



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

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

ΣΧΕΔΙΑΣΜΟΣ ΚΑΙ ΣΥΝΘΕΣΗ ΝΕΩΝ ΠΡΕΝΥΛΟΞΥ-
ΚΟΥΜΑΡΙΝΙΚΩΝ ΑΝΑΛΟΓΩΝ ΜΕ ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΗ
ΚΑΙ ΑΝΤΙΦΛΕΓΜΟΝΩΔΗ ΔΡΑΣΗ

ΕΥΗ ΧΑΡΑΛΑΜΠΟΥΣ

ΕΠΙΒΛΕΠΟΥΣΑ ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ

ΑΝΑΣΤΑΣΙΑ ΔΕΤΣΗ

ΑΘΗΝΑ 2015

Περίληψη

Σκοπός της παρούσας εργασίας είναι η σύνθεση νέων πρενυλοξυ-κουμαρινικών αναλόγων και η μελέτη της πιθανής αντιοξειδωτικής και αντιφλεγμονώδους δράσης αυτών.

Συγκεκριμένα, σχεδιάστηκαν και συντέθηκαν ανάλογα των 5 και 7-υδροξυ-κουμαρινών που περιέχουν φαινυλο- και αλκυλο-υποκαταστάτες στις θέσεις 3 και 4 του βενζοπυρανικού δακτυλίου. Τα νέα παράγωγα, παρασκευάστηκαν μέσω αντιδράσεων συμπύκνωσης ενός φαινυλοξικού οξέος με μια κατάλληλα υποκατεστημένη 2-υδροξυ-ακετοφαινόνη σε βασικό περιβάλλον. Οι αντιδράσεις σύνθεσης των κουμαρινών, πραγματοποιήθηκαν με ακετυλοξυ-υποκαταστάτη στη θέση 7 ή 5. Παρασκευάστηκαν συνολικά δεκαπέντε κουμαρινικά ανάλογα, εκ των οποίων τα εννέα είναι νέες ενώσεις, άγνωστες στη βιβλιογραφία, οι οποίες περιλαμβάνουν πρενυλοξυ, γερανυλοξυ και φαρνεζυλοξυ-ομάδες στις θέσεις 5- και 7- του κουμαρινικού δακτυλίου.

Τα νέα αυτά παράγωγα στη συνέχεια, ελέγχθησαν ως προς την αντιοξειδωτική δράση τους, *in vitro* με βάση την ικανότητα δέσμευσης της σταθερής ελεύθερης ρίζας DPPH παρουσιάζοντας μη αξιόλογα αποτελέσματα, ενώ η αναστολή της λιπιδικής υπεροξειδωσης του λινολεϊκού οξέος που επάγεται από τη ρίζα AAPH και η αντιφλεγμονώδη δράση είναι υπό εξέλιξη.

Η ταυτοποίηση της δομής των νέων αυτών ενώσεων πραγματοποιήθηκε με Φασματοσκοπία Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού NMR. Τα σημαντικότερα συμπεράσματα που προέκυψαν κατά την ολοκλήρωση της ερευνητικής διαδικασίας είναι ότι τα νέα κουμαρινικά ανάλογα δεν παρουσιάζουν αντιοξειδωτική δράση.

Επιστημονική περιοχή: Οργανική σύνθεση βιοδραστικών αναλόγων φυσικών προϊόντων.

ΛΕΞΕΙΣ ΚΛΕΙΔΙΑ: πρενυλοξυ-κουμαρίνες, αντιοξειδωτική δράση, αντιφλεγμονώδης δράση

Abstract

The purpose of this work is the synthesis of new prenyloxy-coumarin analogs and study the possible antioxidant and anti-inflammatory action of these.

Specifically, were designed and synthesized analogs of 5 and 7-hydroxy-coumarins containing phenyl and alkyl substituents at positions 3- and 4- of the benzopyran ring. The novel derivatives were prepared by condensation reactions of a phenylacetic acid with an appropriately substituted 2-hydroxyacetophenone in a basic environment. The synthesis reactions of coumarins, performed acetyloxy substituent at position 7 or 5 were prepared in total fifteen coumarin analogs, of which nine are novel compounds, not known in the literature, including prenyloxy, geranyloxy and farnezyloxy-groups at the 5- and 7 of the coumarin ring.

These new derivatives are then tested for their antioxidant activity, in vitro based on the stable free radical DPPH scavenging capacity showing poor results, while the inhibition of lipid peroxidation of linoleic acid induced by AAPH radical and anti-inflammatory action is still ongoing.

The identification of the structure of these novel compounds was performed by NMR spectroscopy NMR. The most important conclusions drawn at the conclusion of the research process are that new coumarin analogues show no promising antioxidant activity.

Scientific area: Organic synthesis of bioactive analogues of natural products.

KEYWORDS: prenyloxy-coumarins, antioxidant, anti-inflammatory effect

Ευχαριστίες

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στο εργαστήριο Οργανικής Χημείας του Τμήματος Χημικών Μηχανικών του Εθνικού Μετσόβιου Πολυτεχνείου κατά το ακαδημαϊκό έτος 2014-2015.

Πρώτα απ' όλα, θέλω να ευχαριστήσω την επιβλέπουσα καθηγήτρια της διπλωματικής εργασίας μου, Επίκουρο Καθηγήτρια, κα. Αναστασία Δέτση, για την εμπιστοσύνη, την πολύτιμη βοήθεια και καθοδήγηση της κατά τη διάρκεια εκπόνησης της διπλωματικής μου εργασίας, κατά τη διάρκεια συγγραφή της, τις συμβουλές και την καθοδήγησή της σε εργαστηριακό και γνωστικό επίπεδο, καθώς και την υποστήριξη και βοήθεια που έλαβα για τα μετέπειτα βήματα μου.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω ιδιαίτερα την υποψήφια διδάκτορα στο εργαστήριο Οργανικής Χημείας, Ελένη Καβέτσου, για την συνεχή βοήθεια σε κάθε προκύπτον ζήτημα, για την λήψη και αποτίμηση των φασμάτων NMR και για την ουσιαστική συνεισφορά της στην εκτέλεση της διπλωματικής εργασίας, όπως επίσης την υποψήφια διδάκτορα, Ανδρομάχη Τζάνη, στο εργαστήριο Οργανικής Χημείας, για την άψογη συνεργασία και την βοήθεια κατά την εκτέλεση των πειραμάτων και για την αποτίμηση των φασμάτων NMR.

Επίσης, είμαι ευγνώμων στα υπόλοιπα μέλη της εξεταστικής επιτροπής της διπλωματικής εργασίας μου κα. Ευαγγελία Παυλάτου και κ. Εμμανουήλ Κούκιος, για την προσεκτική ανάγνωση της εργασίας μου και για τις πολύτιμες υποδείξεις τους.

Οφείλω ευχαριστίες στην Καθηγήτρια κα. Δήμητρα Χατζηπαύλου-Λίτινα, στον Τομέα Φαρμακευτικής Χημείας του Τμήματος Φαρμακευτικής του Αριστοτέλειου Πανεπιστημίου Θεσσαλονίκης, για την διεξαγωγή των *in vitro* βιοδοκιμασιών για την εκτίμηση της αντιοξειδωτικής και αντιφλεγμονώδους δράσης των νέων παραγώγων.

Ευχαριστώ τους φίλους(ες) και συναδέλφους μου για την ηθική υποστήριξή τους.

Πάνω απ' όλα, είμαι ευγνώμων στην οικογένεια μου, Χαράλαμπο, Μαρία και Έλενα Χαραλάμπους για την ολόψυχη αγάπη και υποστήριξή τους όλα αυτά τα χρόνια. Αφιερώνω αυτή την εργασία στην οικογένεια μου.

Πίνακας περιεχομένων

Εισαγωγή.....	1
ΜΕΡΟΣ Α: Θεωρητικό μέρος.....	4
1. Ανασκόπηση φυσικών κουμαρινών και η φαρμακολογική τους δράση	4
2. Κουμαρίνες και η Φαρμακευτική τους δράση	8
2.1 Αντικαρκινική δράση	8
2.2 Αντιφλεγμονώδης και αντιοξειδωτική δράση	10
2.3 Αντιϊική δράση	14
2.4 Αντιμικροβιακή δράση.....	15
2.5 Αντιθρομβωτική και Αντιπηκτική δράση	16
2.6 Αντιμαλάρια δράση	17
3. Μέθοδοι σύνθεσης κουμαρινών	18
3.1 Βιοσύνθεση κουμαρίνης.....	18
3.2 Αντίδραση Perkin	19
3.3 Αντίδραση Pechmann	21
3.4 Προσθήκη Michael.....	22
3.5 Αντίδραση Knoevenagel	22
3.6 Αντίδραση Wittig	23
3.7 Αντίδραση Kostanecki-Robinson	24
3.8 Αντίδραση Reformatsky.....	25
3.9 Αντίδραση Vilsmeier-Haack	25
4. Πρενυλοξυ-κουμαρίνες	26
ΜΕΡΟΣ Β: Σχεδιασμός, αξιολόγηση βιολογικής δράσης, ταυτοποίηση δομής, διαχωρισμός και απομόνωση νέων πρενυλοξυ-κουμαρινικών αναλόγων.....	30
5. Σχεδιασμός νέων πρενυλοξυ-κουμαρινικών αναλόγων	30
5.1 Σχεδιασμός νέων παραγώγων	30
5.1.1 Σειρά Α: Ακετυλοξυ-3-αρυλο-κουμαρίνες	31
5.1.2 Σειρά Β: Υδροξυλιωμένες-3-αρυλο-κουμαρίνες.....	31
5.1.3 Σειρά Γ: Πρενυλοξυ-3-αρυλο-κουμαρίνες	32
5.1.4 Σειρά Δ: Γερανυλοξυ-3-αρυλο-κουμαρίνες	33
5.1.5 Σειρά Ε: Φαρνεζυλοξυ-3-αρυλο-κουμαρίνες.....	33
5.2 Σύνθεση νέων μορίων.....	34
5.2.1 Σύνθεση 5- και 7-ακετυλόξυ-3-αρυλο-κουμαρινών	34
5.2.2 Σύνθεση 5- και 7-υδροξυ-3-αρυλο-κουμαρινών	35
5.2.3 Σύνθεση 5- και 7-πρενυλοξυ-3-αρυλο-κουμαρινών.....	35
6. Αξιολόγηση βιολογικής δράσης των νέων κουμαρινικών αναλόγων	36

6.1.Αντιοξειδωτική δράση	36
6.1.1 Ικανότητα δέσμευσης της σταθερής ελεύθερης ρίζας DPPH.....	36
6.1.2 Αναστολή λιπιδικής υπεροξειδωσης του λινολεϊκού οξέος.....	39
6.2 Αντιφλεγμονώδης δράση.....	41
7. Φασματοσκοπία μαγνητικού συντονισμού (NMR- Nuclear magnetic resonance).....	43
7.1 Φασματοσκοπική μελέτη σειράς Α: Ακετυλοξυ-3-αρυλο-κουμαρίνες	45
7.2 Φασματοσκοπική μελέτη σειράς Β: Υδροξυλιωμένες-3-αρυλο-κουμαρίνες.....	46
7.3 Φασματοσκοπική μελέτη σειράς Γ: Πρενυλοξυ-3-αρυλο-κουμαρίνες	47
7.4 Φασματοσκοπική μελέτη σειράς Δ: Γερανυλοξυ-3-αρυλο-κουμαρίνες	48
7.5 Φασματοσκοπική μελέτη σειράς Ε: Φαρνεζυλοξυ-3-αρυλο-κουμαρίνες.....	49
8. Χρωματογραφία Λεπτής Στοιβάδας (Thin Layer Chromatography-TLC) και Στήλη χρωματογραφίας (Flash column chromatography).....	51
ΜΕΡΟΣ Γ: Πειραματικό μέρος.....	54
9. Όργανα, συσκευές, διαλύτες και αντιδραστήρια.....	54
10. Συνθετική πορεία νέων κουμαρινικών αναλόγων	55
10.1 Μέθοδος σύνθεσης 7- και 5-ακετυλοξυ-3-αρυλο κουμαρινών (στάδιο 1).....	55
10.2 Μέθοδος απακετευλίωσης κουμαρινών (στάδιο 2).....	57
10.3 Σύνθεση πρενυλοξυ-κουμαρινών (στάδιο 3)	59
10.4 Μέθοδοι βιοδοκιμασιών	64
10.4.1 Προσδιορισμός της ικανότητας δέσμευσης της σταθερής ελεύθερης ρίζας DPPH..	64
10.4.2 Υπολογισμός της αναστολής της λιπιδικής υπεροξειδωσης (AAPH).....	64
10.4.3 Προσδιορισμός της ικανότητας αναστολής του ενζύμου λιποξυγονάση από σόγια	65
ΜΕΡΟΣ Δ: Αποτελέσματα και συζήτηση.....	66
11. Αποτελέσματα βιολογικής δράσης.....	66
12. Συμπεράσματα.....	68
13. Προτάσεις για μελλοντική έρευνα.....	68
Βιβλιογραφία	69
Παράρτημα φασμάτων.....	79

Λίστα Σχημάτων

Σχήμα 1: Χημική δομή της απλούστερης κουμαρίνης-1, αριθμημένη	1
Σχήμα 2: Δράσεις κουμαρινικών ενώσεων.....	3
Σχήμα 3: Κατηγοριοποίηση απλών κουμαρινικών ενώσεων (4).....	3
Σχήμα 4: Χημική δομή geiparvarin	9
Σχήμα 5: Προτεινόμενος μηχανισμός αντιοξειδωτικής δράσης της 7,8-διακετοξυ-4- μεθυλο-κουμαρίνης προς 7,8-διυδροξυ-4 μεθυλο-κουμαρίνη (52)	12
Σχήμα 6: Σύνοψη της σχέσης δομής-δράσης κουμαρινών με αντιοξειδωτική δραστηριότητα (56) ...	13
Σχήμα 7: Χημική δομή Ουμπελλιφερόνης, φραξετίνης και η δαφνίνης	13
Σχήμα 8: Χημική δομή της φαινπροκουμόνη και βαρφαρίνη.....	15
Σχήμα 9: Χημική δομή Νοβοβοκίνης.....	15
Σχήμα 10: Χημική δομή δικουμαρόλης και βαρφαρίνης	17
Σχήμα 11: Χημική δομή οσθόλης και σκοπολετίνης	17
Σχήμα 12: Προτεινόμενη πορεία βιοσύνθεσης κουμαρίνης στα φυτά (71)	19
Σχήμα 13: Στάδια αντίδρασης Perkin	20
Σχήμα 14: Στάδια αντίδρασης Pechmann	21
Σχήμα 15: Στάδια αντίδρασης με προσθήκη Michael	22
Σχήμα 16: Στάδια αντίδρασης Knoevenagel.....	23
Σχήμα 17: Στάδια αντίδρασης Wittig.....	24
Σχήμα 18: Αντίδραση Kostanecki-Robinson	25
Σχήμα 19: Στάδια αντίδρασης Reformatsky με παραγόμενο προϊόν την κουμαρίνη-1	25
Σχήμα 20: Σύνθεση 3,4-υποκατεστημένων κουμαρινών μέσω της αντίδρασης Vilsmeier-Haack	26
Σχήμα 21: Χημική δομή πρενυλο-(i) γερανυλο- (ii) φαρνεζυλο- (iii)ομάδας	26
Σχήμα 22: Χημική δομή ωραπτένης	27
Σχήμα 23: Γενική συνθετική οδός για την παρασκευή πρενυλοξυ-κουμαρινών.....	29
Σχήμα 24: Μόριο οδηγός για τον σχεδιασμό και σύνθεση νέων πρενυλοξυ-κουμαρινικών αναλόγων	30
Σχήμα 25: Ακετυλοξυ-3-(4-μεθοξυ-φαινυλο)-κουμαρινικά παράγωγα σειράς Α.....	31
Σχήμα 26: Υδροξυλιωμενα-3-αρυλο-κουμαρινικά παράγωγα σειράς Β	32
Σχήμα 27: Πρενυλοξυ-3-(4-μεθοξυ-φαινυλο)- κουμαρινικά παράγωγα σειράς Γ	32
Σχήμα 28: Γερανυλαξυ-3-αρυλο- κουμαρινικά παράγωγα σειράς Δ	33
Σχήμα 29: Φαρνεζυλοξυ-3-αρυλο- κουμαρινικά παράγωγα σειράς Ε.....	34
Σχήμα 30: Αντίδραση σύνθεσης 5- και 7-ακετυλοξυ-3-αρυλο-κουμαρινών.....	35
Σχήμα 31: Αντίδραση σύνθεσης 5- και 7-υδροξυ-3-αρυλο-κουμαρινών.....	35
Σχήμα 32: Αντίδρασεις σύνθεσης 5- και 7-πρενυλοξυ-3-αρυλο-κουμαρινών	36
Σχήμα 33: Χημική δομή DPPH.....	37
Σχήμα 34: Αντίδραση DPPH ρίζας παρουσία αντιοξειδωτικής ένωσης	37
Σχήμα 35: Χημική δομή NDGA.....	38
Σχήμα 36: Μηχανισμός λιπιδικής υπεροξειδωσης.....	40
Σχήμα 37: Χημική δομή AAPH.....	40
Σχήμα 38: Χημική δομή Trolox	41
Σχήμα 39: Υποστρώματα λιποξυγενάσης, λινελαϊκό, α- λινελαϊκό και το αραχιδονικό οξύ	41
Σχήμα 40: Κατάλυση αραχιδονικού οξέος προς σχηματισμό λευκοτριενίων.....	42
Σχήμα 41: Αντίδραση λιποξυγενάσης.....	42

Λίστα Πινάκων

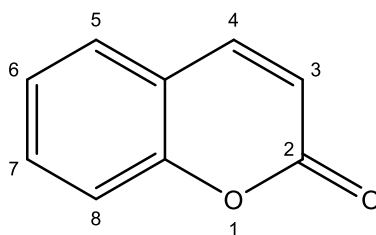
Πίνακας 1: Φυσικές κουμαρίνες, η προέλευση τους και η βιολογική τους δράση	4
Πίνακας 2: Αποτελέσματα της in vitro αξιολόγησης της αντιοξειδωτικής δράσης των νέων μορίων	66

Λίστα Εικόνων

Εικόνα 1: Οικογένειες φυτών που περιέχουν κουμαρίνη (9).....	2
Εικόνα 2: Διάγραμμα απορρόφησης DPPH ρίζας πριν και μετά την παρουσία αντιοξειδωτικής ένωσης	38
Εικόνα 3: Χημικές μετατοπίσεις χαρακτηριστικών ομάδων στη φασματοσκοπία ^1H NMR	44
Εικόνα 4: Συνήθεις πολλαπλότητες σπίν	45
Εικόνα 5: Φάσμα πρωτονίου ^1H NMR (CDCl_3 , 300MHz) της κουμαρίνης 3	46
Εικόνα 6: Φάσμα πρωτονίου ^1H NMR (CDCl_3 , 300MHz) της κουμαρίνης 4	47
Εικόνα 7: Φάσμα πρωτονίου ^1H NMR (CDCl_3 , 300MHz) της κουμαρίνης 9	48
Εικόνα 8: Φάσμα πρωτονίου ^1H NMR (CDCl_3 , 300MHz) της κουμαρίνης 10	49
Εικόνα 9: Φάσμα πρωτονίου ^1H NMR (CDCl_3 , 300MHz) της κουμαρίνης 14	50
Εικόνα 10: Χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας	51
Εικόνα 11: Migration distance στην πλάκα TLC.....	52
Εικόνα 12: Πορεία διαχωρισμού στην στήλη χρωματογραφίας	53
Εικόνα 13: Φάσμα πρωτονίου ^1H NMR (CDCl_3 , 300MHz) της κουμαρίνης 1	79
Εικόνα 14: Φάσμα πρωτονίου ^1H NMR (CDCl_3 , 300MHz) της κουμαρίνης 2	80
Εικόνα 15: Φάσμα πρωτονίου ^1H NMR (CDCl_3 , 300MHz) της κουμαρίνης 5	80
Εικόνα 16: Φάσμα πρωτονίου ^1H NMR (CDCl_3 , 300MHz) της κουμαρίνης 6	81
Εικόνα 17: Φάσμα πρωτονίου ^1H NMR (CDCl_3 , 300MHz) της κουμαρίνης 7	81
Εικόνα 18: Φάσμα πρωτονίου ^1H NMR (CDCl_3 , 300MHz) της κουμαρίνης 11	82
Εικόνα 19: Φάσμα πρωτονίου ^1H NMR (CDCl_3 , 300MHz) της κουμαρίνης 12	82
Εικόνα 20: Φάσμα πρωτονίου ^1H NMR (CDCl_3 , 300MHz) της κουμαρίνης 13	83
Εικόνα 21: Φάσμα πρωτονίου ^1H NMR (CDCl_3 , 300MHz) της κουμαρίνης 15	83

Εισαγωγή

Οι κουμαρίνες είναι μια ομάδα ενώσεων της οικογένειας των βενζοπυρόνων, ενώσεις, οι οποίες αποτελούνται από ένα δακτύλιο βενζολίου ενωμένο με ένα πυρονικό δακτύλιο (1). Είναι απλούστερο μέλος της ομάδας αυτής και συναντάται κατά την ονομασία βενζο-2-πυρόνες, 1,2-βενζοπυρόνη, 2H-1-βενζοπυραν-2-όνη, 2H-χρωμεν-2-όνη (2). Το εμπειρικό όνομα τους προέρχεται από την ονομασία "Coumarou", μια λαϊκή ονομασία των φασολίων τόνκα (*Dipteryx odorata*), από τα οποία απομονώθηκε για πρώτη φορά το 1820 η πρώτη απλή κουμαρίνη από τον Voleg, ενώ το 1868 συντέθηκε για πρώτη φορά από τον Perkin (3). Με το όνομα κουμαρίνη 1, αναφέρεται στην απλούστερη χημική δομή κουμαρίνης (4) (5). Οι κουμαρίνες συχνά υπάρχουν, ως άοσμο σύμπλεγμα συζευγμένο σε σάκχαρα και οξέα, και απελευθερώνονται από τη δράση οξέων, ενζύμων, ή υπεριώδους (UV) ακτινοβολίας (3).



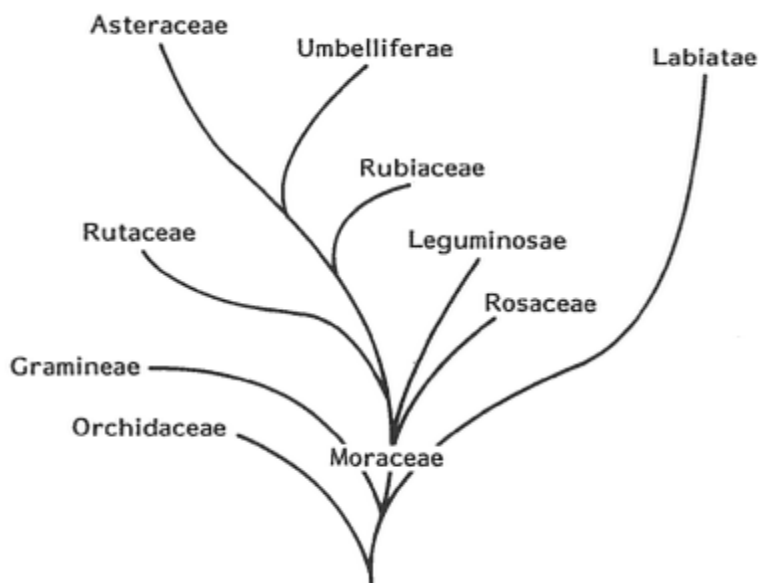
Σχήμα 1: Χημική δομή της απλούστερης κουμαρίνης-1, αριθμημένη

Η κουμαρίνη-1 έχει μοριακό βάρος 146.15 g/mol, υπόλευκου χρώματος, με ευχάριστη και χαρακτηριστική οσμή. Έχει σημείο τήξης 68-71° C και σημείο ζέσεως 303°C. Η κουμαρίνη έχει μέγιστη UV απορρόφηση 272nm σε χλωροφόρμιο. Είναι ευδιάλυτη σε αιθανόλη, χλωροφόρμιο, και έλαια, ενώ είναι ελάχιστα διαλυτή σε ζεστό νερό και μόνο ελαφρώς διαλυτή σε κρύο νερό στους 20 °C (3).

Οι κουμαρίνες καταλαμβάνουν σημαντική θέση στο χώρο των φυσικών προϊόντων και της συνθετικής οργανικής χημείας. Οι ενώσεις αυτές απαντώνται σε ποικίλες ποσότητες στο φυτικό βασίλειο, τόσο σε φυτά από διάφορες οικογένειες αλλά και σε βρώσιμα φυτά (φράουλες, κανέλα, μέντα, πράσινο τσάι, καρότα, σέλινο) (6). Επίσης έχουν εντοπισθεί σε μικροοργανισμούς, με τη μορφή παραγώγων βενζοπυρενίου, ιδιαίτερα σε προϊόντα ευρείας κατανάλωσης προερχόμενα από ζύμωση, όπως η μπύρα (7) (8).

Εισαγωγή

Εκτός από τις βιολογικές δραστηριότητες των κουμαρινών, συχνά χρησιμοποιούνται ως πρόσθετα σε τρόφιμα και καλλυντικά. Παρά το γεγονός ότι η χρήση κουμαρίνης σε τρόφιμα επιτρέπεται μέσω φυσικών προϊόντων, τα οποία περιέχουν κουμαρινικά ανάλογα, όπως η κανέλα, στην παρούσα φάση, η κουμαρίνη δεν επιτρέπεται για χρήση ως άμεσο πρόσθετο τροφής, παρόλο που χρησιμοποιείται ως αρωματικό συστατικό στον καπνό. Στην αρωματοποιία η κουμαρίνη χρησιμοποιείται ως συστατικό του αρώματος, ως ενισχυτής, ή/και ως σταθεροποιητής (4) (6) (7). Το 1967, ο Duquienois κατασκεύασε το οικογενειακό δέντρο φυτών, τα οποία περιέχουν κουμαρίνη και ανάλογα της. Μια απλή μορφή του σχεδίου αυτού φαίνεται στην εικόνα 1 (9).



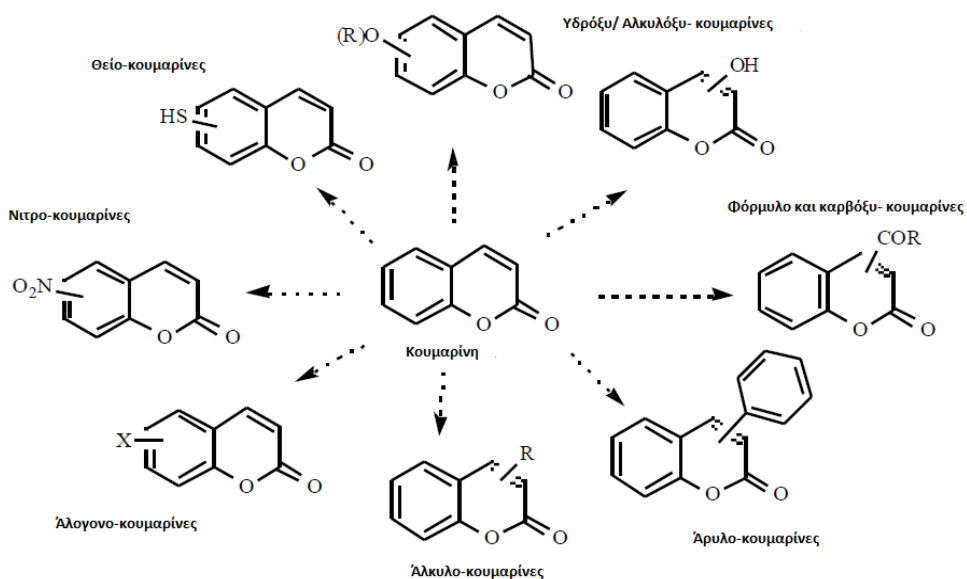
Εικόνα 1: Οικογένειες φυτών που περιέχουν κουμαρίνη (9)

Οι απλές κουμαρίνες και τα ανάλογά τους έχουν προσελκύσει το ενδιαφέρον της επιστημονικής κοινότητας λόγω των πολλών αλλά και πολλαπλών βιολογικών δράσεων τους όπως αντιφλεγμονώδης, αντιϊική, αντιβακτηριακή, αντικαρκινική, αντιμαλάρια, αντιοξειδωτική, αντι-υπερτασική κ.α (7). Λόγω της εξαιρετικά εύκολα μεταβαλλόμενης δομής των κουμαρινών, από τους διάφορους τύπους υποκαταστατών στη βασική τους δομή, η βιολογική τους δραστηριότητα επηρεάζεται και αλλάζει, καταλαμβάνοντας έτσι μια εξέχουσα θέση στην φαρμακευτική χημεία, καλύπτοντας ένα ευρύ φάσμα εφαρμογών και δράσεων (8) (10).



Σχήμα 2: Δράσεις κουμαρινικών ενώσεων

Κύριες υποκατηγορίες κουμαρινών είναι οι υδροξυ-κουμαρίνες, οι φουρανοκουμαρίνες και οι πυρανοκουμαρίνες. Οι υδροξυ-κουμαρίνες, είναι υδροξυλιωμένα, αλκοξυλιωμένα και αλκυλιωμένα παράγωγα από την μητρική ένωση, την κουμαρίνη-1. Οι φουρανοκουμαρίνες αποτελούνται από ένα πενταμελή δακτύλιο (φουράνιο), ο οποίος συνδέεται με τον κουμαρινικό δακτύλιο. Η ομάδα των πυρανοκουμαρινών είναι ανάλογη περίπτωση με τις φουρανοκουμαρίνες, με την διαφορά ότι ο δακτύλιος είναι εξαμελής (1). Μια άλλη πιο εκτενέστερη κατηγοριοποίηση, των κουμαρινικών ενώσεων με βάση το πρόδρομο μόριο της απλής κουμαρίνης και φαίνεται στο παρακάτω σχήμα (4).



Σχήμα 3: Κατηγοριοποίηση απλών κουμαρινικών ενώσεων (4)

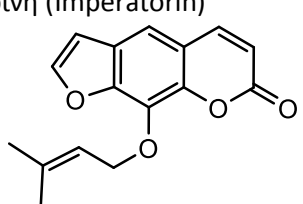
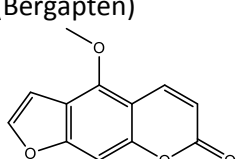
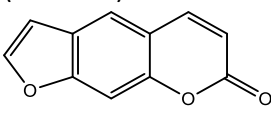
ΜΕΡΟΣ Α: Θεωρητικό μέρος

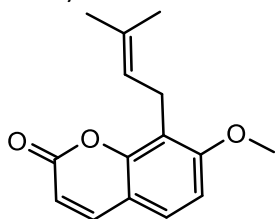
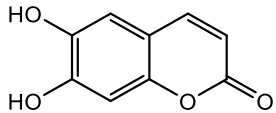
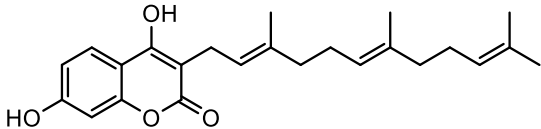
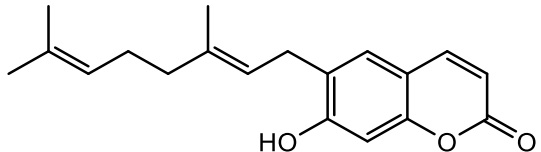
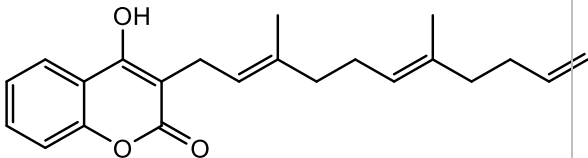
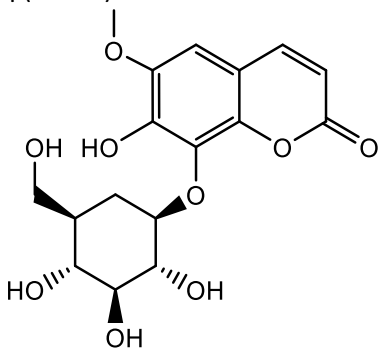
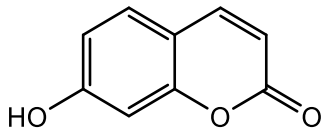
1. Ανασκόπηση φυσικών κουμαρινών και η φαρμακολογική τους δράση

Περισσότερες από 1300 κουμαρίνες έχουν ταυτοποιηθεί σε φυτά, βακτήρια και μύκητες. Οι κουμαρίνες βρέθηκαν αρχικά στα φασόλια *tonka* και αναφέρονται σε περίπου 150 διαφορετικά είδη κατανεμημένα σε περίπου 30 διαφορετικές οικογένειες, εκ των οποίων μερικές είναι *Rutaceae* (*Ruta graveolens* - κοινός εσπεριδοειδών), *Umbelliferae* (οικογένεια κυρίως αρωματικών φυτών), *Clusiaceae*, *Guttiferae*, *Caprifoliaceae*, *Oleaceae*, *Nyctaginaceae*, *Apiaceae* (*Amni majus*), *Asteraceae* (*Trilisa odoratissima*), *Fabiaceae* (*Melilotus officinalis*), *Rosaceae* (*Prunus mahaleb*), *Rubiaceae* (*Asperual odorata*) (9).

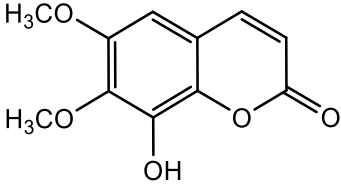
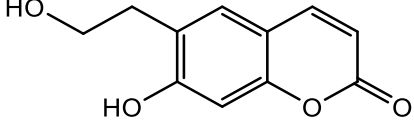
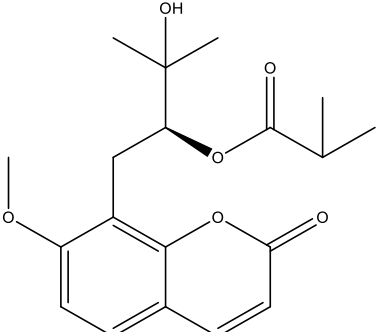
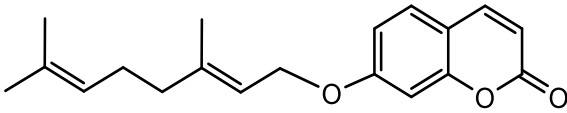
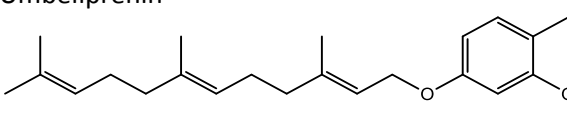
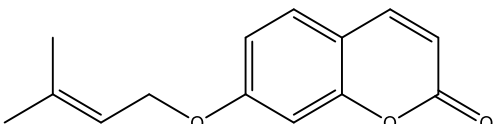
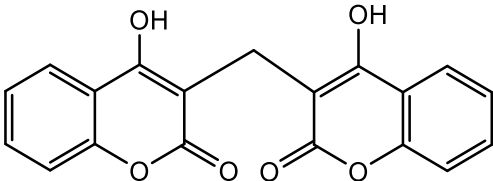
Οι φυσικές κουμαρίνες κατατάσσονται κυρίως σε πέντε τύπους με βάση τη χημική δομή των ενώσεων τις απλές κουμαρίνες, φουρανοκουμαρίνες, πυρανοκουμαρίνες (γραμμικού και γωνιακού τύπου), φαινυλο-κουμαρίνες και δικουμαρίνες. Οι φυσικοχημικές ιδιότητες και οι θεραπευτικές εφαρμογές των φυσικών κουμαρινών εξαρτώνται από τον τύπο υποκατάστασης. Ο πίνακας 1, παρουσιάζει αναλυτικά μερικές κουμαρίνες φυσικής προέλευσης, με την χημική δομή τους, και τις δράσεις τους (11). Ωστόσο κάποιες από τις κουμαρίνες που έχουν συμπεριληφθεί στον πίνακα 1, μπορεί να βρίσκονται και σε άλλες οικογένειες φυτών και να εμφανίζουν περισσότερες δράσεις.

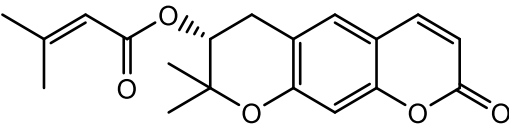
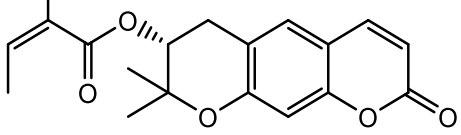
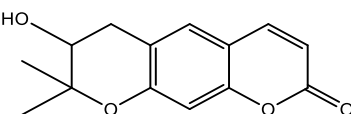
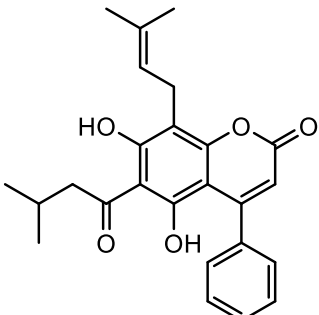
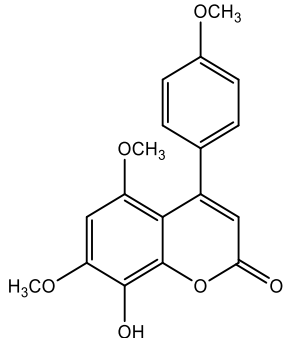
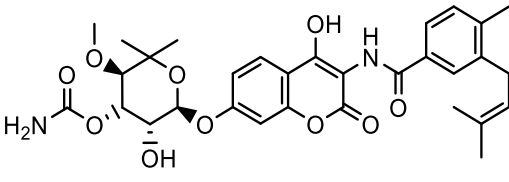
Πίνακας 1: Φυσικές κουμαρίνες, η προέλευση τους και η βιολογική τους δράση

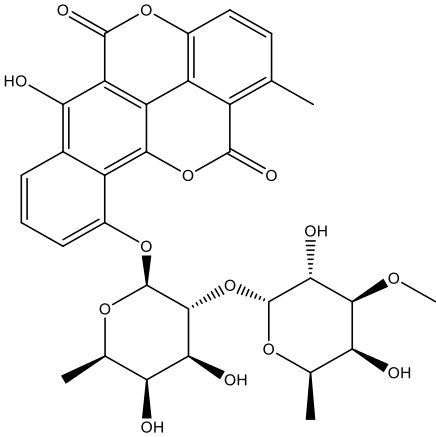
Κουμαρίνη	Προέλευση	Βιολογική δράση
Φουρανοκουμαρίνες		
Ιμπερατορίνη (Imperatorin) 	<i>Urena lobata</i> L. <i>(Malvaceae)</i> (12), <i>Angelica archangelica</i> (13), <i>Angelica dahurica</i> (14), <i>Glehnia littoralis</i> (15)	Αντιφλεγμονώδη, Αντιβακτηριακή, Αντι-ιική, Αντικαρκινική, Αντιμυκητιακή (11), (16)
Βεργαπτένη (Bergapten) 	<i>Cnidium monnieri</i> , <i>Citrus aurantiifolia</i> , <i>Citrus Limon</i> (17)	Αντιφλεγμονώδη, Αντιοξειδωτική (11)
Ψωραλένιο (Psoralen) 	<i>Diplotaenia damavandica</i> (16), <i>Selinum vaginatum</i> , <i>Agnelica arhangelica</i> (18)	Αντιμυκητιακή (16)

Απλές κουμαρίνες		
<p>Οσθόλη (Osthole)</p> 	<p><i>Cnidium monnieri</i> (19), <i>Angelica archangelica</i>, <i>Angelica pubescens</i> (16)</p>	<p>Αντιβακτηριακή, Αντιμυκητιακή, Αντικαρκινική, Αντιοξειδωτική (11)</p>
<p>Αισκουλετίνη (Esculetin , 6,7-dihydroxycoumarin, cichorigenin)</p> 	<p><i>Aesculus hippocastanum</i> (16)</p>	<p>Αντιφλεγμονώδη Αντικαρκινική Αντιοξειδωτικό Νευροπροστατευτική (11)</p>
<p>Ammoresinol</p> 	<p><i>Basillus megatherium</i> (18)</p>	<p>Αντιβακτηριακή (20)</p>
<p>Ostruthin</p> 	<p><i>Peucedanum ostruthium</i> (21)</p>	<p>Αντιβακτηριακή, Αντιμυκητιακή (11)</p>
<p>Ferulenol</p> 	<p><i>Ferula communis</i> (22)</p>	<p>Αντιβακτηριακή (22)</p>
<p>Φραξίνη (Fraxin)</p> 	<p><i>Fraximus ornus</i> (16)</p>	<p>Αντικαρκινική, Αντιοξειδωτική (11)</p>
<p>Ουμπελιφερόνη (Umbelliferone, 7-υδροξυκουμαρίνη)</p> 	<p>Ariaceae (ή Umbelliferae), <i>Hieracium pilosella</i> <i>Aegle marmelos</i> (23)</p>	<p>Αντιφυματιακή Αντιδιαβητική, Αντιυπερλιπιδαιμική Αντιοξειδωτική (23)</p>

Ανασκόπηση φυσικών κουμαρινών και η φαρμακολογική τους δράση

<p>Φραξιδίνη (Fraxidin)</p> 	<p><i>Jatropha podagrica</i> Hook (Euphorbiaceae) (24)</p>	<p>Αντιϋπεργλυκαιμική (11)</p>
<p>Phellodenol A</p> 	<p><i>Phellodendron</i> <i>amurense</i> var. <i>wilsoni</i> (25)</p>	<p>Αντιοξειδωτική (25)</p>
<p>Murrayatin</p> 	<p><i>Murraya paniculata</i> (26) <i>Murraya exotica</i> (27)</p>	<p>Εντομοκτόνα (28)</p>
<p>Ωραπτίνη (Auraptene)</p> 	<p><i>Ferula szowitsiana</i>, Rutaceae (Citrus) (16)</p>	<p>Αντικαρκινική, Αντιβακτηριακή (16)</p>
<p>Umbeliprenin</p> 	<p><i>Ferula szowitsiana</i> (29) <i>Ferula cocanica</i> <i>Angelica glauca</i> L. (30)</p>	<p>Κατά του οξειδωτικού στρες (31)</p>
<p>7-πρενυλοξυ-κουμαρίνη (7-prenyloxy-coumarin)</p> 	<p><i>Zosima absinthifolia</i> (32), <i>Angelica</i>, <i>Prangos</i> (33)</p>	<p>Αναστολεας της κατηγορίας A β-λακταμάσης (29), Κατά του οξειδωτικού στρες (34)</p>
Διμερή κουμαρινών		
<p>Δικουμαρόλη (Dicoumarol)</p> 	<p><i>Mellitus alba</i> (16)</p>	<p>Αντιθρομβωτική (16)</p>

Πυρανοκουμαρίνες		
<p>Grandivittin</p> 	<p><i>Ferulago campestris</i> (35)</p>	<p>Αντιοξειδωτική (35)</p>
<p>Agasyllin</p> 	<p><i>Ferulago campestris</i> (35)</p>	<p>Αντιβακτηριακή Αντιοξειδωτική (35)</p>
<p>Xanthyletin</p> 	<p><i>Citrus sinensis</i> (36) (37)</p>	<p>Αντιβακτηριακή (11)</p>
Φαινυλο-κουμαρίνες		
<p>Mammea A</p> 	<p><i>C. verticillatum</i> (38)</p>	<p>Αντιβακτηριακή (38) Αντιική (39)</p>
<p>Exostemin</p> 	<p><i>Exostemma caribaeum</i> (40)</p>	<p>Αντικαρκινική (41)</p>
Κουμαρίνες με σύνθετη δομή		
<p>Νοβοβιοκίνη (Novobiocin)</p> 	<p><i>Streptomyces niveus</i> (42)</p>	<p>Αντιβακτηριακή (11)</p>

<p>Chartreusin</p> 	<p><i>Streptomyces chartreusis</i> (43)</p>	<p>Αντιβακτηριακή Αντικαρκινική (11)</p>
--	---	--

2. Κουμαρίνες και η Φαρμακευτική τους δράση

2.1 Αντικαρκινική δράση

Παραδοσιακά, τα αντικαρκινικά φάρμακα σχεδιάζονται και στοχεύουν, να στο διακόψουν τη διαδικασία της κυτταρικής διαίρεσης. Αυτά τα φάρμακα είναι αποτελεσματικά, αλλά κυτταροτοξικά, με επακόλουθες παρενέργειες ιδιαίτερα στους φυσιολογικά πολλαπλασιαζόμενους ιστούς, όπως για παράδειγμα στο αιμοποιητικό σύστημα. Επί του παρόντος, η χημειοθεραπεία, η ακτινοθεραπεία και τη χειρουργική επέμβαση, σε συνδυασμό, προσφέρουν καλά αποτελέσματα για τους καρκινοπαθείς και έχουν εφαρμοστεί επιτυχώς για συγκεκριμένους τύπους καρκίνου, όπως, το λέμφωμα Hodgkin, τον καρκίνο των όρχεων και διάφορους τύπους λευχαιμίας (44) (45).

