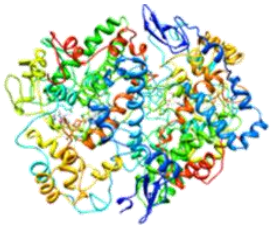
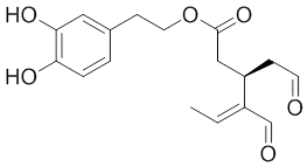
ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΗ ΣΧΟΛΗ
ΤΟΜΕΑΣ ΦΑΡΜΑΚΟΓΝΩΣΙΑΣ
& ΧΗΜΕΙΑΣ ΦΥΣΙΚΩΝ ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ
ΔΙΕΥΘΥΝΤΗΣ: Καθηγητής Αλέξιος-Λέανδρος Σκαλτσούνης

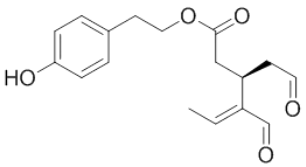
ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

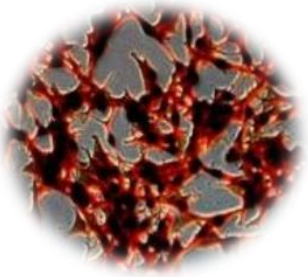
ΦΥΣΙΚΑ ΚΑΙ ΣΥΝΘΕΤΙΚΑ ΣΕΚΟΪΡΙΔΟΕΙΔΗ ΤΟΥ ΕΙΔΟΥΣ *OLEA EUROPAEA* ΜΕ ΒΙΟΛΟΓΙΚΟ ΕΝΔΙΑΦΕΡΟΝ – ΜΙΑ ΦΥΤΟΧΗΜΙΚΗ ΚΑΙ ΣΥΝΘΕΤΙΚΗ ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ



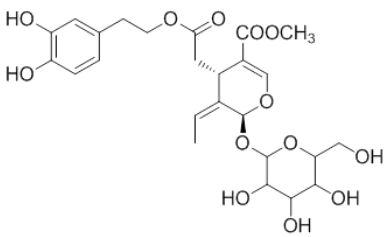












ΧΡΙΣΤΟΦΟΡΙΔΟΥ ΝΙΚΟΛΕΤΑ

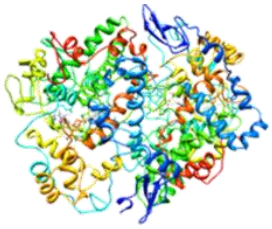
ΧΗΜΙΚΟΣ, M.Sc.

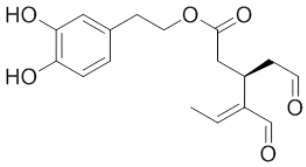
ΑΘΗΝΑ 2017

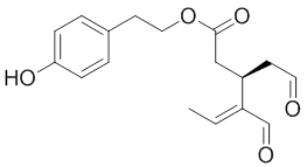
ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΗ ΣΧΟΛΗ
ΤΟΜΕΑΣ ΦΑΡΜΑΚΟΓΝΩΣΙΑΣ
& ΧΗΜΕΙΑΣ ΦΥΣΙΚΩΝ ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ
ΔΙΕΥΘΥΝΤΗΣ: Καθηγητής Αλέξιος-Λέανδρος Σκαλτσούνης

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

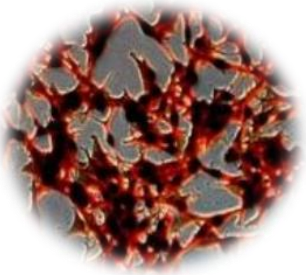
ΦΥΣΙΚΑ ΚΑΙ ΣΥΝΘΕΤΙΚΑ ΣΕΚΟΪΡΙΔΟΕΙΔΗ ΤΟΥ ΕΙΔΟΥΣ *OLEA EUROPAEA* ΜΕ ΒΙΟΛΟΓΙΚΟ ΕΝΔΙΑΦΕΡΟΝ – ΜΙΑ ΦΥΤΟΧΗΜΙΚΗ ΚΑΙ ΣΥΝΘΕΤΙΚΗ ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ



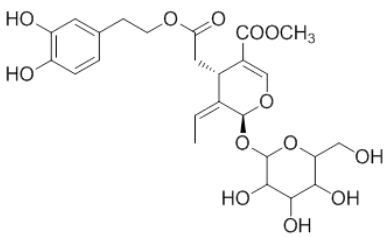












ΧΡΙΣΤΟΦΟΡΙΔΟΥ ΝΙΚΟΛΕΤΑ

ΧΗΜΙΚΟΣ, M.Sc.

ΑΘΗΝΑ 2017

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗΣ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ

ΣΚΑΛΤΣΟΥΝΗΣ ΑΛΕΞΙΟΣ- ΛΕΑΝΔΡΟΣ, ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ ΕΚΠΑ

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗΣ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ

ΣΚΑΛΤΣΟΥΝΗΣ ΑΛΕΞΙΟΣ- ΛΕΑΝΔΡΟΣ, ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ ΕΚΠΑ

ΜΗΤΑΚΟΥ ΣΟΦΙΑ, ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ ΕΚΠΑ

ΦΩΚΙΑΛΑΚΗΣ ΝΙΚΟΛΑΟΣ, ΕΠΙΚΟΥΡΟΣ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ ΕΚΠΑ

ΕΠΤΑΜΕΛΗΣ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗΣ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ

ΣΚΑΛΤΣΟΥΝΗΣ ΑΛΕΞΙΟΣ – ΛΕΑΝΔΡΟΣ, ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ ΕΚΠΑ

ΜΗΤΑΚΟΥ ΣΟΦΙΑ, ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ ΕΚΠΑ

ΦΩΚΙΑΛΑΚΗΣ ΝΙΚΟΛΑΟΣ, ΕΠΙΚΟΥΡΟΣ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ ΕΚΠΑ

ΠΟΥΛΗ ΝΙΚΟΛΑΪΣ, ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ ΕΚΠΑ

ΜΑΡΑΚΟΣ ΠΑΝΑΓΙΩΤΗΣ, ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ ΕΚΠΑ

ΚΩΣΤΑΚΗΣ ΙΩΑΝΝΗΣ, ΕΠΙΚΟΥΡΟΣ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ ΕΚΠΑ

ΖΩΪΔΗΣ ΓΡΗΓΟΡΙΟΣ, ΕΠΙΚΟΥΡΟΣ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ ΕΚΠΑ

«Το μικρό κομμάτι της άγνοιάς μας που οργανώνουμε και ταξινομούμε, το ονομάζουμε γνώση.»

Αμβρόσιος Μπηρς
Αμερικανός συγγραφέας
1842-1914

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ **9**
ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ **17**
ΣΚΟΠΟΣ – ΔΙΑΡΘΡΩΣΗ **23**
ΠΕΡΙΛΗΨΗ **25**
ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΠΡΩΤΟ: Ι. ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ **29**
I.1 Εισαγωγή – Μεσογειακή Διατροφή **31**
I.2 Η οικογένεια *Oleaceae* **31**
I.2.a *Μορφολογικά χαρακτηριστικά* **31**
I.3 Το γένος Olea **32**
I.4 Το είδος *Olea europaea* L. **32**
I.4.a *Ιστορική Αναδρομή* **34**
I.4.b *Γεωγραφική εξάπλωση* **34**
I.4.c *Χρήσεις και φαρμακολογικές δράσεις του είδους Olea europaea* **35**
I.4.d *Συστατικά που απαντώνται στην Olea europaea* **37**
I.4.d.1 Συστατικά που απαντώνται στο φλοιό της ελιάς *37*
I.4.d.2 Συστατικά που απαντώνται στον ελαιόκαρπο *38*
I.4.d.3 Συστατικά που απαντώνται στα φύλλα της ελιάς *39*
I.4.d.4 Συστατικά που απαντώνται στο ελαιόλαδο *39*
I.4.d.5 Συστατικά που απαντώνται στα υγρά απόβλητα ελαιοτριβείων (OMWW) *40*
I.5 Ελαιοευρωπαΐνη, μια πρώτη ύλη για σύνθεση και φαρμακολογία **47**
I.5.a *Εισαγωγή* **47**
I.5.b *Η Ελαιοευρωπαΐνη* **48**
I.5.b.1 Ιστορική Αναδρομή *48*
I.5.b.2 Δομή και περιγραφή *49*
I.5.b.3 Πηγές Ελαιοευρωπαΐνης *50*
I.5.c *Βιολογικές και φαρμακολογικές δράσεις της Ελαιοευρωπαΐνης* 52
I.5.c.1 Αντιοξειδωτική δράση 52
I.5.c.1.1 Δράση ανασταλτική της οξείδωσης της LDL1 λιποπρωτεΐνης *53*
I.5.c.1.2 Αντι-αθηρωγόνος δράση *53*
I.5.c.1.3 Δράση ως δεσμευτές ελευθέρων ριζών *53*
I.5.c.1.4 Δράση έναντι της υπεριώδους ακτινοβολίας UV-B *54*
I.5.c.2 Αντιμικροβιακή δράση *54*
I.5.c.3 Αντιφλεγμονώδης δράση *54*
I.5.c.3.1 Ρευματοειδής Αρθρίτιδα *54*
I.5.c.3.2 Επούλωση πληγών *54*
I.5.c.4 Αντιϊκή δράση *55*
I.5.c.5 Αντικαρκινική δράση *55*
I.5.c.5.1 Καρκίνος του παχέος εντέρου *55*
I.5.c.5.2 Καρκίνος του μαστού *55*
I.5.c.5.3 Καρκίνος του προστάτη *55*
I.5.c.6 Κυτταροτοξική δράση *56*
I.5.c.7 Αντιθρομβωτική και anti-PAF δράση *56*
I.5.c.8 Δράση έναντι της στεφανιαίας καρδιακής νόσου *56*
I.5.c.9 Αντιδιαβητική δράση *56*
I.5.c.10 Αντι-νευροεκφυλιστική – Νευροπροστατευτική δράση *56*
I.5.c.11 Άλλες βιολογικές δράσεις *56*
I.6 Ολεασίνη, το ισχυρότερο αντιοξειδωτικό του ελαιολάδου **59**
I.6.a *Εισαγωγή* **59**
I.6.b *Η ολεασίνη* **59**
I.6.b.1 Δομή και περιγραφή της ολεασίνης 59
I.6.b.2 Ιστορική αναδρομή 61
I.6.c Οργανοληπτικά χαρακτηριστικά και φαρμακολογικές δράσεις της ολεασίνης **61**
I.6.c.1 Αντιοξειδωτική δράση 61
I.6.c.2 Αντιφλεγμονώδης δράση 62
I.6.c.3 Αντισυσσωματική δράση 62
I.6.c.4 Αντιβακτηριακή δράση 62
I.6.c.5 Αντικαρκινική δράση 63

I.7 Ολεοκανθάλη, το φαινολικό συστατικό του ελαιολάδου με την καυστική γεύση 65
I.7.a *Εισαγωγή* 65
I.7.b *Η ολεοκανθάλη* 65
I.7.b.1 Δομή και περιγραφή 65
I.7.b.2 Ιστορική αναδρομή 66
I.7.c *Οργανοληπτικά χαρακτηριστικά και Φαρμακολογικές δράσεις της ολεοκανθάλης* 66
I.7.c.1 Αντιφλεγμονώδης δράση **68**
I.7.c.1.1 Ρευματοειδής αρθρίτιδα και Νευροπροστατευτική δράση *68*
I.7.c.2 Αντιμικροβιακή δράση 68
I.7.c.3 Άλλες δράσεις 68
ΓΕΝΙΚΕΣ ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΕΣ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΕΣ 69
ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΔΕΥΤΕΡΟ: ΙΙ. ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΚΑΙ ΦΥΤΟΧΗΜΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ ΦΥΣΙΚΩΝ ΠΡΟΙΟΝΤΩΝ 85
II.1 Μέθοδοι απομόνωσης Ελαιοευρωπεΐνης από την *Olea europaea* 89
II.1.a *Μέθοδοι και τεχνικές απομόνωσης της ελαιοευρωπεΐνης από φύλλα της Olea europaea* 89
II.1.a.1.1 Περιγραφή μεθόδου 89
II.1.a.1.1.1 Φυγόκεντρος χρωματογραφία κατανομής (CPC) 89
II.1.a.1.1.2 Χρωματογραφία στήλης (CC) 90
II.1.a.1.1.3 Χρωματογραφία ανοικτής στήλης υπό κενό (Shot) 91
II.2 Μέθοδοι απομόνωσης Ολεασίνης από την *Olea europaea* 93
II.2.a *Απομόνωση ολεασίνης από πολυφαινολικό εκχύλισμα εξαιρετικά παρθένου ελαιολάδου* 93
II.2.a.1 Περιγραφή Μεθόδου 93
II.2.a.1.1 Χρωματογραφία μοριακού αποκλεισμού (SEC) 94
II.2.a.1.2 Χρωματογραφία στήλης (CC) 94
II.2.a.1.3 Υγρή χρωματογραφία μέσης πίεσης (Medium Pressure Liquid Chromatography, MPLC) 95
II.2.a.1.4 Υγρή χρωματογραφία υψηλής πίεσης ή απόδοσης υψηλής (HPLC) 95
II.2.b *Απομόνωση ολεασίνης από φύλλα της Olea europaea* 97
II.2.b.1 Περιγραφή μεθόδου 97
II.2.b.1.1 Δοκιμή με φύλλα ελιάς από την Κρήτη 97
II.2.b.1.2 Δοκιμή με φύλλα ελιάς που συλλέχθηκαν από εμάς 98
II.2.c *Απομόνωση ολεασίνης από καρπούς της Olea europaea* 101
II.2.c.1 Περιγραφή μεθόδου *101*
II.2.c.1.1 Απομόνωση ολεασίνης από φρέσκες, ώριμες μαυροελιές 101
II.2.c.1.2 Απομόνωση ολεασίνης από προχωρημένης ωρίμανσης, μαύρες «λιανοελιές» 103
II.2.d *Απόλυτη στερεοχημεία της ολεασίνης, ως προϊόν απομόνωσης από την Olea europaea* 103
II.3 Απομόνωση ελαιοευρωπεΐνης από την *Olea europaea* 109
II.3.a *Φυγόκεντρος χρωματογραφία κατανομής (CPC)* 109
II.3.b *Χρωματογραφία στήλης (CC)* 110
II.3.c *Χρωματογραφία ανοικτής στήλης υπό κενό (Shot)* 111
II.4 Απομόνωση ολεασίνης από την *Olea europaea* 113
II.4.a *Απομόνωση ολεασίνης από πολυφαινολικό εκχύλισμα εξαιρετικά παρθένου Ελαιολάδου* 113
II.4.a.1 Χρωματογραφία μοριακού αποκλεισμού (SEC) *113*
II.4.a.2 Χρωματογραφία στήλης (CC) *114*
II.4.a.3 Υγρή χρωματογραφία μέσης πίεσης (MPLC) *115*
II.4.a.4 Υγρή χρωματογραφία υψηλής πίεσης ή υψηλής απόδοσης (HPLC[36]) *116*
II.4.b *Απομόνωση ολεασίνης από φύλλα της Olea europaea* 117
II.4.b.1 Δοκιμή με φύλλα ελιάς από την Κρήτη *117*
II.4.b.2 Δοκιμή με φύλλα ελιάς που συλλέχθηκαν από την ομάδα μας *118*
II.4.c *Απομόνωση ολεασίνης από καρπούς της Olea europaea* 120
II.4.c.1 Απομόνωση ολεασίνης από φρέσκες, ώριμες μαυροελιές *120*
II.4.c.2 Απομόνωση ολεασίνης από προχωρημένης ωρίμανσης, μαύρες «λιανοελιές» *122*
II.5 Απομόνωση και ταυτοποίηση φυσικών προϊόντων από υγρό ελαιουργικό απόβλητο («*Κατσίγαρος*») – OMWW 127
II.5.a *Εισαγωγή* 127
II.5.b *Περιγραφή Μεθόδου* 127
II.6 Απομόνωση και ταυτοποίηση φυσικών προϊόντων από υγρό ελαιουργικό απόβλητο («*Κατσίγαρος*») – OMWW 131
II.6.a *Περιγραφή Μεθόδου* 131
II.6.b *Ταυτοποίηση φυσικών προϊόντων που απομονώθηκαν από υγρό ελαιουργικό απόβλητο* 133
II.6.b.1 Προϊόντα ήδη γνωστά από προηγούμενη μελέτη 133

ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΤΡΙΤΟ: ΙΙΙ. ΣΥΝΘΕΣΗ ΦΥΣΙΚΩΝ ΠΡΟΙΟΝΤΩΝ 141
ΙΙΙ.1. ***Απόπειρα ολικής σύνθεσης του φυσικού προϊόντος νουζενίδη*** 145
ΙΙΙ.1.a. ***Εισαγωγή*** **145**
ΙΙΙ.1.b. ***Παρουσίαση του νουζενίδη*** **145**
ΙΙΙ.1.b.1. Δομή του νουζενίδη *145*
ΙΙΙ.1.b.2. Πηγές νουζενίδη *146*
ΙΙΙ.1.c. ***Φαρμακολογικές δράσεις του νουζενίδη*** **146**
ΙΙΙ.1.d. ***Ολική σύνθεση του νουζενίδη*** **147**
ΙΙΙ.1.d.1. Στάδιο 1ο: Σύνθεση της 1,2,3,4-τετρα-Ο-ακετυλο-6-τριτυλο-β-D-γλυκοπυρανόζης (12), με πρώτη ύλη τη γλυκόζη 148
ΙΙΙ.1.d.1.1. Περιγραφή μεθόδου 148
ΙΙΙ.1.d.1.2. Μελέτη δομής 150
ΙΙΙ.1.d.2. Στάδιο 2ο: Σύνθεση της 1,2,3,4-τετρα-Ο-ακέτυλο-β-D-γλυκοπυρανόζης 151
ΙΙΙ.1.d.2.1. Περιγραφή μεθόδου 151
ΙΙΙ.1.d.2.2. Μελέτη δομής 152
ΙΙΙ.1.d.3. Στάδιο 3ο: Σύνθεση της 1,2,3,4-τετρα-Ο-ακετυλο-6-χλωροακετυλο-β-D-γλυκοπυρανόζης (14) 153
ΙΙΙ.1.d.3.1. Περιγραφή μεθόδου 153
ΙΙΙ.1.d.3.2. Μελέτη δομής 154
ΙΙΙ.1.d.4. Στάδιο 4ο: Σύνθεση της 2,3,4-τρι-Ο-ακετυλο-1-βρωμο-6-χλωροακετυλο-β-D-γλυκοπυρανόζης (15) 155
ΙΙΙ.1.d.4.1. Περιγραφή μεθόδου 155
ΙΙΙ.1.d.4.2. Μελέτη δομής 157
ΙΙΙ.1.d.5. Στάδιο 5ο: Σύνθεση της 1-[2-(4-ακετοξυ-φαινυλο)αιθανόλη]-2,3,4-τρι-Ο-ακετυλο-6-χλωροακετυλο-β-D-γλυκοπυρανόζης (16) 160
ΙΙΙ.1.d.5.1. Περιγραφή μεθόδου 160
ΙΙΙ.1.d.5.2. Μελέτη δομής 161
ΙΙΙ.1.d.6. Στάδιο 6ο: Σύνθεση της 1-[2-(4-ακετοξυ-φαινυλο)αιθανόλη]-2,3,4-τρι-Ο-ακετυλο-β-D-γλυκοπυρανόζης 163
ΙΙΙ.1.d.6.1. Περιγραφή μεθόδου 163
ΙΙΙ.1.d.6.2. Μελέτη δομής 164
ΙΙΙ.2 ***Ημισύνθεση της ολεασίνης, με πρώτη ύλη την ελαιοευρωπεΐνη*** 167
ΙΙΙ.2.a ***Εισαγωγή – Περιγραφή μεθόδου*** **167**
ΙΙΙ.2.b ***Μελέτη δομής*** **168**
ΙΙΙ.2.c ***Απόλυτη στερεοχημεία της ολεασίνης, ως προϊόν ημισύνθεσης της ελαιοευρωπεΐνης*** **169**
ΙΙΙ.3. Ημισύνθεση της ολεοκανθάλης, με πρώτη ύλη την ελαιοευρωπεΐνη **171**
ΙΙΙ.3.a. Εισαγωγή **171**
ΙΙΙ.3.b. ***Σύνθεση του ενδιαμέσου ολεοσίδη, με πρώτη ύλη την ελαιοευρωπεΐνη*** **174**
ΙΙΙ.3.b.1. Περιγραφή μεθόδου *174*
ΙΙΙ.3.b.2. Μελέτη δομής *177*
ΙΙΙ.3.c. ***Σύνθεση του 7-[2-(4-υδροξυφαινυλ)-αιθυλ] εστέρα του ολεοσίδη, πρόδρομη ένωση της ολεοκανθάλης, με πρώτη ύλη τον ολεοσίδη*** 178
ΙΙΙ.3.c.1. Περιγραφή μεθόδου *178*
ΙΙΙ.3.c.2. Μελέτη δομής *183*
ΙΙΙ.3.d. ***Σύνθεση της ολεοκανθάλης, με πρώτη ύλη τον 7-[2-(4-υδροξυφαινυλ)-αιθυλ]εστέρα του ολεοσίδη*** **184**
ΙΙΙ.3.d.1. Περιγραφή μεθόδου *184*
ΙΙΙ.3.d.2. Μελέτη δομής *185*
ΙΙΙ.4 Ολική σύνθεση του νουζενίδη 189
ΙΙΙ.4.a Στάδιο 1ο: Σύνθεση της 1,2,3,4-τετρα-Ο-ακετυλο-6-τριτυλο-β-D-γλυκοπυρανόζης (12), με πρώτη ύλη τη γλυκόζη **189**
ΙΙΙ.4.b Στάδιο 2ο: Σύνθεση της 1,2,3,4-τετρα-Ο-ακέτυλο-β-D-γλυκοπυρανόζης (13) **190**
ΙΙΙ.4.c Στάδιο 3ο: Σύνθεση της 1,2,3,4-τετρα-Ο-ακετυλο-6-χλωροακετυλο-β-D-γλυκοπυρανόζης (14) **191**
ΙΙΙ.4.d Στάδιο 4ο: Σύνθεση της 2,3,4-τρι-Ο-ακετυλο-1-βρωμο-6-χλωροακετυλο-β-D-γλυκοπυρανόζης (15) **192**
ΙΙΙ.4.e Στάδιο 5ο: Σύνθεση της 1-[2-(4-ακετοξυ-φαινυλο)αιθανόλη]-2,3,4-τρι-Ο-ακετυλο-6-χλωροακετυλο-β-D-γλυκοπυρανόζης (16) **193**
ΙΙΙ.4.f Στάδιο 6ο: Σύνθεση της 1-[2-(4-ακετοξυ-φαινυλο)αιθανόλη]-2,3,4-τρι-Ο-ακετυλο-6-χλωροακετυλο-β-D-γλυκοπυρανόζης (17) **194**
ΙΙΙ.5 Ημισύνθεση ολεασίνης, με πρώτη ύλη ελαιοευρωπεΐνη – αντίδραση Krapcho **195**
ΙΙΙ.6 Ημισύνθεση της ολεοκανθάλης, με πρώτη ύλη την ελαιοευρωπεΐνη **197**
ΙΙΙ.6.a ***Σύνθεση του 11-μεθυλεστέρα του ολεοσίδη (26)*** 197

III.6.b ***Σύνθεση του ολεοσίδη (22)*** **198**
III.6.c ***Σύνθεση του τετραοξικού ολεοσίδη (23)*** **199**
III.6.d ***Σύνθεση του τετραοξικού 7-[2-(4-ακετοξυφαινυλ)-αιθυλ]εστέρα του ολεοσίδη (25)*** **200**
III.6.d.1 Σύνθεση της 2-(4-ακετοξυ-φαινυλο) αιθανόλης (20) *200*
III.6.d.1.1 1ος τρόπος *200*
III.6.d.1.2 2ος τρόπος *200*
III.6.d.2 Σύνθεση του τετραοξικού 7-[2-(4-ακετοξυφαινυλ)-αιθυλ]εστέρα του ολεοσίδη (25) *201*
III.6.d.3 Σύνθεση του 7-[2-(4-υδροξυφαινυλ)-αιθυλ]εστέρα του ολεοσίδη (24) *202*
III.6.d.4 Σύνθεση της ολεοκανθάλης (3) *203*
ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΤΕΤΑΡΤΟ: IV. ΗΜΙΣΥΝΘΕΣΗ ΑΝΑΛΟΓΩΝ ΕΛΑΙΟΕΥΡΩΠΕΪΝΗΣ & ΟΛΕΑΣΙΝΗΣ **205**
IV.1. Ημισύνθεση παραγώγων της Ελαιοευρωπεΐνης **209**
IV.1.a. ***Η Ελαιοευρωπεΐνη, ως πρώτη ύλη*** **209**
IV.1.b. Γενική μέθοδος σαπωνοποίησης **211**
IV.1.b.1. Περιγραφή μεθόδου *211*
IV.1.b.1.1. Κλασσική Μέθοδος 211
IV.1.b.1.2. Μέθοδος Μικροκυμάτων 212
IV.1.b.2. Μελέτη Δομής 212
IV.1.c. ***Γενική μέθοδος ακετυλίωσης*** 214
IV.1.d. ***Γενικές μέθοδοι εστεροποίησης*** 214
IV.1.d.1. Γενική μέθοδος εστεροποίησης με βρωμίδια *214*
IV.1.d.2. Γενική μέθοδος εστεροποίησης με αλκοόλες, αμίνες ή θειόλες *216*
IV.1.e. ***Γενική μέθοδος αποπροστασίας*** 217
IV.2. Ημισύνθεση παραγώγων της Ολεασίνης **219**
IV.2.a. ***Ημισυνθετικά ανάλογα ολεασίνης*** 219
IV.2.a.1. Σύνθεση αναλόγων με πρώτη ύλη την ολεασίνη 219
IV.2.a.1.1. Αναγωγή – Σύνθεση της διόλης (28) 219
IV.2.a.1.1.1. Περιγραφή μεθόδου 219
IV.2.a.1.1.2. Μελέτη δομής 220
IV.2.a.1.2. Σαπωνοποίηση – Σύνθεση του οξέος της διόλης (29) 221
IV.2.a.1.2.1. Περιγραφή μεθόδου 221
IV.2.a.1.2.2. Μελέτη δομής 222
IV.2.a.1.3. Κυκλοποίηση του οξέος της διόλης (29) – Σύνθεση της λακτόνης (30) 223
IV.2.a.1.3.1. Μελέτη δομής 223
IV.2.a.1.4. Σύνθεση της διοξίμης (31) 224
IV.2.a.1.4.1. Περιγραφή μεθόδου 224
IV.2.a.1.4.2. Μελέτη δομής 225
IV.2.a.1.5. Σύνθεση της ακετυλο-διόλης (32) 226
IV.2.a.1.5.1. Περιγραφή μεθόδου 226
IV.2.a.1.5.2. Μελέτη δομής 227
IV.2.a.1.6. Σύνθεση των MEM αναλόγων του οξέος (33α) και της λακτόνης του οξέος (33b) 228
IV.2.a.1.6.1. Περιγραφή μεθόδου 228
IV.2.a.1.6.2. Μελέτη δομής 229
IV.2.a.1.7. Σύνθεση της ακετυλο λακτόνης του οξέος (34) 229
IV.2.a.1.7.1. Περιγραφή μεθόδου 229
IV.2.a.1.7.2. Μελέτη δομής 229
IV.2.a.1.8. Σύνθεση της λακτόλης (35) 230
IV.2.a.1.8.1. Περιγραφή μεθόδου 230
IV.2.a.1.8.2. Μελέτη δομής 230
IV.2.a.2. Σύνθεση αναλόγων με πρώτη ύλη την ελαιοευρωπεΐνη 231
IV.2.a.2.1. Σύνθεση του οξέος (36) 231
IV.2.a.2.1.1. Περιγραφή μεθόδου 231
IV.2.a.2.1.2. Μελέτη δομής 232
IV.2.a.2.2. Σύνθεση της ισο-ολεοκανθάλης (37) 233
IV.2.a.2.2.1. Περιγραφή μεθόδου 233
IV.2.a.2.2.2. Μελέτη δομής 234
IV.2.a.2.3. Σύνθεση του αδαμαντανο αναλόγου (38) 237
IV.2.a.2.3.1. Περιγραφή μεθόδου 237
IV.2.a.2.3.2. Μελέτη δομής 238
IV.2.a.2.4. Σύνθεση του κυκλοεξυλ αιθυλο αναλόγου (39) *239*

IV.2.a.2.4.1. Περιγραφή μεθόδου *239*
IV.2.a.2.4.2. Μελέτη δομής *240*
IV.3. Ημισύνθεση παραγώγων της Ελαιοευρωπεΐνης **243**
IV.3.a. ***Ελαιοευρωπεΐνη, ως πρώτη ύλη*** **243**
IV.3.b. ***Γενική μέθοδος σαπωνοποίησης*** **244**
IV.3.b.1. Πειραματική διαδικασία *244*
IV.3.b.1.1. Κλασική μέθοδος *244*
IV.3.b.1.2. Μέθοδος μικροκυμάτων (MW) *244*
IV.3.b.2. 11-μεθυλεστέρας του ολεοσίδη (26) *245*
IV.3.b.2.1. Κλασική μέθοδος *245*
IV.3.b.2.2. Μέθοδος μικροκυμάτων *245*
IV.3.b.3. Ολεοσίδης (22) *246*
IV.3.c. ***Γενική μέθοδος ακετυλίωσης*** 247
IV.3.c.1. Τετραοξικός 11-μεθυλεστέρας του ολεοσίδη (27) *248*
IV.3.c.2. Τετραοξικός ολεοσίδης (23) *249*
IV.3.d. ***Γενικές μέθοδοι εστεροποίησης*** 250
IV.3.d.1. Γενική μέθοδος εστεροποίησης με βρωμίδια 250
IV.3.d.1.1. Τετραοξικός 7-αλλυλεστέρας 11-μεθυλεστέρας του ολεοσίδη (40) 251
IV.3.d.1.2. Τετραοξικός 11-μεθυλεστέρας 7-(τετραβενζοϋλο γλυκοπυρανόζυλο) εστέρας του ολεοσίδη (41) 252
IV.3.d.2. Προϊόντα εστεροποίησης με αλκοόλες - ***Αλκυλο εστέρες*** *– προφίλ* 253
IV.3.d.2.1. Αλκυλο εστέρες τετραοξικού 11-μεθυλεστέρα του ολεοσίδη 253
IV.3.d.2.1.1 Τετραοξικός 7-αιθυλεστέρας 11-μεθυλεστέρας του ολεοσίδη (42) 253
IV.3.d.2.1.2 Τετραοξικός 11-μεθυλεστέρας 7-προπυλεστέρας του ολεοσίδη (43) 254
IV.3.d.2.1.3 Τετραοξικός 7-κετυλεστέρας 11-μεθυλεστέρας του ολεοσίδη (44) 255
IV.3.d.2.1.4 Τετραοξικός 7-(μεθυλ-αδαμαντανο) εστέρας 11-μεθυλεστέρας του ολεοσίδη (45) . 256
IV.3.d.2.2 Αλκυλο εστέρες του τετραοξικού ολεοσίδη 257
IV.3.d.2.2.1 Τετραοξικος 7-μεθυλεστέρας του ολεοσίδη (46) 257
IV.3.d.2.2.2 Τετραοξικός 7-κετυλεστέρας του ολεοσίδη (47) 258
IV.3.d.2.2.3 Τετραοξικός 7-(μεθυλ-αδαμαντανο) εστέρας του ολεοσίδη (48) 259
IV.3.d.2.2.4 Τετραοξικός 7-(κυκλοεξυλ-αιθυλ) εστέρας του ολεοσίδη (49) 260
IV.3.d.3. Προϊόντα εστεροποίησης με αμίνες - ***Αμίδιο*** *– προφίλ* 261
IV.3.d.3.1. Τετραοξικός 11-μεθυλεστέρας 7-προπυλαμίδιο του ολεοσίδη (50) 261
IV.3.d.4. Προϊόντα εστεροποίησης με αλκοόλες - ***Αρυλο εστέρες*** *– προφίλ* 262
IV.3.d.4.1. ***Αρυλο εστέρες*** *του 11-μεθυλεστέρα του ολεοσίδη* 262
IV.3.d.4.1.1. Τετραοξικός 11-μεθυλεστέρας 7-φαινυλαιθυλεστέρας του ολεοσίδη (51) 262
IV.3.d.4.1.2. Τετραοξικός λουσιδουμοσίδης D (52) 263
IV.3.d.4.1.3... Τετραοξικός 7-(1, 4-βενζοδιοξαν) αιθυλεστέρας 11-μεθυλεστέρας του ολεοσίδη (53) 264
IV.3.d.4.1.4. Τετραοξικός 11-μεθυλεστέρας 7-φαιναιθυλο θειοεστέρας του ολεοσίδη (54) 265
IV.3.d.4.1.5. Τετραοξικός λιγκστροσίδης (55) 266
IV.3.d.4.1.6. Τετραοξικός φορμοσίδης (56) 267
IV.3.d.4.1.7. Τετραοξικός 11-μεθυλεστέρας 7-[(2-υδροξυ)-φαινυλαιθυλ]εστέρας του ολεοσίδη (57) 268
IV.3.d.4.1.8. Πενταοξικός λιγκστροσίδης (58) 269
IV.3.d.4.2. ***Αρυλο εστέρες*** *του τετραοξικού ολεοσίδη* 270
IV.3.d.4.2.1. Τετραοξικός 7-[2-(4-ακετοξυ-φαινυλ)αιθυλ] εστέρας του ολεοσίδη (59) 270
IV.3.d.4.2.2. Τετραοξικός 7-φαινυλαιθυλο εστέρας του ολεοσίδη (60) 271
IV.3.e. ***Γενική μέθοδος αποπροστασίας*** 272
IV.3.e.1. Προϊόντα αποπροστασίας τετραοξικού 11-μεθυλεστέρα του ολεοσίδη 272
IV.3.e.1.1. 7-αιθυλεστέρας 11-μεθυλεστέρας του ολεοσίδη (61) 272
IV.3.e.1.2. 11-μεθυλεστέρας 7-προπυλεστέρας του ολεοσίδη (62) 273
IV.3.e.1.3. 7-κετυλεστέρας 11-μεθυλεστέρας του ολεοσίδη (63) 274
IV.3.e.1.4. 11-μεθυλεστέρας 7-προπυλαμίδιο του ολεοσίδη (64) 275
IV.3.e.1.5. 11-μεθυλεστέρας 7-φαινυλαιθυλεστέρας του ολεοσίδη (65) 276
IV.3.e.1.6. Λουσιδουμοσίδης D (66) 277
IV.3.e.1.7. 7-(1, 4-βενζοδιοξαν) αιθυλεστέρας 11-μεθυλεστέρας του ολεοσίδη (67) 278
IV.3.e.1.8. Λιγκστροσίδης (68) 279
IV.3.e.1.9. 11-μεθυλεστέρας 7-[(2-υδροξυ)-φαινυλαιθυλεστέρας] του ολεοσίδη (69) 280
IV.3.e.2. Προϊόντα αποπροστασίας του τετραοξικού ολεοσίδη 281
IV.3.e.2.1. ***Άλκυλο*** *παράγωγα αποπροστασίας του τετραοξικού ολεοσίδη* 281

