

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



Σύνθεση και μελέτη της αντιοξειδωτικής και αντιφλεγμονώδους δράσης νέων κουμαρινών

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

ΚΩΝΣΤΑΝΤΙΝΟΣ ΖΕΛΙΑΝΑΙΟΣ

Αθήνα 2012

Επιβλέπων:

Στέλιος ΧΑΜΗΛΑΚΗΣ, Επικ. Καθηγητής
Εργαστήριο Οργανικής Χημείας

Πρόλογος

Η παρούσα εργασία εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Οργανικής Χημείας της Σχολής Χημικών Μηχανικών του Εθνικού Μετσόβιου Πολυτεχνείου κατά το ακαδημαϊκό έτος 2010-2011, υπό την επίβλεψη του Δρ Σ. Χαμηλάκη, Επίκουρου Καθηγητή ΕΜΠ.

Για την πραγματοποίηση της παρούσας εργασίας, θα ήθελα να ευχαριστήσω καταρχάς τον επιβλέποντα Δρ Σ. Χαμηλάκη, Επίκουρο Καθηγητή ΕΜΠ για την ανάθεση της Διπλωματικής Εργασίας, την άψογη συνεργασία που είχαμε, την παροχή βοήθειας και τις συμβουλές που μου προσέφερε σε όποιο σημείο χρειάστηκε και την συνολικότερη καθοδήγηση σε όλα τα σημεία εκπόνησης αυτής της εργασίας.

Ευχαριστώ ειδικότερα τη Δρ Αναστασία Δέτση, Λέκτορα ΕΜΠ για την πολύτιμη βοήθειά της τόσο στα πλαίσια λειτουργίας του εργαστηρίου και εκπόνησης των πειραμάτων, όσο και για τις συμβουλές σε όλη τη διάρκεια εκπόνησης της διπλωματικής εργασίας.

Επίσης, ευχαριστώ τον Καθ. Α. Τσολομούτη για την συμμετοχή του στην εξεταστική επιτροπή και την κριτική ανάγνωση της εργασίας.

Για τη διεξαγωγή των πειραμάτων αξιολόγησης της αντιφλεγμονώδους και αντιοξειδωτικής δράσης των μορίων που μελετήθηκαν στην παρούσα εργασία ευχαριστώ ιδιαίτερα την Καθηγήτρια του Τμήματος Φαρμακευτικής ΑΠΘ Δήμητρα Χατζηπαύλου-Λίτινα.

Ιδιαίτερες ευχαριστίες οφείλω στη Μαρίνα Ρουσάκη, υποψήφια διδάκτορα στο Εργαστήριο Οργανικής Χημείας του ΕΜΠ, που με την βοήθειά της σε εργαστηριακό επίπεδο αλλά και στην συγγραφή της παρούσας εργασίας είχε σημαντικότερη συνδρομή στην πρόοδο και την ολοκλήρωση της παρούσας εργασίας.

Επίσης, ευχαριστώ την κα Ζαμπία Κατσανεβάκη, ΕΕΔΙΠ στο Εργαστήριο Οργανικής Χημείας για τη βοήθειά της κατά τη διάρκεια εκπόνησης αυτής της εργασίας.

Επιπλέον, οφείλω να ευχαριστήσω τους συνάδελφούς μου, τους βοηθούς αλλά και τους καθηγητές του εργαστηρίου για την διατήρηση ενός άψογου κλίματος συνεργασίας και αλληλοβοήθειας αλλά και για την πάντα ευχάριστη ατμόσφαιρα που υπήρχε.

Κατανοώντας ότι όλες οι προσπάθειες των προπτυχιακών, μεταπτυχιακών και διδακτορικών φοιτητών, του διδακτικού προσωπικού και των καθηγητών, του βοηθητικού προσωπικού και όλων των υπόλοιπων μελών της Σχολής και του Πολυτεχνείου συνδέονται σε ένα άρρηκτο δίκτυο συνεργασίας και συνθέτουν την συλλογική προσπάθεια της ακαδημαϊκής κοινότητας, επεκτείνω τις ευχαριστίες μου για τις δυνατότητες που μου δόθηκαν και για τις εμπειρίες που αποκόμισα, στο σύνολο των ανθρώπων της Σχολής Χημικών Μηχανικών, του Εθνικού Μετσόβιου Πολυτεχνείου και όλων των συνεργατών αυτών.

Τέλος, θεωρώ πως αξίζουν όχι μόνο τις ευχαριστίες, αλλά και την ευγνωμοσύνη μου όλοι όσοι μου προσέφεραν εμπειρίες, υποστήριξη και ενθάρρυνση όλα αυτά τα χρόνια, οι φίλοι μου, οι γονείς μου, οι συγγενείς μου και το ευρύτερο περιβάλλον στο οποίο διαμορφώθηκα και διαμορφώνομαι ακόμα καθημερινά.

Περίληψη

Σκοπός της παρούσας ερευνητικής εργασίας είναι η σύνθεση, ο χαρακτηρισμός και η μελέτη της αντιοξειδωτικής και αντιφλεγμονώδους δράσης συγκεκριμένων κουμαρινικών παραγώγων. Συντέθηκαν 11 νέες κουμαρίνες και διερευνήθηκε η ενδεχόμενη και αντιοξειδωτική και αντιφλεγμονώδης δράση τους.

Οι κουμαρίνες είναι φυσικά προϊόντα με σημαντικότερη παρουσία στο φυτικό βασίλειο και πλειάδα καταγεγραμμένων περιπτώσεων με βιολογική δράση. Ο δομικός σκελετός των κουμαρινών είναι η βενζοπυρόνη, μία πυρόνη ενωμένη με ένα βενζολικό δακτύλιο. Τα διάφορα είδη κουμαρινών περιλαμβάνουν πολλές δομικές προσθήκες και τροποποιήσεις και ο σχεδιασμός νέων κουμαρινικών παραγώγων μπορεί να οδηγήσει σε πολυποίκιλια (από μορφολογικής απόψεως) μόρια. Η παρούσα εργασία περιλαμβάνει το σχεδιασμό, τη σύνθεση, το χαρακτηρισμό δομής και την αξιολόγηση της αντιοξειδωτικής και αντιφλεγμονώδους δράσης νέων κουμαρινικών αναλόγων. Ο σχεδιασμός των νέων μορίων βασίστηκε σε πρόσφατα αποτελέσματα του Εργαστηρίου Οργανικής Χημείας, σύμφωνα με τα οποία ο δομικός σκελετός της 3-φαιnyλο-κουμαρίνης αποτελεί ενδιαφέρουσα ένωση-οδηγό.

Αρχικά, μελετήθηκε η επίδραση της παρουσίας υποκαταστάτη μεθυλίου στη θέση 4 και βρωμίου στις θέσεις 6 και 8 του βενζοπυρονικού δακτυλίου (Σειρά Α). Στη συνέχεια, διερευνήθηκε η δομική τροποποίηση αυτών των μορίων με διαδοχική αποπροστασία των μεθοξυ-ομάδων και αλκυλίωση των υδροξυ-ομάδων (Σειρά Β). Η σκοπιμότητα αυτής της συνθετικής πορείας ήταν η εμφάνιση αρχικά κατεχολικού συστήματος στο μόριο των κουμαρινών και στην συνέχεια αλκυλομάδων, για την διερεύνηση της συμβολής τους στην βελτίωση ή μη της αντιοξειδωτικής και της αντιφλεγμονώδους δραστηριότητας. Τέλος, πραγματοποιήθηκε η σύνθεση κουμαρινών που περιέχουν αρωματικό δακτύλιο στη θέση 6 του βενζοπυρονικού συστήματος, μέσω αντίδρασης σύζευξης Suzuki (Σειρά Γ).

Όλα τα μόρια που παρασκευάστηκαν εξετάστηκαν α) για την αντιοξειδωτική δράση τους χρησιμοποιώντας δύο διαφορετικές βιοδοκιμασίες (ικανότητα αλληλεπίδρασης με την ελεύθερη ρίζα DPPH και ικανότητα αναστολής της λιπιδικής υπεροξειδωσης) και β) για την αντιφλεγμονώδη δράση τους μέσω της ικανότητάς τους να αναστέλλουν το ένζυμο λιποξυγονάση από σόγια.

Τα σημαντικότερα συμπεράσματα που προκύπτουν από αυτή την μελέτη είναι τα εξής:

-Χρησιμοποιήθηκε με επιτυχία, η μέθοδος σύνθεσης ετεροκυκλικών βιοδραστικών μορίων αναλόγων των κουμαρινών που έχει αναπτυχθεί στο Εργαστήριο Οργανικής Χημείας, η οποία βασίζεται στην αντίδραση κατάλληλα υποκατεστημένων 2-υδροξυ-ακετοφαινονών με ιμιδαζολίδια καρβοξυλικών οξέων σε ήπιες συνθήκες και αντίδραση σε ένα μόνο βήμα.

-Μελετήθηκε μέσω των αντιδράσεων αποπροστασίας η επίδραση της ύπαρξης κατεχολικού συστήματος στον αρωματικό δακτύλιο της θέσης 3 στη βελτίωση των βιολογικών ιδιοτήτων των κουμαρινών .

-Μελετήθηκε με τις αντιδράσεις αλκυλίωσης η επίδραση της παρουσίας πρένυλομάδων στην αντιοξειδωτική και αντιφλεγμονώδη δράση των παραγόμενων ενώσεων.

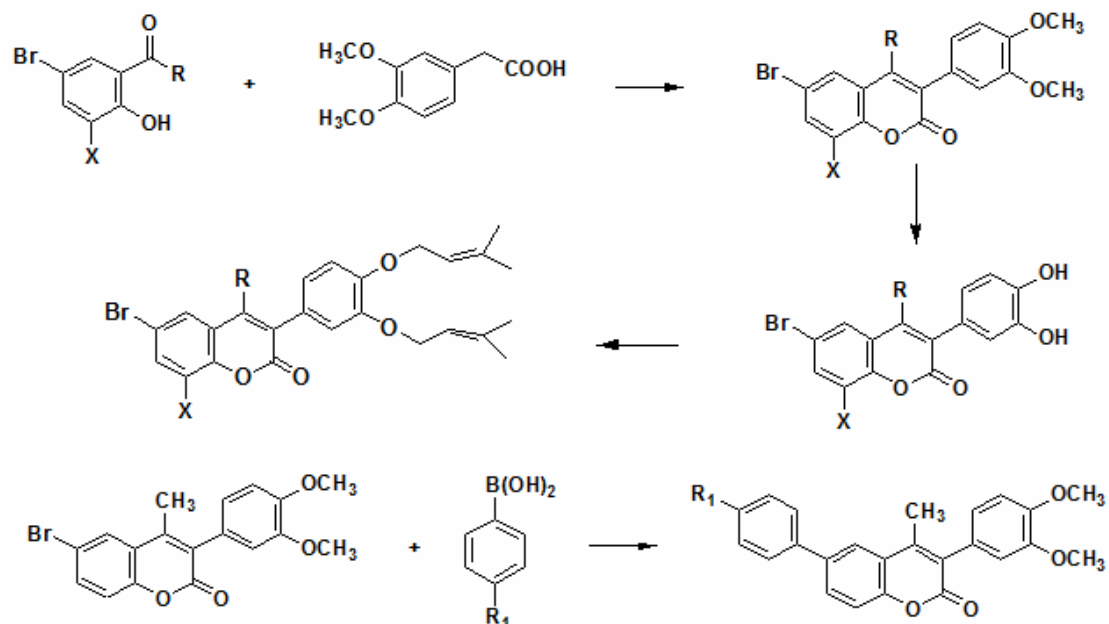
-Διερευνήθηκε η αντίδραση σύζευξης Σουζούκι (Suzuki – Coupling) σε διαφορετικές πειραματικές συνθήκες (βάση, διαλύτης, αναλογία αντιδρώντων, θερμοκρασία) και μελετήθηκε η επίδραση της παρουσίας αρυλο-υποκαταστάτη στη θέση 6 του βενζοπυρονικού δακτυλίου.

-Η δομή όλων των νέων ενώσεων ταυτοποιήθηκε με φασματοσκοπικές μεθόδους (^1H και ^{13}C NMR).

-Τα νέα παράγωγα εξετάστηκαν ως προς την αντιοξειδωτική τους δράση με δύο διαφορετικές *in vitro* μεθόδους (ικανότητα δέσμευσης της δραστικής ρίζας DPPH και αναστολή της λιπιδικής υπεροξειδωσης) και ως προς την ικανότητά τους να αναστέλλουν τη δράση της φυτικής λιποξυγονάσης, ικανότητα που συνδέεται ποιοτικά με την αντιφλεγμονώδη δράση τους.

-Τα αποτελέσματα των βιολογικών δοκιμασιών οδήγησαν σε συμπεράσματα για τη σχέση δομής-βιολογικής δράσης των νέων μορίων. Από τη μελέτη αυτή προσδιορίστηκαν τα δομικά χαρακτηριστικά τριών νέων παραγώγων που συνδυάζουν ισχυρή αντιοξειδωτική και αντιφλεγμονώδη δράση και θα χρησιμεύσουν ως μόρια-οδηγοί για την ανάπτυξη νέων και βελτιωμένων, από άποψη βιολογικών ιδιοτήτων, κουμαρινών.

Μία συνοπτική παρουσίαση της συνθετικής πορείας που ακολουθήθηκε είναι η εξής:



Λέξεις Κλειδιά: κουμαρίνες, αντιοξειδωτική δράση, αντιφλεγμονώδης δράση, suzuki

Abstract

Coumarins are benzopyrone analogues widely distributed in nature. The fused heterocyclic framework of coumarins has served as the prototype scaffold for the synthesis of a wide variety of analogues in order to investigate their biological activity. In the literature, coumarins constitute an important class of naturally occurring compounds many of which exhibit a remarkable range of biological properties including antioxidant, anticancer, vasorelaxant, antiviral and anti-inflammatory activities. Moreover, several synthetic coumarin derivatives have important pharmacological potential as they proved to be efficient inhibitors of a variety of enzymes such as the human 5-lipoxygenase, aromatase and horseradish peroxidase.

Our work aims at the synthesis of novel bioactive compounds via an efficient one-step novel synthetic approach towards 3-aryl-coumarin derivatives and the evaluation of their antioxidant and lipoxygenase inhibitory activity. The new series of coumarins, bearing a substituted phenyl ring on position 3, were synthesized through an intramolecular condensation reaction of 2-hydroxyacetophenones and 2-hydroxybenzaldehyde with imidazolyl phenylacetic acid active intermediates.

Additionally, in order to further investigate the structural requirements that enhance dual antioxidant and anti-inflammatory activity, we studied the structural requirements for efficient LOX inhibitory and lipid peroxidation activity of the new molecules. Demethylation of the synthesized coumarins, as well as prenylation and Suzuki coupling reactions were investigated, in order to examine the influence of these structural features on the biological activity of the new coumarin analogues.

The *in vitro* antioxidant activity of the synthesized compounds was evaluated using two different antioxidant assays (radical scavenging ability of DPPH stable free radical and inhibition of lipid peroxidation induced by the thermal free radical AAPH). Moreover, the ability of the compounds to inhibit soybean lipoxygenase was determined as an indication of potential anti-inflammatory activity.

Περιεχόμενα

	Κεφάλαιο 1^ο	
	Φυσικά Προϊόντα και Κουμαρίνες	
1.1	Φυσικά Προϊόντα	9
1.2	Κουμαρίνες	10
	1.2.1 Ορισμός	10
	1.2.2 Γενική Δομή	10
	1.2.3 Κυριότερες μέθοδοι σύνθεσης κουμαρινών	14
	1.2.4 Εφαρμογές και χρήσεις κουμαρινικών αναλόγων	18
	1.2.5 Βιολογική δράση φυσικών και συνθετικών κουμαρινών	19
	Κεφάλαιο 2^ο	
	Σχεδιασμός, σύνθεση και ταυτοποίηση των νέων ενώσεων	
2.1	Σχεδιασμός των νέων παραγώγων	25
2.2	Δομικές τροποποιήσεις	29
	2.2.1 Αποπροστατευμένες και αλκυλιωμένες κουμαρίνες	29
	2.2.2 Suzuki coupling	33
2.3	Φασματοσκοπική Μελέτη	37
2.4	Ταυτοποίηση των νέων ενώσεων	38
	Κεφάλαιο 3^ο	
	Πειραματικό Μέρος	
3.1	Όργανα και συσκευές	45
3.2	Συνθετική Πορεία των νέων ενώσεων	46
	3.2.1 Γενική μέθοδος σύνθεσης κουμαρινών 3a-3c	46
	3.2.2 Γενική μέθοδος σύνθεσης αποπροστατευμένων κουμαρινών 4a-4c	48
	3.2.3 Γενική μέθοδος σύνθεσης πρενυλιωμένων κουμαρινών 5a-5c	51
	3.2.4 Γενική Μέθοδος σύνθεσης κουμαρινών 7a και 7b με αντίδραση σύζευξης Suzuki	53
	Κεφάλαιο 4^ο	
	Αποτελέσματα και Συζήτηση	
4.1	Αντιφλεγμονώδης δράση των νέων ενώσεων	56
	4.1.1 Ταξινόμηση των αναστολέων της 5-LO	57
	4.1.2 Παραδείγματα μορίων με αντιφλεγμονώδη δράση	58
4.2	Αντιοξειδωτική δράση των νέων ενώσεων	60
	4.2.1 Αναστολή λιπιδικής υπεροξειδωσης	61
	4.2.2 Προσδιορισμός της αναγωγής της σταθερής ρίζας DPPH	63
4.3	Βιοδοκιμές	63
4.4	Συμπεράσματα	66
	Βιβλιογραφία	68
	Παράρτημα Φασμάτων	

Κατάλογος Σχημάτων

- Σχήμα 1:** Η δομή της α-πυρόνης και η γενική δομή κουμαρινών (σελ. 10)
- Σχήμα 2:** Η κουμαρίνη και η αρίθμηση των θέσεων της (σελ. 11)
- Σχήμα 3:** Οικογένειες φυτών με είδη που περιέχουν κουμαρίνη (σελ. 12)
- Σχήμα 4:** Η 7-υδροξυκουμαρίνη (σελ. 12)
- Σχήμα 5:** Το ψωραλλένιο, η αγγελικίνη και ο φουρανικός δακτύλιος (σελ. 13)
- Σχήμα 6:** Οι δύο χαρακτηριστικές πυρανοκουμαρίνες (σελ. 13)
- Σχήμα 7:** Καλανολίδα και πυρανονο-κουμαρίνη (σελ. 14)
- Σχήμα 8:** Ο μηχανισμός της συμπύκνωσης Pechmann [Fylaktakidou 1997] (σ. 15)
- Σχήμα 9:** Στάδια της αντίδρασης Perkin [Herworth 1984] (σελ. 16)
- Σχήμα 10:** Η δομή της δικουμαρόλης (σελ. 20)
- Σχήμα 11 :** Οι δομές της εσκουλετίνης, της φραξετίνης και της δαφνετίνης (σ. 22)
- Σχήμα 12:** Το 2,2-διμεθυλο-8-οξο-3,8-διυδρο-2H-φουρο[2,3-h]χρωμεν-6-καρβοξυλικό μεθύλιο (σελ. 23)
- Σχήμα 13:** η 3,4-υποκατεστημένη κουμαρίνη (σελ. 23)
- Σχήμα 14:** 6-βρωμο-3-(3,4-διμεθοξυφαινυλο)-4-μεθυλο-χρωμεν-2-όνη με αξιόλογη αντιοξειδωτική και αντιφλεγμονώδη δράση (σελ. 25)
- Σχήμα 15 :** Ανάλογα κουμαρινών της Σειράς Α. (σελ. 26)
- Σχήμα 16 :** Αντίδραση σύνθεσης κουμαρινών όπου (i) CDI, CH₂Cl₂, rt; (ii) DBU, CH₂Cl₂, rt. (σελ. 27)
- Σχήμα 17:** Αναλυτικός μηχανισμός της τροποποιημένης συμπύκνωσης Pechmann (σελ. 27)
- Σχήμα 18 :** οι κουμαρίνες της σειράς Β (σελ. 29)
- Σχήμα 19:** Γενική Μέθοδος αποπροστασίας κουμαρινών (σελ. 30)
- Σχήμα 20:** Γενική Μέθοδος σύνθεσης πρενυλιωμένων κουμαρινών (σελ. 31)
- Σχήμα 21:** Ο μηχανισμός της αλκυλίωσης (σελ. 31)
- Σχήμα 22 :** Κουμαρινικά ανάλογα της Σειράς Γ (σελ. 33)
- Σχήμα 23 :** σύζευξη Suzuki (σελ. 33)

- Σχήμα 24:** Η γενική δομή του βορονικού οξέως (σελ. 34)
- Σχήμα 25:** Μηχανισμός της Suzuki - Coupling (σελ. 34)
- Σχήμα 26:** Γενική αντίδραση σύζευξης Suzuki (σελ. 35)
- Σχήμα 27:** Αντίδραση σύζευξης Suzuki (σελ. 36)
- Σχήμα 28:** Κατάλυση του αραχιδονικού οξέος προς σχηματισμό λευκοτριενίων με τη βοήθεια της 5-λιποξυγενάσης 5-LO (σελ. 56)
- Σχήμα 29:** Οξειδοαναγωγικοί αναστολείς της 5-LO (σελ. 59)
- Σχήμα 30:** Αναστολείς της 5-LO που συμπλοκοποιούν το σίδηρο (σελ. 59)
- Σχήμα 31:** Αναστολείς μη οξειδοαναγωγικού τύπου (σελ. 59)
- Σχήμα 32:** Λικοφελόνη (σελ. 60)
- Σχήμα 33:** Ουσία που αναστέλλει την πρωτεΐνη FLAP (σελ. 60)
- Σχήμα 34:** DPPH (πάνω) και η δράση του, R:ρίζα, A:αντιοξειδωτικό (σελ. 61)
- Σχήμα 35:** Μηχανισμός λιπιδικής υπεροξειδωσης (σελ. 62)
- Σχήμα 36:** Εκκινητής ελευθέρων ριζών (σελ. 62)

Κατάλογος Πινάκων και Εικόνων

Πίνακας 1: Βελτιστοποίηση συνθηκών αντίδρασης Suzuki – Coupling (σελ. 36)

Πίνακας 2: Αποτελέσματα αξιολόγησης βιολογικής δράσης των νέων κουμαρινών (σελ. 64)

Εικόνα 1: Φάσμα ^1H NMR (CDCl_3 , 300MHz) της κουμαρίνης **3a** (σελ. 38)

Εικόνα 2: Φάσμα ^1H NMR (CDCl_3 , 300MHz) της κουμαρίνης **3c** (σελ. 39)

Εικόνα 3: Φάσμα ^{13}C NMR (CDCl_3 , 75MHz) της κουμαρίνης **3c** (σελ. 40)

Εικόνα 4: Φάσμα ^1H NMR (DMSO, 300MHz) της κουμαρίνης **4a** (σελ. 41)

Εικόνα 5: Φάσμα ^1H NMR (CDCl_3 , 300MHz) της κουμαρίνης **5a** (σελ. 42)

Εικόνα 6: Φάσμα ^1H NMR (CDCl_3 , 300MHz) της κουμαρίνης **7a** (σελ. 43)

Εικόνα 7: Φάσμα ^1H NMR (CDCl_3 , 300MHz) της κουμαρίνης **7b** (σελ. 44)

Κεφάλαιο 1^ο: Φυσικά Προϊόντα και Κουμαρίνες

1.1 Φυσικά προϊόντα

Η φύση ως μια πλούσια πηγή φυσικών προϊόντων, έχει προκαλέσει το ζωηρό ενδιαφέρον της επιστημονικής κοινότητας εδώ και δεκαετίες, για το άνοιγμα νέων δρόμων στην παραγωγή φαρμάκων μέσω της έρευνας των φαρμακολογικών ιδιοτήτων των φυτών.

Ως φυσικά προϊόντα αναφέρονται οι ενώσεις που παράγονται από φυτικούς ή ζωικούς οργανισμούς. Από άποψη δομής, καλύπτουν ένα ευρύ φάσμα οργανικών ενώσεων και κατατάσσονται σε κατηγορίες με βάση ορισμένα δομικά χαρακτηριστικά τους (στεροειδή, αλκαλοειδή), τη φυσιολογική τους δράση (αντιβιοτικά, βιταμίνες, ορμόνες), την πηγή από την οποία προκύπτουν καθώς και τη βιοσυνθετική τους πορεία. Τα φυσικά προϊόντα συντίθενται από τη φύση με σκοπό να επιτελέσουν συγκεκριμένες διαδικασίες με επιλεκτικό αλλά και ιδιαίτερα αποτελεσματικό τρόπο, αποτελώντας σημαντικότερη πηγή για την εύρεση και ανάπτυξη νέων φαρμάκων.

Από τον συνολικό αριθμό των φυσικών προϊόντων που μελετώνται ετήσια και τα οποία επιδεικνύουν κάποια αξιοσημείωτη βιολογική δραστικότητα, ένα ελάχιστο ποσοστό (περίπου το 5% του συνόλου του φυτικού βασιλείου) είναι αυτό που θα χρησιμοποιηθεί τελικά για φαρμακευτικούς σκοπούς. Η εξέλιξη επομένως της χημείας έχει δώσει μεγάλη ώθηση στην φαρμακολογική έρευνα, με την ανάπτυξη νέων συνθετικών μεθοδολογιών και τη βελτιστοποίηση των ήδη υπαρχουσών, καθιστώντας δυνατή τη σύνθεση ολοένα μεγαλύτερου αριθμού φαρμακευτικών προϊόντων.

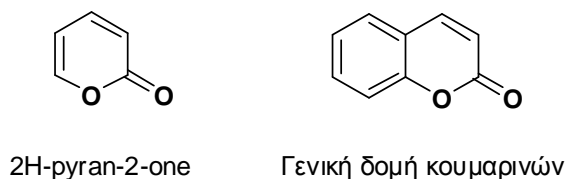
1.2 Κουμαρίνες (χρωμεν-2-όνες)

1.2.1 Ορισμός

Οι κουμαρίνες ή αλλιώς βενζοπυρόνες, είναι μια μεγάλη οικογένεια ενώσεων φυσικής και συνθετικής προελεύσεως που ανήκουν στην κατηγορία των βενζοπυρονών [O'Kennedy et al. 1997] και η επίσημη χημική τους ονομασία είναι χρωμεν-2-όνες (παλαιότερα 1-βενζοπυραν-2-όνες). Καταλαμβάνουν μία σημαντική θέση στον χώρο της φυσικής και της συνθετικής οργανικής χημείας και έχουν απασχολήσει πολλές φορές τους ερευνητές λόγω των πολλαπλών και ποικίλων ιδιοτήτων τους [Murray et al. 1982].