Επίσης η αντίσταση των καρκινικών κύτταρων σε φάρμακα αποτελεί, έλλειψη απάντησης για θεραπεία στην πλέον διαδεδομένη ασθένεια του καρκίνου. Είναι μία από τις κύριες αιτίες, για την αποτυχία της χημειοθεραπείας και μπορεί να οδηγήσει σε υποτροπή της νόσου ή ακόμη και στο θάνατο (46). Οι νέοι πιθανοί αντικαρκινικοί παράγοντες πρέπει να συντίθενται και να δοκιμάζονται για την αποτελεσματικότητά τους, τόσο *in vitro* όσο και *in vivo*. Επομένως ο καταλληλότερος πιθανός αντικαρκινικός παράγοντας, είναι αυτός που θα καταστείλει το ρυθμό με τον οποίο ξεκίνησαν τα καρκινικά κύτταρα να εξελίσσονται, προωθώντας ενδεχομένως μια τύπου μετάσταση χωρίς σημαντική τοξικότητα (47).

Η νέα επιστημονική τάση τα τελευταία χρονιά, έχει στραφεί στην αξιοποίηση των φυσικών προϊόντων με αντικαρκινικό προφίλ, για την ανάπτυξη φαρμάκων με τις λιγότερες δυνατές παρενέργειες. Μεταξύ των διαφόρων φυσικών προϊόντων, οι κουμαρίνες έχουν προσελκύσει ιδιαίτερο ενδιαφέρον

Κουμαρίνες και η Φαρμακευτική τους δράση

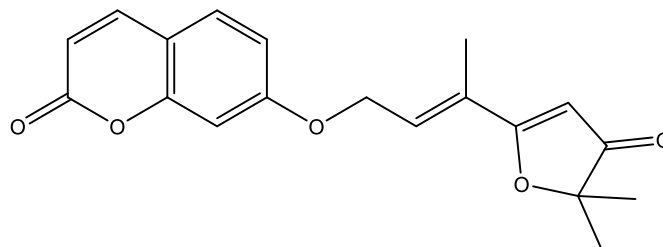
(48). Εμφανίζουν όχι μόνο τη δυνατότητα θεραπείας του καρκίνου, αλλά και την αντιμετώπιση των παρενεργειών από την ακτινοθεραπεία (5).

Οι κουμαρίνες μπορούν να δράσουν με διάφορους τρόπους για μια αποτελεσματική θεραπεία. Μερικές πιθανές δράσεις τους είναι: αναστολή του ένζυμου της τελομεράσης, αναστολή της δραστηριότητας της πρωτεΐνης κινάσης, καταστολή του πολλαπλασιασμού των καρκινικών κυττάρων, δημιουργία ελευθέρων ριζών σε καρκινικά κύτταρα που προκαλούν το οξειδωτικό στρες, οδηγώντας σε προ-αποπτωτικό¹ αποτέλεσμα (46).

Οι υποκατάστατες καθώς και η θέση τους στο μόριο της κουμαρίνης επηρεάζουν θετικά ή αρνητικά την εκάστοτε δράση. Οι συνεχείς μελέτες και η συσχέτιση δομής – δράσης, είχε ως επακόλουθο την εύρεση, των κατάλληλα υποκατεστημένων κουμαρινικών αναλόγων. Όσο αφορά τις κουμαρίνες με πιθανή αντικαρκινική δράση προτείνεται (5):

- Στην 3-θέση βενζιμιδαζόλιο, σουλφοναμίδες, διυδροπυραζόλιο, υποκατεστημένα φαινολικά, αλλά και υποκατεστημένα ετερόκυκλα μόρια μπορεί να ενισχύσουν την δραστηριότητα
- Στις θέσεις 4- και 6- trans-βινυλοβενζόλιο, χαλκόνες
- Στην 7- θέση ομάδες που απελευθερώνουν ηλεκτρόνια
- Στην 8- θέση, αρυλο ομάδες συνδεδεμένες, διακλαδωμένες ή γραμμικές

Ανάμεσα στις κουμαρίνες φυσικής προέλευσης, η πιο αντιπροσωπευτική, με αντικαρκινική δράση είναι η *geiparvarin*. Η *geiparvarin*, βρίσκεται στα φύλλα του *Geijera parviflora*, η οποία μαζί ανάλογα της εμφανίζουν, *in vitro* κυτταροστατική δράσης, αλλά και σημαντική ανασταλτική δράση της λευχαιμίας, και του ανθρώπινου καρκινώματος στο ρινοφάρυγγα (4) (11) (49).



Σχήμα 4: Χημική δομή *geiparvarin*

¹ **Απόπτωση** είναι μια διεργασία προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου. Κατά τη διάρκεια της απόπτωσης το κύτταρο συρρικνώνεται, το ίδιο και η χρωματίνη, η μιτοχondριακή μεμβράνη διαρρηγνύεται και το κύτταρο αποδομείται και σχηματίζει αποπτωτικά σώματα, τα οποία φαγοκυτταρώνονται, χωρίς φλεγμονή. Κατά τη διάρκεια της απόπτωσης έχουμε πρωτεϊνοσύνθεση. Η διαδικασία της απόπτωσης είναι καταστροφική και αυτοενισχυόμενη και μη αντιστρεπτή.

2.2 Αντιφλεγμονώδης και αντιοξειδωτική δράση

Η φλεγμονή είναι μια αυτοπροστατευτική απόκριση του σώματος, η οποία προκαλεί φυσιολογικές προσαρμογές για τη μείωση της βλάβης στους ιστούς και να εξαλειφθούν τα φλεγμονώδη ερεθίσματα (44). Δραστικές ομάδες που περιέχουν οξυγόνο (ROS- Reactive Oxygen Species) όπως ρίζα υπεροξειδικού ανιόντος, υπεροξειδίου του υδρογόνου (H_2O_2) και ρίζα υδροξυλίου ($OH\cdot$) που παράγονται κατά τη διάρκεια της φλεγμονής έμμεσα, ως κυτταρικοί αγγελιοφόροι και προκαλούν φλεγμονώδη απόκριση. Υψηλά επίπεδα ελευθέρων ριζών και δραστικών ομάδων οξυγόνου (ROS) πιθανότατα προκαλούν περεταιίρω βλάβες σε λιπίδια, πρωτεΐνες και στο DNA, με αποτέλεσμα ασθένειες όπως για παράδειγμα, η καρκινογένεση, φλεγμονή, αθηρογένεση και η γήρανση. Έτσι η καταπολέμηση των ελεύθερων ριζών στις πολυσχιδής ασθένειες έχει προσελκύσει μεγάλο ερευνητικό ενδιαφέρον (50). Δεδομένου ότι τα ROS έχουν συσχετιστεί με την φλεγμονή, η ανακάλυψη των μορίων που δρουν τόσο αντιφλεγμονώδεις και αντιοξειδωτικά, θεωρείται ότι οδηγεί σε φάρμακα με ένα βελτιωμένο θεραπευτικό δείκτη, γι' αυτό και συχνά οι δυο αυτές δράσεις εξετάζονται από κοινού (5) (51).

Οι δραστικές ομάδες οξυγόνου, ROS, εμπλέκονται ουσιαστικά στην αποτοξίνωση, όταν χημικές ουσίες εισβάλλουν σε ένα οργανισμό, αλλά η περίσσεια τους προκαλεί την υπεροξείδωση λιπιδίων σε υγιή κύτταρα. Τα αντιοξειδωτικά είναι οι ουσίες, οι οποίες όταν υπάρχουν σε χαμηλές συγκεντρώσεις καθυστερούν ή να αποτρέπουν την οξείδωση του εν λόγω υποστρώματος. Ο βασικός ρόλος των αντιοξειδωτικών είναι να παρακολουθούν και να αντιδρούν με ελεύθερες ρίζες, αποτρέποντας τις αλυσιδωτές συνέπειες διάδοσης των ROS μέσω της δωρεάς πρωτονίων του αντιοξειδωτικού στα ROS. Η αντιοξειδωτική ιδιότητα μιας ουσίας αποδίδεται στην ικανότητα του (52):

- i. Σάρωση ριζών οξυγόνου
- ii. Αναστολή κυτταρικής οξείδωσης
- iii. Καταστολή του σχηματισμού του ROS.

Έτσι, τα αντιοξειδωτικά είναι οι καταλληλότεροι παράγοντες για να περιοριστεί η δράση των ελευθέρων ριζών οξυγόνου. Οι πολυφαινολικές ενώσεις έχουν επιστήσει μεγάλη προσοχή σε σύγκριση με άλλες κατηγορίες φυσικών προϊόντων για τις σημαντικές βιολογικές λειτουργίες που επιδεικνύουν ως αντιοξειδωτικά. Κατηγορίες των πολυφαινολικών ενώσεων είναι, οι κουμαρίνες, ξανθόνες, φλαβόνες κ.α (52).

Κουμαρίνες και η Φαρμακευτική τους δράση

Ταξινόμηση των αντιοξειδωτικών (53):

Ανάλογα με το μηχανισμό δράσης τους:

- Αναστολή λιπιδικής υπεροξειδωσης-αρωματικές ενώσεις με ένα αδύναμο δεσμό -OH, -NH
- Αναστολείς οξειδωσης με την παγίδευση ριζών αλκυλίου
- Αποσύνθετες υδροϋπεροξειδίου: δρουν χωρίς το σχηματισμό ελεύθερων ριζών
- Χηλικές ενώσεις: σχηματισμός συμπλοκών με μεταλλικά ιόντα
- Πολλαπλά στάδια δράσης: περιέχουν ενώσεις (αλκοόλες και αμίνες) που μπορούν να αναγεννηθούν κατά την διαδικασία της οξείδωσης.
- Αναστολείς με συνδυασμένη δράση : δύο ή περισσότερες λειτουργικές ομάδες, που αντιδρούν σε διαφορετικές αντιδράσεις.

Ανάλογα με τη φύση τους:

- Φυσικά αντιοξειδωτικά
- Συνθετικά

Ανάλογα με την βιολογική τους δραστηριότητα:

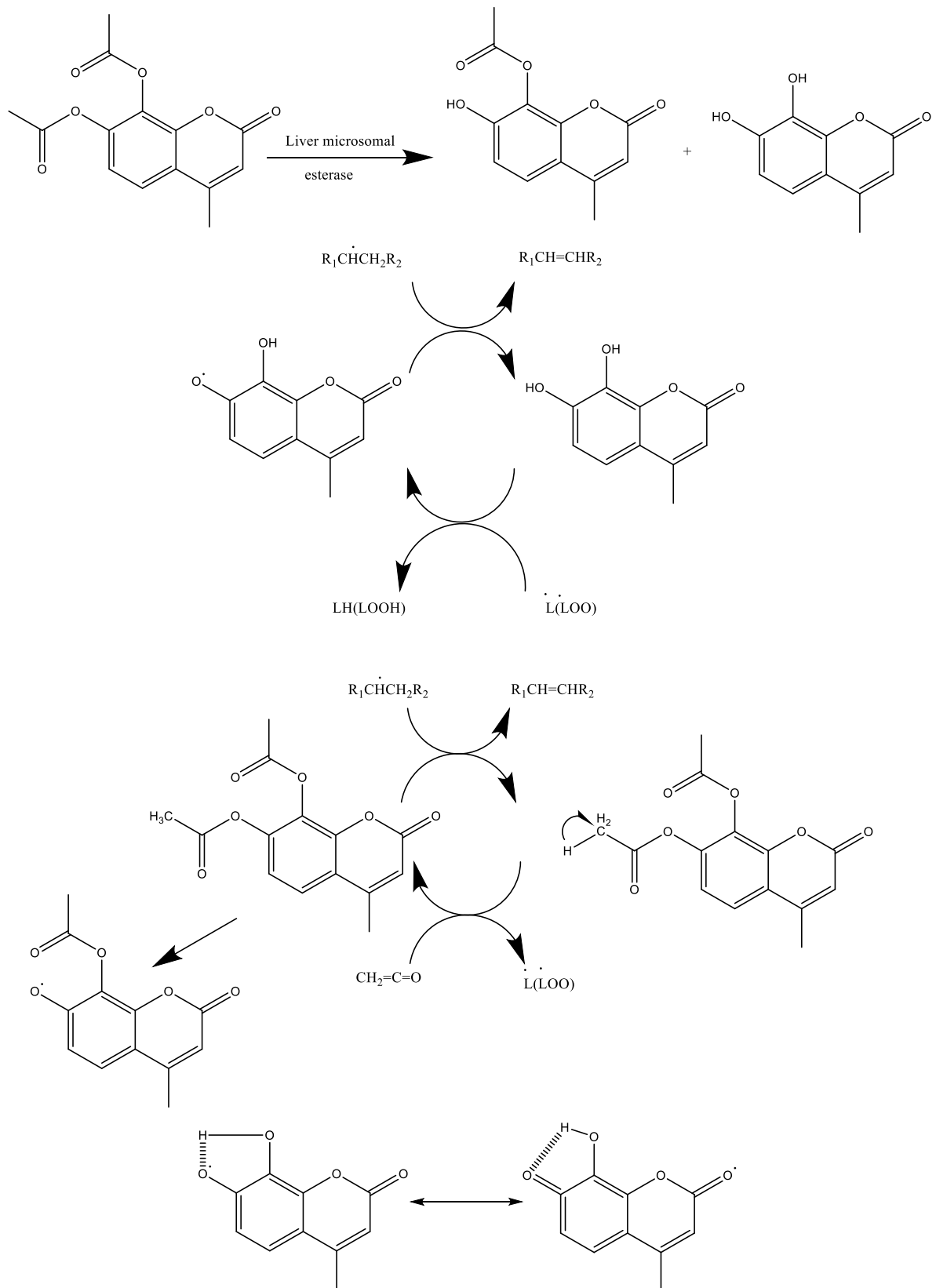
- Βιο-αντιοξειδωτικά ενώσεις τόσο με βιολογικές και αντιοξειδωτικές δράσεις
- Αντιοξειδωτικά χωρίς βιολογική δράση

Ανάλογα με τον αριθμό των φαινολικών ομάδων:

- Απλές φαινόλες
- Διφαινύλια
- Πολυφαινόλες

Ένας προτεινόμενος μηχανισμός δράσης των κουμαρινών με αντιοξειδωτική δράση της 7,8-διακετοξυ-4-μεθυλο-κουμαρίνης (DAMC) προς 7,8-διυδροξυ-4-μεθυλο-κουμαρίνη(DHMC) φαίνεται στο σχήμα 2.2.2 (52).

Κουμαρίνες και η Φαρμακευτική τους δράση

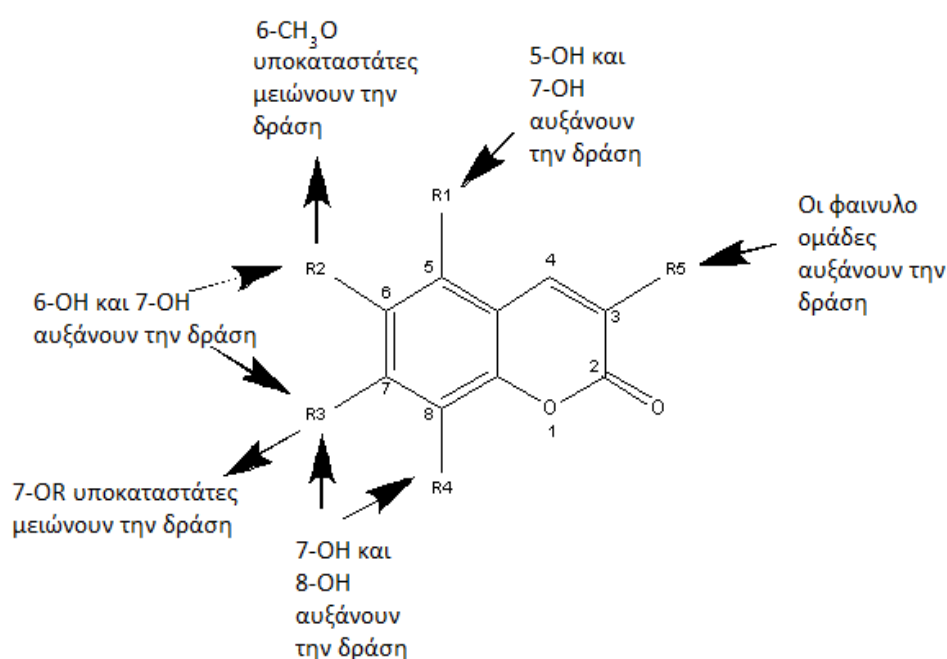


Reduced form of lipids LH/LOOH
Oxidised form of lipids L / LOO radicals

Σχήμα 5: Προτεινόμενος μηχανισμός αντιοξειδωτικής δράσης της 7,8-διακετοξυ-4- μεθυλο-κουμαρίνης προς 7,8-διυδροξυ-4 μεθυλο-κουμαρίνη (52)

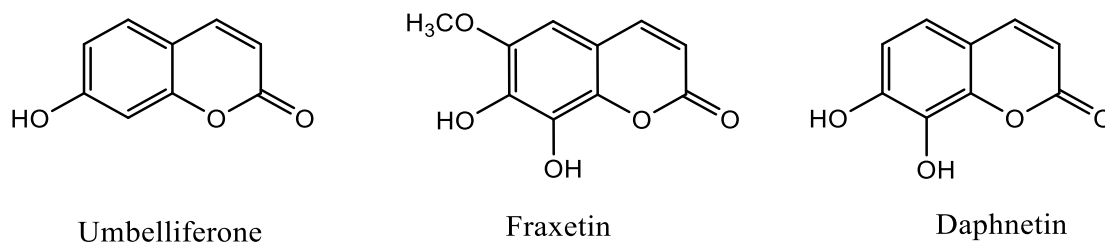
Κουμαρίνες και η Φαρμακευτική τους δράση

Είναι γνωστό ότι οι κουμαρίνες και τα παράγωγά τους εμφανίζουν διάφορες φαρμακολογικές δράσεις, γι' αυτό το λόγο πραγματοποιείται μια μεγάλη προσπάθεια για να σχεδιάσουν και να συντεθούν λειτουργικά κουμαρινικά παράγωγα. Μελέτες έχουν δείξει ότι κατάλληλης δομής υποκατάστατες, στην C4- και C7- θέση του κουμαρινικού μορίου, συντελούν στην εμφάνιση υψηλής αντιφλεγμονώδους και αντιοξειδωτικής δράσης (4). Άλλες ερευνητικές συνεισφορές αναφέρουν επίσης, ότι τα παράγωγα κουμαρίνης με άλλες λειτουργικές ομάδες, εκτός από την κατεξοχήν προτιμώμενη ομάδα υδροξυλίου ενδέχεται να έχουν μια καλή αντιφλεγμονώδη δράση (54). Παραδείγματα είναι η έστερο- ομάδα η νίτρο- ομάδα και ενώσεις πυριδυλίου (55). Το σχήμα 6, παρουσιάζει την σχέση δομής δράσης για κουμαρίνες με αντιοξειδωτική δράση σύμφωνα με την προτεινομένη βιβλιογραφία (56).



Σχήμα 6: Σύνοψη της σχέσης δομής-δράσης κουμαρινών με αντιοξειδωτική δραστηριότητα (56)

Τρία εξέχοντα παραδείγματα φυσικών κουμαρινών με ισχυρή αντιφλεγμονώδη δραστηριότητα είναι η Ουμπελλιφερόνη (*umbelliferone*), η φραξετίνη (*fraxetin*) και η δαφνίνη (*daphnetin*) (44).



Σχήμα 7: Χημική δομή Ουμπελλιφερόνης, φραξετίνης και η δαφνίνης

2.3 Αντιϊική δράση

Από τις αρχές της δεκαετίας του 1980 όπου ξεκίνησε η πανδημία του AIDS, πολλές προσπάθειες έχουν γίνει για μια αποτελεσματική θεραπεία, για τον ιό της ανθρώπινης ανοσοανεπάρκειας ή HIV (57). Η αντιϊική δραστηριότητα των απλών κουμαρινών επικεντρώνεται κυρίως στην αναστολή του ιού HIV, ένας ιός που μέχρι στιγμής δεν έχει πλήρη και αποτελεσματική θεραπεία, και ως εκ τούτου παρουσιάζει τις μεγαλύτερες απειλές για την ανθρώπινη υγεία. Επίσης η ταχεία ανάπτυξη ανοχής σε αυτούς τους αναστολείς αποτελεί το κύριο πρόβλημα της τρέχουσας θεραπείας. Η κλασική θεραπεία περιλαμβάνει τη χρήση των φαρμάκων με σοβαρές παρενέργειες. Λόγω της επείγουσας ανάγκης για νέα φάρμακα, ενώσεις με πολλαπλές λειτουργίες συντίθεται (44).

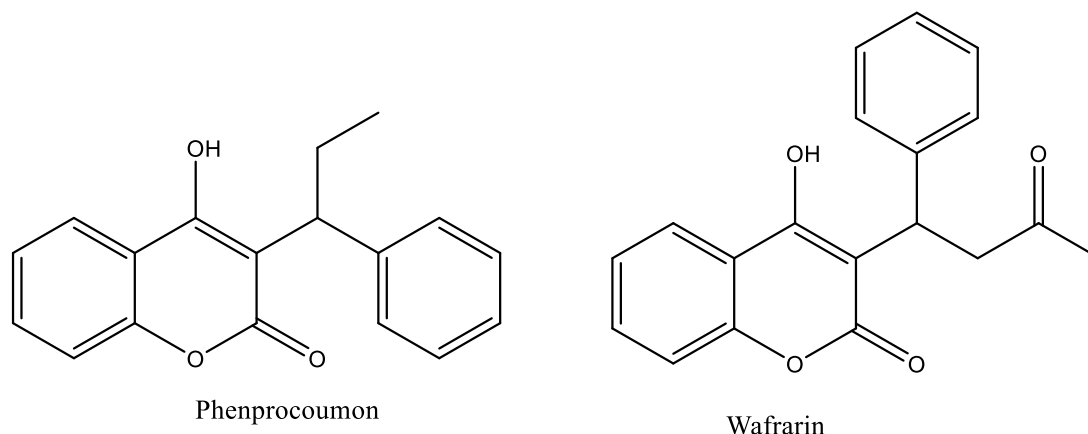
Ο κύκλος του ιού HIV αποτελείται από δέκα βήματα, όπου ενδείκνυται να παρέμβει η χημειοθεραπευτική παρέμβαση. Οι περισσότερες από τις ουσίες που προσδιορίζονται ως αντι-HIV παράγοντες, παρεμβαίνουν σε ένα από αυτά τα βήματα του αντιγραφικού κύκλου. Τα βήματα αυτά είναι:

1. Προσρόφηση του ιού στην κυτταρική μεμβράνη
2. Διάχυση μεταξύ του υϊκού περιβλήματος και της κυτταρικής μεμβράνης,
3. Απόδυση του υϊκού νουκλεοκαψιδίου
4. Αντίστροφη μεταγραφή του υϊκού RNA σε προϊικό DNA
5. Ενσωμάτωση του προϊικού DNA στο κυτταρικό γονιδίωμα
6. Αντιγραφή του DNA
7. Μεταγραφή του προϊικού DNA σε RNA
8. Μετάφραση του προδρόμου υϊκού m-RNA σε ώριμο m-RNA
9. Ωρίμανση του ιού από πρωτεόλυση, μυριστοϋλίωση, γλυκοζυλίωση
10. Εκκόλαψη, συναρμολόγηση ιού, και απελευθέρωση

Το βήμα 4, ένα βασικό βήμα στον αντιγραφικό κύκλο των ρετροϊών. Ένας άλλος στόχος για παρέμβαση είναι βήμα 9, με ιδιαίτερη έμφαση στην πρωτεόλυση των πρόδρομων πρωτεϊνών από την πρωτεάση HIV (58). Η πλειονότητα των διαθέσιμων φαρμάκων για την θεραπεία του ιού HIV είναι αναστολείς της ανάστροφης μεταγραφάσης (RT) και πρωτεάσης (PT) (59).

Με αυτό το στόχο, η ανασταλτική δράση των διαφόρων κουμαρινών προς αναστολή της HIV-1 πρωτεάσης έχει διερευνηθεί, και ταξινομείται ως μια κατηγορία φαρμάκων που παρουσιάζουν

ενδιαφέρον ως αντιϊικοί παράγοντες. Παραδείγματα κουμαρινών είναι η φαινπροκουμόνη και βαρφαρίνη που αναφέρονται ως πρώτης γενιάς αναστολείς του HIV-PR (4) (57) (60).

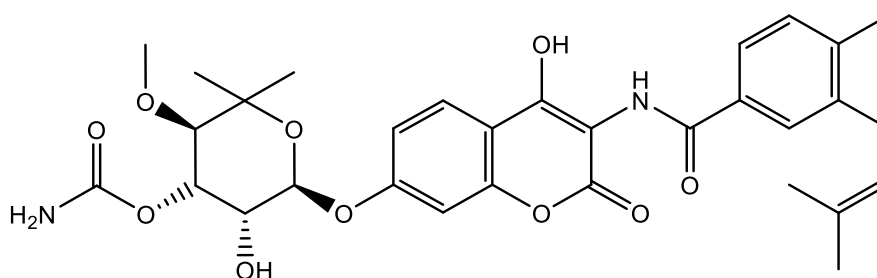


Σχήμα 8: Χημική δομή της φαινπροκουμόνη και βαρφαρίνη

2.4 Αντιμικροβιακή δράση

Η συμβατική αντιμικροβιακή θεραπεία διέρχεται μέσω μιας κρίσης αναποτελεσματικότητας λόγω της ταχείας ανάπτυξης αντοχής στους υφιστάμενους αντιμικροβιακούς παράγοντες. Μέχρι σήμερα, ο αριθμός των ανθεκτικών βακτηρίων σε πολλαπλά φάρμακα (MDR- multi-drug resistance) αυξάνεται, με ιδιαίτερη αντίσταση των θετικά κατά Γκραμ² βακτηρίων (61). Η ικανότητα τους να αναπτύσσουν αντίσταση σε σχεδόν όλα τα αντιβιοτικά είναι ανησυχητική και είναι σημαντικό, νέοι αντιμικροβιακοί παράγοντες να παρασκευαστούν για την καταπολέμηση του προβλήματος (44) (62).

Μερικά αντιβιοτικά προερχόμενα από την οικογένεια των κουμαρινών, φυσικών και μη, έχουν εξετασθεί ως προς την δράση τους έναντι αυτών των MDR βακτηρίων. Ένα δραστικό μόριο, είναι η νοβοβοκίνη, μια φυσική κουμαρίνη, η οποία, απομονώνεται από *Streptomyces niveus*, η οποία είναι κυρίως δραστική έναντι των θετικά κατά Γκραμ βακτηρίων (4).



Σχήμα 9: Χημική δομή Νοβοβοκίνης

² **Χρώση κατά Γκραμ (Gram stain):** ονομάζεται μια απλή μέθοδος η οποία κατατάσσει τα είδη των βακτηρίων σε δύο μεγάλες ομάδες, τα "θετικά κατά Γκραμ" και τα "αρνητικά κατά Γκραμ". Στην πρώτη περίπτωση τα βακτήρια διατηρούν το μπλε-ιώδες χρώμα, ενώ στη δεύτερη λαμβάνουν ερυθρό χρώμα.

Υποκατάστατες εστέρα ή καρβοξυλικού οξέος επί του κουμαρινικού μορίου, επηρεάζει σημαντικά την ανασταλτική δράση έναντι θετικά κατά Γκραμ και τα αρνητικά κατά Γκραμ βακτηρίων (4). Μια ελεύθερη υδροξυλομάδα (-OH) στην C4- θέση στον κουμαρινικό δακτύλιο προβλέπεται να είναι έχει αντιμυκητιακή δράση και ένα ελεύθερο υδροξύλιο στην C7- θέση στον ίδιο πυρήνα, έχει σημαντική για αντιβακτηριακή δράση. Η εισαγωγή του αρυλίου στη C3- θέση στον κουμαρινικό δακτύλιο έχει αναφερθεί ότι, εμφανίζει καλή αντιμικροβιακή δραστηριότητα (63).

2.5 Αντιθρομβωτική και Αντιπηκτική δράση

Τα θρομβωτικά προβλήματα είναι κύριες αιτίες των καρδιαγγειακών επεισοδίων που σχετίζονται με το θάνατο στον ανεπτυγμένο κόσμο. Η προφύλαξη και θεραπεία της αρτηριακής θρόμβωσης σε ασθενείς με καρδιαγγειακές νόσους επιτυγχάνονται χρησιμοποιώντας αντιαιμοπεταλιακά φάρμακα, ενώ η φλεβική θρόμβωση προλαμβάνεται με αντιπηκτικά φάρμακα, τα οποία αναστέλλουν την πήξη του αίματος (64). Τα αντιθρομβωτικά φάρμακα χρησιμοποιούνται σε ένα ευρύ φάσμα για την πρόληψη και αντιμετώπιση σοβαρών καταστάσεων όπως η φλεβική θρόμβωση, πνευμονική εμβολή, έμφραγμα του μυοκαρδίου και εγκεφαλικό επεισόδιο (65) (66) (67).

Οι τρέχουσες θεραπείες ως αντιαιμοπεταλιακά φάρμακα, περιλαμβάνουν την συνηθέστερα χρησιμοποιούμενη ασπιρίνη. Η αντιπηκτική θεραπεία, χρησιμοποιείται για τη θεραπεία μιας πληθώρας περιστάσεων, συμπεριλαμβανομένων την θεραπεία και την πρόληψη της φλεβικής θρομβοεμβολής (VTE), την μακροπρόθεση πρόληψη του ισχαιμικού εγκεφαλικού επεισοδίου, περιλαμβάνοντας ηπαρίνες και την ανταγωνιστή της βιταμίνης K, την βαρφαρίνη (64). Η κύρια παρενέργεια των περισσότερων από τα διαθέσιμων αντιθρομβωτικών φαρμάκων είναι η αιμορραγία, ενώ σε μερικές περιπτώσεις η θεραπεία είναι ανεπαρκής, συνεπάγοντας τον κίνδυνο επανεμφάνισης της θρόμβωσης (64).

Πολλά παράγωγα κουμαρίνης ειδικότερα, οι 4-υδροξυκουμαρίνες παρουσίασαν σημαντική αντιθρομβωτική δράση μέσω της ανταγωνιστικής δράσης της βιταμίνης K. Περαιτέρω, τα 6-υποκατεστημένα-κουμαρίνο-3-καρβοξαμίδια έχουν αναφερθεί ως αναστολείς της θρομβίνης και FXa³. Οι ενώσεις αυτές, βρέθηκαν να δρουν ως ανασταλτικοί μηχανισμοί, μέσω πυρηνόφιλης προσβολής από την ενεργοποιημένη ομάδα υδροξυλίου στο Ser195⁴ στο ήμισυ λακτόνης, σχηματίζοντας ακυλο-ενζύμο, οδηγώντας το σε μονιμά απενεργοποιημένη μορφή ενζύμου.

³ Άμεσοι αναστολείς παράγοντα Xa «xabans»: κατηγορία αντιπηκτικών φαρμάκων τα οποία δρουν απευθείας πάνω παράγοντα X (ένζυμο) στον καταρράκτη της πήξης, χωρίς τη χρήση αντιθρομβίνης ως μεσολαβητή.

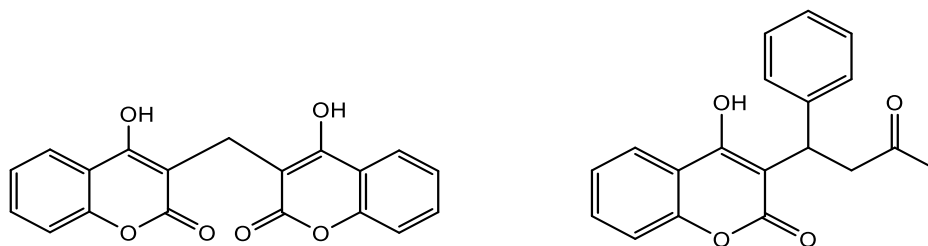
⁴ Serine proteases: ένζυμα που διασπούν πεπτιδικούς δεσμούς σε πρωτεΐνες.

Κουμαρίνες και η Φαρμακευτική τους δράση

Επιπλέον τα 3,6-δισ υποκαταστημένα ανάλογα κουμαρινών, εμφανίζουν πολύ ισχυρή αναστολή θρομβίνης. Τέλος, μερικά ανάλογα από την κατηγορία των βενζο-κουμαρινικών αμιδίων και πυριдино-κουμαρίνων εμφανίζουν ισχυρή αντιθρομβωτική και αντιαιμοπεταλιακή δράση (68).

Το 1939, Campbell και Link εντόπισαν το φυσικό προϊόν και αντιπηκτικό παράγοντα, δικουμαρόλη.

Το 1948, η βαρφαρίνη χαρακτηρίστηκε ως ένωση, με υψηλή αντιπηκτική δράση (65).



Dicoumarol

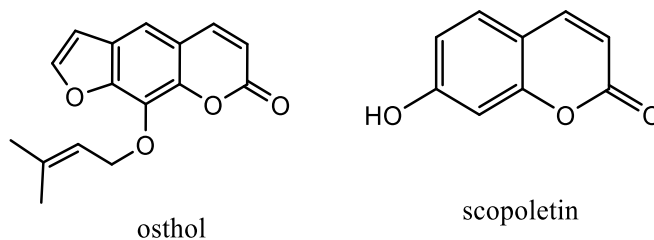
Wafarin

Σχήμα 10: Χημική δομή δικουμαρόλης και βαρφαρίνης

2.6 Αντιμαλάρια δράση

Η ελονοσία, διεθνώς αποκαλούμενη μαλάρια, προκαλείται από παρασιτικά πρωτόζωα του γένους Plasmodium (*Plasmodium falciparum*, *Plasmodium malariae*, *Plasmodium ovale*, και *Plasmodium vivax*). Σύμφωνα με τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας (WHO), περίπου το ήμισυ του παγκόσμιου πληθυσμού είναι σε κίνδυνο εμφάνισης της ελονοσίας και αριθμεί 1 έως 2 εκατομμύρια θανάτους ετησίως (κυρίως μεταξύ των παιδιών της Αφρικής). Και σε αυτή την περίπτωση τα παρασιτικά πρωτόζωα αναπτύξει αντίσταση, έναντι στα περισσότερα χορηγούμενα φάρμακα που χρησιμοποιούνται για θεραπεία, εξού και η ανάγκη για νέες δραστικές ενώσεις (69).

Κουμαρίνες φυσικής προέλευσης ως με αντιμαλάρια δράση είναι: 7-υδροξυ-6-μεθοξικουμαρίνη ή σκοπολετίνη (scopoletin), η οποία απομονώθηκε από το εκχύλισμα των φύλλων της *Schefflera umbellifera* (Araliaceae) και η πρενυλοξυ-κουμαρίνη οσθόλη (osthol) (70).



osthol

scopoletin

Σχήμα 11: Χημική δομή οσθόλης και σκοπολετίνης

3. Μέθοδοι σύνθεσης κουμαρινών

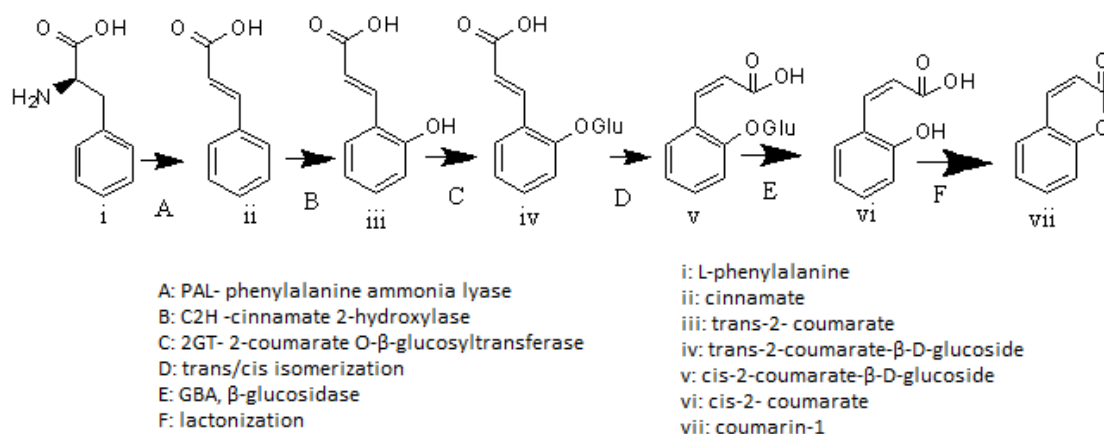
3.1 Βιοσύνθεση κουμαρίνης

Οι κουμαρίνες και οι βιολογικές τους δράσεις αποτελούν πλέον, ένα μεγάλο ερευνητικό πεδίο, αλλά λίγες είναι συγκριτικά οι πληροφορίες, που είναι διαθέσιμες σχετικά με τη βιοσύνθεση της, ακόμα και για το πιο απλό κουμαρινικό μόριο, το οποίο χρησιμεύει ως μόριο οδηγός σε πολλά άλλα παράγωγα κουμαρίνης και είναι αναμφισβήτητα ένα σημαντικό σημείο εκκίνησης για την περαιτέρω σύνθεση νέων κουμαρινικών αναλόγων.

