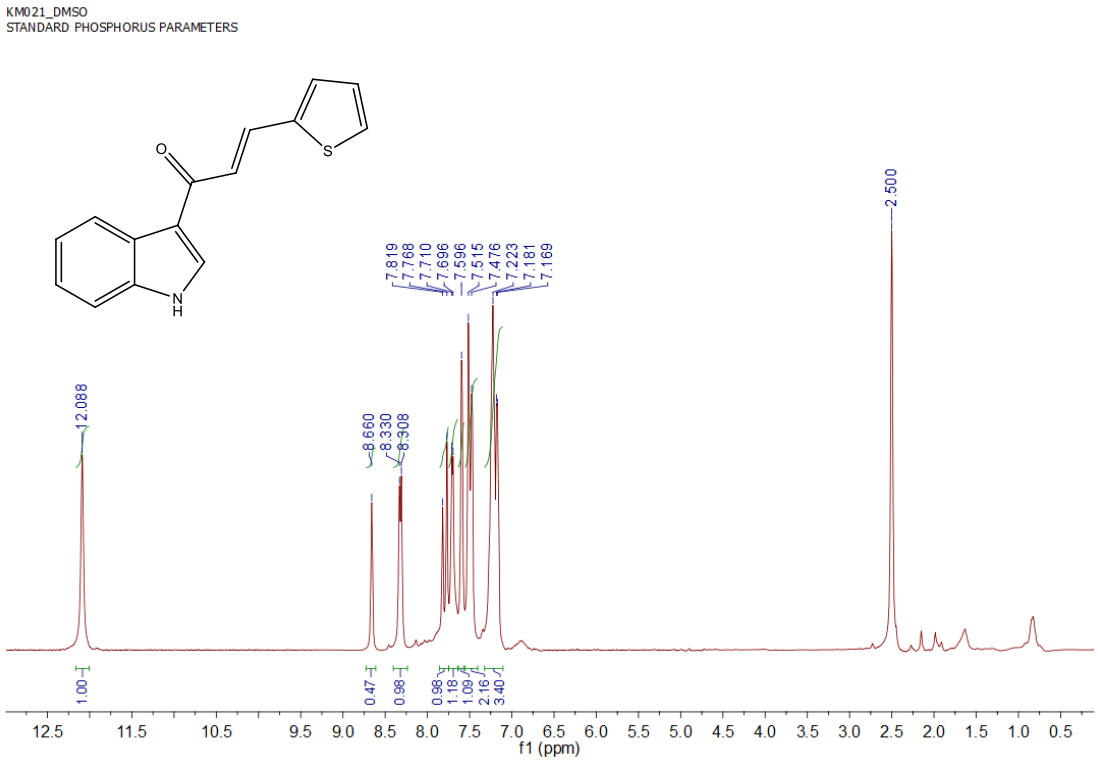
[76] T. F. Vieira and S. F. Sousa, “Comparing AutoDock and Vina in Ligand/Decoy Discrimination for Virtual Screening,” *Applied Sciences*, vol. 9, no. 21, p. 4538, Oct. 2019, doi: 10.3390/app9214538.

[77] N. T. Nguyen *et al.*, “Autodock Vina Adopts More Accurate Binding Poses but Autodock4 Forms Better Binding Affinity,” *J Chem Inf Model*, vol. 60, no. 1, pp. 204–211, Jan. 2020, doi: 10.1021/acs.jcim.9b00778.

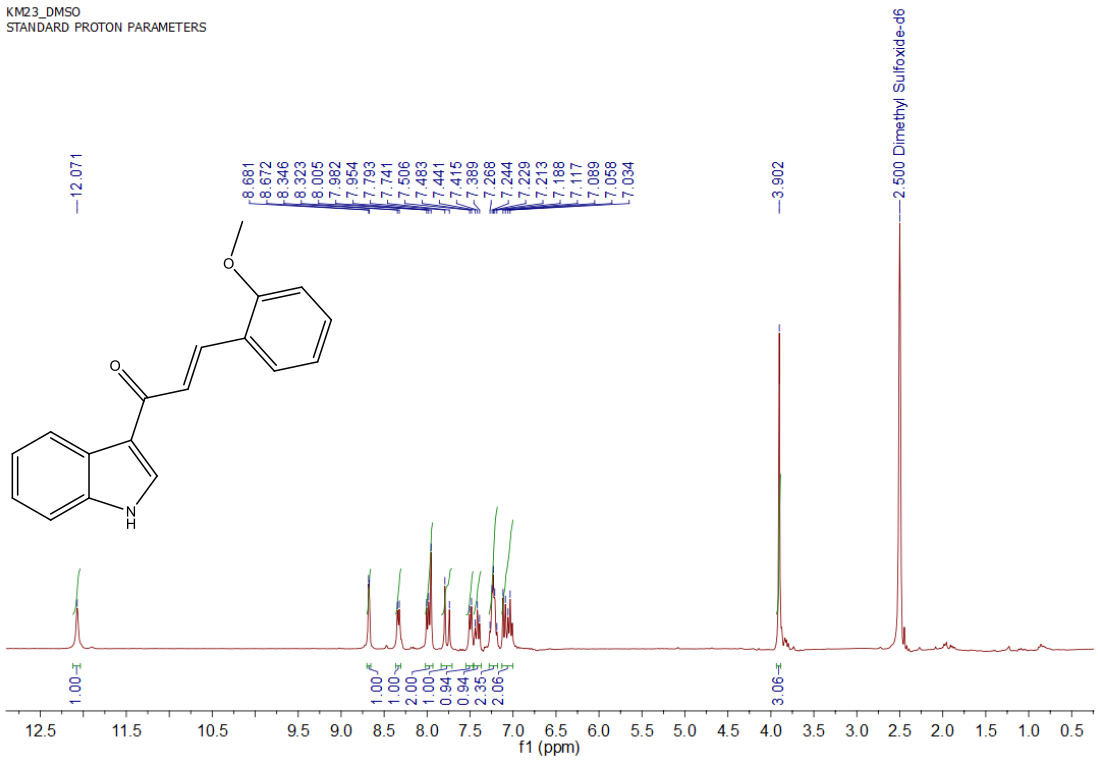
Παράρτημα Ι: Φάσματα ^{1}H NMR, FTIR, UV-Vis



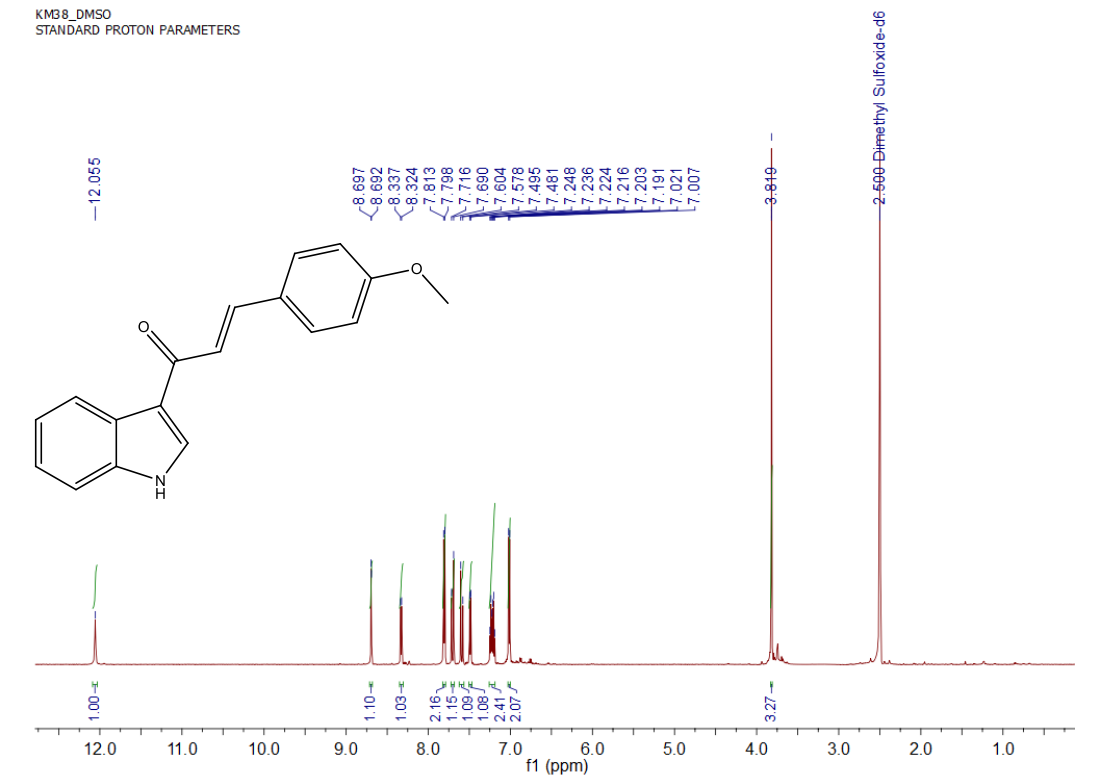
Εικόνα 40. *Φάσμα ^{1}H NMR της (E)-1-(1H-ινδολ-3-υλ)-3-(p-τολυλ)προπ-2-εν-1-όνη* ***(3α)*** *(300 MHz, DMSO, d_6)*



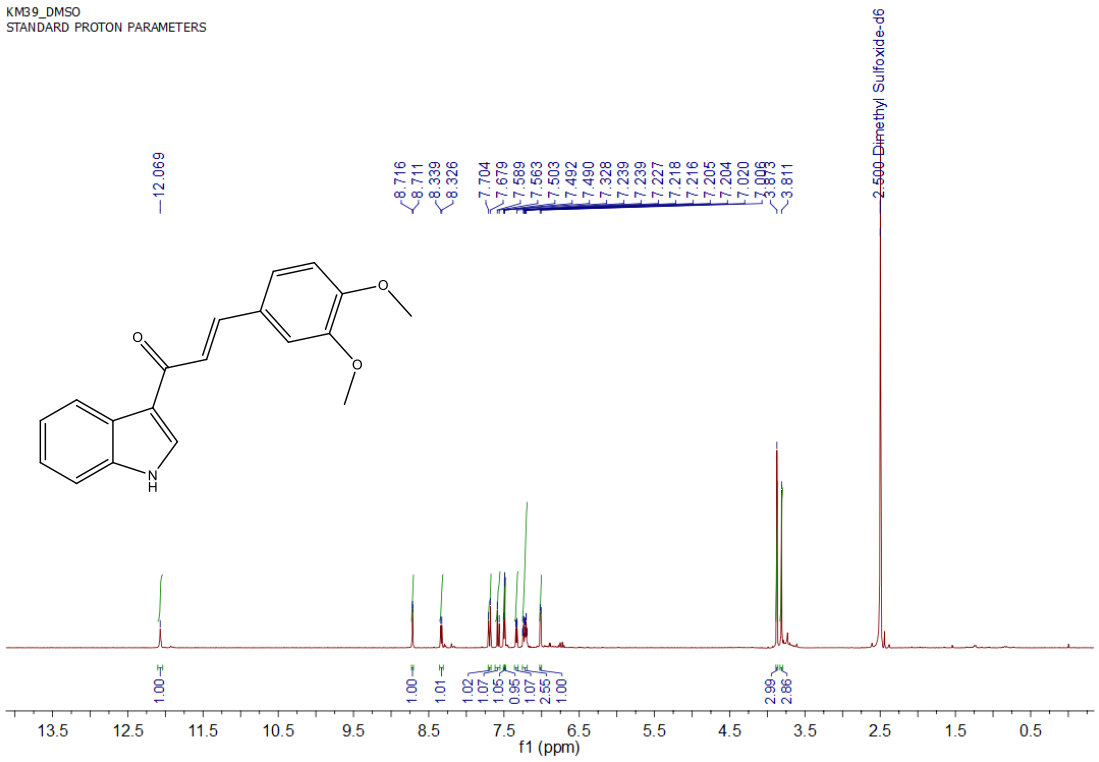
Εικόνα 41. *Φάσμα ^{1}H NMR της (E)-1-(1H-ινδολ-3-υλ)-3-(θειοφαιν-3-υλ)προπ-2-εν-1-όνη* ***(3b)*** *(300 MHz, DMSO, d_6)*