IV.3.e.2.1.1. 7-μεθυλεστέρας του ολεοσίδη (70) ... 281
IV.3.e.2.1.2. 7-(κυκλοεξυλ-αιθυλ) εστέρας του ολεοσίδη (71) ... 282
*IV.3.e.2.2. **Άρυλο** παράγωγα αποπροστασίας του τετραοξικού ολεοσίδη* ... 283
IV.3.e.2.2.1. 7-[2-(4-υδροξυφαινυλ)-αιθυλ] εστέρας του ολεοσίδη (72) ... 283
IV.4 Ημισύνθεση παραγώγων ολεασίνης ... **285**
IV.4.a *Σύνθεση αναλόγων με πρώτη ύλη την ολεασίνη* ... 285
IV.4.a.1 Αναγωγή – Σύνθεση της διόλης (28) ... *285*
IV.4.a.2 Σαπωνοποίηση – Σύνθεση του οξέος(29) ... *286*
IV.4.a.3 Κυκλοποίηση του οξέος (29) – Σύνθεση της λακτόνης (30) ... *287*
IV.4.a.4 Σύνθεση της διοξίμης (31) ... *288*
IV.4.a.5 Ακετυλίωση – Σύνθεση της ακετυλο διόλης (32) ... *289*
IV.4.a.6 Σύνθεση των MEM αναλόγων του οξέος (33a) και της λακτόνης (33b) ... *290*
IV.4.a.7 Ακετυλίωση – Σύνθεση της ακετυλο λακτόνης (34) ... *291*
IV.4.a.8 Αναγωγή – Σύνθεση της λακτόλης (35) ... *292*
IV.4.b *Σύνθεση αναλόγων με πρώτη ύλη την ελαιοευρωπεΐνη* ... 293
IV.4.b.1 Σύνθεση του οξέος (36) ... *293*
IV.4.b.2 Σύνθεση της ισο-ολεοκανθάλης (37) ... *294*
IV.4.b.3 Σύνθεση του αδαμαντανο αναλόγου (38) ... *295*
IV.4.b.4 Σύνθεση του κυκλοεξυλαιθυλο αναλόγου (39) ... *296*
IV.5 Αντιδράσεις βιοκατάλυσης με ένζυμα ... **299**
IV.5.a *Περιγραφή μεθόδου* ... 299
IV.5.a.1 Ενζυμικές αντιδράσεις με χρήση αλκοολικής αφυδρογονάσης ... 299
IV.5.a.1.1 Ενζυμικές αντιδράσεις της ολεασίνης, με αλκοολική αφυδρογονάση ... 300
IV.5.a.1.2 Ενζυμική αντίδραση της διόλης της ολεασίνης, με αλκοολική αφυδρογονάση ... 301
IV.5.a.1.2.1 Περιγραφή μεθόδου ... 301
IV.5.a.1.2.2 Μελέτη δομής ... 303
IV.5.a.2 Ενζυμικές αντιδράσεις με χρήση λιπάσης ... 303
IV.5.a.2.1 Ενζυμική αντίδραση της ελαιοευρωπεΐνης (1), με λιπάση ... 304
IV.5.a.2.2 Ενζυμική αντίδραση της ολεασίνης, με λιπάση ... 305
IV.6 Αντιδράσεις βιοκατάλυσης με ένζυμα ... **309**
IV.6.a *Αντιδράσεις βιοκατάλυσης με αλκοολική αφυδρογονάση* ... **309**
IV.6.a.1 Ενζυμική αντίδραση της ολεασίνης με αλκοολική αφυδρογονάση ... 309
IV.6.a.1.1 Ενζυμική αντίδραση με ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών 1M, pH 5.8-8.0 ... *309*
IV.6.a.1.2 Ενζυμική αντίδραση με ρυθμιστικό διάλυμα 0.1 M γλυκίνης – NaOH ... *309*
IV.6.a.1.3 Ενζυμική αντίδραση με υδατικό διάλυμα 10% NaCl ... *310*
IV.6.a.1.4 Ενζυμική αντίδραση με χρήση απεσταγμένου H_2O ... *310*
IV.6.a.2 Ενζυμική αντίδραση της διόλης της ολεασίνης, με αλκοολική αφυδρογονάση ... **311**
IV.6.b *Αντιδράσεις βιοκατάλυσης με λιπάση* ... **312**
IV.6.b.1 Ενζυμική αντίδραση ελαιοευρωπεΐνης με λιπάση ... *312*
IV.6.b.2 Ενζυμική αντίδραση ολεασίνης με λιπάση ... *312*
ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΠΕΜΠΤΟ: V. ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΒΙΟΛΟΓΙΚΗΣ ΔΡΑΣΗΣ ... **317**
V.1. Αξιολόγηση κυτταροτοξικής δράσης ημισυνθετικών αναλόγων της ελαιοευρωπεΐνης ... **319**
V.1.a. Αξιολόγηση του εκχυλίσματος φύλλων ελιάς έναντι καρκινικών κυτταρικών σειρών ... **319**
V.1.b. Αξιολόγηση ημι-συνθετικών αναλόγων ελαιοευρωπεΐνης, έναντι καρκινικών κυτταρικών σειρών ... **320**
V.1.c. Αξιολόγηση της τοξικότητας του ημι-συνθετικού αναλόγου (63), σε φυσιολογικά κύτταρα ... **325**
V.1.d. In vivo αξιολόγηση της δράσης του αναλόγου (63), έναντι μελανώματος, σε ποντίκια ... **327**
V.1.e. Το ανάλογο (63) επάγει την in vivo παραγωγή αντικαρκινικών «εκτελεστών» ... **331**
V.2. Αξιολόγηση της δράσης φυσικών και συνθετικών αναλόγων, έναντι της νόσου του Alzheimer ... **333**
V.2.a. Πρωτόκολλο για την αξιολόγηση της δράσης έναντι της νόσου Alzheimer ... **333**
V.2.b. Αξιολόγηση δράσης εκχυλισμάτων και φυσικών καθαρών αναλόγων ... **334**
V.2.c. Αξιολόγηση δράσης συνθετικών αναλόγων ... **336**
V.3. Αξιολόγηση φυσικών προϊόντων και συνθετικών αναλόγων της ολεασίνης, ως αναστολέων της δράσης της κυκλοοξυγενάσης (COX) ... **339**
V.3.a. Πρωτόκολλο για την αξιολόγηση της ανασταλτικής, των COX-1 και COX-2, δράσης ... **340**
V.3.b. Αξιολόγηση της δράσης φυσικών μορίων και εκχυλισμάτων, καθώς και και συνθετικών αναλόγων, έναντι των COX-1 και COX-2 ... **341**
ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ – ΠΡΟΟΠΤΙΚΕΣ ... **350**
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Ι ... **352**
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ ... **354**

ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ

[1]**LDL**: Low Density Lipoprotein, η «κακή χοληστερόλη»
[2]**HDL**: High Density Lipoprotein, η «καλή χοληστερόλη»
[3]**DHPG**: 3,5-dihydroxyphenylglycine, 3,5-διϋδροξυ-φαινυλο γλυκόλη
[4]**PHBA**: p-hydroxybenzoic acid, p-υδροξυ-βενζοϊκό οξύ
[5]**BHA**: beta hydroxyl acid, ο-υδροξυ-βενζοϊκό οξύ, σαλικυλικό οξύ
[6]**p-HPEA-EDA**: dialdehydic form of decarboxymethyl ligstroside aglycone, oleocanthal
[7]**3,4-DHPEA-EDA**: dialdehydic form of decarboxymethyl oleuropein aglycone, oleacein
[8]**OMWW**: Olive Mill Waste Water, υγρό ελαιουργικό απόβλητο
[9]**DOPAC**: 3,4-Dihydroxyphenylacetic acid, 3,4-διϋδροξυ-φαινυλαιθανικό οξύ
[10]**ROS:** Reactive Oxygen Species, ελεύθερες ρίζες οξυγόνου
[11]**UV-B**: Ultra -Violet B radiation, ισχυρή υπεριώδη Β ακτινοβολία
[12]**ATCC**: American Type Culture Collection, ένα ιδιωτικό, μη-κερδοσκοπικό βιολογικό κέντρο, του οποίου η αποστολή επικεντρώνεται στην απόκτηση, την πιστοποίηση, την παραγωγή, τη συντήρηση, την ανάπτυξη και τη διανομή πρότυπων μικροοργανισμών, κυτταρικών σειρών και άλλων υλικών αναφοράς, διαθέσιμων για έρευνα σε επιστήμες της ζωής.
[13]**RSV**: Respiratory Syncytial Virus, Συγκυτιακός Αναπνευστικός Ιός, ανήκει στην οικογένεια Paramyxoviridae, προκαλεί προβλήματα στο αναπνευστικό σύστημα, με τη δημιουργία συγκυτίων, δηλαδή νεκρών εκφυλισμένων κυττάρων. Αποτελεί το συχνότερο αίτιο λοίμωξης τον πρώτο χρόνο ζωής.
[14]**hPIV-3**: Human Parainfluenza Virus Type 3, ανήκει στην οικογένεια Paramyxoviridae, προκαλεί την «human parainfluenza», δηλαδή μία γριπώδη ασθένεια, που προσβάλλει κυρίως παιδιά, παραμένει η δεύτερη, μετά τον RSV, κύρια αιτία νοσηλείας παιδιών κάτω των 5 ετών, που πάσχουν από ασθένεια του αναπνευστικού, σχετίζεται με την βρογχιολίτιδα και την πνευμονία
[15]**IM**: Infectious mononucleosis ή «kissing disease», Λοιμώδης Μονοπυρήνωση, προκαλείται από τον Epstein–Barr ιό (EBV), έναν ερπητοϊό της οικογένειας Herpesviridae των DNA ιών, μεταδίδεται με το σάλιο και προσβάλλει κυρίως νεαρούς ενήλικες
[16]**EBV**: Epstein–Barr Virus, Epstein–Barr ιός
[17]**HIV-1**: Human Immunodeficiency Virus 1, Ιός Ανθρώπινης Ανοσοανεπάρκειας
[18]**LNCaP κύτταρα**: Lymph Node Carcinoma of the Prostate, σχετίζεται με τον καρκίνο του προστάτη, είναι μία ορμονοεξαρτώμενη (ανδρογονο-ευαίσθητη) κυτταρική σειρά ανθρώπινων κυττάρων που χρησιμοποιούνται συνήθως στον τομέα της ογκολογίας.
[19]**DU145 (DU-145)**: «κλασική», μη ορμονοεξαρτώμενη κυτταρική σειρά ανθρώπινου καρκίνου του προστάτη. Τα DU145 κύτταρα έχουν μέτρια δυνατότητα μετάστασης. Η κυτταρική σειρά DU145 προήλθε από μετάσταση στον εγκέφαλο.
[20]**BPH-1**: Benign prostatic hyperplasia epithelial cell line, ορμονοεξαρτώμενη (από στερεοειδείς ορμόνες) κυτταρική σειρά επιθηλιακών κυττάρων του προστάτη με καλοήθη υπερπλασία.
[21]**PAF**: Platelet-activating factor, Παράγοντας Ενεργοποίησης Αιμοπεταλίων, λιποειδική ένωση που ανήκει στην τάξη των φωσφολιποειδών, είναι ένας πανίσχυρος ενεργοποιητής και μεσολαβητής πολλών λειτουργιών των λευκών αιμοσφαιρίων. Προκαλεί συγκόλληση των αιμοπεταλίων, διαστολή των αιμοφόρων αγγείων, ερεθισμό και αναφυλαξία. Επιπλέον, συμμετέχει στους μηχανισμούς της αιμόστασης. Ο PAF είναι εν δυνάμει φλεγμονώδης παράγων. Anti-PAF δράση, δράση έναντι της συσσωμάτωσης των αιμοπεταλίων.
[22]**DXR**: Doxorubicin, Δοξορουβικίνη
[23]**ACE**: Angiotensin Converting Enzyme, Μετατρεπτικό ένζυμο της αγγειοτενσίνης
[24]**DPPH**: 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl, ελεύθερη ρίζα 1,1 διφαινυλ-2-πικρυλυδραζυλίου
[25]**ABTS**: 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid), ρίζα (2,2-αζινοδις-(3-αιθυλβενζοθειαζολίνη)-6-σουλφονικού)

[26]**PBMC**: Peripheral blood mononuclear cells
[27]**4-DMAP**: 4-Dimethylaminopyridine, 4-διμεθυλαμινο-πυριδίνη, πυρηνόφιλος καταλύτης, χρήσιμος σε ένα ευρύ φάσμα αντιδράσεων
[28]**DNA**: Deoxyribonucleic Acid, Δε(σ)οξυριβονουκλεϊ(νι)κό οξύ
[29]**m-RNA**: messenger Ribonucleic Acid, αγγελιοφόρο ριβονουκλεϊκό οξύ
[30]**COX**: cyclooxygenase enzyme 1 & 2, ένζυμο κυκλοοξυγενάσης 1 & 2
[31]**HL-60**: Human promyelocytic leukemia cells, λευχαιμική κυτταρική σειρά που έχει χρησιμοποιηθεί για εργαστηριακή έρευνα, σχετικά με το πώς σχηματίζονται ορισμένα είδη κυττάρων του αίματος.
[32]**NSAID**: Nonsteroidal anti-inflammatory drug, μη-στεροειδές αντιφλεγμονώδες φάρμακο
[33]**TRPA**1: Transient receptor potential cation channel, subfamily A, member 1, δίαυλος ιόντων
[34]**TLC**: Thin Layer Chromatography, Χρωματογραφία Λεπτής Στιβάδας, χρωματογραφική τεχνική
[35]**SEC**: Size Exclusion Chromatography, Χρωματογραφία Μοριακού Αποκλεισμού
[36]**HPLC**: High Performance/ Pressure Liquid Chromatography, Χρωματογραφία Υψηλής Απόδοσης/ Πίεσης
[37]**FCPC/ CPC**: (Fast) Centrifugal Partition Chromatography, Φυγόκεντρος Χρωματογραφία Κατανομής
[38]**SPE**: Solid-Phase Extraction, Εκχύλιση Στερεάς Φάσης
[39]**NMR**: Nuclear Magnetic Resonance, Φασματοσκοπία Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού
[40]**COSY/ COSY-LR**: Correlation Spectroscopy/ Correlation Spectroscopy Long Range (for Long Range Couplings), βελτιστοποιημένη, ομοπυρηνική, δύο διαστάσεων φασματοσκοπική τεχνική, που δίνει συσχετίσεις μεταξύ πρωτονίων μεγάλης απόστασης, με spin-spin σύζευξη
[41]**HMQC**: Heteronuclear Multiple Quantum Coherence, φασματοσκοπική τεχνική δύο διαστάσεων, που δίνει συσχετίσεις μεταξύ ανθράκων και των αντίστοιχων πρωτονίων που τους αντιστοιχούν (ατόμων άνθρακα και πρωτονίων άμεσα συνδεδεμένων).
[42]**HMBC**: Heteronuclear Multiple Bond Correlation, φασματοσκοπική τεχνική δύο διαστάσεων, που δίνει συσχετίσεις μεταξύ ανθράκων και πρωτονίων που απέχουν δύο, τρία, και, μερικές φορές σε συζευγμένα συστήματα, τέσσερις δεσμούς. Οι συσχετίσεις ατόμων άμεσα συνδεδεμένων δεν απεικονίζονται εδώ
[43]**MS/ HRMS**: Mass Spectrometry/ High Resolution Mass Spectrometry, Φασματομετρία μάζας/ Υψηλής Ανάλυσης Φασματομετρία μάζας
[44]**SFC**: Supercritical Fluid Chromatography, Χρωματογραφία υπερκρίσιμων ρευστών
[45]**CCC**: Countercurrent chromatography, Χρωματογραφία κατ' Αντιρροή
[46]**CC**: Column chromatography, Χρωματογραφία στήλης
[47]**RP**: Reverse Phase, Ανάστροφης Φάσης
[48]**MPLC**: Medium Pressure Liquid Chromatography, Υγρή Χρωματογραφία μέσης πίεσης
[49]**LC-MS**: Liquid Chromatography - Mass Spectrometry, Υγρή Χρωματογραφία συζευγμένη με Φασματογράφο Μάζας
[50]**R_f**: Retention factor, παράγων συγκράτησης ή συντελεστής επιβράδυνσης
[51]**PPAKα**: Υποδοχέας άλφα των πολλαπλασιαστών των υπεροξυσωμάτων
[52]**HT29**: Ανθρώπινη καρκινική κυτταρική σειρά παχέος εντέρου
[53]**MW**: Microwave, Μικροκύματα
[54]**FMN**: Flavin Mononucleotide/ Rivoflavin-5΄-phosphate, Φλαβινομονονουκλεοτιδίου
[55]**NAD+**: Nicotinamide Adenine Dinucleotide, Νικοτιναμιδο-Αδενινο Δινουκλεοτίδιο
[56]**YADH**: Yeast Alcohol Dehydrogenase, ένζυμο Αλκοολικής Αφυδρογονάσης Ζύμης
[57]**HLADH**: Horse Liver Alcohol Dehydrogenase, ένζυμο Αλκοολικής Αφυδρογονάσης από Συκώτι Αλόγου
[58]**MTT**: Χρωματομετρική δοκιμή για τη μέτρηση της δράσης κυτταρικών ενζύμων που ανάγουν την χρώση τετραζολίου, MTT, σε αδιάλυτη «φορμαζάνη», δίνοντας μωβ χρώμα
[59]**FM3**: Κυτταρική σειρά του ανθρώπινου μελανώματος

[60]**HCT-116**: Human Colorectal Carcinoma, μη ορμονοεξαρτώμενη κυτταρική σειρά καρκίνου του παχέος εντέρου
[61]**HeLa**: Ανθρώπινη καρκινική κυτταρική σειρά του τραχήλου της μήτρας
[62]**MCF-7**: Ορμονοεξαρτώμενη κυτταρική σειρά καρκίνου του μαστού, που απομονώθηκε το 1970, στο Michigan Cancer Foundation-7 ινστιτούτο, στο Detroit
[63]**SKBR3**: Μη ορμονοεξαρτώμενη κυτταρική σειρά αδενοκαρκινώματος του ανθρώπινου μαστού, που απομονώθηκε από το Memorial Sloan–Kettering Cancer Center το 1970
[64]**IC_{50}**: Half maximal inhibitory concentration, σχετική ημίσεια μέγιστη ανασταλτική συγκέντρωση
[65]**K562**: Human erythroleukemia cell line, ανθρώπινη ερυθρολευχαιμική κυτταρική σειρά

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον επιβλέποντα της παρούσας διδακτορικής διατριβής, Καθηγητή Αλέξιο – Λέανδρο Σκαλτσούνη, για την επιλογή και ανάθεση του θέματος, τη διαρκή καθοδήγηση και βοήθειά του, καθώς και για την οικονομική ενίσχυση κατά την παρουσία μου στην εργαστηριακή του ομάδα και την ευκαιρία να συμμετάσχω σε Διεθνή Συνέδρια και να επισκεφθώ τη Λατινική Αμερική, στα πλαίσια του προγράμματος "ChemBioFight".

Ευχαριστώ την Καθηγήτρια Σοφία Μητάκου, για την πολύτιμη βοήθειά της, κατά τη διάρκεια συγγραφής και τελικής διαμόρφωσης της παρούσας διατριβής, καθώς και για το ενδιαφέρον της καθ' όλη τη διάρκεια εκπόνησης αυτής.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Επίκουρο Καθηγητή Νικόλαο Φωκιαλάκη, ως μέλος της τριμελούς εξεταστικής επιτροπής, για τις παρατηρήσεις του, κατά τη συγγραφή της παρούσας διατριβής.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω ιδιαίτερα τα υπόλοιπα μέλη της επταμελούς εξεταστικής επιτροπής, την Καθηγήτρια Νικολαΐδα Πουλή, τον Καθηγητή Παναγιώτη Μαράκο, τον Επίκουρο Καθηγητή Ιωάννη Κωστάκη και τον Επίκουρο Καθηγητή Γρηγόριο Ζωΐδη, για την τιμή που μου έκαναν να αξιολογήσουν την παρούσα διδακτορική διατριβή.