Η βιοσυνθετική οδός της κουμαρίνης τεκμηριώθηκε κατά τη διάρκεια της δεκαετίας του '60 και του '70, με τη βοήθεια πειραμάτων σίτισης ιχνηθέτη, η οποία πρότεινε, ότι η βιοσύνθεση της κουμαρίνης-1, εκκινεί από την L-φαινυλαλανίνη, μέσω των ενδιάμεσων του trans-κινναμικού οξέος, trans-2-κουμαρικού οξέος, β-D-γλυκοζίτη του trans-2-κουμαρικού οξέος, β-D-γλυκοζίτη του cis-2-κουμαρικού οξέος, και cis-2-κουμαρικού οξέος. Το ένζυμο, *phenylalanine ammonialyase* (PAL) μετατρέπει την L-φαινυλαλανίνη σε trans-κινναμικό οξύ. Στη συνέχεια, ένα συνδεδεμένο με μεμβράνη ένζυμο P450, κινναμικό-2-υδροξυλάση (C2H), καταλύει την υδροξυλίωση στη 2-θέση του trans-κινναμικού οξέος δίνοντας το trans-2-κουμαρικό οξύ (71) (72).

Στο επόμενο βήμα, ένα 2-κουμαρικό O-β-γλυκοζυλοτρανφεράση (2GT) μεταφέρει την γλυκοζυλομάδα από UDP-γλυκόζης στο trans-2-κουμαρικό οξύ παράγοντας τον β-D-γλυκοζίτη του trans-2-κουμαρικού οξέος. Ο β-D-γλυκοζίτης του trans-2-κουμαρικού οξέος υποβάλλεται trans/cis ισομερισμό αποδίδοντας το β-D-γλυκοζίτη του cis-2-κουμαρικού οξέος, το οποίο προτάθηκε ότι λαμβάνει χώρα φωτοχημικά. Το τελευταίο βήμα της οδού είναι η αυθόρμητη λακτονοποίηση του cis-2-κουμαρικού οξέος προς κουμαρίνη. Αυτή η οδός είναι υπεύθυνη για την βιοσύνθεση κουμαρίνης σε γενικές γραμμές. Η προαναφερθείσα οδός σύνθεσης της κουμαρίνης-1 είναι ένα ατελής διότι, τα γονίδια που κωδικοποιούν τα ένζυμα C2H, 2GT και GBA είναι ακόμη πλήρως άγνωστα (71) (73). Η ενζυμική αντίδραση σε κάθε βήμα στο σχήμα 12, που παρουσιάζεται, επιβεβαιώθηκε από πειραματικές αποδείξεις.

Μέθοδοι σύνθεσης κουμαρινών



Σχήμα 12: Προτεινόμενη πορεία βιοσύνθεσης κουμαρίνης στα φυτά (71)

3.2 Αντίδραση Perkin

Η μέθοδος αυτή, είναι από τις πιο συνήθεις μεθόδους παρασκευής απλών αλλά και υποκατεστημένων κουμαρινικών ενώσεων. Η πρώτη αναφορά για την παρακάτω σύνθεση γίνεται από το ίδιο Perkin το 1828. Η πρόσδος της αντίδρασης απαιτεί θερμότητα και το σύστημα αντιδρώντων αποτελείται από σαλικυλική αλδεΐδη με οξικό ανυδρίτη παρουσία οξικού νατρίου ή τριαιθυλαμίνης. Τα στάδια και η πορεία της αντίδρασης παρουσιάζονται στο σχήμα 13 (74).

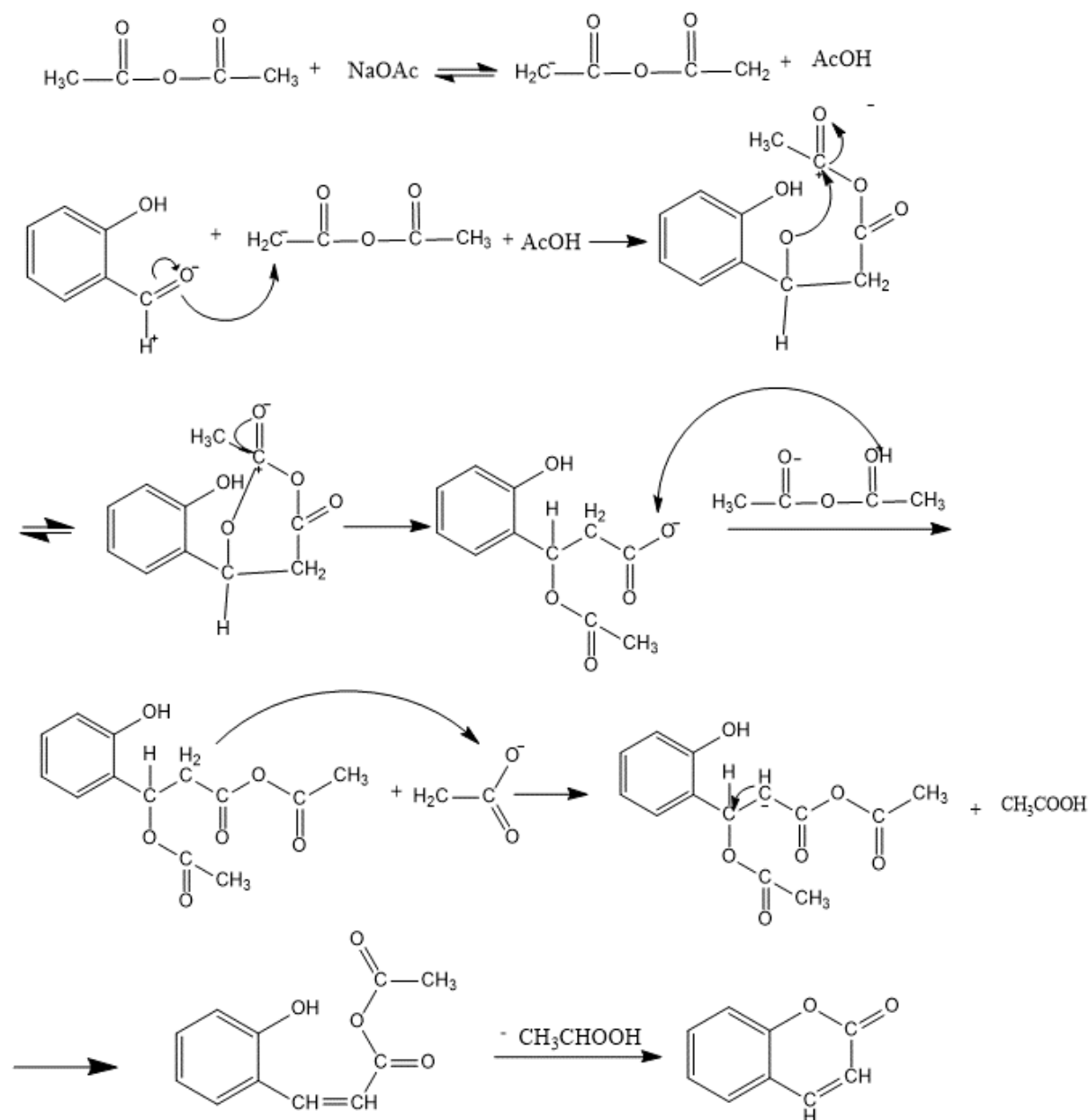
Ο μηχανισμός με τον οποίο οδεύει η αντίδραση Perkin, έχει αποτελέσει αντικείμενο πολλών ερευνών που διεξάγονται σε μια περίοδο άνω των 50 χρόνων, η οποία οδήγησε στη διατύπωση ενός γενικώς αποδεκτού μηχανισμού για αυτή την αντίδραση, ως διαμοριακής συμπύκνωσης με επακόλουθη αφυδάτωση (4) (75).

Παρόλα αυτά ο προτεινόμενος μηχανισμός του σχηματισμού της κουμαρίνης κάτω από αυτές τις σειρές αντιδράσεως δεν εξηγείται σαφώς από το διαμοριακό μηχανισμό. Αυτό εξηγείται διότι, το α,β-ακόρεστο αρωματικό οξύ το οποίο αναμένεται να σχηματιστεί από την διαμοριακή συμπύκνωση αλδολικού τύπου (76), της σαλικυλαλδεΐδης με Ac_2O θα έχουν την trans-διαμόρφωση και είναι απίθανο να μετατραπεί σε λακτόνη⁵ υπό της αναφερόμενες συνθήκες αντιδράσεως. Αργότερα οι Crawford και Shaw, διατύπωσαν την άποψη ότι ο σχηματισμός της κουμαρίνης στην παραπάνω αντίδραση μπορεί να λάβει χώρα τόσο διαμοριακά όσο και ενδομοριακά και στην περίπτωση λακτονοποίησης, αυτή πραγματοποιείται πριν την αποβολή του H_2O ή $HOAc$. Παρά τις πειστικές

⁵ **Λακτόνη:** οργανική ένωση που περιέχει μία ομάδα εστέρα $-OCO-$ ως τμήμα ενός δακτυλίου

Μέθοδοι σύνθεσης κουμαρινών

αποδείξεις για την υποστήριξη, ενός ενδομοριακού μηχανισμού, ο σχηματισμός του προϊόντος μπορεί ωστόσο, να εξηγηθεί ικανοποιητικά από τον γενικά αποδεκτό διαμοριακό μηχανισμό για την αντίδραση Perkin (4) (77).



Σχήμα 13: Στάδια αντίδρασης Perkin

Η κλασική σύνθεση της κουμαρίνης μέσω της αντίδρασης Perkin, εφαρμόζεται για την παρασκευή αρυλο-κουμαρίνων, με διάφορους υποκατάστατες, μέσω της τροποποιημένης αντίδρασης Perkin-Ogialogo με συμπύκνωση των κατάλληλων υποκατεστημένων σαλικυλαλδεΐδες, με τα άλατα νατρίου των αντιστοιχών οξέων αρυλόξυ-οξέων (75).

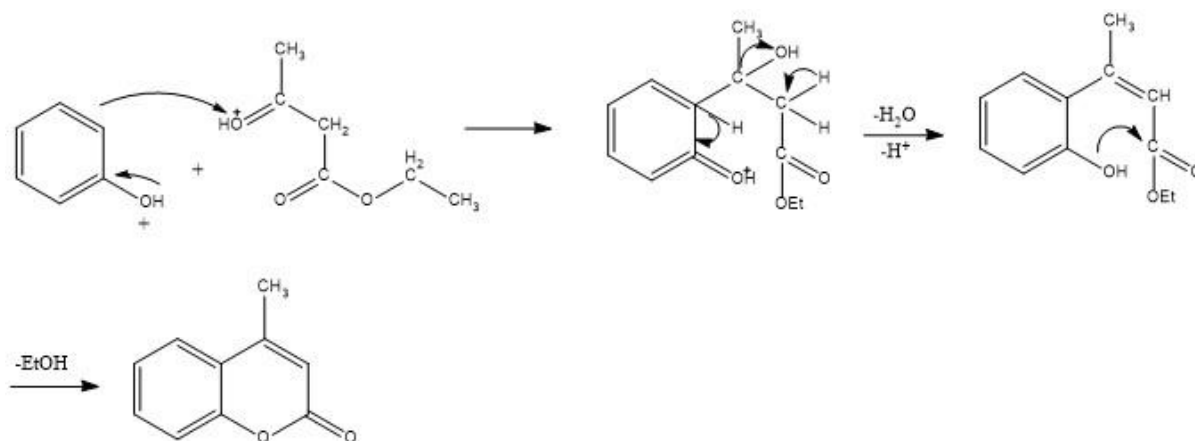
Μέθοδοι σύνθεσης κουμαρινών

Πλεονέκτημα της μεθόδου αυτής είναι η καθορισμένη δομή της παραγόμενης κουμαρίνης, καθώς ο σχηματισμός ισομερών προϊόντων αποκλείεται, λόγω των συγκεκριμένων θέσεων στον αρωματικό δακτύλιο που συμμετέχουν προς σχηματισμό του λακτονικού δακτυλίου (74).

Μειονεκτήματα της μεθόδου είναι οι ποικίλες αποδόσεις μέσω της μεθόδου αυτής, συνήθως όμως παρατηρούνται χαμηλές αποδόσεις λόγω της παρατεταμένης θέρμανσης, σε θερμοκρασίες άνω των 100°C και η παρασκευή των απαραίτητων πρώτων υλών (78).

3.3 Αντίδραση Pechmann

Μια πολύ αξιόλογη μέθοδος για τη σύνθεση των κουμαρινών είναι η αντίδραση Pechmann. Η συνθετική αυτή οδός έχει χρησιμοποιηθεί συχνά για τη σύνθεση φυσικών κουμαρινών, με βιολογικό ή βιομηχανικό ενδιαφέρον. Σε γενικές γραμμές, οι κουμαρίνες που λαμβάνονται προέρχονται από συμπύκνωση των φαινολών με β-κετοεστέρες, παρουσία όξινων καταλυτών. Η σύνθεση της κουμαρίνης προϊόντος οδεύει μέσω τριών αντιδράσεων, της υδροξυαλκυλίωσης, της μετεστεροποίησης, και της αφυδάτωσης, οι οποίες συμβαίνουν ταυτόχρονα στα δύο αντιδρώντα σε δύο θέσεις συνθέτοντας έτσι, την κουμαρίνη. Στα στάδια του μηχανισμού της αντίδρασης φαίνονται στο παρακάτω σχήμα 14 (4) (79).



Σχήμα 14: Στάδια αντίδρασης Pechmann

Παρότι η κλασική αυτή συνθετική διαδρομή, δίνει τα επιθυμητά προϊόντα, πολλές προσπάθειες εξακολουθούν να πραγματοποιούνται για τη βελτίωση της απόδοσης της (4).

Η απόδοση της αντίδρασης εξαρτάται από τους υποκατάστατες της φαινόλης, το είδος του β-κετοεστέρα καθώς και από το αντιδραστήριο συμπύκνωσης (όξινοι καταλύτες). Φαινόλες με ομάδες δότες ηλεκτρονίων σε μέτα- θέση όπως -OH, -OMe -NR₂, -NHR, -R, συμπυκνώνονται πιο ευκολά. Οι

Μέθοδοι σύνθεσης κουμαρινών

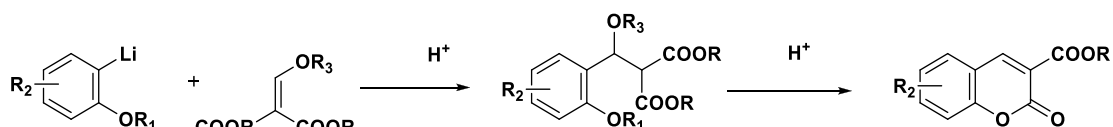
ομάδες αυτές σε όρθο- και πάρα θέσεις δεν επηρεάζουν καθόλου την δραστικότητα της φαινόλης. Ομάδες δέκτες ηλεκτρονίων εμποδίζουν την συμπύκνωση (80) (81). Αντιδραστήρια που χρησιμοποιούνται για συμπύκνωση είναι π-H₂SO₄, HCl σε CH₃COOH ή σε ROH, ZnCl₂, H₃PO₄, κ.α (75).

Πλεονεκτήματα της μεθόδου είναι οι καλές αποδόσεις και οι απλές πρώτες ύλες, βασικοί λόγοι για την συνεχή εφαρμογή και βελτιστοποίηση της μεθόδου (74) (78).

Μειονεκτήματα της μεθόδου είναι ότι η αντίδραση Pechmann δεν ενδείκνυται για φαινόλες ευαίσθητες σε οξέα και ο σχηματισμός ισομερών (74).

3.4 Προσθήκη Michael

Η αντίδραση προσθήκης Michael είναι μια εναλλακτική μέθοδος, συμπληρωματική της μεθόδου Pechmann (82). Ευρέως χρησιμοποιούμενη, ως μία από τις πιο γενικές μεθόδους για τον σχηματισμό των δεσμών C=C στην οργανική σύνθεση. Η ασύμμετρη οργανική κατάλυση, αντίδραση συζυγής προσθήκης β-κετοεστέρων σε α-β-ακόρεστες καρβονύλο-ενώσεις είναι μια άμεση και ελκυστική προσέγγιση για χηλικές ενώσεις που είναι ευέλικτα ενδιάμεσα στην οργανική σύνθεση. Ιδιαίτερως, η προσθήκη α, β-ακόρεστες κετόνες σε 4-υδροξυκουμαρίνη είναι μια απλή μέθοδος για την πρόσβαση βαρφαρίνη (83) (84).

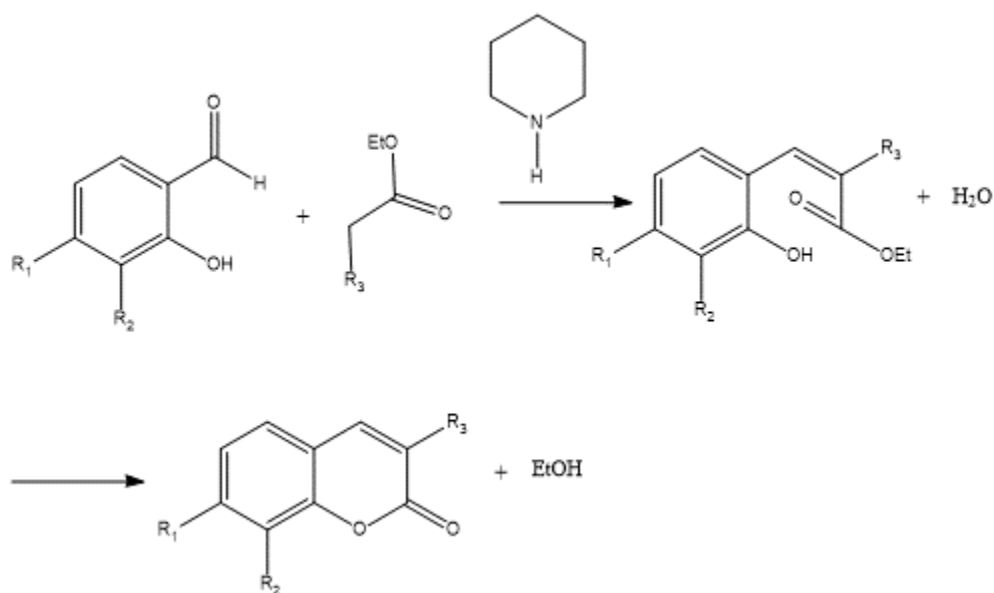


Σχήμα 15: Στάδια αντίδρασης με προσθήκη Michael

3.5 Αντίδραση Knoevenagel

Η αντίδραση Knoevenagel, είναι μια αντίδραση συμπύκνωσης προς σχηματισμό δεσμού C=C. Τα προϊόντα που προκύπτουν προέρχονται από 2-υδροξυ-βενζαλδεύδες με ενεργές ενώσεις μεθυλενίου με αμμωνία ή άλλη αμίνη (όπως, πυριδίνη, πιπεριδίνη) ως καταλύτη. Το παρακάτω σχήμα παρουσιάζει τα στάδια της αντίδρασής Knoevenagel (85) (86).

Μέθοδοι σύνθεσης κουμαρινών



Σχήμα 16: Στάδια αντίδρασης Knoevenagel

Πολλές κουμαρινικές ενώσεις συντίθενται με την μέθοδο αυτή, με χαρακτηριστικά παραδείγματα της άμινο- και άλκυλο- κουμαρίνες.

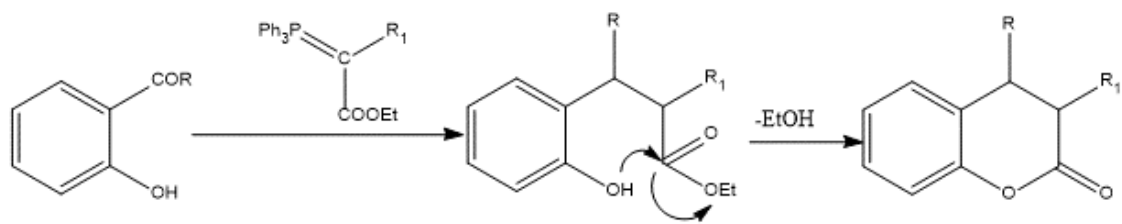
Πλεονέκτημα της μεθόδου είναι οι πιο ήπιες συνθήκες που επικρατούν σε σχέση με την μέθοδο Perkin και λόγω αυτού βρίσκει εφαρμογή για την σύνθεση πολλών φυσικών κουμαρινών γίνεται με την μέθοδο Knoevenagel.

Μειονέκτημα της μεθόδου είναι ότι η φύση του βασικού καταλύτη επηρεάζει την απόδοση προϊόντων που μπορεί να οδηγήσει σε χαμηλότερες αποδόσεις από την μέθοδο Perkin (75).

3.6 Αντίδραση Wittig

Μια καλή εναλλακτική λύση για τη σύνθεση των 3,4-υποκατεστημένων κουμαρινών είναι η δύο σταδίων αντίδραση Wittig. Σε γενικές γραμμές, η σύνθεση των κατάλληλων ο-υδροξυβενζαλδεϋδών ή ο-υδροξυακέτοφαινόλων και αντιδραστήριο Wittig, εστέρες του φωσφορανίου ($\text{Ph}_3\text{P}=\text{C}(\text{R}^1)\text{COOR}$), μετατρέπονται στην αντίστοιχη κουμαρίνη. Η σύνθεση κουμαρινών μέσω αυτής της μεθόδου, απαιτεί αυστηρές συνθήκες αντίδρασης και καταλύτη, όπως νιτρικό βισμούθιο (III) ($\text{Bi}(\text{NO}_3)_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$). Στο σχήμα 17, δίνεται η αντίδραση Wittig (87).

Μέθοδοι σύνθεσης κουμαρινών



Σχήμα 17: Στάδια αντίδρασης Wittig

Η σύνθεση της κουμαρίνης μέσω αντίδρασης Wittig των ο-υδροξυβενζαλδεΐδων ή ο-υδροξακέτοφαινόνης με το αντιδραστήριο Wittig, απαιτεί χρόνους αντίδρασης, μέχρι και τις 17-34 ώρες υπό συνθήκες αναρροής σε βενζόλιο ή ξυλόλιο (πολύ τοξικοί διαλύτες) (87).

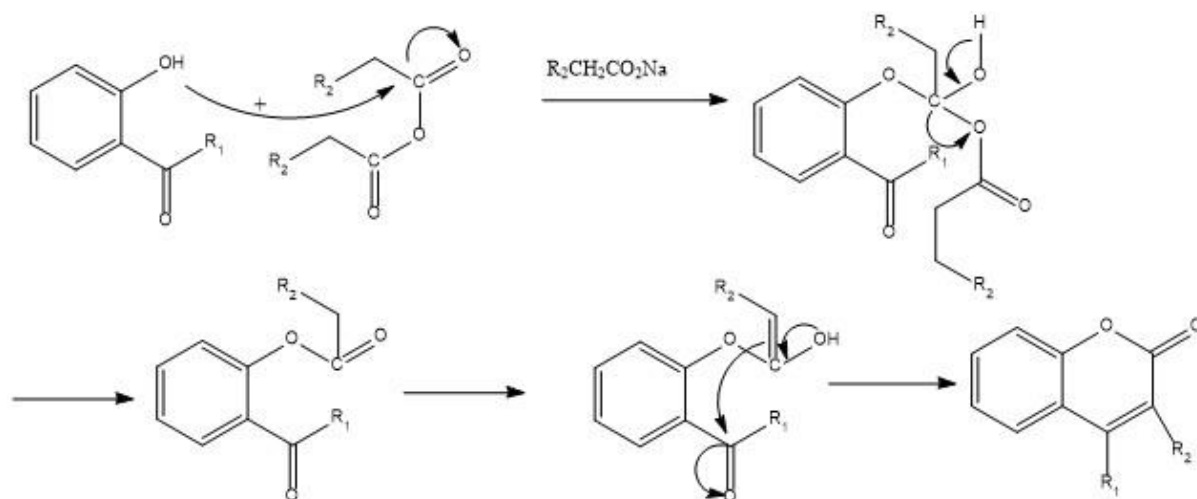
Πλεονεκτήματα της μεθόδου είναι οι ήπιες συνθήκες, η απλή κατεργασία, οι υψηλές αποδόσεις και η έλλειψη παραπροϊόντων, καθώς οι θέσεις στον δακτύλιο είναι καθορισμένες (74).

Βασικό μειονέκτημα της μεθόδου είναι η παρασκευή και εύρεση των κατάλληλα υποκατεστημένων ο-υδροξυβενζαλδεΐδων ή ο-υδροξακέτοφαινονων (74).

3.7 Αντίδραση Kostanecki-Robinson

Η αντίδραση Kostanecki-Robinson εμπλέκει τον σχηματισμό των κουμαρινών από εύκολα διαθέσιμες 2-υδροξυ-αρυλο-κετόνες με αλειφατικό ανυδρίτη παρουσία του αντίστοιχου άλατος νατρίου μέσω ο-ακυλίωση με σχηματισμό ενός τετραεδρικού ενδιάμεσου και έπειτα, αλδολική συμπύκνωση με σχηματισμό του κουμαρινικού δακτυλίου. Η μέθοδος αυτή είναι περιορισμένη, λόγω της μεγάλης περίσσειας αντιδραστηρίων και αυστηρές συνθήκες αντίδρασης που προκύπτουν σε χαμηλές αποδόσεις. Η αντίδραση φαίνεται στο παρακάτω σχήμα 18 (88) (89).

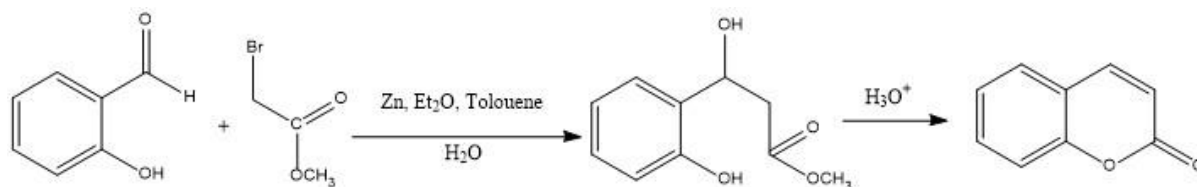
Μέθοδοι σύνθεσης κουμαρινών



Σχήμα 18: Αντίδραση Kostanecki-Robinson

3.8 Αντίδραση Reformatsky

Η αντίδραση Reformatsky, περιλαμβάνει την συμπύκνωση των αλδευδών ή κετονών με οργανικά παράγωγα ψευδαργύρου των α-αλογονομένων εστέρων, για να δώσει β-υδροξυ εστέρες. Στις κατάλληλες συνθήκες αντίδρασης, πραγματοποιείται λακτονοποίηση με σχηματισμό των κουμαρινών (4) (78).



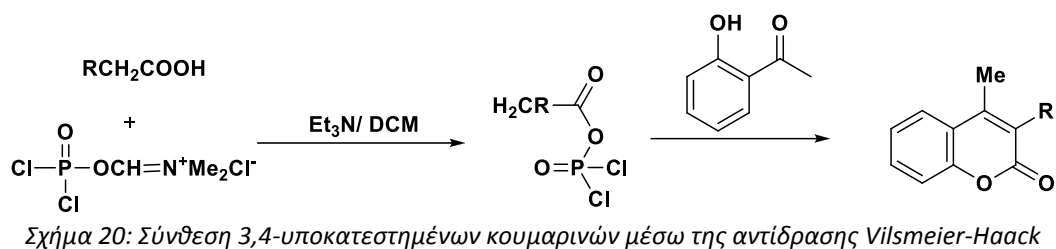
Σχήμα 19: Στάδια αντίδρασης Reformatsky με παραγόμενο προϊόν την κουμαρίνη-1

3.9 Αντίδραση Vilsmeier-Haack

Η εφαρμογή του αντιδραστήριου, Vilsmeier-Haack (VH) (POCl₃/DMF) για φορμυλίωση είναι μια ευρέως χρησιμοποιούμενη μέθοδος, για την φορμυλίωση ενεργοποιημένων αρωματικών και ετεροαρωματικών ενώσεων. Το αντιδραστήριο Vilsmeier-Haack, είναι ένα αποτελεσματικό, οικονομικό και ήπιο αντιδραστήριο. Η κλασική αντίδραση Vilsmeier-Haack, συνεπάγεται από ηλεκτρονιόφιλη υποκατάσταση σε ενεργοποιημένο αρωματικό δακτύλιο από άλας αλογονομεθυλενο-ιμινίου, να διευκολύνει την είσοδο σε διάφορες ομάδες. Το αντιδραστήριο Vilsmeier δεν χρησιμεύει μόνο ως μέσο φορμυλίωσης, αλλά επίσης και ως αντιδραστήριο ενεργοποίησης των καρβοξυλικών οξέων για να δώσουν εστέρες, αμίδια, χλωρίδια οξέων και αλκοολών για να δώσει αλκυλο-χλωρίδια, αλκύλια, αρύλια και σουλφίδια. Εκτός από αυτό, το

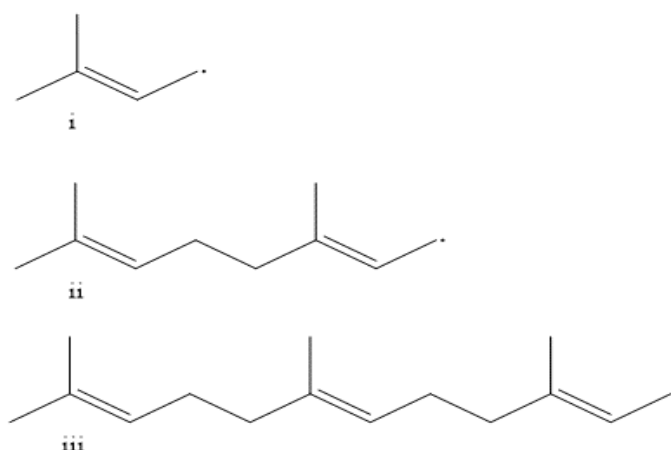
Πρενυλοξυ-κουμαρίνες

αντιδραστήριο, έχει επίσης χρησιμοποιηθεί εκτεταμένα για την πραγματοποίηση διάφορων χημικών μετατροπών (90) (91).



4. Πρενυλοξυ-κουμαρίνες

Τα πρενυλοξυ φυσικά προϊόντα (ισοπεντυλοξυ- (C₅), γερανυλοξυ- (C₁₀) και οι ενώσεις του λιγότερο εμφανιζόμενο φαρνεζυλοξυ-(C₁₅)), αντιπροσωπεύουν μια οικογένεια δευτερογενών μεταβολιτών που έχουν εξεταστεί για χρόνια ως βιοσυνθετικά ενδιάμεσα των C-πρενυλιωμένων παραγώγων. Μέχρι τώρα περίπου 300 μόρια έχουν απομονωθεί από φυτά που ανήκουν κυρίως στις οικογένειες των *Rutaceae*, *Ariaceae* και *Compositae* (92). Μια ευρεία ποικιλία των ενώσεων αυτών που έχουν απομονωθεί, περιέχουν μια πρενυλοξυ-ομάδα στην πλευρική τους αλυσίδα, όπως για παράδειγμα κουμαρίνες, κινναμωμικά οξέα, βενζοϊκά οξέα, φαινόλες, αλκοόλες, αλδεΐδες, χαλκόνες, ξανθόνες, ακέτο- και βενζοφαινόλες. Πολλά από τα απομονωμένα πρενυλοξυ φυσικά προϊόντα και συνθετικά παράγωγά τους έδειξαν αξιόλογη *in vitro* και *in vivo* αντικαρκινική, αντιφλεγμονώδη, αντιμικροβιακή και αντιμυκητιακή δράση (93) (94).



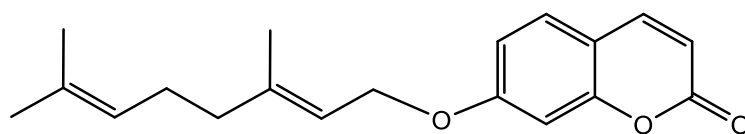
Σχήμα 21: Χημική δομή πρενυλο- (i) γερανυλο- (ii) φαρνεζυλο- (iii) ομάδας

Πρενυλοξυ-κουμαρίνες

Η πρενυλίωση (γνωστή και ως ισοπρενυλίωση ή λιπιδίωση) είναι μία χημική ή ενζυμική προσθήκη μιας υδρόφοβης πλευρικής αλυσίδας σε ένα μόριο κυρίως αρωματικής ένωσης ή μια πρωτεΐνη κ.λπ. Ειδικότερα, η πρενυλίωση των αρωματικών δευτερογενών μεταβολιτών διαδραματίζει έναν σημαντικό ρόλο στη βιοσύνθεση ενός ευρέος φάσματος μορίων με αξιοσημείωτες φαρμακολογικές δράσεις. Συχνά, η προσθήκη μιας αλυσίδας ισοπρενοειδών καθιστά το μόριο περισσότερο αποτελεσματικό από τη μητρική ένωση από φαρμακολογικής άποψης (93) (95).

Τα πρενυλοξυ φυσικά προϊόντα είναι ενώσεις βιοσυνθετικής προέλευσης για τα οποία το τελικό στάδιο της διαδικασίας είναι η βιοσυνθετική πρενυλίωση ενός αλκαλοειδούς ή ενός φαινυλοπροπανοειδούς πυρήνα χρησιμοποιώντας διφωσφορικό πρενυλιο ως μέσο αλκυλίωσης. Τα πρενυλοξυ προϊόντα έχουν εξεταστεί για δεκαετίες απλώς ως βιοσυνθετικά ενδιάμεσα του C-πρενυλιωμένων ενώσεων και μόνο τα τελευταία χρόνια έχουν απασχολήσει τους ερευνητές ως ενώσεις βιολογικά δραστικές (93).

Παράδειγμα, πρενυλοξυ-κουμαρίνης και συγκεκριμένα γερανυλοξυ-κουμαρίνης είναι η ωραπτένη (Auraptene) (σχήμα 22). Απομονώθηκε για πρώτη φορά από το *Citrus aurantium* και η δομή της χαρακτηρίστηκε από τους Komatsu και Tanaka το 1930 (96) και είναι το πιο κοινό συστατικό των φρούτων της οικογένεια αυτής. Αν και έχει γίνει γνωστό όλο αυτό το διάστημα, η πρώτη μελέτη, που περιγράφει την βιολογική δράση της ωραπτένης εμφανίστηκε το 1991 (97). Στον πίνακα 1, παρουσιάζονται επίσης τα εξής πρενυλοξυ φυσικά προϊόντα: Ιμπερατορίνη, Umbeliprenin και 7-πρενυλοξυ-κουμαρίνη.



Σχήμα 22: Χημική δομή ωραπτένης

Όπως έχει αναφερθεί για πρώτη φορά στη δεκαετία του '30, έχει απομονωθεί από πολλά είδη εσπεριδοειδών η ωραπτένη, μια γερανυλοξυ-κουμαρίνη, με ενδιαφέρουσες φαρμακευτικές ιδιότητες, ιδιαίτερα όσον αφορά την πρόληψη των εκφυλιστικών νοσημάτων. Επιδημιολογικές έρευνες και πειράματα με ζώα, συμπέραναν ότι η εισαγωγή στη διατροφή μέσω ορισμένων ειδών λαχανικών και φρούτων συμβάλλουν στην μείωση της εμφάνισης του καρκίνου, ειδικότερα του καρκίνου του ήπατος, του δέρματος, της γλώσσας, του οισοφάγου και του παχέος εντέρου (98) (99).

Πρενυλοξυ-κουμαρίνες

Επιπρόσθετα, η ωραππένη έχει δείξει, εξαιρετική ανασταλτική δράση, έναντι της β-λακταμάσης, ένζυμο που παράγεται από βακτηρίδια που παρέχουν αντίσταση σε αντιβιοτικά της β-λακτάμης. Το ένζυμο της β-λακταμάσης, παράγει το θετικά κατά Γκραμ βακτήριο *Staphylococcus aureus*, κύρια αιτία της νοσοκομειακής πνευμονίας και χειρουργικών μολύνσεων, και είναι η πιο κοινή πηγή των νοσοκομειακών λοιμώξεων του αίματος και σταφυλόκοκκου (100).

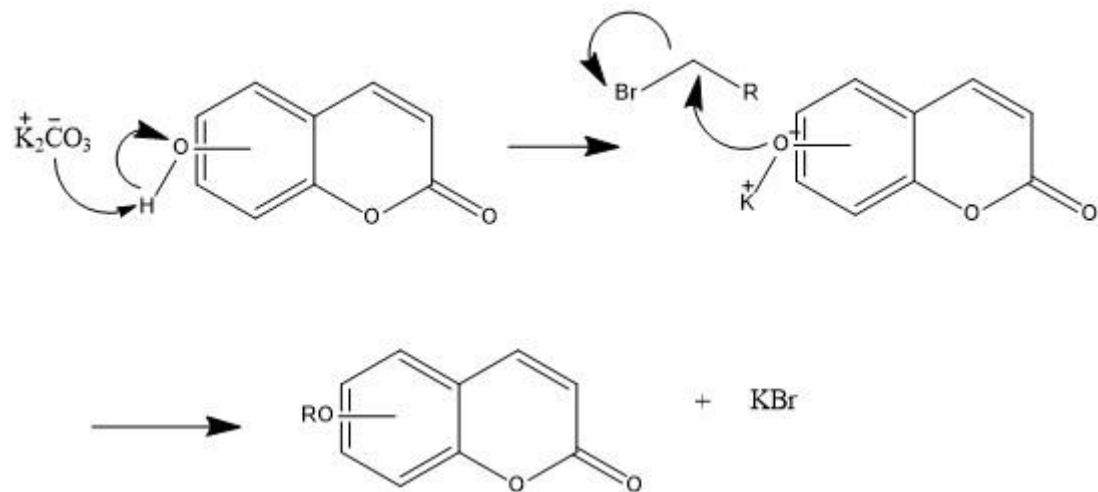
Περισσότερες από 30 ενώσεις που έχουν πρενυλοξυ-ομάδα ως πλευρική αλυσίδα βρίσκονται στη φύση. In vivo η 7-ισοπεντυλόξυ-κουμαρίνη φαίνεται να δρα ως χημική άμυνα σε λοιμώξεις από φυτοπαθογόνους μύκητες. Αναστέλλει αποτελεσματικά την ανάπτυξη των ανθρώπινων παθογόνων μυκήτων *Epidermophyton floccosum*. Η Isoobtusin, έδειξε in vitro ανασταλτική δράση έναντι του ιού της πολιομυελίτιδας και ανέστειλε την αντιγραφή του ιού HIV μόνο κατά περίπου 10%, ενώ ήταν αδρανής έναντι των HSV-1 και VSV. Όπως και άλλοι αιθέρες, οι πρενυλοξυ-ενώσεις, υφίστανται, αναδιάταξη κατά Claisen με θέρμανση: π.χ. στους 175 ° C σε N,N-δισουλτανιλίνη (98).

Μια τυπική φαρνεζυλοξυ-κουμαρίνη είναι η umbelliprenin, που απομονώθηκε για πρώτη φορά το 1938 από τους σπόρους του *Angelica archangelica L.*, και στη συνέχεια αναφέρεται συχνά και ως «φαρνεζυλο-αιθέρας ουμπελιφερόνης». Η umbelliprenin, έχει χαρακτηριστεί ως OSC (οξειδοσκαλένιο κυκλάσης) αναστολέας, ως πολλά υποσχόμενος υποψήφιος για αντιμυκητιακή και αντιβακτηριακή δράση, ή ως φαρμακευτικό μέσο για τη μείωση της χοληστερόλης (98).

Γενικά οι πρενυλοξυ-κουμαρίνες, εμφανίζουν εξαιρετική αντιφλεγμονώδης δράση αλλά μέτρια αντιοξειδωτική δράση, κυρίως λόγω της αλειφατικής αλυσίδας. Η συσχέτιση δομής-δράσης από τις ερευνητικές αναφορές, πιστοποιεί ότι αύξηση της αντιφλεγμονώδους δράσης, εξαρτάται άμεσα από την πρενυλο-αλυσίδα, ιδιαίτερα όταν εξετάζονται ως αναστολείς της λιποξυγενάσης. Επίσης η ανασταλτική δράση αυξάνεται συνήθως, με αύξηση της αλυσίδας. Σημαντική επίσης είναι και η θέση υποκατάστασης στον κουμαρινικό δακτύλιο, ιδιαίτερα όμως για τις γερανυλοξυ- και φαρνεζυλοξυ-κουμαρίνες (101).