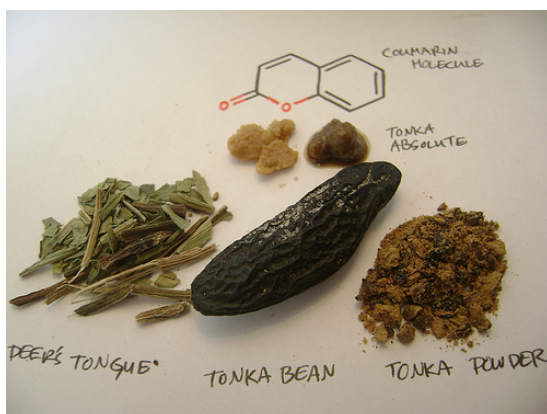
1.2.2 Γενική Δομή

Με το όνομα κουμαρίνη, χαρακτηρίζεται η ένωση η οποία προκύπτει από την συμπύκνωση ενός βενζολικού δακτυλίου με την [e] πλευρά μιας α-πυρόνης. Μια πυρόνη είναι ένας εξαμελής ετεροκυκλικός δακτύλιος με ένα άτομο οξυγόνου και πέντε sp^2 -υβριδοποιημένους άνθρακες (Σχήμα 1).

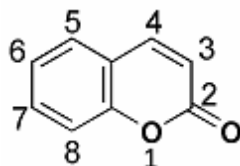


Σχήμα 1: Η δομή της α-πυρόνης και η γενική δομή κουμαρινών

Αρχικά, η απομόνωση φυσικών κουμαρινικών αναλόγων πραγματοποιήθηκε από τη ζύμωση φασολιών τόνκα ή *Coumarouna odorata* σε αλκοόλ, τα οποία είναι γνωστά με την γαλλική ονομασία coumarou, από τα οποία και προήλθε η ονομασία κουμαρίνη. Κουμαρίνη είναι το αποδεκτό εμπειρικό όνομα της ένωσης, ενώ επιπλέον χρησιμοποιούνται τα ονόματα 2H-1-βενζοπυραν-2-όνη και 2H-βενζο[b]πυραν-2-όνη. Άλλα ονόματα είναι 1,2-βενζοπυρόνη, λακτόνη του cis-ο-κουμαρινικού οξέος, κουμαρινικός ανυδρίτης, 2-οξο-1-βενζοπυράνιο και 2H-χρωμεν-2-όνη [Egan et al. 1990].



Η απλούστερη κουμαρίνη **1** (Σχήμα 2), απομονώθηκε για πρώτη φορά το 1820 από τον Vogel, με σκοπό τη χρήση των αναλόγων ως πρόσθετα γεύσης και αρωμάτων, ενώ παρασκευάστηκε συνθετικά το 1868 από τον Perkin. Το πρώτο όμως γνωστό κουμαρινικό παράγωγο, η δαφνίνη (8-υδροξυ-7-β-D-γλυκοσυλοκουμαρίνη), απομονώθηκε το 1812 και ταυτοποιήθηκε το 1930 [Murray et al. 1982].



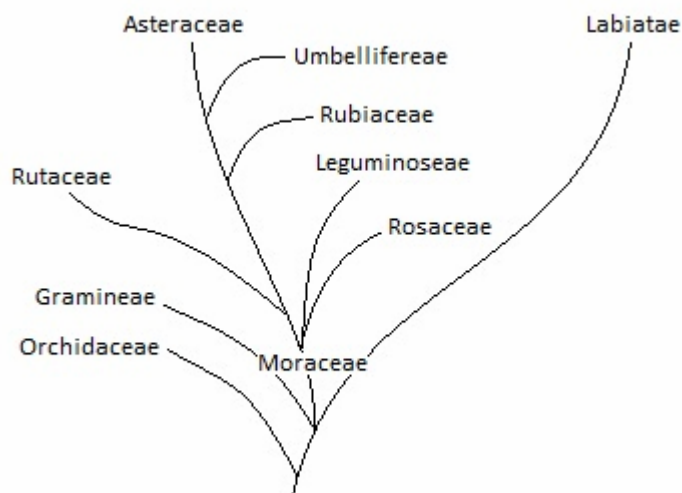
Σχήμα 2: Η κουμαρίνη και η αρίθμηση των θέσεων της

Η κουμαρίνη είναι διάσημη για το άρωμά της που προσομοιάζει βανίλια ή φρεσκοκομμένο γρασίδι. Βρίσκεται σε υψηλές συγκεντρώσεις σε φυτά όπως η λεβάντα, τα



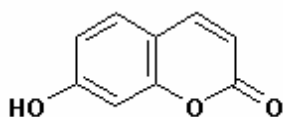
φασόλια τόνκα, το γρασίδι βανίλιας, το γλυκό τριφύλλι, ο γλυκάνισος, η γλυκόριζα και σε πολλά καρποφόρα φυτά όπως τα βερύκοκα, τα κεράσια, οι φράουλες, αλλά και στην κανέλλα. Εντοπίζεται επιπλέον στο φυτό *gallium odoratum* (κοινώς woodruff). Γενικά είναι παρούσα σε πολλές οικογένειες

δικοτυλήδων και άλλων φυτών, κάποιες από τις οποίες φαίνονται στο Σχήμα 3 [Duquenois 1967]. Φυσικά κουμαρινικά ανάλογα έχουν απομονωθεί από συνολικά 800 είδη φυτών και μικροοργανισμών ενώ περισσότερα από 1000 κουμαρινικά παράγωγα έχουν ταυτοποιηθεί [U.S. DoHHS 1992].



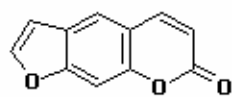
Σχήμα 3: Οικογένειες φυτών με είδη που περιέχουν κουμαρίνη

Οι κουμαρίνες βάση δομής μπορούν να ταξινομηθούν με πολύ γενικό τρόπο σε απλές, φουρανοκουμαρίνες, πυρανοκουμαρίνες, υποκατεστημένες στον πυρονικό δακτύλιο και πιο πολύπλοκες (και συνήθως τεχνητές) κουμαρίνες. Οι απλές κουμαρίνες περιλαμβάνουν την 7-υδροξυκουμαρίνη (Σχήμα 4) που είναι και η απλούστερη κουμαρίνη και όλα τα υδροξυ-, αλκοξυ- και αλκυλο- υποκατεστημένα (στο βενζολικό δακτύλιο) παράγωγά της, καθώς και τους αντίστοιχους γλυκοζίτες.

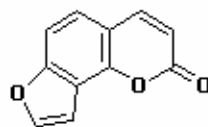


Σχήμα 4: Η 7-υδροξυκουμαρίνη

Οι φουρανοκουμαρίνες περιλαμβάνουν το ψωραλλένιο και την αγγελικίνη (Σχήμα 5) και τα παράγωγά τους που φέρουν υποκαταστάτες στον φουρανικό, στον πυρονικό ή στον βενζολικό δακτύλιο. Αυτό που τις διακρίνει είναι η ύπαρξη του πενταμελή φουρανικού δακτυλίου.



ψωραλλένιο



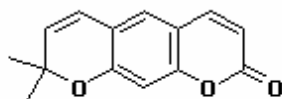
αγγελικίνη



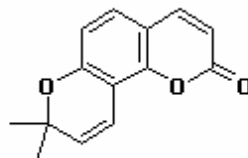
φουρανικός δακτύλιος

Σχήμα 5: Το ψωραλλένιο, η αγγελικίνη και ο φουρανικός δακτύλιος

Από την άλλη, η παρουσία ενός εξαμελούς (πυρανοκού) δακτυλίου διακρίνει τις πυρανοκουμαρίνες. Όπως και στην περίπτωση των φουρανοκουμαρινών, υπάρχουν γραμμικοί και γωνιακοί τύποι μορίων. Παράδειγμα αποτελεί η ξανθυλετίνη και η σεσελίνη (Σχήμα 6).



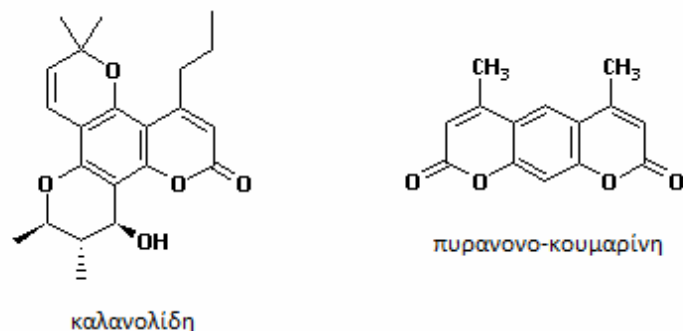
ξανθυλετίνη



σεσελίνη

Σχήμα 6: Οι δύο χαρακτηριστικές πυρανοκουμαρίνες

Πολλές κουμαρίνες δεν εντάσσονται στις παραπάνω κατηγορίες λόγω των συνθετότερων δομών τους (συνθετότεροι υποκαταστάτες ή άλλοι συμπυκνωμένοι δακτύλιοι). Δύο τυπικά παραδείγματα συνθετότερων κουμαρινών είναι η καλανολίδα [Kashman et al. 1992] και η πυρανονο-κουμαρίνη [Osborne 1983] (Σχήμα 7).



Σχήμα 7: Καλανολίδη και πυρανονο-κουμαρίνη

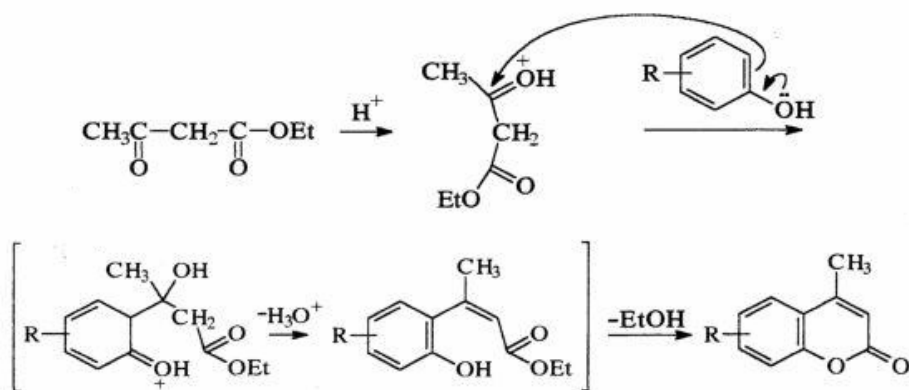
Παράγωγα κουμαρίνης αναφέρονται ως καταστολείς της όρεξης, κάτι που υποδηλώνει πως ίσως η αιτία της διάδοσής της στα φυτά και ειδικά στο γρασίδι και το τριφύλλι, να είναι το γεγονός ότι μειώνει τις επιπτώσεις της βοσκής κοπαδιών σε αυτά τα λιβάδια αλλά και το ότι λειτουργεί ως απωθητικό στα σκαθάρια και σε άλλα ασπόνδυλα. Επίσης, αυτή η διάδοση φαίνεται να συσχετίζεται και με την ικανότητα της να αναστέλλει την αναπαραγωγή μυκήτων στα φυτά [O’Kennedy et al. 1997]. Παρ’ όλο που η ουσία έχει μία ευχάριστη γλυκιά οσμή (που ευθύνεται για πολλά από τα ονόματά τους), αυτά τα φυτά δεν έχουν γλυκιά αλλά περισσότερο πικρή γεύση, κάτι που ωθεί τα ζώα στο να την αποφεύγουν, όταν είναι δυνατό.

1.2.3 Κυριότερες μέθοδοι σύνθεσης κουμαρινών

Δεδομένης της σημαντικής θέσης που κατέχουν οι κουμαρίνες στο χώρο της φυσικής και της συνθετικής χημείας, έχει υπάρξει μεγάλο ενδιαφέρον για την εύρεση και την ανάπτυξη μεθόδων με τις οποίες να επιτυγχάνεται η ακριβής και αποτελεσματική παραγωγή συνθετικών κουμαρινών. Οι τεχνικές που έχουν αναπτυχθεί σε αυτό τον ενάμιση αιώνα χημικής σύνθεσης κουμαρινών είναι πολυπληθείς και περιλαμβάνουν ποικίλους μηχανισμούς. Η κάθε μία ανταποκρίνεται σε συγκεκριμένα κριτήρια και έχει συγκεκριμένα πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα. Επίσης εφαρμόζονται συχνά πολλές τροποποιήσεις σε ήδη γνωστές μεθόδους οι οποίες στοχεύουν να τις κάνουν καταλληλότερες για τις ανάγκες της κάθε ερευνητικής προσπάθειας. Για τις ανάγκες θεωρητικής θεμελίωσης της παρούσας εργασίας αρκεί να αναφερθούν οι κυριότερες μέθοδοι χημικής σύνθεσης κουμαρινών, οι οποίες είναι η αντίδραση Perkin [Johnson 1942], η συμπύκνωση Pechmann [Pechmann et al. 1884] και οι αντιδράσεις Knoevenagel [Jones 1967; Brufola et al. 1996], Reformatsky [Shriner 1942] και Wittig [Narasimahan et al. 1979].

ο Συμπύκνωση Pechmann

Η αντίδραση Pechmann είναι η πιο ευρέως διαδεδομένη μέθοδος σύνθεσης κουμαρινών καθώς περιλαμβάνει την συμπύκνωση φαινόλων με β-κετονικούς εστέρες με παρουσία διαφόρων όξινων παραγόντων συμπύκνωσης δίνοντας σε καλές αποδόσεις 4-υποκατεστημένες κουμαρίνες [Sethna et al. 1953; Russell et al. 1941]. Ειδικότερα, η αντίδραση ξεκινάει με ηλεκτρονιόφιλη αρωματική υποκατάσταση στη φαινόλη (Σχήμα 8). Η πορεία της αντίδρασης εξαρτάται από το είδος του β-κετοεστέρα, την όξινη κατάλυση και τους υποκαταστάτες της φαινόλης. Φαινόλες [Sethna et al. 1953] με υποκαταστάτες δέκτες ηλεκτρονίων δεν ευνοούν γενικά τη συμπύκνωση. Υποκαταστάτες δότες ηλεκτρονίων σε μετα- θέση ως προς το -OH την ευνοούν, ενώ σε ορθο- και παρα- θέσεις δεν επηρεάζουν καθόλου τη δραστηριότητα της φαινόλης.



Σχήμα 8: Ο μηχανισμός της συμπύκνωσης Pechmann [Fylaktakidou 1997]

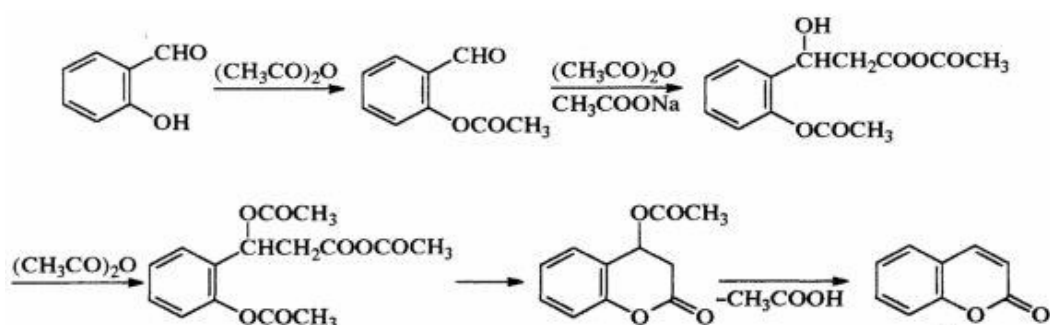
Έχουν χρησιμοποιηθεί διάφοροι όξινοι καταλύτες στην αντίδραση Pechmann συμπεριλαμβανομένων του θειικού οξέος [Pechmann et al. 1884], του φωσφορικού πεντοξειδίου [Simmonis et al. 1914], του χλωριούχου αργιλίου [Sethna et al. 1938], του τριφθοροξικού οξέος [Woods et al. 1962] και πολλών άλλων [Sethna et al. 1953]. Παρ' όλα αυτά οι παραπάνω καταλύτες πρέπει να χρησιμοποιηθούν σε περίσσεια. Επιπλέον, η δημιουργία όξινων αποβλήτων οδηγεί στην ρύπανση του περιβάλλοντος.

Με την ταχεία ανάπτυξη στον τομέα της συνθετικής οργανικής χημείας, οι ερευνητές (ακαδημαϊκοί και βιομηχανικοί) έχουν αρχίσει να σκέπτονται σοβαρά περί των καταστροφικών συνεπειών των διεργασιών και χημικών που δεν είναι φιλικά προς το περιβάλλον. Ανέπτυξαν επιτυχώς πολλές περιβαλλοντικά αβλαβείς διαδικασίες για την αποφυγή, ή τουλάχιστον την ελαχιστοποίηση, αυτών των συνεπειών.

Παρ' όλα αυτά, μειονέκτημα της μεθόδου είναι ο σχηματισμός ισομερών προϊόντων ως προς τη θέση συγκρότησης του λακτονικού δακτυλίου [Osborne 1983] και άλλων παραπροϊόντων, όπως επίσης και ο σχηματισμός γ-πυρονών ειδικά με τη χρήση ενώσεων του φωσφόρου ως αντιδραστηρίων συμπύκνωσης. Επίσης, η αντίδραση Pechmann δεν θεωρείται κατάλληλη για φαινόλες ευαίσθητες στα οξέα. Πλεονέκτημα της είναι οι απλές πρώτες ύλες. Για το λόγο αυτό χρησιμοποιείται αρκετά συχνά και σήμερα. [Kucherenko et al. 1995; Confalone 1983; Hoefnagel et al. 1995; Crombie et al. 1987]

ο Αντίδραση Perkin

Μία άλλη κλασική μέθοδος παρασκευής κουμαρινών είναι η αντίδραση Perkin, η οποία πραγματοποιείται με θερμική αντίδραση σαλικυλικής αλδεΐδης με οξικό ανυδρίτη παρουσία οξικού νατρίου. [Johnson 1942]



Σχήμα 9: Στάδια της αντίδρασης Perkin [Herworth 1984]

Από την πρώτη εφαρμογή της μεθόδου για την παραγωγή κουμαρίνης το 1868, έχουν συντεθεί χημικά πολλές από τις φυσικές κουμαρίνες. Η σύνθεση κουμαρινών με μεθόξυ- ή υδρόξυ- ομάδες ακόμα συνηθίζεται να γίνεται με την αντίδραση Perkin, παρ' όλες τις χαμηλές αποδόσεις.

Δεδομένου ότι ο σχηματισμός της πυρόνης είναι το σημαντικότερο βήμα σε πολλές από τις συνθέσεις κουμαρινών, έχουν αναπτυχθεί διάφορες μέθοδοι για την εισαγωγή χαρακτηριστικών ομάδων σε αυτή την δομή. Μία προσέγγιση είναι η προετοιμασία φαινόλης με τους επιθυμητούς υποκαταστάτες της κουμαρίνης. Διαφορετικά, μπορεί να προηγηθεί ο σχηματισμός του δομικού πυρήνα της κουμαρίνης και στην συνέχεια να προστεθούν οι κατάλληλοι υποκαταστάτες με αλκυλίωση άνθρακα ή οξυγόνου [O'Kennedy et al. 1997].

Από την άλλη, κάποια μειονεκτήματα της μεθόδου αυτής είναι η δυσκολία παρασκευής των απαραίτητων πρώτων υλών (υποκατεστημένες ο-υδροξυ-βενζαλδεΐδες) και οι χαμηλές αποδόσεις που οφείλονται στο γεγονός ότι οι δραστικές συνθήκες που απαιτούνται (παρατεταμένη θέρμανση στους 150-200°C) οδηγούν στο σχηματισμό ρητινωδών προϊόντων. Η μέθοδος εμφανίζεται στη σύγχρονη βιβλιογραφία, [Worden et al. 1970; Marx et al. 1975; Cotterill et al. 1994] και με παραλλαγές, π.χ. με χρήση 1,8-διαζαδικυκλο[5.4.0]ενδεκ-7-ενίου, DBU [Kawase et al. 1978] αντί οξικού νατρίου. Τέτοιες παραλλαγές ενδεχομένως άρουν τα παραπάνω μειονεκτήματα.

Το φανερό πλεονέκτημα είναι ότι δεν υπάρχει αμφιβολία για τη δομή του προϊόντος αφού δεν είναι δυνατός ο σχηματισμός ισομερών προϊόντων λόγω της παρουσίας σε συγκεκριμένες θέσεις του αρωματικού δακτυλίου, των υποκαταστατών που συμμετέχουν στο σχηματισμό του λακτονικού δακτυλίου.

ο **Λοιπές Μέθοδοι Σύνθεσης Κουμαρινών**

Εκτός των δύο βασικών μεθόδων που προαναφέρθηκαν, έχει αναπτυχθεί μία πληθώρα άλλων μεθόδων σύνθεσης κουμαρινών. Μία ευρέως χρησιμοποιημένη είναι η μέθοδος Knoevenagel. Οι 2-υδροξυ-βενζαλδεΐδες δίνουν αντιδράσεις συμπύκνωσης με ενώσεις που έχουν ενεργή μεθυλενική ομάδα. Ο μηλονικός διαιθυλεστέρας, παρουσία καταλυτικής ποσότητας οργανικής βάσης, μετά από λακτονοποίηση δίνει σαν τελικό προϊόν την 3-καρβαιθοξυ-κουμαρίνη, η αποκαρβοξυλίωση της οποίας δίνει κουμαρίνη μη υποκατεστημένη στις 3,4-θέσεις. [Knoevenagel 1904; Jones 1967]

Στην αντίδραση Wittig, οι ο-υδροξυ-αρωματικές αλδεΐδες ή οι ο-υδροξυ-αρωματικές κετόνες αντιδρούν με αλκοξυκαρβονυλομεθυλενοτριφαινυλοφωσφοράνια, $\text{Ph}_3\text{P}=\text{C}(\text{R}^1)\text{COOR}$, και δίνουν κουμαρινικά παράγωγα [Mali et al. 1977]. Αρχικά με την αντίδραση Wittig σχηματίζεται ο trans-ο-υδροξυ-κινναμμωμικός εστέρας, που στην συνέχεια ισομερίζεται θερμικά ή φωτοχημικά προς το cis-ισομερές και λακτονοποιείται προς κουμαρίνη.

Κουμαρίνες μπορούν να παρασκευαστούν σε υψηλές αποδόσεις κατά την οξειδωση υπερχλωρικών αλάτων του βενζοπυριλίου με διοξείδιο του μαγγανίου σε χλωροφόρμιο ή ακετονιτρίλιο. Κουμαρινικά ανάλογα προκύπτουν επιπλέον και από ο-κινονομεθίδια με ενδιάμεση προσθήκη τύπου Michael [Smith et al. 1946]. Κινονομεθίδια που προέρχονται

από αντίδραση ο-κινόνης και αλκοξυκαρβονυλομεθυλενοτριφαινυλοφωσφορανίων, $\text{Ph}_3\text{P}=\text{CHCOOR}$, υπόκεινται επίσης σε προσθήκη Michael ενός δεύτερου μορίου υλιδίου και δίνουν 4-καρβοαιθοξυκουμαρίνες, οι οποίες μπορούν να αποκαρβοξυλωθούν προς 3- και 4- μη υποκατεστημένες κουμαρίνες [Bestmann et al. 1969; Nicolaidis et al. 1992; Nicolaidis et al. 1990; Nicolaidis et al. 1991].

Εκτός από τις αντιδράσεις σύνθεσης των κουμαρινών, συναντώνται στη φύση και στο εργαστήριο πολλές ακόμα χημικές αντιδράσεις που μεταβάλουν την μορφή τους. Με προσθήκες και τροποποιήσεις χαρακτηριστικών ομάδων μπορούν να κατασκευαστούν διάφορες κουμαρίνες, από τις πιο απλές έως και πιο πολύπλοκα μόρια, όπως οι κουμαρινολιγνάνες και οι διμερείς κουμαρίνες. Η ευελιξία δόμησης και τροποποίησης των κουμαρινών, συνεπώς, καθιστά την εξερεύνηση νέων ιδιοτήτων σε αυτή την οικογένεια μορίων πολύ ελκυστική. [Fylaktakidou 1997]

1.2.4 Εφαρμογές και χρήσεις κουμαρινικών αναλόγων

Η απλούστερη κουμαρίνη **1**, χρησιμοποιείται συχνότατα στη βιομηχανία λόγω της έντονης και ευχάριστης οσμής της. Κάποιες από τις ποικίλες βιομηχανικές της χρήσεις είναι ως σταθεροποιητής αρωμάτων, γλυκαντική ουσία, ενισχυτικό φυσικών ελαίων, πρόσθετο τροφίμων σε συνδυασμό με την βανιλίνη, και σταθεροποιητής αρώματος-οσμής στον καπνό. Έχει παραδοσιακά χρησιμοποιηθεί ως υποκατάστατο βανίλιας σε διάφορα φαγητά, και ιδιαίτερα στον καπνό για τσιγάρα, παρ' όλο που η χρήση αυτή έχει απαγορευτεί σε κάποιες χώρες. Κάποια παραδοσιακά φαγητά φτιάχνονται με φυτά που περιέχουν κουμαρίνη, η οποία είναι ξεκάθαρα σημαντικός αρωματικός-γευστικός παράγοντας δεδομένου ότι αυτές οι τροφές προετοιμάζονται κατά τρόπο ώστε να συμπυκνώνεται η φυσική κουμαρίνη. Στην Πολωνία και την Γερμανία, φυτά όπως το woodruff προστίθενται στο αλκοόλ για την παραγωγή ενός ποτού με χαρακτηριστική δροσερή, ανοιξιάτικη γεύση που πιθανώς να αποδίδεται στην κουμαρίνη. Αυτά τα προϊόντα δεν είναι γενικά επικίνδυνα στην κατανάλωση, αν και ίσως κάποιος να θελήσει να αποφύγει την κατανάλωση μεγάλων ποσοτήτων αυτών των τροφών. Το ίδιο ισχύει για την θεραπευτική κουμαρίνη ή τα παράγωγά της που θα μπορούσε να συνταγογραφήσει ένας γιατρός.