Ένα πολύ μεγάλο «ευχαριστώ» στον επιβλέποντα και δάσκαλό μου, Dr. Nicolas Gaboriaud-Kolar, για την άψογη συνεργασία μας, τη διαρκή του στήριξη και καθοδήγηση και την πολύτιμη βοήθεια που μου προσέφερε, σε κάθε στάδιο της παρούσας διατριβής, με υπομονή, ενδιαφέρον και αγάπη.

Ένα μεγάλο «ευχαριστώ» στην επιβλέπουσά μου, κατά τη διάρκεια εκπόνησης της Μεταπτυχιακής μου εργασίας, Dr. Christelle Lemus, για την συνεργασία μας και την οργάνωση της δουλειάς μας, την καθοδήγηση, το ενδιαφέρον, την αγάπη και τη συμμετοχή της, όπου χρειάστηκε, ακόμα και μετά την αποχώρησή της από την εργαστηριακή ομάδα.

Ευχαριστώ την Επίκουρη Καθηγήτρια Μαρία Χαλαμπαλάκη, για την καθοδήγηση και τις πολύτιμες συμβουλές της, κατά τη διάρκεια εκπόνησης της παρούσας διδακτορικής διατριβής, τη λήψη φασμάτων μάζας, καθώς και τη συνεισφορά της, σε επικοινωνιακό, αλλά και επιστημονικό επίπεδο, στη συνεργασία με το Πανεπιστήμιο της Λουιζιάνα, στο Monroe των ΗΠΑ και με το Ινστιτούτο Φαρμακευτικών Επιστημών του Karl-Franzens-Universität, στο Graz της Αυστρίας, για τη βιολογική αξιολόγηση των δειγμάτων.

Θα ήθελα, επίσης, να ευχαριστήσω τη Dr. Κωνσταντίνα Βουγογιαννοπούλου, για την καθοδήγησή της και τις χρήσιμες συμβουλές της, κατά τη διάρκεια της φυτοχημικής ανάλυσης του ελαιουργικού αποβλήτου («Κατσίγαρος») και τη βοήθειά της στις ενόργανες τεχνικές που χρησιμοποιήθηκαν.

Ευχαριστώ ιδιαίτερα τον Dr. και Ε.Δ.Ι.Π. του Τομέα Φαρμακογνωσίας, Παναγιώτη Σταθόπουλο και την MSc. Μαρία Λαλιώτη, για την ανάλυση με HPLC χρωματογραφία, δειγμάτων ελιάς και άλλων δειγμάτων, όποτε αυτό ήταν απαραίτητο, καθώς και για την παροχή πρότυπου δείγματος ολεοκανθάλης, για τη μέτρηση της στροφικής ικανότητας του μορίου.

Ευχαριστώ ιδιαίτερα, για τη διεξαγωγή των βιολογικών ελέγχων κυτταροτοξικότητας στα συνθετικά ανάλογα της ελαιοευρωπεΐνης, καθώς και για τη συνεργασία μας στα πλαίσια της

συγγραφής και δημοσίευσης της σχετικής εργασίας, στο European Journal of Medicinal Chemistry, την Καθηγήτρια κα. Ουρανία Τσιτσιλώνη, καθώς και τις Διδάκτορες Πηνελόπη Σαμαρά και Κυριακή Ιωάννου, του Τμήματος Βιολογίας του ΕΚΠΑ.

Για την αξιολόγηση της βιολογικής δράσης έναντι της νόσου του Alzheimer, θα ήθελα να ευχαριστήσω την επιστημονική ομάδα της Επίκουρης Καθηγήτριας του Department of Basic Pharmaceutical Sciences, της Φαρμακευτικής Σχολής, του Πανεπιστημίου της Λουιζιάνα, στο Monroe των ΗΠΑ, Dr. Amal Kaddoumi.

Επιπλέον, για την αξιολόγηση της βιολογικής δράσης έναντι των ενζύμων COX-1 και COX-2 θα ήθελα να ευχαριστήσω την επιστημονική ομάδα του Καθηγητή Dr. Rudolf Bauer από το Institute of Pharmaceutical Sciences, του Τμήματος Φαρμακογνωσίας, του Karl-Franzens-Universität, στο Graz της Αυστρίας.

Ευχαριστώ τον Dr. Vincent Brieudes, τον Dr. Job Tchoumtchoua, την Dr. Ειρήνη Μπαίρα και την υποψήφια διδάκτορα Θεοδώρα Νίκου, για τη λήψη φασμάτων μάζας και για το ενδιαφέρον τους, όποτε χρειάστηκα τη βοήθειά τους.

Θα ήθελα, επίσης, να ευχαριστήσω τον Dr. Αποστόλη Αγγελή, για τη βοήθειά του στην ανάλυση φασμάτων και την ταυτοποίηση αγνώστων δομών.

Ένα μεγάλο «ευχαριστώ» στην αγαπημένη μου φίλη Dr. Νικητία Μέξια, για τη διαρκή της στήριξη, βοήθεια και καθοδήγηση, καθώς και το αμείωτο ενδιαφέρον της για καθετί που με απασχόλησε, καθ' όλη τη διάρκεια των μεταπτυχιακών σπουδών μου. Ακόμη, για την προσφορά της επιστημονικής της γνώσης, τη λήψη φασμάτων NMR, αλλά και τις ανεκτίμητες στιγμές που μοιραστήκαμε καθημερινά, συνυπάρχοντας στο εργαστηριακό περιβάλλον.

Ακόμη, θα ήθελα να ευχαριστήσω την υποψήφια Διδάκτορα Γεωργία Σαρικάκη, που θα συνεχίσει το παρόν πειραματικό έργο, για τη βοήθειά της στην επεξεργασία HPLC χρωματογραφημάτων δειγμάτων ελιάς.

Ευχαριστώ την υποψήφια Διδάκτορα Πηνελόπη Βλάχου, για την προσφορά δείγματος ελαιόκαρπων από την Κέρκυρα, με σκοπό τη φυτοχημική του ανάλυση.

Για τα αξέχαστα αυτά πέντε χρόνια στο εργαστήριο Φαρμακογνωσίας, θα ήθελα να ευχαριστήσω όλους τους αγαπημένους μου φίλους και συναδέλφους, και καθέναν απ' αυτούς ξεχωριστά, την Αλεξάνδρα, τον Παναγιώτη, τη Δανάη, την Άννα και το Στέλιο, καθώς και όλους τους συναδέλφους του εργαστηρίου Φαρμακογνωσίας, για τη συνεργασία μας και τις ευχάριστες στιγμές που περάσαμε μαζί στο εργαστήριο.

Τέλος, το μεγαλύτερο, ίσως, «ευχαριστώ» οφείλω στην οικογένειά μου, που με στηρίζει πάντα ενεργά στις επιλογές μου, στους γονείς μου που με αγαπούν και είναι πλάι μου σε κάθε βήμα, προς την εκπλήρωση όλων μου των στόχων.

ΣΚΟΠΟΣ – ΔΙΑΡΘΡΩΣΗ

Κατά παράδοση, στον τομέα των φυσικών προϊόντων, η ανακάλυψη και ταυτοποίηση βιοδραστικών μορίων είναι άμεσα συνδεδεμένη με τη διαδικασία διαλογής των απομονωθέντων – από μικροοργανισμούς, ανώτερους φυτικούς οργανισμούς και ζώα– ενώσεων.

Μία αποτελεσματική μέθοδος, για τη μελέτη της σχέσης δομής – δράσης, είναι η χρήση ενός φυσικού προϊόντος, δραστικού σε συγκεκριμένο βιολογικό στόχο, όταν αυτό μπορεί να απομονωθεί σε μεγάλες ποσότητες και η πραγματοποίηση ενός εύρους χημικών μετατροπών, με στόχο τη βελτίωση των φαρμακολογικών και βιολογικών δράσεων των παραγώγων του.

Στα πλαίσια αυτά, η παρούσα διατριβή είχε ως πρώτο στόχο τη σύνθεση ημισυνθετικών παραγώγων της ελαιοευρωπεΐνης, ενός σεκοϊριδοειδούς γλυκοζίτη, χαρακτηριστικού των Ολεασών (Oleaceae) και κύριου πολυφαινολικού συστατικού της ελιάς (*Olea europaea*), καθώς και της ολεασίνης και της ολεοκανθάλης, δύο εκ των κυριότερων φαινολικών συστατικών του εξαιρετικά παρθένου ελαιολάδου και των ισχυρότερων αντιοξειδωτικών του συστατικών.

Απώτερος σκοπός μας ήταν η αξιολόγηση της φαρμακολογικής δράσης δευτερογενών μεταβολιτών της *Olea europaea* και ημισυνθετικών αναλόγων αυτών.

Πιο συγκεκριμένα, με έναυσμα την αναφερόμενη, στη βιβλιογραφία, κυτταροτοξική δράση της ελαιοευρωπεΐνης, μελετήθηκε η *in vitro* και *in vivo* αντικαρκινική δράση αναλόγων αυτής. Επίσης, μελετήθηκε η βελτίωση της δράσης αυτής, κατόπιν δομικής τροποποίησης των μορίων, στα πλαίσια μελέτης της σχέσης δομής – δράσης τους.

Επιπλέον, με βάση προηγούμενα ερευνητικά αποτελέσματα που προκύπτουν από βιβλιογραφικές αναφορές σχετικά με τη νευρο-προστατευτική δράση της ολεασίνης μελετήθηκαν αντίστοιχα: η δράση έναντι της νόσου του Alzheimer και έναντι του ενζύμου κυκλοοξυγενάση (COX-1, COX-2) απομονωμένων δευτερογενών μεταβολιτών του είδους *Olea europaea* και συνθετικών αναλόγων της ολεασίνης.

ꕥ Στο πρώτο κεφάλαιο της παρούσας εργασίας, δίνονται κάποια εισαγωγικά στοιχεία σχετικά με τα συστατικά που απαντώνται σε διάφορα τμήματα της *Olea europaea*, ενώ παρουσιάζονται εκτενώς η ελαιοευρωπεΐνη, η ολεασίνη και η ολεοκανθάλη, το δεύτερο σημαντικότερο φαινολικό συστατικό του εξαιρετικά παρθένου ελαιολάδου. Επιπλέον, παρατίθενται μερικές από τις, αναφερόμενες στη βιβλιογραφία, φαρμακολογικές ιδιότητες των ανωτέρω συστατικών.

ꕥ Στο δεύτερο κεφάλαιο, περιγράφεται η διαδικασία απομόνωσης της ελαιοευρωπεΐνης και της ολεασίνης από την *Olea europaea*, με χρήση ποικίλων, χρωματογραφικών, κατά κύριο λόγο, τεχνικών, καθώς επίσης, η απομόνωση και ταυτοποίηση δευτερογενών μεταβολιτών με φαρμακολογικό ενδιαφέρον, από υγρό ελαιουργικό απόβλητο («*Κατσίγαρος*»).

ꕥ Στο τρίτο κεφάλαιο της παρούσας διατριβής, παρουσιάζεται για πρώτη φορά η απόπειρα ολικής σύνθεσης ενός φυσικού συστατικού, που απαντάνται στον πυρήνα του ελαιόκαρπου και δεν είναι άλλο, από τον νουζενίδη, ενώ περιγράφεται, επίσης, η ημισύνθεση της ολεασίνης και της ολεοκανθάλης, με πρώτη ύλη την ελαιοευρωπεΐνη.

ꕥ Στο τέταρτο κεφάλαιο, περιγράφεται αναλυτικά η ημισυνθετική πορεία που ακολουθήθηκε για την παραλαβή παραγώγων της ελαιοευρωπεΐνης και της ολεασίνης, καθώς επίσης παρατίθενται φασματοσκοπικά δεδομένα για κάθε ανάλογο.

ꕥ Τέλος, στο πέμπτο κεφάλαιο της παρούσας διατριβής, παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της μελέτης κυτταροτοξικότητας των παραγώγων ελαιοευρωπεΐνης, *in vitro* και *in vivo*, καθώς επίσης η βιολογική αξιολόγηση των υπολοίπων αναλόγων, φυσικών και συνθετικών, για τη δράση τους, έναντι της νευροεκφυλιστικής νόσου του Alzheimer και ως αναστολέων του ενζύμου κυκλοοξυγενάση (COX-1 και COX-2).

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Πολλές επιδημιολογικές μελέτες έχουν δείξει χαμηλή συχνότητα εμφάνισης καρδιαγγειακής και νευροεκφυλιστικής νόσου, διαβήτη και καρκίνου στην περιοχή της Μεσογείου. Το φαινόμενο αυτό οφείλεται στην κατανάλωση ελαιόκαρπων και ελαιολάδου, κύριων συστατικών της νοτιοευρωπαϊκής διατροφής. Η φυτοχημική διερεύνηση των φύλλων της ελιάς *Olea europaea* (Oleaceae), των ελαιόκαρπων, του ελαιολάδου, καθώς και των ελαιουργικών αποβλήτων, έχει επισημάνει την παρουσία αρκετών δευτερογενών μεταβολιτών και συγκεκριμένα, φαινολικών ενώσεων, όπως η ελαιοευρωπεΐνη, η υδροξυτυροσόλη, η τυροσόλη, ο νουζενίδης, η ολεοκανθάλη και η ολεασίνη.

Όλα αυτά τα φαινολικά συστατικά έχουν θεωρηθεί εν δυνάμει υπεύθυνα για τη βιολογική δράση διαφόρων ελαιοκομικών προϊόντων, κυρίως λόγω των αντιοξειδωτικών ιδιοτήτων τους. Παρόλα αυτά, αναπόφευκτα, η παραγωγή ελαιολάδου και βρώσιμων ελιών, οδηγεί στην παραγωγή τόνων αποβλήτων, συμπεριλαμβανομένων των φύλλων, του πυρηνελαίου, των αποβλήτων επιτραπέζιων ελιών και των λυμάτων ελαιοτριβείων. Αυτά τα απόβλητα είναι ιδιαίτερα τοξικά για το περιβάλλον, αποτελώντας, ωστόσο, πηγή βιοδραστικών μορίων.

Κατά την εκπόνηση της παρούσας διατριβής, εκχυλίσματα φύλλων και ελαιόκαρπων της *Olea europaea*, δείγμα ελαιολάδου, καθώς επίσης εκχύλισμα ελαιουργικού αποβλήτου, αναλύθηκαν φυτοχημικά, με χρωματογραφικές, κυρίως, τεχνικές, με σκοπό την απομόνωση, ταυτοποίηση και τέλος, βιολογική αξιολόγηση των κυριότερων, περιεχομένων σε αυτά, δευτερογενών μεταβολιτών.

Μεταξύ αυτών, η ελαιοευρωπεΐνη, φαινολικός σεκοϊριδοειδής γλυκοζίτης και κύριο συστατικό των φύλλων και των μη επεξεργασμένων ελαιόκαρπων, με πλήθος, αναφερόμενων στη βιβλιογραφία, βιολογικών δράσεων, αξιοποιήθηκε, ως, υψηλής καθαρότητας, πρώτη ύλη, για την ημισύνθεση σεκοϊριδοειδικών αναλόγων, με ποικιλία στη δομή. Οι περισσότερες, μέχρι σήμερα, βιβλιογραφικές αναφορές σχετικά με την ελαιοευρωπεΐνη, επεσήμαναν το φαινολικό μέρος της χημικής της δομής, ως πηγή δραστικότητας του μορίου, ενώ δεν έχει προταθεί, έως τώρα, μελέτη για τη βελτίωση της βιολογικής της δραστικότητας και δημιουργία δεδομένων SAR, μέσω της σύνθεσης δομικών αναλόγων αυτής. Προφανώς, μία τέτοια μελέτη παρουσιάζει ιδιαίτερο ενδιαφέρον, δεδομένης της μεγάλης διαθεσιμότητας σε φύλλα ελιάς, κυρίως στις χώρες της Μεσογείου.

Στα πλαίσια αυτά, στη παρούσα διατριβή, συντέθηκαν 37 ημισυνθετικά παράγωγα της ελαιοευρωπεΐνης και αξιολογήθηκε η κυτταροτοξικότητά τους, αρχικά, έναντι της καρκινικής σειράς SKBR3 αδενοκαρκινώματος του μαστού και στη συνέχεια, τα πλέον δραστικά ανάλογα υποβλήθηκαν σε αξιολόγηση κυτταροτοξικής δράσης, έναντι έξι επιπλέον καρκινικών κυτταρικών σειρών. Το δραστικότερο, μεταξύ των αναλόγων, αξιολογήθηκε για την *in vivo* δραστικότητά του έναντι της καρκινικής σειράς μελανώματος B16.F1 σε ποντίκια, καθώς και για την τοξικότητά του έναντι υγειών κυττάρων, επιδεικνύοντας, συνδυαστικά, εντυπωσιακά αποτελέσματα.

Επιπλέον, με έναυσμα προηγούμενα ερευνητικά αποτελέσματα και αντίστοιχες βιολογικές αναφορές σχετικά με την αντιφλεγμονώδη, κυρίως, δράση της ολεασίνης και της ολεοκανθάλης, συντέθηκαν 13 ανάλογα αυτών, εκ των οποίων τα 9 αξιολογήθηκαν, χωρίς, ωστόσο, αξιοσημείωτα αποτελέσματα, για τη νευροπροστατευτική δράση τους, έναντι της νόσου του Alzheimer..

Τέλος, στο συνθετικό μέρος της παρούσας διατριβής, με βάση την αναφερόμενη στη βιβλιογραφία αντιοξειδωτική δράση του φαινολικού συστατικού νουζενίδη και δεδομένης της χαμηλής απόδοσης απομόνωσής του από τον ελαιοπυρήνα, επιχειρήθηκε η ολική του σύνθεση.

Μεταξύ των συνθετικών αναλόγων της ολεασίνης και της ολεοκανθάλης, 8 ανάλογα αξιολογήθηκαν για τη δράση τους έναντι των ενζύμων κυκλοοξυγενάση-1 και 2 (COX-1 και COX-2), εμφανίζοντας, σε γενικές γραμμές, ικανοποιητικότερη ανασταλτική δράση, έναντι της COX-2, χωρίς, ωστόσο, να παρουσιάσουν στο σύνολό τους κάποια αξιόλογη δράση.