Από συνθετικής πλευράς, τα πρενυλοξυ- ανάλογα, παρασκευάζονται μέσω της σύνθεσης εστέρων κατά Williamson μέσω S_N2 μηχανισμού (76). Συγκεκριμένα για την σύνθεση πρενυλοξυ-κουμαρινών το σύστημα αντίδρασης περιλαμβάνει μια υδροξυ-κουμαρίνη με ένα πρενυλιομένο βρωμίδιο, παρουσία ακετόνης ως διαλύτη και βάσης για την παρασκευή αλκοξειδίου, σε θερμοκρασία κάτω των 100°C. Ο μηχανισμός της συνθετικής οδού φαίνεται στο σχήμα 23 (102) (101).

Πρενυλοξυ-κουμαρίνες



Σχήμα 23: Γενική συνθετική οδός για την παρασκευή πρενυλοξυ-κουμαρινών

ΜΕΡΟΣ Β: Σχεδιασμός, αξιολόγηση βιολογικής δράσης, ταυτοποίηση δομής, διαχωρισμός και απομόνωση νέων πρενυλοξυ-κουμαρινικών αναλόγων

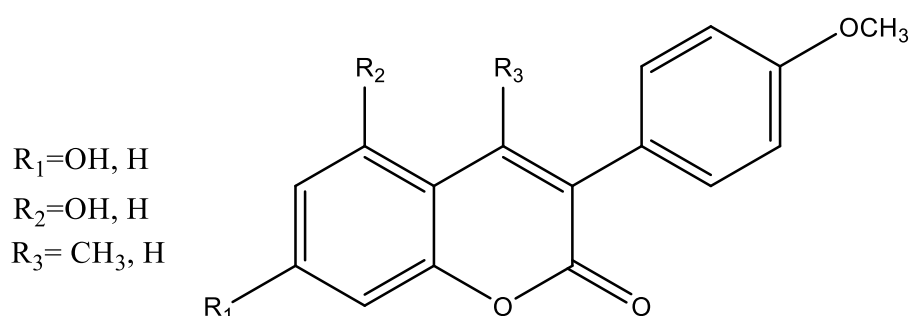
ΜΕΡΟΣ Β: Σχεδιασμός, αξιολόγηση βιολογικής δράσης, ταυτοποίηση δομής, διαχωρισμός και απομόνωση νέων πρενυλοξυ-κουμαρινικών αναλόγων

5. Σχεδιασμός νέων πρενυλοξυ-κουμαρινικών αναλόγων

5.1 Σχεδιασμός νέων παραγώγων

Στόχος της παρούσας διπλωματικής εργασίας, η οποία εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Οργανικής Χημείας Ε.Μ.Π., είναι ο σχεδιασμός και η παρασκευή μιας νέας συνθετικής σειράς πρενυλοξυ-κουμαρινικών φυσικών αναλόγων. Παράλληλα μελετήθηκε η αντιοξειδωτική ικανότητα των νέων ενώσεων μέσω της αλληλεπίδρασής τους με την ελεύθερη ρίζα του DPPH και μέσω της δυνατότητας αναστολής της λιπιδικής υπεροξειδωσης (AAPH), αλλά και η αντιφλεγμονώδης δράση τους μέσω της αναστολής της λιποξυγονάσης από σόγια.

Για τον σχεδιασμό και τη σύνθεση των νέων ενώσεων, χρησιμοποιήθηκε ως μόριο οδηγός η ένωση, του σχήματος 24 (95) (103).

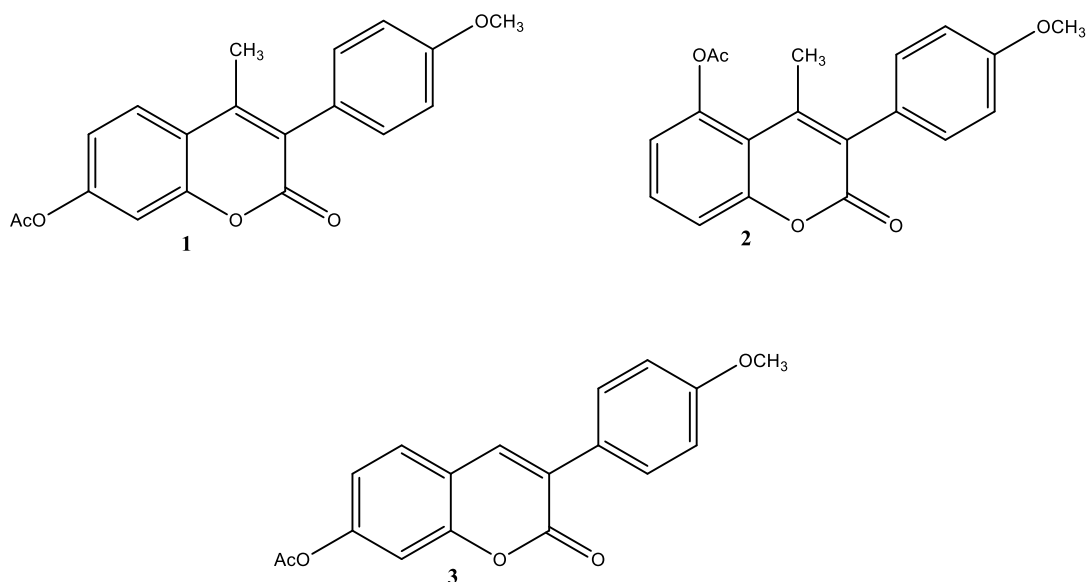


Σχήμα 24: Μόριο οδηγός για τον σχεδιασμό και σύνθεση νέων πρενυλοξυ-κουμαρινικών αναλόγων

Η γενική συνθετική μέθοδος που ακολουθήθηκε πραγματοποιήθηκε σε τρία στάδια και περιλαμβάνει, την σύνθεση των ακετυλοξυ-3-αρυλο-κουμαρινών (στάδιο 1- σειρά Α), την παρασκευή υδροξυλιωμένων-3-αρυλο-κουμαρινών μέσω αντιδράσεων αποπροστασίας (στάδιο 2- σειρά Β), και τέλος την παρασκευή των πρενυλοξυ-3-αρυλο-κουμαρινών μέσω της σύνθεσης εστέρων κατά Williamson, χρησιμοποιώντας τα πρενυλο-βρωμίδιο (στάδιο 3-σειρά Γ), γερανυλο-βρωμίδιο (στάδιο 3-σειρά Δ), και trans-trans-φαρνεζυλο-βρωμίδιο (στάδιο 3-σειρά Ε). Αναλυτικότερα οι νέες ενώσεις που συντέθηκαν και εξετάστηκαν είναι:

5.1.1 Σειρά A: Ακετυλοξυ-3-αρυλο-κουμαρίνες

Η σειρά A των κουμαρινικών αναλόγων αφορά στη σύνθεση 5- και 7-ακετυλοξυ-3-αρυλο-κουμαρινών. Αποτελείται συνολικά από τρία παράγωγα τα οποία διαθέτουν μια μεθοξυ-ομάδα, (-OCH₃), ως υποκατάστατη στη πάρα- θέση του αρωματικού δακτυλίου της θέσης 3. Η σειρά A, αποτελεί το πρώτο στάδιο σύνθεσης των νέων κουμαρινικών αναλόγων και είναι η πρώτη ύλη για την σύνθεση των κουμαρινών της σειράς B. Τα μόρια που προέκυψαν όπως φαίνεται στο σχήμα 25 είναι: 7-ακετυλοξυ-3-(4-μεθοξυ-φαινυλο)-4-μεθυλο-2H-χρωμεν-2-όνη-(**1**), 5-ακετυλοξυ-3-(4-μεθοξυ-φαινυλο)-4-μεθυλο-2H-χρωμεν-2-όνη-(**2**), 7-ακετυλοξυ-3-(4-μεθοξυ-φαινυλο)-2H-χρωμεν-2-όνη-(**3**).

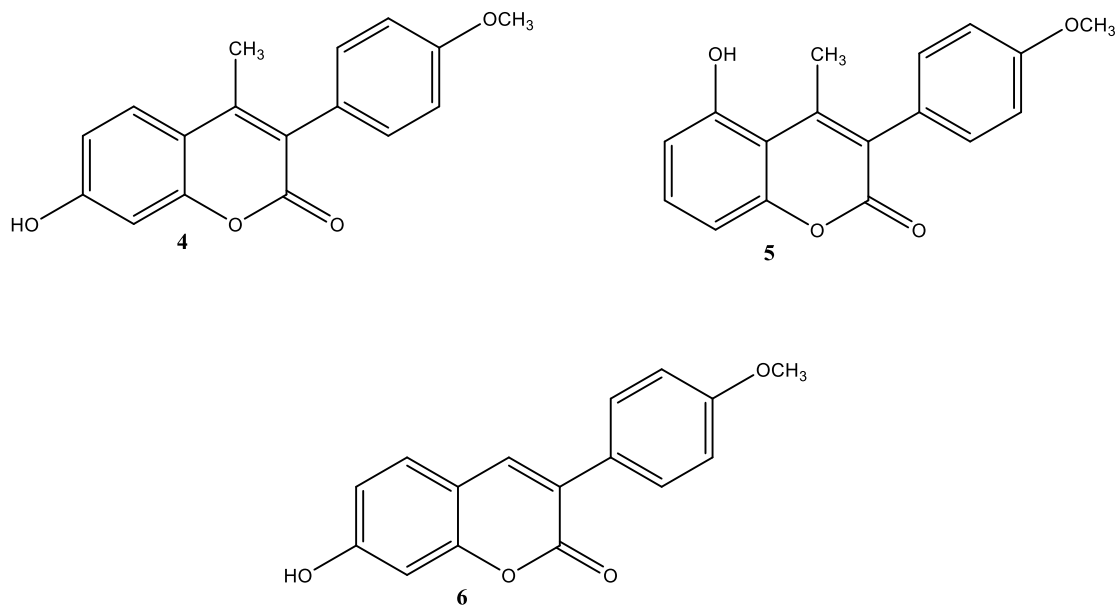


Σχήμα 25: Ακετυλοξυ-3-(4-μεθοξυ-φαινυλο)-κουμαρινικά παράγωγα σειράς A

5.1.2 Σειρά B: Υδροξυλιωμενες-3-αρυλο-κουμαρίνες

Η σειρά B των κουμαρινικών αναλόγων αφορά στη σύνθεση 5- και 7-υδροξυ-3-αρυλο-κουμαρινών. Οι ενώσεις αυτές παρασκευάστηκαν μέσω αντίδρασης μερικής αποπροστασίας των αναλόγων της σειράς A. Αποτελείται συνολικά από τρία παράγωγα τα οποία διαθέτουν μια μεθοξυ-ομάδα (-OCH₃) υποκατάστατη στη πάρα- θέση του αρωματικού δακτυλίου της θέσης 3. Η σειρά B, αποτελεί το δεύτερο στάδιο σύνθεσης των νέων κουμαρινικών αναλόγων. Τα μόρια που προέκυψαν όπως φαίνεται στο σχήμα 26 είναι: 7-υδροξυ-3-(4-μεθοξυ-φαινυλο)-4-μεθυλο-2H-χρωμεν-2-όνη-(**4**), 5-υδροξυ-3-(4-μεθοξυ-φαινυλο)-4-μεθυλο-2H-χρωμεν-2-όνη-(**5**), 7-υδροξυ-3-(4-μεθοξυ-φαινυλο)-2H-χρωμεν-2-όνη-(**6**).

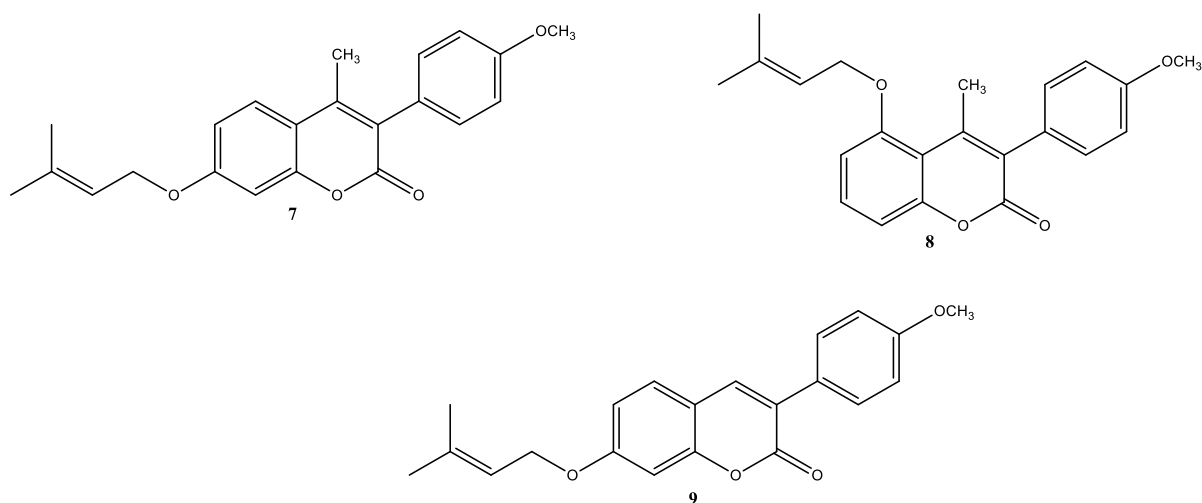
Σχεδιασμός νέων πρενυλοξυ-κουμαρινικών αναλόγων



Σχήμα 26: Υδροξυλιωμενα-3-αρυλο-κουμαρινικά παράγωγα σειράς Β

5.1.3 Σειρά Γ: Πρενυλοξυ-3-αρυλο-κουμαρίνες

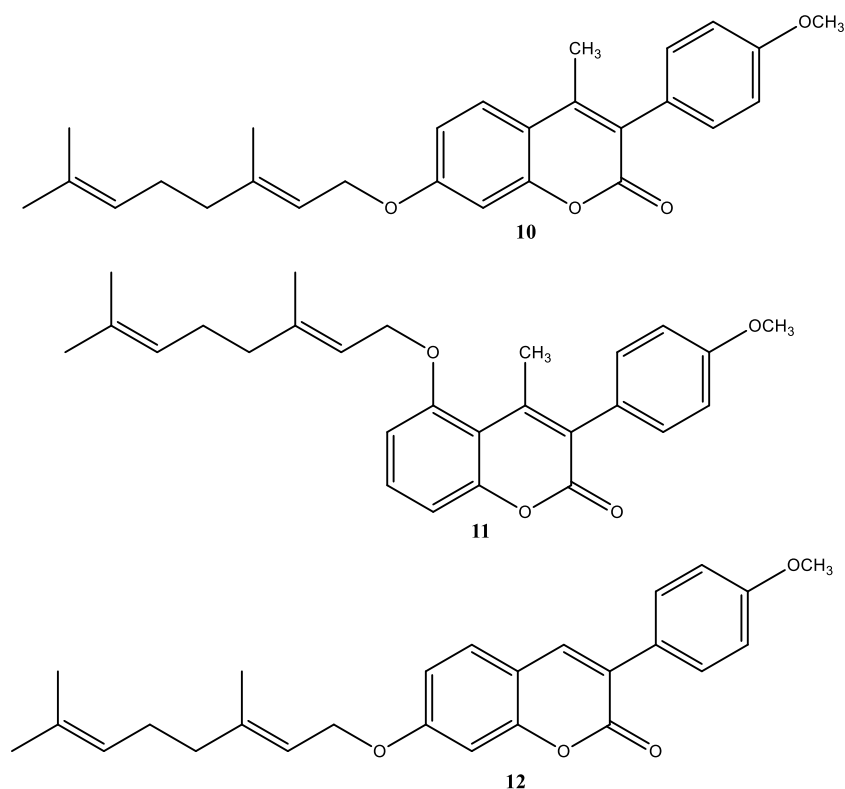
Η σειρά Γ των κουμαρινικών αναλόγων αφορά στη σύνθεση 5- και 7-πρενυλοξυ-3-αρυλο-κουμαρινών. Οι ενώσεις αυτές παρασκευάστηκαν μέσω της σύνθεσης εστέρων κατά Williamson, χρησιμοποιώντας το κατάλληλο πρενυλο-βρωμίδιο. Αποτελείται συνολικά από τρία παράγωγα τα οποία διαθέτουν μια μεθοξυ-ομάδα (-OCH₃) υποκατάστατη στη πάρα- θέση του αρωματικού δακτυλίου της θέσης 3. Τα μόρια που προέκυψαν όπως φαίνεται στο σχήμα 27 είναι: 7-πρενυλοξυ-3-(4-μεθοξυ-φαινυλο)-4-μεθυλο-2Η-χρωμεν-2-όνη **(7)**, 5-πρενυλοξυ-3-(4-μεθοξυ-φαινυλο)-4-μεθυλο-2Η-χρωμεν-2-όνη **(8)**, 7-πρενυλοξυ-3-(4-μεθοξυ-φαινυλο)-2Η-χρωμεν-2-όνη **(9)**.



Σχήμα 27: Πρενυλοξυ-3-(4-μεθοξυ-φαινυλο)-κουμαρινικά παράγωγα σειράς Γ

5.1.4 Σειρά Δ: Γερανυλοξυ-3-αρυλο-κουμαρίνες

Η σειρά Δ των κουμαρινικών αναλόγων αφορά στη σύνθεση 5- και 7-γερανυλοξυ-3-αρυλο-κουμαρινών. Οι ενώσεις αυτές παρασκευάστηκαν μέσω της σύνθεσης εστέρων κατά Williamson, χρησιμοποιώντας το γερανυλο-βρωμίδιο. Αποτελείται συνολικά από τρία παράγωγα τα οποία διαθέτουν μια μεθοξυ-ομάδα (-OCH₃) υποκατάστατη στη πάρα- θέση του αρωματικού δακτυλίου της θέσης 3. Η σειρά Δ, αποτελείται από τις γερανυλοξυ κουμαρίνες, 7-γερανυλοξυ-3-(4-μεθοξυ-φαινυλο)-4-μεθυλο-2H-χρωμεν-2-όνη **(10)**, 5- γερανυλοξυ-3-(4-μεθοξυ-φαινυλο)-4-μεθυλο-2H-χρωμεν-2-όνη-**(11)**, 7-γερανυλοξυ-3-(4-μεθοξυ-φαινυλο)-2H-χρωμεν-2-όνη **(12)**.



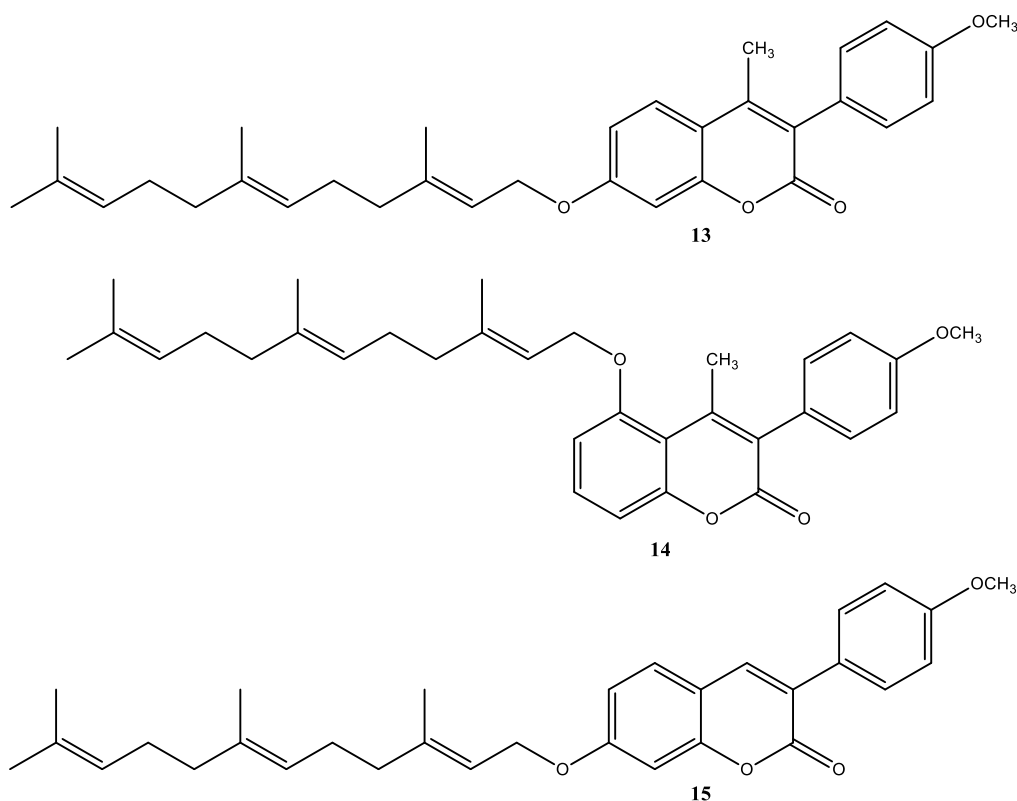
Σχήμα 28: Γερανυλοξυ-3-αρυλο-κουμαρινικά παράγωγα σειράς Δ

5.1.5 Σειρά Ε: Φαρνεζυλοξυ-3-αρυλο-κουμαρίνες

Η σειρά Ε των κουμαρινικών αναλόγων αφορά στη σύνθεση 5- και 7-φαρνεζυλοξυ-3-αρυλο-κουμαρινών. Οι ενώσεις αυτές παρασκευάστηκαν μέσω της σύνθεσης εστέρων κατά Williamson, χρησιμοποιώντας το trans-trans-φαρνεζυλο-βρωμίδιο. Αποτελείται συνολικά από τρία παράγωγα τα οποία διαθέτουν μια μεθοξυ-ομάδα (-OCH₃) υποκατάστατη στη πάρα- θέση του αρωματικού δακτυλίου της θέσης 3. Η σειρά Ε, περιλαμβάνει τις φαρνεζυλο-κουμαρίνες, 7-φαρνεζυλοξυ-3-(4-

Σχεδιασμός νέων πρενυλοξυ-κουμαρινικών αναλόγων

μεθοξυ-φαινυλο)-4-μεθυλο-2Η-χρωμεν-2-όνη (**13**), 5-φαρνεζυλοξυ-3-(4-μεθοξυ-φαινυλο)-4-μεθυλο-2Η-χρωμεν-2-όνη (**14**), 7-φαρνεζυλοξυ-3-(4-μεθοξυ-φαινυλο)-2Η-χρωμεν-2-όνη (**15**).



Σχήμα 29: Φαρνεζυλοξυ-3-αρυλο-κουμαρινικά παράγωγα σειράς E

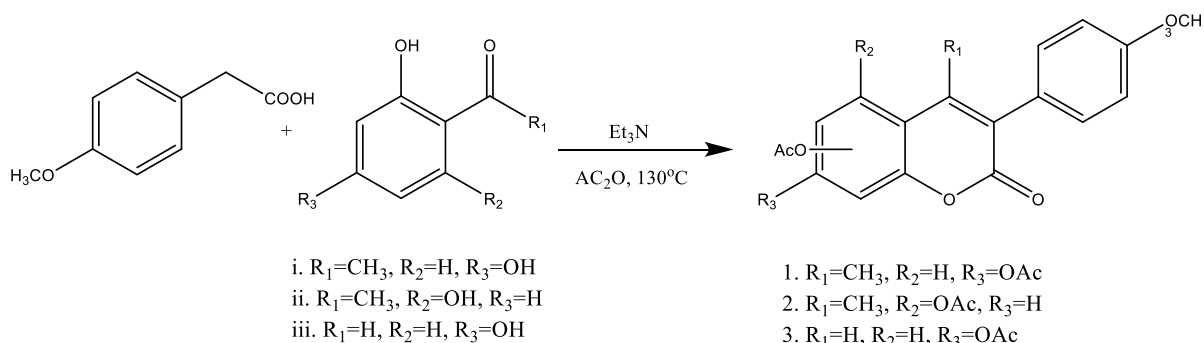
5.2 Σύνθεση νέων μορίων

Στο παρόν, υποκεφάλαιο περιγράφεται η συνθετική πορεία που ακολουθήθηκε, για τα νέα ανάλογα των σειρών A-E, όπως και οι συνθήκες αντίδρασης.

5.2.1 Σύνθεση 5- και 7-ακετυλόξυ-3-αρυλο-κουμαρινών

Μέσω της μεθόδου αυτής συντέθηκαν τα ανάλογα **1-3** (σχήμα 25). Η τροποποιημένη αντίδραση συμπύκνωσης Perkin-Ogialoro (75), πραγματοποιήθηκε παρουσία τριαιθυλαμίνης (Et_3N) και οξικού ανυδρίτη (Ac_2O) και πλεονεκτεί σημαντικά από άλλες συνθετικές μεθόδους καθώς τα προϊόντα ελήφθησαν σε ικανοποιητικότερες αποδόσεις χωρίς να απαιτούνται περαιτέρω διεργασίες καθαρισμού. Ο μηχανισμός της αντίδρασης εξηγείται αναλυτικά στο υποκεφάλαιο 3.2 (σχήμα 13).

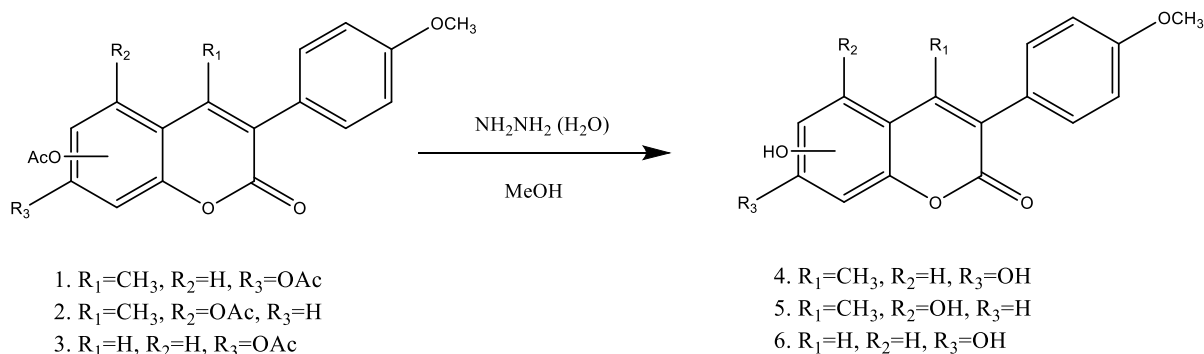
Σχεδιασμός νέων πρενυλοξυ-κουμαρινικών αναλόγων



Σχήμα 30: Αντίδραση σύνθεσης 5- και 7-ακετυλοξυ-3-αρυλο-κουμαρινών

5.2.2 Σύνθεση 5- και 7-υδροξυ-3-αρυλο-κουμαρινών

Τα τελικά προϊόντα των υδροξυ-κουμαρινών **4-6** (σχήμα 26), ελήφθησαν ύστερα από αντίδραση απακετυλίωσης των αρχικών μορίων, **1-3** (σχήμα 25) παρουσία υδραζίνης σε διαλύτη μεθανόλη με σημαντικά ικανοποιητικές αποδόσεις.

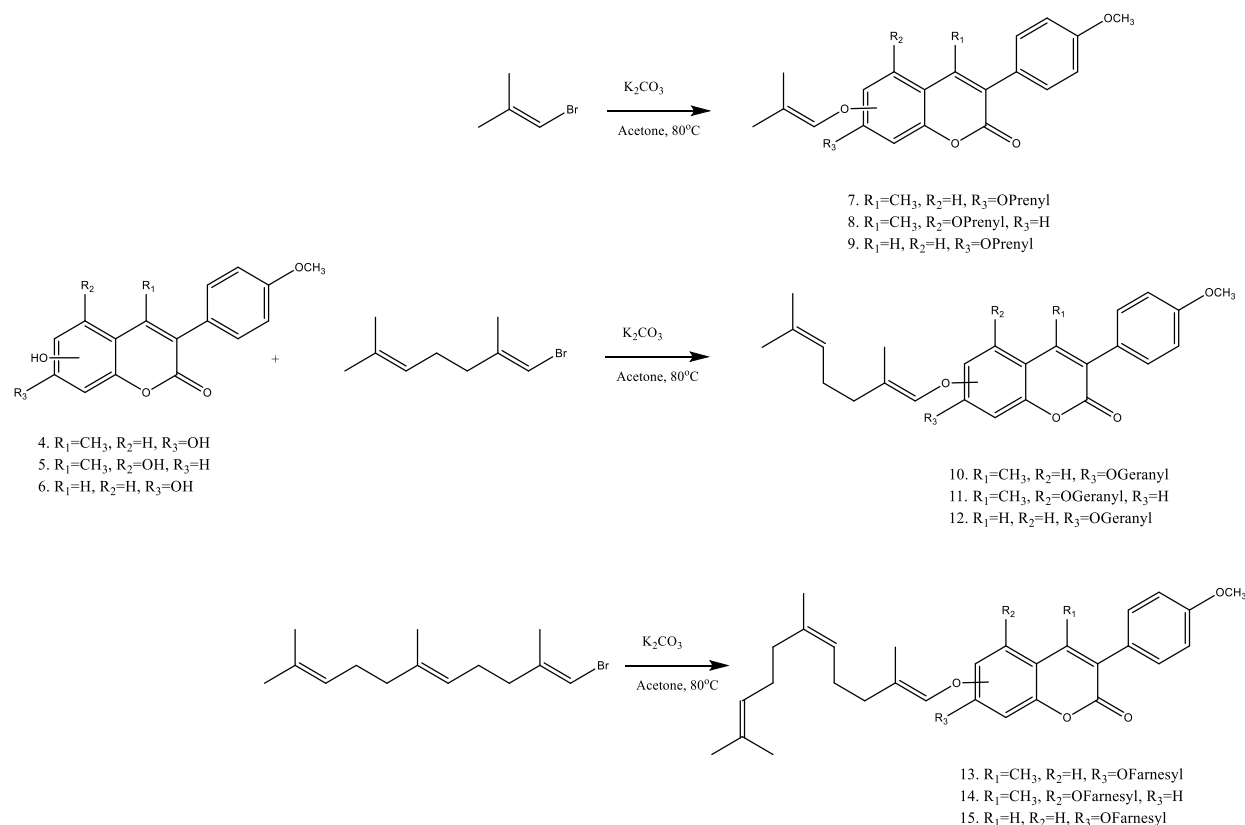


Σχήμα 31: Αντίδραση σύνθεσης 5- και 7-υδροξυ-3-αρυλο-κουμαρινών

5.2.3 Σύνθεση 5- και 7-πρενυλοξυ-3-αρυλο-κουμαρινών

Οι νέες πρενυλοξυ-κουμαρίνες, ενώσεις **7-15** (σχήμα 27-29), παρήχθησαν σύμφωνα με τη γενική αντίδραση αλκυλίωσης της υδροξυ-ομάδας, στις θέσεις 5- και 7- του κουμαρινικού δακτυλίου, των κουμαρινών, **4-6** (σχήμα 26) με μία πρενυλο-βρωμίδιο (1-βρωμο-3-μεθυλο-βρωμίδιο), γερανυλο-βρωμίδιο και trans-trans-φαρνεζυλο-βρωμίδιο παρουσία ανθρακικού καλίου σε διαλύτη ακετόνη με ικανοποιητικές αποδόσεις.

Αξιολόγηση βιολογικής δράσης των νέων κουμαρινικών αναλόγων



Σχήμα 32: Αντίδρασεις σύνθεσης 5- και 7-πρενυλοξυ-3-αρυλο-κουμαρινών

6. Αξιολόγηση βιολογικής δράσης των νέων κουμαρινικών αναλόγων

6.1.Αντιοξειδωτική δράση

Η αντιοξειδωτική τους δράση των νέων κουμαρινικών αναλόγων αξιολογήθηκε *in vitro* με βάση την ικανότητα δέσμευσης της σταθερής ελεύθερης ρίζας DPPH και την αναστολή της λιπιδικής υπεροξειδωσης του λινολεϊκού οξέος που επάγεται από τη ρίζα AAPH.

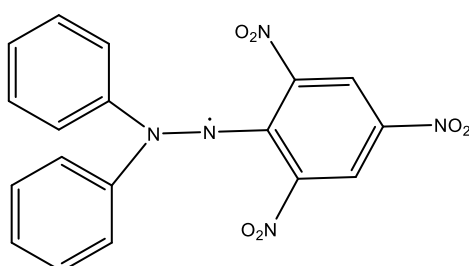
6.1.1 Ικανότητα δέσμευσης της σταθερής ελεύθερης ρίζας DPPH

Ένας από τους κυριότερους τρόπους λειτουργίας ενός αντιοξειδωτικού είναι η ικανότητά του να παγιδεύει ελεύθερες ρίζες. Πολύ δραστικές ελεύθερες ρίζες και δραστικές μορφές οξυγόνου δημιουργούνται σε βιολογικά συστήματα από μία ευρεία ποικιλία πηγών. Αυτές οι ελεύθερες ρίζες μπορούν

Αξιολόγηση βιολογικής δράσης των νέων κουμαρινικών αναλόγων

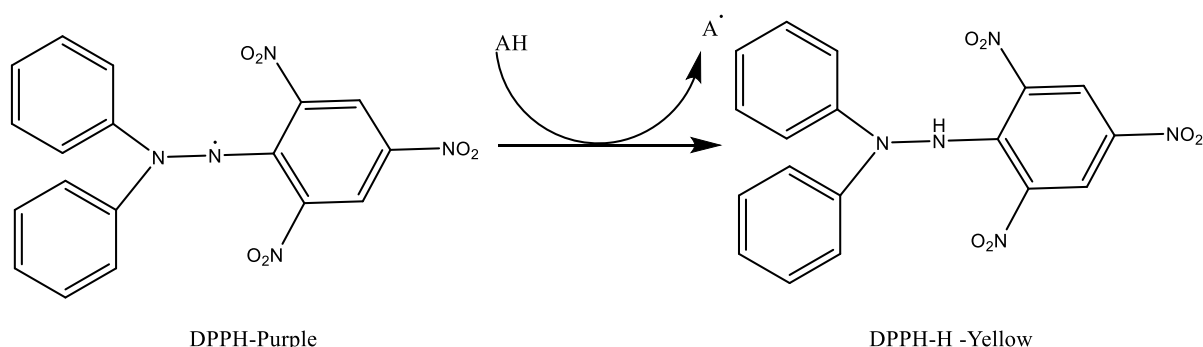
να οξειδώνουν νουκλεϊκά οξέα, πρωτεΐνες, λιπίδια ή ακόμα και το DNA, πρόδρομος για την εμφάνιση ασθενειών. Αντιοξειδωτικές ενώσεις, όπως φαινολικά οξέα, πολυφαινόλες και φλαβονοειδή σαρώνουν τις ελεύθερες ρίζες, όπως το υπεροξειδίο, υδροϋπεροξειδίο ή λιπίδιο υπεροξυλίου αναστέλλοντας τους οξειδωτικούς μηχανισμούς που οδηγούν σε ασθένειες (16) (78) (104).

Οι αναλυτικές αυτές μέθοδοι, μετρούν την δράση των αντιοξειδωτικών ενώσεων κατά των ελεύθερων ριζών όπως η 1,1-διφαινυλο-2-πικρυλ-υδραζύλη (DPPH) ρίζα, η ρίζα ανιόντος υπεροξειδίου, η ρίζα υδροξυλίου ($\cdot\text{OH}$), ή το ρίζα υπεροξυλίου ($\text{ROO}\cdot$) (104) (105). Η 1,1-διφαινυλο-2-πικρυλ-υδραζύλη είναι μια σταθερή ελεύθερη ρίζα η οποία διαθέτει ένα ασύζευκτο ηλεκτρόνιο σθένους σε ένα άτομο αζώτου (106).



Σχήμα 33: Χημική δομή DPPH

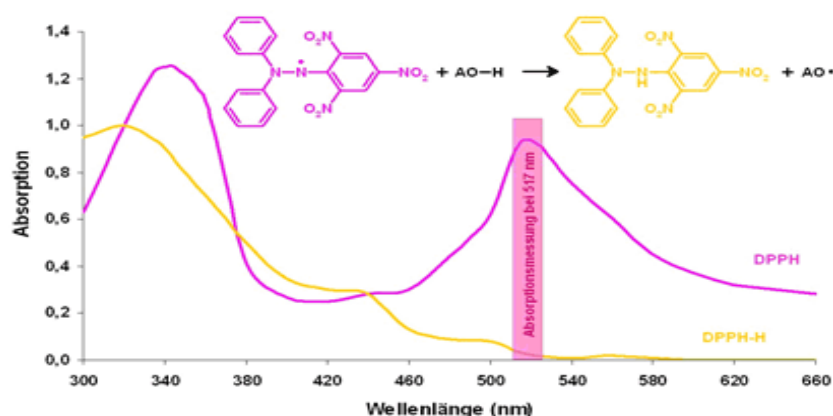
Η DPPH ρίζα χρησιμοποιείται ευρέως, για να εξετάσει την ικανότητα των ενώσεων να δρουν ως σαρωτές ελεύθερης ρίζας ή δότες υδρογόνου, επιτρέποντάς την αξιολόγηση της αντιοξειδωτικής δράσης ενώσεων. Η μέθοδος DPPH χρησιμοποιείται τόσο σε στερεά αλλά και υγρά δείγματα και δεν εξειδικεύεται σε κάποιο συγκεκριμένο αντιοξειδωτικό συστατικό, αλλά εξετάζει τη συνολική αντιοξειδωτική ικανότητα του δείγματος (104). Η μέθοδος αυτή είναι ταχεία, απλή, ακριβής και ανέξοδη δοκιμασία για τη μέτρηση της ικανότητας των διαφόρων ενώσεων (107).



Σχήμα 34: Αντίδραση DPPH ρίζας παρουσία αντιοξειδωτικής ένωσης

Αξιολόγηση βιολογικής δράσης των νέων κουμαρινικών αναλόγων

Η μείωση της συγκέντρωσης της DPPH ρίζας από ένα αντιοξειδωτικό φαίνονται παρακάτω. Το μονήρες ηλεκτρόνιο στην ελεύθερη ρίζα DPPH δίνει ένα ισχυρό μέγιστο απορρόφησης στα 517 nm και είναι μοβ χρώματος. Παρατηρείται αποχρωματισμός από μωβ σε κίτρινο όπως και η απορρόφηση της DPPH ρίζας στα 517 nm όπου και μειώνεται, όταν το μονήρες ηλεκτρόνιο της DPPH ρίζας ενώνεται με υδρογόνο όπου σχηματίζεται το DPPH-H. Ο προκύπτων αποχρωματισμός είναι μια στοιχειομετρική σχέση με τον αριθμό των ηλεκτρονίων που έχουν δεσμευθεί (104).