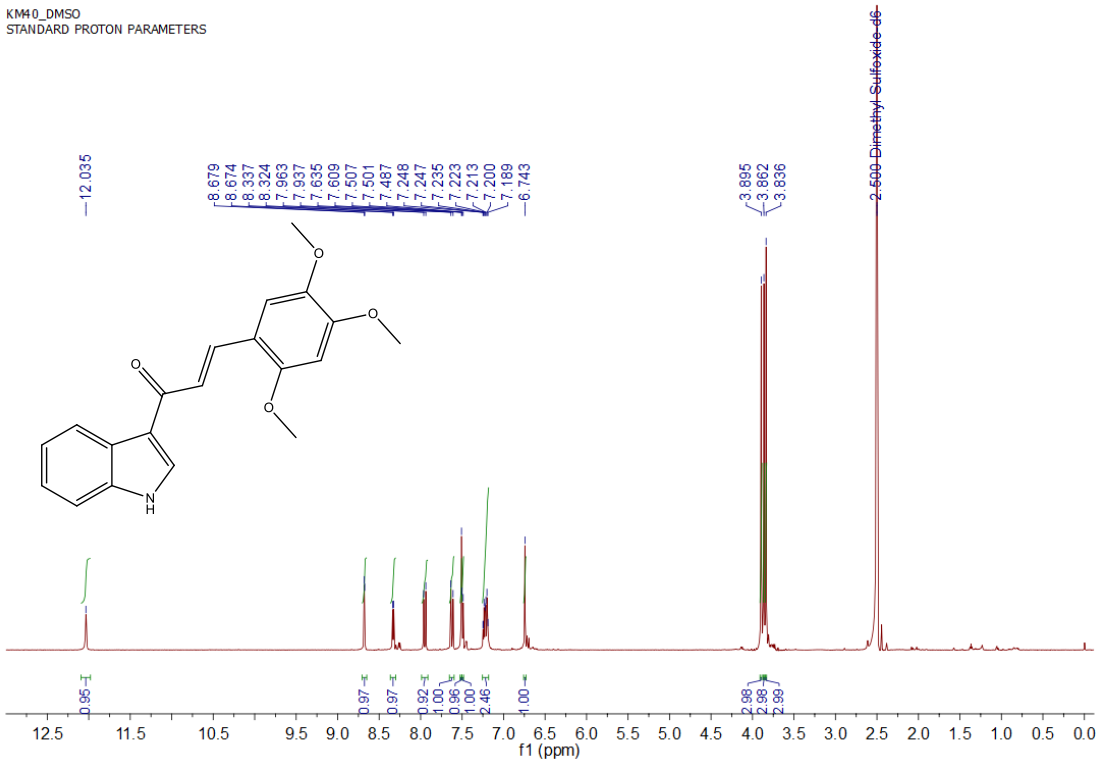
Εικόνα 42. *Φάσμα ^{1}H NMR της (E)-1-(1H-ινδολ-3-υλ)-3-(2-μεθοξυφαινυλ)προπ-2-εν-1-όνη* ***(3c)*** *(300 MHz, DMSO, d_6)*



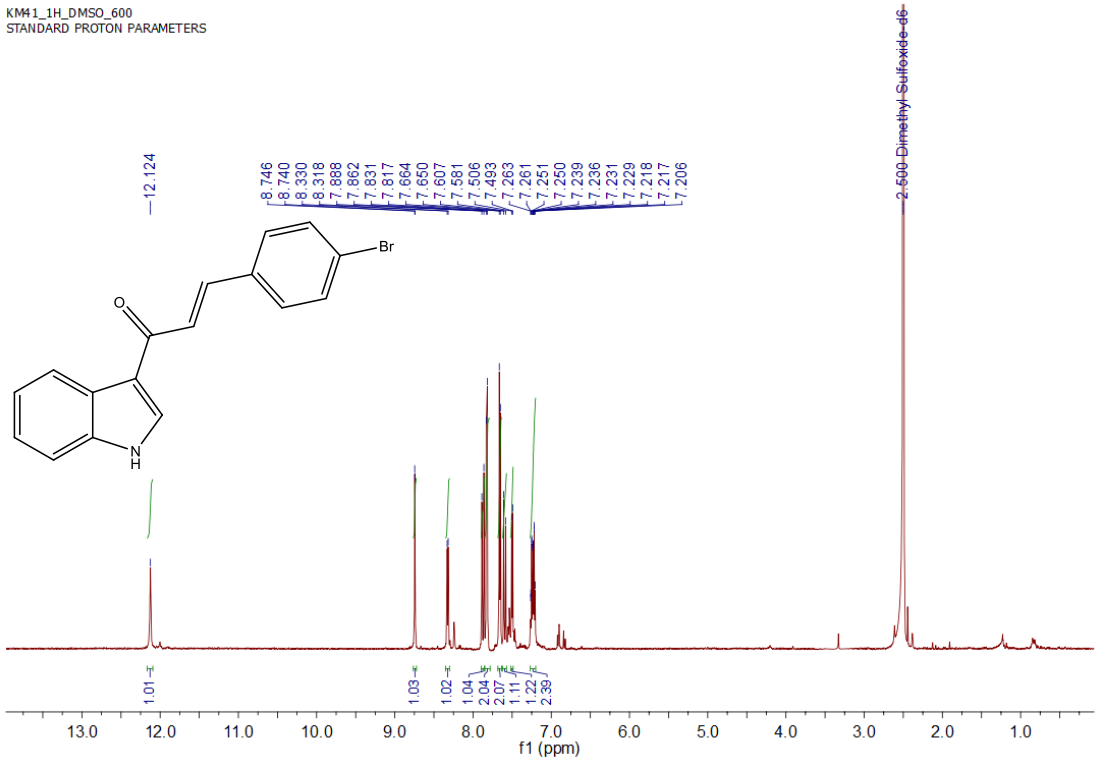
Εικόνα 43. *Φάσμα ^{1}H NMR της (E)-1-(1H-ινδολ-3-υλ)-3-(4-μαθοξυφαινυλ)προπ-2-εν-1-όνη* ***(3d)*** *(600 MHz, DMSO, d_6)*



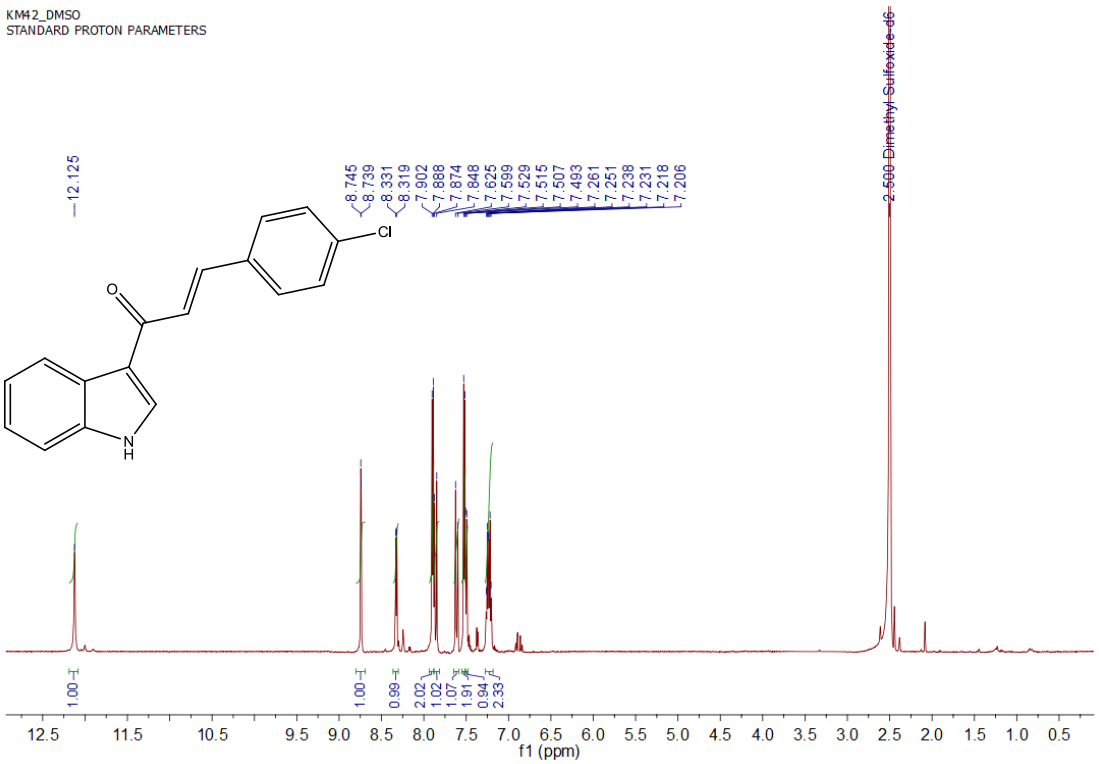
Εικόνα 44. *Φάσμα ^{1}H NMR της (E)-3-(3,4-διμεθοξυφαινυλ)-1-(1H-ινδολ-3-υλ)προπ-2-εν-1-όνη* ***(3e)*** *(600 MHz, DMSO, d_6)*