Τέλος, εκχύλισμα φύλλων της *Olea europaea*, ελαιόκαρπων, καθώς επίσης το ολικό εκχύλισμα του ελαιουργικού αποβλήτου και οι απομονωμένοι απ' αυτό δευτερογενείς μεταβολίτες, αξιολογήθηκαν για την αντιφλεγμονώδη δράση τους έναντι της νόσου Alzheimer και των ενζύμων COX-1 και COX-2. Μεταξύ των δειγμάτων, το εκχύλισμα των ελαιόκαρπων κατέδειξε αξιοσημείωτη δράση, αφ' ενός, επάγοντας τη δράση των πρωτεϊνών «στενών συνάψεων», αφ' ετέρου, ενισχύοντας τη δράση του βασικού μεταφορέα P-gp, ως εκ τούτου ενδείκνυται για περαιτέρω φυτοχημική ανάλυση.

SUMMARY

Various epidemiological studies have shown a low frequency of cardiovascular and neurodegenerative disease, diabetes and cancer, in the Mediterranean region. This low incidence is thought to be linked wth the comsumption of olives and olive oil, main constituents of South European diet. Phytochemical analysis of leaves of *Olea europaea* (Oleaceae), olive oil and Olive Mill Waste Waters (OMWW), has revealed the presence of a number of secondary metabolites, more specifically phenolic compounds, such as oleuropein, hydroxytyrosol, tyrosol, ligstroside, oleocanthal and oleacein.

The above mentioned phenolic compounds have been considered to be potently responsible for the biological activity of various olive products, especially due to their antioxidant properties. However, olive oil and edible olives' production, leads to the formation of tones of waste, including leaves, table olives' and olive mill waste waters. This waste is extremely toxic for the environment, consisting, nevertheless, a source of bioactive compounds.

During the preparation of this dissertation, extracts of olive leaves and drupes of *Olea europaea*, an olive oil sample and an OMWW extract, where phytochemicaly explored, using, mainly, chromatographical techniques and aiming at the isolation, identification and biological evaluation of secondary metabolites included.

Among these metabolites, oleuropein, a phenolic secoiridoid glucoside and main constituent of leaves and unprocessed drupes of *Olea europaea*, with a number of, mentioned in bibliography, biological activities, was used as a high purity raw material, for the semi-synthesis of secoiridoidic analogs, with variety in structure. Until recently, most bibliographical data regarding oleuropein, highlighted the phenolic part of oleuropein's structure, as the part to be blamed for the molecule's activity, while there is no study to date, concerning the enhancement of biological activity, through semi-synthesis of analogs, in the context of structure-activity relationship. Eventually, there is a significant interest in a study of this kind, given that, in the Mediterranean region, there is a high availability in olive leaves, thus in high purity oleuropein.

During this thesis, 37 semi-synthetic analogs of oleuropein where synthesized and evaluated, in a first screening, for their in vitro cytotoxicity against cancer cell line SKBR3 of breast adenocarcinoma. The analogs that showed the best activity in this first test, were further evaluated for their activity in vitro against six other cancer cell lines. The analog that showed the best cytotoxicity among the analogs tested, was then evaluated for its in vivo activity against cancer cell line B16.F1 of melanoma, in mouse models, as well as for its toxicity against normal cells too, illustrating impressive results.

Furthermore, triggered by biological data referring especially to the anti-inflammatory activity of oleacein and oleocanthal, 13 analogs were synthesized, among which, 9 were evaluated for their neuroprotective activity against Alzheimer's disease, however without significant results.

Finally, in the synthetic part of the present study, based on bibliographical data regarding the antioxidant activity of the phenolic compound nuzhenide and taking as granted the low yield of this compound's isolation from olive drupes' cores, its total synthesis was attempted.

Among the synthesized analogs of oleacein and oleocanthal, 8 were evaluated for their activity agains enzymes cyclooxygenase-1 and 2 (COX-1 and COX-2), showing, in general, better inhibition of COX-2 than of COX-1, whithout illustrating, in total, any remarkable activity.

Last but not least, olive leaves' and olive drupes' extracts of Olea europaea, total extract of OMWW and the secondary metabolites isolated from this, were also evaluated for their anti-inflammatory activity against Alzheimer's disease and against COX-1 and COX-2 enzymes. Among the samples tested, olive drupes' extract showed the best activity against Alzheimer's disease, inducing tight junction proteins and upregulating the amyloid beta transporter P-gp, thus this extract is appropriate for further phytochemical analysis.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΠΡΩΤΟ: Ι. ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ



I.1 Εισαγωγή – Μεσογειακή Διατροφή

Ο όρος «Μεσογειακή Διατροφή» φαίνεται να διαφέρει ανάλογα με τη χώρα, αλλά συνδέεται πάντα με την καλή υγεία και το μεγάλο προσδόκιμο ζωής. Η Μεσογειακή Διατροφή μπορεί να οριστεί ως το διατροφικό πρότυπο των ελαιοκομικών περιοχών της Μεσογείου, στα τέλη της δεκαετίας του 1950 και στις αρχές της δεκαετίας του 1960 [1].

Αν και υπάρχουν διάφορες παραλλαγές της Μεσογειακής Διατροφής, ορισμένα κοινά στοιχεία μπορούν να εντοπιστούν: χαμηλή κατανάλωση κορεσμένων λιπαρών και υψηλή μονοακόρεστων, μέτρια πρόσληψη αλκοόλ (κυρίως με τη μορφή του κρασιού με το γεύμα), υψηλή κατανάλωση λαχανικών, φρούτων, οσπρίων και δημητριακών και μέτρια κατανάλωση ψαριού, γάλακτος και γαλακτοκομικών προϊόντων (κυρίως τυριού) [1].

Τις τελευταίες δεκαετίες, πολλές επιδημιολογικές μελέτες έχουν επισημάνει μια ελάττωση στη συχνότητα εμφάνισης της καρδιαγγειακής και της νευροεκφυλιστικής νόσου, της παχυσαρκίας, του διαβήτη, καθώς και διαφόρων μορφών καρκίνου, στις χώρες όπου ακουλουθείται αυτό το διατροφικό πρότυπο. Η Μεσογειακή Διατροφή χαρακτηρίζεται από την υψηλή κατανάλωση παρθένου ελαιολάδου, που είναι και το κύριο συστατικό της διατροφής της Νότιας Ευρώπης.

Μια διατροφή με βάση το ελαιόλαδο έχει παρατηρηθεί ότι επιδρά σημαντικά στην πρόληψη κακοηθειών, όπως ο καρκίνος του παχέος εντέρου και του μαστού [2], καθώς και η στεφανιαία καρδιακή νόσος, ενώ ταυτόχρονα, οδηγεί σε μείωση της «κακής χοληστερόλης», LDL[1] και της αρτηριακής πίεσης [2], [3].

I.2 Η οικογένεια *Oleaceae*

Η οικογένεια *Oleaceae* (Ελαιίδες ή Ελαιοειδή) είναι η οικογένεια της ελιάς. Ανήκει στην τάξη Lamiales και περιλαμβάνει 25 γένη – σήμερα κατατάσσονται σ' αυτήν 24 ζώντα γένη και 1 επί πλέον γένος, που πιστεύεται ότι έχει εξαφανισθεί (*Hesperelaea*) [4] – και 615 είδη. Εννέα από τα γένη συναντώνται στην Ευρώπη, έξι εκ των οποίων στην Ελλάδα. Τα γένη που απαρτίζουν την οικογένεια *Oleaceae* είναι τα: *Abeliophyllum, Chionanthus, Comoranthus, Dimetra, Fontanesia, Forestiera, Forsythia, Fraxinus, Haenianthus, Hesperelaea, Jasminum, Ligustrum, Menodora, Myxopyrum, Nestegis, Noronhia, Notelaea, Nyctanthes,* ***Olea****, Osmanthus, Phillyrea, Picconia, Priogymnanthus, Schrebera* και *Syringa*.

I.2.a *Μορφολογικά χαρακτηριστικά*

Η οικογένεια *Oleaceae* περιλαμβάνει φυτά ξυλώδη, αειθαλή ή φυλλοβόλα, κυρίως με μορφή θαμνώδη, αλλά και δένδρα και αναρριχητικά. Το τρίχωμα των φυτών της οικογένειας αποτελείται από λεπιοειδείς ασπιδόμορφες τρίχες, επιπρόσθετα με τις κανονικές, οι οποίες δίνουν συνήθως μια γκρίζα ή ασημί απόχρωση, στους νεαρούς βλαστούς και στα φύλλα.

Τα φύλλα συνήθως είναι τοποθετημένα αντίθετα στο βλαστό, συνήθως χωρίς παράφυλλα. Το σχήμα τους ποικίλει, μπορεί να είναι απλά ακέραια (συνηθέστερα), αλλά μπορεί να είναι με τρία φυλλάρια ή πτεροειδώς έλλοβα.

Τα άνθη των φυτών της οικογένειας *Oleaceae* είναι ερμαφρόδιτα, σπανίως μονογενή. Τα πέταλα είναι συνήθως τέσσερα αλλά ποικίλουν μεταξύ των γενών, από 2, 6, ή 12, ενώ μερικές φορές μπορεί και να απουσιάζουν. Είναι ελεύθερα ή ενωμένα μεταξύ τους, ώστε συχνά να σχηματίζουν ένα κοντό ή μακρύ σωλήνα στεφάνης. Τα σέπαλα συνήθως είναι τέσσερα. Οι στήμονες είναι 2 ή 4, ενωμένοι με τα πέταλα (επιπέταλοι), με κοντά νήματα, και εναλλασσόμενοι με τα καρπόφυλλα. Τα περισσότερα είδη έχουν άνθη με 2 στήμονες (αρσενικά όργανα) και έναν ύπερο (γυναικείο όργανο). Η ωοθήκη είναι επιφυής και αποτελείται από 2 συμφυή καρπόφυλλα, καθένα από τα οποία περιέχει δύο θήκες, συνήθως με δύο ανάτροπες σπερμοβλάστες σε κάθε θέση (μερικές φορές μία, τέσσερις ή πολυάριθμες), συνδεδεμένες στην κορυφή στα πλάγια ή στην βάση των θηκών. Ο στύλος είναι απλός με το στίγμα ακέραιο δίλοβο ή δισχιδές.

Οι καρποί είναι ποικίλοι: μπορεί να είναι ξηροί ή σαρκώδεις, διαρρηκτοί ή αδιάρρηκτοι, με 1 έως 4 σπέρματα, α) σαρκώδης ράγα (πχ Λιγκούστρο), β) δρύπη (πχ Ελιά), γ) κάψα (πχ Πασχαλιά), δ) κάρυο, ή πτερυγιοφόρο κάρυο (δηλ. σαμάριο ή σαμάρα) (πχ Φράξινος). [4]

I.3 Το γένος Olea

Το γένος *Olea* περιλαμβάνει 35 είδη, από τα οποία μόνο το είδος *Olea europaea* L. (Ελαία η ευρωπαϊκή) παρουσιάζει οικονομικό ενδιαφέρον και είναι το συνηθέστερα καλλιεργούμενο είδος ανά τον κόσμο. Άλλα είδη που περιλαμβάνονται στο γένος *Olea* είναι τα: Ελαία η αιολόκαρπος (*Olea aeolocarpus*), Ελαία η ηδύκαρπος (*Olea nigra dulcis*), Ελαία η ισπανική (*Olea hispanica*), Ελαία η κρανιόμορφος (*Olea craniomorpha*), Ελαία η εκκρεμής (*Olea pendula*), Ελαία η λευκόκαρπος (*Olea leucocarpa*), Ελαία η μακρόκαρπος (*Olea macrocarpa*), Ελαία η μικρόκαρπος (*Olea microcarpa*), κοινώς λιανολιά κ.ά. [5]

I.4 Το είδος *Olea europaea* L.

Το είδος *Olea europaea* L., η ελιά (*Εικόνα 1*), είναι δέντρο αειθαλές ή θάμνος, ενδημικό στη Μεσόγειο, την Ασία και την Αφρική. Παρουσιάζει αργή ανάπτυξη, αλλά μπορεί να ζήσει εκατοντάδες, χίλια χρόνια ή και περισσότερο. Ευδοκιμεί σε κλίματα εύκρατα, χωρίς ακρότητες θερμοκρασίας (με μέση ετήσια θερμοκρασία 16^{o}C) και υγρασίας, με τη θερμοκρασία να μη κατέρχεται πολύ και για μεγάλα χρονικά διαστήματα κάτω από το μηδέν.

Είναι κοντή, ξεπερνώντας σπάνια τα 8-15 μέτρα (26-49 πόδια). Ο κορμός της είναι συνήθως οζώδης και στριμμένος και καλύπτεται από τεφρόφαιο φλοιό.

Έχει φύλλα αντίθετα, λογχοειδή και επιμήκη, με μήκος 4-10 εκατοστά (1.6 έως 3.9 ίντσες) και πλάτος 1-3 εκατοστά (0.39 έως 1.2 ίντσες), τα οποία είναι δερματώδη, σκουροπράσινα στην άνω επιφάνεια και αργυρόχροα στην κάτω (*Εικόνα 3*).



***Εικόνα 1**. Ελιά (Olea europaea)*

Τα άνθη της είναι πολύ μικρά, φτεροειδή, λευκωπά και μονοπέταλα, με δεκάσχισμο κάλυκα και στεφάνη, δύο στήμονες και δίλοβο στίγμα (*Εικόνα 2*). Επίσης, τα άνθη φύονται στις

μασχάλες των φύλλων σε βοτρυώδεις ταξιανθίες (τσαμπιά), και εμφανίζονται προς το τέλος Μαΐου, στο φλοιό του προηγούμενου έτους.

Ο καρπός είναι μία μικρή δρύπη, μήκους 1-2.5 εκατοστών, λεπτότερα διογκωμένη και μικρότερη σε άγρια φυτά, απ' ό, τι σε ποικιλίες οπωρώνα. Οι καρποί ωριμάζουν και συλλέγονται κατά τα τέλη του φθινοπώρου και τις αρχές του χειμώνα, στο στάδιο όπου έχουν αποκτήσει πράσινο-μωβ χρώμα *(Εικόνα 3)*.



Εικόνα 2. *Καρπός, άνθη και φύλλα της Olea*



Εικόνα 3. *Καρποί έτοιμοι για συγκομιδή*

<u>Το είδος υποδιαιρείται και συναντάται σε δύο υποείδη-ποικιλίες:</u>



α. Ελαία η ήμερη ή εδώδιμη: (*Olea europaea* L. var. *europaea* ή var. *communis* ή var. *sativa*). Πρόκειται για τη γνωστή «ήμερη» ή «καλλιεργούμενη ελιά», φυτό πολύ σημαντικό για την οικονομία της Ελλάδας. Έχει μεγαλύτερα φύλλα και καρπούς από τη δεύτερη ποικιλία, ενώ ο καρπός της είναι μαλακός, με μεγάλη ποσότητα ελαιώδους σάρκας, απ' όπου εξάγεται το ελαιόλαδο, με σύνθλιψη. Καλλιεργείται κυρίως στις Μεσογειακές χώρες, στην Καλιφόρνια και στην Αργεντινή. Φτάνει μέχρι 12 μέτρα ύψος. Σήμερα υπάρχουν περισσότερες από 300 καλλιεργούμενες ποικιλίες (cultivars), που διαφέρουν μεταξύ τους ως προς το σχήμα φύλλων και καρπών, το χρώμα και το μέγεθος των καρπών, καθώς και την περιεκτικότητα σε λάδι.



β. Ελαία η άγρια ή δασική: (*Olea europaea* L. var. *sylvestris* Brot. ή var. *oleaster*). Πρόκειται για τη γνωστή «αγριελιά» ή «κότινος των αρχαίων» (δηλ. το στεφάνι από κλαδί αγριελιάς με το οποίο στεφάνωναν τον νικητή στους ολυμπιακούς αγώνες της αρχαιότητας). Έχει μικρότερα και πιο στρογγυλεμένα φύλλα από την ήμερη ποικιλία, οι καρποί της είναι μικρότεροι και σκληρότεροι, ενώ τα κλωνάρια της είναι επίσης σκληρότερα. Εμφανίζεται σε ακαλλιέργητες περιοχές και είναι εξαπλωμένη κοντά στις ακτές της Μεσογείου και της Ν. Μαύρης Θάλασσας. Απαντάται κυρίως σε βραχώδεις πλαγιές και πετρώδεις λόφους ή λαγκάδια, ή ακόμη και ανάμεσα σε ασβεστολιθικά πετρώματα. Φυτρώνει σε περιοχές με υψόμετρο 50-750 μέτρα από την επιφάνεια της θάλασσας. Στην Ελλάδα, τη συναντούμε σε εκτεθειμένους, στον ήλιο, λόφους όλης της χώρας.

Εκτός από τις δύο παραπάνω, στη φύση απαντώνται και ενδιάμεσες μορφές (υβρίδια), λόγω γονιμοποίησης μεταξύ φυτών των δύο ποικιλιών. Οι διαφορές των δύο ποικιλιών ελαττώνονται κατά την ανάπτυξη του φυτού.

Συστηματική ταξινόμηση της Olea europaea:



Βασίλειο: Plantae
Συνομοταξία: Magnoliophyta
Ομοταξία: Magnoliopsida
Τάξη: Lamiales
Οικογένεια: Oleaceae
Γένος: *Olea*
Είδος: ***Olea europaea* L.**

I.4.a *Ιστορική Αναδρομή*

Οι καρποί της ελιάς, το λάδι της, αλλά και τα κλαδιά της, χρησιμοποιήθηκαν για ανθηρό εμπόριο, έθρεψαν υγιεινά γενιές και γενιές, προσέφεραν μακροζωία, έγιναν γιατρικό για πληθώρα ασθενειών, φώτισαν, καλλώπισαν, στεφάνωσαν και συνδέθηκαν με θρύλους, αλλά και με την πραγματική ιστορία και τον πολιτισμό της Ανατολικής Μεσογείου.

Ο μύθος λέει ότι την ελιά έφερε στον ελληνικό χώρο ο Ηρακλής, από τις παραποτάμιες περιοχές της Μαύρης θάλασσας. Οι ιστορικοί αναζητούν την καταγωγή της στη Συρία και στις μακρόστενες κοιλάδες μεταξύ Ταύρου και Λιβάνου. Άλλοι ιστορικοί αναφέρουν ότι το δέντρο της ελιάς είναι ιθαγενές, στην λεκάνη της Μεσογείου και ότι η αγριελιά προέρχεται από τη Μικρά Ασία και την Αρχαία Ελλάδα. Άγριες ελιές συλλέγονταν από την Νεολιθική εποχή, δηλαδή από την 8η χιλιετία π.Χ.