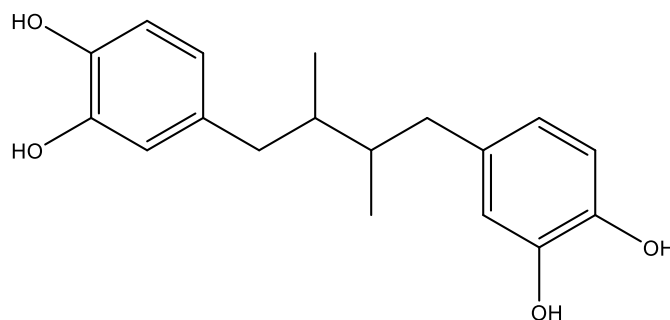


Εικόνα 2: Διάγραμμα απορρόφησης DPPH ρίζας πριν και μετά την παρουσία αντιοξειδωτικής ένωσης

Το ποσοστό της αντιοξειδωτικής δραστηριότητας (AA%) προσδιορίζεται σύμφωνα με την σχέση (I) (105):

$$AA\% = 100 - \left[\frac{(Abs_{sample} - Abs_{blank}) \times 100}{Abs_{control}} \right] \quad (I)$$

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

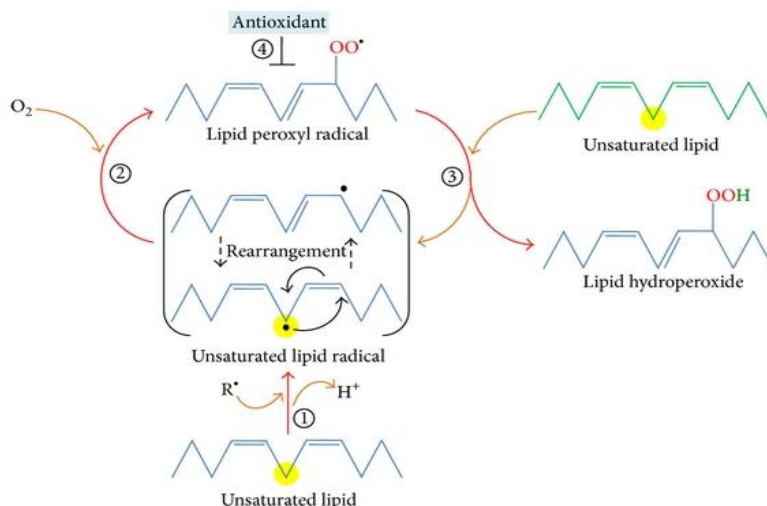


Σχήμα 35: Χημική δομή NDGA

6.1.2 Αναστολή λιπιδικής υπεροξειδωσης του λινολεικού οξέος

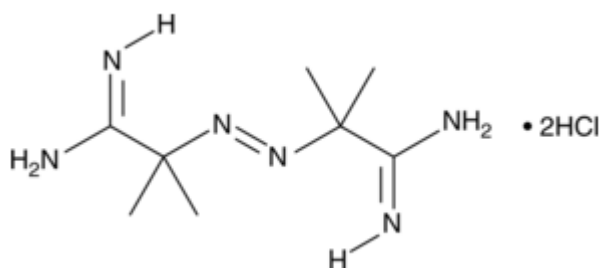
Η οξειδωτική τροποποίηση των κυτταρικών συστατικών (συμπεριλαμβανομένων λιπιδίων, πρωτεϊνών και DNA) είναι η βασική αιτία διαφόρων παθολογικών καταστάσεων. Αυτά περιλαμβάνουν το διαβήτη, καταρράκτη, πνευμονικό εμφύσημα, αρθρίτιδα, καρκίνος, και τη γήρανση. Στις βιολογικές μεμβράνες, την υπεροξειδωση των λιπιδίων είναι συχνά συνέπεια της προσβολής ελεύθερων ριζών. Ο υπεροξειδωση των ακόρεστων λιπαρών οξέων των κυττάρων παράγει πολλά δραστικά είδη, ελεύθερες ρίζες όπως, υδροϋπεροξειδία, και οι ενώσεις καρβονυλίου, τα οποία προκαλούν βλάβες. Δεδομένου ότι οι μεμβράνες αποτελούν τη βάση πολλών κυτταρικών οργανιδίων, όπως μιτοχόνδρια, μεμβράνες του πλάσματος, ενδοπλασματικό δίκτυο, λιποσώματα κλπ. Δομικές βλάβες που προκαλούνται από λιπιδική υπεροξειδωση είναι εξαιρετικά επιζήμιες για τη λειτουργία των κυττάρων (108) (109) (53).

Η λιπιδική υπεροξειδωση μπορεί να περιγραφεί, γενικά, ως μια διαδικασία σύμφωνα με την οποία, οξειδωτικά μέσα, όπως ελεύθερες ρίζες επιτίθενται σε λιπίδια που περιέχουν διπλό δεσμό άνθρακα-άνθρακα(C=C), ιδιαίτερα σε πολυακόρεστα λιπαρά οξέα (PUFA) που συνήθως είναι δομικά συστατικά των κυτταρικών μεμβρανών. Το σχήμα 26, παρουσιάζει συνοπτικά το μηχανισμό λιπιδικής υπεροξειδωσης. Στο βήμα 1, τα προ-οξειδωτικά αποσπούν το αλλυλικό υδρογόνο σχηματίζοντας στον άνθρακα ανάμεσα στους διπλούς δεσμούς, την λιπιδική ρίζα. Η ρίζα αυτή τείνει να σταθεροποιηθεί με μοριακή αναδιάταξη, όπου και σχηματίζεται ένα συζευγμένο διένιο. Στην επόμενη φάση (βήμα 2), η λιπιδική ρίζα αντιδρά ταχέως με οξυγόνο για να σχηματίζοντας υπεροξυλική ρίζα, η οποία αποσπά ένα υδρογόνο από ένα άλλο μόριο λιπιδίου δημιουργώντας μια νέα λιπιδική ρίζα και στη συνέχεια ένα νέο λιπιδικό υδροϋπεροξειδίο (βήμα 3). Τέλος, στο βήμα 4, η αντίδραση τερματισμού, από αντιοξειδωτικά, πραγματοποιείται δίνοντας ένα άτομο υδρογόνου στην υπεροξυλική ρίζα του λιπιδίου με αποτέλεσμα το σχηματισμό των μη δραστικών προϊόντων (110).



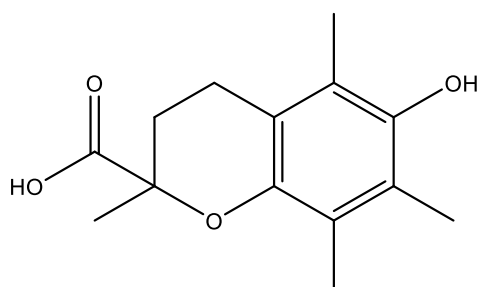
Σχήμα 36: Μηχανισμός λιπιδικής υπεροξειδωσης

Το 2,2 αζοδισ-(2-αμιδινοπροπανο)-υδροχλωρίδιο (AAPH) είναι μια υδατοδιαλυτή αζωτούχα ένωση η οποία χρησιμοποιείται εκτενώς ως δημιουργός ελευθέρων ριζών, στη μελέτη της υπεροξειδωσης των λιπιδίων και τον χαρακτηρισμό των αντιοξειδωτικών. Η αποσύνθεση της AAPH παράγει μοριακό άζωτο και δυο ρίζες άνθρακα. Οι ρίζες άνθρακα, μπορούν να συνδυαστούν, παράγοντας σταθερά προϊόντα ή να αντιδρώντας με μοριακό οξυγόνο για να δώσει υπεροξυλικές ρίζες. Η οξειδωση του AAPH που προκαλείται από το λινολεϊκό οξύ έχει αναπτυχθεί ως μια γρήγορη και αξιόπιστη μέθοδος για τη μέτρηση της αντιοξειδωτικής δραστηριότητας των πρώτων υλών (109). Βασίζεται στην αναστολή της οξειδωσης των λιπιδίων, παρέχοντας ένα μέτρο του κατά πόσο αποτελεσματικά πραγματοποιείται η αντιοξειδωτική προστασία έναντι στην *in vitro* οξειδωση των λιπιδίων (111).



Σχήμα 37: Χημική δομή AAPH

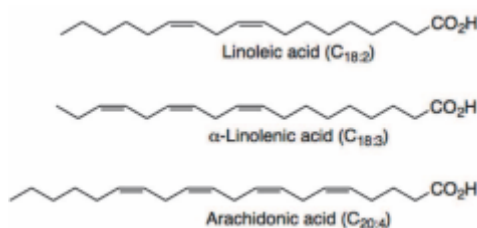
Για τη μελέτη της αντιοξειδωτικής δράσης με τη μέθοδο του AAPH, χρησιμοποιήθηκε ως ένωση αναφοράς το Trolox (6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid), ένα ικανό αντιοξειδωτικό ανάλογο της βιταμίνης E.



Σχήμα 38: Χημική δομή Trolox

6.2 Αντιφλεγμονώδης δράση

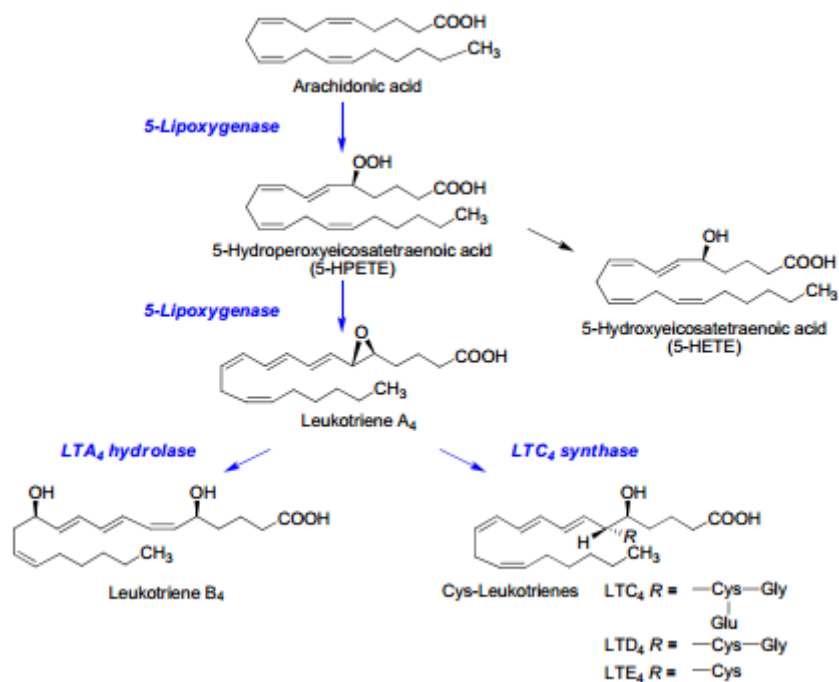
Οι λιποξυγενάσες, με δομή *cis,cis*-1,4-πενταδιένιου, συναντώνται ευρέως σε φυτά, μύκητες, και τα ζώα, οι οποίες είναι μια μεγάλη μονομερής οικογένεια πρωτεϊνών, μη-αίμης, μη-θείουχες, που περιέχουν σίδηρο και που καταλύουν την οξείδωση των πολυακόρεστων λιπαρών οξέων (PUFA), όπως λινολεϊκό, α -λινολενικό και το αραχιδονικό οξύ, τα οποία δίνουν υδροϋπεροξειδία. Η 5-λιποξυγενάση (5-LO) είναι ένα ένζυμο-κλειδί, στη βιοσύνθεση των λευκοτριενίων, όπου και διαδραματίζει καταλυτικό ρόλο στα αρχικά βήματα για τη μετατροπή του αραχιδονικού οξέος σε λευκοτριένια. Αναστολή αυτού του ενζύμου μπορεί να μειώσει τη μεσολάβηση λευκοτριενίων με φλεγμονώδεις αποκρίσεις και να συμβάλει στην εμφάνιση καταστάσεων, ασθένειας όπως το άσθμα. Πρόσφατες μελέτες έχουν εμπλέξει τη δραστηριότητα 5-LO σε ένα μεγάλο αριθμό άλλων ασθενειών, συμπεριλαμβανομένου του καρκίνου, της οστεοπόρωσης, και της αθηροσκλήρωσης (112) (113) (114).



Σχήμα 39: Υποστρώματα λιποξυγενάσης, λινελαϊκό, α -λινελαϊκό και το αραχιδονικό οξύ

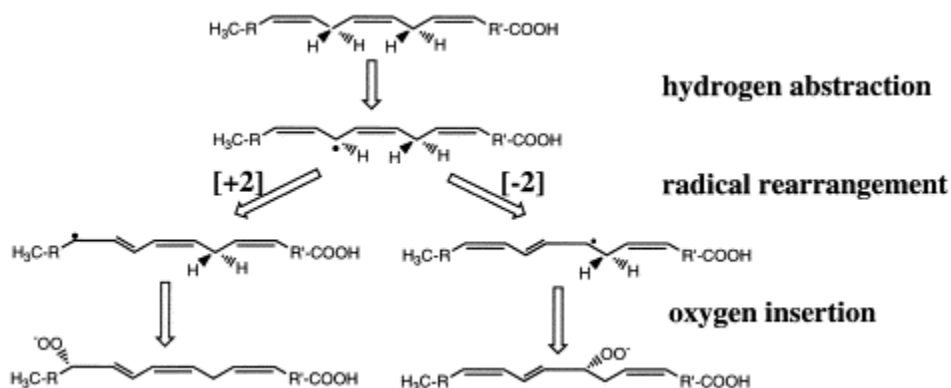
Το σχήμα 40, παρουσιάζει την κατάλυση του αραχιδονικού οξέος προς λευκοτριένια. Η 5-λιποξυγενάση (5-LO) καταλύει τη μετατροπή του αραχιδονικού οξέος (AA) σε 5(S)-υδροϋπεροξυεικοσατετραενοϊκό οξύ (5-HPETE) και λευκοτριενίου LTA_4 με τη βοήθεια της FLAP, μια 5-LO-πρωτεΐνη ενεργοποίησης. Το ασταθές LTA_4 συνέχεια είτε μετατρέπεται σε LTB_4 μέσω της υδρολάσης LTA_4 ή σε LTC_4 μέσω της συνθάσης LTC_4 (115).

Αξιολόγηση βιολογικής δράσης των νέων κουμαρινικών αναλόγων



Σχήμα 40: Κατάλυση αραχιδονικού οξέος προς σχηματισμό λευκοτριενίων

Η κατανόηση του μηχανισμού αναστολής της LOXs μπορεί να επιδράσει ουσιαστικά, στην ανάπτυξη πολλών αντικαρκινικών και αντιφλεγμονωδών φαρμάκων. Το αρχικό στάδιο της αντίδρασης LOX, είναι η απομάκρυνση ενός ατόμου υδρογόνου από μια ομάδα μεθυλενίου ανάμεσα στους διπλούς δεσμούς στο υπόστρωμα των λιπαρών οξέων. Η προκύπτουσα ρίζα άνθρακα σταθεροποιείται με ηλεκτρονική αναδιάταξη ανάμεσα στους διπλούς δεσμούς. Στη συνέχεια, ένα μοριακό οξυγόνο προστίθεται στο άτομο άνθρακα στη +2 ή -2 θέση από την αρχική ρίζα άνθρακα, σχηματίζοντας έτσι, μια υπεροξειδική ρίζα, καθώς και ένα συζευγμένο trans,cis-διένιο. Η υπεροξειδική ρίζα στη συνέχεια, υδρογονώνεται για να σχηματίσει ένα υδροϋπεροξειδίο (116).



Σχήμα 41: Αντίδραση λιποξυγενάσης

Φασματοσκοπία μαγνητικού συντονισμού (NMR- Nuclear magnetic resonance)

Σε γενικές γραμμές, αναστολείς λιποξυγενάσης μπορούν να ενωθούν ομοιοπολικά με σίδηρο, ή να σχηματίσουν μοριακό συγκρότημα παρεμπόδισης στην πρόσβαση από το σίδηρο. Οι 5-LO αναστολείς μπορούν να ταξινομηθούν σε τρεις κύριες ομάδες: αναστολείς που δρουν οξειδοαναγωγικά, αναστολείς που δεσμεύουν τον σίδηρο με μικρή οξειδοαναγωγική δράση και αναστολείς μη-οξειδοαναγωγικού τύπου (115).

Τα μόρια της παρούσας διπλωματικής εργασίας μελετήθηκαν *in vitro* ως προς την ικανότητά τους να αναστέλλουν τη δράση της 5-LOX λιποξυγονάσης φυτικής προέλευσης από σόγια. Έχει πειραματικά αποδειχθεί ότι η αναστολή της φυτικής λιποξυγονάσης που προκαλείται από μη στεροειδή αντιφλεγμονώδη μόρια (NSAIDs) είναι ποιοτικά παρόμοια με την αναστολή της λιποξυγονάσης από θηλαστικά. Επομένως, τα αποτελέσματα από αυτή τη δοκιμασία μπορούν να χρησιμοποιηθούν για μια πρώτη διερεύνηση της αντιφλεγμονώδους δράσης νέων μορίων.

7. Φασματοσκοπία μαγνητικού συντονισμού (NMR- Nuclear magnetic resonance)

Η ταυτοποίηση και ο χαρακτηρισμός της δομής όλων των νέων μορίων πραγματοποιήθηκε με φασματοσκοπία NMR (^1H NMR), τα οποία ελήφθησαν στο Φασματογράφο NMR Varian Gemini 300 του Εθνικού Ιδρύματος Ερευνών. Στο κεφάλαιο αυτό περιγράφεται ο τρόπος ταυτοποίησης των νέων κουμαρινικών παραγώγων από τα προκύπτοντα φάσματα NMR για κάποια αντιπροσωπευτικά μόρια από κάθε κατηγορία.

Η φασματοσκοπία μαγνητικού συντονισμού, κοινώς ως NMR, χαρακτηρίζεται ως η πιο διακεκριμένη τεχνική για την αναγνώριση και ταυτοποίηση οργανικών ενώσεων. Το φαινόμενο NMR βασίζεται στο γεγονός ότι οι πυρήνες των ατόμων έχουν μαγνητικές ιδιότητες, που μπορούν να χρησιμοποιηθούν για να εξαχθούν χημικές πληροφορίες από το 'χάρτη' του ανθρακικού σκελετού που εξάγεται (76).

Οι πυρήνες πολλών ισότοπων στοιχείων, έχουν ένα χαρακτηριστικό σπίν (*spin*). Κάποια από αυτά έχουν ακέραιο, κάποια κλάσμα, ενώ κάποια άλλα καθόλου. Τα ισότοπα που συχνά ενδιαφέρουν τους επιστήμονες για τις μελέτες τους είναι: ^1H , ^{13}C , ^{19}F , ^{31}P , τα οποία έχουν σπίν $I=1/2$. Οτιδήποτε είναι φορτισμένο και κινείται έχει μια μαγνητική ροπή και παράγει ένα μαγνητικό πεδίο. Ως εκ τούτου, ένας πυρήνας λειτουργεί ως ένας μικρός μαγνήτης προσανατολισμένος κατά μήκος του άξονα

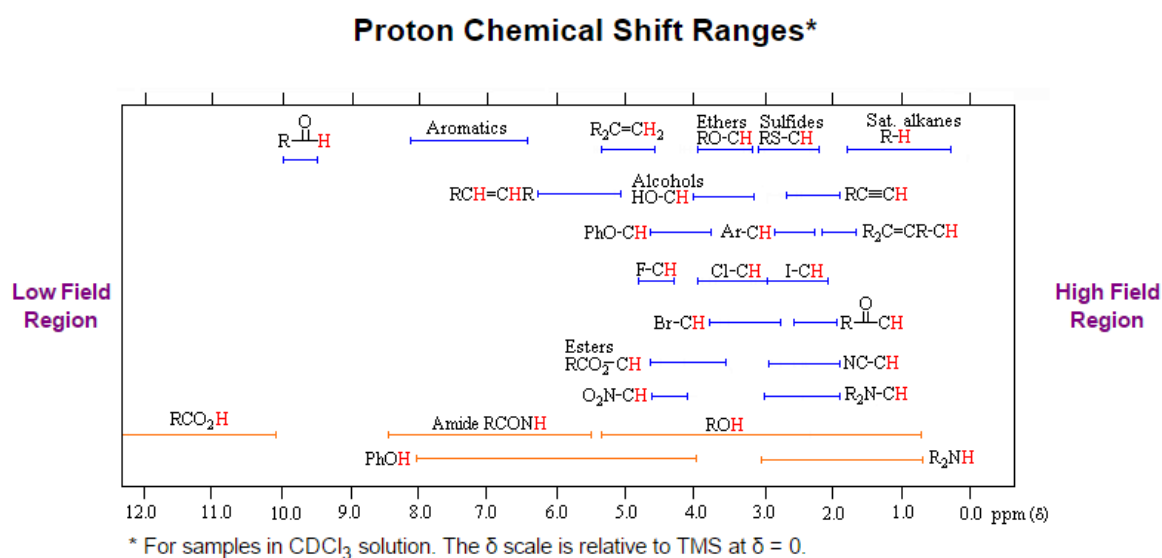
Φασματοσκοπία μαγνητικού συντονισμού (NMR- Nuclear magnetic resonance)

περιστροφής και κατά την έκθεση του σε μαγνητικό πεδίο, παρατηρείται προσανατολισμός (76) (117).

Το φαινόμενο του NMR, ακολουθεί την εξής αρχή: οι πυρήνες ατόμων με αυτοστροφορμή (σπίν) υπό την επίδραση ισχυρού στατικού μαγνητικού πεδίου, όταν ακτινοβολούνται διεγείρονται και κατά την αποδιέγερσή τους δίνουν σήμα (117) (118).

Βασικοί παράμετροι είναι:

- Χημική μετατόπιση: Η συχνότητα στην οποία συντονίζεται κάθε πυρήνας (θέση στο γράφημα) και μετράτε αναφορικά με τη συχνότητα συντονισμού μιας ένωσης προτύπου. Η βαθμονόμηση των γραφημάτων NMR, χρησιμοποιεί την αυθαίρετη κλίμακα δέλτα (δ). Μια μονάδα δέλτα ισούται με 1 ppm (parts per million), της συχνότητας λειτουργίας του φασματόμετρου. Η σχέση (II), χρησιμοποιείται για κάθε απορρόφηση (119).



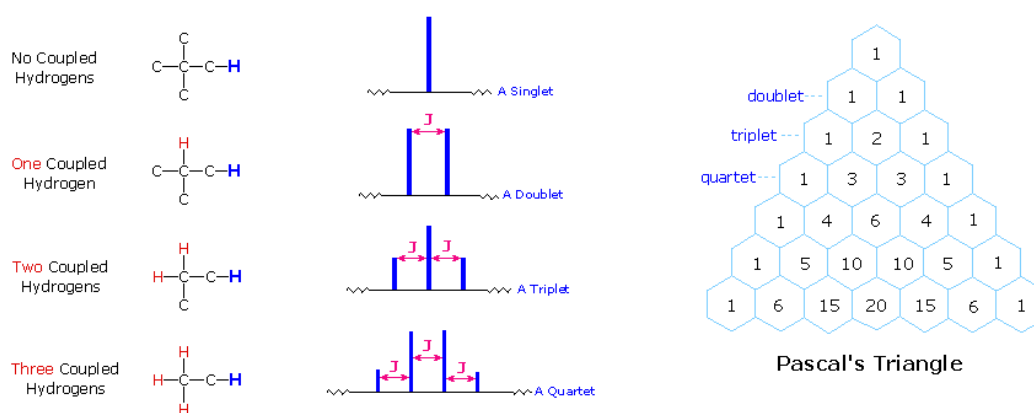
Εικόνα 3: Χημικές μετατοπίσεις χαρακτηριστικών ομάδων στη φασματοσκοπία ^1H NMR

$$\delta = \frac{\text{Παρατηρούμενη χημική μετατόπιση (αριθμός Hz από το TMS)}}{\text{Συχνότητα φασματομέτρου σε MHz}} \quad (\text{II})$$

- Σχάση σπίν-σπίν: Συχνά στα φάσματα ^1H NMR, παρατηρούνται πολλαπλές κορυφές, γνωστό ως φαινόμενο σχάσης σπίν-σπίν. Αυτό συμβαίνει από την αλληλεπίδραση των σπίν από γειτονικά άτομα. Οι κορυφές στο φάσμα, μπορούν να επιβεβαιωθούν μέσω του γενικού κανόνα $n+1$, πρωτόνια με, n ισοδύναμα γειτονικά πρωτόνια εμφανίζουν, $n+1$ κορυφές. Η

Φασματοσκοπία μαγνητικού συντονισμού (NMR- Nuclear magnetic resonance)

σταθερά σύζευξης, J , δίνει την απόστασή μεταξύ των επιμέρους κορυφών σε μια πολλαπλή (119).

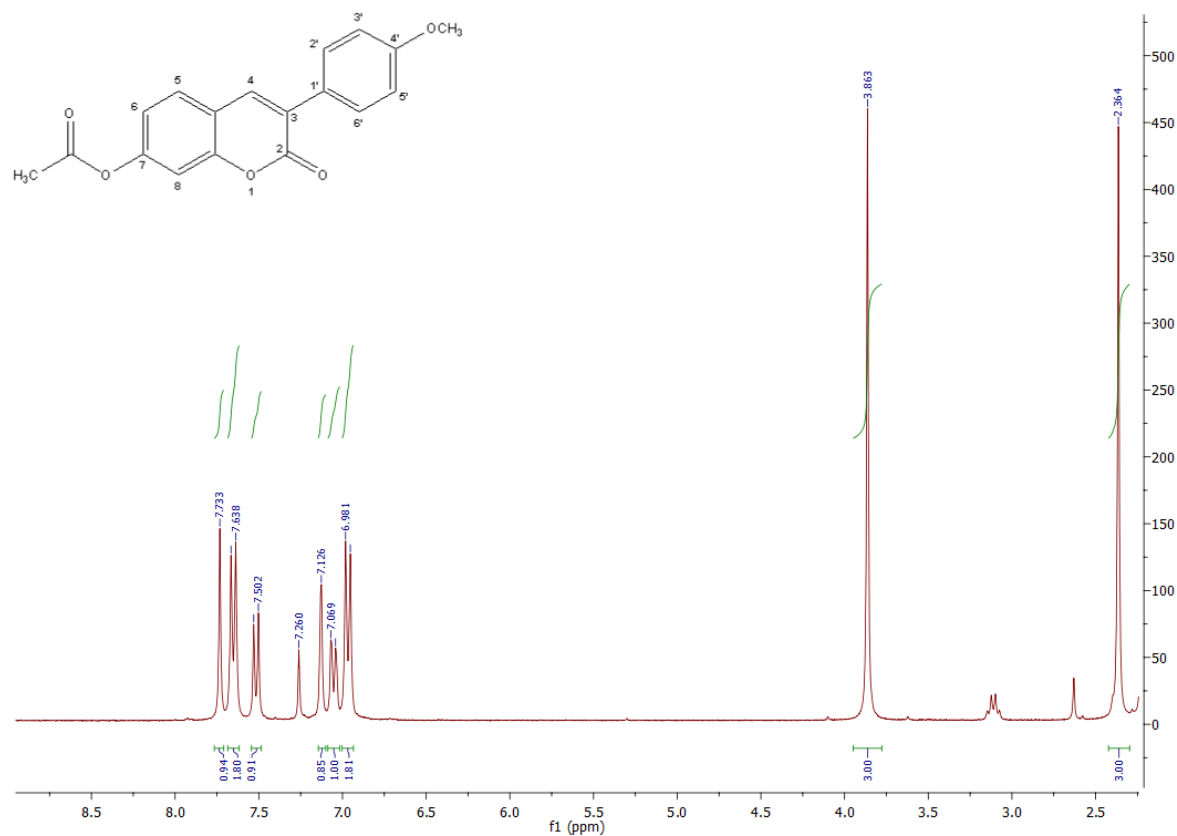


Εικόνα 4: Συνήθεις πολλαπλότητες σπίν

7.1 Φασματοσκοπική μελέτη σειράς A: Ακετυλοξυ-3-αρυλο-κουμαρίνες

Τα φάσματα των 5- και 7- ακετυλοξυ-κουμαρινικών αναλόγων **1-3**, ελήφθησαν σε διαλύτη δευτεριωμένο χλωροφόρμιο (CDCl₃). Στην εικόνα 5, παρουσιάζεται το φάσμα πρωτονίου ¹H NMR (CDCl₃, 300MHz) της κουμαρίνης **3**. Η τελική δομή των νέων παραγώγων, προσδιορίζεται από τις χαρακτηριστικές απλές κορυφές της μεθυλο-ομάδας (τρία ισοδύναμα πρωτόνια) της θέσης 4- του βενζοπυρανικού δακτυλίου στα 2.37-2.38 ppm, της μεθοξυ-ομάδας (τρία ισοδύναμα πρωτόνια) του δακτυλίου της θέσης 3- στα 3.86-3.88 ppm και της ακετυλο-ομάδας στην θέση 2.38-2.4 ppm. Τα οχτώ αρωματικά πρωτόνια αναμένονται στην περιοχή των 6.9-7.8 ppm. Στην ίδια περιοχή εμφανίζεται η κορυφή του διαλύτη στα 7.26 ppm. Στο παράρτημα φασμάτων παρατίθενται τα υπόλοιπα φάσματα των κουμαρινών **1** και **2**.

Φασματοσκοπία μαγνητικού συντονισμού (NMR- Nuclear magnetic resonance)

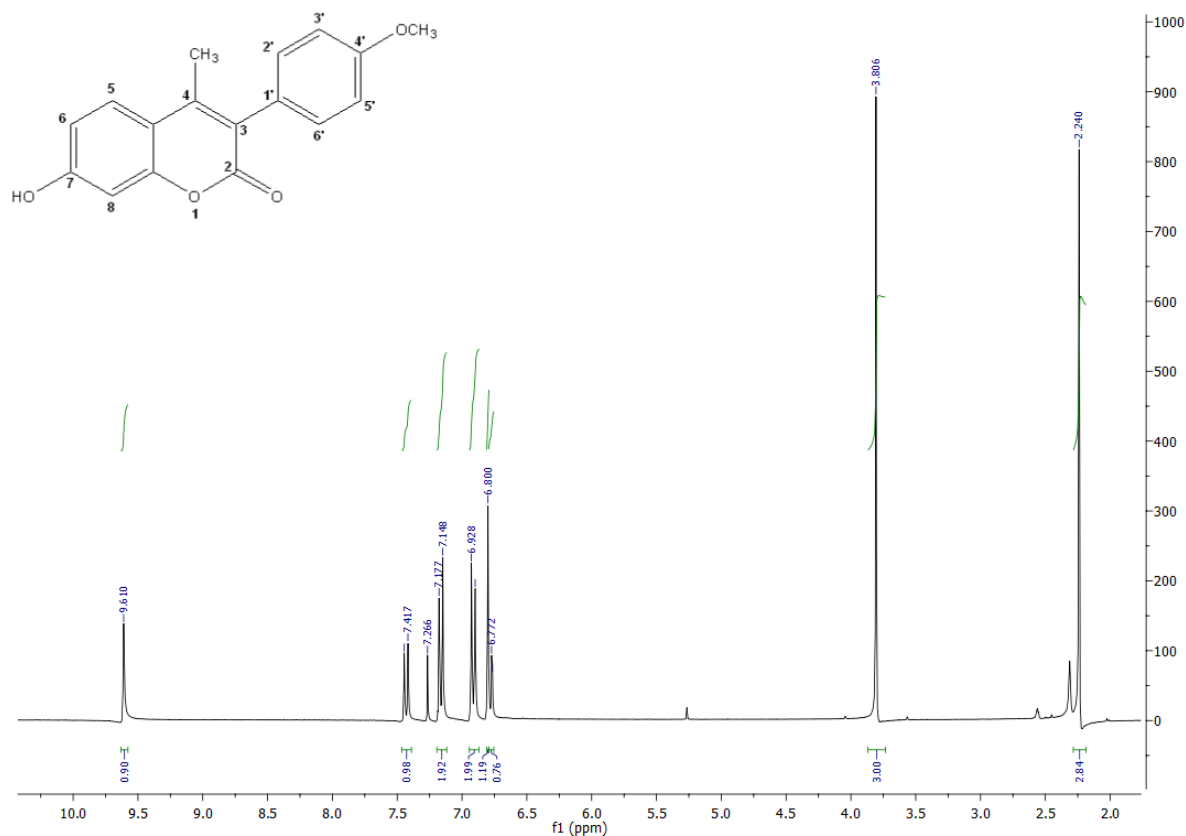


Εικόνα 5: Φάσμα πρωτονίου ^1H NMR (CDCl_3 , 300MHz) της κουμαρίνης **3**

7.2 Φασματοσκοπική μελέτη σειράς Β: Υδροξυλιωμένες-3-αρυλο-κουμαρίνες

Τα φάσματα των 5- και 7- υδροξυ-κουμαρινικών αναλόγων **4-6**, ελήφθησαν σε διαλύτη δευτεριωμένο χλωροφόρμιο (CDCl_3). Στην εικόνα 6, παρουσιάζεται το φάσμα πρωτονίου ^1H NMR (CDCl_3 , 300MHz) της κουμαρίνης **4**. Η τελική δομή των νέων παραγώγων, προσδιορίζεται από τις χαρακτηριστικές απλές κορυφές της μεθυλο-ομάδας (τρία ισοδύναμα πρωτόνια) της θέσης 4- του βενζοπυρανικού δακτυλίου στα 2.24 ppm, της μεθοξυ-ομάδας (τρία ισοδύναμα πρωτόνια) του δακτυλίου της θέσης 3- στα 3.8 ppm και της υδροξυ-ομάδας στην θέση 7- στα 9.61ppm. Τα επτά αρωματικά πρωτόνια αναμένονται στην περιοχή των 6.5-7.5 ppm. Στην ίδια περιοχή εμφανίζεται η κορυφή του διαλύτη στα 7.26 ppm. Στο παράρτημα φασμάτων παρατίθενται τα υπόλοιπα φάσματα των κουμαρινών **5** και **6**.

Φασματοσκοπία μαγνητικού συντονισμού (NMR- Nuclear magnetic resonance)



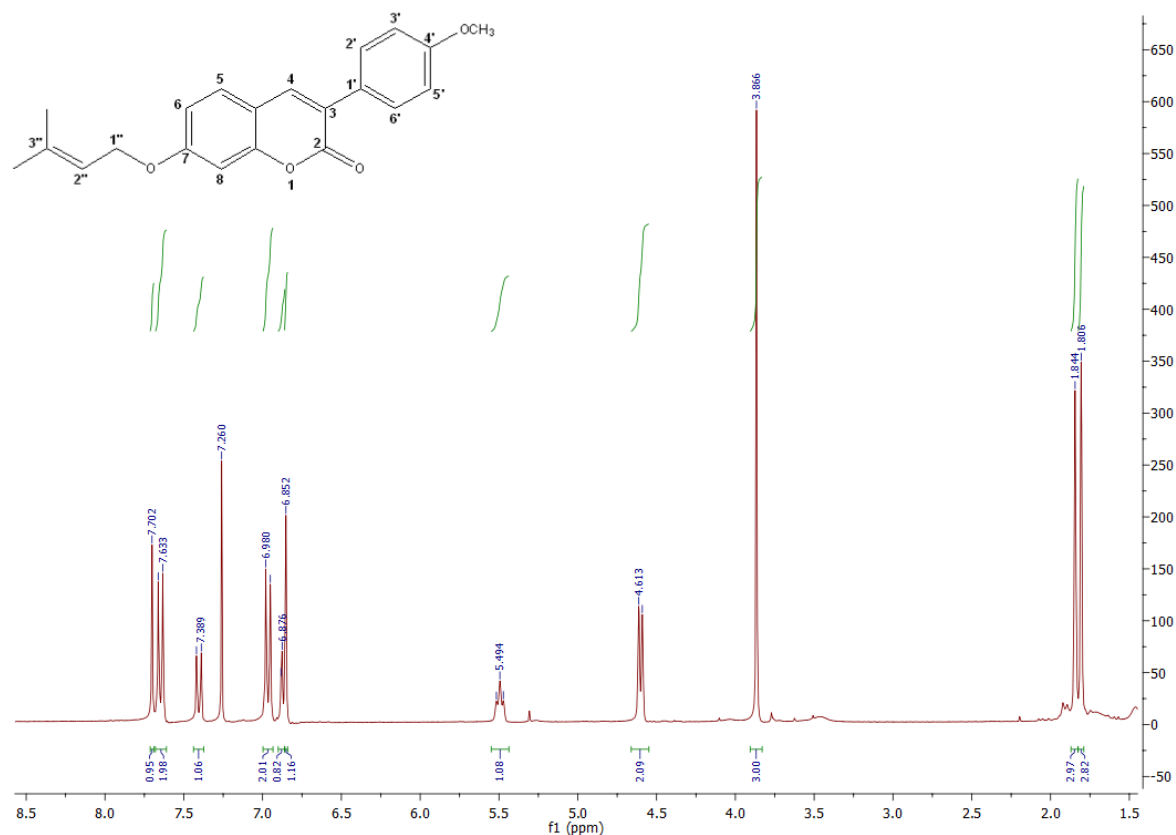
Εικόνα 6: Φάσμα πρωτονίου ¹H NMR (CDCl₃, 300MHz) της κουμαρίνης 4

7.3 Φασματοσκοπική μελέτη σειράς Γ: Πρενυλοξυ-3-αρυλο-κουμαρίνες

Τα φάσματα των 5- και 7- υδροξυ κουμαρινικών αναλόγων **7-9**, ελήφθησαν σε διαλύτη δευτεριωμένο χλωροφόρμιο (CDCl₃). Στην εικόνα 7, παρουσιάζεται το φάσμα πρωτονίου ¹H NMR (CDCl₃, 300MHz) της κουμαρίνης **9**. Η τελική δομή των νέων παραγώγων, προσδιορίζεται από τις χαρακτηριστικές απλές κορυφές της μεθυλο-ομάδας (τρία ισοδύναμα πρωτόνια) της θέσης 4- του βενζοπυρανικού δακτυλίου στα 2,3 ppm για τις κουμαρίνες **7-8**, της μεθοξυ-ομάδας (τρία ισοδύναμα πρωτόνια) του δακτυλίου της θέσης 3-, στα 3.8-3.9 ppm. Τα οχτώ αρωματικά πρωτόνια αναμένονται στην περιοχή των 6.8-7.5 ppm. Στην ίδια περιοχή εμφανίζεται η κορυφή του διαλύτη στα 7.26 ppm. Η παρουσία της πρενυλο-ομάδας σε αυτήν την κατηγορία παραγώγων, πιστοποιείται αρχικά από την παρουσία κορυφών στην περιοχή 1.79-1.82 ppm, που οφείλονται στα προστατευμένα πρωτόνια των ακραίων μεθυλο-ομάδων και ολοκληρώνονται για έξι πρωτόνια. Τα βινυλικά πρωτόνια της πρενυλο-ομάδας στην θέση 2'', απορροφούν σε υψηλές συχνότητες στην περιοχή των 5.45-5.5 ppm, με την εμφάνιση μιας πολλαπλής κορυφής η οποία ολοκληρώνεται για ένα πρωτόνιο. Τα δύο πρωτόνια μεθυλενο-ομάδας (-CH₂) στην θέση 1'' όπως φαίνεται στην εικόνα 7, συντονίζονται σε χαμηλότερα πεδία

Φασματοσκοπία μαγνητικού συντονισμού (NMR- Nuclear magnetic resonance)

εμφανίζοντας μια διπλή κορυφή στην περιοχή των 4.58-4.61 ppm. Στο παράρτημα φασμάτων παρατίθενται τα υπόλοιπα φάσματα της κουμαρίνης **7** και **8**.



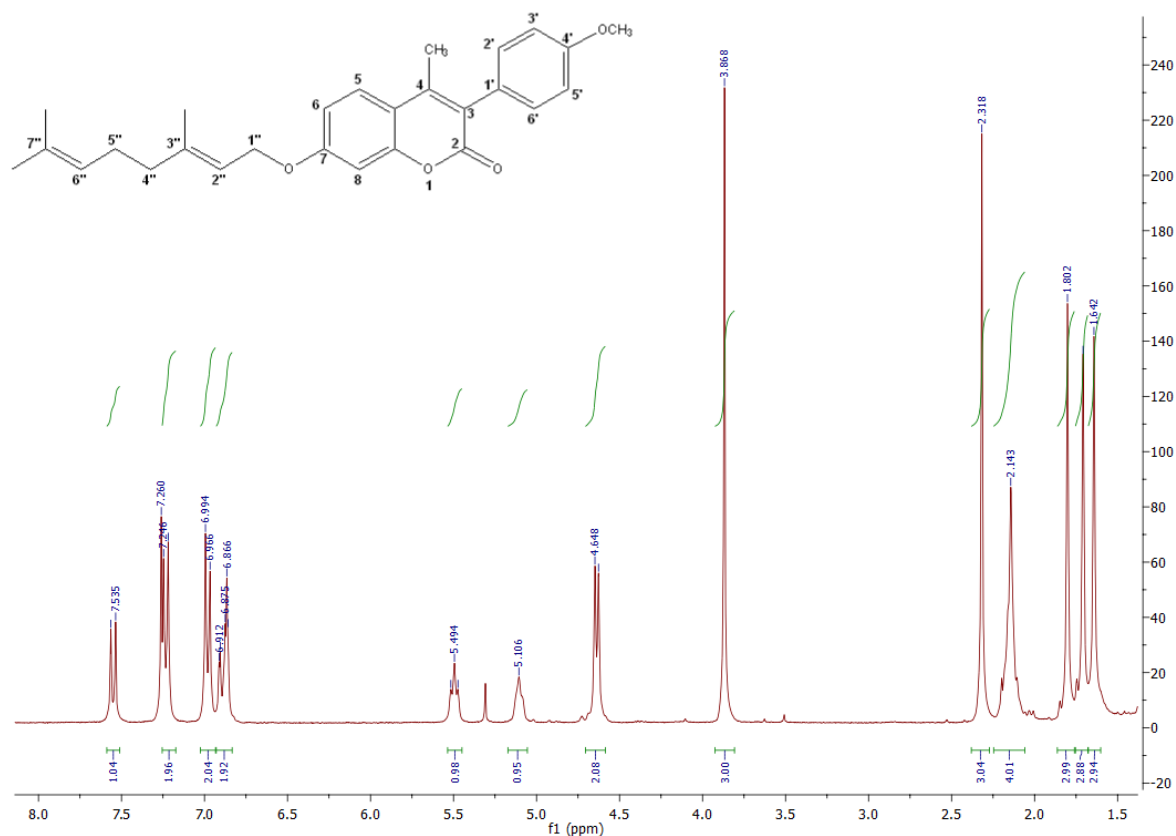
Εικόνα 7: Φάσμα πρωτονίου ^1H NMR (CDCl_3 , 300MHz) της κουμαρίνης **9**

7.4 Φασματοσκοπική μελέτη σειράς Δ: Γερανυλοξυ-3-αρυλο-κουμαρίνες

Τα φάσματα των 5- και 7- γερανυλοξυ-κουμαρινικών αναλόγων **10-12**, ελήφθησαν σε διαλύτη δευτεριωμένο χλωροφόρμιο (CDCl_3). Στην εικόνα 8, παρουσιάζεται το φάσμα πρωτονίου ^1H NMR (CDCl_3 , 300MHz) της κουμαρίνης **10**. Η τελική δομή των νέων παραγώγων, προσδιορίζεται από τις χαρακτηριστικές απλές κορυφές της μεθυλο-ομάδας (τρία ισοδύναμα πρωτόνια) της θέσης 4- του βενζοπυρανικού δακτυλίου στα 2.3-2.5 ppm για τις κουμαρίνες **10-11**, της μεθοξυ-ομάδας (τρία ισοδύναμα πρωτόνια) του δακτυλίου της θέσης 3-, στα 3.8-3.9 ppm. Τα επτά αρωματικά πρωτόνια αναμένονται στην περιοχή των 6.7-7.7 ppm. Στην ίδια περιοχή εμφανίζεται η κορυφή του διαλύτη στα 7.26 ppm. Η παρουσία της γερανυλο-ομάδας σε αυτήν την κατηγορία παραγώγων, πιστοποιείται αρχικά από την παρουσία κορυφών στην περιοχή 1.6-2.15 ppm, που οφείλονται στα προστατευμένα πρωτόνια των ακραίων μεθυλο-ομάδων και ολοκληρώνονται για δεκατρία πρωτόνια. Τα βινυλικά πρωτόνια της γερανυλο-ομάδας στις θέσεις 2'' και 6'', απορροφούν σε υψηλές συχνότητες στην

Φασματοσκοπία μαγνητικού συντονισμού (NMR- Nuclear magnetic resonance)

περιοχή των 5-5.52 ppm, με την εμφάνιση πολλαπλών κορυφών οι οποίες ολοκληρώνονται για δύο πρωτόνια. Τα δύο πρωτόνια μεθυλενο-ομάδας (-CH₂) στην θέση 1'' όπως φαίνεται στην εικόνα 8, συντονίζονται σε χαμηλότερα πεδία εμφανίζοντας μια διπλή κορυφή στην περιοχή των 4.62-4.65 ppm. Στο παράρτημα φασμάτων παρατίθενται τα υπόλοιπα φάσματα της κουμαρίνης **11** και **12**.