Ανάλογες χρήσεις με την κουμαρίνη **1** έχουν και ορισμένες απλές κουμαρινικές ενώσεις, π.χ. η 3,4-διϋδροκουμαρίνη χρησιμοποιείται στην βιομηχανία αρωμάτων, η 6-μεθυλοκουμαρίνη ως ενισχυτής αρωμάτων, ενώ η 7-υδροξυ-κουμαρίνη ως προστατευτικό από τον

ήλιο και ως λευκαντικό. Επίσης, διάφορα παράγωγα της κουμαρίνης χρησιμοποιούνται ως επισημαντές ενζύμων.

Υπάρχουν διάφορα παραπροϊόντα κουμαρινών, συμπεριλαμβανομένων της αντιμυκητιακής ουμπελιφερόνης (umbelliferone) που βρίσκεται στα σελινοειδή και σε πολλά άλλα αποκλειστικά φάρμακα, της αγκυκόνης από τον πολύτιμο αγγειακό θεραπευτικό παράγοντα εσκουλίνη από τα αγριοκάστανο (*Aesculus hippocastanum*) και της σκοπολετίνης από την θανατηφόρο οικογένεια του στρύχνου (nightshade ή μελαντόνα). Επιπλέον υπάρχουν τα ισχυρά αγγειοδιασταλτικά khellin και visnagin από το μεσανατολίτικο φυτό khellin (ή *Ammi visnaga*). Το βεργαπτένιο (bergapten), που λαμβάνεται από έλαια περγαμότου (και άλλων εσπεριδοειδών), είναι ακόμα ένα παραπροϊόν της κουμαρίνης (με την προσθήκη δακτυλίου φουρανίου) με διαβόητη εφαρμογή ως αντηλιακός παράγοντας σε πολλές κρέμες ηλιοθεραπείας. Τέλος, ο γλυκάνισος περιέχει σκοπολετίνη, ουμπελιφερόνη, ουμπελιπρενίνη και βεργαπτένιο και λόγω αυτών μπορεί να αλληλεπιδράσει με αντιπηκτική θεραπεία.

Ανάλογα κουμαρινών απαντώνται σε πολλά ακόμα φαρμακευτικά φυτά και βότανα. Για παράδειγμα το φυτό μελιλότος, θεωρείται υπεύθυνο για την αντιφλεγμονώδη δράση του κατά την τοπική εφαρμογή του. Σε εγχειρίδια παραδοσιακής εμπειρικής ιατρικής [O'Kennedy et al. 1997] το συγκεκριμένο φυτό θεραπεύει πληγές, φλεγμονές, αϋπνίες και γενικότερα τον πόνο. Σε πειραματικά ζώα, κατά τη διάρκεια φαρμακολογικών-τοξικολογικών δοκιμών, υψηλές δόσεις κουμαρίνης παράγουν μία δυνατή και σύντομη νάρκωση. Επίσης, οι κουμαρίνες διαπερνούν βιολογικές μεμβράνες και φράγματα. [O'Kennedy et al. 1997]

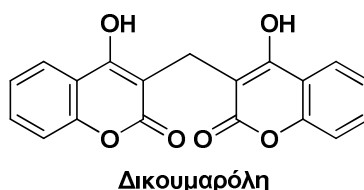
1.2.5 Βιολογική δράση φυσικών και συνθετικών κουμαρινών

Φυσικά αλλά και συνθετικά ανάλογα κουμαρινών, κατέχουν ένα μεγάλο εύρος βιολογικών και φαρμακολογικών ιδιοτήτων, με περιορισμένες όμως εφαρμογές ως φάρμακα. Στην πρόσφατη βιβλιογραφία οι κουμαρίνες αναφέρονται ως βιοδραστικές ενώσεις με ευρεία φαρμακολογική δράση όπως σημαντικές αντι-ιικές, αντι-ογκολογικές [Huang et al. 2011], αντι-υπερτασικές, αντι-οξειδωτικές [Kostova et al. 2001], αντι-αρρυθμικές, αντι-φλεγμονώδεις [Lee et al. 2011], αντι-οστεοπορωσιακές, αντισηπτικές και αναλγητικές δράσεις. Επίσης, χρησιμοποιούνται ευρέως για την θεραπεία του άσθματος [Vasconcelos et al. 2007] καθώς και για την ίαση του λεμφοιδήματος.

Άλλα κουμαρινικά παράγωγα έχουν αντιμυκητιακή και αντιπηκτική δράση, ενώ αποδεδειγμένη βιολογική δράση έχουν διάφορες 3-υποκατεστημένες κουμαρίνες και παράγωγά τους με υποκαταστάτες ετεροκυκλικούς δακτυλίους σε διάφορες θέσεις. Επιπλέον, οι πολυκυκλικές κουμαρίνες που είναι ανάλογα του φαινανθρενίου, του βενζο[α]ανθρακενίου και του βενζο[α]πυρενίου, καθώς και τα μεθυλο-υποκατεστημένα παράγωγά τους χρησιμοποιούνται στη χημική παρεμπόδιση του καρκίνου. Ανάλογα κουμαρινών έχουν επίσης χρησιμοποιηθεί ως αντισπασμολυτικά, σε θεραπείες εγκαυμάτων, αλλά και ως φάρμακα για διάφορες ασθένειες όπως ο καρκίνος, η βρουκέλωση και οι ρευματικές παθήσεις.

Αντιπηκτική δράση

Ισχυρή αντιθρομβωτική δράση εμφανίζει το κουμαρινικό παράγωγο δικουμαρόλη (dicoumarol), ένα προϊόν μεταβολισμού της κουμαρίνης (κάτι που συμβαίνει και στην φύση, σε κάποια είδη μυκήτων) το οποίο απαντάται στο γλυκό τριφύλλι [Stahman et al. 1941].



Σχήμα 10: Η δομή της δικουμαρόλης

Η δικουμαρίνη αυτή ως ισχυρή αντιπηκτική ένωση αποτελεί τη βάση ποντικοφάρμακων με κύριο μηχανισμό δράσης την πρόκληση αιμορραγίας στα τρωκτικά. Κλινικά έγινε διαθέσιμη το 1940-1941, με ευρεία χρήση στην σύγχρονη ιατρική ως αντιπηκτικό φάρμακο. Η φαρμακευτική βιομηχανία στηρίχτηκε στη δικουμαρόλη για την σύνθεση αντιπηκτικών φαρμάκων όπως η βαρφαρίνη (κουμαδίνη) [Watt et al. 2005] αλλά και κάποιων πιο ισχυρών ποντικοφαρμάκων που βασίζονται στην ίδια αντιπηκτική λειτουργία.



Επιπλέον, οι σημαντικές ομοιότητες στη δομή της δικουμαρόλης με την βιταμίνη Κ,

οδήγησε στο συμπέρασμα ότι η ένωση δρα ενάντια στην προθρομβίνη, στην οποία οφείλεται η πήξη του αίματος, γεγονός που κατατάσσει τη δικουμαρόλη στους ανταγωνιστές της βιταμίνης Κ. Το σύνολο των ενώσεων αυτών ανακαλύφθηκε ιστορικά κατά την ανάλυση μίας αιμορραγικής πάθησης βοοειδών που έτρωγαν γλυκό τριφύλλι (sweet clover disease).

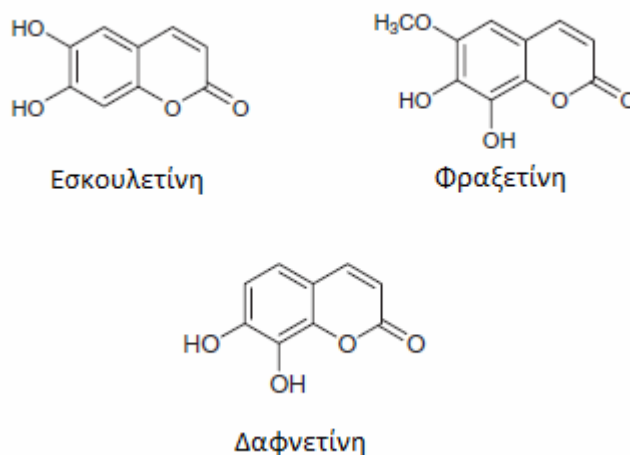
Επίσης, κυρίως λόγω της αντιπηκτικής κουμαρίνης και αιμολυτικών σαπώνων, φυτικά εκχυλίσματα δεν εισάγονται ποτέ κατευθείαν με ένεση στο αίμα του ανθρώπου. Λόγω ανησυχιών για την πιθανή τοξική δράση της κουμαρίνης στο συκώτι και στα νεφρά, έχει απαγορευθεί η χρήση της ως πρόσθετο τροφίμων, ενώ είναι απολύτως ασφαλείς οι τροφές που την περιέχουν φυσικά. Το καλό με τις κουμαρίνες είναι ότι όταν φτάσουν το πεπτικό σύστημα διασπώνται εύκολα σε ακίνδυνες ουσίες και καταναλώνονται από το σώμα. Επιπροσθέτως, δεν χρησιμοποιούνται ποτέ ως αντιπηκτικά στα φυτικά φάρμακα γιατί η απευθείας εφαρμογή τους μπορεί να αποβεί βλαβερή για το σώμα. Από την άλλη, έχουν αντιβακτηριδιακές ιδιότητες και συνεπώς χρησιμοποιούνται για την θεραπεία του πυρετού στις κατσίκες.

Η δεδομένη δραστικότητα των κουμαρινών και οι πολλές και διαφορετικές ιδιότητες που παρουσιάζουν τα διάφορα κουμαρινικά παράγωγα ανάλογα με την δομή τους, έχουν προσελκύσει το ερευνητικό ενδιαφέρον και για τον τομέα των αντιοξειδωτικών και των αντιφλεγμονώδων ιδιοτήτων.

Αντιοξειδωτική και αντιφλεγμονώδης δράση

Το φαρμακολογικό ενδιαφέρον ουσιών που έχουν αντιοξειδωτική και αντιφλεγμονώδη δράση έχει ωθήσει από την μία την μελέτη φυσικών προϊόντων ως προς αυτές τις ιδιότητες και από την άλλη τον σχεδιασμό και την σύνθεση νέων παραγώγων που θα παρουσιάζουν περαιτέρω βελτίωση σε αυτό τον τομέα. Τα τελευταία χρόνια, συνεχίζεται και έχει ενταθεί η έρευνα για το αν υπάρχουν κουμαρίνες με αντιοξειδωτική και με αντιφλεγμονώδη δράση, για το ποιες είναι αυτές και για το ποια είναι τα στοιχεία στην δομή τους που τους την προσδίδουν.

Η εσκουλετίνη (Σχήμα 11), για παράδειγμα, είναι μία φυσική κουμαρίνη παρούσα σε πολλά φαρμακευτικά αλλά και σε τοξικά φυτά που προκύπτει μέσω της διαμοριακής κυκλοποίησης ενός παράγωγου του κινναμωμικού οξέος. Στην πρόσφατη βιβλιογραφία [Phuong Thien Thuong et al. 2009] εξετάστηκε και έδειξε πολύ καλή αντιοξειδωτική δράση, συγκρινόμενη με αυτή της κατεχίνης που είναι γνωστή ουσία αναφοράς σε σχέση με τις αντιοξειδωτικές βιοδοκιμές. Επίσης, μία άλλη φυσική κουμαρίνη, η φραξετίνη (Σχήμα 11) εμφανίζεται σε πολλές ερευνητικές προσπάθειες [Sánchez-Reus et al. 2005; Phuong Thien Thuong et al. 2009] να έχει καλή αντιοξειδωτική δράση, καλύτερη μάλιστα από το καφεϊκό οξύ (επίσης γνωστός αντιοξειδωτικός παράγοντας).

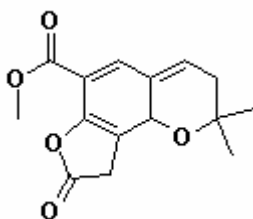


Σχήμα 11 : Οι δομές της εσκουλετίνης, της φραξετίνης και της δαφνετίνης

Ένας άλλος δευτερεύων μεταβολίτης που βρίσκεται σε πολλά βότανα, η δαφνετίνη (Σχήμα 11), έχει παρουσιάσει πολλά διαφορετικά είδη βιολογικών ιδιοτήτων που να παρουσιάζουν ενδιαφέρον για περαιτέρω φαρμακευτική διερεύνηση [Jiménez-Orozco et al.

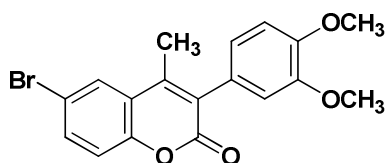
2011]. Εκτός των άλλων έχει και αυτή σημειωθεί για σημαντική αντιοξειδωτική δραστηριότητα με διάφορες αντίστοιχες βιοδοκιμές [Phuong Thien Thuong et al. 2009].

Εκτός από τις φυσικές κουμαρίνες και την διερεύνηση των ιδιοτήτων τους γίνονται εκτεταμένες έρευνες για σύνθεση νέων τεχνητών κουμαρινών, στις οποίες οι επιθυμητές βιολογικές ιδιότητες θα είναι προϊόν σχεδιασμού. Επιπλέον, γίνεται προσπάθεια να συνδυαστεί η ύπαρξη αντιοξειδωτικής με την ύπαρξη και αντιφλεγμονώδους δράσης, συνδυαστική ιδιότητα που κάνει ένα μόριο ακόμα πιο ελκυστικό φαρμακευτικό παράγοντα. Ένα τέτοιο παράδειγμα είναι το 2,2-διμεθυλο-8-οξο-3,8-διυδρο-2H-φουρο[2,3-h]χρωμεν-6-καρβοξυλικό μεθύλιο (Σχήμα 12), το οποίο εκτός από αντιοξειδωτική δραστηριότητα, παρουσίασε και *in vivo* αντιφλεγμονώδη δραστηριότητα [Symeonidis et al. 2009]. Επιπρόσθετη διερεύνηση στις ιδιότητες της κουμαρίνης μπορεί να δώσει ακόμα μεγαλύτερη ώθηση σε ενδεχόμενη περαιτέρω έρευνα. Για παράδειγμα, στην προαναφερθείσα κουμαρίνη, παράλληλα με την μελέτη της αντιοξειδωτικής και αντιφλεγμονώδους δράσης της, εξετάστηκε χωρίς τελικά να παρουσιάσει ελκυστική δραστηριότητα [Symeonidis et al. 2009].



Σχήμα 12: Το 2,2-διμεθυλο-8-οξο-3,8-διυδρο-2H-φουρο[2,3-h]χρωμεν-6-καρβοξυλικό μεθύλιο

Συνδυασμένη αντιοξειδωτική και αντιφλεγμονώδη δράση, παρουσίασε και η 3,4-υποκατεστημένη κουμαρίνη (Σχήμα 13), της οποίας η σύνθεση πραγματοποιήθηκε στο εργαστήριο Οργανικής Χημείας του ΕΜΠ [Roussaki et al. 2010], εμφανίζοντας ικανοποιητική αντιοξειδωτική δράση έναντι της ελεύθερης ρίζας DPPH με ταυτόχρονη ικανότητα αναστολής του ενζύμου λιποξυγονάση.



Σχήμα 13: η 3,4-υποκατεστημένη κουμαρίνη

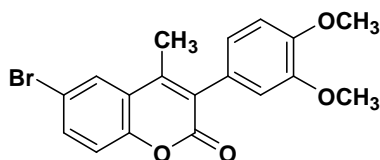
Στο συνδυασμένο αυτό φαρμακολογικό προφίλ του παραπάνω παραγώγου, στηρίχτηκε ο σχεδιασμός και η σύνθεση των νέων κουμαρινικών αναλόγων της διπλωματικής αυτής εργασίας.

Κεφάλαιο 2^ο: Σχεδιασμός, σύνθεση και ταυτοποίηση των νέων ενώσεων

2.1 Σχεδιασμός των νέων παραγώγων

Ο σχεδιασμός της δομής των νέων ενώσεων έγινε με βάση τα επιτυχημένα αποτελέσματα προηγούμενης έρευνας που είχε διεξαχθεί στο Εργαστήριο Οργανικής Χημείας ΕΜΠ [Roussaki et al 2010]. Από το σύνολο των ενώσεων που εξετάστηκαν, η ένωση **3a** (Σχήμα 14), παρουσίασε τη βέλτιστη αντιοξειδωτική δράση συνδυασμένη με ισχυρή ικανότητα αναστολής του ενζύμου λιποξυγονάση από σόγια.

Στην παρούσα εργασία πραγματοποιήθηκε ο σχεδιασμός και η σύνθεση νέων κουμαρινικών αναλόγων, χρησιμοποιώντας την ένωση **3a** ως ένωση-οδηγό. Διερευνήθηκε η επίδραση της προσθήκης διάφορων υποκαταστατών στον αρωματικό δακτύλιο της κουμαρίνης, στη θέση 3 και στη θέση 4 του ετεροκυκλικού δακτυλίου.



3a

Σχήμα 14: 6-βρωμο-3-(3,4-διμεθοξυφαινυλο)-4-μεθυλο-χρωμεν-2-όνη με αξιόλογη αντιοξειδωτική και αντιφλεγμονώδη δράση

Δεδομένου ότι οι θέσεις 3, 4, 6 και 8 στο σύστημα ετεροκυκλικών δακτυλίων της κουμαρίνης φαίνεται να παίζουν τον σημαντικότερο ρόλο στην δράση του μορίου, εξετάστηκαν:

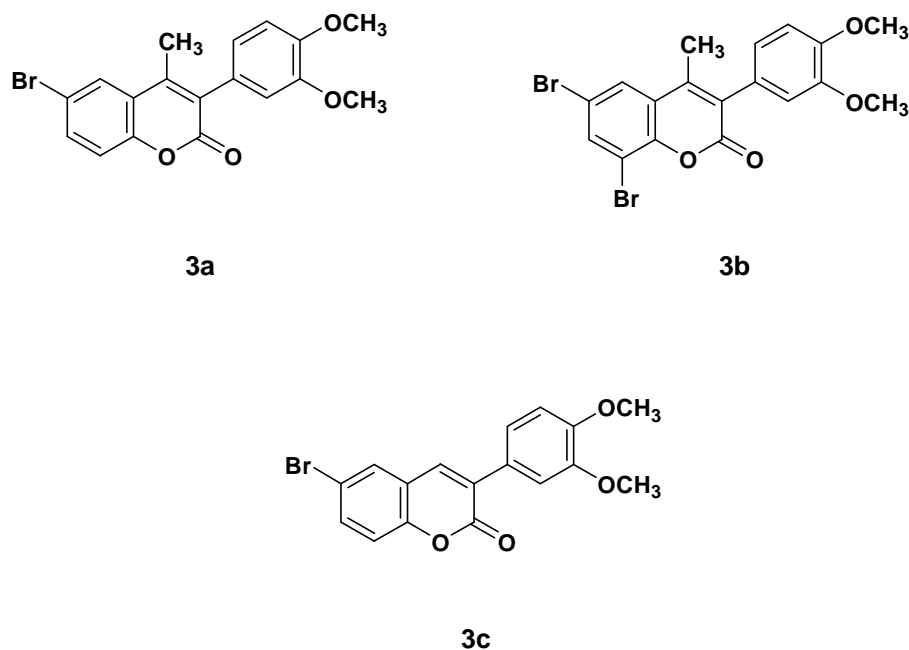
A) η επίδραση του βρωμίου και του μεθυλίου ως υποκαταστατών στις θέσεις 8 και 4 αντίστοιχα, διατηρώντας τη διμεθοξυ-φαινυλο-ομάδα στην θέση 3 και το βρώμιο στην θέση 6 (σειρά A),

Γ) η τροποποίηση των μορίων της σειράς Α όσον αφορά την υποκατάσταση του φαινυλίου της θέσης 3, με διαδοχική αποπροστασία των μεθοξυ-ομάδων και αλκυλίωσή των ελεύθερων υδροξυλίων (σειρά Β) και

Β) η προσθήκη στην θέση 6 ενός επιπλέον δακτυλίου με μία μεθοξυ-ομάδα ή μία αλδεΐδομάδα σε παρα-θέση (σειρά Γ).

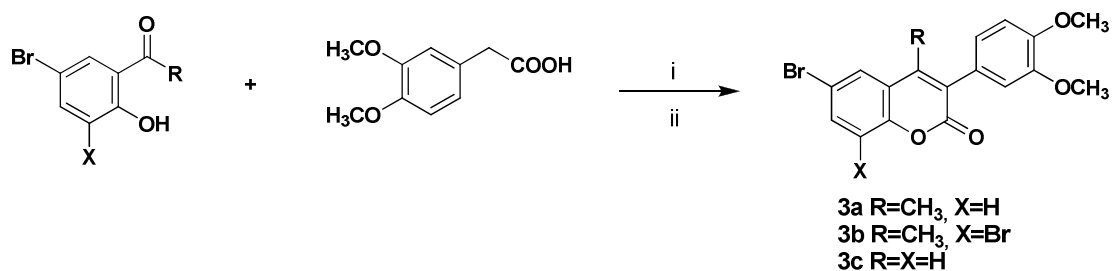
ι. Σειρά Α

Η πρώτη σειρά αποτελείται από τρία νέα παράγωγα, την ήδη γνωστή ως προς την δράση της 6-βρωμο-3-(3,4-διμεθοξυφαινυλο)-4-μεθυλο-χρωμεν-2-όνη (**3a**), την 6,8-διβρωμο-3-(3,4-διμεθοξυφαινυλο)-4-μεθυλο-χρωμεν-2-όνη (**3b**) και την 6-βρωμο-3-(3,4-διμεθοξυφαινυλο)-χρωμεν-2-όνη (**3c**). Στο Σχήμα 15 φαίνεται ξεκάθαρα η προσπάθεια διερεύνησης της επίδρασης της παρουσίας του βρωμίου στη θέση 8 και του μεθυλίου στη θέση 4.



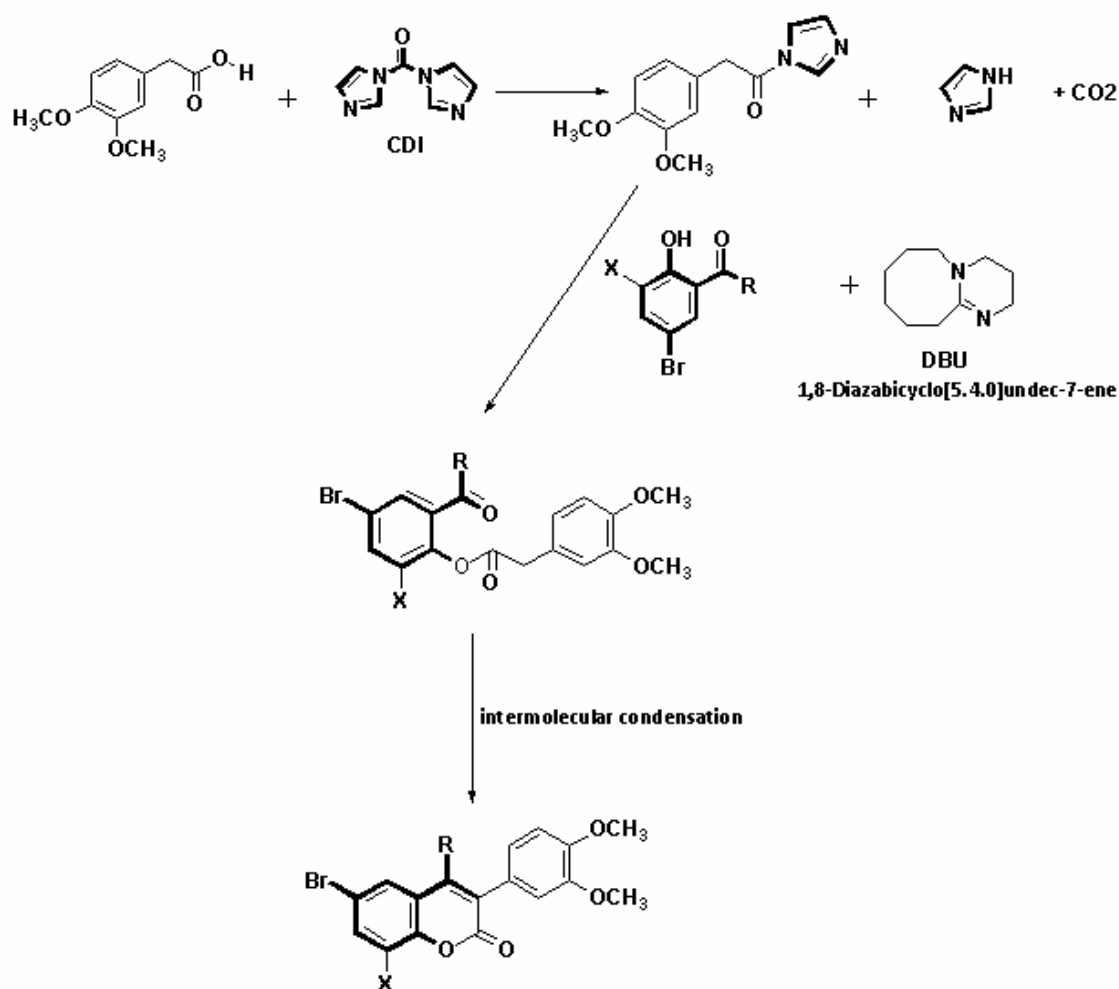
Σχήμα 15 : Ανάλογα κουμαρινών της Σειράς Α.

Η σύνθεση της σειράς Α των κουμαρινών έγινε με τροποποιημένη συμπύκνωση Perkin μεταξύ κατάλληλα υποκατεστημένων 2-υδροξυ-ακετοφαινονών και φαινυλοξικών οξέων (Σχήμα 16). [Roussaki et al 2010]



Σχήμα 16 : Αντίδραση σύνθεσης κουμαρινών όπου (i) CDI, CH₂Cl₂, rt; (ii) DBU, CH₂Cl₂, rt.