Δεν είναι σαφές πότε και πού αναπτύχθηκαν τα πρώτα «εξημερωμένα» ελαιόδεντρα. Στη Μικρά Ασία, την 6η χιλιετία π.Χ, στην ακτή, που εκτείνεται από τη χερσόνησο του Σινά έως την σημερινή Τουρκία την 4η χιλιετία π.Χ ή κάπου στην εύφορη Μεσοποταμία την 3η χιλιετία π.Χ;

Σύμφωνα, όμως, με την αρχαία ελληνική παράδοση, πατρίδα της ελιάς είναι η Αθήνα και η πρώτη ελιά φυτεύτηκε από την θεά Αθηνά, σε ένα βραχώδη λόφο, στην Ακρόπολη. Οι Έλληνες ήταν ο πρώτος λαός που καλλιέργησε την ελιά στον ευρωπαϊκό μεσογειακό χώρο. Την μετέφεραν είτε Έλληνες άποικοι είτε Φοίνικες έμποροι. Όπως αναφέρει ο Πλίνιος, κατά το 580 π.Χ, ούτε το Λάτιο, ούτε η Ισπανία, ούτε η Τύνιδα γνώριζαν την ελιά και την καλλιέργειά της.

Μετά τον 16ο μ.Χ. αιώνα, οι Ευρωπαίοι φτάνουν στην Αμερική και μεταφέρουν την ελιά στο Νέο Κόσμο. Σήμερα υπάρχουν ελαιοκαλλιέργειες στην Καλιφόρνια, στο Μεξικό, στο Περού, στη Χιλή και στην Αργεντινή.

I.4.b *Γεωγραφική εξάπλωση*

Η οικογένεια έχει σχεδόν κοσμοπολίτικη εξάπλωση, αλλά επικεντρώνεται στην ΝΑ Ασία και την Αυστραλία. Κάποια γένη έχουν εκτεταμένη εξάπλωση π.χ. *Olea*: Ελιά (Ευρώπη, Ασία, Αυστραλασία), *Fraxinus*: Φράξινος ή Φράξος ή Μελιός ή Μέλεγος (Ευρασία, Β. Αμερική),

Jasminum: Γιασεμί (Ευρασία, Αφρική, Αυστραλία, Ωκεανία και Τροπική Αμερική), *Ligustrum*: Λιγκούστρο ή Λιγούστρο (Ευρώπη έως Β. Ιράν, Ασία, Ινδο-Μαλαισία και Νέες Εβρίδες), ενώ κάποια άλλα, στενότοπη π.χ. *Phillyrea*: Φιλλύρεα ή Φιλύκι (Μεσόγειος, Κανάρια νησιά, Μαδέρα), *Abeliophyllum* (Κορέα), *Notelaea* (Αν. Αυστραλία), *Tessarandra* (Βραζιλία). [4]

Εκτιμάται ότι σήμερα υπάρχουν περίπου 800 εκατομμύρια ελαιόδενδρα σε όλο τον κόσμο και ότι η συντριπτική πλειοψηφία (95%) βρίσκεται στις χώρες της Μεσογείου, ενώ η Ιταλία και η Ελλάδα είναι οι μεγαλύτεροι παραγωγοί ελιάς και ελαιολάδου. Τα ελαιόδεντρα καλλιεργούνται ευρέως στην Ελλάδα, πολύ περισσότερο από οποιοδήποτε άλλο οπωροφόρο δένδρο. Αντιστοιχούν στο 75% της συνολικής δενδροκομίας και καλύπτουν περίπου το 15% της γεωργικής γης.

Ι.4.c *Χρήσεις και φαρμακολογικές δράσεις του είδους Olea europaea*

Η ελιά υπάρχει, μαζί με το λάδι, παντού στη ζωή των Ελλήνων: Στη διατροφή, στον αθλητισμό, στον καλλωπισμό, στο φωτισμό, στη θέρμανση, στην ιατρική, στη φαρμακευτική, στη θρησκεία, στον πολιτισμό, στη μυθολογία, στη διακόσμηση, στη τέχνη (λογοτεχνία, λαογραφία, ζωγραφική, κ.ά.).

Διατροφή. Το λάδι αποτελούσε από την αρχαιότητα βασικό στοιχείο της ελληνικής διατροφής. Τρεις ήταν οι ποιότητες λαδιού. Το ωμοτριβές ελαιόλαδο ή ομφάκινος (ετυμολ. ο ανώριμος καρπός), όπως ονομαζόταν το αρίστης ποιότητας ελαιόλαδο, εκείνο που παράγεται από ελιές άγουρες, στην αρχή της ελαιοκομικής περιόδου· το γνωστό σε όλους «αγουρέλαιο», το «δεύτερον γεύματος», που ήταν το καλής ποιότητας ελαιόλαδο και το «χυδαίον έλαιον», όπως χαρακτηριζόταν το κατώτερης ποιότητας λάδι από ελιές υπερώριμες ή χτυπημένες. Έτσι έχουν κατά καιρούς βρεθεί άφθονοι ελαιοπυρήνες, δείγμα κατανάλωσης ελιάς και λαδιού στα αρχαία χρόνια, καθώς και πολλοί οπό τους λεγόμενους «ψευδόστομους» αμφορείς, οι οποίοι χρησίμευαν κυρίως για την αποθήκευση λαδιού.

Σήμερα το λάδι κατέχει εξ' ίσου σημαντική θέση και αποτελεί κύριο στοιχείο της μεσογειακή διατροφής. Η πολύτιμη δράση του ελαιολάδου είναι παγκοσμίως γνωστή και συμβάλλει στην καλή υγεία και την πρόληψη ασθενειών.

Αθλητισμός. Το στεφάνωμα των νικητών των Ολυμπιακών Αγώνων γινόταν με στεφάνι από κλαδί αγριελιάς. Ο «κότινος», όπως ονομαζόταν, κοβόταν πάντα από την ίδια γέρικη αγριελιά, την καλλιστέφανο, που φύτρωνε δεξιά από τον οπισθόδομο του ναού του Δία. Προσφερόταν ως βραβείο στους νικητές, από τους πρώτους Ολυμπιακούς Αγώνες στην Ολυμπία το 776 π.Χ. μέχρι και τους τελευταίους αρχαίους Ολυμπιακούς, προάγοντας την ανακωχή και την ειρήνη μεταξύ των λαών.

Ο "Παναθηναϊκός αμφορέας" πλήρης ελαιολάδου δινόταν σαν βραβείο στους νικητές των αθλητικών αγώνων, στα Παναθήναια, που ήταν και αυτά σημαντικοί αθλητικοί αγώνες της αρχαίας Αθήνας. Ο ίδιος ο αμφορέας αποτελούσε εγγύηση της ποιότητας του ελαιολάδου. Αυτό αποτελεί το πρώτο παράδειγμα διαπιστευμένου προϊόντος στην παγκόσμια Ιστορία [6].

Καλλωπισμός. Το ελαιόλαδο στην αρχαία Ελλάδα προοριζόταν για την προσωπική καθαριότητα και περιποίηση· ήταν καλής ποιότητας και συχνά αρωματισμένο με βότανα και αρωματικά φυτά. Σε εποχές που δεν υπήρχαν σαπούνια, ούτε άλλα υλικά καθαρισμού και σωματικής υγιεινής, το λάδι φαίνεται να διαδραματίζει πρωτεύοντα ρόλο. Στην περιποίηση του σώματος, χρησιμοποιούνταν ειδικά αρωματισμένα έλαια αλλά και αρώματα, που είχαν ως βάση

το ελαιόλαδο. Μάλιστα, σε πολλές περιπτώσεις, η επάλειψη του κορμιού με λάδι προστάτευε από τον ήλιο και το ψύχος.

Φωτισμός και θέρμανση. Από τα προϊστορικά χρόνια το ελαιόλαδο χρησιμοποιείται για το φωτισμό των οικιών και δημοσίων οικοδομημάτων. Οι περίφημοι «λύχνοι» της προϊστορικής περιόδου μας δίνουν μια πλήρη εικόνα καθημερινού βίου, ενώ στη μινωική εποχή, οι πλούσιοι ξεχώριζαν, εκτός των άλλων, και από το πόσο λάδι κατανάλωναν, όχι μόνο για διατροφή αλλά και για φωτισμό.

Ο κορμός και τα κλαδιά της ελιάς αποτελούν ιδανική καύσιμη ύλη, όπως επίσης και το απελαιωμένο πυρηνόξυλο, που προέρχεται από την εκχύλιση αποξηραμένων, συνθλιμμένων ελαιοπυρήνων, στα πυρηνελαιουργεία. Το υπόλοιπο προϊόν που προκύπτει από την παραπάνω κατεργασία, περνάει από το στάδιο της απόσταξης, κατά την οποία παράγεται το ακατέργαστο πυρηνέλαιο.

Θρησκεία, Πολιτισμός, Μυθολογία. Τα ελαιόδεντρα είναι απολύτως συνδεδεμένα με τη θρησκεία, τον πολιτισμό και την ιστορία των Ελλήνων. Αποτελεί ζωντανό μέρος μιας βαριάς πολιτιστικής κληρονομιάς, με θρύλους, παραδόσεις και θρησκευτικές τελετουργίες, άρρηκτα συνδεδεμένες με την ανθοφορία, τη συγκομιδή και την παραγωγή του ελαιολάδου. Ο Όμηρος αναφέρεται στο ελαιόλαδο ως "χρυσό υγρό", ενώ πολυάριθμες αναφορές συνδέουν την ελιά με τη θρησκεία, ήδη από την αρχαία Ελλάδα. Σήμερα, ως ιερό σύμβολο του κύκλου της ζωής, το ελαιόλαδο χρησιμοποιείται σε όλες τις σημαντικές στιγμές και τελετουργίες· γέννηση, βάπτιση, γάμο και θάνατο.

Κατά την Ελληνική μυθολογία, η ελιά μεταφέρθηκε στην κεντρική Ελλάδα με πρωτοβουλία του Κέκροπα**,** γιου της Μητέρας Γης και μυθικού ιδρυτή της πρώτης πόλης των Αθηνών. Σύμφωνα με τα συγγράμματα του Έλληνα περιηγητή και γεωγράφου Παυσανία, η δεύτερη ήμερη ελιά φυτεύτηκε στην περίφημη Ακαδημία του Πλάτωνα, του δασκάλου που επηρέασε τη φιλοσοφία του σύγχρονου Ευρωπαϊκού πολιτισμού, ίσως περισσότερο από οποιονδήποτε άλλο. Ο μεγάλος νομοθέτης της Αρχαίας Ελλάδας, Σόλων (639-559 π.Χ.), αναγνωρίζοντας τα οφέλη, κατοχύρωσε νομικά την ελιά, η οποία στην πόλη των Αθηνών θεωρήθηκε Ιερό Δένδρο αλλά και σύμβολο Ζωής, Σοφίας και Ευημερίας. Έκτοτε, ο νόμος, όχι μόνο απαγόρευε την κοπή του ελαιόδεντρου, αλλά και παρότρυνε τους πολίτες για το φύτεμα νέων.

Φαρμακολογικές δράσεις της Olea europaea. Η *Olea europaea* χρησιμοποιείται παραδοσιακά ως διουρητικό, υποτασικό, μαλακτικό, καθαρτικό, αντιπυρετικό, καθαριστικό του δέρματος, χολαγωγό, καθώς επίσης για τη θεραπεία των λοιμώξεων του ουροποιητικού, της χολολιθίασης, του βρογχικού άσθματος, της διάρροιας και άλλων παθήσεων [7].

Οι λαοί των χωρών της Μεσογείου, για περισσότερα από 2000 χρόνια τώρα, χρησιμοποιούν τα φύλλα της ελιάς, τις ρίζες της, ακόμα και τον φλοιό της, ως θεραπεία. Αφεψήματα φύλλων ελιάς χρησιμοποιούνταν για θεραπεία από κρύωμα και αδιαθεσία. Στις αρχές του 1800, Ευρωπαίοι ιατροί χρησιμοποιούσαν τα αφεψήματα αυτά για να θεραπεύσουν την μαλάρια. Τα παρατηρούμενα οφέλη έχουν τη βάση τους στις φαρμακολογικές ιδιότητες των δευτερογενών μεταβολιτών που παράγονται από το φυτό, για την εξασφάλιση της άμυνάς του έναντι εντόμων και βακτηρίων [8].

Από το 4000 π.Χ. ήταν γνωστή η χρήση του ελαιολάδου για θεραπευτικούς σκοπούς. Ο Διοσκουρίδης, αρχαίος Έλληνας ιατρός, φαρμακολόγος και βοτανολόγος, ονομάζει το ελαιόλαδο «*προς την εν υγεία χρήσιν άριστον*»· θεωρούσε δε, ως καλύτερο έλαιο το «ωμοτριβές ή ομφάκινο», ενώ συνιστούσε το ελαιόλαδο από άγριες ελιές, ως στυπτικό και ευεργετικό, για

οδονταλγίες ή κεφαλαλγίες, όπως δηλαδή χρησιμοποιούνται σήμερα τα κλασικά, μη στεροειδή, αντιφλεγμονώδη φάρμακα. Επίσης, αναφέρει ποικίλες θεραπευτικές ιδιότητες κατά του έρπητα και της άφθας.

Ο Ιπποκράτης, ο πατέρας της Ιατρικής, περιγράφει το ελαιόλαδο σαν το τέλειο θεραπευτικό. Στις διασωθείσες εργασίες του, αναφέρονται περισσότερες από 60 φαρμακευτικές και ιατρικές χρήσεις του ελαιολάδου. Αυτές περιλαμβάνουν δερματολογικές ασθένειες, μυϊκούς πόνους, θεραπεία του έλκους και της χολέρας, φλεγμονές των ούλων, αϋπνία, ναυτία, πυρετό και στομαχικούς πόνους.

Υπάρχουν πολυάριθμες αναφορές [9], [10], [11], [7] κυρίως από τη λαϊκή ιατρική, σε σχέση με τις ευεργετικές ιδιότητες της ελιάς και του ελαιολάδου, μερικές εκ των οποίων είναι:

- η συμβολή τους στη σωστή ανάπτυξη των οστών και στην διατήρηση της ισορροπίας του μεταβολισμού
- η πρόληψη και θεραπεία της οστεοπόρωσης και η επιβράδυνση της γήρανσης, χάρη στη βιταμίνη Ε που περιέχει ο καρπός της ελιάς
- η πρόληψη καρδιαγγειακών και εγκεφαλικών νοσημάτων, λόγω μείωσης της κακής χοληστερόλης (LDL[1]) και αύξησης της καλής (HDL[2])
- η αποφυγή ανάπτυξης αρκετών μορφών καρκίνου, κυρίως του μαστού και του παχέος εντέρου
- η βελτίωση της κινητικότητας του παχέος εντέρου και η αντιμετώπιση της δυσκοιλιότητας, χάρη και στις φυτικές ίνες που περιέχει η ελιά
- η ευεργετική τους δράση στη θεραπεία του διαβήτη, της υπέρτασης κ.ά.

I.4.d *Συστατικά που απαντώνται στην Olea europaea*

Φυτοχημική μελέτη του είδους *Olea europaea*, έχει οδηγήσει στην απομόνωση φλαβονοειδών, φλαβονών και γλυκοσιδών τους (π.χ. χαλκόνη [12], γλυκοζίτες κυανιδίνης [13]), ιριδοειδών και γλυκοσιδών τους, σεκοϊριδοειδών και γλυκοσιδών τους, τριτερπενίων, λιπαρών και οργανικών οξέων (π.χ. ελαϊκό οξύ (79), παλμιτικό οξύ, κ.ά.), βιοφαινολών [14], παραγώγων βενζοϊκού οξέος, ξυλιτόλης, στερολών, ισοχρωμανίων, πρωτεϊνών και αμινοξέων (π.χ. τρυπτοφάνη, λυσίνη, ιστιδίνη [15], κ.ά.), σακχάρων-σακχαροαλκοολών (π.χ. σουκρόζη, φρουκτόζη, γλυκόζη, [16] κ.ά.), σαπωνινών, κινονών και άλλων δευτερογενών μεταβολιτών, από διάφορα μέρη του φυτού. Φαινολικές ενώσεις, φλαβονοειδή, σεκοϊριδοειδή και οι σεκοϊριδοειδείς γλυκοσίδες [17], απαντώνται σχεδόν σε όλα τα μέρη της *Olea europaea* [18], [19].

I.4.d.1 Συστατικά που απαντώνται στο φλοιό της ελιάς

Ο σεκοϊριδοειδής γλυκοζίτης ελαιοευρωπεΐνη (1), ο οποίος θα αναλυθεί εκτενώς σε επόμενη υποενότητα, απαντάται στο φλοιό της ελιάς, σε συγκέντρωση μεγαλύτερη από τη διπλάσια αυτής που συναντάμε στα φύλλα της ελιάς και μάλιστα αποτελεί το βασικό χημικό συστατικό του φλοιού [8]. Άλλα συστατικά που περιλαμβάνονται στον φλοιό της ελιάς, είναι η υδροξυτυροσόλη (2), η τυροσόλη (3), το 4-υδροξυ-φαινυλαιθανικό οξύ (4), το 3-μεθοξυ-4-υδροξυ-βενζοϊκό οξύ (βανιλικό οξύ) (5), το καφεϊκό οξύ (6), το κουμαρικό οξύ (7), το

φερουλικό οξύ (8), η βανιλίνη (9), [8] η d-μαννιτόλη (10), τα μονο-καρβοξυλικά οξέα και οι φυτοστερόλες (πχ. β-σιτοστερόλη (11)).

Επίσης, λιγνάνες όπως η (−)-ολιβίλη (12), η (+)-κυκλο-ολιβίλη (13), η (+)-1-ακετοξυ-πινορεσινόλη (14), η (+)-1-υδροξυ-πινορεσινόλη (15), ο (+)-1-ακετοξυ-πινορεσινολ-4΄΄-*O*-μεθυλ-αιθέρας (16) και ο (+)-1-υδροξυ-πινορεσινολ-4΄΄-*O*-μεθυλ-αιθέρας (17), καθώς και το συστατικό εσκουλίνη (18), έχουν απομονωθεί από αιθερικό εκχύλισμα του φλοιού της *Olea europaea* [20]. Ακόμη, οι κουμαρίνες εσκουλετίνη (19) (υδρολυμένο παράγωγο της εσκουλίνης), σκοπολετίνη (20) και σκοπολίνη (21) είναι επίσης συστατικά του φλοιού [21].