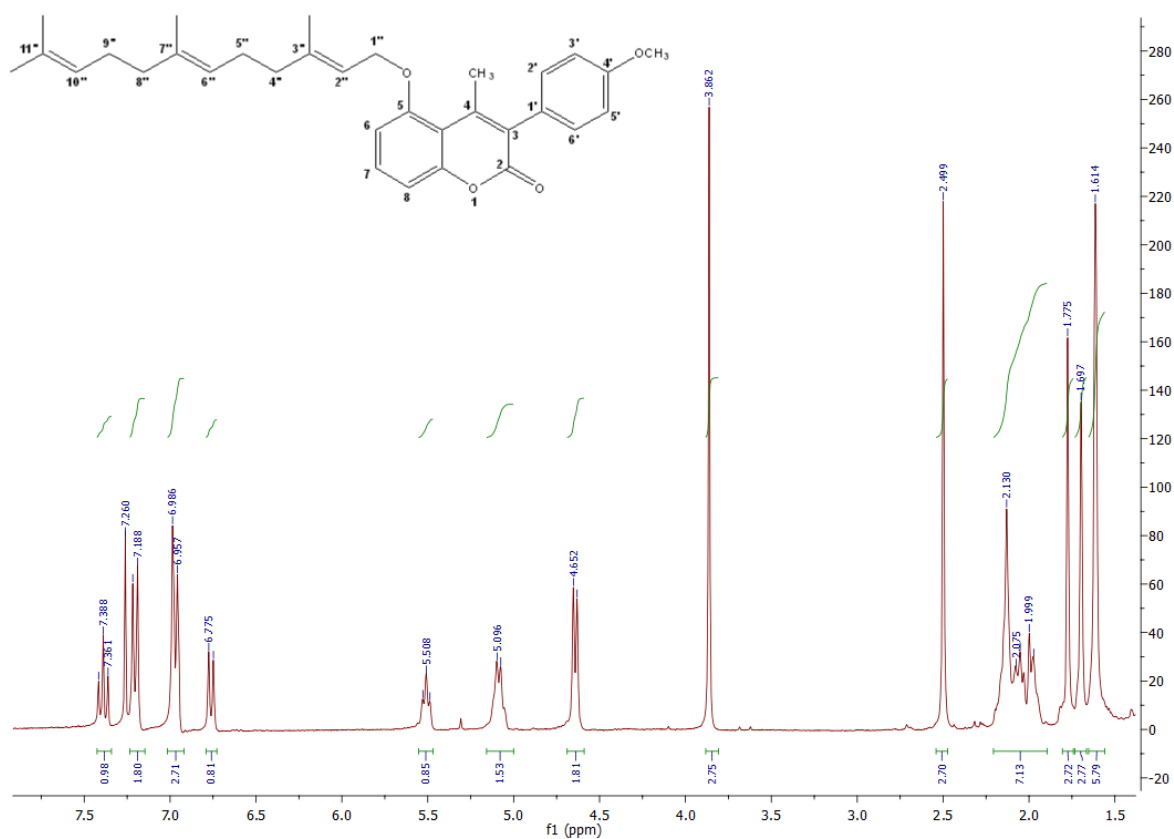
Εικόνα 8: Φάσμα πρωτονίου ¹H NMR (CDCl₃, 300MHz) της κουμαρίνης **10**

7.5 Φασματοσκοπική μελέτη σειράς Ε: Φαρνεζυλοξυ-3-αρυλο-κουμαρίνες

Τα φάσματα των 5- και 7- φαρνεζυλοξυ-κουμαρινικών αναλόγων **13-15**, ελήφθησαν σε διαλύτη δευτεριωμένο χλωροφόρμιο (CDCl₃). Στην εικόνα 9 παρουσιάζεται το φάσμα πρωτονίου ¹H NMR (CDCl₃, 300MHz) της κουμαρίνης **14**. Η τελική δομή των νέων παραγώγων, προσδιορίζεται από τις χαρακτηριστικές απλές κορυφές της μεθυλο-ομάδας (τρία ισοδύναμα πρωτόνια) της θέσης 4- του βενζοπυρανικού δακτυλίου στα 2.3-2.5 ppm για τις κουμαρίνες **10-11**, της μεθοξυ-ομάδας (τρία ισοδύναμα πρωτόνια) του δακτυλίου της θέσης 3-, στα 3.8-3.9 ppm. Τα επτά αρωματικά πρωτόνια αναμένονται στην περιοχή των 6.7-7.7 ppm. Στην ίδια περιοχή εμφανίζεται η κορυφή του διαλύτη στα 7.26 ppm. Η παρουσία της φαρνεζυλο-ομάδας σε αυτήν την κατηγορία παραγώγων,

Φασματοσκοπία μαγνητικού συντονισμού (NMR- Nuclear magnetic resonance)

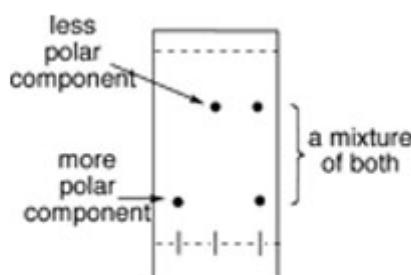
πιστοποιείται αρχικά από την παρουσία κορυφών στην περιοχή 1.6-2.15 ppm, που οφείλονται στα προστατευμένα πρωτόνια των ακραίων μεθυλο- ομάδων και ολοκληρώνονται για είκοσι πρωτόνια. Τα βινυλικά πρωτόνια της γερανυλο-ομάδας στις θέσεις 2'', 6'' και 10'', απορροφούν σε υψηλές συχνότητες στην περιοχή των 5.05-5.52 ppm, με την εμφάνιση πολλαπλών κορυφών οι οποίες ολοκληρώνονται για τρία πρωτόνια. Τα δύο πρωτόνια μεθυλενο-ομάδας (-CH₂) στην θέση 1'' όπως φαίνεται στην εικόνα 9, συντονίζονται σε χαμηλότερα πεδία εμφανίζοντας μια διπλή κορυφή στην περιοχή των 4.62-4.65 ppm. Στο παράρτημα φασμάτων παρατίθενται τα υπόλοιπα φάσματα της κουμαρίνης **13** και **15**.



Εικόνα 9: Φάσμα πρωτονίου ¹H NMR (CDCl₃, 300MHz) της κουμαρίνης **14**

8. Χρωματογραφία Λεπτής Στοιβάδας (Thin Layer Chromatography-TLC) και Στήλη χρωματογραφίας (Flash column chromatography)

Η χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας, είναι η μέθοδος με την οποία, αναλύονται μίγματα ενώσεων με διαχωρισμό σύμφωνα με την πολικότητα τους. Η μέθοδος αυτή χρησιμοποιείται για να διαπιστωθεί ο αριθμός των ενώσεων σε ένα μίγμα, να ταυτοποιηθούν και να απομονωθούν. Μια επίσης σημαντική εφαρμογή της μεθόδου αυτής, είναι η παρακολούθηση της πορείας της αντίδρασης, παρατηρώντας την παρουσία ή απουσία αντιδρώντων και προϊόντων (120).



Εικόνα 10: Χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας

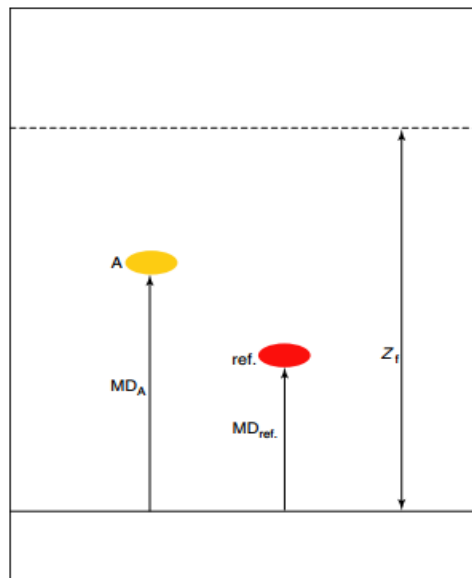
Η χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας, αποτελείται από τρία βασικά βήματα. Το πρώτο είναι η μεταφορά ουσίας στην πλάκα, μέσω τριχοειδών σωλήνων στο κάτω μέρος της πλάκας. Η πλάκα συχνά αναφέρεται ως ακίνητη φάση (stationery phase) και οι πλάκες σίλικας (silica gel) είναι πλέον πιο ευρέως χρησιμοποιούμενες. Η ανάπτυξη είναι το επόμενο στάδιο και αναφέρεται στην τοποθέτηση της πλάκας σε ένα γυάλινο δοχείο με μια ρηχή επιφάνεια από το σύστημα διαλυτών. Καθώς το σύστημα διαλυτών απορροφάται κατά μήκος της πλάκας συμπαρασέρνει την αρχική κηλίδα. Η πολική σίλικα (silica gel), προσπαθεί να κρατήσει την κηλίδα στο αρχικό της σημείο ενώ οι διαλύτες να την μετακινήσουν. Το αποτέλεσμα επομένως εξαρτάται, από τρεις πολικότητες – της σίλικας, των διαλυτών και των ενώσεων. Ο διαλύτης ή το σύστημα διαλυτών επιλέγεται έτσι ώστε ανάλογα με την πολικότητα των προς εξέταση ενώσεων και των διαλυτών να επιτυγχάνεται ευδιάκριτος διαχωρισμός. Συστατικά με διαφορετική πολικότητα, καλύπτουν διαφορετική απόσταση στην πλάκα σε σχέση με το αρχικό σημείο. Τελευταίο στάδιο είναι η απεικόνιση των διαχωρισμένων ενώσεων. Επειδή συχνά οι ενώσεις αυτές είναι άχρωμες, χρησιμοποιείται UV-light. Ωστόσο κάποιες ενώσεις μπορεί να μην φαίνονται ακόμα από το UV-light, και συχνά η πλάκα χρωματίζεται από

Χρωματογραφία Λεπτής Στοιβάδας (Thin Layer Chromatography-TLC) και Στήλη χρωματογραφίας (Flash column chromatography)

κάποια χρωστική ένωση. Γενικό παράδειγμα τέτοιων ενώσεων είναι το φωσφομολυβδικό οξύ (Phosphomolybdic acid (PMA)), που με θέρμανσή δίνει πράσινα ή μαύρα σημεία ενώ η υπόλοιπη πλάκα χρωματίζεται με ανοιχτό πράσινο (120).

Στην χρωματογραφία στήλης, το σύστημα έχει σταθερό μήκος. Κάθε στοιχείο του δείγματος χαρακτηρίζεται από τον χρόνο κατακράτησης (t_R) που χρειάζεται για να περάσει μέσω της στήλης και να φτάσει στην έξοδο. Αυτή η παρατήρηση μπορεί να συσχετισθεί με την χρωματογραφία λεπτής στιβάδας (TLC), και συγκεκριμένα με τον χρόνο ανάπτυξης, που απαιτείται για να μεταναστεύσουν τα συστατικά του δείγματος, δημιουργούνται αποστάσεις (MD-migration distance) από την αρχική κηλίδα (spot). Μια ένωση με μεγάλη MD έχει πιο σύντομη παραμονή στην στήλη, σε σχέση με ένα συστατικό με μικρότερη απόσταση. Έτσι εισάγεται ο παράγοντας συγκράτησης, R_f , που δίνεται από τη σχέση (III): (121)

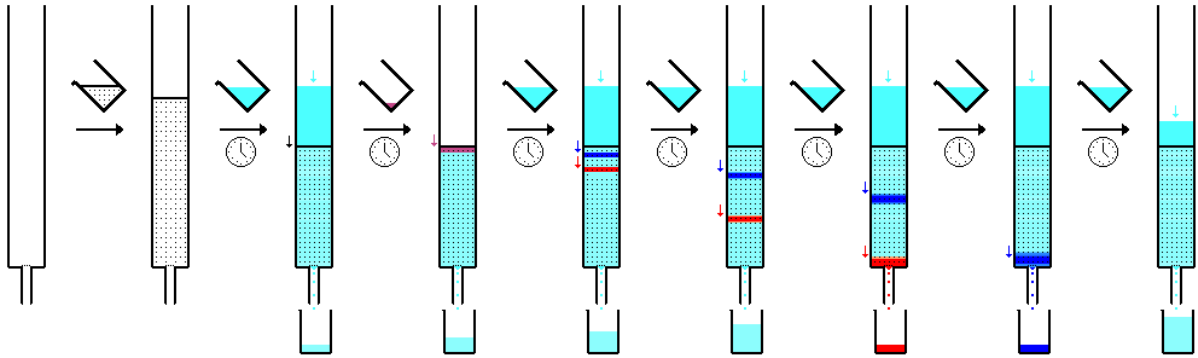
$$R_f = \frac{MD}{z_i} \quad (III)$$



Εικόνα 11: Migration distance στην πλάκα TLC

Ένα αποτελεσματικό σύστημα διαλυτών ή διαλύτης συνήθως χαρακτηρίζεται από τιμές του R_f με εύρος 0,3-0,7. Η τεχνική αυτή, είναι ευρέως χρησιμοποιούμενη σε εργαστηριακές μονάδες για απομόνωση των επιθυμητών συστατικών (121). Η επιλογή διαμέτρου στήλης σε σχέση με το προς την ποσότητα του μίγματος συστατικών, η ποσότητας της síλικας, το σύστημα διαλυτών, καθώς και η φόρτωση της στήλης είναι παράμετροι που επηρεάζουν την επιτυχία της.

Χρωματογραφία Λεπτής Στοιβάδας (Thin Layer Chromatography-TLC) και Στήλη χρωματογραφίας (Flash column chromatography)



Εικόνα 12: Πορεία διαχωρισμού στην στήλη χρωματογραφίας

ΜΕΡΟΣ Γ: Πειραματικό μέρος

9. Όργανα, συσκευές, διαλύτες και αντιδραστήρια

Τα φάσματα πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού, NMR ^1H , έχουν καταγραφεί με τα όργανα Varian Gemini 300MHz. Ως διαλύτες χρησιμοποιήθηκε δευτεριωμένο χλωροφόρμιο (CDCl_3). και ως ένωση αναφοράς το τετραμεθυλοσιλάνιο (TMS).

Οι τιμές των χημικών μετατοπίσεων, δίνονται σε ppm ως προς τη συχνότητα συντονισμού του τετραμεθυλοσιλάνιου (TMS). 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). Οι σταθερές συζεύξεως J δίνονται σε Hz.

Ο προσδιορισμός των σημείων τήξης (Σ.Τ.) έγινε σε ανοικτούς τριχοδιαμετρικούς σωλήνες σε μια συσκευή Gallenkamp και οι τιμές τους δεν έχουν διορθωθεί.

Η χρωματογραφία στήλης ταχείας ανάπτυξης (Flash Column Chromatography, FCC) έλαβε χώρα σε γέλη πυριτίου (Silica gel) 60 (40-63 micras) της εταιρίας Merck. Τα συστήματα έκλουσης για τον καθαρισμό των ενδιάμεσων και τελικών προϊόντων είναι ίδια με αυτά που δίνονται για τον παράγοντα συγκράτησης (R_f). Ο έλεγχος της καθαρότητας των ενώσεων και η παρακολούθηση της πορείας των αντιδράσεων έγινε με χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας (TLC) σε πλάκες αλουμινίου, επιστρωμένες με Silica gel F254 της εταιρίας Merck. Οι κηλίδες των χρωματογραφημάτων TLC εμφανίστηκαν με λάμπα υπεριώδους (UV) ακτινοβολίας στα 254 nm και με εμποτισμό σε διάλυμα φωσφομολυβδαινικού οξέος (PMA) σε αναλογία (αιθανολικό διάλυμα PMA 7% /EtOH 1:2).

Οι αντιδράσεις που περιλάμβαναν άνυδρους διαλύτες ή ουσίες ευαίσθητες στην ατμόσφαιρα έλαβαν χώρα κάτω από ατμόσφαιρα αδρανούς αερίου - αζώτου (N_2).

Οι συμπυκνώσεις των οργανικών διαλυμάτων έλαβαν χώρα σε θερμοκρασίες 30-40°C, υπό ελαττωμένη πίεση σε συσκευή ταχείας απόσταξης Büchi Rotavapor R-210.

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

10. Συνθετική πορεία νέων κουμαρινικών αναλόγων

10.1 Μέθοδος σύνθεσης 7- και 5-ακετυλοξυ-3-αρυλο κουμαρινών (στάδιο 1)

Σε σφαιρική φιάλη, μεταφέρεται 1eq 4-μεθοξυ-φαινυλοξικού οξέος, 1,05eq της κατάλληλα υποκατεστημένης ακετοφαινόνης ή σαλικυλαλδεΐδης και 3eq τριαιθυλαμίνης (Et_3N), πυκνότητας 0,725g/ml. Προστίθεται επίσης, κατάλληλη ποσότητα οξικού ανυδρίτη, $[(\text{CH}_3\text{CO})_2\text{O}]$.

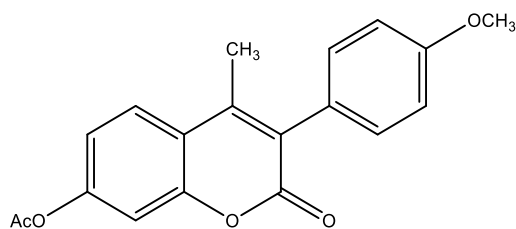
Η αντίδραση πραγματοποιείται, σε θερμοκρασία 130°C για 3-4 ώρες παρουσία κάθετου ψυκτήρα. Σε τακτικά χρονικά διάστημα γίνεται έλεγχος της πορείας της αντίδρασης μέσω της μεθόδου χρωματογραφίας λεπτής στοιβάδας (TLC).

Με το πέρας της αντίδρασης, εφόσον το σύστημα της αντίδρασης έχει επέλθει σε θερμοκρασία περιβάλλοντος, γίνεται προσθήκη νερού, ποσότητας διπλάσιας της ποσότητας του οξικού ανυδρίτη στο σύστημα. Ακολουθεί εκχύλιση με διαλύτη διχλωρομεθάνιο (DCM), έτσι ώστε να περισυλλέγει η οργανική φάση. Προστίθεται ξηραντικό μέσο (θειικό νάτριο Na_2SO_4) και ακολουθεί διήθηση. Το διήθημα εξατμίζεται υπό ελαττωμένη πίεση όπου προκύπτει ελαιώδες προϊόν.

Στο υγρό υπόλειμμα, προστίθεται διαιθυλ-αιθέρας και υπό ψύξη, παρατηρείται καταβύθιση ανοιχτόχρωμου στερεού εντός μιας ώρας. Ακολουθεί διήθηση υπό κενό, όπου το τελικό προϊόν απομονώνεται και ξηραίνεται.

Η ταυτοποίηση των ενώσεων γίνεται μέσω φασματοσκοπίας μαγνητικού συντονισμού (NMR). Όλα τα προϊόντα που ελήφθησαν με αυτή τη συνθετική μέθοδο δεν χρειάστηκαν περαιτέρω διεργασίες καθαρισμού.

7-ακετυλοξυ-3-(4-μεθοξυ-φαινυλο)-4-μεθυλο-2H-χρωμεν-2-όνη (1)



Σύμφωνα με την γενική μέθοδο σύνθεσης 5- και 7-ακετυλοξυ-κουμαρινών σε 6.67 ml οξικού ανυδρίτη και 0.01862mol (1.887g-2.6ml) τριαιθυλαμίνης, προστίθενται 0,006mol (1g) 4-μεθοξυ-φαινυλοξικού οξέος και 0.0063mol (0.961g) 2,4-διυδροξυ-ακετοφαινόνης.

Απόδοση: 33.92%

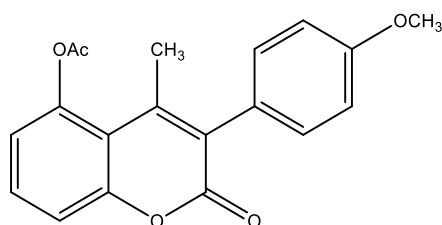
Χρώμα: Ανοιχτό κίτρινο

Σημείο τήξης: 204°C

Σημείο τήξης βιβλιογραφίας: 153-154 °C (122)

¹H NMR: (300MHz, CDCl₃) δ 7.67(d, J=8.4Hz, 1H, C5), 7.23(d, J=8.7Hz, 2H, C2', C6'), 7.14(d, J=2.1Hz, 1H, C8), 7.09(dd, J=8.4, 2.1Hz, 1H, C6), 6.99(d, J=8.7Hz, 2H, C3', C5'), 3.87(s, 3H, C4'-OCH₃), 2.38(s, 3H, C4-CH₃), 2.35(s, 3H, 7C-OAc)

5-ακετυλοξυ-3-(4-μεθοξυ-φαινυλο)-4-μεθυλο-2H-χρωμεν-2-όνη (2)



Σύμφωνα με την γενική μέθοδο σύνθεσης 5- και 7-ακετυλοξυ-κουμαρινών σε 5.33 ml οξικού ανυδρίτη και 0.0149mol (1.509g-2.08ml) τριαιθυλαμίνης, προστίθενται 0,0048mol (0.8g) 4-μεθοξυ-φαινυλοξικού οξέος και 0.00505mol (0.769g) 2,4-διυδροξυ-ακετοφαινόνης.

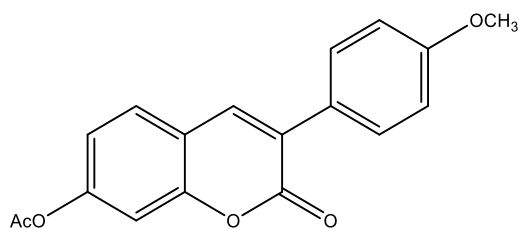
Απόδοση: 20.76%

Χρώμα: Λευκό

Σημείο τήξης: 158-159°C

¹H NMR: (300MHz, CDCl₃) δ 7.49(t, J=8.7Hz, 1H, C7), 7.3(s, 1H, C8), 7.20(d, J=8.1Hz, 2H, C2', C6'), 6.99(br, 3H, C3', C5', C6), 3.87(s, 3H, C4'-OCH₃), 2.38(s, 6H, C4-CH₃, C5-OAc)

7-ακετυλοξυ-3-(4-μεθοξυ-φαινυλο)-2H-χρωμεν-2-όνη (3)



Σύμφωνα με την γενική μέθοδο σύνθεσης 5- και 7-ακετυλόξυ-κουμαρινών σε 5.33 ml οξικού ανυδρίτη και 0.0149mol (1.509g-2.08ml) τριαιθυλαμίνης, προστίθενται 0,0048mol (0.8g) 4-μεθοξυ-φαινυλοξικού οξέος και 0.00504mol (0.665g) 2,4-διωδροξυ-βενζαλδεΐδης.

Απόδοση: 23.54%

Χρώμα: Λευκό

Σημείο τήξης: 178-179 °C

Σημείο τήξης βιβλιογραφίας: 168-170 °C (123)

¹H NMR: (300MHz, CDCl₃) δ 7.73(s, 1H, C4), 7.65(d, J=8.4Hz, 2H, C2', C6'), 7.52(d, J=8.4Hz, 1H, C5), 7.13(s, 1H, C8), 7.06(d, J=8.4Hz, 1H, C6), 6.97(d, J=8.4Hz, 2H, C3', C5'), 3.86 (s, 3H, C4'-OCH₃), 2.36(s, 3H, C7-OAc)

10.2 Μέθοδος απακετευλίωσης κουμαρινών (στάδιο 2)

Ποσότητα από το στερεό, που πρόκειται να απακετυλιωθεί, 1eq, αντιδρά με 5eq μονό-ένυδρης υδραζίνης, (NH₂NH₂ H₂O), πυκνότητας 1,05g/ml, παρουσία διαλύτη μεθανόλης (MeOH).

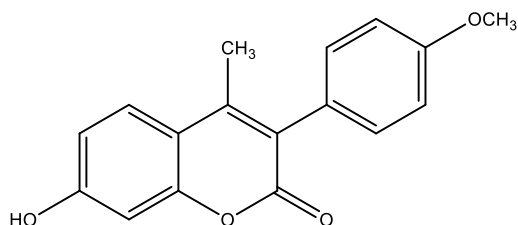
Η αντίδραση πραγματοποιείται, σε θερμοκρασία περιβάλλοντος για 2-2,5 ώρες. Σε τακτικά χρονικά διάστημα γίνεται έλεγχος της πορείας της αντίδρασης μέσω της μεθόδου χρωματογραφίας λεπτής στοιβάδας (TLC).

Με το πέρας της αντίδρασης, πραγματοποιείται εκχύλιση με διαλύτη διχλωρομεθάνιο (DCM), έτσι ώστε να περισυλλέγει η οργανική φάση. Προστίθεται ξηραντικό μέσο (θειικό νάτριο Na₂SO₄) και ακολουθεί διήθηση. Το διήθημα εξατμίζεται υπό ελαττωμένη πίεση όπου προκύπτει κιτρινωπό υγρό.

Στο υγρό υπόλειμμα, προστίθεται διαιθυλ-αιθέρας και υπό ψύξη, παρατηρείται καταβύθιση ανοιχτόχρωμου στερεού εντός μιας ώρας. Ακολουθεί διήθηση υπό κενό, όπου και το τελικό προϊόν απομονώνεται και ξηραίνεται.

Η ταυτοποίηση των ενώσεων γίνεται μέσω φασματοσκοπίας μαγνητικού συντονισμού (NMR). Όλα τα προϊόντα που ελήφθησαν με αυτή τη συνθετική μέθοδο δεν χρειάστηκαν περαιτέρω διεργασίες καθαρισμού.

7-υδροξυ-3-(4-μεθοξυ-φαινυλο)-4-μεθυλο-2H-χρωμεν-2-όνη (4)



Σύμφωνα με την γενική μέθοδο σύνθεσης 5- και 7-υδροξυ-κουμαρινών σε 23,6ml μεθανόλης και 0.00909mol (0.46g- 0.45ml) μονο-ένυδρης υδραζίνης, προστίθενται 0,0018mol (0.59g) 7-ακετυλοξυ-3-(4-μεθοξυ-φαινυλο)-4-μεθυλο-2H-χρωμεν-2-όνη (1).

Απόδοση: 63.81%

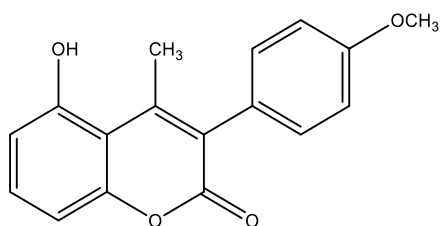
Χρώμα: Λευκό

Σημείο τήξης: 235 °C

Σημείο τήξης βιβλιογραφίας: 234-235 °C (122)

$^1\text{H NMR}$: (300MHz, CDCl_3) δ 9.61(s, 1H, C7-OH), 7.43(d, $J=8.7\text{Hz}$, 1H, C5), 7.16(d, $J=8.7\text{Hz}$, 2H, C2', C6'), 6.91(d, $J=8.7\text{Hz}$, 2H, C3', C5'), 6.80(s, 1H, C8), 6.77(d, $J=2.4\text{Hz}$, 1H, C6), 3.81(s, 3H, C4'-OCH₃), 2.24(s, 3H, C4-CH₃)

5-υδροξυ-3-(4-μεθοξυ-φαινυλο)-4-μεθυλο-2H-χρωμεν-2-όνη (5)



Σύμφωνα με την γενική μέθοδο σύνθεσης 5- και 7-υδροξυ-κουμαρινών σε 12ml μεθανόλης και 0.00909mol 0.0046mol (0.23g- 0.22ml) μονο-ένυδρης υδραζίνης, προστίθενται 0,0018mol (0.59g) 0,0009mol (0.3g) 5-ακετυλοξυ-3-(4-μεθοξυ-φαινυλο)-4-μεθυλο-2H-χρωμεν-2-όνη (2).

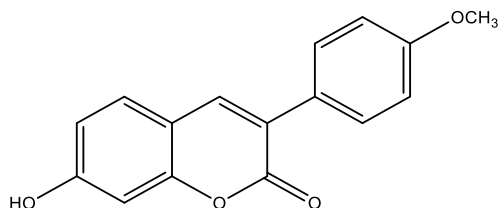
Απόδοση: 50.61%

Χρώμα: Ανοιχτό κίτρινο

Σημείο τήξης: 235 °C

$^1\text{H NMR}$: (300MHz, CDCl_3) δ 7.30(d, $J=7.5\text{Hz}$, 1H, C7), 7.21(d, $J=8.7\text{Hz}$, 2H, C2', C6'), 6.97(d, $J=8.7\text{Hz}$, 2H, C3', C5'), 6.93(d, $J=8.1\text{Hz}$, 1H, C8), 6.63(d, $J=8.1\text{Hz}$, 1H, C6), 3.86(s, 3H, C4'-OCH₃), 2.53(s, 3H, C4-CH₃)

7-υδροξυ-3-(4-μεθοξυ-φαινυλο)-2H-χρωμεν-2-όνη (6)



Σύμφωνα με την γενική μέθοδο σύνθεσης 5- και 7-υδροξυ-κουμαρινών σε 12ml μεθανόλης και 0.00909mol 0.0046mol (0.23g- 0.22ml) μονο-ένυδρης υδραζίνης, προστίθενται 0,0009mol (0.3g) 7-ακετυλοξυ-3-(4-μεθοξυ-φαινυλο)-2H-χρωμεν-2-όνη (3).

Απόδοση: 77.30%

Χρώμα: Κίτρινο

Σημείο τήξης: 235-236 °C

Σημείο τήξης βιβλιογραφίας: 228 °C (123)

$^1\text{H NMR}$: (300MHz, DMSO) δ 7.73(s, 1H, C4), 7.64(d, J=8.7Hz, 2H, C2', C6'), 7.56(d, J=8.4Hz, 1H, C5), 6.99(d, J=8.7Hz, 2H, C3', C5'), 6.80(dd, J=8.4, 1.8Hz, 1H, C6), 6.74(s, 1H, C8), 3.80(s, 3H, C4'-OCH₃)

10.3 Σύνθεση πρενυλοξυ-κουμαρινών (στάδιο 3)

Σε σφαιρική φιάλη, μεταφέρεται ποσότητα απακετυλιωμένης κουμαρίνης, πρενυλο-βρωμιδίου (1-βρωμο-3-μεθυλο-2-βουτένιο: πυκνότητα 1,281g/ml, γερανυλο-βρωμίδιο: πυκνότητα 1,094g/ml, trans-trans-φαρνεζυλο-βρωμίδιο: πυκνότητα 1,052g/ml), διαλύτη ακετόνη (CH₃COCH₃) και ανθρακικού καλίου (K₂CO₃), σε κατάλληλη αναλογία.

Η αντίδραση πραγματοποιείται, σε θερμοκρασία 80°C για 5-6 ώρες παρουσία κάθετου ψυκτήρα. Σε τακτικά χρονικά διάστημα γίνεται έλεγχος της πορείας της αντίδρασης μέσω της μεθόδου χρωματογραφίας λεπτής στοιβάδας (TLC).

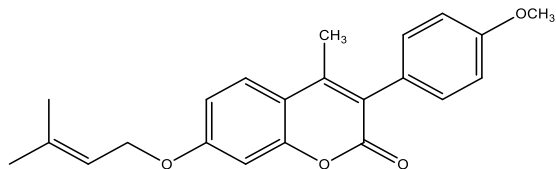
Με το πέρας της αντίδρασης, εφόσον στο σύστημα της αντίδρασης έχει επέλθει θερμοκρασία περιβάλλοντος, γίνεται διήθησή υπό κενό για την απομάκρυνση του ανθρακικού καλίου από το μίγμα με έκπλυση χρησιμοποιώντας διαλύτη ακετόνη. Ακολουθεί εξάτμιση του διηθήματος υπό ελαττωμένη πίεση όπου προκύπτει ανοιχτόχρωμο στερεό. Κατόπιν το λαμβανόμενο στερεό ξηραίνεται.

Η ταυτοποίηση των ενώσεων γίνεται μέσω φασματοσκοπίας μαγνητικού συντονισμού (NMR). Όλα τα προϊόντα που ελήφθησαν με αυτή τη συνθετική μέθοδο χρειάστηκαν περαιτέρω καθαρισμό πλην

Συνθετική πορεία νέων κουμαρινικών αναλόγων

των κουμαρινών **7** και **9**. Το προϊόν λαμβάνεται, ύστερα από διαχωρισμό με χρωματογραφία στήλης σε σύστημα διαλυτών πετρελαϊκού αιθέρα/ οξικού αιθυλεστέρα (PE/EtOAc) σε αναλογία 95:5, υπό τη μορφή στερεού.

7-πρενυλοξυ-3-(4-μεθοξυ-φαινυλο)-4-μεθυλο-2H-χρωμεν-2-όνη (**7**)



Σύμφωνα με την γενική μέθοδο σύνθεσης 5- και 7-πρενυλοξυ- κουμαρινών σε 7.44ml ακετόνης, προστίθενται 0.5mmol (150mg) 7-υδροξυ-3-(4-μεθοξυ-φαινυλο)-4-μεθυλο-2H-χρωμεν-2-όνη (**4**), 0.64mmol (95mg) 1-βρωμο-3-μεθυλο-2-βουτένιο και 0.07g ανθρακικού καλίου.

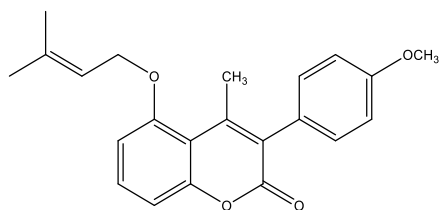
Απόδοση: 66.23%

Χρώμα: Καφέ

Σημείο τήξης: 113-114 °C

¹H NMR: (300MHz, CDCl₃) δ 7.53(d, J=8.7Hz, 1H, C5), 7.20(d, J=8.7Hz, 2H, C2', C6'), 6.95(d, J=8.7Hz, 2H, C3', C5'), 6.86(d, J=8.7Hz, 1H, C6), 6.84(s, 1H, C8), 5.47(t, J=6.7Hz, 1, C2''), 4.58(d, J=6.9Hz, 2H, C1''), 3.84(s, 3H, C4'-OCH₃), 2.29(s, 3H, C4-CH₃), 1.82(s, 3H, C3''-CH₃), 1.77(s, 3H, C3''-CH₃)

5-πρενυλοξυ-3-(4-μεθοξυ-φαινυλο)-4-μεθυλο-2H-χρωμεν-2-όνη (**8**)



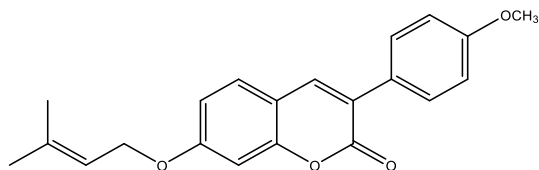
Σύμφωνα με την γενική μέθοδο σύνθεσης 5- και 7-πρενυλοξυ- κουμαρινών σε 2ml ακετόνης, προστίθενται 0.146mmol (40mg) 5-υδροξυ-3-(4-μεθοξυ-φαινυλο)-4-μεθυλο-2H-χρωμεν-2-όνη (**5**), 0.17mmol (25.3mg) 1-βρωμο-3-μεθυλο-2-βουτένιο και 19.57g ανθρακικού καλίου.

Απόδοση: 75%

Χρώμα: Λευκό

Σημείο τήξης: 106-107 °C

7-πρενυλοξυ-3-(4-μεθοξυ-φαινυλο)-2H-χρωμεν-2-όνη (9)



Σύμφωνα με την γενική μέθοδο σύνθεσης 5- και 7-πρενυλοξυ-κουμαρινών σε 2ml ακετόνης, προστίθενται, 0.18mmol (50mg) 7-υδροξυ-3-(4-μεθοξυ-φαινυλο)-2H-χρωμεν-2-όνη (6), 0.22mmol (33.26mg) 1-βρωμο-3-μεθυλο-2-βουτένιο και 26mg ανθρακικού καλίου.

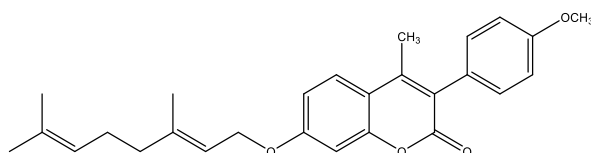
Απόδοση: 63.09%

Χρώμα: Λευκό

Σημείο τήξης: 146-147 °C

¹H NMR: (300MHz, CDCl₃) δ 7.70(s, 1H, C4), 7.65(d, J=8.7Hz, 2H, C2', C6'), 7.46(d, J=9Hz, 1H, C5), 6.97(d, J=8.7Hz, 2H, C3', C5'), 6.88(d, J=2.4Hz, 1H, C6), 6.85(s, 1H, C8), 5.49(t, J=6.6Hz, 1H, C2''), 4.60(d, J=6.9Hz, 2H, C1''), 3.87(s, 3H, C4'-OCH₃), 1.84(s, 3H, C3''-CH₃), 1.81(s, 3H, C3''-CH₃)

7-γερανυλοξυ-3-(4-μεθοξυ-φαινυλο)-4-μεθυλο-2H-χρωμεν-2-όνη (10)



Σύμφωνα με την γενική μέθοδο σύνθεσης 5- και 7-πρενυλοξυ-κουμαρινών σε 7ml ακετόνης, προστίθενται, 0.5mmol (150mg) 7-υδροξυ-3-(4-μεθοξυ-φαινυλο)-4-μεθυλο-2H-χρωμεν-2-όνη (4), 0.64mmol (138mg) γερανυλο-βρωμίδιο και 0.07g ανθρακικού καλίου.