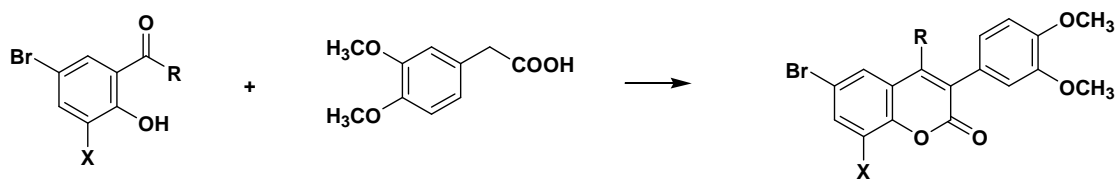
Η σύνθεση επιτυγχάνεται μέσω μίας διαμοριακής αντίδρασης συμπύκνωσης 5-βρομο-2-υδροξυ-ακετοφαινόνης ή 2-υδροξυβενζαλδεΐδης, με μιδαζολίδια φαινυλοξικών οξέων ως ενδιάμεσα. Το μιδαζολίδιο του οξέος αντιδρά σε βασικές συνθήκες με τις υποκατεστημένες 2-υδροξυ-καρβονυλικές ενώσεις σχηματίζοντας τους αντίστοιχους ενδιάμεσους εστέρες οι οποίοι στις συνθήκες της αντίδρασης υφίστανται ενδομοριακή αντίδραση συμπύκνωσης. Ο μηχανισμός της αντίδρασης είναι ο εξής:



Σχήμα 17: Αναλυτικός μηχανισμός της τροποποιημένης συμπύκνωσης Pechmann

Η μεθοδολογία για την σύνθεση των ενώσεων της Σειράς Α επελέγη καθώς πλεονεκτεί έναντι στις παραδοσιακές αντιδράσεις Perkin και Reichmann, ως προς τις ηπιότερες συνθήκες που απαιτούνται, την ασφάλεια και τη διαθεσιμότητα των αντιδρώντων και την ικανοποιητική απόδοση.

Ανακεφαλαιώνοντας, η πορεία σύνθεσης της Σειράς Α είναι η εξής:



1a : X=H, R=CH₃

1b : X=Br, R=CH₃

1c : X=H, R=H

2

3a : X=H, R=CH₃

3b : X=Br, R=CH₃

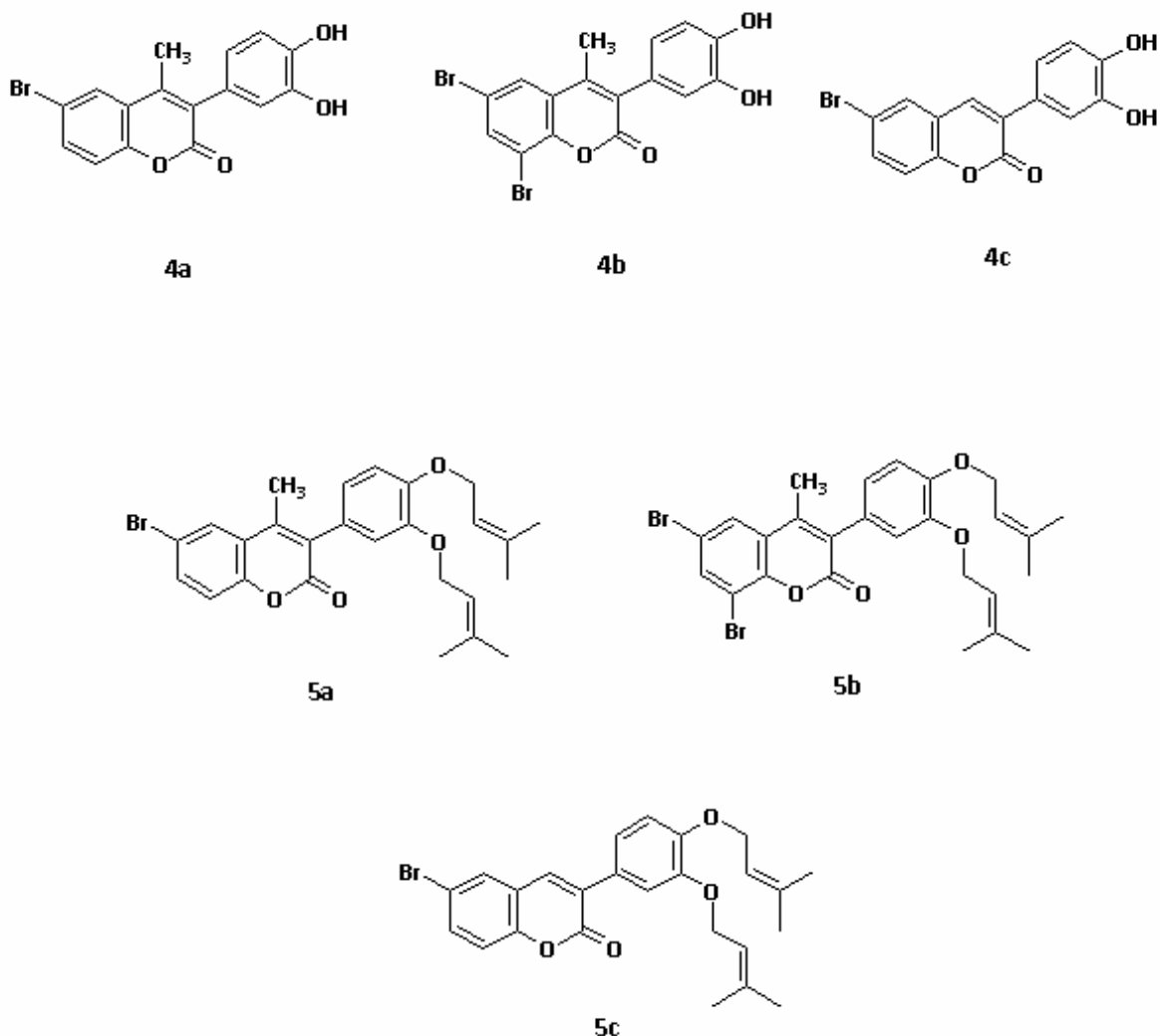
3c : X=H, R=H

2.2 Δομικές τροποποιήσεις

2.2.1 Αποπροστατευμένες και πρενυλιωμένες κουμαρίνες

ii. Σειρά Β

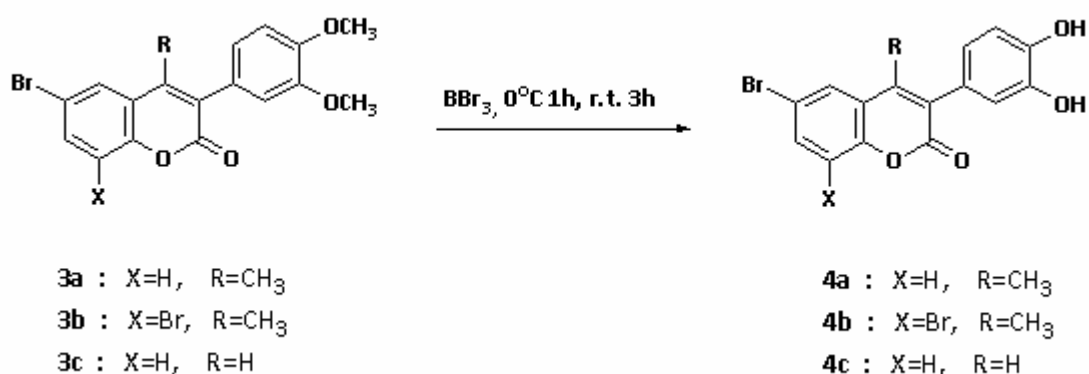
Για την περαιτέρω διερεύνηση του τρόπου που επηρεάζει η δομή την βιολογική δράση, πραγματοποιήθηκαν δύο διαδοχικές τροποποιήσεις στις κουμαρίνες **3a**, **3b** και **3c** με αποτέλεσμα έξι νέα παράγωγα, τα οποία προέκυψαν από αποπροστασία των μεθοξυομάδων των **3a**, **3b** και **3c** και από αλκυλίωση με πρενυλο-ομάδα.



Σχήμα 18 : οι κουμαρίνες της σειράς Β

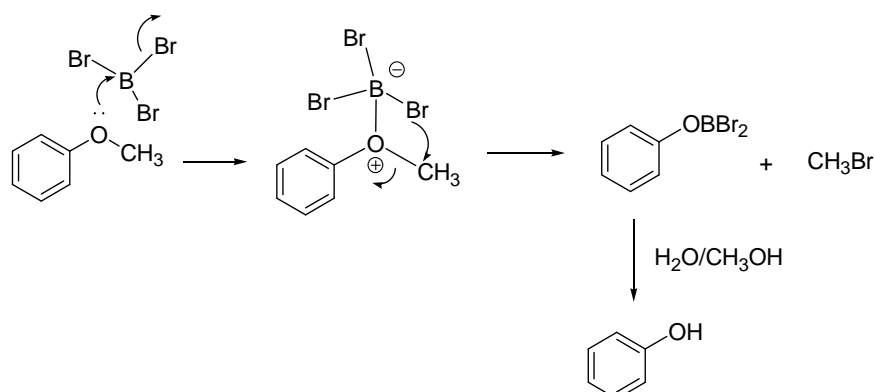
Η αποπροστασία των μεθοξυ-ομάδων του φαινολικού υποκαταστάτη της θέσης 3 οδήγησε στα προϊόντα [6-βρωμο-3-(3,4-διυδροξυφαινυλο)-μεθυλο-χρωμεν-2-όνη (**4a**), 6-διβρωμο-3-(3,4-διυδροξυφαινυλο)-μεθυλο-χρωμεν-2-όνη (**4b**), 6-βρωμο-3-(3,4-διυδροξυφαινυλο)-χρωμεν-2-όνη (**4c**)] μέσω των οποίων διερευνήθηκε η επίδραση της παρουσίας κατεχολικού συστήματος στις επιθυμητές δράσεις των μορίων. Στη συνέχεια συντέθηκαν η 3-[3,4-δι-(3-μεθυλο-βουτ-2-ενυλοξυ)-φαινυλο]-6-βρωμο-4-μεθυλο-χρωμεν-2-όνη (**5a**), η 3-[3,4-δι-(3-μεθυλο-βουτ-2-ενυλοξυ)-φαινυλο]-6,8-διβρωμο-4-μεθυλο-χρωμεν-2-όνη (**5b**) και η 3-[3,4-δι-(3-μεθυλο-βουτ-2-ενυλοξυ)-φαινυλο]-6-βρωμο-χρωμεν-2-όνη (**5c**) με σκοπό την διερεύνηση της επίδρασης της παρουσίας της πρένυλο-ομάδας στη βιολογική δράση. Η ομάδα 'πρένυλ' επιλέχθηκε λόγω της παρουσίας της σε μεγάλο αριθμό φυσικών προϊόντων που εμφανίζουν βιολογική δραστηριότητα.

Συγκεκριμένα, για την αποπροστασία της μεθοξυ-ομάδας, τα παράγωγα **3a**, **3b** και **3c** κατεργάστηκαν με διάλυμα BBr_3 σε άνυδρο διχλωρομεθάνιο (Σχήμα 19) και προέκυψαν τα νέα μόρια **4a**, **4b** και **4c**.

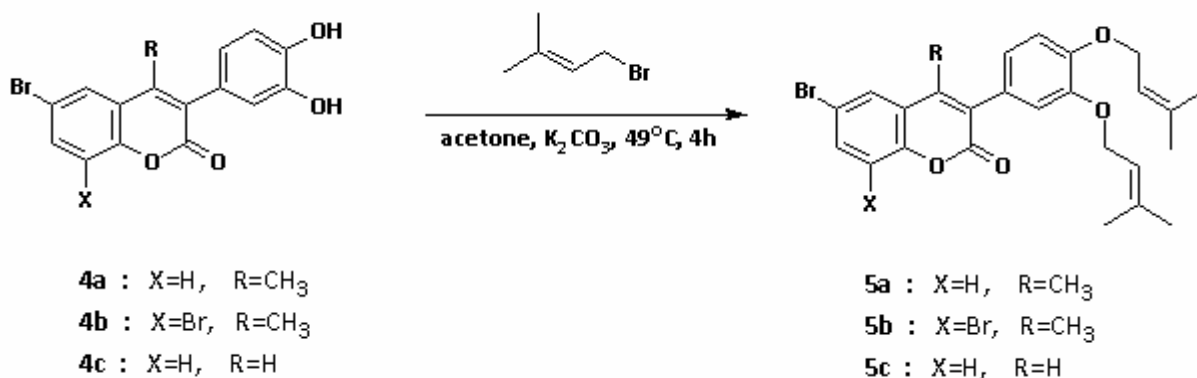


Σχήμα 19: Γενική Μέθοδος αποπροστασίας κουμαρινών

Ο μηχανισμός της απόπροστασίας των ομάδων $-OCH_3$ είναι ο εξής:

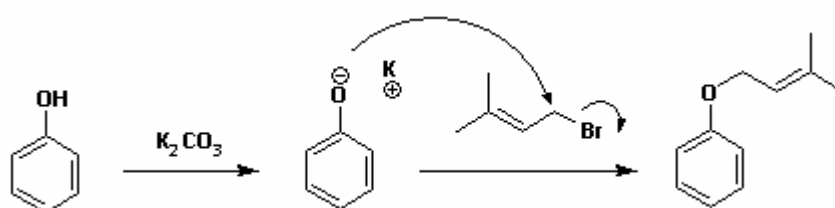


Ακολούθως, οι ενώσεις **4a**, **4b** και **4c** που έχουν δύο υδροξυ-ομάδες στον δακτύλιο της θέσης 3 αντέδρασαν με 3,3-διμεθυλαλλυλο-βρωμίδιο παρουσία ανθρακικού καλίου σε ακετόνη. Από την αλκυλίωση (Σχήμα 20) προέκυψαν τα προϊόντα **5a**, **5b** και **5c**.



Σχήμα 20: Γενική Μέθοδος σύνθεσης πρενυλιωμένων κουμαρινών

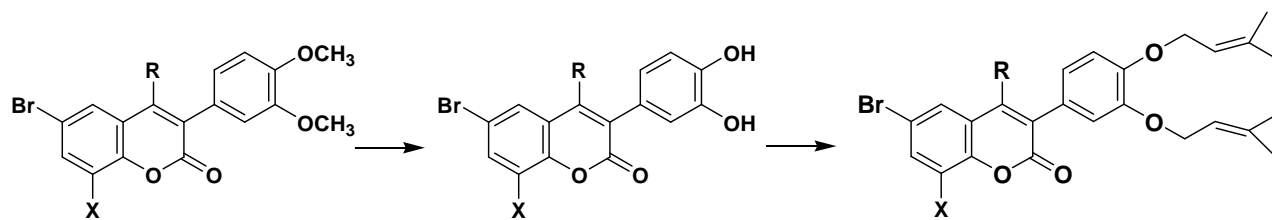
Η αλκυλίωση ακολουθεί το μηχανισμό που φαίνεται στο Σχήμα 21:



Σχήμα 21: Ο μηχανισμός της αλκυλίωσης

Ο μηχανισμός της αλκυλίωσης της υδροξυ-ομάδας εμπεριέχει δύο βήματα. Πρώτα γίνεται σχηματισμός αλκοξειδίου και στην συνέχεια το πυρηνόφιλο αλκοξείδιο προσβάλλει τον ηλεκτρονιόφιλο άνθρακα του πρενυλο-βρωμιδίου μέσω μηχανισμού πυρηνόφιλης υποκατάστασης S_N2.

Ανακεφαλαιώνοντας, η πορεία σύνθεσης για όλη την Σειρά Β είναι η εξής:



3a : X=H, R=CH₃

3b : X=Br, R=CH₃

3c : X=H, R=H

4a : X=H, R=CH₃

4b : X=Br, R=CH₃

4c : X=H, R=H

5a : X=H, R=CH₃

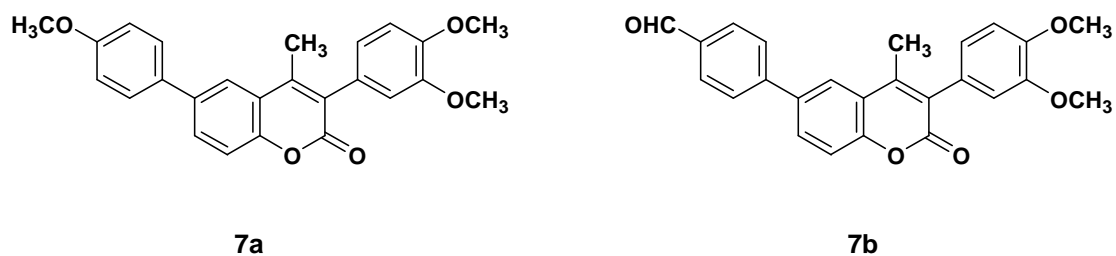
5b : X=Br, R=CH₃

5c : X=H, R=H

2.2.2 Suzuki - coupling

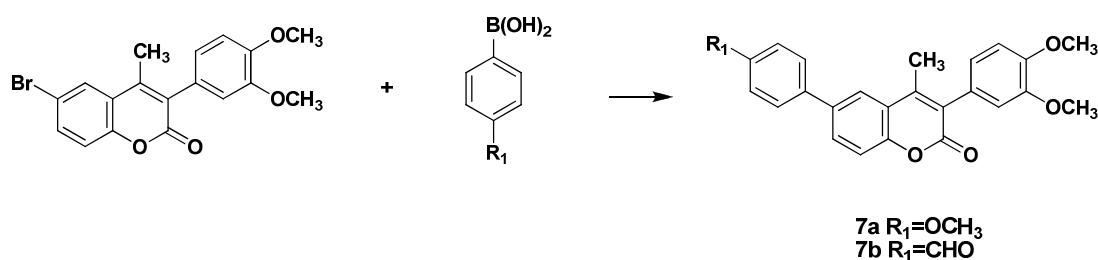
iii) Σειρά Γ

Η σειρά Γ αποτελείται από δύο νέα μόρια, την 3-(3,4-διμεθοξυφαινυλο)-6-(4-μεθοξυφαινυλο)-4-μεθυλο-χρωμεν-2-όνη (**7a**) και την 4-[3-(3,4-διμεθοξυφαινυλο)-4-μεθυλο-2-οξο-2H-χρωμεν-6-υλ]-βενζαλδεΐδη (**7b**). Στα συγκεκριμένα κουμαρινικά παράγωγα, όπως φαίνεται και στο Σχήμα 22, διερευνήθηκε η επίδραση της παρουσίας ενός φαινυλίου στην θέση 6, με υποκαταστάτη σε παρα-θέση του νέου αρωματικού δακτυλίου, στην πρώτη περίπτωση μία μεθόξυ-ομάδα και στην δεύτερη περίπτωση μία αλδεΐδομάδα.



Σχήμα 22 : Κουμαρινικά ανάλογα της Σειράς Γ

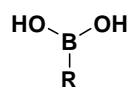
Τα δύο αυτά μόρια συντέθηκαν με σύζευξη Suzuki μεταξύ της ένωσης **3a** και υποκατεστημένων βορονικών οξέων (Σχήμα 23).



Σχήμα 23 : σύζευξη Suzuki

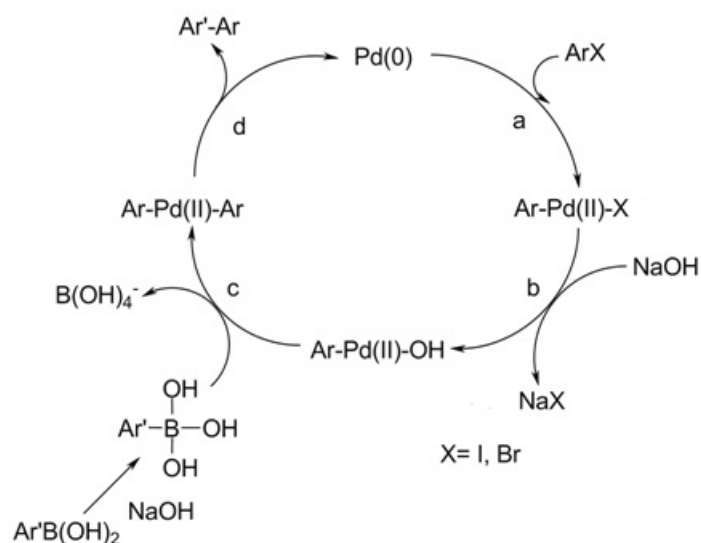
Η αντίδραση Suzuki είναι η καταλυόμενη από παλλάδιο αντίδραση διασταύρωσης [Miyaura et al. 1995] μεταξύ οργανοβορονικών οξέων και αλογονιδίων. Είναι μία δημοφιλής και ευέλικτη αντίδραση που οδηγεί στη δημιουργία απλών δεσμών άνθρακα-άνθρακα μεταξύ φαινυλίων [Hoye et al. 1996].

Ένα βορονικό οξύ είναι ένα αλκυλο- ή αρυλο- υποκατεστημένο βορικό οξύ που περιέχει έναν δεσμό άνθρακα-βορίου και το οποίο ανήκει στην μεγαλύτερη τάξη των οργανοβορανών (organoboranes). Τα βορονικά οξέα λειτουργούν ως κατά Lewis οξέα.



Σχήμα 24: Η γενική δομή του βορονικού οξέως

Ο μηχανισμός της αντίδρασης σύζευξης Suzuki φαίνεται στο Σχήμα 25:



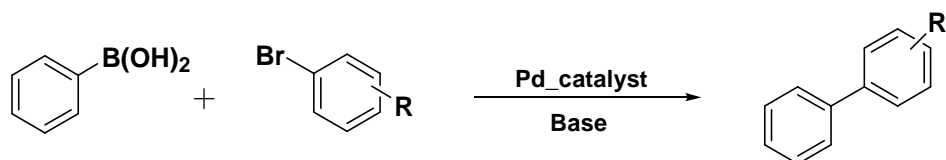
Σχήμα 25: Μηχανισμός της Suzuki - Coupling

Σημαντικά πλεονεκτήματα της μεθόδου είναι οι υψηλές αποδόσεις, οι ήπιες συνθήκες και οι μικροί χρόνοι αντίδρασης. Επίσης, τα βορονικά οξέα είναι αβλαβή, μη τοξικά και αρκετά σταθερά, προσθέτοντας πρακτικό πλεονέκτημα στην σύζευξη Suzuki σε σχέση με άλλες συζεύξεις.

Από την άλλη, το παλλάδιο ως καταλύτης της μεθόδου είναι απαραίτητος για την αντίδραση έστω και του πιο μικρού ποσοστού αντιδραστηρίων. Χωρίς αυτό, η σύζευξη Suzuki σχεδόν δεν έχει απόδοση. Επιπρόσθετα, η μέθοδος παρουσιάζει πρόβλημα σε σχέση με τον καταλύτη, δεδομένης της ταχείας αποσύνθεσής του [Bandgar et al 2004]. Βέβαιη επιτυχία στη χρήση του παλλαδίου ως καταλύτη στην αντίδραση Suzuki έχει καταγραφεί σε μεγάλη ποικιλία συζεύξεων μεταξύ αρυλαλογονιδίων και βορονικών οξέων [Beller et al. 1995]. Στην παρούσα εργασία εξετάζεται η σύζευξη μεταξύ μιας βρωμο-χρωμενόνης και βορονικών οξέων που δεν έχει έως τώρα αναφερθεί στη βιβλιογραφία. Γίνεται λοιπόν

κατανοητό ότι ο ρόλος και η δράση του παλλαδίου είναι κεντρικό κομμάτι της μελέτης και εφαρμογής της σύζευξης Suzuki.

Για τις αντιδράσεις σύζευξης Suzuki χρησιμοποιήθηκε η κουμαρίνη **3a** και κατάλληλα βορονικά οξέα σύμφωνα με τη γενική αντίδραση:



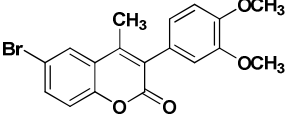
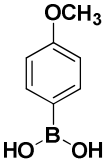
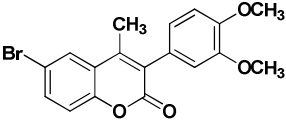
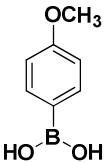
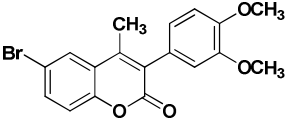
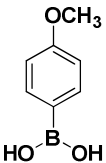
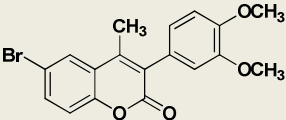
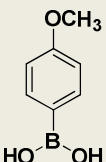
Σχήμα 26: Γενική αντίδραση σύζευξης Suzuki

Προκειμένου να μελετηθούν οι βέλτιστες συνθήκες της αντίδρασης σύζευξης των νέων κουμαρινικών παραγώγων με τα βορονικά οξέα, διερευνήθηκαν όλοι οι παράγοντες, όπως η αναλογία αντιδρώντων/βάσης, είδος βάσης, διαλυτής, θερμοκρασία, χρόνος αντίδρασης. Τα συγκεντρωτικά αποτελέσματα ήταν ιδιαίτερα ενδιαφέροντα, και παρουσιάζονται στον Πίνακα 1.

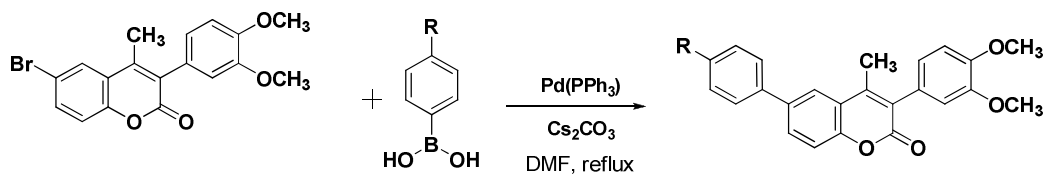
Αρχικά μελετήθηκε η αντίδραση παρουσία της βάσης Na_2CO_3 , σε διαλύτη τολουόλιο στους 115°C , παρουσίαση καταλύτη Pd(OAc)_2 για 24 ώρες. Παρατηρήθηκε ο σχηματισμός του αναμενόμενου προϊόντος της αντίδρασης σύζευξης Suzuki, αλλά σε πολύ μικρή απόδοση. Με τις ίδιες συνθήκες δοκιμάστηκαν και αντιδράσεις παρουσία καταλύτη Pd/C , αλλά χωρίς ικανοποιητικά αποτελέσματα (Πίνακας 1).