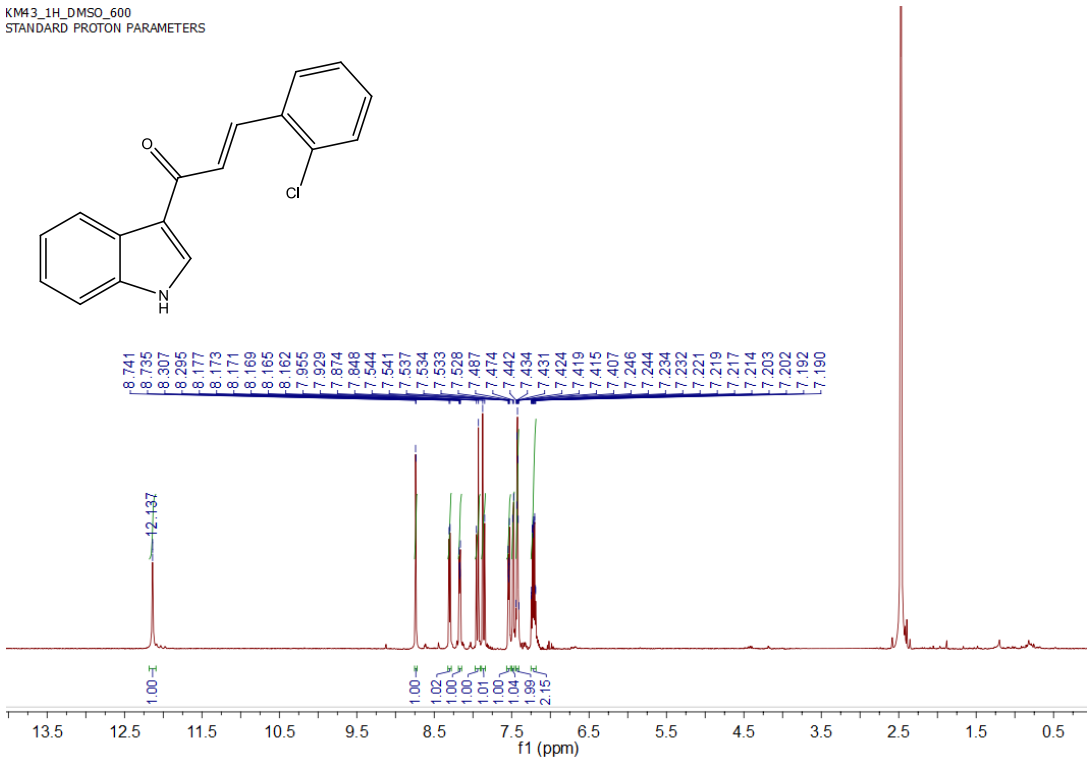
Εικόνα 45. *Φάσμα ^{1}H NMR της (E)-1-(1H-ινδολ-3-υλ)-3-(2,4,5-τριμεθοξυφαινυλ)προπ-2-εν-1-όνη* ***(3f)*** *(400 MHz, DMSO, d_6)*



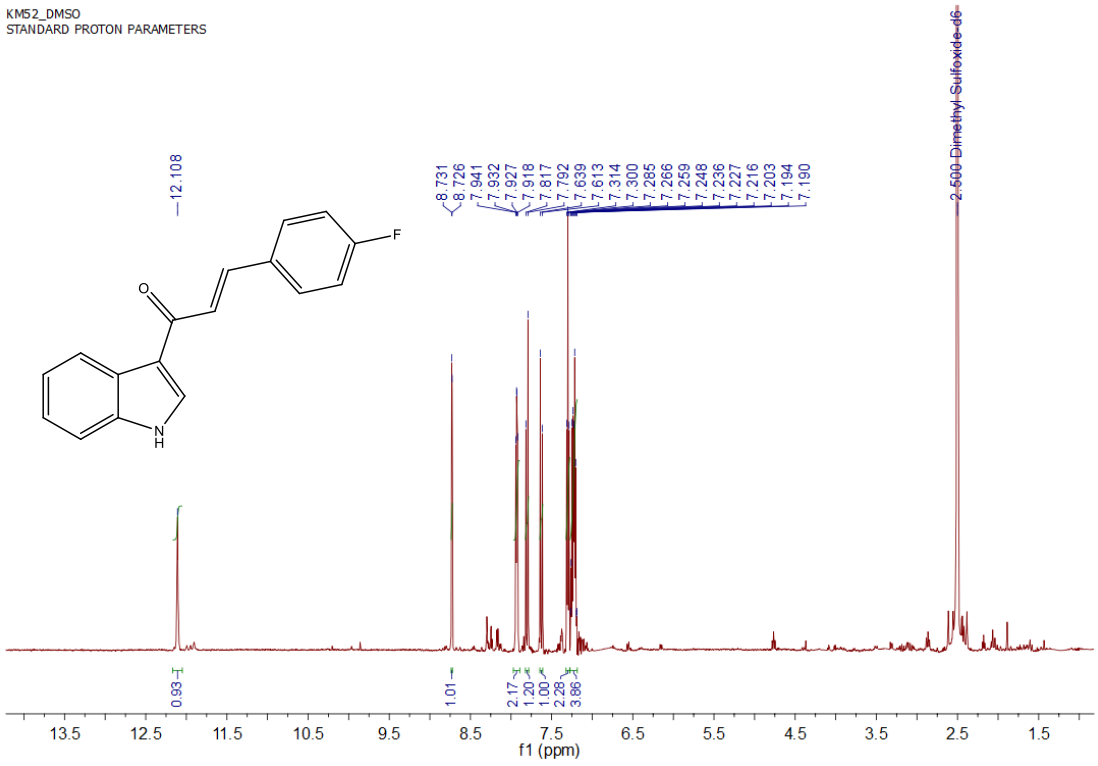
Εικόνα 46. *Φάσμα ^{1}H NMR της (E)-3-(4-βρωμοφαινυλ)-1-(1H-ινδολ-3-υλ)προπ-2-εν-1-όνη* ***(3g)*** *(600 MHz, DMSO, d_6)*



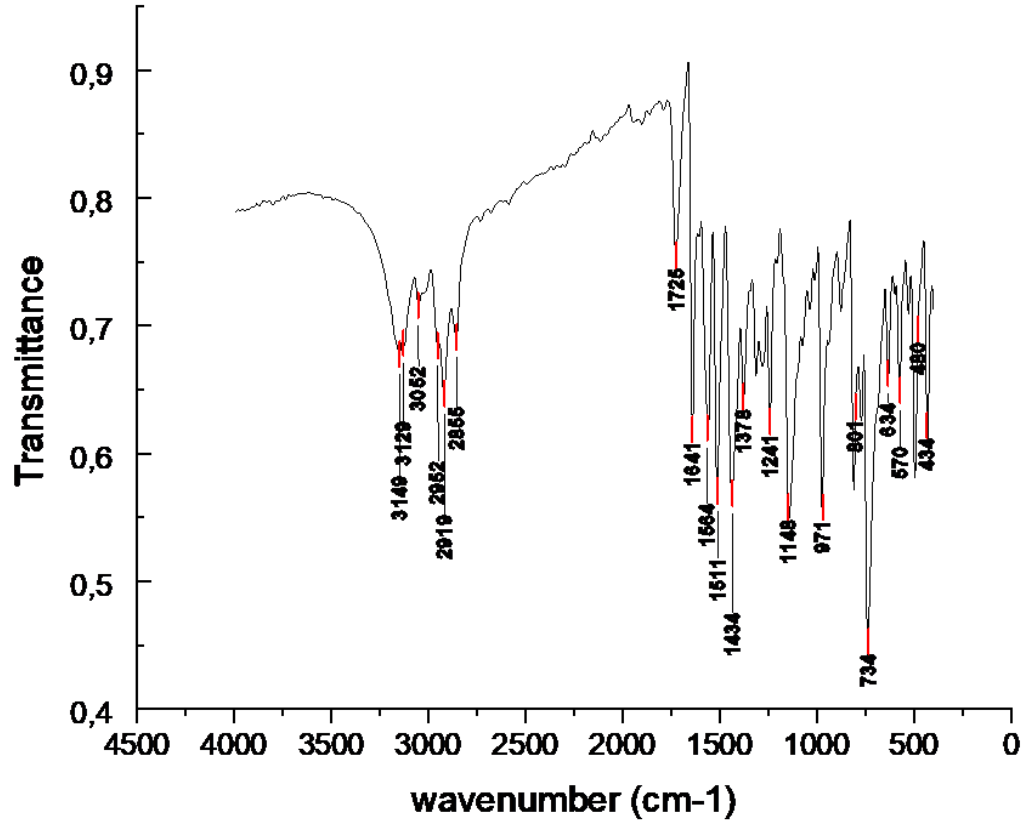
Εικόνα 47. *Φάσμα ^{1}H NMR της (E)-3-(4-χλωροφαινυλ)-1-(1H-ινδολ-3-υλ)προπ-2-εν-1-όνη* ***(3h)*** *(600 MHz, DMSO, d_6)*



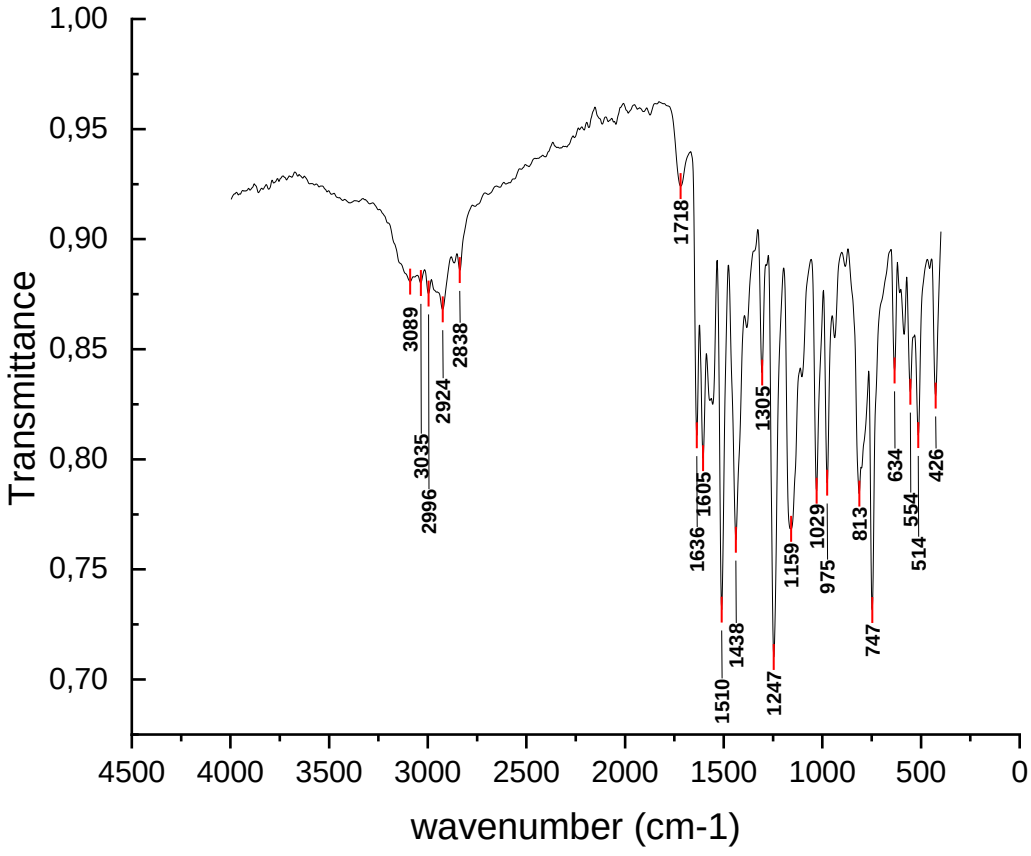
Εικόνα 48. *Φάσμα ^{1}H NMR της (E)-3-(2-χλωροφαινυλ)-1-(1H-ινδολ-3-υλ)προπ-2-εν-1-όνη* ***(3i)*** *(600 MHz, DMSO, d_6)*