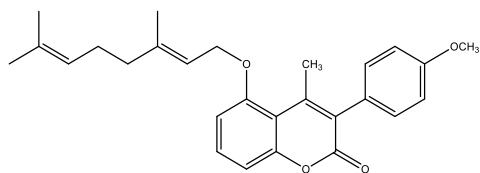
Απόδοση: 29.5%

Χρώμα: Κίτρινο

Σημείο τήξης: 100-101 °C

¹H NMR: (300MHz, CDCl₃) δ 7.55(d, J=8.7Hz, 1H, C5), 7.46(d, J=8.4Hz, 2H, C2', C6'), 6.97(d, J=8.4Hz, 2H, C3', C5'), 6.87(d, J=7.2, 2H, C6, C8), 5.49(t, J=6.5Hz, 1H, C2''), 5.11(br, 1H, C6''), 4.64(d, J=6.3Hz, 2H, C1''), 3.87(s, 3H, C4'-OCH₃), 2.32(s, 3H, C4-CH₃), 2.14(br, 4H, C4'', C5''), 1.80(s, 3H, C3''-CH₃), 1.71(s, 3H, C7''-CH₃), 1.64(s, 3H, C7''-CH₃)

5-γερανυλοξυ-3-(4-μεθοξυ-φαινυλο)-4-μεθυλο-2H-χρωμεν-2-όνη (11)



Σύμφωνα με την γενική μέθοδο σύνθεσης 5- και 7-πρενυλοξυ-κουμαρινών σε 2ml ακετόνης, προστίθενται, 0.146mmol (40mg) 5-υδροξυ-3-(4-μεθοξυ-φαινυλο)-4-μεθυλο-2H-χρωμεν-2-όνη (5), 0.17mmol (36,9g) γερανυλο-βρωμίδιο και 19.57g ανθρακικού καλίου.

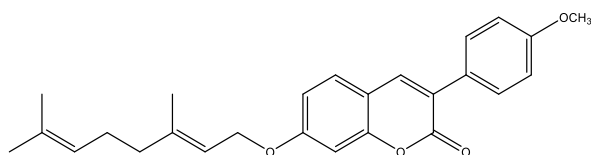
Απόδοση: 26.52%

Χρώμα: Κίτρινο

Σημείο τήξης: 77 °C

¹H NMR: (300MHz, CDCl₃) δ 7.39(t, J=8.4Hz, 1H, C7), 7.21(d, J=8.4Hz, 2H, C2', C6'), 6.97(d, J=8.4Hz, 3H, C3', C5', C8), 6.76(d, J=8.4Hz, 1H, C6), 5.51(t, J=6.3Hz, 1H, C2''), 5.07(br, 1H, C6''), 4.64(d, J=6.6Hz, 2H, C1''), 3.86(s, 3H, C4'-OCH₃), 2.50(s, 3H, C4-CH₃), 2.12(br, 4H, C4'', C5''), 1.77(s, 3H, C3''-CH₃), 1.68(s, 3H, C7''-CH₃), 1.62(s, 3H, C7''-CH₃)

7-γερανυλοξυ-3-(4-μεθοξυ-φαινυλο)-2H-χρωμεν-2-όνη (12)



Σύμφωνα με την γενική μέθοδο σύνθεσης 5- και 7-πρενυλοξυ-κουμαρινών σε 2ml ακετόνης, προστίθενται, 0.186mmol (50mg) 7-υδροξυ-3-(4-μεθοξυ-φαινυλο)-2H-χρωμεν-2-όνη (6), 0.22mmol (44,47mg) γερανυλο-βρωμίδιο και 26mg ανθρακικού καλίου.

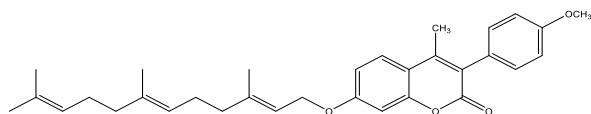
Απόδοση: 31.11%

Χρώμα: Λευκό

Σημείο τήξης: 92-93 °C

¹H NMR: (300MHz, CDCl₃) δ 7.70(s, 1H, C4), 7.64(d, J=8.4Hz, 2H, C2', C6'), 7.41(d, J=9Hz, 1H, C5), 6.97(d, J=8.7Hz, 2H, C3', C5'), 6.87(d, J=7.2Hz, 2H, C6, C8), 5.49(t, J=6.3Hz, 1H, C2''), 5.10(br, 1H, C6''), 4.63(d, J=6.6Hz, 2H, C1''), 3.87(s, 3H, C4'-OCH₃), 2.14(br, 4H, C4'', C5''), 1.80(s, 3H, C3''-CH₃), 1.71(s, 3H, C7''-CH₃), 1.64(s, 3H, C7''-CH₃)

7-φαρνεζυλοξυ-3-(4-μεθοξυ-φαινυλο)-4-μεθυλο-2H-χρωμεν-2-όνη (13)



Σύμφωνα με την γενική μέθοδο σύνθεσης 5- και 7-πρενυλοξυ- κουμαρινών σε 5ml ακετόνης, προστίθενται, 0.32mmol (90mg) 7-υδροξυ-3-(4-μεθοξυ-φαινυλο)-4-μεθυλο-2H-χρωμεν-2-όνη -(4), 0.4mmol (109mg) trans-trans-φαρνεζυλο-βρωμίδιο και 0.05g ανθρακικού καλίου.

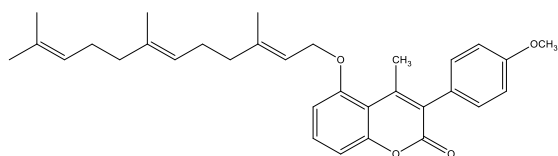
Απόδοση: 12.38%

Χρώμα: Λευκό

Σημείο τήξης: 86-87 °C

$^1\text{H NMR}$: (300MHz, CDCl_3) δ 7.55(d, $J=8.7\text{Hz}$, 2H, C5), 7.23(d, $J=8.4\text{Hz}$, 2H, C2', C6'), 6.98(d, $J=8.4\text{Hz}$, 2H, C3', C5'), 6.88(d, $J=11.4\text{Hz}$, 2H, C6, C8), 5.50(t, $J=6\text{Hz}$, 1H, C2''), 5.10(br, 2H, C6'', C10''), 4.64(d, $J=6.6\text{Hz}$, 2H, C1''), 3.87(s, 3H, C4'-OCH₃), 2.32(s, 3H, C4-CH₃) 2.15-2.00(m, 8H, C4'', C5'', C8'', C9''), 1.81(s, 3H, C7''-CH₃) 1.71(s, 3H, C3''-CH₃), 1.63(s, 6H, C11''-2XCH₃)

5-φαρνεζυλοξυ-3-(4-μεθοξυ-φαινυλο)-4-μεθυλο-2H-χρωμεν-2-όνη (14)



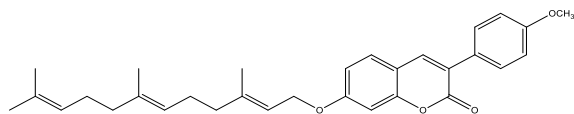
Σύμφωνα με την γενική μέθοδο σύνθεσης 5- και 7-πρενυλοξυ- κουμαρινών σε 2ml ακετόνης, προστίθενται, 0.1314mmol (37,1mg) 5-υδροξυ-3-(4-μεθοξυ-φαινυλο)-4-μεθυλο-2H-χρωμεν-2-όνη- (5), 0.1577mmol (44,97g) trans-trans-φαρνεζυλο-βρωμίδιο και 16.19mg ανθρακικού καλίου.

Απόδοση: 10.89%

Χρώμα: Κοκκινωπό έλαιο

$^1\text{H NMR}$: (300MHz, CDCl_3) δ 7.39(t, $J=8.4\text{Hz}$, 1H, C7), 7.20(d, $J=8.7\text{Hz}$, 2H, C2', C6'), 6.97(d, $J=8.7\text{Hz}$, 3H, C3', C5', C8), 6.76(d, $J=8.1$, 1H, C6), 5.51(t, $J=6.1\text{Hz}$, 1H, C2''), 5.09(br, 2H, C6'', C10''), 4.64(d, $J=6.3$, 2H, C1''), 3.86(s, 3H, C4'-OCH₃), 2.50(s, 3H, C4-CH₃) 2.13-1.97(m, 8H, C4'', C5'', C8'', C9''), 1.78(s, 3H, C7''-CH₃) 1.70(s, 3H, C3''-CH₃), 1.61(s, 6H, C11''-2XCH₃)

7-φαρνεζυλοξυ-3-(4-μεθοξυ-φαινυλο)-2H-χρωμεν-2-όνη (15)



Σύμφωνα με την γενική μέθοδο σύνθεσης 5- και 7-πρενυλοξυ-κουμαρινών σε 2ml ακετόνης, προστίθενται, 0.18mmol (50mg) 7-υδροξυ-3-(4-μεθοξυ-φαινυλο)-2H-χρωμεν-2-όνη-(6), 0.22mmol (63,67mg) trans-trans-φαρνεζυλο-βρωμίδιο και 6mg ανθρακικού καλίου.

Απόδοση: 30.09%

Χρώμα: Κίτρινο

Σημείο τήξης: 80 °C

^1H NMR: (300MHz, CDCl_3) δ 7.70(s, 1H, C4), 7.65(d, $J=8.7\text{Hz}$, 2H, C2', C6'), 7.40(d, $J=9.3\text{Hz}$, 1H, C5), 6.97(d, $J=9\text{Hz}$, 2H, C3'', C5''), .86(d, $J=7.2\text{Hz}$, 2H, C6, C8), 5.49(t, $J=6.3\text{Hz}$, 1H, C2''), 5.11(br, 2H, C6'', C10''), 4.63(d, $J=6.6\text{Hz}$, 2H, C1''), 3.87(s, 3H, C4'-OCH₃), 2.17-2.02(m, 8H, C4'', C5'', C8'', C9''), 1.80(s, 3H, C7''-CH₃) 1.70(s, 3H, C3''-CH₃), 1.63(s, 6H, C11''-2XCH₃)

10.4 Μέθοδοι βιοδοκιμασιών

10.4.1 Προσδιορισμός της ικανότητας δέσμευσης της σταθερής ελεύθερης ρίζας DPPH

Οι ενώσεις μελετήθηκαν για τη δυνατότητα τους να αλληλεπιδρούν με την ελεύθερη ρίζα του DPPH στις συγκεντρώσεις (0.1 mM και 50 μM) σε δύο διαφορετικούς χρόνους (20 min και 60 min). Τα υπό εξέταση μόρια προστίθενται σε αιθανολικό διάλυμα DPPH (0.05mM, 3.9ml, 25mg/L) μέχρι τελικής συγκέντρωσης 0.1 mM. Το μείγμα αναδεύεται έντονα και στη συνέχεια αφήνεται σε ηρεμία για 20 ή 60 λεπτά. Κατόπιν, καταγράφεται η απορρόφηση του διαλύματος, στο μήκος κύματος απορρόφησης του DPPH (517 nm), και υπολογίζεται μέσω αυτής το ποσοστό της αντιοξειδωτικής δράσης. Όλα τα τεστ γίνονται τρεις φορές και τα αποτελέσματα προκύπτουν ύστερα από τον υπολογισμό του μέσου όρου (124) (125).

10.4.2 Υπολογισμός της αναστολής της λιπιδικής υπεροξειδωσης (AAPH)

Η αναστολή της λιπιδικής υπεροξειδωσης από τις ενώσεις που παρασκευάστηκαν υπολογίζεται από την οξείδωση του άλατος με νάτριο του λινελαϊκού οξέος σε υδατικό αιώρημα, κάτι που

Συνθετική πορεία νέων κουμαρινικών αναλόγων

παρατηρείται στα 234 nm. Το 2,2,- αζοδις- (2-αμιδινοπροπανο) διυδροχλωρίδιο (AAPH) χρησιμοποιείται σαν εκκινητής των ελευθέρων ριζών (124) (125).

Συγκεκριμένα, δέκα μικρόλιτρα από το αιώρημα των 16 mM του λινελαϊκού ύ οξέος προστίθενται στην UV κυψελίδα που περιέχει 0.93 mL από το ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών αλάτων 0.05 M με pH= 7.4 το οποίο έχει προθερμανθεί στους 37 °C. Η αντίδραση οξειδωσης ξεκινά στους 37 °C υπό ατμοσφαιρική πίεση με την προσθήκη 50 μL του διαλύματος AAPH των 40 mM. Η οξειδωση πραγματοποιείται παρουσία δόσεων 10 μL της υπό εξέταση ένωσης. Στην δοκιμασία χωρίς προσθήκη του αντιοξειδωτικού, η λιπιδική οξειδωση μετράται με την παρουσία ίδιας ποσότητας DMSO. Ο ρυθμός οξειδωσης στους 37 °C παρακολουθείται καταγράφοντας την αύξηση της απορρόφησης στα 234 nm που προκαλείται από τα συζευγμένα διενικά υδροϋπεροξειδία (124) (125).

10.4.3 Προσδιορισμός της ικανότητας αναστολής του ενζύμου λιποξυγονάση από σόγια

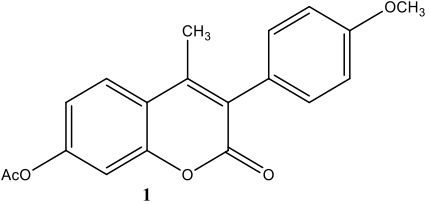
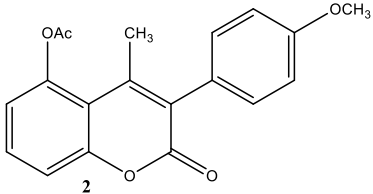
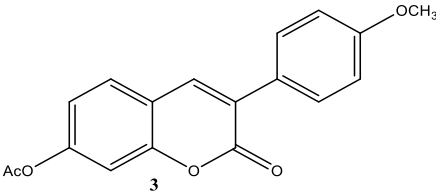
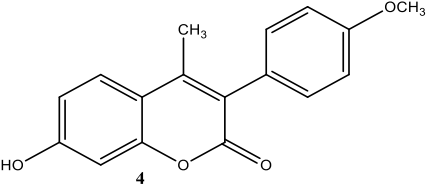
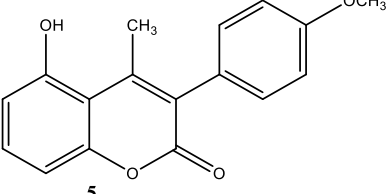
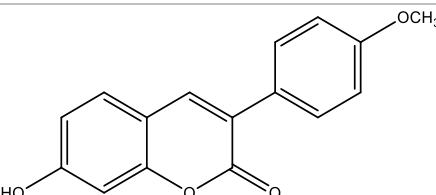
Για τον προσδιορισμό της αναστολής της δράσης της λιποξυγονάσης, οι υπό εξέταση ουσίες διαλύονται σε διμεθυλοσουλφοξείδιο και αφήνονται να επωαστούν σε θερμοκρασία δωματίου με λινελαϊκό νάτριο (0.1 mL) και 0.2 mL ενζυμικού διαλύματος ($1/9 \times 10^{-4}$ w/v σε φυσιολογικό ορό) σε ρυθμιστικό διάλυμα Tris pH= 9. Η μετατροπή του άλατος με νάτριο του λινελαϊκού οξέος σε 13-υδροπεροξυλινελαϊκό οξύ στα 234 nm καταγράφεται και συγκρίνεται με αυτή που προκαλείται από την κατάλληλη ένωση αναφοράς (124) (125).

Επιπλέον, πραγματοποιήθηκε ο θεωρητικός προσδιορισμός της λιποφιλικότητας ορισμένων μορίων από το σύνολο τα οποία παρήχθησαν, η οποία εκφράζεται ως ο λογάριθμος του συντελεστή κατανομής P της ένωσης (Calculated logP, ClogP). Η τιμή της λιποφιλικότητας είναι μία από τις παραμέτρους του 'κανόνα των πέντε', ο οποίος προβλέπει την ικανότητα των εξεταζόμενων ενώσεων να διαπερνούν βιολογικές μεμβράνες. Σύμφωνα με τον κανόνα αυτό, μια ένωση με λιποφιλικότητα μεγαλύτερη από πέντε εμφανίζει μικρή πιθανότητα διάβασης μεμβρανών (124) (125).

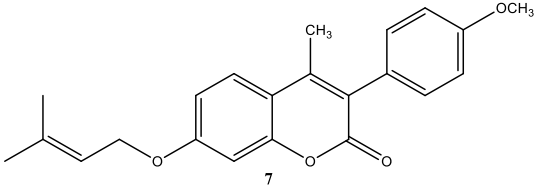
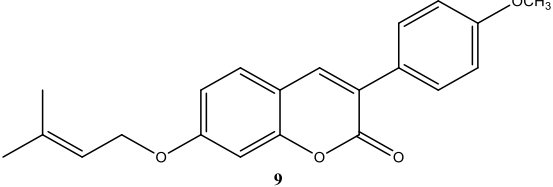
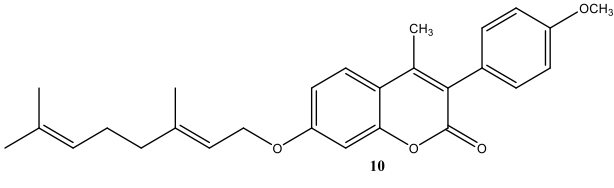
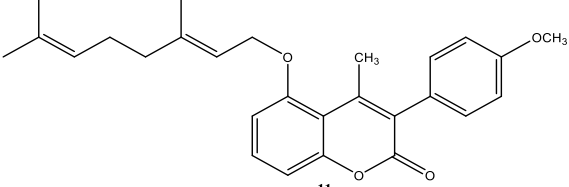
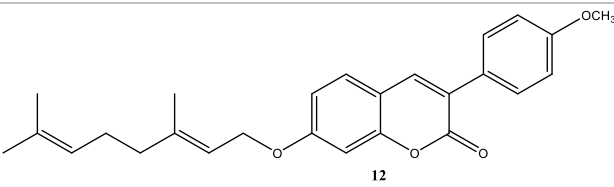
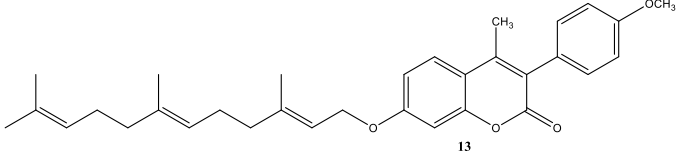
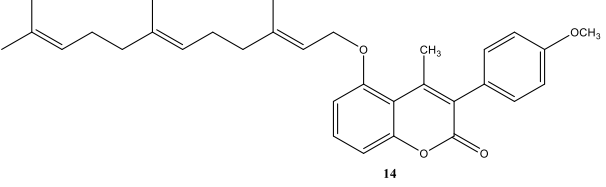
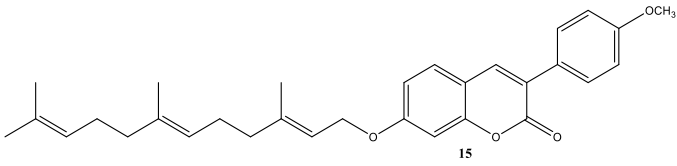
ΜΕΡΟΣ Δ: Αποτελέσματα και συζήτηση

11. Αποτελέσματα βιολογικής δράσης

Πίνακας 2: Αποτελέσματα της *in vitro* αξιολόγησης της αντιοξειδωτικής δράσης των νέων μορίων

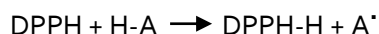
Αλληλεπίδραση με την ελεύθερη ρίζα DPPH(%) 0.1mM		
Προϊόν	20min	60min
 <p>1</p>	16.2	65.27
 <p>2</p>	4	6
 <p>3</p>	17.3	No
 <p>4</p>	No	No
 <p>5</p>	8.86	3.52
 <p>6</p>	No	No

11. Αποτελέσματα βιολογικής δράσης

 <p>7</p>	11.7	No
 <p>9</p>	10.3	2.5
 <p>10</p>	17.3	No
 <p>11</p>	No	No
 <p>12</p>	2.1	No
 <p>13</p>	No	No
 <p>14</p>	No	No
 <p>15</p>	7.0	2.5
<p>NDGA</p>	85	97

12. Συμπεράσματα

Τα αποτελέσματα της μέτρησης της ικανότητας των ενώσεων να δεσμεύουν τη σταθερή ελεύθερη ρίζα DPPH δείχνουν ότι οι τα κουμαρινικά αυτά ανάλογα δεν έχουν δράση σε αυτή τη δοκιμασία. Ως ένα βαθμό αυτό είναι αναμενόμενο, δεδομένου ότι η συγκεκριμένη δοκιμασία απαιτεί την παρουσία φαινολικών υδροξυλίων τα υδρογόνα των οποίων είναι ευκίνητα και μπορούν να αντιδράσουν με την ελεύθερη ρίζα DPPH, σύμφωνα με την αντίδραση:



Η καλύτερη αντιοξειδωτική δράση παρουσιάζει το κουμαρινικό ανάλογο **1**.

13. Προτάσεις για μελλοντική έρευνα

Βάσει των αποτελεσμάτων που προέκυψαν μέσω αυτής της διπλωματικής εργασίας εμφανίζεται η προοπτική για την έρευνα στο κομμάτι της σύνθεσης ανάλογων κουμαρινικών παραγώγων, με σκοπό την βελτιωμένη αντιοξειδωτική και αντιφλεγμονώδη δράση πρενυλοξυ-κουμαρινών.

Η σύνθεση νέων πρενυλόξυ-κουμαρινικών αναλόγων, από τις 5- και 7-υδροξυ-κουμαρίνες με μεθοξυ- και υδροξυ- υποκαταστάτες, σε θέσεις μέτα και πάρα του αρωματικού δακτυλίου της 3-θέσης του κουμαρινικού δακτυλίου, προτείνεται προκειμένου να μελετηθεί περαιτέρω η σχέση δομής-δράσης.

Βιβλιογραφία

1. A. Lacy and R. O'Kennedy, 'Studies on Coumarins and Coumarin-Related Compounds to Determine their Therapeutic Role in the Treatment of Cancer', *Current Pharmaceutical Design*, **2004**, *10*, 3797-3811
2. T. Smyth, V.N. Ramachandran, W.F. Smyth, 'A study of the antimicrobial activity of selected naturally occurring and synthetic coumarins', *International Journal of Antimicrobial Agents*, **2009**, *33*, 421-426
3. D. Egan, R. O'Kennedy, E. Moran, D. Cox, E. Prosser, D. Thornes, 'The pharmacology, Metabolism, Analysis, and applications of coumarins and coumarins-related compounds', *Drug metabolism reviews*, **1990**, *22*(5), 503-529
4. F. Borges, F. Roleira, N. Milhazes, L. Santana, E. Uriarte 'Simple Coumarins and Analogues in Medicinal Chemistry: Occurrence, Synthesis and Biological Activity', *Current Medicinal Chemistry*, **2005**, *12*, 887-916
5. P. K. Jain, Himanshu Joshi, 'Coumarin: Chemical and Pharmacological Profile', *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, **2012**, *02* (06), 236-240
6. B.D. Carlton, 'Coumarins', *Encyclopedia of Toxicology*, **2005**, 674-676, ISBN: 978-0-12-369400-3
7. R.E. Patre, P.S. Parameswaran, S.G. Tilvea, 'Synthesis of the naturally occurring prenylated coumarins coumarins balsamiferone and cedrellopsin by domino reactions', *Arkivoc*, **2011**, (ix) 68-76
8. J.C. Trivedi, 'Studies on some important Heterocyclic Moieties', Thesis PhD, **2008**, Saurashtra University, India
9. R. O'Kennedy, D. Thornes, 'Coumarins: Biology, Applications and Mode of Action', **1997**, ISBN: 978-0-471-96997-6
10. J.C. Morris, 'A 'Click Approach' to the Generation of novel Profluorescent Nitroxides', Master Thesis, **2011**, Queensland University of Technology, Australia
11. K.N. Venugopala, V. Rashmi, B. Odhav, 'Review on Natural Coumarin Lead Compounds for Their Pharmacological Activity', *BioMed Research International*, **2013**, 1-14
12. S. Sigurdssona, H.M. Ögmundsdottirb, S. Gudbjarnason, 'Antiproliferative Effect of *Angelica archangelica* Fruits', *A Journal of Biosciences*, **2004**, *59*, 523-527
13. Y. Xie, W. Zhao, T. Zhou, G. Fan, Y. Wu, 'An efficient strategy based on MAE, HPLC-DAD-ESI-MS/MS and 2D-prep-HPLC-DAD for the rapid extraction, separation, identification and purification of five active coumarin components from Radix Angelicae Dahuricae', *Phytochemical Analysis*, **2010**, *21*, 473-482

14. M. Liu, X. Shi, W. Yang, S. Liu, N. Wang, R. Shi, S. Qiao, Q. Wang, Y. Wang, 'Quantitative analysis of nine coumarins in rat urine and bile after oral administration of Radix Glehniae extract by high-performance liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry', *Biomedical Chromatography*, **2011**, 25, 783-793
15. B. Zhao, X. Yang, L. Zhang, 'Chemical constituents of roots of *Saposhnikovia divaricata*', *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi*, **2001**, 117-119.
16. Μ. Ρουσσάκη, Σχεδιασμός και Συνθεση νέων Βιοδραστικών ενώσεων αναλόγων των Κουμαρινών, Διδακτορική διατριβή, **2014**, Εθνικό Μετσόβιο Πολυτεχνείο
17. M. Wink, 'Biochemistry of Plant Secondary Metabolism', *Annual Plant Reviews*, **2010**, 40, 197-208, ISBN: 978-1-4051-8397-0
18. H. Baxter, J.B. Harborne, G. P. Moss, 'Phytochemical Dictionary: A Handbook of Bioactive Compounds from Plants', **1998**, 390-406, ISBN 9780748406203
19. J. Chen, W. Chiou, C. Chen, F. Chen, 'Effect of the plant-extract osthole on the relaxation of rabbit corpus cavernosum tissue in vitro', *The journal of urology*, **2000**, 163, 1975-1980
20. G. Polya, 'Biochemical Targets of Plant Bioactive Compounds: A Pharmacological reference guide to sites of action and biological effects', **2003**, 28, ISBN 978041530829
21. A. Schinkovitz, S. Gibbons, S. Michael, M. Cocksedge, F. Bucar, 'Ostruthin: An antimycobacterial coumarin from the roots of *Peucedanum ostruthium*', *Planta Medica*, **2003**, 69, 369-371
22. M. Monti, M. Pinotti, G. Appendino, F. Dallochio, T. Bellini, F. Antognoni, F. Poli, F. Bernardi, 'Characterization of anti-coagulant properties of prenylated coumarin ferulenol', *Biochimica et Biophysica Acta*, **2007**, 1770, 1437-1440
23. V. Kumar, D. Ahmed, A. Verma, F. Anwar, M. Ali, M. Mujeeb, 'Umbelliferone β-D-galactopyranoside from *Aegle marmelos* (L.) corr. an ethnomedicinal plant with antidiabetic, antihyperlipidemic and antioxidative activity', *BMC Complementary and Alternative Medicine* **2013**, 273
24. O.O. Aiyelaagbe, J.B. Gloer, 'Japodic acid, A Novel Aliphatic Acid from *Jatropha podagrica* Hook', *Rec. Nat. Prod.*, **2008**, 2:4, 100-106
25. T. Wu, Y. Hsu, C. Kuo, B. Sreenivasulu, G. Damu, R. Su, Y. Li, 'Constituents from the leaves of *Phellodendron amurense* var. *wilsonii* and their bioactivity', *J. Nat. Prod.*, **2003**, 66 (9), 1207-1211
26. A. Rahman, M. Shabbir, S.Z. Sultani, A. Jabba; M.I. Choudhary, 'Cinnamates and coumarins from the leaves of *Murraya paniculata*' *Phytochemistry*, **1997**, 44, 683-685

27. B. Barik, A. Dey, A. Chatterjee, 'Murrayatin, a coumarin from *Murraya exotica*' *Phytochemistry*, **1983**, *22*, 2273-2275
28. W.Q. Li, C.H. Jiang, S.S. Chu, M. X. Zuo, Z. L. Liu, 'Chemical Composition and Toxicity against *Sitophilus zeamais* and *Tribolium castaneum* of the Essential Oil of *Murraya exotica* Aerial Parts', *Molecules*, **2010**, *15*, 5831-5839
29. H. Safdari, A. Neshani, A. Sadeghian, M. Ebrahimi, M. Iranshahi, H. Sadeghian, 'Potent and selective inhibitors of class A β -lactamase: 7-prenyloxy coumarins', *The Journal of Antibiotics*, **2014**, *67*, 373-377
30. P.K. Mukherjee, V. Kumar, M. Mal, P.J. Houghton, 'Acetylcholinesterase inhibitors from plants', *Phytomedicine*, **2007**, *14*, 289-300
31. R. Rezaee, M. Iranshahi, J. Behravan, E. Behravan, F. Soltani, 'Evaluation of antigenotoxicity effects of umbeliprenin on human peripheral lymphocytes exposed to oxidative stress', *Cell Biol Toxicol.*, **2009**, *25*(3), 291-296
32. G. Flamini, 'Bioactive natural products', *Studies in Natural Products Chemistry*, **2012**, *38*, 1-491
33. S.M. Razavi, G. Imanzadeh, M. Davari, 'Coumarins from *Zosima absinthifolia* seeds, with allelopathic effects', *EurAsia J BioSci*, **2010**, *4*, 17-22
34. R. Rezaee, E. Behravan, J. Behravan, F. Soltani, Y. Naderi, B. Emami, M. Iranshahi, 'Antigenotoxic activities of the natural dietary coumarins umbelliferone, herniarin and 7-isopentenylxy coumarin on human lymphocytes exposed to oxidative stress', *Drug Chem Toxicol*, **2014**, *37*(2), 144-148
35. A. Basile, S. Sorbo, V. Spadaro, M. Bruno, A. Maggio, N. Faraone, S. Rosselli, 'Antimicrobial and Antioxidant Activities of Coumarins from the Roots of *Ferulago campestris* (Apiaceae)', *Molecules*, **2009**, *14*, 939-952
36. M. Casal, C. Dominique, C. Vieria, B. Fernandes, 'Isolation of xanthyletin, an inhibitor of ants symbiotic fungus, by high-speed counter-current chromatography', *J Chromatogr A.*, **2009**, *19*, 4307-4312
37. A. Ravise, A. Khan, G. Kunesch, S. Chuilon, S. 'Structure and biological activity of Xanthyletin, a new phytoalexin of Citrus', *Fruits*, **1985**, *40*(12), 807-811
38. E.G. Yordi, M.J. Matos, L. Santana, E. Uriarte, O. Abreu, E.M. Pérez, 'Natural coumarins: QSRT approaches regarding their genotoxicity', *Escoc* 18
39. N. Marquez, R. Sancho, L.M. Bedoya, J. Alcamí, J.L. Lopez-Perez, A.S. Feliciano, B. L. Fiebich, E. Munoz, 'Mesuol, a natural occurring 4-phenylcoumarin, inhibits HIV-1 replication by targeting the NF- κ B pathway', *Antiviral Research*, **2005**, *66*, 137-145

40. J.B. Harborne, T.J. Mabry, H. Mabry, 'The Flavonoids', **1975**, 267-275, ISBN: 978-0-12-324602-8
41. A. Ito, H. Chai, Y.G. Shin, R. Garcia, M. Mejia, Q. Gao, C.R. Fairchild, K.E. Lane, A. T. Menendez, N.R. Farnsworth, G.A. Cordell, J.M. Pezzuto, A.D. Kinghorn, 'Cytotoxic Constituents of the Roots of *Exostema acuminatum*', *Tetrahedron*, **2000**, 56, 6401-6405
42. B. Lanoot, M. Vancanneyt, I. Cleenwerck, L. Wang, W. Li, Z. Liu, J. Swings, 'The search for synonyms among streptomycetes by using SDS-PAGE of whole cell proteins Emendation of the species *Streptomyces aurantiacus*, *Streptomyces cacaoi* subsp. *cacaoi*, *Streptomyces caeruleus* and *Streptomyces violaceus*', *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, **2002**, 52, 823-829
43. Z. Xu, K. Jakobi, K. Welzel, C. Hertweck, 'Biosynthesis of the Antitumor Agent Chartreusin Involves the Oxidative Rearrangement of an Anthracyclic Polyketide', *Chemistry & Biology*, **2005**, 12, 579-588
44. S. Sandhu, Y. Bansal, O. Silakari, G. Bansal, 'Coumarin hybrids as novel therapeutic agents' *Biorg. Med. Chem.*, **2014**, 22, 3086-3814
45. M. Grazula, E. Budzisz, 'Biological activity of metal ions complexes of chromones, coumarins and flavones', *Coordination Chemistry Reviews*, **2009**, 253, 2588-2598
46. T. Nasr, S. Bondock, M. Youns, 'Anticancer activity of new coumarin substituted hydrazide-hydrazone derivatives', *European Journal of Medicinal Chemistry*, **2014**, 76, 539-548
47. I. Kostova, 'Synthetic and Natural Coumarins as Cytotoxic Agents', *Curr. Med. Chem.-Anti-Cancer Agents*, **2005**, 5, 29-46
48. R.N. Gacche, S.G. Jadhav, 'Antioxidant Activities and Cytotoxicity of Selected Coumarin Derivatives: Preliminary Results of a Structure-Activity Relationship Study Using Computational Tools', *J Exp Clin Med*, **2012**, 4(3), 165-169
49. S. Chimichi, M. Boccacini, B. Cosimelli, G. Viola, D. Vedaldi, F. Dall'Acqua, 'New geiparvarin analogues from 7-(2-oxoethoxy)coumarins as efficient in vitro antitumoral agents', *Tetrahedron Letters*, **2002**, 43, 7473-7476
50. Y. Zhang, B. Zou, Z. Chen, Y. Pan, H. Wang, H. Liang, X. Yi, 'Synthesis and antioxidant activities of novel 4-Schiff base-7-benzyloxy-coumarin derivatives', *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, **2011**, 21, 6811-6815
51. A. Witaicenis, L.N. Seito, A. S. Chagas, L.D. Almeida, A.C. Luchini, P. Rodrigues-Orsi, S.H. Cestari, L.C. Stasi, 'Antioxidant and intestinal anti-inflammatory effects of plant-derived coumarin derivatives', *Phytomedicine*, **2014**, 21, 240-246

52. S. Malhotra, G. Shakya, A. Kumar, B.W. Vanhoecke, A.L. Cholli, H.G. Raj, L. Saso, B. Ghosh, M.E. Bracke, A.K. Prasad, S. Biswal, V.S. Parmar. 'Antioxidant, anti-inflammatory and anti-invasive Activities of Biopolyphenolics', *ARKIVOC*, **2008**, (vi) 119-139
53. V.D. Kancheva, O.T. Kasaikina, 'Lipid Oxidation in Homogeneous and Micro-Heterogeneous Media in Presence of Prooxidants, Antioxidants and Surfactants', *Lipid Peroxidation*, ISBN: 978-953-51-0716-3
54. K. Kang, C. Kong, Y. Seo, M. Kim, S. Kim, 'Anti-inflammatory effect of coumarins isolated from *Corydalis heterocarpa* in HT-29 human colon carcinoma cells', *Food and Chemical Toxicology*, **2009**, 47, 2129–2134
55. E.Y. Bissonnette, G.M. Tremblay, V. Turmel, B. Pirotte, M. Reboud-Ravaux, 'Coumarinic derivatives show anti-inflammatory effects on alveolar macrophages, but their anti-elastase activity is essential to reduce lung inflammation in vivo', *International Immunopharmacology*, **2009**, 9, 49–54
56. G.B. Bubolsa, D. Viannac, A. Medina-Remón, G. Poserb, R.M. Lamuela-Raventosd, V.L. Eifler-Lima, S.C. Garcia, 'The Antioxidant Activity of Coumarins and Flavonoids', *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry*, **2013**, 13, 1-17
57. L. Huanga, X. Yuana, D. Yub, K.H. Leeb, C. H. Chen, 'Mechanism of action and resistant profile of anti-HIV-1 coumarin derivatives', *Virology*, **2005**, 332, 623– 628
58. I. Kostova, S. Raleva, P. Genova, R. Argirova, 'Structure-Activity Relationships of Synthetic Coumarins as HIV-1 Inhibitors', *Bioinorg Chem Appl.*, **2006**, 68274
59. V.K. Srivastav, M. Tiwari, 'QSAR and docking studies of coumarin derivatives as potent HIV-1 integrase inhibitors', *Arabian Journal of Chemistry*, **2013**, 1-14
60. P. Zhoua, Y. Takaishia, H. Duana, B. Chena, G. Honda, M. Itohb, Y. Takedac, O.K. Kodzhimatovd, K. Lee, 'Coumarins and bicoumarin from *Ferula sumbul*: anti-HIV activity and inhibition of cytokine release', *Phytochemistry*, **2000**, 53, 689-697
61. H.B. Lad, R.R. Giri, D.I. Brahmhatt, 'An efficient synthesis of some new 3-bipyridinyl substituted coumarins as potent antimicrobial agents', *Chinese Chemical Letters*, **2013**, 24, 227–229
62. D. Zavrnsnik, S. Spirtovic- Halilovic, D. Softikc, 'Synthesis, structure and antibacterial activity of 3-substituted derivatives of 4-hydroxycoumarin', *Periodicum Biologorum*, **2011**, 113 (1), 93– 97
63. J. Sahoo, S. K. Mekapb, P.S.Kumar, 'Synthesis, spectral characterization of some new 3-heteroaryl azo 4-hydroxy coumarin derivatives and their antimicrobial evaluation', *Journal of Taibah University for Science*, **2015**, 9, 187–195

64. K.V. Sashidhara, G.R. Palnati, S.R. Avulaa, S. Singh, M. Jain, M. Dikshit, 'Synthesis and evaluation of antithrombotic activity Synthesis and evaluation of antithrombotic activity', *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, **2012**, 22 (9), 3115–3121
65. M. K. El Ashry 'Synthesis of Heterocyclic Compounds derived from Coumarin with potential antithrombotic activity', Master Thesis, **2012**, Cairo University
66. J. Hoak, W. Connor, E. Wabner, J. Carter, 'The Antithrombotic Properties of Coumarin Drugs', *Ann Intern Med.*, **1961**, 54(1), 73-81
67. M. Jain, S. Kumar, H. Siddiqui, 'Antithrombotic Activity of a Newly Synthesized Coumarin Derivative 3-(5-Hydroxy-2, 2-dimethyl-chroman-6-yl)-N-{2-[3-(5-hydroxy-2,2-dimethyl-chroman-6-yl)-propionylamino]-ethyl}-propionamide', *Chem Biol Drug Des.*, **2013**, 81(4), 499-508.
68. K.M. Amin, N.M. Gawad, D.E. A.Rahman, M. El Ashry, 'New series of 6-substituted coumarin derivatives as effective factor Xa inhibitors: Synthesis, in vivo antithrombotic evaluation and molecular docking', *Bioorganic Chemistry*, **2014**, 52, 31–43
69. F.Ntie-Kang, P.A. Onguéné, L.L. Lifongo, J.C. Ndom, W. Sippl, L. Mbaze, 'The potential of anti-malarial compounds derived from African medicinal plants, part II: a pharmacological evaluation of non-alkaloids and non-terpenoids', *Malaria Journal*, **2014**, 13 (81), 1-20
70. S. Farouk, T. Khalid, J. Geary, A. Jensen, 'Potential antimalarial candidates from african plants: an in vitro approach using plasmodium falciparum', *Journal of Ethnopharmacology*, **1985**, 15, 201-209
71. Y. Lin, X. Sun, Q. Yuan, Y. Yan, 'Combinatorial biosynthesis of plant-specific coumarins in bacteria', *Metabolic Engineering*, **2013**, 18, 69–77
72. F. Bourgaud, A. Hehn, R. Larbat, S. Doerper, E. Gontier, S. Kellner, U. Matern, 'Biosynthesis of coumarins in plants: a major pathway still to be unravelled for cytochrome P450 enzymes', *Phytochem Rev*, **2006**, 5, 293–308
73. J.R. Stoker, 'The Biosynthesis of Coumarin in Melilotus Azba', *Biochemical and biophysical research communications*, **1964**, 14(1), 17-20
74. Κ. Φυλακτακίδου, 'Σύνθεση και μελέτη συμπυκνωμένων γραμμικών και 4-υποκατεστημένων κουμαρινικών παραγώγων', Διδακτορική διατριβή, **1997**, Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης
75. Α. Μπεξεργιαννίδου-Μπαλούκτση, 'Σύνθεση και μελέτη συμπυκνωμένων κουμαρινό-ετεροκυκλικών συστημάτων', Διδακτορική διατριβή, **1992**, Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης
76. J. McMurry, *Οργανική Χημεία*, **2013**, 559-587/1092-1096, ISBN: 978-960-524-054-7