Στη συνέχεια εξετάστηκαν διαφορετικές ανόργανες βάσεις, όπως το ανθρακικό ασβέστιο και το ανθρακικό καίσιο παρουσία καταλύτη $\text{Pd(PPh}_3)_3$. Με χρήση ανθρακικού ασβεστίου παρατηρήθηκαν μόνο ίχνη του προϊόντος, ενώ παρουσίας περίσσειας ανθρακικού καυσίου ως βάση (5eq) σε διαλύτη διμεθυλοφορμαμίδιο (DMF) παρατηρήθηκε ο σχηματισμός του επιθυμητού προϊόντος σε ικανοποιητική απόδοση. Η χρήση διαλύτη DMF έναντι του τολουολίου ευνοεί την αντίδραση σύζευξης Suzuki λόγω καλύτερης διαλυτοποίησης των αντιδρώντων και πραγματοποίησης της αντίδρασης σε υψηλότερη θερμοκρασία.

Πίνακας 1: Βελτιστοποίηση συνθηκών αντίδρασης Suzuki – Coupling

Αντιδρών 1	Αντιδρών 2	Βάση	Καταλύτης	Πειραματικές συνθήκες	Απόδοση
	 1.0 eq	Na ₂ CO ₃ 2 eq	Pd(OAc) ₂ 0.01 eq	Toluene reflux 24 ώρες	~25 %
	 2.0 eq	Na ₂ CO ₃ 2 eq	Pd/C 0.01 eq	Toluene reflux 24 ώρες	ίχνη
	 2.0 eq	CaCO ₃ 2 eq	Pd(PPh ₃) ₄ 3%	Toluene reflux 24 ώρες	ίχνη
	 1.5eq	Cs ₂ CO ₃ 5eq	Pd(PPh ₃) ₄ 3%	DMF reflux 24 ώρες	37-39%

Από τη διερεύνηση των συνθηκών της αντίδρασης, προέκυψε ότι οι καλύτερες αποδόσεις λαμβάνονται κατά την αντίδραση του κουμαρινικού παραγώγου **3a** με το κατάλληλο βορονικό οξύ σε αναλογία 1:1.5 eq αντίστοιχα, σε παρουσία περίσσειας ποσότητας βάσης (Cs₂CO₃), με καταλύτη Pd(PPh₃)₄ στη θερμοκρασία βρασμού του διαλύτη DMF (153°C) (Σχήμα 27).



Σχήμα 27: Αντίδραση σύζευξης Suzuki

2.3 Φασματοσκοπική μελέτη

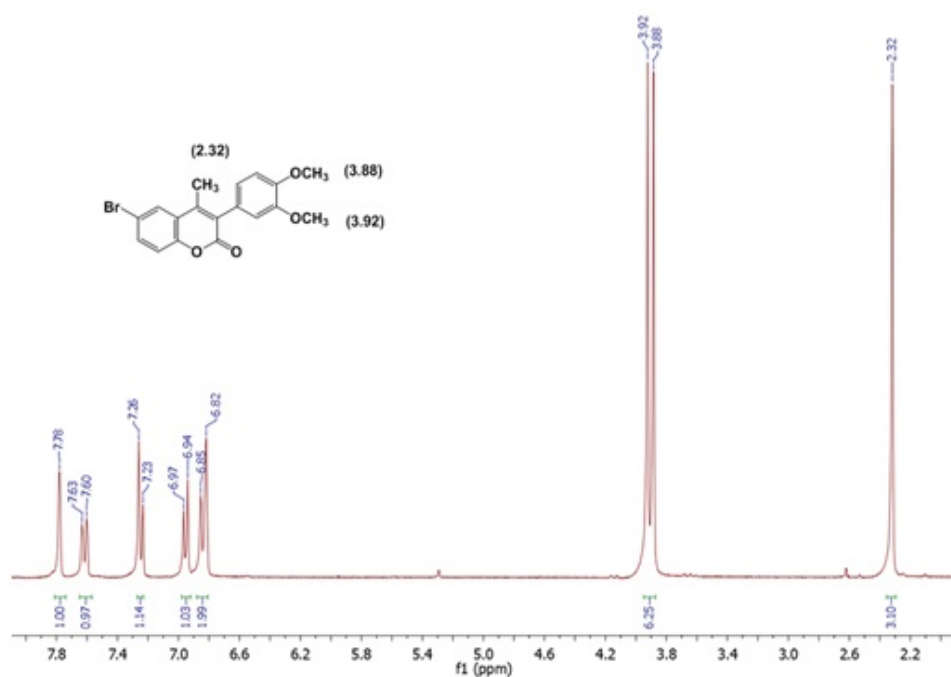
Η δομή των ενώσεων που παρασκευάστηκαν ταυτοποιήθηκε με φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού ^1H και ^{13}C NMR. Τα φάσματα ελήφθησαν σε φασματογράφο 300MHz, σε διαλύτη δευτεριωμένο χλωροφόρμιο και δευτεριωμένο DMSO, στο Φασματογράφο NMR Varian Gemini 300 του Εργαστηρίου Οργανικής Χημείας της Σχολής Χημικών Επιστημών ΕΜΠ.

2.4 Ταυτοποίηση της δομής των νέων ενώσεων

- **Σειρά A**

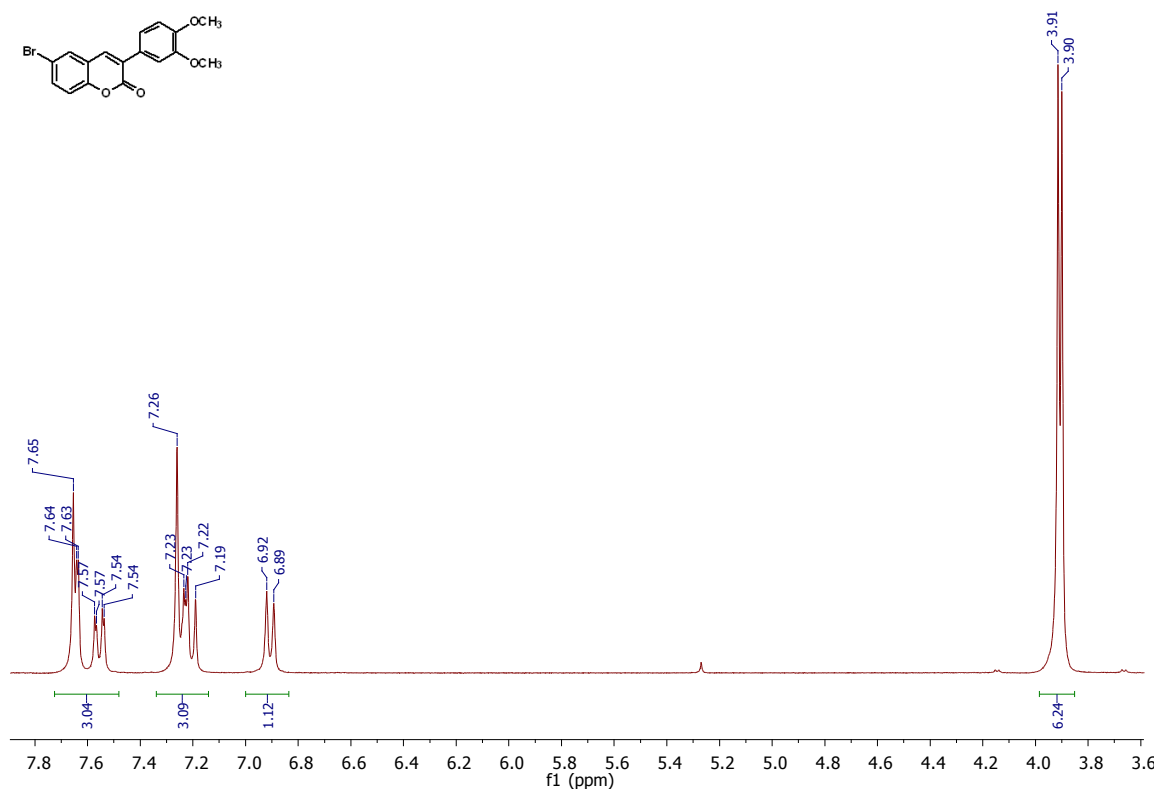
Τα φάσματα ^1H NMR των κουμαρινών παρουσιάζουν ορισμένα βασικά χαρακτηριστικά, τα οποία είναι ενδεικτικά για την ταυτοποίηση των ενώσεων αυτών. Συγκεκριμένα, η παρουσία των αρωματικών πρωτονίων πιστοποιείται από την εμφάνιση κορυφών στην περιοχή 6.8 έως 8.5 ppm ενώ τα πρωτόνια των αλειφατικών ομάδων εμφανίζονται στην περιοχή από 4 έως 2 ppm.

Στην Εικόνα 1 παρουσιάζεται το φάσμα ^1H NMR της κουμαρίνης **3a** το οποίο χαρακτηρίζεται από την παρουσία μιας απλής κορυφής στα 2.32 ppm που οφείλεται στα πρωτόνια της μέθυλο ομάδας της θέσης 4 του βενζοπυρανικού δακτυλίου. Χαρακτηριστικές επίσης είναι οι δύο απλές κορυφές στα 3.88 και 3.92 ppm, που οφείλονται στα πρωτόνια των δύο μεθόξυ ομάδων του δακτυλίου της θέσης 3 των κουμαρινικών παραγώγων.



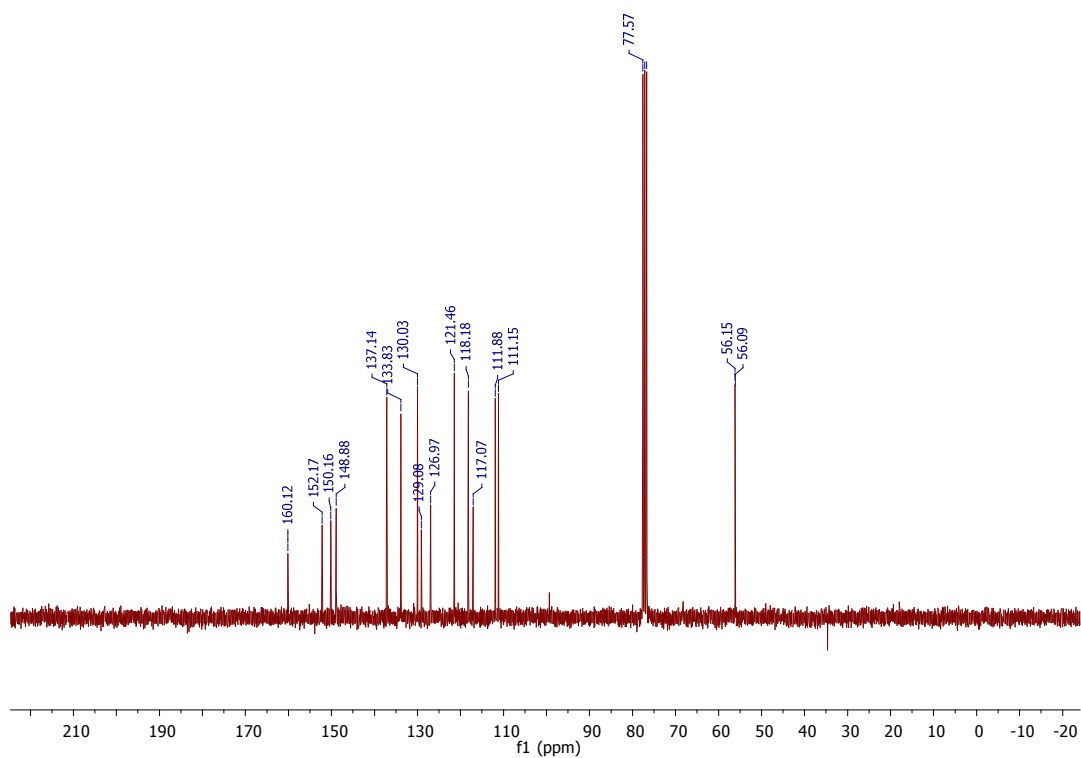
Εικόνα 1: Φάσμα ^1H NMR (CDCl_3 , 300MHz) της κουμαρίνης **3a**

Στην εικόνα 2 παρουσιάζεται το φάσμα ^1H NMR της κουμαρίνης **3c** στο οποίο παρατηρούμε μία απλή κορυφή στα 7.65 ppm που ολοκληρώνεται για ένα πρωτόνιο και αντιστοιχεί στο βινυλικό πρωτόνιο της θέσης 4 του ετεροκυκλικού δακτυλίου της κουμαρίνης. Το αρωματικό πρωτόνιο της θέσης 5 εμφανίζεται με την μορφή μιας διπλής κορυφής στα 7.64 ppm με σταθερά σύζευξης $J=2.1\text{Hz}$ η οποία οφείλεται στην μέτα-σύζευξη με το H-7. Το H-7 δίνει ένα σήμα στα 7.56 ppm με την μορφή μιας κορυφής διπλής διπλών (dd) με σταθερές σύζευξης $J_{7,8}=8.7\text{Hz}$ και $J_{7,5}=2.1\text{Hz}$. Τα H-8, H-6' και H-2' εμφανίζονται με την μορφή πολλαπλής κορυφής στην περιοχή 7.26 έως 7.19 ppm. Το H-5' εμφανίζεται ως μια διπλή κορυφή στα 6.91 ppm με σταθερά σύζευξης $J_{5',6'}=7.8\text{Hz}$. Τα πρωτόνια των μεθυλιών των μεθόξυ ομάδων εμφανίζονται με την μορφή απλών κορυφών στα 3.91 και 3.90 ppm.



Εικόνα 2: Φάσμα ^1H NMR (CDCl_3 , 300MHz) της κουμαρίνης **3c**

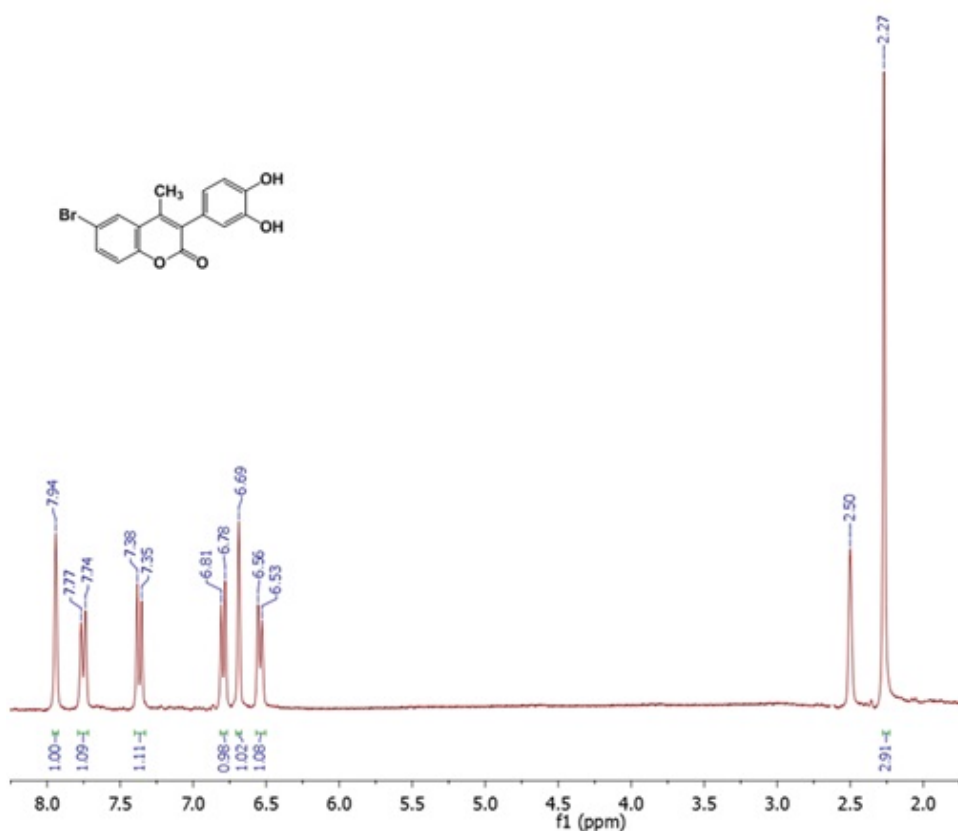
Στο φάσμα ^{13}C NMR της ίδιας ένωσης (Εικόνα 3) παρατηρούμε μία κορυφή σε χαμηλό μαγνητικό πεδίο, στα 160.12 ppm, η οποία αποδίδεται στον αποπροστατευμένο καρβοξυλικό άνθρακα του μορίου. Οι κορυφές που εμφανίζονται στα 56.15 και 56.09 ppm, αποδίδονται στους άνθρακες των δύο μεθόξυ ομάδων.



Εικόνα 3: Φάσμα ^{13}C NMR (CDCl_3 , 75MHz) της κουμαρίνης **3c**

- **Σειρά Β**

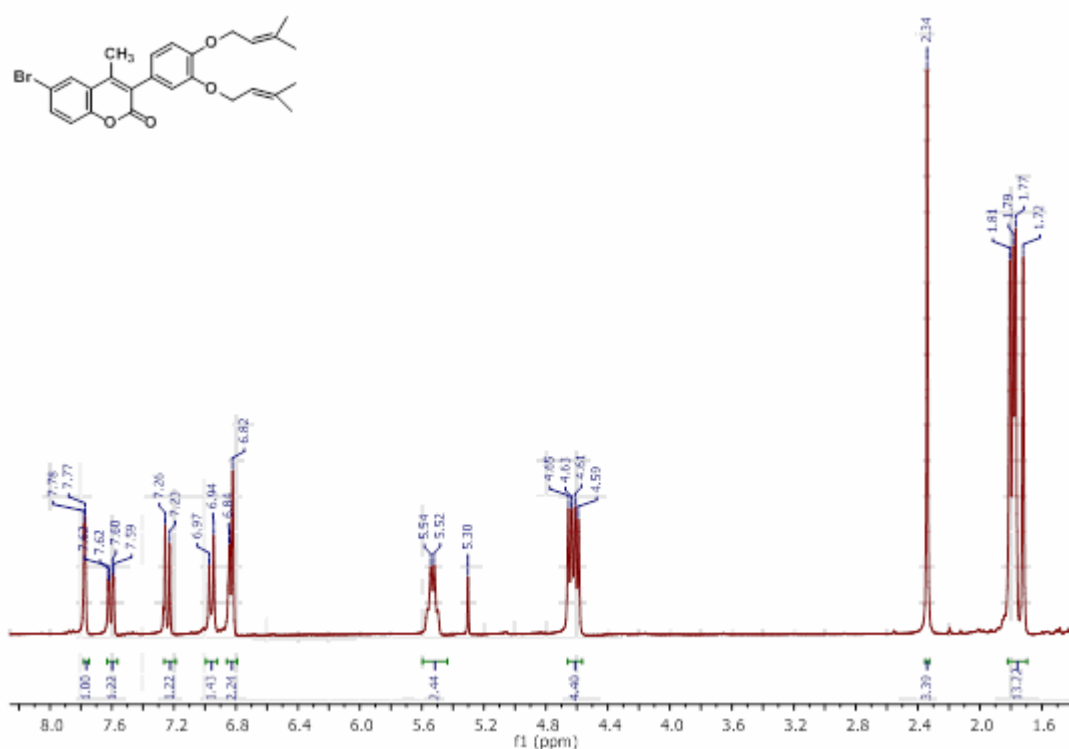
Για όλα τα φάσματα των αποπροστατευμένων παραγώγων της Σειράς Β, είναι φανερή η απουσία των δύο απλών κορυφών στα 3.88 και 3.92 ppm, που οφείλονται στα πρωτόνια των δύο μεθόξυ ομάδων του δακτυλίου της θέσης 3 των κουμαρινικών παραγώγων (Εικόνα 4). Τα πρωτόνια των υδροξυλίων του κατεχολικού συστήματος των νέων παραγώγων, λόγω του δευτεριωμένου διαλύτη DMSO στον οποίο ελήφθησαν, καθίστανται ευκίνητα με αποτέλεσμα να εμφανίζουν ευρείες κορυφές και να μην είναι δυνατή η ανίχνευση των κορυφών τους.



Εικόνα 4: Φάσμα ^1H NMR (DMSO, 300MHz) της κουμαρίνης **4a**

Για όλα τα φάσματα ^1H των πρενυλιωμένων παραγώγων της Σειράς Β που μελετήθηκαν, παρατηρήθηκαν οι χαρακτηριστικές απορροφήσεις της αλκυλο-ομάδας των μορίων. Στην περιοχή των υψηλότερων πεδίων, 1.72-1.81 ppm, εμφανίζονται οι κορυφές των μεθυλίων

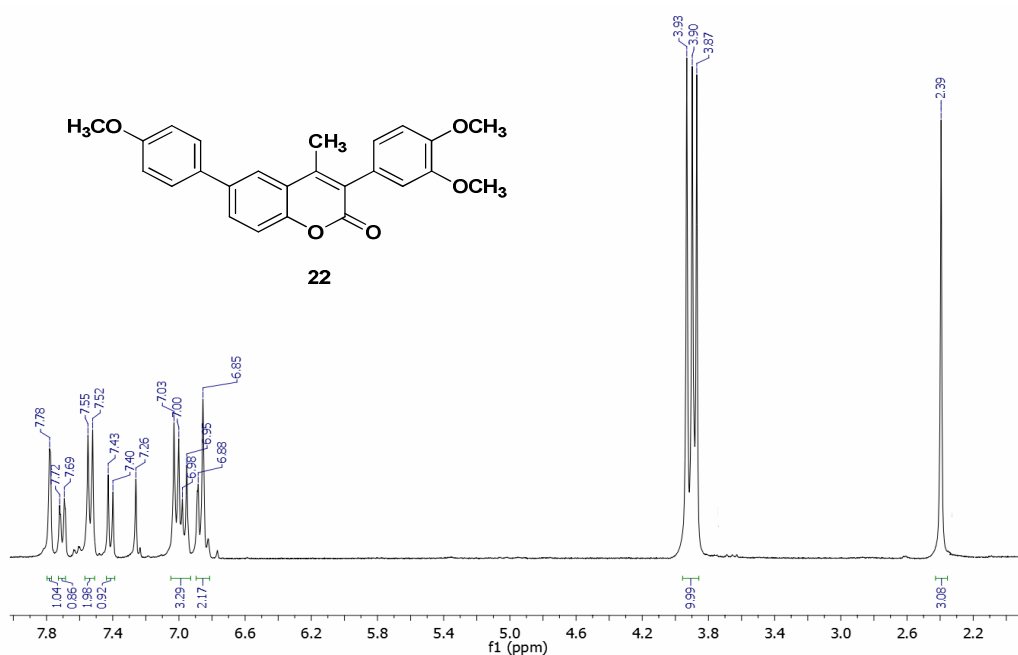
της πρενυλο-ομάδας, ενώ στα 4.60 και 4.64 ppm δύο διπλές κορυφές που ολοκληρώνονται για τέσσερα πρωτόνια και οφείλονται στα πρωτόνια της μεθυλενο-ομάδας $[-OCH_2CH=C(CH_3)_2]$ και στα 5.50-5.57 ppm μία πολλαπλή κορυφή που ολοκληρώνεται για δύο πρωτόνια και αποδίδεται στα βινυλικά πρωτόνια $[-OCH_2CH=C(CH_3)_2]$.



Εικόνα 5: Φάσμα 1H NMR ($CDCl_3$, 300MHz) της κουμαρίνης 5a

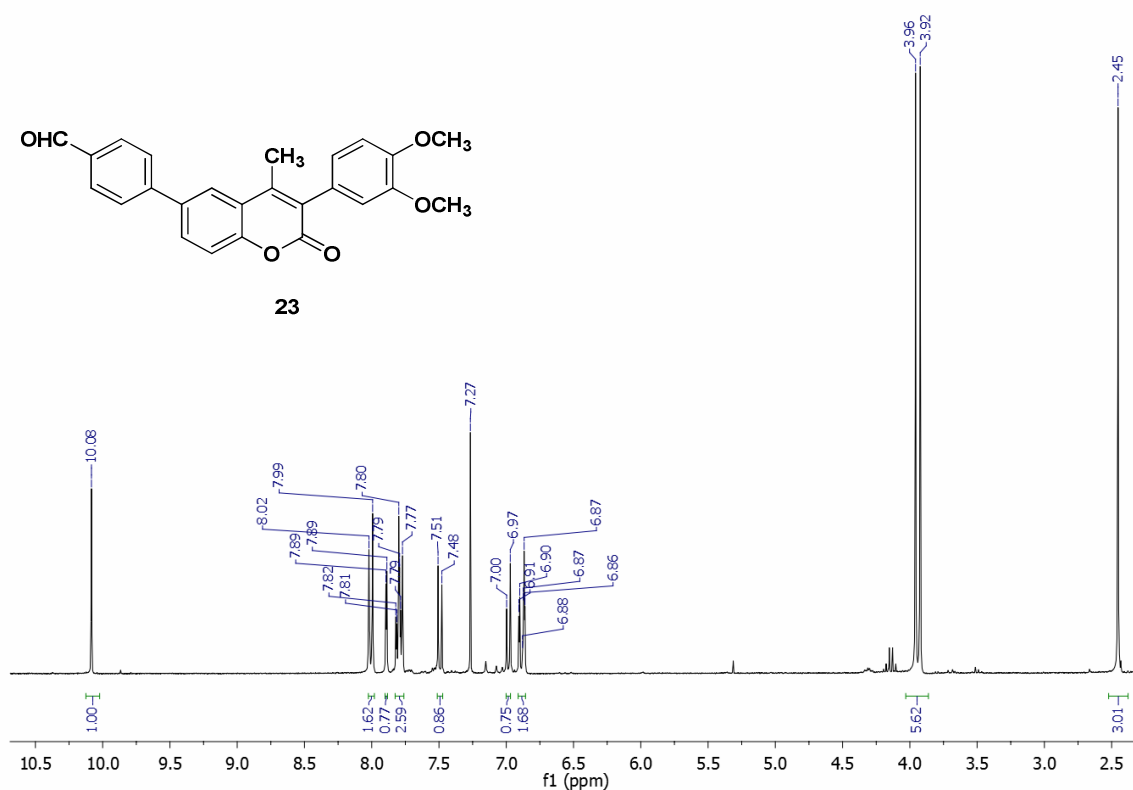
- Σειρά Γ

Στην Εικόνα 6 παρουσιάζεται το φάσμα ^1H NMR της κουμαρίνης **7a** το οποίο χαρακτηρίζεται από την παρουσία μιας απλής κορυφής στα 2.39 ppm που οφείλεται στα πρωτόνια της μέθυλο ομάδας της θέσης 4 του βενζοπυρανικού δακτυλίου. Χαρακτηριστικές επίσης είναι οι τρεις απλές κορυφές στα 3.87, 3.90 και 3.93 ppm, που οφείλονται στα πρωτόνια των δύο μεθόξυ ομάδων του δακτυλίου στη θέση 3 των κουμαρινικών παραγώγων και της μίας μεθόξυ ομάδας του νέου αρωματικού δακτυλίου στην θέση 6.