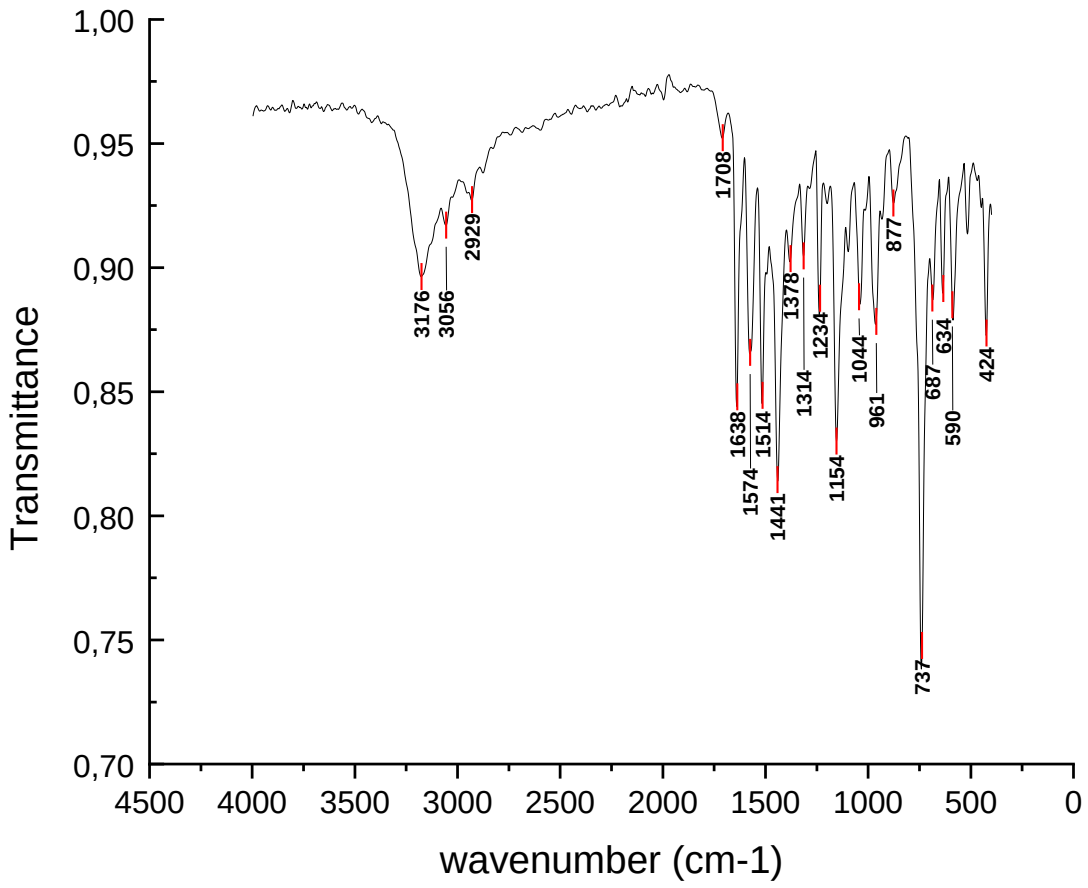
Εικόνα 49. *Φάσμα ^{1}H NMR της (E)-3-(4-φλουοροφαινυλ)-1-(1H-ινδολ-3-υλ)προπ-2-εν-1-όνη* ***(3j)*** *(400 MHz, DMSO, d_6)*



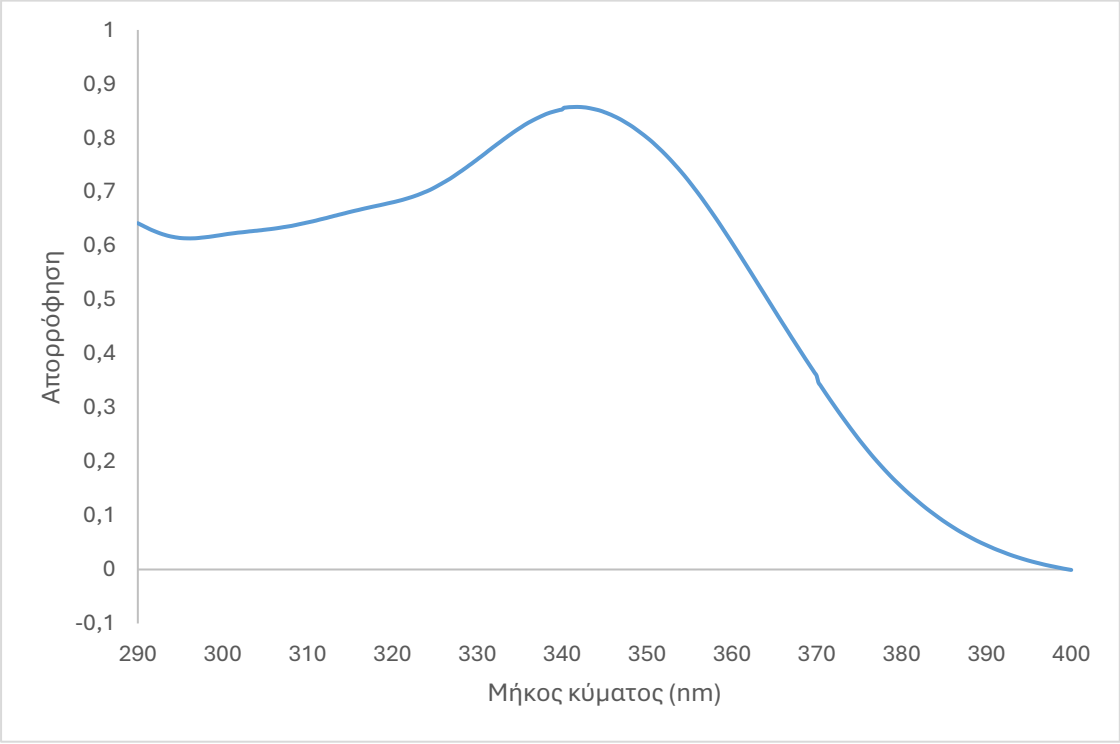
Εικόνα 50. *Φάσμα FTIR της (Ε)-1-(1Η-ινδολ-3-υλ)-3-(p-τολυλ)προπ-2-εν-1-όνη* ***(3α)***



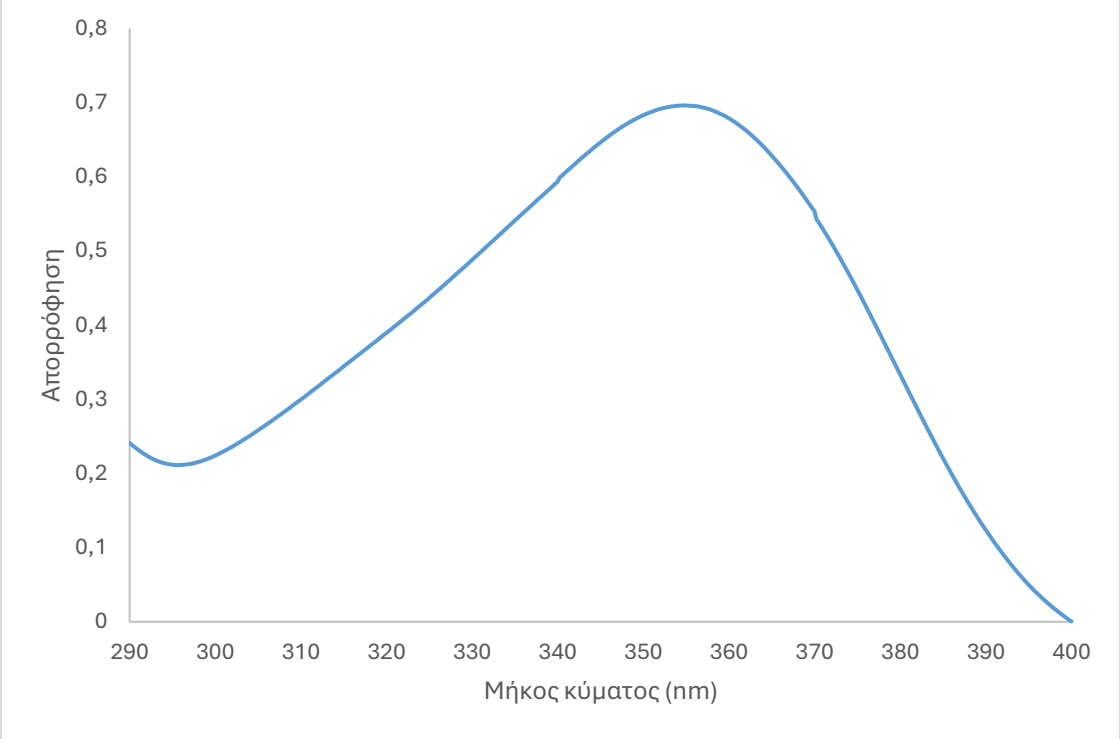
Εικόνα 51. *Φάσμα FTIR της (Ε)-1-(1Η-ινδολ-3-υλ)-3-(4-μεθοξυφαινυλ)προπ-2-εν-1-όνη* ***(3d)***