77. P. L. Majumder, S. Majumder, 'Further Evidence for the Mechanism of Formation of Coumarin by Perkin Reaction from salicylaldehyde and a Novel Synthesis of 1,1-diphenyl-2(2'-hydroxyphenyl) ethene from O- α , α -diphenylacetylsalicylaldehyde with Et₃N', *ECSOC-11*, **2007**, 1-5
78. Ε. Καβέτσου, 'Σχεδιασμός και σύνθεση νέων υδροξυ-κουμαρινικών αναλόγων με πιθανή αντιοξειδωτική, αντιφλεγμονώδη και αντικαρκινική δράση', Διπλωματική εργασία, **2013**, Εθνικό Μετσόβιο Πολυτεχνείο
79. M. Thimons, C.A. Chua, M. Achalabun, 'The Pechmann Reaction', <http://courses.chem.psu.edu/chem36/Chem36H/IndivExpt1/804%20Pechman%20Rx.pdf>
80. J. Clayton, 'The functions of the higher valencies', *J. Chem. Soc., Trans.*, **1916**, 109, 1046-1050
81. R. Joshi, U. Chudasama, 'Synthesis of coumarins via Pechmann condensation using inorganic ion exchangers as solid acid catalysts', *Journal of Scientific & Industrial Research*, **2008**, 67, 1092-1097
82. Σ. Λαφαζάνης, 'Σύνθεση αζωτούχων κουμαρινικών παραγώγων και μελέτη της οξειδωσης τους', Διδακτορική διατριβή, **2008**, Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης
83. Y.J. Lim, D.Y. Kim, 'Enantioselective Conjugate Addition of 4-Hydroxycoumarin to Enones Catalyzed by Binaphthyl-Modified Primary Amine Organocatalyst', *Bull. Korean Chem. Soc.*, **2012**, 33(6), 1825
84. C.W. Suh, T. H. Han, D.Y. Kim, 'Organocatalytic Asymmetric Michael Addition of 4-Hydroxycoumarin to β , γ -Unsaturated α -Keto Esters', *Bull. Korean Chem. Soc.*, **2013**, 34 (6), 1623
85. R. Menegatti, 'Green Chemistry – Aspects for the Knoevenagel Reaction', Green Chemistry - Environmentally Benign Approaches, ISBN: 978-953-51-0334-9, <http://www.intechopen.com/books/green-chemistry-environmentally-benign-approaches/green-chemistry-aspects-for-knoevenagel-reaction->
86. P. Verdía, F. Santamarta, E. Tojo, 'Knoevenagel Reaction in [MMIm][MSO₄]: Synthesis of Coumarins', *Molecules*, **2011**, 16, 4379-4388
87. S. Ahmad, G. Rahim, R.A. Hossein, 'Synthesis of Functionalized Coumarins', *Iran. J. Chem. Chem. Eng, Vol.*, **2011**, 30(4), 19-22
88. I. Hwang, S. Lee, J. Hwang, K. Lee, 'A Facile Synthesis of Highly Functionalized 4-Arylcoumarins via Kostanecki Reactions Mediated by DBU', *Molecules*, **2011**, 16(8), 6313-6321
89. G.P. Ellis, 'Chromenes, Chromanones, and Chromones from The Chemistry of Heterocyclic Compounds', **1977**, ISBN 0-471-38212-4
90. A.P. Rajput, P.D. Girase, 'Review article on Vildmeier-Haach Reaction', *IJPCBS*, **2012**, 3(1), 25-43

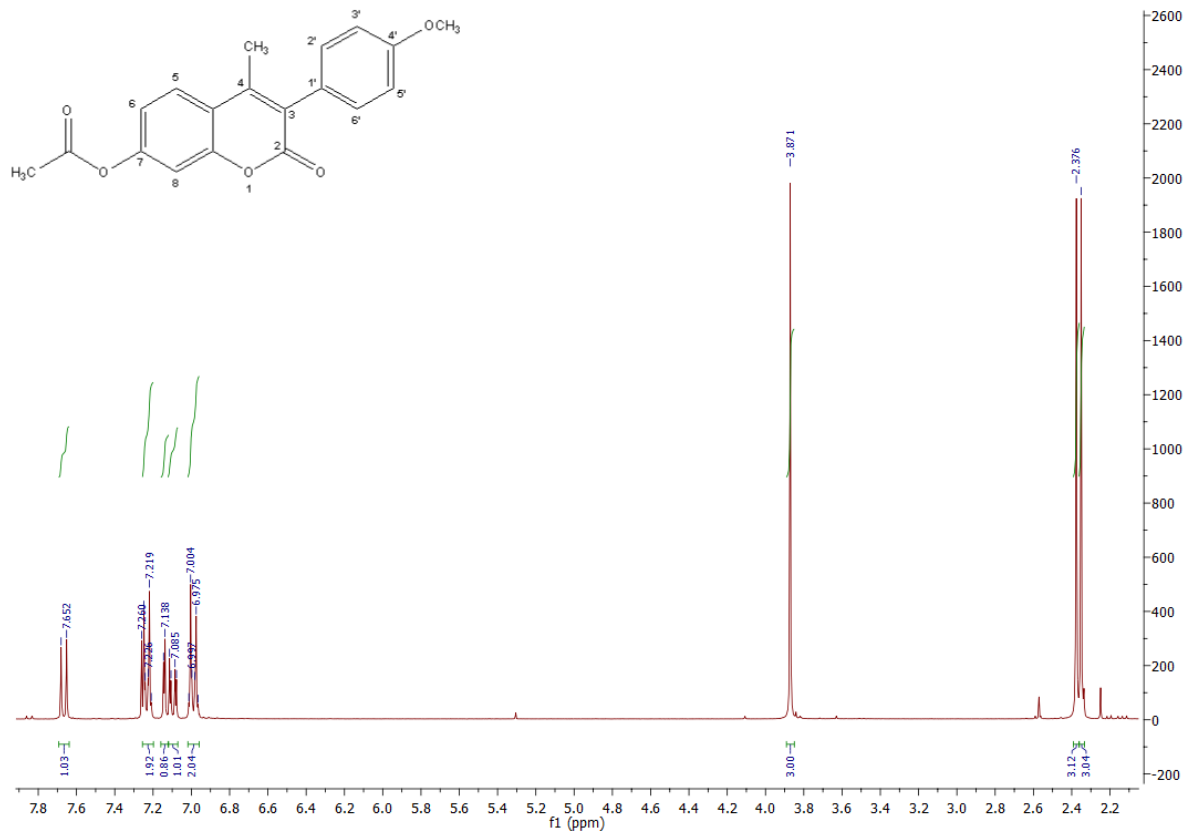
91. N. K. Chodankar, S. Seshadri, 'Studies in the Vilsmeier-Haack Reaction: Part XXV- Synthesis of 3-Hetarylcoumarins by the Application of the Vilsmeier-Haack Reaction', *Dyes and Pigments*, **1985**, 6, 313-319
92. W. Phakhodee, M. Pattarawarapan, P. Pongparn, S. Laphookhieo, 'Naturally occurring prenylated coumarins from *Micromelum integerrimum* twigs', *Phytochemistry Letters*, **2014**, 7, 165–168
93. F. Epifano, S. Genovese, L. Menghini, M. Curini, 'Chemistry and pharmacology of oxyprenylated secondary plant metabolites', *Phytochemistry*, **2007**, 68, 939–953
94. C. Bruyère, S. Genovese, B. Lallemand, A. Ionescu-Motatu, M. Curini, R. Kiss, F. Epifano, 'Growth inhibitory activities of oxyprenylated and non-prenylated naturally occurring phenylpropanoids in cancer cell lines', *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, **2011**, 21,4174–4179
95. M. Roussaki, K. Zelianaios, E.Kavetsou, S. Hamilakis, D. Hadjipavlou-Litina, C.Kontogiorgis, T. Liargkova, A.Detsi, 'Structural modifications of coumarin derivatives: Determination of antioxidant and lipoxygenase (LOX) inhibitory activity', *Bioorg. Med. Chem.*, **2014**, 22, 6586-6594
96. A. Murakami, Y. Nakamuta, T. Tanaka, K. Kawabata, D. Takahashi, K. Koshimizu, H. Ohigashi, 'Suppression by citrus auraptene of phorbol ester- and endotoxin induced inflammatory responses: role of attenuation of leukocyte activation', *Carcinogenesis*, **2000**, 21(10), 1843-1850
97. T. Masuda, Y. Muroya, N. Nakatani, 'Coumarin Constituents of the Juice Oil from Citrus hassaku and Their Spasmolytic Activity', *Biosci. Biotech. Biochem.*, **1992**, 56 (8), 1257-1260
98. M. Curini, G. Cravotto, F. Epifano, G. Giannone, 'Chemistry and Biological Activity of Natural and Synthetic Prenyloxycoumarins', *Current Medicinal Chemistry*, **2006**, 13, 199-222
99. M. Curini, F. Epifano, S. Genovese, M.C. Marcotullio, L. Menghini, '3-(4'-Geranyloxy-3'-methoxyphenyl)-2-trans propenoic acid: a novel promising cancer chemopreventive agent. Anticancer Agent', *Anticancer Agents Med Chem.*, **2006**, 6(6), 571-577
100. H. Safdari, A. Neshani, A. Sadeghian, M. Ebrahimi, M. Iranshahi, H. Sadeghian, 'Potent and selective inhibitors of class A b-lactamase: 7-prenyloxy coumarins', *The Journal of Antibiotics*, **2014**, 67, 373–377
101. H. Sadeghian, M. Iranshahi, A. Jabbari, A. Orafaie, R. Mehri, S. Zeraatkar, T. Ahmadi, 'Alimardani, M.Synthesis and SAR studies of o-prenylated coumarins as potent 15-lipoxygenase inhibitors', *European Journal of Medicinal Chemistry*, **2012**, 57, 134-142
102. M. Jun, A.F. Bacay, J. Moyer, A. Webbb, D. Carrico-Moniz, 'Synthesis and biological evaluation of isoprenylated coumarins as potential anti-pancreatic cancer agents', *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, **2014**, 24, 4654–4658

103. M. Roussaki, C.A. Kontogiorgis, D.Hadjipavlou-Litina, S. Hamilakis, A. Detsi, 'A novel synthesis of 3-aryl coumarins and evaluation of their antioxidant and lipoxygenase inhibitory activity', *Bioorg. Med. Chem. Lett*, **2010**, 20, 3889-3892
104. A. Prakash, F. Rigelhof, E. Mille. 'Antioxidant Activity', http://www.medlabs.com/Downloads/Antiox_acti_.pdf
105. E. Garcia, T. Oldoni, S. Alensar, A. Reis, A. Loguercio, R. Grande, 'Antioxidant Activity by DPPH Assay of Potential Solutions to be Applied on Bleached Teeth', *Braz Dent J.*, **2012**, 23(1), 22-27
106. O.P. Sharma, T.K. Bhat, 'DPPH antioxidant assay revisited', *Food Chemistry*, **2009**, 113, 1202–1205
107. G. Marinova, V. Batchvarov, 'Evaluation of the methods for determination of the free radical scavenging activity by DPPH', *Bulgarian Journal of Agricultural Science*, **2011**, 17 (1), 11-24
108. S.J. Yoon, J.E. Park, J. Yang, J.W. Park, 'OxyR Regulon Controls Lipid Peroxidation-mediated Oxidative Stress in *Escherichia coli*', *Journal of Biochemistry and Molecular Biology*, 2002, 35(3), 297-301
109. B. Lakshmi, J. C. Tilak, S. Adhikari, T. P. A. Devasagayam, K.K. Janardhanan, 'Inhibition of lipid peroxidation induced by γ -radiation and AAPH in rat liver and brain mitochondria by mushrooms', *Current Science*, **2005**, 88(3), 1-5
110. A. Ayala, M.F. Muñoz, S. Argüelles, 'Lipid Peroxidation: Production, Metabolism, and Signaling Mechanisms of Malondialdehyde and 4-Hydroxy-2-Nonenal', *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, **2014**, 1-31
111. A. Detsi, M. Majdalani, C.A. Kontogiorgis, D. Hadjipavlou-Litina, P. Kefalas, 'Natural and synthetic 2'-hydroxy-chalcones and aurones: Synthesis, characterization and evaluation of the antioxidant and soybean lipoxygenase inhibitory activity', *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, **2009**, 17, 8073–8085
112. E.L. Grimm, C. Brideau, N. Chauret, C.C. Chan, D. Delorme, Y. Ducharme, D. Ethier, J.P. Falguyret, R.W. Friesen, J. Guay, P. Hamel, D. Riendeau, C.S. Breau, P. Tagari, Y.Girard, 'Substituted coumarins as potent 5-lipoxygenase inhibitors', *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, **2006**, 16, 2528–2531
113. M. Iranshahi, M.Askari, A.Sahebkar, D. Hadjipavlou-Litina, 'Evaluation of antioxidant, anti-inflammatory and lipoxygenase inhibitory activities of the prenylated coumarin umbelliprenin', *DARU*, **2009**, 17(2) , 99-103
114. N. Rioux, A. Castonguay, 'Inhibitors of lipoxygenase: a new class of cancer chemopreventive agents', *Carcinogenesis* **1998**, 19(8), 1393–1400

Βιβλιογραφία

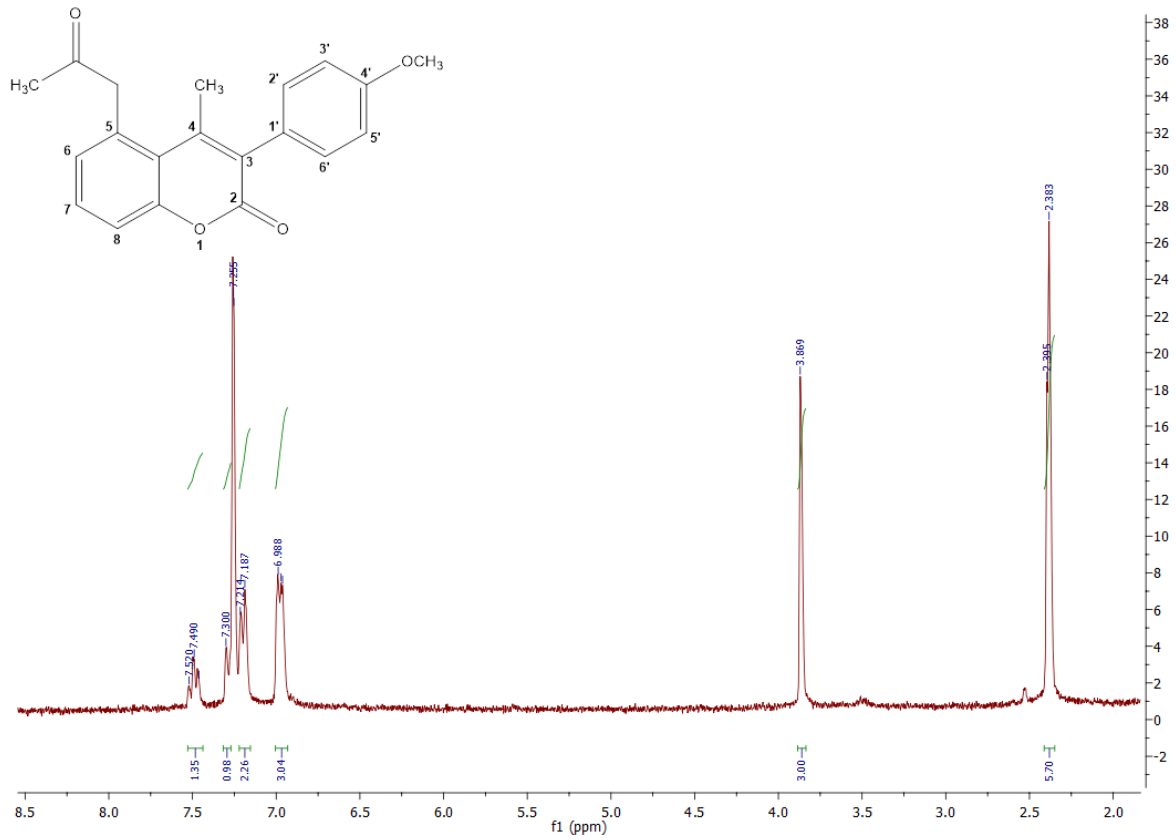
115. D. Steinhilber, B. Hofmann. 'Recent Advances in the Search of Novel 5-Lipoxygenase Inhibitors', *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology*, **2014**, 144, 70-77
116. V.S. Chedea, M. Jisaka, 'Inhibition of Soybean Lipoxygenases – Structural and Activity Models for the Lipoxygenase Isoenzymes Family', <http://cdn.intechopen.com/pdfs-wm/22600.pdf>
117. J.C. Edwards, Principles of NMR, <http://process-nmr.com/pdfs/NMR%20Overview.pdf>
118. T.L. James, Fundamentals of NMR, <https://www.biophysics.org/Portals/1/PDFs/Education/james.pdf>
119. F.A. Bovey, P.A. Mirau, H.S. Gutowsky, 'Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy', **1988**, ISBN: 978-0-12-119752-0
120. E. Reich, A. Blatter, 'Thin-Layer (Planar) Chromatography', Reference Module in Chemistry, Molecular Sciences and Chemical Engineering, **2013**, ISBN: 978-0-12-409547-2
121. H. Chaudhari, F. Chaudhari, M. Patel, P.K. Pradhan, U.M. Upadhyay, 'A Review on a Flash Chromatography', *IJPDT*, **2012**, 2(2), 80-84.
122. S. Sawhney, 'Journal of Scientific and Industrial Research', **1954**, 13, 316-318
123. M.D. Mertens, M. Gütschow, 'Synthesis and Evaluation of Two Coumarin-Type Derivatization Reagents for Fluorescence Detection of Chiral Amines and Chiral Carboxylic Acids', *Chirality*, **2013**, 25(12), 957-964
124. G. Melagraki, A. Afantitis, O. Igglessi-Markopoulou, A. Detsi, M. Koufaki, C. Kontogiorgis, D.J. Hadjipavlou-Litina, 'Synthesis and evaluation of the antioxidant and anti-inflammatory activity of novel coumarin-3-aminoamides and their alpha-lipoic acid adducts', *European Journal of Medicinal Chemistry*, **2009**, 44, 3020–3026
125. C. Kontogiorgis, K.E. Litinas, A. Makri, D.N. Nicolaides, A. Vronteli D. Hadjipavlou-Litina, E. Pontiki, A. Siohou, 'Synthesis and biological evaluation of novel angular fused pyrrolocoumarins', *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, **2008**, 23(1), 43-49

Παράρτημα φασμάτων

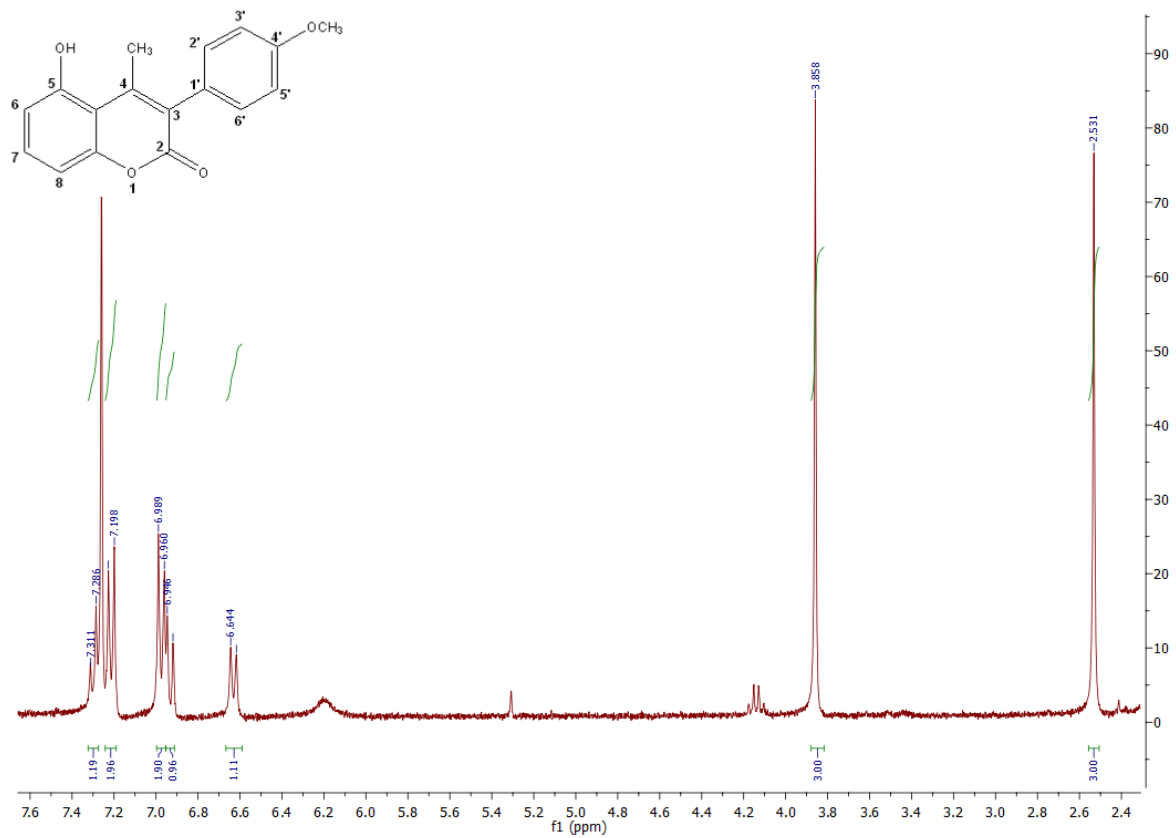


Εικόνα 13: Φάσμα πρωτονίου ¹H NMR (CDCl₃, 300MHz) της κουμαρίνης **1**

Παράρτημα φασμάτων

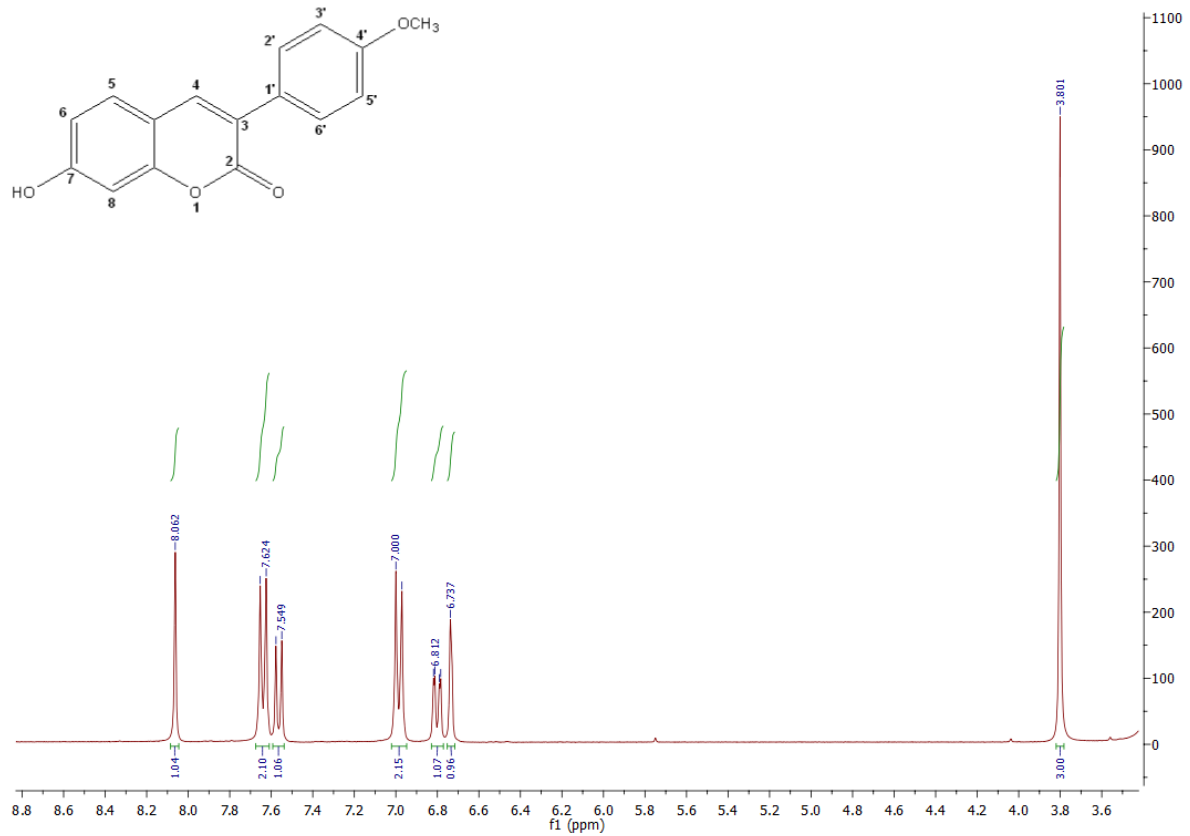


Εικόνα 14: Φάσμα πρωτονίου ^1H NMR (CDCl_3 , 300MHz) της κουμαρίνης 2

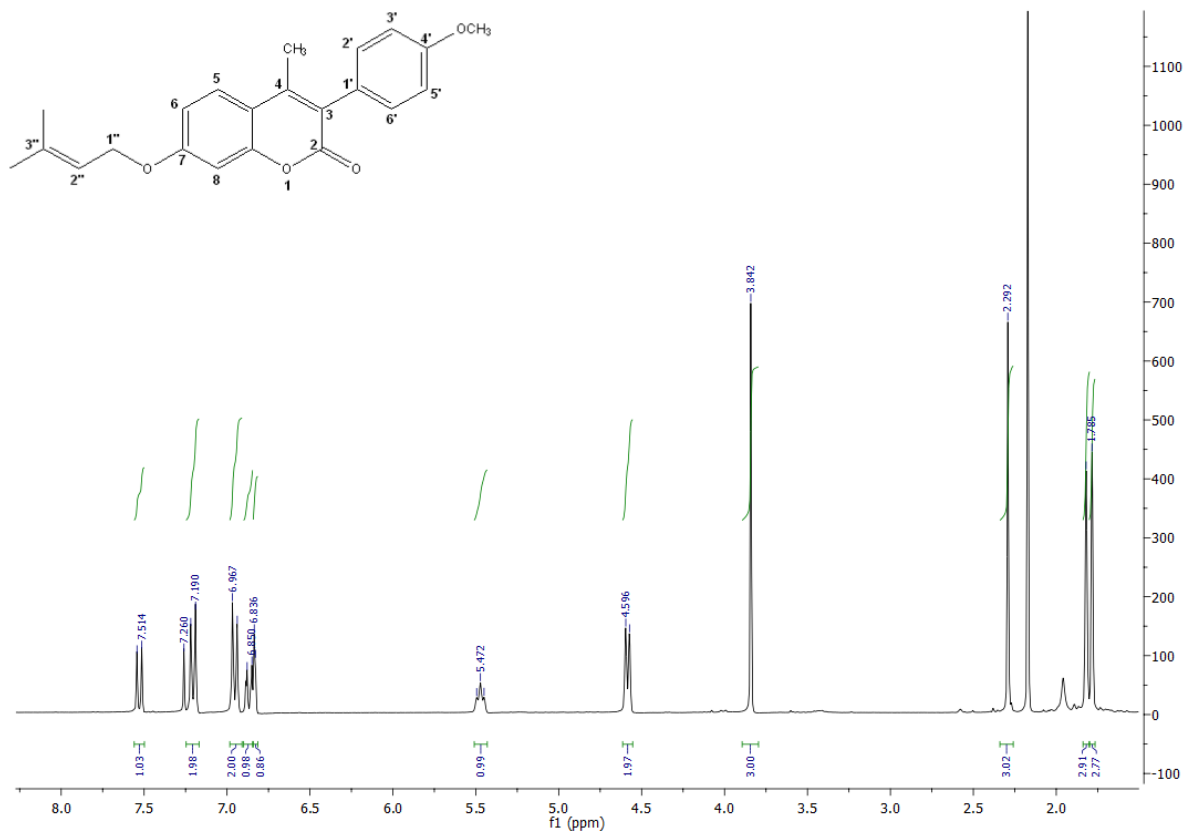


Εικόνα 15: Φάσμα πρωτονίου ^1H NMR (CDCl_3 , 300MHz) της κουμαρίνης 5

Παράρτημα φασμάτων

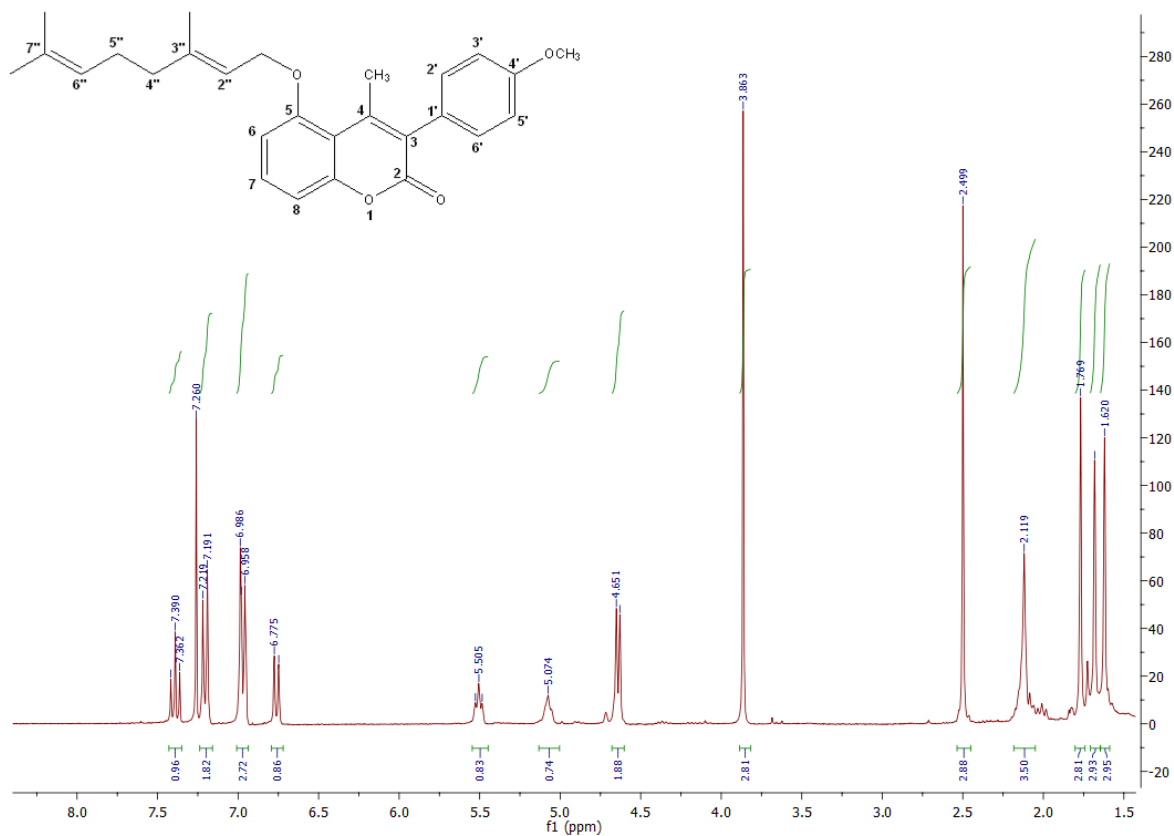


Εικόνα 16: Φάσμα πρωτονίου $^1\text{H NMR}$ (CDCl_3 , 300MHz) της κουμαρίνης **6**

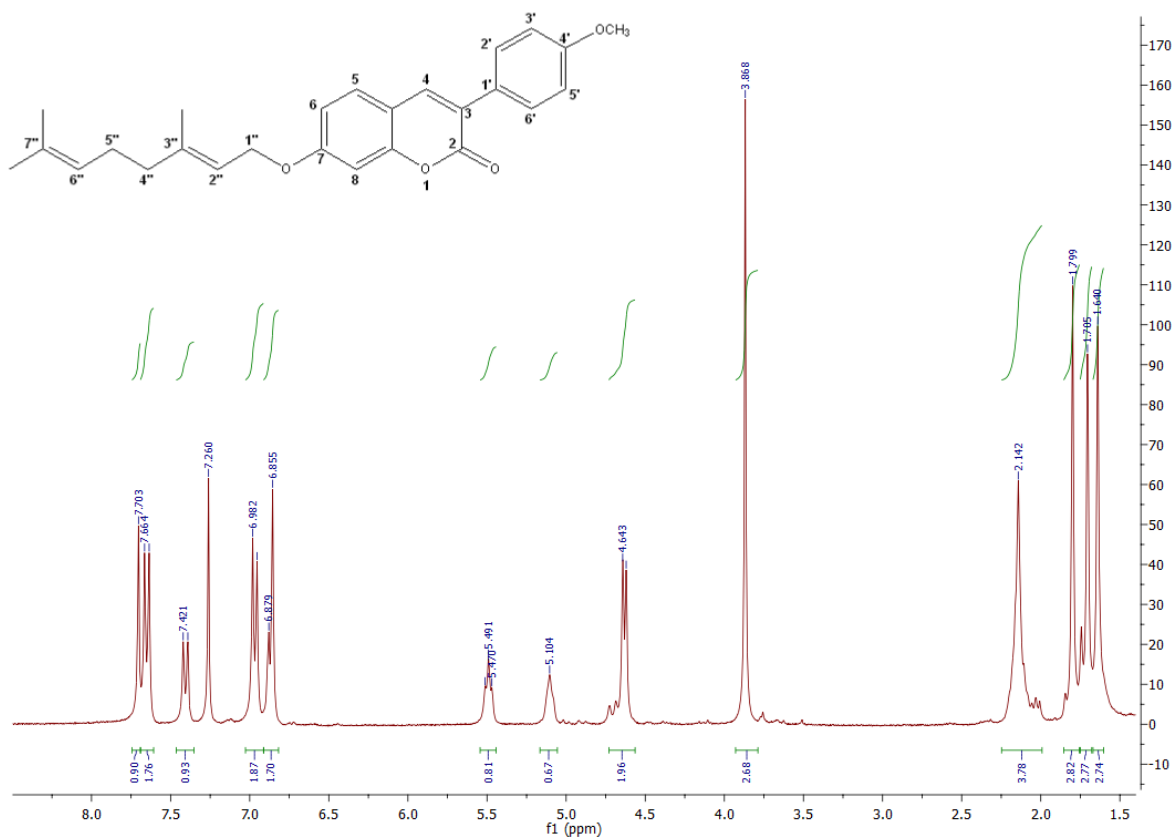


Εικόνα 17: Φάσμα πρωτονίου $^1\text{H NMR}$ (CDCl_3 , 300MHz) της κουμαρίνης **7**

Παράρτημα φασμάτων

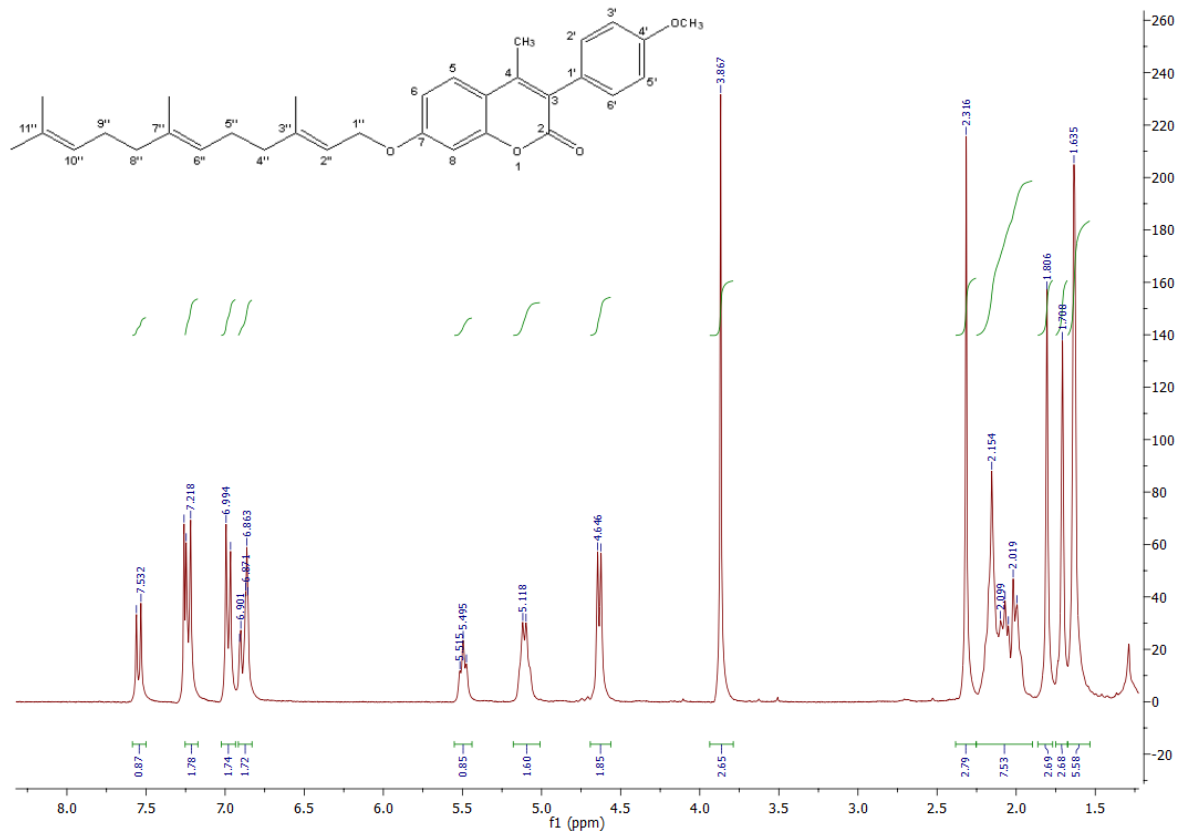


Εικόνα 18: Φάσμα πρωτονίου ^1H NMR (CDCl_3 , 300MHz) της κουμαρίνης **11**

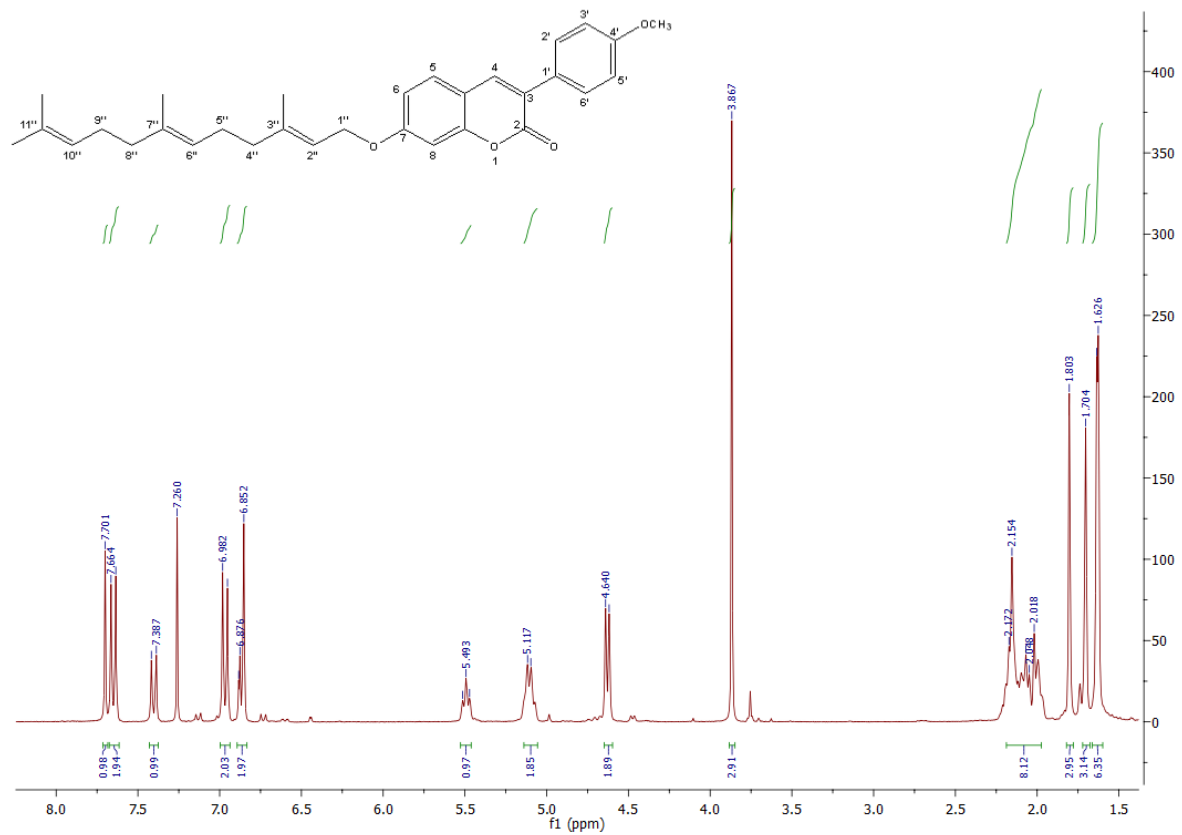


Εικόνα 19: Φάσμα πρωτονίου ^1H NMR (CDCl_3 , 300MHz) της κουμαρίνης **12**

Παράρτημα φασμάτων



Εικόνα 20: Φάσμα πρωτονίου ^1H NMR (CDCl_3 , 300MHz) της κουμαρίνης **13**



Εικόνα 21: Φάσμα πρωτονίου ^1H NMR (CDCl_3 , 300MHz) της κουμαρίνης **15**