I.4.d.2 Συστατικά που απαντώνται στον ελαιόκαρπο

Ο καρπός της *Olea europaea* περιέχει σημαντικές ποσότητες φλαβονοειδών, σεκοϊριδοειδών, σεκοϊριδοειδών γλυκοσιδών [22] και φαινολικών συστατικών, όπως τυροσόλη (3), υδροξυτυροσόλη (2) και παραγώγων τους [23]. Ορισμένα παράγωγα της υδροξυτυροσόλης (2), όπως ο ραμνοσίδης της υδροξυτυροσόλης (22) [24], ο γλυκοσίδης της υδροξυτυροσόλης (23) [25], καθώς και ο *β*-υδροξυ-τυροσολ-μεθυλεστέρας του μηλικού οξέος (24) [26], είναι συστατικά που απομονώθηκαν πρόσφατα από τον ελαιόκαρπο. Άλλα, πρόσφατα απομονωμένα από τον ελαιόκαρπο, συστατικά είναι κάποια ανάλογα της τυροσόλης (3), ο κορνοσίδης (25) [22], ο εστέρας του ελενολικού οξέος με υδροξυτυροσόλη (26) [27], καθώς επίσης και η 3,4-διϋδροξυ-φαινυλο γλυκόλη (DHPG[3]) (27), που αποτελεί κύριο φαινολικό συστατικό των επιτραπέζιων (βρώσιμων) ελιών [28], [29].

Γαλακτολιπίδια, τριακυλογλυκερόλες και λιπαρά οξέα, έχουν επίσης απομονωθεί από καρπούς *Olea europaea*, σύμφωνα με.άλλες μελέτες [30], [31].

Μία μελέτη διασποράς των φαινολικών συστατικών στα διάφορα μέρη του καρπού, έδειξε την παρουσία ελαιοευρωπεΐνης (1), δεμεθυλ-ελαιοευρωπεΐνης (28) [32] και βερμπασκοσίδη (29) [33] σε όλα τα μέρη του ελαιόκαρπου, ενώ ο νουζενίδης (30) βρέθηκε να είναι το συστατικό με τη μεγαλύτερη συγκέντρωση, στα κουκούτσια της ελιάς [33], [34], απ' όπου έχει απομονωθεί επίσης ο ολεοσίδης (31).

Το συνολικό περιεχόμενο σε πολυφαινόλες, σύμφωνα με τη μέθοδο Folin Ciocalteau [35], είναι 117 mg/ 100 g, στις μαύρες ελιές και 161 mg/ 100 g, σε πράσινες ελιές. Η συγκέντρωση της ελαιοευρωπεΐνης (1) στον καρπό της ελιάς, ελαττώνεται με την ωρίμανση. Οι πράσινες ελιές περιέχουν διάφορους τύπους πολυφαινολών, κυρίως τυροσόλες, φαινολικά οξέα, φλαβονοειδή και φλαβόνες, ενώ οι μαύρες και ανθοκυανίδια [36].

Επιπλέον, ένας μεγάλος αριθμός φλαβονοειδών, όπως η κερκετίνη (32) και ο 7-*O*-γλυκοζίτης της κερκετίνης (33), η ρουτίνη (34) [37], η απιγενίνη (35), η κερσιτρίνη (36), η χρυσοεριόλη (37) κ.ά φλαβονοειδή, έχουν απομονωθεί από τον καρπό της ελιάς και τον χυμό του [38].

Οι τριτερπενικές αλκοόλες β-αμυρίνη (38), ταραξερόλη (39), 24-μεθυλενοκυκλοαρτενόλη (40), κυκλοαρτενόλη (41), μαζί με τις 4α-μονομεθυλο-στερόλες: ομπτουσιφολιόλη (42), γραμιστερόλη (43), κυκλοευκαλενόλη (44) και κιτροσταδιενόλη (45), βρέθηκαν σε ώριμες ελιές [39]. Επιπλέον, πεντακυκλικά τριτερπενοειδή, συμπεριλαμβανομένων των: ερυθροδιόλη (46), ουβαόλη (47) [40], ουρσολικό οξύ (48) και μασλινικό οξύ (49) [41], απομονώθηκαν από τους καρπούς διαφόρων ποικιλιών *Olea europaea*.

Από την ομάδα των τοκοφερολών, οι: α-τοκοφερόλη (50), β-τοκοφερόλη (51) και γ-τοκοφερόλη (52), έχουν απομονωθεί από τον ελαιόκαρπο, σύμφωνα με άλλες μελέτες , ενώ από

την ομάδα των σακχάρων, μονοσακχαρίτες, δισακχαρίτες αλλά και τρισακχαρίτες, καρβοξυλικά οξέα σακχάρων και παράγωγά τους, έχουν απομονωθεί όχι μόνο από τον καρπό αλλά και από τα φύλλα και τους ιστούς της ελιάς [42].

Οι καρποί περιέχουν, τέλος, φαινολοκαρβονικά οξέα και ανόργανα άλατα [43].

I.4.d.3 Συστατικά που απαντώνται στα φύλλα της ελιάς

Τα φύλλα της ελιάς είναι πλούσια σε σεκοϊριδοειδή, με κύριο συστατικό την ελαιοευρωπεΐνη (1), σε ποσοστό 1-14% w/w, ποσοστό που ποικίλει ανάλογα με την ποικιλία της ελιάς, την εποχή συλλογής των φύλλων, καθώς και τις κλιματολογικές συνθήκες [8]. Άλλα συστατικά είναι ο ολεουροσίδης (53), το άγλυκο της ελαιοευρωπεΐνης (54), το ελενολικό οξύ (55), ο λιγκστροσίδης (56), ο ολεοσίδης (31), η ολεασίνη (57), η δεμεθυλ-ελαιοευρωπεΐνη (28), η υδροξυτυροσόλη (2), ο διμεθυλεστέρας του ολεοσίδη (58), η τυροσόλη (3) και ο βερμπασκοσίδης (29).

Επιπλέον, περιέχουν φλαβονοειδή, όπως απιγενίνη (35), 4΄-*O*-ρουτινοσίδης της απιγενίνης (59), 7-*O*-γλυκοσίδης της απιγενίνης (απιγετρίνη) (60), ισοροϊφορίλη (61), εσπεριτίνη (62), κεμπφερόλη (63) [44], λουτεολίνη (64), βανιλίνη (9), γιουνκεΐνη (65), 7-*O*-γλυκοζίτης της λουτεολίνης (γλυκολουτεολίνη ή λουτεολοσίδιο) (66), σκολυ(ϊ)μοσίδιο (67), χρυσοεριόλη (37), κερκετίνη (32), ρουτίνη (34), φαινολικά οξέα όπως καφεϊκό οξύ (6), χλωρογενικό οξύ (68), κιναμωμικό οξύ (69), ελενολικό οξύ (55), φερουλικό οξύ (8), ομοβανιλικό οξύ (70), p-υδροξυ-βενζοϊκό οξύ (PHBA[4]) (71), 4-υδροξυ-φαινυλαιθανικό οξύ (4), p-κουμαρικό οξύ (7), πρωτοκατεχουικό οξύ (72), ο-υδροξυ-βενζοϊκό οξύ (σαλικυλικό οξύ) (BHA[5]) (73) και συριγγικό οξύ (74) [8], [45], ενώ περιέχουν επίσης αλκαλοειδή (π.χ. κιγχονίνη (75), κιγχονιδίνη (76), [46]) και στερόλες.

Τέλος, στα φύλλα της ελιάς, βρέθηκαν σημαντικές ποσότητες τριτερπενίων, όπως β-αμυρίνη (38), β-σιτοστερόλη (11) (ιδίως στην άγρια ποικιλία), ολεανολικό οξύ (77) (ιδίως στα ξερά φύλλα της ελιάς) [47], ερυθροδιόλη (46) [9], ενώ στα τριτερπενικά οξέα που απομονώθηκαν επίσης από φύλλα *Olea europae*α συγκαταλέγονται το μπετουλινικό οξύ (78), το μασλινικό οξύ (49) και το ουρσολικό οξύ (48) [9], καθώς επίσης και η ουβαόλη (47) σύμφωνα με μία μελέτη του 2003 [48].

I.4.d.4 Συστατικά που απαντώνται στο ελαιόλαδο

Το ελαιόλαδο αποτελεί το 30% του ώριμου καρπού της ελιάς, αποτελείται κατά 97% από λιπαρά οξέα [κυρίως μονοακόρεστα (80% ελαϊκό οξύ (79)), πολυακόρεστα (7% λινελαϊκό οξύ (80) και λινολενικό οξύ (81)) και κορεσμένα 10%] και είναι πλούσιο σε τοκοφερόλες (50), (51), (52) και τριγλυκερίδια. Το συνολικό περιεχόμενο σε πολυφαινόλες του παρθένου ελαιολάδου, σύμφωνα με τη μέθοδο Folin Ciocalteu, είναι 21 mg/ 100 g, ενώ του εξαιρετικά παρθένου ελαιολάδου ανέρχεται στα 55 mg/ 100 g. Στο ελαιόλαδο, το ποσοστό σε ελαιοευρωπεΐνη (1) περιορίζεται στο 0.005-0.12% w.w, ενώ το μεγαλύτερο δυνατό ποσοστό παρατηρείται στο νωπό ελαιόλαδο, δηλαδή στο ελαιόλαδο που προέρχεται από πράσινες, άγουρες ελιές.

Το ελαιόλαδο αποτελεί επίσης, πηγή γλυκερολών και δευτερευουσών ενώσεων, όπως αλκοόλες, στερόλες, χρωστικές, πτητικά συστατικά (σε ποσοστό 2%), σκουαλένιο (82), φυτοστερόλες (σε ποσοστό 1%) και αντιοξειδωτικά [49].

Στα αντιοξειδωτικά συγκαταλέγονται τα φαινολικά οξέα και οι αλκοόλες (τυροσόλη (3) και υδροξυτυροσόλη (2)) τα φλαβονοειδή, οι λιγνάνες [11] και τα σεκοϊριδοειδή (ελαιοευρωπεΐνη (1), λιγκστροσίδης (56) και παράγωγά τους) [50]. Δύο από τα πιο σημαντικά σεκοϊριδοειδή είναι η ολεοκανθάλη (83) και η ολεασίνη (57), οι οποίες θα αναλυθούν εκτενώς σε επόμενη υποενότητα. Αποτελούν διαλδεΰδες του δεκαρβοξυμεθυλ-ελενοϊκού οξέος, συνδεδεμένες με τυροσόλη (3) (στην περίπτωση της ολεοκανθάλης (83), p-HPEA-EDA[6]) και υδροξυτυροσόλη (2) (στην περίπτωση της ολεασίνης (57), 3,4-DHPEA-EDA[7]) [49].

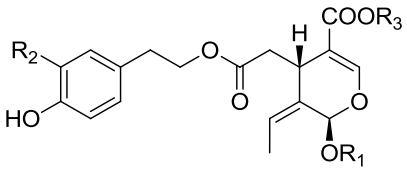
I.4.d.5 Συστατικά που απαντώνται στα υγρά απόβλητα ελαιοτριβείων (OMWW[8])

Εκτός από το νερό (83-92%), τα κύρια συστατικά των υγρών αποβλήτων ελαιοτριβείων (OMWW[8]) είναι οι φαινολικές ενώσεις και συγκεκριμένα οι φαινυλο αλκοόλες (υδροξυτυροσόλη (2), τυροσόλη (3)), τα φαινολικά οξέα, τα σεκοϊριδοειδή, οι αλδεΰδες, τα φλαβονοειδή (όπως η ρουτίνη (34)), οι λιγνάνες, τα στιλβένια, οι ταννίνες, τα σάκχαρα (κυρίως κυτταρίνη (84), ημικυτταρίνη (85) και λιγνίνη [51]), τα λιπαρά, οι πρωτεΐνες και τα οργανικά οξέα. Το φαινολικό συστατικό που βρίσκεται σε μεγαλύτερη συγκέντρωση στο εκχύλισμα OMWW[8] είναι η υδροξυτυροσόλη (2), έχοντας προκύψει αφενός από την υδρόλυση της ελαιοευρωπεΐνης (1) κατά την εξαγωγή του ελαιολάδου, αφετέρου από την όξινη υδρόλυση των σεκοϊριδοειδικών αναλόγων (κατόπιν προσθήκης HCl στο OMWW[8]) [52].

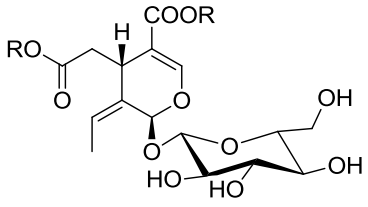
Μεταξύ των φαινολικών ενώσεων που έχουν ανιχνευτεί στο OMWW[8] είναι: η 4-μεθυλο-κατεχόλη (86), το p-υδροξυ-βενζοϊκό οξύ (71), το πρωτοκατεχικό οξύ (72), το βανιλικό οξύ (5), το γαλλικό οξύ (87), το p-κουμαρικό οξύ (7), το καφεϊκό οξύ (6), το φερουλικό οξύ (8), η DHPG[3] (27), το ομοβανιλικό οξύ (70), η ομοβανιλική αλκοόλη (88), το συριγγικό οξύ (74) και το 3,4-διϋδροξυ-φαινυλαιθανικό οξύ (DOPAC[9]) (89) [51].

Τέλος, το ανόργανο περιεχόμενο του OMWW[8] αποτελείται κυρίως από μέταλλα. Τα κύρια μεταλλικά στοιχεία που υπάρχουν στο OMWW[8] είναι το κάλιο, το ασβέστιο και το νάτριο και, ως θρεπτικά συστατικά, καθιστούν το OMWW[8] κατάλληλο υλικό για λίπασμα, με την προϋπόθεση ότι η ρυπογόνος επίδρασή του στο περιβάλλον είναι ελεγχόμενη [53].

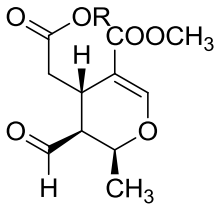
Πίνακας 1. *Συστατικά που απαντώνται στην Olea europaea*

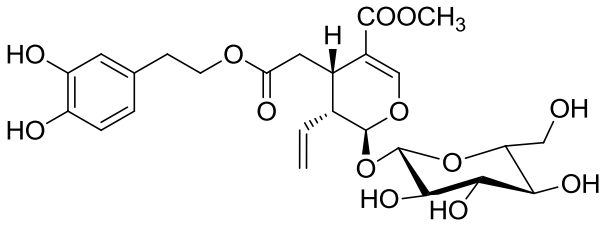


	R_1	R_2	R_3
ελαιοευρωπεΐνη (1)	γλυκοζυλ-	OH	CH_3
λιγκστροσίδης (56)	γλυκοζυλ-	H	CH_3
δεμεθυλ-ελαιοευρωπεΐνη (28)	γλυκοζυλ-	OH	H
άγλυκο της ελαιοευρωπεΐνης (1)	H	OH	CH_3
άγλυκο του λιγκστροσίδη (90)	H	H	CH_3



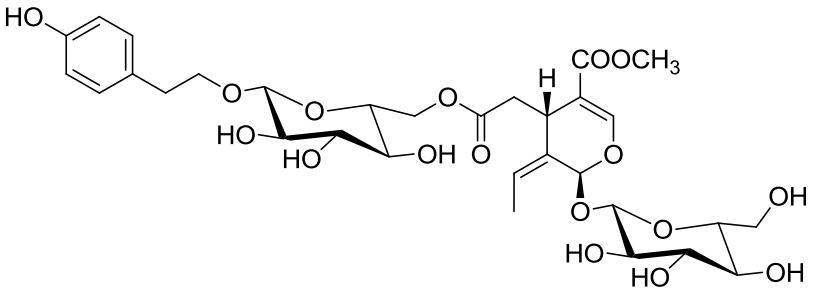
	R
ολεοσίδης (31)	H
διμεθυλεστέρας του ολεοσίδη (58)	CH_3



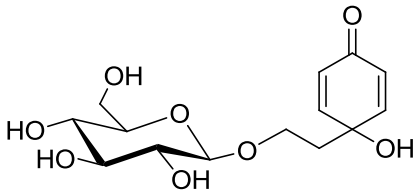


ολεουροσίδης (53)

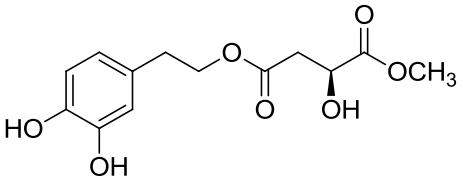
	R
ελενολικό οξύ (55)	H
εστέρας ελενολικού οξέος με υδροξυτυροσόλη (26)	υδροξυ-τυροσόλη



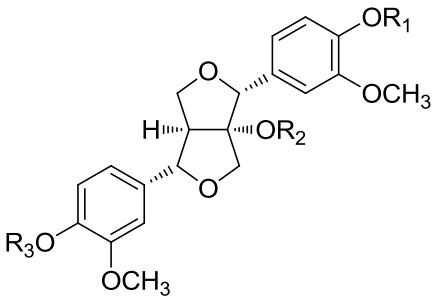
νουζενίδης (30)



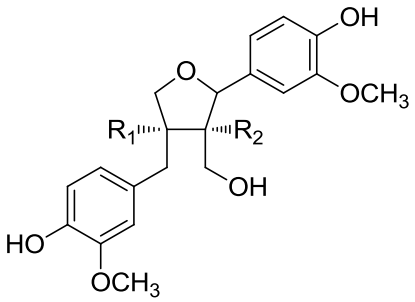
κορνοσίδης (25)



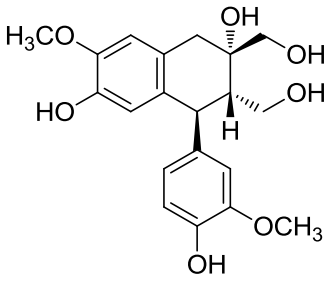
β-(υδροξυ-τυροσολ)-μηλικός μεθυλεστέρας (24)