Εικόνα 6: Φάσμα ^1H NMR (CDCl₃, 300MHz) της κουμαρίνης **7a**

Στην Εικόνα 7 παρουσιάζεται το φάσμα ^1H NMR της κουμαρίνης **7b** το οποίο χαρακτηρίζεται και αυτό από την παρουσία μιας απλής κορυφής στα 2.45 ppm που οφείλεται στα πρωτόνια της μέθυλο ομάδας της θέσης 4 του βενζοπυρανικού δακτυλίου. Χαρακτηριστικές επίσης είναι οι δύο απλές κορυφές στα 3.92 και 3.96 ppm, που οφείλονται στα πρωτόνια των δύο μεθόξυ ομάδων του δακτυλίου της θέσης 3 των κουμαρινικών παραγώγων και μία απλή κορυφή στα 10.08 ppm που οφείλεται στο πρωτόνιο της αλδεϋδομάδας του νέου αρωματικού δακτυλίου στην θέση 6.



Εικόνα 7: Φάσμα ^1H NMR (CDCl_3 , 300MHz) της κουμαρίνης **7b**

Κεφάλαιο 3^ο: Πειραματικό Μέρος

3.1 Όργανα και συσκευές

- Τα φάσματα πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (^1H και ^{13}C NMR) έχουν καταγραφεί με τα εξής όργανα:
 - Varian Gemini 300MHz
 - Varian 600MHz

Οι τιμές των χημικών μετατοπίσεων, δίνονται σε ppm. Η πολλαπλότητα των σημάτων στα φάσματα ^1H NMR αναφέρονται ως:

- s (singlet, απλό)
- d (doublet, διπλό)
- t (triplet, τριπλό)
- q (quartet, τετραπλό)
- m (multiplet, πολλαπλό)
- br (broad, ευρύ).

Η σταθερές συζεύξεως J δίνονται σε Hz.

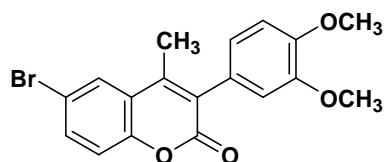
- Τα σημεία τήξεως έχουν ληφθεί σε συσκευή Gallenkamp και δεν έχουν διορθωθεί.

3.2 Συνθετική Πορεία των νέων ενώσεων

3.2.1 Γενική μέθοδος σύνθεσης κουμαρινών 3a-3c

1eq 3,4-διμεθοξυφαιτυλοξικού οξέος (**2**) και 1.2eq καρβονυλοδιμιδαζολίου προστίθενται σε διχλωρομεθάνιο. Παρατηρείται έκλυση CO₂ λόγω ενεργοποίησης του οξέος (διάλυμα Α). Το μίγμα αναδεύεται για μισή ώρα, για πλήρη ενεργοποίηση του οξέος. 1eq 5-βρωμο-2-υδροξυ-ακετοφαινόνης (**1a**) και 1eq DBU διαλύονται σε διχλωρομεθάνιο και αναδεύονται σε θερμοκρασία περιβάλλοντος για μισή ώρα (διάλυμα Β). Το διάλυμα Α προστίθεται στάγδην στο διάλυμα Β και το μίγμα της αντίδρασης αναδεύεται σε θερμοκρασία περιβάλλοντος. Μετά το τέλος της αντίδρασης, το μίγμα οξινίζεται με υδατικό διάλυμα HCl 10% έως pH2, υπό έντονη ανάδευση. Το προκύπτον μίγμα εκχυλίζεται με διχλωρομεθάνιο (3x20mL), η οργανική στιβάδα ξηραίνεται (Na₂SO₄) και ο διαλύτης εξατμίζεται υπό ελαττωμένη πίεση.

6-βρωμο-3-(3,4-διμεθοξυφαιτυλο)-4-μεθυλο-χρωμεν-2-όνη (**3a**)



6-Bromo-3-(3,4-dimethoxy-phenyl)-4-methyl-chromen-2-one

Παρασκευάζεται σύμφωνα με τη Γενική Μέθοδο χρησιμοποιώντας 0,008 mol (1,5 gr) 3,4-διμεθοξυφαιτυλοξικού οξέος (**2**) και 0,009 mol (1,49 gr) καρβονυλοδιμιδαζολίου σε 12 ml διχλωρομεθανίου (διάλυμα Α), 0,008 mol (1,64 gr) 5-βρωμο-2-υδροξυ-ακετοφαινόνης (**1a**) και 0,008 mol (1,14 ml) DBU σε 12 ml διχλωρομεθανίου (διάλυμα Β). Το προϊόν ανακρυσταλλώνεται από μεθανόλη και λαμβάνεται ως υπόλευκο στερεό.

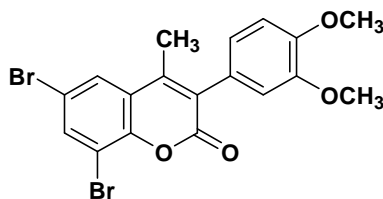
[απόδοση: 60 %, σημείο τήξεως: 184-186 °C]

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃): δ 2.32 (s, 3H), 3.89 (s, 3H), 3.93 (s, 3H), 6.84 (d, J = 10.2 Hz, 2H),

6.96 (d, J = 8.1 Hz, 1H), 7.24–7.27 (m, 1H), 7.62 (dd, J = 8.7 Hz, J = 2.4 Hz, 1H), 7.78 (s, 1H);

¹³C-NMR (75 MHz, CDCl₃): δ 16.83, 56.09, 56.14, 111.28, 113.26, 117.16, 118.68, 122.52, 122.76, 126.54, 127.91, 128.27, 134.09, 146.51, 149.05, 149.35, 151.64, 160.65

6,8-διβρωμο-3-(3,4-διμεθοξυφαινυλο)-4-μεθυλο-χρωμεν-2-όνη (**3b**)



6,8-Dibromo-3-(3,4-dimethoxy-phenyl)-4-methyl-chromen-2-one

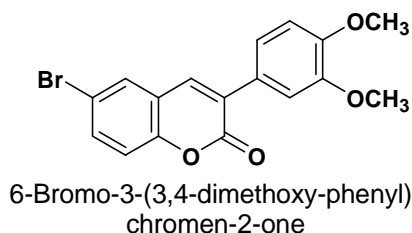
Παρασκευάζεται σύμφωνα με τη Γενική Μέθοδο χρησιμοποιώντας 0,008 mol (1,5 gr) 3,4-διμεθοξυφαινυλοξικού οξέος (**2**) και 0,009 mol (1,49 gr) καρβονυλοδιιμιδαζολίου σε 12 ml διχλωρομεθανίου (διάλυμα A), 0,008 mol (2,24 gr) 2-υδροξυ-3,5-διβρωμο-ακετοφαινόνης (**1b**) και 0,008 mol (1,14 ml) DBU σε 12 ml διχλωρομεθανίου (διάλυμα B). Το προϊόν ανακρυσταλλώνεται από μεθανόλη και λαμβάνεται ως ώχρα στερεό.

[απόδοση: 53 %, σημείο τήξεως: 197-200°C]

¹H-NMR (300MHz, CDCl₃): δ 2.30 (s, 3H), 3.86 (s, 3H), 3.91 (s, 3H), 6.81 (d, J=7.2Hz, 2H), 6.94 (d, J=8.4Hz, 1H), 7.70 (d, J=2.4Hz, 1H), 7.85 (d, J=2.4Hz, 1H)

¹³C-NMR (75MHz, CDCl₃): δ 16.97, 56.03, 56.08, 111.19, 111.43, 113.18, 116.83, 122.7, 123.27, 126.05, 127.14, 128.8, 136.69, 146.07, 148.59, 148.97, 149.4, 159.44

6-βρωμο-3-(3,4-διμεθοξυφαινυλο)-χρωμεν-2-όνη (**3c**)



Παρασκευάζεται σύμφωνα με τη Γενική Μέθοδο χρησιμοποιώντας 0,008 mol (1,5 gr) 3,4-διμεθοξυφαινυλοξικού οξέος (**2**) και 0,009 mol (1,49 gr) καρβονυλοδιμιδαζολίου σε 12 ml διχλωρομεθάνιου (διάλυμα Α), 0,008 mol (1,52 gr) 5-βρωμοσαλικυλαλδεύδης (**1c**) και 0,008 mol (1,14 ml) DBU σε 12 ml διχλωρομεθανίου (διάλυμα Β). Το προϊόν ανακρυσταλλώνεται από μεθανόλη και λαμβάνεται ως υπόλευκο στερεό.

[απόδοση: 49 %]

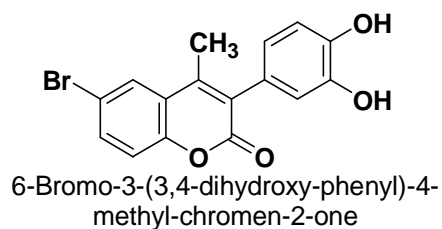
¹H-NMR (300MHz, CDCl₃): δ 3.89 (s, 3H), 3.91 (s, 3H), 6.91 (d, J=7.8Hz, 1H), 7.19-7.23 (m, 3H), 7.53-7.57 (m, 1H), 7.63-7.65 (m, 2H)

¹³C-NMR (75MHz, CDCl₃): δ 56.09, 56.15, 111.16, 111.88, 117.08, 118.19, 121.48, 126.98, 129.09, 130.05, 133.84, 137.16, 148.9, 150.17, 152.19, 160.14

3.2.2 Γενική μέθοδος σύνθεσης αποπροστατευμένων κουμαρινών 4a-4c

Σε κατάλληλη ποσότητα άνυδρου διχλωρομεθανίου, διαλύονται 1 eq της κατάλληλης κουμαρίνης **3a-3c** με 16 eq τριβρωμιούχου βορίου (BBr₃) και το μίγμα αναδεύεται στους 0°C για μία ώρα. Η ανάδευση συνεχίζεται στη συνέχεια σε θερμοκρασία δωματίου και η πορεία της αντίδρασης παρακολουθείται με χρωματογραφία λεπτής στιβάδας (TLC). Μετά το τέλος της αντίδρασης, προστίθεται παγωμένο νερό και μεθανόλη. Το προκύπτον μίγμα εκχυλίζεται με διχλωρομεθάνιο, η οργανική στιβάδα ξηραίνεται (Na₂SO₄) και ο διαλύτης εξατμίζεται υπό ελαττωμένη πίεση. Το τελικό προϊόν λαμβάνεται χωρίς περαιτέρω καθαρισμό με τη μορφή στερεού.

6-βρωμο-3-(3,4-διυδροξυφαινυλο)-4-μεθυλο-χρωμεν-2-όνη (**4a**)



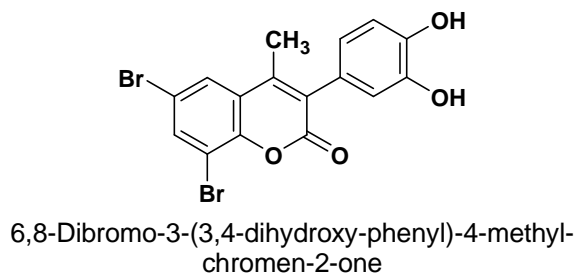
Παρασκευάζεται σύμφωνα με τη Γενική μέθοδο αποπροστασίας κουμαρινών χρησιμοποιώντας 1,33 mmol (500 mgr) 6-βρωμο-3-(3,4-διμεθοξυφαινυλο)-4-μεθυλο-χρωμεν-2-όνης (**3a**) και 21,32 mmol BBr_3 (21,32 ml διαλύματος BBr_3 1M σε επτάνιο) σε 7 ml διχλωρομεθανίου και το μίγμα αναδεύεται στους $0^\circ C$ για μία ώρα και στη συνέχεια σε θερμοκρασία δωματίου για 3 ώρες. Το τελικό προϊόν λαμβάνεται χωρίς περαιτέρω καθαρισμό με τη μορφή λευκού στερεού.

[απόδοση: 89 %, σημείο τήξεως: $282 - 283^\circ C$]

^1H-NMR (300MHz, DMSO- d_6): δ 2.28 (s, 3H), 6.55 (d, $J=7.5Hz$, 1H), 6.68 (s, 1H), 6.79 (d, $J=8.1Hz$, 1H), 7.38 (d, $J=8.7Hz$, 1H), 7.76 (d, $J=9Hz$, 1H), 7.96 (d, $J=2.4Hz$, 1H), 9.05 (br, 2H)

$^{13}C-NMR$ (75MHz, DMSO- d_6): δ 16.5, 115.2, 116.25, 117.5, 118.4, 121.28, 122.3, 124.89, 127.36, 128.09, 133.73, 144.81, 145.37, 146.19, 150.97, 159.51

6,8-διβρωμο-3-(3,4-διυδροξυφαινυλο)-4-μεθυλο-χρωμεν-2-όνη (**4b**)



Παρασκευάζεται σύμφωνα με τη Γενική μέθοδο αποπροστασίας κουμαρινών χρησιμοποιώντας 0,44 mmol (200 mg) 6,8-διβρωμο-3-(3,4-διμεθοξυφαινυλο)-4-μεθυλο-

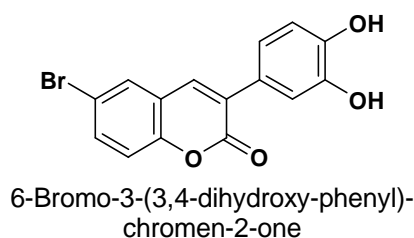
χρωμεν-2-όνης (**3b**) και 7,04 mmol BBr₃ (7,04 ml διαλύματος BBr₃ 1M σε επτάνιο) σε 4 ml διχλωρομεθανίου και το μίγμα αναδεύεται στους 0°C για μία ώρα και στη συνέχεια σε θερμοκρασία δωματίου για 3 ώρες. Το τελικό προϊόν λαμβάνεται με διήθηση με MeOH με τη μορφή ενός κίτρινου στερεού.

[απόδοση: 79 %, σημείο τήξεως: 229 - 230 °C]

¹H-NMR (300MHz, DMSO-d₆): δ 2.28 (s, 3H), 6.54 (d, J=9Hz, 1H), 6.69 (s, 1H), 6.80 (d, J=9Hz, 1H), 7.79 (s, 1H), 8.06 (s, 1H), 9.02 (br, 2H)

¹³C-NMR (75MHz, DMSO-d₆): δ 16.79, 110.31, 115.27, 116.3, 117.48, 121.32, 123.34, 124.57, 127.87, 135.82, 144.87, 145.56, 146.14, 147.86, 158.88

6-βρωμο-3-(3,4-διυδροξυφαινυλο)-χρωμεν-2-όνη (**4c**)



Παρασκευάζεται σύμφωνα με τη Γενική μέθοδο αποπροστασίας κουμαρινών χρησιμοποιώντας 1,107 mmol (400 mgr) 6-βρωμο-3-(3,4-διμεθοξυφαινυλο)-χρωμεν-2-όνης (**3c**) και 17,12 mmol BBr₃ (17ml διαλύματος BBr₃ 1M σε επτάνιο) σε 7 ml διχλωρομεθανίου και το μίγμα αναδεύεται στους 0°C για μία ώρα και στη συνέχεια σε θερμοκρασία δωματίου για 3 ώρες. Το τελικό προϊόν λαμβάνεται με διήθηση με MeOH με τη μορφή ενός σκούρου (πράσινου) στερεού.

[απόδοση: 81 %, σημείο τήξεως: 272 - 273 °C]

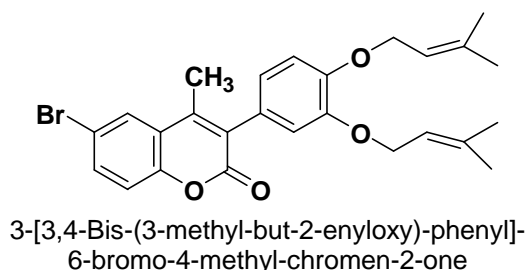
¹H-NMR (300MHz, DMSO-d₆): δ 6.81 (d, J=8.1Hz, 1H), 7.04 (d, J=8.4Hz, 1H), 7.20 (d, J=1.5Hz, 1H), 7.37 (d, J=8.7Hz, 1H), 7.71 (d, J=2.1Hz, 1H), 7.99 (d, J=18.3 Hz, 2H), 9.18 (br, 2H)

¹³C-NMR (75MHz, DMSO-d6): δ 115.38, 115.98, 117.98, 119.95, 121.65, 125.26, 127.85, 130.23, 133.28, 136.93, 144.87, 146.51, 151.58, 159.31

3.2.3 Γενική Μέθοδος σύνθεσης πρενυλιωμένων κουμαρινών 5a-5c

Σε κατάλληλη ποσότητα ακετόνης, προστίθενται 1eq της κατάλληλης κουμαρίνης **4a-4c** και 6 eq ανθρακικού καλίου και το μίγμα αναδεύεται στη θερμοκρασία βρασμού της ακετόνης. Στη συνέχεια, προστίθενται στάγδην 2eq 3,3-διμεθυλαλλυλ-βρωμιδίου και η θέρμανση συνεχίζεται για 4 h. Μετά το τέλος της αντίδρασης, το μίγμα ψύχεται σε θερμοκρασία περιβάλλοντος, το K₂CO₃ διηθείται υπό ελαττωμένη πίεση, εκπλένεται με ακετόνη και το διήθημα εξατμίζεται υπό ελαττωμένη πίεση. Το προϊόν λαμβάνεται μετά από χρωματογραφία στήλης χρησιμοποιώντας σύστημα διαλυτών PE/EtOAc 8:2 υπό τη μορφή στερεού.

3-[3,4-δι-(3-μεθυλο-βουτ-2-ενυλοξυ)-φαινυλο]-6-βρωμο-4-μεθυλο-χρωμεν-2-όνη (**5a**)



Παρασκευάζεται σύμφωνα με τη Γενική μέθοδο σύνθεσης πρενυλιωμένων κουμαρινών χρησιμοποιώντας 0,144 mmol (0,0497 g) 6-βρωμο-3-(3,4-διυδροξυφαινυλο)-4-μεθυλοχρωμεν-2-όνη (**4a**), 0,861mmol (0,119gr) K₂CO₃ και 0,288 mmol (0,035 ml) 3,3-διμεθυλαλλυλ-βρωμιδίου σε 2 ml ακετόνη. Το προϊόν λαμβάνεται μετά από καθαρισμό υπό τη μορφή λευκού-καφέ στερεού.

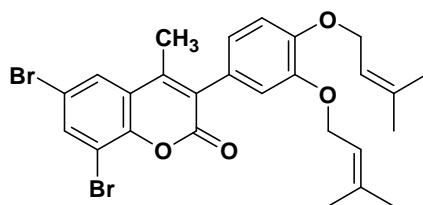
[απόδοση: 43 %]

¹H-NMR (300MHz, CDCl₃): δ 1.72 (s, 3H), 1.78 (d, J= 6 Hz, 6H), 1.81, (s, 3H), 2.34 (s, 3H), 4.60

(d, J= 6Hz, 2H), 4.64 (d, J= 6Hz, 2H), 5.50-5.57 (m, 2H), 6.83 (d, J=6Hz, 2H), 6.95 (d, J=9Hz, 1H), 7.25 (d, J=12Hz, 1H), 7.60 (d, J=6Hz, 1H), 7.78 (s, 1H)

¹³C-NMR (75MHz, CDCl₃): δ 16.80, 18.37, 25.93, 65.92, 66.34, 111.96, 113.62, 116.34, 117.13, 118.64, 119.18, 120.24, 121.97, 122.58, 123.44, 126.33, 128.09, 134.03, 137.50, 144.07, 146.39, 149.32, 151.59, 160.70

3-[3,4-δι-(3-μεθυλο-βουτ-2-ενυλοξυ)-φαινυλο]-6,8-διβρωμο-4-μεθυλο-χρωμεν-2-όνη (**5b**)



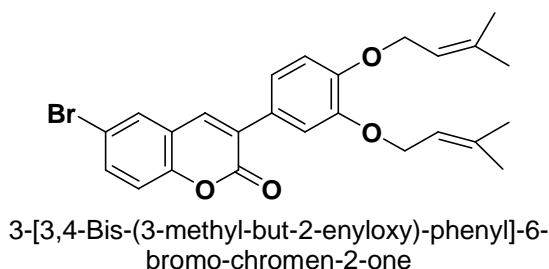
Παρασκευάζεται σύμφωνα με τη Γενική μέθοδο σύνθεσης πρενυλιωμένων κουμαρινών χρησιμοποιώντας 0,11 mmol (0,05g) 6,8-διβρωμο-3-(3,4-διυδροξυφαινυλο)-4-μεθυλο-χρωμεν-2-όνης (**4b**) και 0,66 mmol (0,091gr) K₂CO₃ και 0,22 mmol (0,026 ml) 3,3-διμεθυλαλλυλ-βρωμιδίου σε 2 ml ακετόνη. Το προϊόν λαμβάνεται μετά από καθαρισμό υπό τη μορφή κίτρινο-καφέ στερεού.

[απόδοση: 39%]

¹H-NMR (300MHz, CDCl₃): δ 1.69 (s, 3H), 1.75 (d, J= 4.2 Hz, 6H), 1.78, (s, 3H), 2.31 (s, 3H), 4.57 (d, J= 9Hz, 2H), 4.62 (d, J= 6.6Hz, 2H), 5.51 (d, J= 6 Hz, 2H), 6.81 (d, J=5.4Hz, 2H), 6.94 (d, J=9Hz, 1H), 7.21 (s, 1H), 7.86 (s, 1H)

¹³C-NMR (75MHz, CDCl₃): δ 16.98, 18.37, 25.91, 66.06, 66.33, 111.49, 113.55, 116.21, 116.82, 120.19, 120.27, 122.98, 123.42, 125.92, 127.14, 128.95, 136.68, 13.48, 137.58, 145.84, 148.60, 148.66, 149.48, 159.48

3-[3,4-δι-(3-μεθυλο-βουτ-2-ενυλοξυ)-φαινυλο]-6-βρωμο-χρωμεν-2-όνη (**5c**)



Παρασκευάζεται σύμφωνα με τη Γενική μέθοδο σύνθεσης πρενυλιωμένων κουμαρινών χρησιμοποιώντας 0,15 mmol (0,05g) 6-βρωμο-3-(3,4-διυδροξυφαινυλο)-χρωμεν-2-όνης (**4c**) και 0,9mmol (0,124gr) K_2CO_3 και 0,3 mmol (0,035 ml) 3,3-διμεθυλαλλυλ-βρωμιδίου σε 2 ml ακετόνη. Το προϊόν λαμβάνεται μετά από καθαρισμό υπό τη μορφή κίτρινο στερεού.

[απόδοση: 46 %, σημείο τήξεως: 117-119 °C]

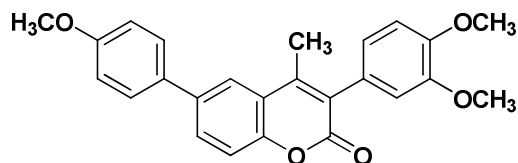
1H -NMR (300MHz, $CDCl_3$): δ 1.76 (d, $J=10.2$ Hz, 12H), 4.64 (d, $J=9$ Hz, 4H), 5.52 (d, $J=5.1$ Hz, 2H), 6.93 (d, $J=8.4$ Hz, 1H), 7.21-7.28 (m, 3H), 7.57 (d, $J=12$ Hz, 1H), 7.66 (s, 2H)

^{13}C -NMR (75MHz, $CDCl_3$): δ 18.4, 18.42, 25.93, 25.97, 66.04, 66.27, 113.38, 114.43, 117.06, 118.19, 120.11, 121.52, 121.57, 126.79, 129.2, 130, 133.76, 137.03, 137.61, 137.73, 148.59, 150.06, 152.14, 160.17

3.2.4 Γενική Μέθοδος σύνθεσης κουμαρινών **7a** και **7b** με αντίδραση σύζευξης Suzuki

Σε κατάλληλη ποσότητα αποξηγώνωμένου DMF διαλύονται σε αναλογία 1:1.5 ποσότητα της κατάλληλης κουμαρίνης και του κατάλληλου βορονικού οξέος. Στη συνέχεια προστίθεται 3% w/w καταλύτη $Pd(PPh_3)_4$ και 5 eq CS_2CO_3 , και το μίγμα της αντίδρασης αναδεύεται στους 153°C. Η πορεία της αντίδρασης παρακολουθείται με χρωματογραφία λεπτής στιβάδας (TLC). Μετά το τέλος της αντίδρασης, το μίγμα διηθείται από γη διατόμων (celite), πραγματοποιούνται εκπλύσεις με DMF και ο διαλύτης εξατμίζεται υπό ελαττωμένη πίεση. Το στερεό υπόλειμμα καθαρίζεται με χρωματογραφία στήλης χρησιμοποιώντας σύστημα διαλυτών PE/EtOAc7:3.