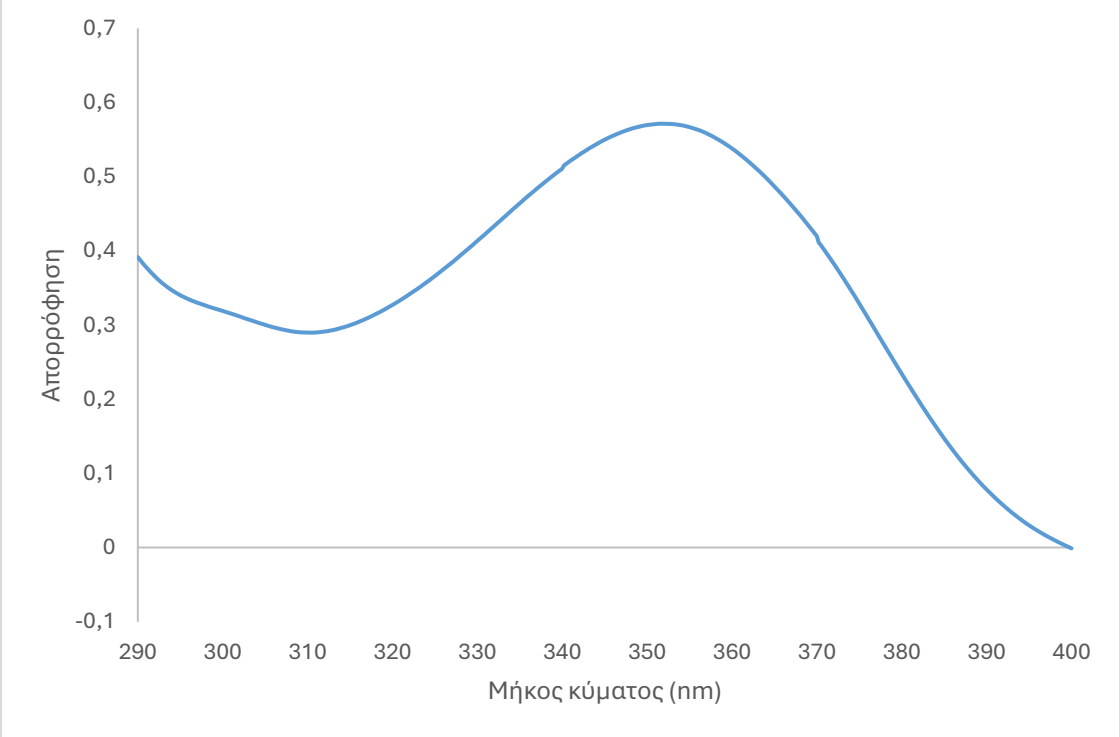
Εικόνα 52. *Φάσμα FTIR της (E)-3-(2-χλωροφαινυλ)-1-(1H-ινδολ-3-υλ)προπ-2-εν-1-όνη* ***(3i)***



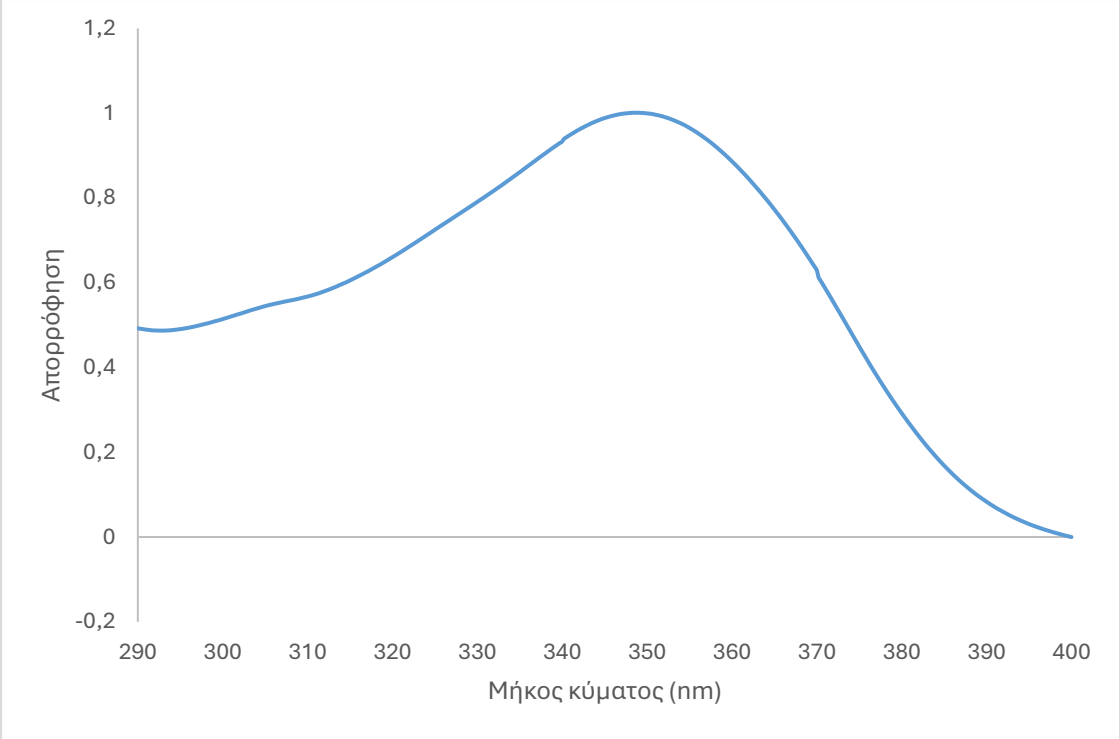
Εικόνα 53. *Φάσμα UV-Vis της (E)-1-(1H-ινδολ-3-υλ)-3-(p-τολυλ)προπ-2-εν-1-όνη* ***(3a)***



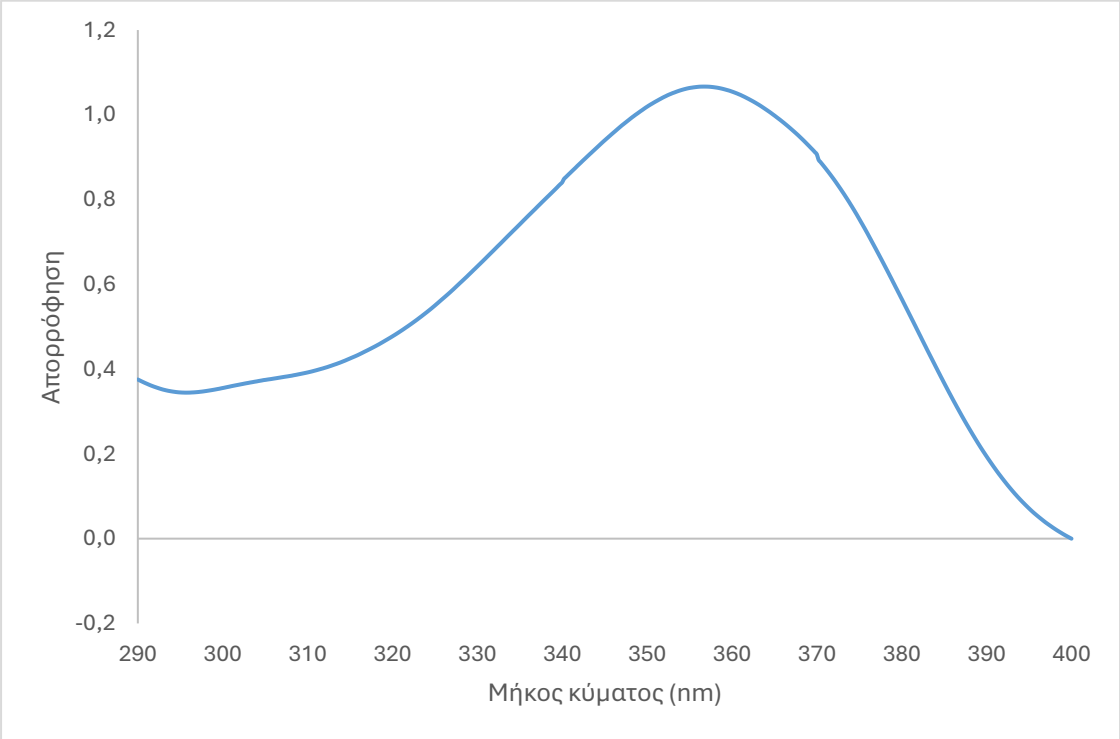
Εικόνα 54. *Φάσμα UV-Vis της (E)-1-(1H-ινδολ-3-υλ)-3-(θειοφαιν-3-υλ)προπ-2-εν-1-όνη* ***(3b)***



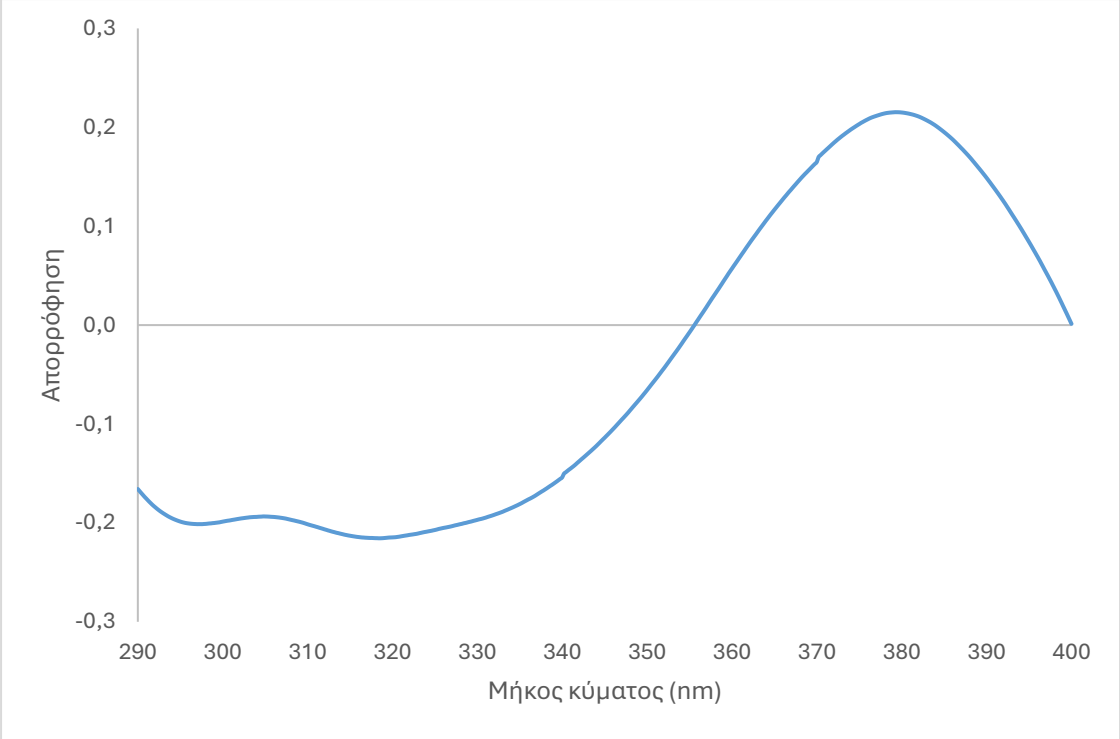
Εικόνα 55. *Φάσμα UV-Vis της (E)-1-(1H-ινδολ-3-υλ)-3-(2-μεθοξυφαινυλ)προπ-2-εν-1-όνη* ***(3c)***