3-(3,4-διμεθοξυφαινυλο)-6-(4-μεθοξυφαινυλο)-4-μεθυλο-χρωμεν-2-όνη (**7a**)



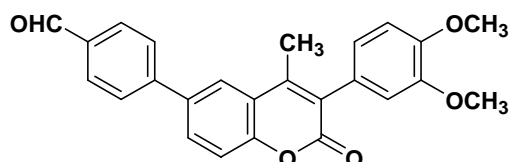
Παρασκευάζεται σύμφωνα με τη Γενική μέθοδο σύνθεσης κουμαρινών με αντίδραση Suzuki-coupling χρησιμοποιώντας 0,267 mmol (0,1g) **3a**, 0,64 mmol (0,061g) 4-μεθοξυφαινυλο-βορονικού οξέος (**6a**), 1.335 mmol (0,435g) Cs₂CO₃ και 0,008 mmol (0,009g) Pd(PPh₃)₄ σε 6 ml DMF και το μίγμα αναδεύεται για 4 h σε reflux. Το στερεό υπόλειμμα που λαμβάνεται μετά την κατεργασία, καθαρίζεται με χρωματογραφία στήλης οπότε λαμβάνεται το τελικό καθαρό προϊόν υπό τη μορφή στερεού.

[απόδοση: 38 %, σημείο τήξεως: 165-166°C]

¹H-NMR (300MHz, CDCl₃): δ 2.39 (s, 3H), 3.88 (d, J=9Hz, 6H), 3.93 (s, 3H), 6.86 (d, J=6Hz, 2H), 6.95-7.03 (m, 3H), 7.42 (d, J=6Hz, 1H), 7.53 (d, J=6Hz, 2H), 7.71 (d, J=6Hz, 1H), 7.78 (s, 1H)

¹³C-NMR (75MHz, CDCl₃): δ 16.89, 55.55, 56.06, 56.09, 111.22, 113.30, 114.58, 117.27, 120.90, 122.78, 123.07, 127.07, 127.49, 128.35, 130.03, 132.65, 137.44, 147.81, 148.96, 149.12, 151.78, 159.59, 161.31

4-[3-(3,4-διμεθοξυφαινυλο)-4-μεθυλο-2-οξο-2H-χρωμεν-6-υλ]-βενζαλδεΐδη (**7b**)



4-[3-(3,4-Dimethoxy-phenyl)-4-methyl-2-oxo-2H-chromen-6-yl]-benzaldehyde

Παρασκευάζεται σύμφωνα με τη Γενική μέθοδο σύνθεσης κουμαρινών με αντίδραση Suzuki-coupling χρησιμοποιώντας 0,107 mmol (0,041 g) **3a**, 0,16 mmol (0,025 g) 4-φορμυλφαινυλο-βορονικού οξέος (**6b**), 0,535 mmol (0,174g) Cs₂CO₃ και 0,0032 mmol (0,004

g) $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$ σε 5 ml DMF και το μίγμα αναδεύεται για 4 h σε reflux. Το στερεό υπόλειμμα που λαμβάνεται μετά την κατεργασία, καθαρίζεται με χρωματογραφία στήλης χρησιμοποιώντας σύστημα διαλυτών PE/EtOAc7:3 οπότε λαμβάνεται το τελικό καθαρό προϊόν υπό τη μορφή στερεού.

[απόδοση: 29 %]

$^1\text{H-NMR}$ (300MHz, CDCl_3): δ 2.45 (s, 3H), 3.94 (d, $J=9\text{Hz}$, 6H), 6.88 (d, $J=12\text{Hz}$, 2H), 6.98 (d, $J=9\text{Hz}$, 1H), 7.49 (d, $J=9\text{Hz}$, 1H), 7.76-7.81 (m, 3H), 7.89 (d, $J=3\text{Hz}$, 1H), 8 (d, $J=6\text{Hz}$, 2H), 10.08 (s, 1H)

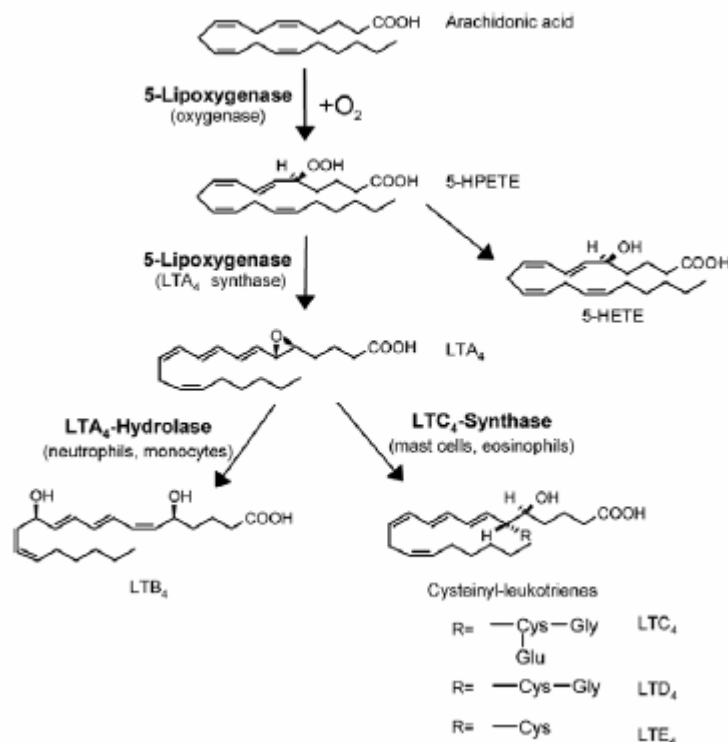
$^{13}\text{C-NMR}$ (75MHz, CDCl_3): δ 16.94, 29.85, 56.09, 111.26, 113.28, 117.73, 121.24, 122.8, 124.04, 127.89, 130.41, 130.62, 135.63, 136.27, 146.04, 147.52, 149.28, 152.91, 191.89

Κεφάλαιο 4^ο: Αποτελέσματα και συζήτηση

4.1 Αντιφλεγμονώδης δράση των νέων ενώσεων

Γενικά

Οι λιποξυγενάσες (LO) είναι ένζυμα που περιέχουν σίδηρο τα οποία απαντώνται ευρέως στα φυτά και στα ζώα. Καταλύουν την οξείδωση των πολυακόρεστων λιπαρών οξέων όπως το λινολεϊκό οξύ (στα φυτά) και το αραχιδονικό οξύ (στα θηλαστικά), σε συγκεκριμένες θέσεις σε υδροϋπεροξειδία. [Detsi et al. 2009] Το αραχιδονικό οξύ μέσω του ενζύμου της 5-λιποξυγενάσης μετατρέπεται σε LTA₄. Το LTA₄ είναι ένα ασταθές ενδιάμεσο που μετά από μια διαδικασία συνεχών μετατροπών καταλήγει στο σχηματισμό λευκοτριενίων LT's. (Σχήμα 28).



Σχήμα 28: Κατάλυση του αραχιδονικού οξέος προς σχηματισμό λευκοτριενίων με τη βοήθεια της 5-λιποξυγενάσης 5-LO

Οι αναστολείς της λιποξυγενάσης προκαλούν το ενδιαφέρον εξαιτίας της σχέσης του ενζύμου με διάφορες παθολογικές καταστάσεις καθώς επίσης και με έναν αριθμό διατροφικών διαδικασιών. Συγκεκριμένα, στον άνθρωπο, η λιποξυγενάση παίζει ένα σημαντικό ρόλο στη βιοσύνθεση των λευκοτριενίων, δηλαδή των φλεγμονωδών πρόδρομων ενώσεων που ελευθερώνονται από κύτταρα μυελού των οστών. Έτσι, οι αναστολείς της λιποξυγενάσης εξετάζονται αρχικά σαν πιθανές ουσίες στη θεραπεία φλεγμονών και αλλεργιών [Detsi et al. 2009]. Επιπλέον, ο τρόπος που δρα η 5-LO συνδέεται με την αθηροσκλήρυνση [Mehrabian et al. 2003; De Caterina et al. 2004; Rdmarm 2003], την οστεοπόρωση [Gallwitz et al. 1993], καθώς επίσης και με διάφορες μορφές καρκίνου, όπως το νευροβλάστωμα [Van Rossum et al. 2002] και ο καρκίνος του προστάτη [Ghosh et al. 1998]. Έτσι, το ενδιαφέρον στην σύνθεση αναστολέων λευκοτριενίων παραμένει υψηλό.

Πολλά φλαβονοειδή και άλλα φαινολικά όπως επίσης και κουμαρινικά παράγωγα αναστέλουν την λιποξυγενάση από σόγια. Αυτή η αναστολή σχετίζεται με την ικανότητά τους να ανάγουν τις μορφές σιδήρου του ενεργού κέντρου σε καταλυτικά ανενεργές σιδηρούχες μορφές [Muller 1994]. Οι λιποξυγενάσες οξειδώνουν συγκεκριμένα λιπαρά οξέα σε συγκεκριμένες θέσεις προς υδροϋπεροξειδία που αποτελούν τις πρόδρομες ουσίες των λευκοτριενίων, οι οποίες περιέχουν μία συζευγμένη δομή τριενίων. Οι περισσότεροι από τους LO αναστολείς είναι αντιοξειδωτικά ή καθαριστές ελευθέρων ριζών, δεδομένου ότι η lipoxygenation συμβαίνει μέσω ελεύθερης ρίζας άνθρακα. Είναι γνωστό ότι η λιποξυγενάση σόγιας αναστέλλεται από τα NSAID σε ποιοτικά παρόμοιο τρόπο με αυτόν της λιποξυγενάσηςσιτευτικού κυττάρου αρουραίων και μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως μία αξιόπιστη επισκόπηση για τέτοια δραστηριότητα.

Παρόλο που η λιποφιλία αναφέρεται ως μία σημαντική φυσικοχημική ιδιότητα των καταστολέων LO, δεν ακολουθούν όλα τα εξεταζόμενα παράγωγα αυτή την λογική [Symeonidis 2009].

4.1.1 Ταξινόμηση των αναστολέων της 5-LO

Οι αναστολείς της λιποξυγενάσης μπορούν να ταξινομηθούν σε τρεις κατηγορίες. Τις ενώσεις που δρουν οξειδοαναγωγικά, τις ενώσεις που περιέχουν δεσμεύουν σίδηρο με ελάχιστες οξειδοαναγωγικές ιδιότητες, και τους αναστολείς χωρίς καθόλου οξειδοαναγωγικές ιδιότητες.

Η πλειοψηφία των αναστολέων LO είναι αντιοξειδωτικά ή σαρωτές ελευθέρων ριζών καθώς η δράση της λιποξυγενάσης δημιουργεί ελεύθερες ρίζες άνθρακα οπότε τα αντιοξειδωτικά μπορούν να αναστείλουν τη δημιουργία της ρίζας ή να την παγιεύσουν μόλις σχηματιστεί. [Detsi et al. 2009]

Στα πειράματα που εξετάζονται ενώσεις ως πιθανοί αναστολείς της 5-LO το δείγμα της πρωτεΐνης που χρησιμοποιείται είναι από το φυτό της σόγιας. Οι λόγοι που γίνεται αυτή η αντικατάσταση είναι οι εξής:

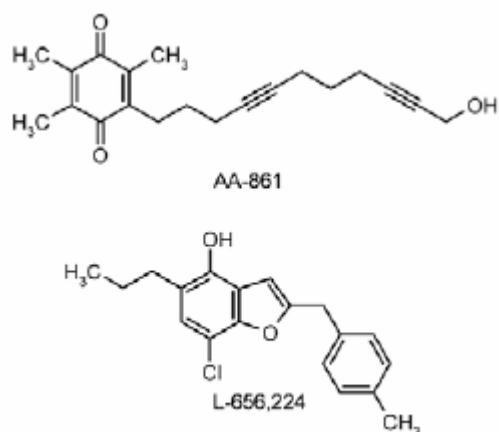
Η ακολουθία των αμινοξέων στις δύο πρωτεΐνες υποδεικνύει δύο περιοχές όπου παραμένει ίδια η σειρά των αμινοξέων και στην ανθρώπινη και στη φυτική λιποξυγενάση. [Applewhite 1989] Ακόμη, είναι σαφώς δυσκολότερο να επιχειρούνται εργαστηριακά πειράματα ρουτίνας με πρωτεΐνη η οποία πρέπει να απομονωθεί από θηλαστικά.

4.1.2 Παραδείγματα μορίων με αντιφλεγμονώδη δράση

Γνωρίζοντας λοιπόν τη δράση της 5-LO και την αναγκαιότητα μιας αντιφλεγμονώδους θεραπείας κατά των λευκοτριενίων έχουν γίνει πολλές προσπάθειες σύνθεσης φαρμακολογικών ουσιών που δρουν εναντίον των λευκοτριενίων. Ο τρόπος επίτευξης της αναστολής δημιουργίας των LTs είναι (i) η αναστολή της βιοσύνθεσης τους, και (ii) η αναστολή της δράσης τους.

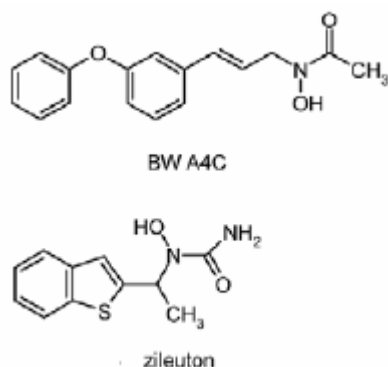
Συνθετικά παράγωγα των λευκοτριενίων, οι προσταγλαδίνες, είχαν αρχικά αναφερθεί σαν αναστολείς της LT βιοσύνθεσης. Για να επιτευχθεί μείωση του σχηματισμού λευκοτριενίων, πιθανούς στόχους αποτελούν τα ένζυμα PLA₂, η 5-LO, η LTA₄ υδρολάση και η LTC₄ συνθάση (Σχήμα 28). Η δέσμευση αυτών των ενζύμων αποσκοπεί στην τελική αναστολή της 5-LO και κατά συνέπεια της εμφάνισης φλεγμονής.

Οι αναστολείς της 5-LO που δρουν οξειδοαναγωγικά περιλαμβάνουν μεταξύ άλλων ενώσεις κυρίως προερχόμενες από φυτά όπως φλαβονοειδήκουμαρίνες, κινόνες, λιγνάνες και άλλα πολυφαινολικά παράγωγα. Οι πρώτες απόπειρες συνθετικών αναστολέων της κατηγορίας των οξειδοαναγωγικών περιλαμβάνουν τις ενώσεις που φαίνονται στο Σχήμα 29. Ωστόσο, μειονέκτημα αυτών αποτελεί η έλλειψη βιοδιαθεσιμότητάς τους από το στόμα, η παρουσία μικρής εκλεκτικότητας στην 5-LO με διάφορες παράπλευρες επιπτώσεις εξαιτίας της εμπλοκής με άλλες βιολογικές οξειδοαναγωγικές διαδικασίες ή με την παραγωγή ριζών. Έτσι οι ουσίες αυτές δεν έχουν ακόμα εισαχθεί στην αγορά. [McMillian et al. 1992; Werz 2007]



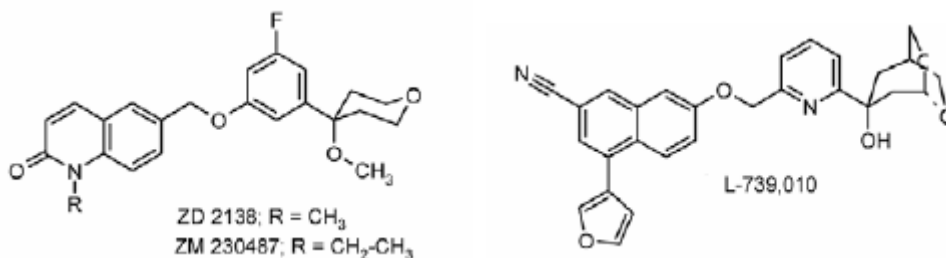
Σχήμα 29: Οξειδοαναγωγικοί αναστολείς της 5-LO

Στην κατηγορία των αναστολέων που συμπλοκοποιούν το σίδηρο ανήκουν οι ενώσεις της (Σχήμα 30). Η ένωση zileuton ήταν και διαθέσιμη στην αγορά πριν αποσυρθεί το 2003 από περαιτέρω κλινικές δοκιμές. [Drazen 1999; Werz 2007]



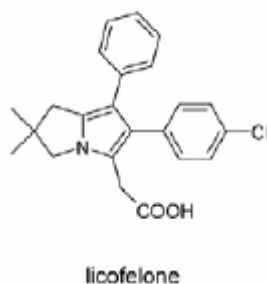
Σχήμα 30: Αναστολείς της 5-LO που συμπλοκοποιούν το σίδηρο

Οι αναστολείς μη οξειδοαναγωγικού τύπου ανταγωνίζονται με το αραχιδονικό οξύ και το λιπιδικούδρουπεροξείδιο (LOOH) για τη δέσμευση της 5-LO χωρίς οξειδοαναγωγικές ιδιότητες και περιλαμβάνουν δομικά διαφορετικά μέρη. (Σχήμα 31) [Werz 2007]



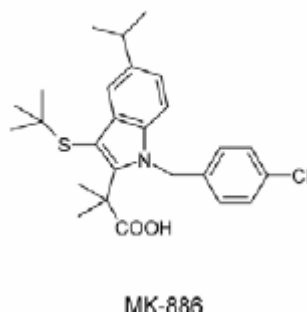
Σχήμα 31: Αναστολείς μη οξειδοαναγωγικού τύπου

Μια άλλη ουσία η οποία αναστέλλει την δημιουργία της 5-LO σε υπομικρομοριακή κλίμακα είναι η λικοφελόνη (Σχήμα 32). [Werz 2007]



Σχήμα 32: Λικοφελόνη

Τέλος, ένας άλλος έμμεσος τρόπος μείωσης στη δημιουργία λευκοτριενίων είναι η αναστολή της πρωτεΐνης FLAP της 5-LO. (Σχήμα 33) [Werz 2007]

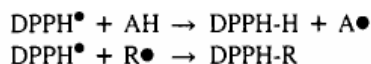
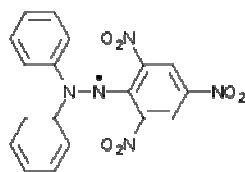


Σχήμα 33: Ουσία που αναστέλλει την πρωτεΐνη FLAP

4.2 Αντιοξειδωτική Δράση των νέων ενώσεων

Πολλές από τις ανωτέρω κουμαρίνες εξετάστηκαν για την αντιοξειδωτική τους δράση και συγκεκριμένα στον τρόπο που δρουν έναντι της σταθερής ελεύθερης ρίζας DPPH. Ως DPPH ορίζεται η σταθερή ελεύθερη ρίζα της 2,2- διφαινυλ-1-πικρυλυδραζιλής. Η DPPH δεν αποσυντίθεται και δεν διμερίζεται ούτε αντιδρά με οξυγόνο είναι ιδιαίτερη χρήσιμη σε ενέργειες όπως η αναστολή του πολυμερισμού ή η χημεία ριζών, στον προσδιορισμό αντιοξειδωτικών ιδιοτήτων αμινών φαινόλων ή άλλων φυσικών ενώσεων (βιταμινών, εκχυλίσματα φυτών, ιατρικών φαρμάκων).

Η ελεύθερη ρίζα DPPH είναι γνωστό ότι μπορεί και αποσπά υδρογόνο δίνοντας το DPPH-H σαν παραπροϊόν (Σχήμα 34).



Σχήμα 34: DPPH (πάνω) και η δράση του, R:ρίζα, A:αντιοξειδωτικό

Σε άλλες περιπτώσεις, η προσθήκη του DPPH μπορεί να δώσει R-DPPH-H υποκατεστημένα παράγωγα. Όπως επίσης το ανιόν DPPH, DPPH^- μπορεί να οξειδωθεί δίνοντας την ελεύθερη ρίζα.

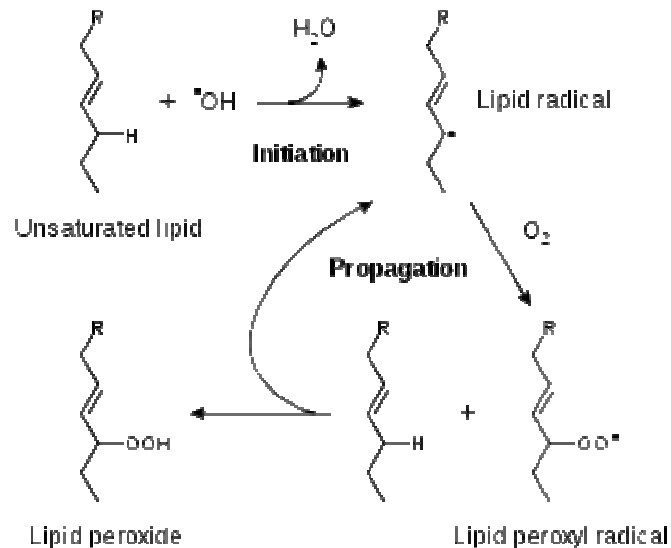
Δραστικές μορφές οξυγόνου (Reactive Oxygen Species, ROS), όπως το υπεροξειδίο του υδρογόνου, η ρίζα υδροξυλίου, και το ανιόν του υπεροξειδίου δημιουργούνται στα κύτταρα μέσω των μεταβολικών διαδικασιών της αναπνοής, της επαναιμάτωσης και της οξείδωσης των λιπαρών οξέων. Μπορεί να αποβούν ιδιαίτερα επιβλαβείς για τα κύτταρα καταστρέφοντας μόρια όπως το DNA, τα λιπίδια και τα ένζυμα. Τα κύτταρα μπορεί να πάθουν ζημιά ή ακόμα και να πάψουν να λειτουργούν όταν η ποσότητα του ενεργού οξυγόνου υπερβεί την αντιοξειδωτική χωρητικότητα του κυττάρου. Έτσι η DPPH χρησιμοποιήθηκε σαν δείκτης αντιοξειδωτικής ικανότητας του ανθρώπινου πλάσματος.

Η ρίζα αυτή έχει χρησιμοποιηθεί σαν σαρωτής πολλών ριζών εξαιτίας της ιδιότητας της βιολετί ρίζας DPPH να μεταπίπτει στην κίτρινη DPPH-H απορροφώντας στην περιοχή του ορατού φάσματος στα 520-330 nm.

4.2.1 Αναστολή της λιπιδικής υπεροξειδωσης

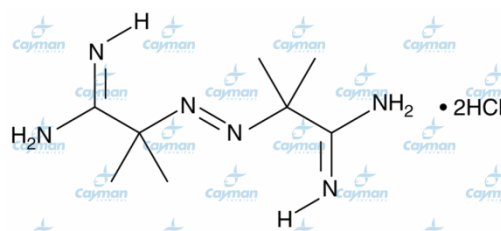
Τα υδροϋπεροξειδία των λιπιδίων είναι ενδιάμεσα προϊόντα που δεν έχουν τη μορφή ριζών και προέρχονται από ακόρεστα λιπαρά οξέα, φωσφολιπίδια, γλυκολιπίδια, εστέρες χοληστερόλης, και από την ίδια τη χοληστερόλη. Ο σχηματισμός τους συμβαίνει σε ενζυματικές ή μη αντιδράσεις, που περιλαμβάνουν δραστικές μορφές οξυγόνου (ROS). (Σχήμα 35). Οι τελευταίες είναι υπεύθυνες για τις τοξικές επιδράσεις στο σώμα μέσω της βλάβης στους ιστούς. Οι ενώσεις ROS περιλαμβάνουν ρίζες υδροξυλίου, ρίζες οξυ- ή υπεροξυ-λιπιδίων, μονοατομικό οξυγόνο και υπεροξυνιτρικό ανιόν που σχηματίζεται από το μονοξειδίο του αζώτου. Όλα τα παραπάνω ενεργούν σαν μονάδα που ονομάζεται **ελεύθερη ρίζα**. Οι χημικές μορφές αυτές ορίζονται σαν ενώσεις ικανές να δρουν ανεξάρτητα περιέχουν ένα ή περισσότερα μη δεσμικά ηλεκτρόνια (αυτά που καταλαμβάνουν ατομικό ή μοριακό τροχιακό από μόνα τους). Σχηματίζονται είτε από την

απώλεια ενός ηλεκτρονίου από μία μη-ρίζα, είτε από την πρόσληψη ενός ηλεκτρονίου από μία μη-ρίζα. Μπορούν εύκολα να σχηματιστούν όταν σπάσει ένας ομοιοπολικός δεσμός, όταν ένα ηλεκτρόνιο παραμείνει με κάθε άτομο, ο μηχανισμός ονομάζεται ομολυτική σχάση. Στο νερό, σχηματίζεται η πιο δραστική ρίζα του υδροξυλίου.



Σχήμα 35: Μηχανισμός λιπιδικής υπεροξειδωσης

Το 2,2 αζοδις-(2-αμιδινοπροπανο)υδροχλωρίδιο (AAPH) είναι ένας 'εκκινητής ελευθέρων ριζών' (Σχήμα 36) που δημιουργεί ελεύθερες ρίζες στο διάλυμα οι οποίες προκαλούν την οξείδωση του λινολεϊκού οξέος. Η μέθοδος μέτρησης της αντιοξειδωτικής δράσης με AAPH είναι μία γρήγορη και αξιόπιστη μέθοδος που χρησιμοποιείται ιδιαίτερα στον προσδιορισμό της αντιοξειδωτικής δράσης πρώτων υλών βοτάνων και μύρας. Βασίζεται στην αναστολή της λιπιδικής υπεροξειδωσης του λινολεϊκού οξέος, και είναι ένα μέτρο του πόσο αποδοτικά τα αντιοξειδωτικά προστατεύουν ενάντια στην λιπιδική υπεροξειδωση *in vitro*. Η οξείδωση του εξωγενούς λινολεϊκού οξέος από ένα θερμικό παραγωγό ελευθέρων ριζών (AAPH) ακολουθείται από φασματοσκοπία UV σε πολύ διαλυτοποιημένο δείγμα. [Detsi et al. 2009]

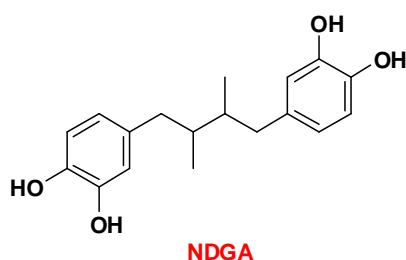


Σχήμα 36: Εκκινητής ελευθέρων ριζών

4.2.2 Προσδιορισμός της αναγωγής της σταθερής ρίζας DPPH

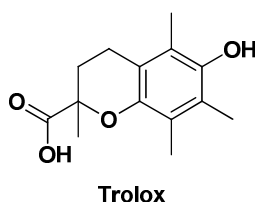
Μεταξύ της πληθώρας μεθόδων αξιολόγησης της αντιοξειδωτικής δραστηριότητας, το (DPPH) τεστ είναι πολύ χρήσιμο στο μικρομοριακό επίπεδο απαιτώντας λεπτά έως ώρες για τα λιπόφιλα αλλά και τα υδρόφιλα δείγματα. Σε περιπτώσεις που η δομή του ηλεκτρονιοδότη δεν είναι γνωστή, αυτή η μέθοδος μπορεί να διαθέσει πληροφορίες για το δυναμικό οξειδοαναγωγής του δείγματος, και συνεπώς μπορεί να βοηθήσει στην σύγκριση του δυναμικού οξειδοαναγωγής άγνωστων υλικών. Η λιποφιλία δεν συσχετίζεται καλά με τα αποτελέσματα. Δεν υπάρχει απόδειξη για οποιοδήποτε δομικό χαρακτηριστικό των εξεταζόμενων ουσιών που να συσχετίζεται με την αντιοξειδωτική δραστηριότητα. Η παρουσία του κουμαρινικού πυρήνα εμπλέκεται από μόνη της στην αναγωγική διαδικασία.