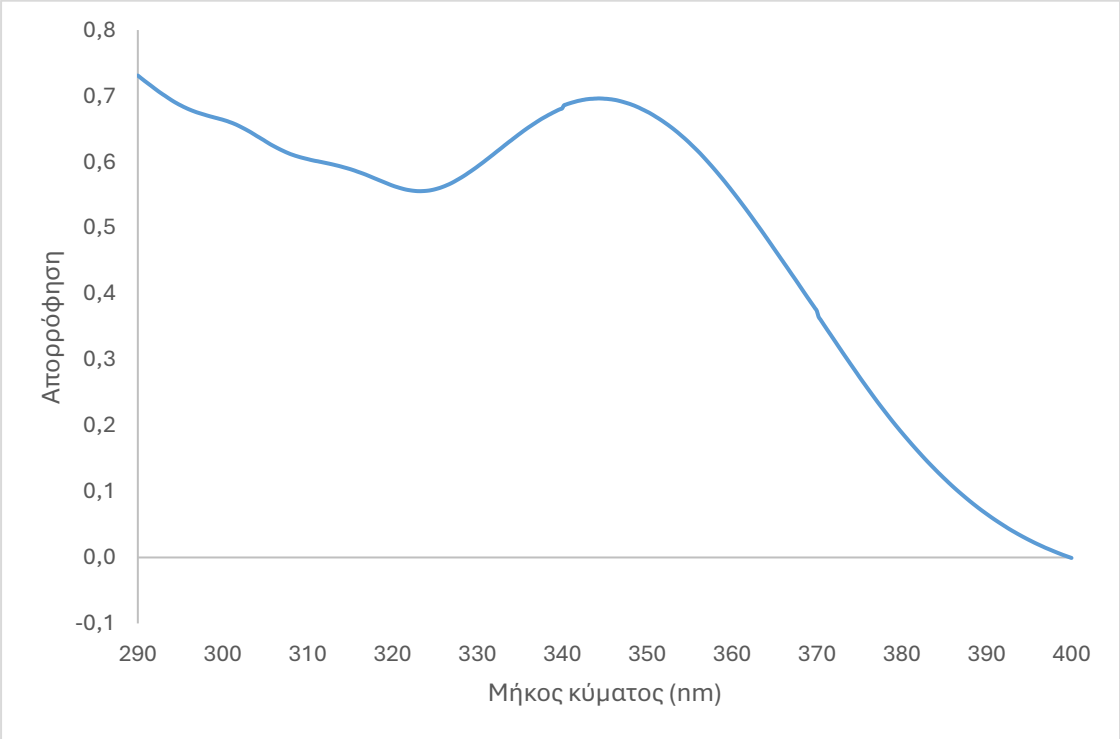
Εικόνα 56. *Φάσμα UV-Vis της (E)-1-(1H-ινδολ-3-υλ)-3-(4-μεθοξυφαινυλ)προπ-2-εν-1-όνη* ***(3d)***



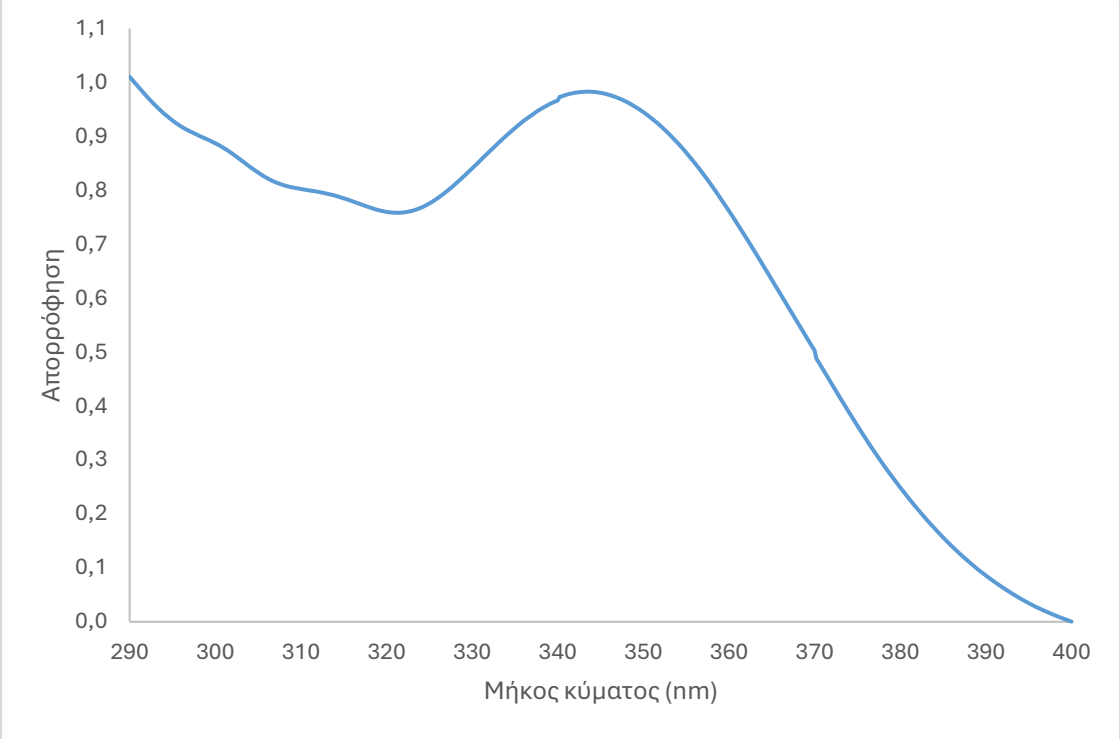
Εικόνα 57. *Φάσμα UV-Vis της (E)-3-(3,4-διμεθοξυφαινυλ)-1-(1H-ινδολ-3-υλ)προπ-2-εν-1-όνη* ***(3e)***



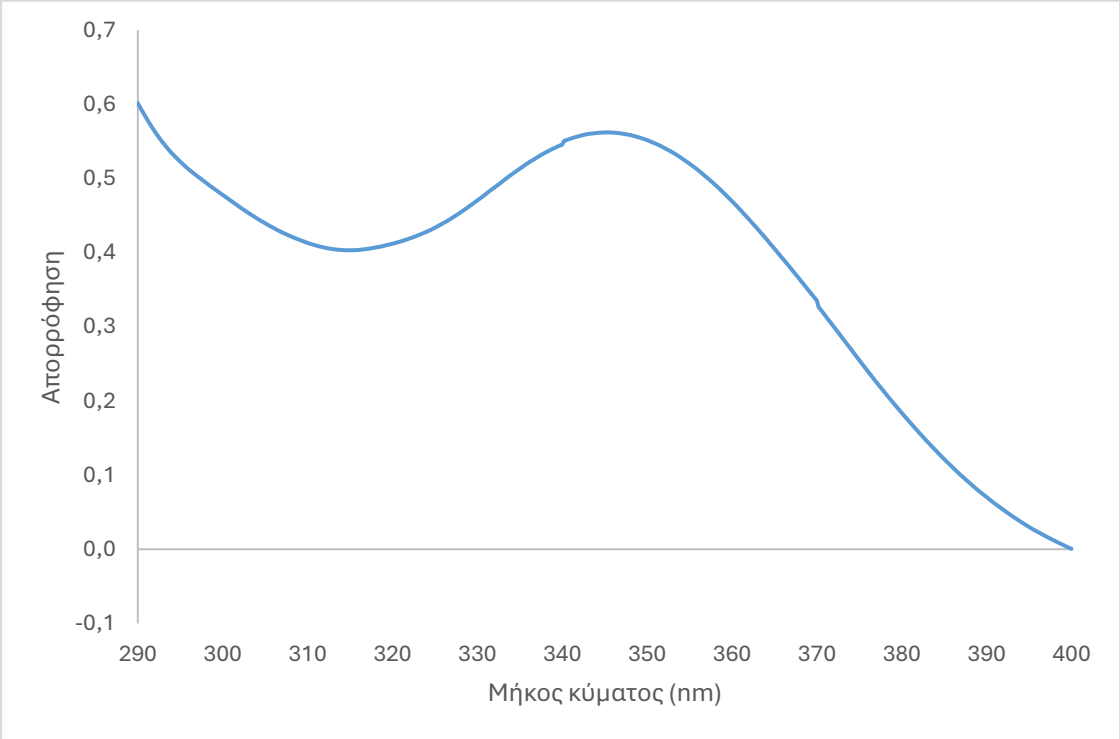
Εικόνα 58. *Φάσμα UV-Vis της (E)-1-(1H-ινδολ-3-υλ)-3-(2,4,5-τριμεθοξυφαινυλ)προπ-2-εν-1-όνη* ***(3f)***



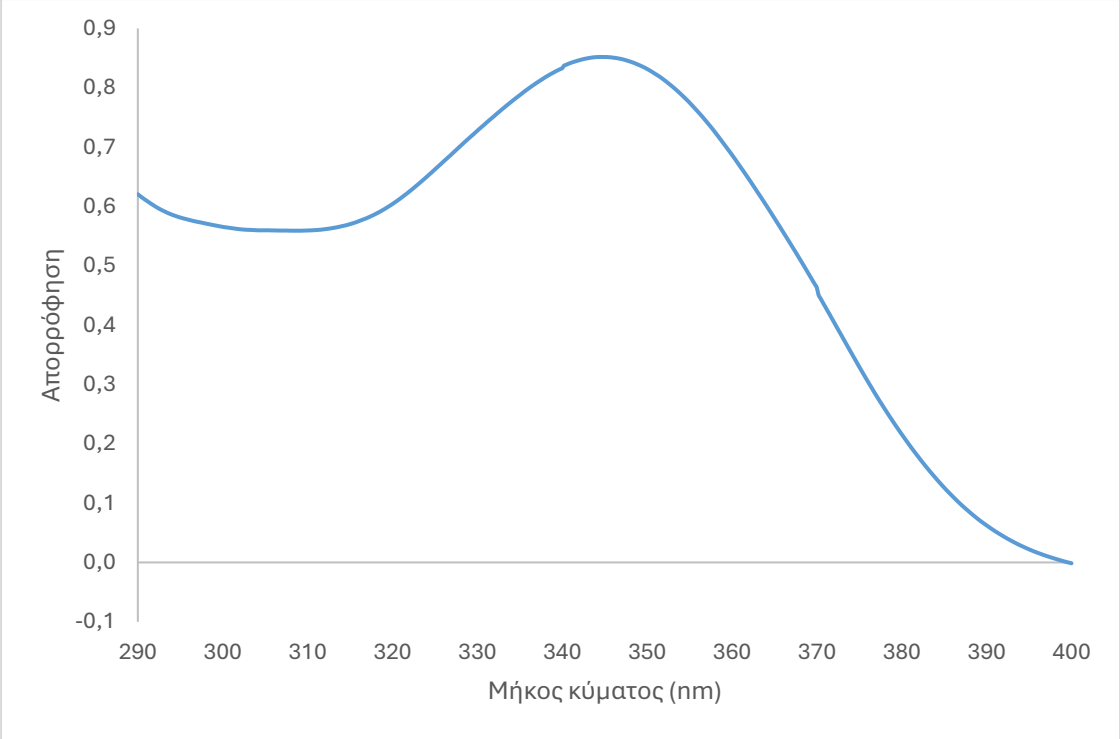
Εικόνα 59. *Φάσμα UV-Vis της (E)-3-(4-βρωμοφαινυλ)-1-(1H-ινδολ-3-υλ)προπ-2-εν-1-όνη* ***(3g)***