Ως ένωση αναφοράς για τη μελέτη της αντιοξειδωτικής δράσης με τη μέθοδο του DPPH και τη μελέτη της αντιφλεγμονώδους δράσης μέσω της αναστολής της δράσης του ενζύμου λιποξυγονάση (LOX), χρησιμοποιήθηκε η αντιοξειδωτική και αντιφλεγμονώδης ένωση NDGA (Nordihydroguaiaretic acid).



4,4'-(2,3-dimethylbutane-1,4-diyl)dibenzene-1,2-diol

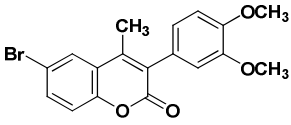
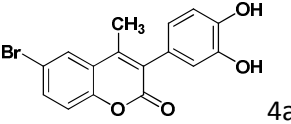
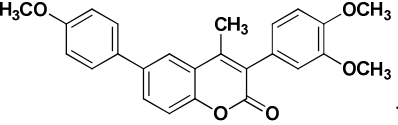
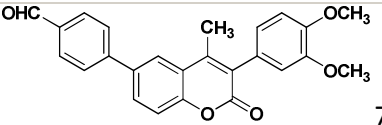
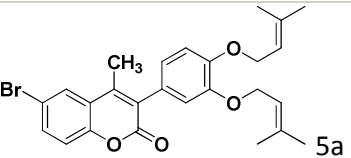
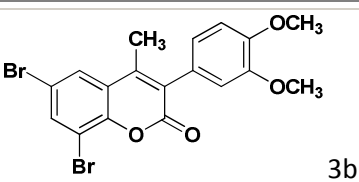
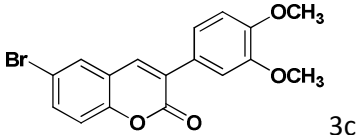
Για τη μελέτη της αντιοξειδωτικής δράσης με τη μέθοδο του AAPH, χρησιμοποιήθηκε ως ένωση αναφοράς το Trolox (6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid), ένα ικανό αντιοξειδωτικό ανάλογο της βιταμίνης E.

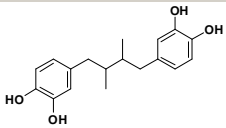
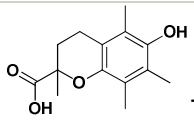


4.3 Βιοδοκιμές

Στον Πίνακα 2 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της αξιολόγησης της βιολογικής δράσης των ενώσεων που παρασκευάστηκαν στην παρούσα διπλωματική.

Πίνακας 2: Αποτελέσματα αξιολόγησης βιολογικής δράσης των νέων κουμαρινών

<p>Προϊόν</p>	<p>Αλληλεπίδραση με την ελεύθερη ρίζα DPPH 0.1mM 20/60 min</p>	<p>Ικανότητα αναστολής της λιποξυγονάσης από σόγια IC50 μM ή % σε 0.1mM</p>	<p>Αναστολή της υπεροξειδωσής του λινελαϊκού οξέος % σε 0.1mM</p>
 <p>3a</p>	<p>3/6</p>	<p>86%</p>	<p>90</p>
 <p>4a</p>	<p>77/62</p>	<p>75μM</p>	<p>75</p>
 <p>7a</p>	<p>17/7</p>	<p>44%</p>	<p>7</p>
 <p>7b</p>	<p>11/68</p>	<p>1%</p>	<p>64</p>
 <p>5a</p>	<p>67/68</p>	<p>74.5μM</p>	<p>92</p>
 <p>3b</p>	<p>13/2</p>	<p>0%</p>	<p>58</p>
 <p>3c</p>	<p>11/12</p>	<p>81μM</p>	<p>56</p>

 <p style="text-align: center;">NDGA</p>	84/83	40μM	
 <p style="text-align: center;">Trolox</p>			63

Η ένωση **3a** που χρησιμοποιήθηκε ως ένωση-οδηγός παρουσιάζει ικανοποιητική αναστολή της λιποξυγονάσης (86%) και ταυτόχρονα αναστέλλει την λιπιδική υπεροξειδωση κατά 90%, ενώ δεν παρουσιάζει σημαντική αλληλεπίδραση με το DPPH.

Προσθήκη ενός ακόμα ατόμου Br στον αρωματικό δακτύλιο της κουμαρίνης (προϊόν **3b**) οδηγεί σε δραματική απώλεια ικανότητας αναστολής του ενζύμου (0%), ελαττώνει σημαντικά την αναστολή της λιπιδικής υπεροξειδωσης (50%) και συνεχίζει να μην παρουσιάζει σημαντική αλληλεπίδραση με το DPPH (13/2).

Το τρίτο παράγωγο της σειράς A, στο οποίο δεν υπάρχει το μεθύλιο στην θέση 4 (προϊόν **3c**) εμφανίζει βελτιωμένη αναστολή της λιποξυγονάσης σε σχέση με το **3a** και δράση έναντι της λιπιδικής υπεροξειδωσης και του DPPH παρόμοια με αυτή του **3b**.

Από τα 6 παράγωγα της σειράς B εξετάστηκαν τα δύο που προέρχονται από αποπροστασία και αλκυλίωση του **3a**, δηλαδή οι κουμαρίνες **4a** και **5a**. Στο προϊόν **4a**, που δημιουργήθηκε κατεχολικό σύστημα, παρατηρήθηκε σημαντικότερη βελτίωση της αλληλεπίδρασης με DPPH (77/62) και διατήρηση σε υψηλά επίπεδα της αναστολής της λιποξυγονάσης με παράλληλη μικρή αλλά όχι σημαντική μείωση της ικανότητας αναστολής της λιπιδικής υπεροξειδωσης.

Το πρενυλιωμένο παράγωγο **5a** παρουσιάζει παρόμοια δράση έναντι της λιποξυγονάσης και του DPPH με το **4a**, ενώ παράλληλα εμφανίζει και την καλύτερη ικανότητα αναστολής της λιπιδικής υπεροξειδωσης σε σχέση με όλα τα μόρια που εξετάστηκαν σε αυτή την εργασία.

Τα προϊόντα **7a** και **7b** που προέκυψαν από την αντίδραση σύζευξης Suzuki της κουμαρίνης **3a** με βορονικά οξέα εμφανίζουν σημαντικά ελαττωμένη δράση σε σχέση με την **3a** σε όλες τις βιοδοκιμές εκτός από την αλληλεπίδραση με το DPPH, στην οποία εμφανίζεται ελαφριά βελτίωση.

Η αξιολόγηση της δράσης των ενώσεων **4b**, **4c**, **5b** και **5c** είναι υπό εξέλιξη.

4.4 Συμπεράσματα - Προτάσεις για μελλοντική έρευνα

- Η νέα εναλλακτική μέθοδος σύνθεσης ετεροκυκλικών βιοδραστικών μορίων αναλόγων των κουμαρινών, από κατάλληλα υποκατεστημένες 2-υδροξυ-ακετοφαινόνες και ιμιδαζολίδια καρβοξυλικών οξέων που ακολουθήθηκε, προσέφερε το σημαντικό πλεονέκτημα των ήπιων συνθηκών και την πραγματοποίηση της αντίδρασης σε ένα μόνο βήμα. Εφαρμόστηκε σε κατάλληλα υποκατεστημένα φαινολικά οξέα με πολύ καλά αποτελέσματα. Με τη μέθοδο αυτή παρασκευάστηκαν συνολικά 3 νέα κουμαρινικά ανάλογα. Με αυτά διερευνήθηκε η επίδραση της παρουσίας ή μη βρωμίου στην θέση 8 και μεθυλίου στην θέση 4 στις βιολογικές ιδιότητες των κουμαρινικών παραγώγων.
- Διερευνήθηκαν αντιδράσεις αποπροστασίας με σκοπό να μελετηθεί αν και εφόσον η ύπαρξη κατεχολικού συστήματος στον αρωματικό δακτύλιο της θέσης 3 του βενζοπυρανικού δακτυλίου, βελτιστοποιεί τις βιολογικές ιδιότητες των νέων κουμαρινικών παραγώγων και έτσι προέκυψαν 3 νέα παράγωγα.
- Διευρύνθηκαν αντιδράσεις αλκυλίωσης προκειμένου να μελετηθεί η σχέση δομής-αντιοξειδωτικής και αντιφλεγμονώδους δράσης των παραγόμενων ενώσεων.
- Διερευνήθηκε η αντίδραση σύζευξης Σουζούκι (Suzuki – Coupling) σε διαφορετικές πειραματικές συνθήκες (βάση, διαλύτης, αναλογία αντιδρώντων, θερμοκρασία) με αποτέλεσμα την παρασκευή 2 νέων ενώσεων, με σκοπό τη σύνθεση παραγώγων με βελτιωμένη βιολογική δραστικότητα.
- Όλα τα νέα μόρια που παρασκευάστηκαν χαρακτηρίστηκαν πλήρως με φασματοσκοπικές μεθόδους (^1H και ^{13}C NMR).
- Τα νέα παράγωγα εξετάστηκαν ως προς την αντιοξειδωτική τους δράση με δύο διαφορετικές *in vitro* μεθόδους (ικανότητα δέσμευσης της δραστικής ρίζας DPPH και αναστολή της λιπιδικής υπεροξειδωσης) και ως προς την ικανότητά τους να αναστέλλουν τη δράση της φυτικής λιποξυγονάσης, ικανότητα που συνδέεται ποιοτικά με την αντιφλεγμονώδη δράση τους.
- Τα αποτελέσματα των βιολογικών δοκιμασιών οδήγησαν σε συμπεράσματα για τη σχέση δομής-βιολογικής δράσης των νέων μορίων. Από τη μελέτη αυτή προσδιορίστηκαν τα δομικά χαρακτηριστικά που συνδυάζουν ισχυρή αντιοξειδωτική και αντιφλεγμονώδη

δράση και θα χρησιμεύσουν ως μόρια-οδηγοί για την ανάπτυξη νέων πιο αποτελεσματικών βιοδραστικών μορίων αυτής της κατηγορίας. Συγκεκριμένα, τα κουμαρινικά ανάλογα **4a** και **5a** εμφανίζουν τη βέλτιστη συνδυασμένη αντιοξειδωτική και αντιφλεγμονώδη δράση:



Όπως αποδείχθηκε, η παρουσία ενός υποκαταστάτη βρωμίου στη θέση 6 του αρωματικού δακτυλίου του βενζοπυρανικού συστήματος είναι απαραίτητη για την εμφάνιση αξιόλογης ικανότητας αναστολής του ενζύμου λιποξυγονάση αφού η αντικατάσταση του συγκεκριμένου υποκαταστάτη με φαινύλιο (ενώσεις **7a 7b**) ή η προσθήκη ενός ακόμη βρωμίου στη θέση 8 (ένωση **3b**) οδηγούν σε μόρια με πολύ χαμηλή δράση. Η ύπαρξη κατεχολικού συστήματος συνδυασμένη με την παρουσία βρωμίου στη θέση 6 (ένωση **4a**), οδηγεί σε ένα μόριο με ιδιαίτερα ικανοποιητική συνδυασμένη αντιοξειδωτική και αντιφλεγμονώδη δράση ενώ η αλκυλίωση με πρενυλο-ομάδα (μια από τις ευρύτερα διαδεδομένες αλκυλο-ομάδες σε φυσικά προϊόντα) (ένωση **5a**) έχει ως αποτέλεσμα τη διατήρηση της αντιφλεγμονώδους δράσης και την αύξηση της ικανότητας αναστολής της λιπιδικής υπεροξειδωσης σε σύγκριση με την κουμαρίνη **4a**. Η πρενυλο-ομάδα αποτελεί σαφώς καλύτερη επιλογή αλκυλο-ομάδας σε σχέση με το μεθύλιο αφού, εκτός της αυξημένης αντιφλεγμονώδους δράσης και ικανότητας αναστολής της λιπιδικής υπεροξειδωσης, εμφανίζει και πολύ ικανοποιητική αλληλεπίδραση με την ελεύθερη ρίζα DPPH (σύγκριση ενώσεων **4a** και **3a**).

Βιβλιογραφία

- Applewhite 1989: Vegetable Protein Utilisation in Human Foods and Animal Feddstuffs. Thomas.H. Applewhite American Oil Chemists' Society. Champaign Illinois. **1989**
- Bandgar et al 2004 : Bandgar, B. P. ; Bettigeri, Sampada V. ; Phopase J. Tetrahedron 2004, 45, 6959-6962
- Beller et al. 1995 : (a) Beller, M.; Fischer, H.; Hermann, W. H.; Ofele, K.; Brossmer, C. Angew. Chem., Int. Ed. Engl. 1995, 34, 1848; (b) Albisson, D. A.; Bedford, R. B.; Lawrence, S. E.; Scully, P. N. Chem. Commun. 1998, 2095; (c) Weissman, H.; Buchwald, S. L. Angew. Chem., Int. Ed. 1999, 38, 2413; (d) Wolfe, J. P.; Buchwald, S. L. Angew. Chem., Int. Ed. 1999, 38, 2413; (e) Wolfe, J. P.; Singer, R. A.; Yange, B. H.; Buchwald, S. L. J. Am. Chem. Soc. 1999, 121, 9550.
- Bestmann et al. 1969: H. J. Bestmann and H. J. Lang, Tetrahedron Lett, 2101 (1969)
- Brufola et al. 1996: Brufola, G.; Fringuelli, F.; Piermatti, O.; Pizzo, F. *Heterocycles* **1996**, 43, 1257;
- Confalone 1983: P. N. Confalone and D. L. Confalone, Tetrahedron, **39**, 1265 (1983)
- Cotterill et al. 1994: W. D. Cotterill, S. A. Fairbank, R. Livingstone and R. Peace, J. Chem. Research (S), 254 (1994) (M), 1489 (1994)
- Crombie et al. 1987: L. Crombie, R. C. F. Jones and C. J. Palmer, J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1, 317 (1987)
- De Caterina et al. 2004: De Caterina R, Zampolli A. From asthma to atherosclerosis-5-lipoxygenase, leukotrienes, and inflammation. N Engl J Med **2004**; 350: 4–7.
- de Lange et al 1995 : de Lange, R.-J.; van Hooijdonk, M. J. C. M.; Brandsma, L. Tetrahedron 1995, 60, 7284
- Detsi et al. 2009: Detsi, A.; Majdalani, M.; Kontogiogis, C. A.; Hadjipavlou – Litina, D.; Kefalas, P. 'Natural and synthetic 2'-hydroxy-chalcones and aurones: synthesis characterization and evaluation of the antioxidant and soybean lipoxygenase inhibitory activity'. Bioorg. Med. Chem. **2009**, 17 , 8073-8085
- Drazen 1999: Drazen JM. Asthma therapy with agents preventing leykotriene synthesis or action. Proc Assoc Am Physicians **1999**; 111: 547-59.
- Duquenois 1967: Duquenois P. Coumarines et derives: Repartition dans la regne vegetal et biosynthese. Pharm Weekbl [Sci] 1967; 102; 443-55
- Egan et al. 1990: D. Egan, R. O'Kennedy, E. Moran, D. Cox, E. Prosser and R.D. Thornes, Drug Metabolism Reviews, 22, 503 (1990)
- Fylaktakidou 1997: Φυλακτακίδου Κωνσταντίνα, 1997, Σύνθεση και μελέτη συμπυκνωμένων γραμμικών και 4-υποκατεστημένων κουμαρινικών παραγώγων
- Gallwitz et al. 1993: Gallwitz WE, Mundy GR, Lee CH, Qiao M, Roodman GD, Raftery M, et al. 5-Lipoxygenase metabolites of arachidonic acid stimulate isolated osteoclasts to resorb calcified matrices. J Biol Chem **1993**; 268:10087–94.
- Ghosh et al. 1998: Ghosh J, Myers CE. Inhibition of arachidonate 5-lipoxygenase triggers massive apoptosis in human prostate cancer cells. Proc Natl Acad Sci USA **1998**; 95:13182–7.
- Hoefnagel et al. 1995: A. J. Hoefnagel, E. A. Gunnewegh, R. S. Downing and H. Van Bekkum, J. Chem. Soc. Chem. Commun. (1995)
- Hoye et al. 1996: (a) Hoye, T. R.; Chen, M. J. Org. Chem. 1996, 61, 7940; (b) Hensel, V.; Lutzow, K.; Jacob, J.; Gessler, K.; Schluter, A.-D. Angew. Chem., Int. Ed. 1997, 36, 2654; (c) Schwartz,
- Huang et al. 2011: Huang, X. Y.; Shan, Z. J.; Zhai, H. L.; Su, L.; Zhang, X. Y. Chem. Biol. Drug Des. **2011**, 78, 651.

- Jiménez-Orozco et al. 2011: Jiménez-Orozco FA, Rosales AA, Vega-López A, Domínguez-López ML, García-Mondragón MJ, Maldonado-Espinoza A, Lemini C, Mendoza-Patiño N, Mandoki JJ, *Eur J Pharmacol.* 2011 Oct 1;668(1-2):35-41. Epub 2011 Jul 3
- Johnson 1942: J. R. Johnson, "Organic Reactions", J. Wiley & Sons, Vol. 1, New York, 1942, p. 210
- Jones 1967: G. Jones, "Organic Reactions", J. Wiley & Sons, Vol. 15, New York, 1967, p. 204
- Kamlage 1999 : Kamlage, S.; Sefkow, M.; Peter, M. G. J. *Org. Chem.* 1999, 64, 2938, and references cited therein
- Kashman et al. 1992: Y. Kashman, K. R. Gustafson, R. W. Fuller, J. H. Cardellina, J. B. McMahon, M. J. Currens, R. W. Buckheit, Jr, S. H. Hughes, G. R. Cragg and M. R. Boyd, *J. Med. Chem.*, 35, 2735 (1992)
- Kawase et al. 1978: Y. Kawase, S. Yamaguchi, K. Aoyama and M. Matsuda, *Bull. Chem. Soc. Japan*, **51**, 1907 (1978)
- Knoevenagel 1904: E. Knoevenagel, *Ber. D. Chem. Ges.*, **31**, 2585 (1898), **37**, 4461 (1904)
- Kostova et al. 2001: Kostova, I.; Bhatia, S.; Grigorov, P.; Balkansky, S.; Parmar, V. S.; Prasad, A. K.; Saso, L. *Curr. Med. Chem.* **2001**, 18, 3929.
- Kucherenko et al. 1995: A. Kucherenko, M. T. Flavin, W. A. Boulanger, A. Khilevich, R. L. Shone, J. D. Rizzo, A. K. Sheinkman and Z. Q. Xu, *Tetrahedron Lett.*, **36**, 5475 (1995)
- Lee et al. 2011: Lee, S. J.; Lee, U. S.; Kim, W. J.; Moon, S. K. *Mol. Med. Rep.* **2011**, 4, 337.
- Mali et al. 1977: R. S. Mali and V. J. Yadav, *Synthesis*, 464 (1977)
- Marx et al. 1975: J. N. Marx, P. S. Song and P. K. Chui, *J. Heterocyclic Chem.*, **12**, 417 (1975)
- McMillian et al. 1992: McMillian RM, Walker ERH. Designing therapeutically effective 5-lipoxygenase inhibitors. *Trends Pharmacol Sci.* **1992**;13:323-30.
- Mehrabian et al. 2003: Mehrabian M, Allayee H. 5-Lipoxygenase and atherosclerosis. *Curr Opin Lipidol* **2003**; 14:447–57.
- Miyaura et al. 1995: (a) Miyaura, N.; Suzuki, A. *Chem. Rev.* 1995, 95, 2457; (b) Suzuki, A. J. *Organomet. Chem.* 1999, 576, 147; (c) Suzuki, A. J. *Organomet. Chem.* 2002, 653, 83; (d) Littke, A. F.; Fu, G. C. *Angew. Chem., Int. Ed.* 2002, 41, 4176.
- Murray et al. 1982: D.H. Murray, J. Mendez, S.A. Brown (Eds.), *The Natural Coumarins: Occurrence, Chemistry and Biochemistry*, J. Wiley & Sons, New York, 1982
- Narasimahan et al. 1979: Narasimahan, N. S.; Mali, R. S.; Barve, M. V. *Synthesis* **1979**, 906
- Nicolaides et al. 1990: D. N. Nicolaides, S. G. Adamopoulos, D. A. Lefkaditis and K. E. Litinas, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1*, 2127 (**1990**)
- Nicolaides et al. 1991: D. N. Nicolaides, S. G. Adamopoulos, E. J. Hatzigrigoriou and K. E. Litinas, *ibid.*, 3159 (**1991**)
- Nicolaides et al. 1992: D. N. Nicolaides, C. Bezergiannidou-Balouktsi, K. E. Litinas, E. Malamidou-Xenikaki, D. Mentzafos and A. Terzis, *J. Chem. Research (M)*, 826 (**1992**)
- O’Kennedy et al. 1997: R. O’Kennedy, R.D. Thornes (Eds.), *Coumarins: Biology, Applications and Mode of Action*, J. Wiley & Sons, Chichester, 1997
- Osborne 1983: A. G. Osborne, *Tetrahedron*, **39**, 1523 (1983)
- Pechmann et al. 1884: v. Pechmann, H.; Duisberg, C. *Chem. Ber.* **1884**, 17, 929
- Phuong Thien Thuong et al. 2009: Phuong Thien Thuong; Tran Manh Hung; Tran Minh Ngoc; Do Thi Ha; Byung Sun Min; Seung Jun Kwack; Tae Suk Kang; Jae Sue Choi; KiHwan Bae, *Phytother. Res.* **24**: 101–106 (2010)
- Rdmark 2003: Rdmark O. 5-Lipoxygenase-derived leukotrienes: mediators also of atherosclerotic inflammation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **2003**; 23:1140–2.
- Roussaki et al. 2010: Marina Roussaki, Christos A. Kontogiorgis, Dimitra Hadjipavlou-Litina, Stylianos Hamilakis, Anastasia Detsi, *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 20 (2010) 3889–3892
- Russell et al. 1941: Russell, A.; Frye, J. R. *Org. Synth.* **1941**, 21, 22

- Sánchez-Reus et al. 2005: Sánchez-Reus MI, Peinado II, Molina-Jiménez MF, Benedí J, Neurosci Res. 2005 Sep;53(1):48-56
- Sethna et al. 1938: Sethna, S. M.; Shah, N. M.; Shah, R. C. *J. Chem. Soc.* **1938**, 228
- Sethna et al. 1953: S. Sethna and R. Phadke, "Organic Reactions", J. Wiley & Sons, Vol. 7, New York, 1953, p. 1-2.
- Shriner 1942: Shriner, R. L. *Org. React.* **1942**, 1, 1
- Simmonis et al. 1914: Simmonis, H.; Remmert, P. *Chem. Ber.* **1914**, 47, 2229
- Smith et al. 1946: L. I. Smith and P. F. Wiley, *J. Am. Chem. Soc.*, **68**, 887 (1946)
- Stahman et al. 1941: Stahman, M. A., Heubner, C. F. & Link, K. P. (1941) *J. biol. Chem.* 138, 513
- Symeonidis et al. 2009: Theodoros Symeonidis, Konstantina C. Fylaktakidou, Dimitra J. Hadjipavlou-Litina, Konstantinos E. Litinas, *Europ. Journal of Med. Chem.* 44 (**2009**) 5012–5017
- U.S. DoHHS 1992: National Toxicology Program Technical Report on the Toxicology and Carcinogenesis of Coumarin in F344/N Rats and B6C3F1 Mice (Gavage Studies). US Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 92-3153, **1992**
- Van Rossum et al. 2002: Van Rossum GS, Bijvelt JJ, van den Bosch H, Verkleij AJ, Boonstra J. Cytosolic phospholipase A2 and lipoxygenase are involved in cell cycle progression in neuroblastoma cells. *Cell Mol Life Sci* **2002**; 59:181–8.
- Vasconcelos et al. 2007: Vasconcelos, J. F.; Teixeira, M. M.; Barbosa-Filho, J. M.; Agra, M. F.; Nunes, X. P.; Giulietti, A. M.; Ribeiro-dos-Santos, R.; Soares, M. B. *Eur. J. Pharmacol.* **2007**, 609, 126.
- Watt et al. 2005: Watt BE, Proudfoot AT, Bradberry SM, Vale JA. **Anticoagulant rodenticides.** *Toxicol Rev.* 2005;24:259–269
- Werz 2007: Inhibition of 5-Lipoxygenase Product Synthesis by Natural Compounds of Plant Origin. *Oliver Werz Planta Med* (**2007**) ; 73: 1331- 1357
- Woods et al. 1962: Woods, L. L.; Sapp, J. *J. Org. Chem.* **1962**, 27, 3703
- Worden et al. 1970: L. R. Worden, K. D. Kaufman, R. J. Smith and G. N. Widiger, *J. Chem. Soc. (C)*, 227 (**1970**)

Παράρτημα Φασμάτων