Εικόνα 60. *Φάσμα UV-Vis της (E)-3-(4-χλωροφαινυλ)-1-(1H-ινδολ-3-υλ)προπ-2-εν-1-όνη* ***(3h)***



Εικόνα 61. *Φάσμα UV-Vis της (E)-3-(2-χλωροφαινυλ)-1-(1H-ινδολ-3-υλ)προπ-2-εν-1-όνη* ***(3i)***



Εικόνα 62. *Φάσμα UV-Vis της (E)-3-(4-φλουοροφαινυλ)-1-(1H-ινδολ-3-υλ)προπ-2-εν-1-όνη* ***(3j)***

Παράρτημα ΙΙ – Κατάλογος Εικόνων

Εικόνα 1. Δομή ινδολίου. 15
Εικόνα 2. Δομή χαλκόνης..... 29
Εικόνα 3. (2E)-3-(5-methoxy-2-methyl-1H-indol-3-yl)-1-(4-pyridinyl)-2-propen-1-one (MOMIPP)..... 41
Εικόνα 4. Χημικές μετατοπίσεις χαρακτηριστικών ομάδων σε ^{1}H NMR. 43
Εικόνα 5. Σχηματική απεικόνιση φασματόμετρου NMR. 45
Εικόνα 6. Δονήσεις έκτασης και κάμψης, όπου το (+) συμβολίζει κίνηση από τη σελίδα προς τον αναγνώστη, ενώ το (-) από τον αναγνώστη προς τη σελίδα. 46
Εικόνα 7. Σχηματική απεικόνιση φασματόμετρου FTIR. 47
Εικόνα 8. Τρόποι δράσης αλκυλιωτικών παραγόντων. 48
Εικόνα 9. Οι τρεις τύποι μη ομοιοπολικής πρόσδεσης. 49
Εικόνα 10. Φάσμα ^{1}H NMR της (E)-1-(1H-ινδολ-3-υλ)-3-(p-τολυλ)προπ-2-εν-1-όνη **(3α)** (300 MHz, DMSO, d_6). 69
Εικόνα 11. Φάσμα ^{1}H NMR (σε μεγέθυνση) της (E)-1-(1H-ινδολ-3-υλ)-3-(p-τολυλ)προπ-2-εν-1-όνη **(3α)** (300 MHz, DMSO, d_6). 70
Εικόνα 12. Φάσμα ^{1}H NMR (σε μεγέθυνση) της (E)-1-(1H-ινδολ-3-υλ)-3-(p-τολυλ)προπ-2-εν-1-όνη **(3α)** (300 MHz, DMSO, d_6). 70
Εικόνα 13. Φάσμα ^{1}H NMR (σε μεγέθυνση) της (E)-1-(1H-ινδολ-3-υλ)-3-(p-τολυλ)προπ-2-εν-1-όνη **(3α)** (300 MHz, DMSO, d_6). 71
Εικόνα 14. Φάσμα FTIR της (E)-1-(1H-ινδολ-3-υλ)-3-(p-τολυλ)προπ-2-εν-1-όνη **(3α)** 72
Εικόνα 15. Σχηματική απεικόνιση της δέσμευσης της ένωσης **(3a)** στην κρυσταλλική δομή του DNA (αριστερά) και απεικόνιση των αλληλεπιδράσεων της ένωσης με το DNA (δεξιά). 73
Εικόνα 16. Σχηματική απεικόνιση της δέσμευσης της ένωσης **(3b)** στην κρυσταλλική δομή του DNA (αριστερά) και απεικόνιση των αλληλεπιδράσεων της ένωσης με το DNA (δεξιά). 74
Εικόνα 17. Σχηματική απεικόνιση της δέσμευσης της ένωσης **(3c)** στην κρυσταλλική δομή του DNA (αριστερά) και απεικόνιση των αλληλεπιδράσεων της ένωσης με το DNA (δεξιά). 75
Εικόνα 18. Σχηματική απεικόνιση της δέσμευσης της ένωσης **(3d)** στην κρυσταλλική δομή του DNA (αριστερά) και απεικόνιση των αλληλεπιδράσεων της ένωσης με το DNA (δεξιά) για την πρώτη δυνατή θέση. 75
Εικόνα 19. Σχηματική απεικόνιση της δέσμευσης της ένωσης **(3d)** στην κρυσταλλική δομή του DNA (αριστερά) και απεικόνιση των αλληλεπιδράσεων της ένωσης με το DNA (δεξιά) για τη δεύτερη δυνατή θέση. 76
Εικόνα 20. Σχηματική απεικόνιση της δέσμευσης της ένωσης **(3e)** στην κρυσταλλική δομή του DNA (αριστερά) και απεικόνιση των αλληλεπιδράσεων της ένωσης με το DNA (δεξιά). 76
Εικόνα 21. Σχηματική απεικόνιση της δέσμευσης της ένωσης **(3f)** στην κρυσταλλική δομή του DNA (αριστερά) και απεικόνιση των αλληλεπιδράσεων της ένωσης με το DNA (δεξιά). 77
Εικόνα 22. Σχηματική απεικόνιση της δέσμευσης της ένωσης **(3g)** στην κρυσταλλική δομή του DNA (αριστερά) και απεικόνιση των αλληλεπιδράσεων της ένωσης με το DNA (δεξιά). 78
Εικόνα 23. Σχηματική απεικόνιση της δέσμευσης της ένωσης **(3h)** στην κρυσταλλική δομή του DNA (αριστερά) και απεικόνιση των αλληλεπιδράσεων της ένωσης με το DNA (δεξιά). 78

Εικόνα 24. Σχηματική απεικόνιση της δέσμευσης της ένωσης **(3i)** στην κρυσταλλική δομή του DNA (αριστερά) και απεικόνιση των αλληλεπιδράσεων της ένωσης με το DNA (δεξιά). 79
Εικόνα 25. Σχηματική απεικόνιση της δέσμευσης της ένωσης **(3j)** στην κρυσταλλική δομή του DNA (αριστερά) και απεικόνιση των αλληλεπιδράσεων της ένωσης με το DNA (δεξιά) για την πρώτη δυνατή θέση. 80
Εικόνα 26. Σχηματική απεικόνιση της δέσμευσης της ένωσης **(3j)** στην κρυσταλλική δομή του DNA (αριστερά) και απεικόνιση των αλληλεπιδράσεων της ένωσης με το DNA (δεξιά) για τη δεύτερη δυνατή θέση. 80
Εικόνα 27. Φάσμα UV-Vis της ένωσης **(3a)** σε διαφορετικές συγκεντρώσεις CT-DNA (0-100 μM) (αριστερά) και διάγραμμα του λόγου $1A-A0$ ως προς το λόγο $1DNA$ (δεξιά). 81
Εικόνα 28. *Φάσμα UV-Vis της ένωσης* ***(3b)*** *σε διαφορετικές συγκεντρώσεις CT-DNA (0-100 μM) (αριστερά) και διάγραμμα του λόγου* $1A-A0$ *ως προς το λόγο* $1DNA$ *(δεξιά).* 82
Εικόνα 29. Φάσμα UV-Vis της ένωσης **(3c)** σε διαφορετικές συγκεντρώσεις CT-DNA (0-100 μM) (αριστερά) και διάγραμμα του λόγου $1A-A0$ ως προς το λόγο $1DNA$ (δεξιά). 83
Εικόνα 30. Φάσμα UV-Vis της ένωσης **(3d)** σε διαφορετικές συγκεντρώσεις CT-DNA (0-100 μM) (αριστερά) και διάγραμμα του λόγου $1A-A0$ ως προς το λόγο $1DNA$ (δεξιά). 83
Εικόνα 31. Φάσμα UV-Vis της ένωσης **(3e)** σε διαφορετικές συγκεντρώσεις CT-DNA (0-100 μM) (αριστερά) και διάγραμμα του λόγου $1A-A0$ ως προς το λόγο $1DNA$ (δεξιά). 84
Εικόνα 32. Φάσμα UV-Vis της ένωσης **(3f)** σε διαφορετικές συγκεντρώσεις CT-DNA (0-100 μM) (αριστερά) και διάγραμμα του λόγου $1A-A0$ ως προς το λόγο $1DNA$ (δεξιά) 85
Εικόνα 33. Φάσμα UV-Vis της ένωσης **(3g)** σε διαφορετικές συγκεντρώσεις CT-DNA (0-100 μM) (αριστερά) και διάγραμμα του λόγου $1A-A0$ ως προς το λόγο $1DNA$ (δεξιά). 85
Εικόνα 34. Φάσμα UV-Vis της ένωσης **(3h)** σε διαφορετικές συγκεντρώσεις CT-DNA (0-100 μM) (αριστερά) και διάγραμμα του λόγου $1A-A0$ ως προς το λόγο $1DNA$ (δεξιά). 86
Εικόνα 35. Φάσμα UV-Vis της ένωσης **(3i)** σε διαφορετικές συγκεντρώσεις CT-DNA (0-100 μM) (αριστερά) και διάγραμμα του λόγου $1A-A0$ ως προς το λόγο $1DNA$ (δεξιά). 87
Εικόνα 36. Φάσμα UV-Vis της ένωσης **(3j)** σε διαφορετικές συγκεντρώσεις CT-DNA (0-100 μM) (αριστερά) και διάγραμμα του λόγου $1A-A0$ ως προς το λόγο $1DNA$ (δεξιά). 87
Εικόνα 37. Σύγκριση των ενώσεων **(3c)**, **(3d)**, **(3e)** και **(3f)** ως προς την ικανότητα αλληλεπίδρασης με το DNA 90
Εικόνα 38. Σύγκριση των ενώσεων **(3a)**, **(3d)**, **(3g)**, **(3h)** και **(3j)** ως προς την ικανότητα αλληλεπίδρασης με το DNA 91
Εικόνα 39. Σύγκριση των ενώσεων **(3h)**, **(3i)**, **(3j)** και **(3b)** ως προς την ικανότητα αλληλεπίδρασης με το DNA 91
Εικόνα 40. Φάσμα ^{1}H NMR της (E)-1-(1H-ινδολ-3-υλ)-3-(p-τολυλ)προπ-2-εν-1-όνη **(3α)** (300 MHz, DMSO, d_6) 101
Εικόνα 41. Φάσμα ^{1}H NMR της (E)-1-(1H-ινδολ-3-υλ)-3-(θειοφαιν-3-υλ)προπ-2-εν-1-όνη **(3b)** (300 MHz, DMSO, d_6) 101
Εικόνα 42. Φάσμα ^{1}H NMR της (E)-1-(1H-ινδολ-3-υλ)-3-(2-μεθοξυφαινυλ)προπ-2-εν-1-όνη **(3c)** (300 MHz, DMSO, d_6) 102
Εικόνα 43. Φάσμα ^{1}H NMR της (E)-1-(1H-ινδολ-3-υλ)-3-(4-μαθοξυφαινυλ)προπ-2-εν-1-όνη **(3d)** (600 MHz, DMSO, d_6) 102
Εικόνα 44. Φάσμα ^{1}H NMR της (E)-3-(3,4-διμεθοξυφαινυλ)-1-(1H-ινδολ-3-υλ)προπ-2-εν-1-όνη **(3e)** (600 MHz, DMSO, d_6) 103
Εικόνα 45. Φάσμα ^{1}H NMR της (E)-1-(1H-ινδολ-3-υλ)-3-(2,4,5-τριμεθοξυφαινυλ)προπ-2-εν-1-όνη **(3f)** (400 MHz, DMSO, d_6) 103
Εικόνα 46. Φάσμα ^{1}H NMR της (E)-3-(4-βρωμοφαινυλ)-1-(1H-ινδολ-3-υλ)προπ-2-εν-1-όνη **(3g)** (600 MHz, DMSO, d_6) 104
Εικόνα 47. Φάσμα ^{1}H NMR της (E)-3-(4-χλωροφαινυλ)-1-(1H-ινδολ-3-υλ)προπ-2-εν-1-όνη **(3h)** (600 MHz, DMSO, d_6) 104

Εικόνα 48. Φάσμα ^{1}H NMR της (Ε)-3-(2-χλωροφαινυλ)-1-(1Η-ινδολ-3-υλ)προπ-2-εν-1-όνη **(3i)** (600 MHz, DMSO, d_6)..... 105
Εικόνα 49. Φάσμα ^{1}H NMR της (Ε)-3-(4-φλουοροφαινυλ)-1-(1Η-ινδολ-3-υλ)προπ-2-εν-1-όνη **(3j)** (400 MHz, DMSO, d_6) 105
Εικόνα 50. Φάσμα FTIR της (Ε)-1-(1Η-ινδολ-3-υλ)-3-(p-τολυλ)προπ-2-εν-1-όνη **(3α)** 106
Εικόνα 51. Φάσμα FTIR της (Ε)-1-(1Η-ινδολ-3-υλ)-3-(4-μεθοξυφαινυλ)προπ-2-εν-1-όνη **(3d)** 106
Εικόνα 52. Φάσμα FTIR της (Ε)-3-(2-χλωροφαινυλ)-1-(1Η-ινδολ-3-υλ)προπ-2-εν-1-όνη **(3i)** 107
Εικόνα 53. Φάσμα UV-Vis της (Ε)-1-(1Η-ινδολ-3-υλ)-3-(p-τολυλ)προπ-2-εν-1-όνη **(3α)** . 107
Εικόνα 54. Φάσμα UV-Vis της (Ε)-1-(1Η-ινδολ-3-υλ)-3-(θειοφαιν-3-υλ)προπ-2-εν-1-όνη **(3b)** 108
Εικόνα 55. Φάσμα UV-Vis της (Ε)-1-(1Η-ινδολ-3-υλ)-3-(2-μεθοξυφαινυλ)προπ-2-εν-1-όνη **(3c)** 108
Εικόνα 56. Φάσμα UV-Vis της (Ε)-1-(1Η-ινδολ-3-υλ)-3-(4-μεθοξυφαινυλ)προπ-2-εν-1-όνη **(3d)** 109
Εικόνα 57. Φάσμα UV-Vis της (Ε)-3-(3,4-διμεθοξυφαινυλ)-1-(1Η-ινδολ-3-υλ)προπ-2-εν-1-όνη **(3e)** 109
Εικόνα 58. Φάσμα UV-Vis της (Ε)-1-(1Η-ινδολ-3-υλ)-3-(2,4,5-τριμεθοξυφαινυλ)προπ-2-εν-1-όνη **(3f)** 110
Εικόνα 59. Φάσμα UV-Vis της (Ε)-3-(4-βρωμοφαινυλ)-1-(1Η-ινδολ-3-υλ)προπ-2-εν-1-όνη **(3g)** 110
Εικόνα 60. Φάσμα UV-Vis της (Ε)-3-(4-χλωροφαινυλ)-1-(1Η-ινδολ-3-υλ)προπ-2-εν-1-όνη **(3h)** 111
Εικόνα 61. Φάσμα UV-Vis της (Ε)-3-(2-χλωροφαινυλ)-1-(1Η-ινδολ-3-υλ)προπ-2-εν-1-όνη **(3i)** 111
Εικόνα 62. Φάσμα UV-Vis της (Ε)-3-(4-φλουοροφαινυλ)-1-(1Η-ινδολ-3-υλ)προπ-2-εν-1-όνη **(3j)** 112

Παράρτημα ΙΙΙ – Κατάλογος Σχημάτων

Σχήμα 1. Σύνθεση ινδολίου Bartoli. 20
Σχήμα 2. Σύνθεση ινδολίου Bischler-Möhlau. 21
Σχήμα 3. Σύνθεση ινδολίου Fischer. 21
Σχήμα 4. Σύνθεση ινδολίου Fukuyama. 22
Σχήμα 5. Σύνθεση ινδολίου Gassman. 22
Σχήμα 6. Μηχανισμός σύνθεσης ινδολίου Hemetsberger. 23
Σχήμα 7. Μηχανισμός σύνθεσης ινδολίου Julia. 24
Σχήμα 8. Σϋνθεση ινδολίου Larock. 24
Σχήμα 9. Σύνθεση ινδολίου Leimgruber-Batcho. 25
Σχήμα 10. Σύνθεση ινδολίου Madelung. 25
Σχήμα 11. Σύνθεση ινδολίου Nenitzescu. 26
Σχήμα 12. Σύνθεση ινδολίου Reissert. 26
Σχήμα 13. Σύνθεση ινδολίου Cadogan-Sundberg. 27
Σχήμα 14. Σύνθεση ινδολίου Ullmann. 27
Σχήμα 15. Σύνθεση χαλκονών μέσω της αντίδρασης Claisen-Schmidt. 36
Σχήμα 16. Σύνθεση χαλκονών μέσω ακτινοβόλησης με υπερήχους. 36
Σχήμα 17. Σύνθεση χαλκονών μέσω ακτινοβόλησης με μικροκύματα. 37
Σχήμα 18. Σύνθεση χαλκονών μέσω σύζευξης Heck. 37
Σχήμα 19. Σύνθεση χαλκονών μέσω σύζευξης Suzuki-Miyaura. 38
Σχήμα 20. Σύνθεση χαλκονών μέσω σύζευξης Sonogashira. 38
Σχήμα 21. Σύνθεση χαλκονών μέσω σύζευξης Julia-Kocienski. 38
Σχήμα 22. Σύνθεση χαλκονών μέσω σύζευξης Wittig. 39
Σχήμα 23. Σύνθεση χαλκονών μέσω σύζευξης Friedel-Crafts. 39
Σχήμα 24. Σύνθεση χαλκονών μέσω αναδιάταξης Photo-Fries. 40
Σχήμα 25. Μηχανισμός αντίδρασης Claisen-Schmidt για τη σύνθεση ινδολικών χαλκονών. 42
Σχήμα 26. Γενική μορφή αντίδρασης σύνθεσης χαλκονών με συμπύκνωση Claisen-Schmidt, ακολουθώντας τη βελτιστοποιημένη μεθοδολογία, όπου (1): 3-ακετυλο-ινδόλιο, (2): αλδεΰδη με υποκαταστάτη X και (3): χαλκόνη. 51
Σχήμα 27. Αντίδραση-μοντέλο σύνθεσης χαλκονών με συμπύκνωση Claisen-Schmidt, όπου (1): 3-ακετυλο-ινδόλιο, (2a): 4-μεθυλοβενζαλδεΰδη. 53
Σχήμα 28. Γενική μορφή αντίδρασης σύνθεσης χαλκονών με συμπύκνωση Claisen-Schmidt, ακολουθώντας τη βελτιστοποιημένη μεθοδολογία, όπου (1): 3-ακετυλο-ινδόλιο, (2): αλδεΰδη με υποκαταστάτη X και (3): χαλκόνη. 57

Παράρτημα IV – Κατάλογος Πινάκων

Πίνακας 1. Οι απαιτούμενες ποσότητες αντιδραστηρίων, όπως υπολογίστηκαν, για τη διεξαγωγή της αντίδρασης-μοντέλο με τρεις διαφορετικές βάσεις και διαλύτη EtOH σε θερμοκρασία δωματίου. 54
Πίνακας 2. Οι απαιτούμενες ποσότητες αντιδραστηρίων, όπως υπολογίστηκαν, για τη διεξαγωγή της αντίδρασης-μοντέλο με βάση KOH, δύο διαφορετικούς διαλύτες και χρήση αναρροής. 55
Πίνακας 3. Οι απαιτούμενες ποσότητες αντιδραστηρίων, όπως υπολογίστηκαν, για τη διεξαγωγή της αντίδρασης-μοντέλο με βάση KOH, δύο διαφορετικούς διαλύτες και χρήση υπερήχων 55
Πίνακας 4. Οι διαφορετικές αλδεΰδες, τα μοριακά βάρη και οι πυκνότητές τους. 57
Πίνακας 5. Η απόδοση της αντίδρασης-μοντέλο σε τελικό προϊόν για κάθε μία από τις τρεις διαφορετικές βάσεις που χρησιμοποιήθηκαν στις ίδιες συνθήκες. 68
Πίνακας 6. Συνθήκες θέρμανσης, διαλύτης, χρόνος αντίδρασης και απόδοση σε τελικό προϊόν για την πραγματοποίηση της αντίδρασης-μοντέλο με χρήση της βάσης KOH. 68
Πίνακας 7. Σύγκριση της ενέργειας σύνδεσης ΔG και της σταθεράς σύνδεσης K_b κάθε ένωσης με το DNA, όπως αυτή προκύπτει από in silico και in vitro μελέτη 88