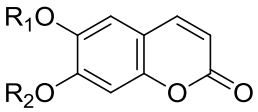
	R_1	R_2	R_3
(+)-1-ακετοξυ-πινορεσινόλη (14)	H	Ac	H
(+)-1-υδροξυ-πινορεσινόλη (15)	H	OH	H
(+)-1-ακετοξυ-πινορεσινολ-4΄΄-*O*-μεθυλ-αιθέρας (16)	H	Ac	CH_3
(+)-1-υδροξυ-πινορεσινολ-4΄΄-*O*-μεθυλ-αιθέρας (17)	H	OH	CH_3



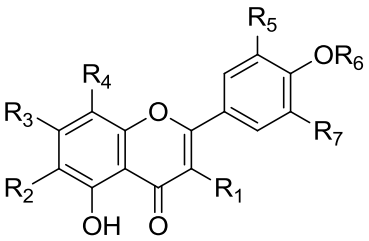
(-)-ολιβίλη (12)



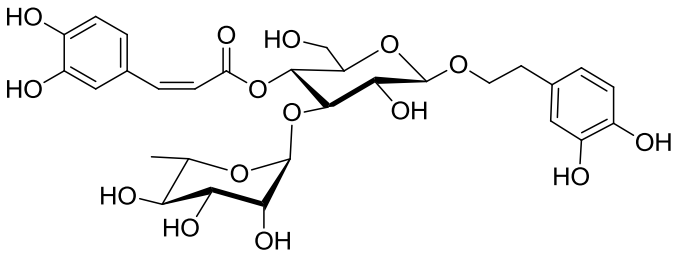
(+)-κυκλο-ολιβίλη (13)



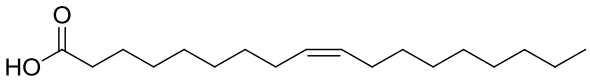
	R_1	R_2
εσκουλίνη (18)	γλυκοζυλ	H
εσκουλετίνη (19)	H	H
σκοπολετίνη (20)	CH_3	H
σκοπολίνη (21)	CH_3	γλυκοζυλ



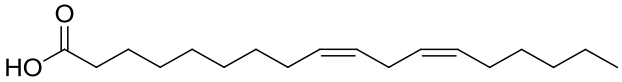
	R_1	R_2	R_3	R_4	R_5	R_6	R_7
κεμπφερόλη (63)	OH	H	OH	H	H	H	H
λουτεολίνη (64)	H	H	OH	H	OH	H	H
γιουνκεΐνη (4′-*O*-γλυκοζίτης της λουτεολίνης) (65)	H	H	OH	H	OH	γλυκοζυλ	H
7-*O*-γλυκοζίτης της λουτεολίνης (66)	H	H	γλυκοζυλ	H	OH	H	H
σκολυ(ϊ)μοσίδιο (7-*O*-ρουτινοζίτης της λουτεολίνης) (67)	H	H	ρουτινοζυλ	H	OH	H	H
4′-O-ρουτινοζίτης της απιγενίνης (59)	H	H	OH	H	H	ρουτινοζυλ	H
απιγετρίνη (7-*O*-γλυκοζίτης της απιγενίνης) (60)	H	H	γλυκοζυλ	H	H	H	H
ισοροϊφολίνη (7-*O*-ρουτινοζίτης της απιγενίνης) (61)	H	H	ρουτινοζυλ	H	H	H	H
απιγενίνη (35)	H	H	OH	H	H	H	H
κερκετίνη (32)	OH	H	OH	H	OH	H	H
ρουτίνη (3-*O*-ρουτινοζίτης της κερκετίνης) (34)	ρουτινοζυλ	H	OH	H	OH	H	H
κερσιτρίνη (3-*O*-ραμνοζίτης της κερκετίνης) (36)	ραμνοζυλ	H	OH	H	OH	H	H
7-O-γλυκοζίτης της κερκετίνης (33)	OH	H	γλυκοζυλ	H	OH	H	H
χρυσοερυόλη (37)	H	H	OH	H	OCH_3	H	H
εσπεριτίνη (62)	H	H	OH	H	OH	CH_3	H



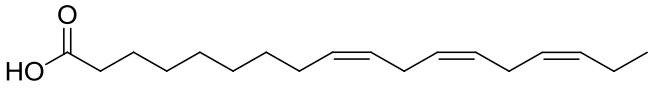
βερμπασκοσίδης (29)



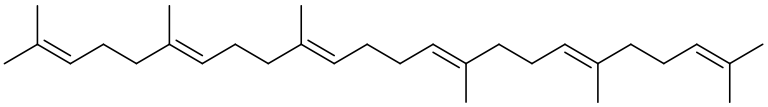
ελαϊκό οξύ (79)



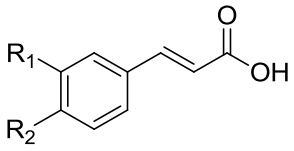
λινελαϊκό οξύ (80)



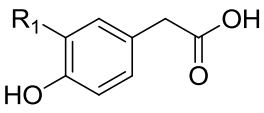
λινολενικό οξύ (81)



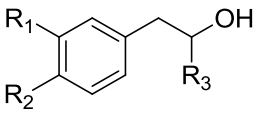
σκουαλένιο (82)



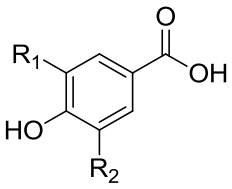
	R_1	R_2
κιναμωμικό οξύ (69)	H	H
p-κουμαρικό οξύ (7)	H	OH
καφεϊκό οξύ (6)	OH	OH
φερουλικό οξύ (8)	OCH_3	OH



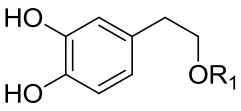
	R_1
ομοβαλινικό οξύ (70)	OCH_3
4-υδροξυ-φαινυλαιθανικό οξύ (4)	OCH_3
DOPAC[9] (89)	OH

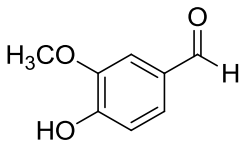


	R_1	R_2	R_3
τυροσόλη (3)	H	OH	H
υδροξυ-τυροσόλη (2)	OH	OH	H
3,4-διυδροξυ-φαινυλο-γλυκόλη (27)	OH	OH	OH
ομοβαλινική αλκοόλη (88)	OCH_3	OH	H



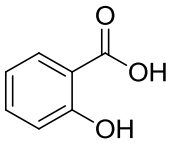
	R_1	R_2
γαλλικό οξύ (87)	OH	OH
συριγγικό οξύ (74)	OCH_3	OCH_3



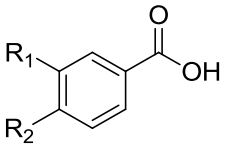


βανιλίνη (9)

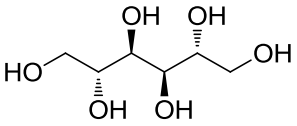
	R_1
γλυκοζίτης της υδροξυ-τυροσόλης (23)	γλυκοζυλ
ραμνοζίτης της υδροξυ-τυροσόλης (22)	ραμνοζυλ



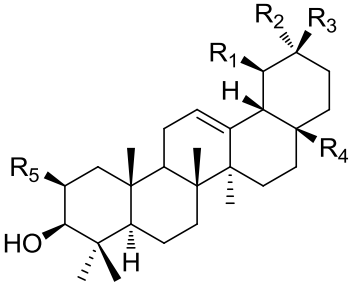
BHA[5] (73)

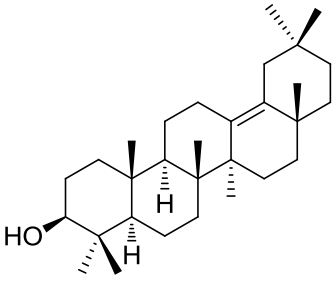


	R_1	R_2
PHBA[4] (71)	OH	H
πρωτοκατεχουϊκό οξύ (72)	OH	OH
βανιλικό οξύ (5)	OH	OCH_3



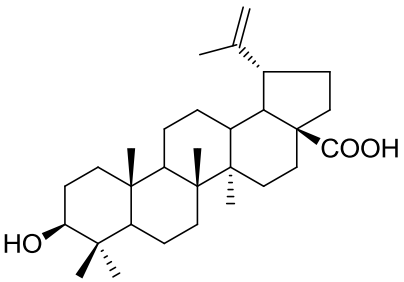
δ-μαννιτόλη (10)



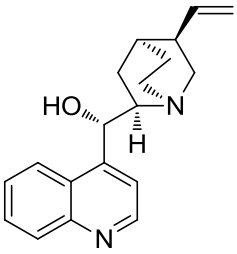


δ-αμυρίνη

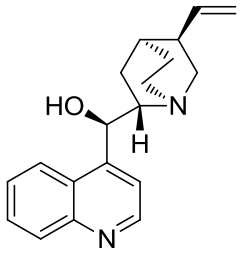
	R_1	R_2	R_3	R_4	R_5
ερυθροδιόλη (46)	H	CH_3	CH_3	CH_2OH	H
ουβαόλη (47)	CH_3	CH_3	H	CH_2OH	H
ουρσολινικό οξύ (48)	CH_3	CH_3	H	COOH	H
μασλινικό οξύ (49)	H	CH_3	CH_3	COOH	OH
ολεανολικό οξύ (77)	H	CH_3	CH_3	COOH	H
β-αμυρίνη (38)	H	CH_3	CH_3	CH_3	H



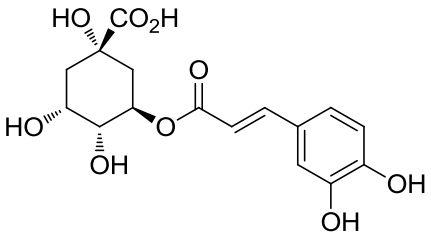
μπετουλινικό οξύ (78)



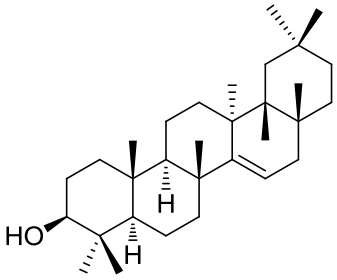
κιγχονίνη (75)



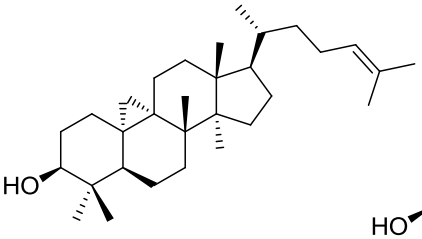
κιγχονιδίνη (76)



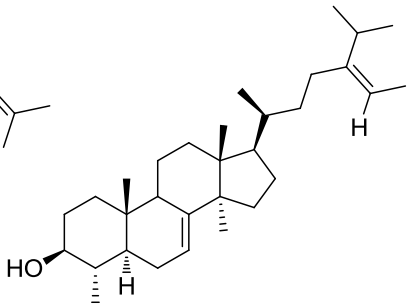
χλωρογενικό οξύ (68)



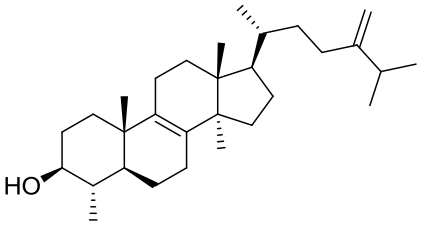
τραροξερόλη (39)



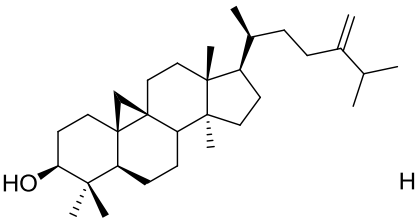
κυκλοαρτενόλη (41)



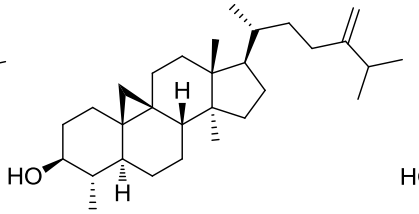
κιτροσταδιενόλη (45)



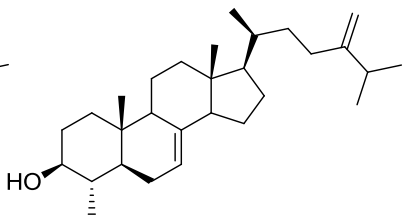
ομπτουσιφολιόλη (42)



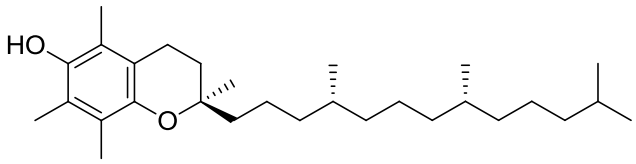
24-μεθυλενο-κυκλοαρτενόλη (40)



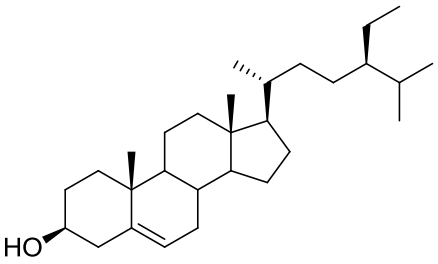
κυκλοευκαλενόλη (44)



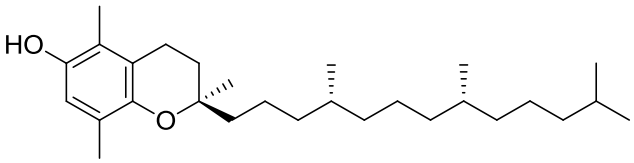
γραμιστερόλη (43)



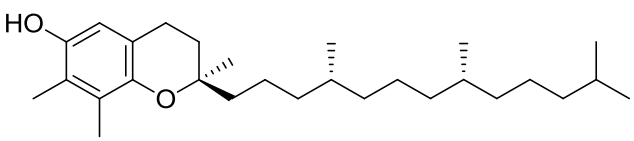
α-τοκοφερόλη (50)



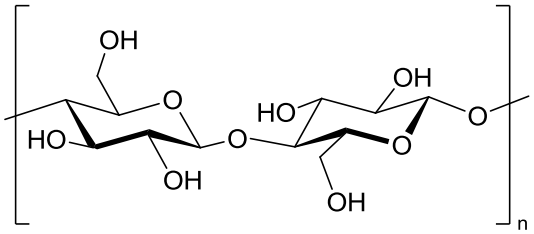
β-σιτοστερόλη (11)



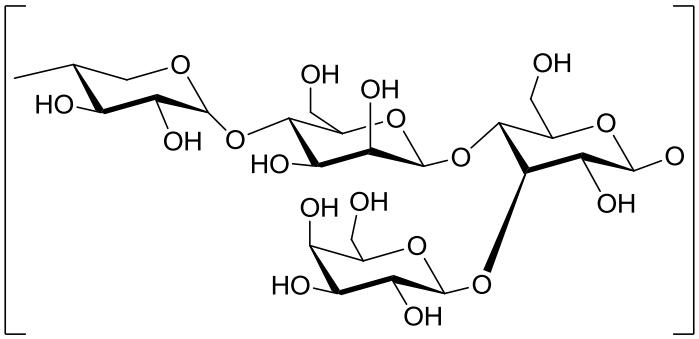
β-τοκοφερόλη (51)



γ-τοκοφερόλη (52)

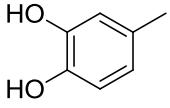


κυτταρίνη (84)

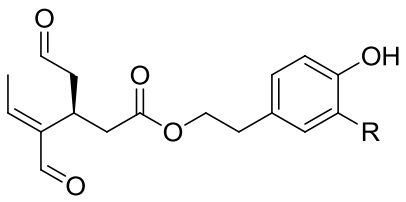


το συνηθέστερο μοριακό «μοτίβο» ημικυτταρίνης (85)

-D-ξυλόζη-(β 1,4)- D-μαννόζη-(β 1,4)-
D-γλυκόζη-(β 1,3)- D-γαλακτόζη



4-μεθυλο-κατεχόλη (86)

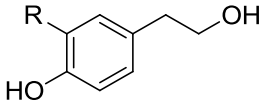
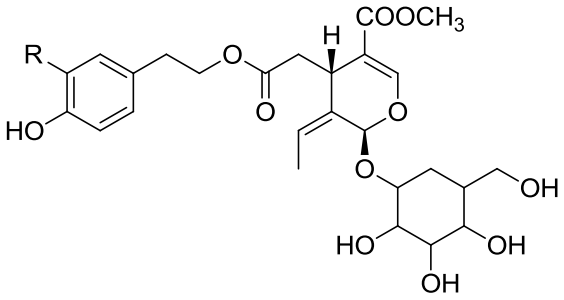


	R
ολεασίνη (57)	OH
ολεοκανθάλη (83)	H

I.5 Ελαιοευρωπεΐνη, μια πρώτη ύλη για σύνθεση και φαρμακολογία

I.5.a *Εισαγωγή*

Το παρθένο ελαιόλαδο είναι ένα τυπικό παράδειγμα ενός «φυσικού» λειτουργικού τροφίμου [54]. Η θετική του επίδραση στην υγεία αποδίδεται στην περιεκτικότητά του σε μονοακόρεστα λιπαρά οξέα (π.χ. ελαϊκό οξύ) (80%) και στην παρουσία βιοδραστικών συστατικών. Το «φαινολικό προφίλ» διαφόρων δειγμάτων ελαιολάδου διαφέρει, ανάλογα με τη γεωγραφική προέλευση και την ποικιλία της ελιάς [55]. Στα κύρια ενεργά συστατικά του ελαιολάδου, όπως αναφέρθηκε και στην υποενότητα I.4.d.4, συγκαταλέγονται το ελαϊκό οξύ, τα φαινολικά συστατικά και το σκουαλένιο. Πιο συγκεκριμένα, τα φαινολικά συστατικά υδροξυτυροσόλη (2), τυροσόλη (3), ελαιοευρωπεΐνη (1) και λιγκστροσίδης (56), εμφανίζονται σε υψηλότερα επίπεδα στο παρθένο ελαιόλαδο και έχουν καταδείξει αντιοξειδωτική δράση [2]. Τα ανωτέρω αντιοξειδωτικά πιστεύεται ότι είναι υπεύθυνα για έναν αριθμό βιολογικών δράσεων του ελαιολάδου, μερικές εκ των οποίων αναφέρθηκαν προηγούμενα και θα αναλυθούν στη συνέχεια.

R		
H	τυροσόλη (3)	λιγκστροσίδης (56)
OH	υδροξυτυροσόλη (2)	ελαιοευρωπεΐνη (1)

Πίνακας 2. *Τα κυριότερα φαινολικά συστατικά του ελαιολάδου*



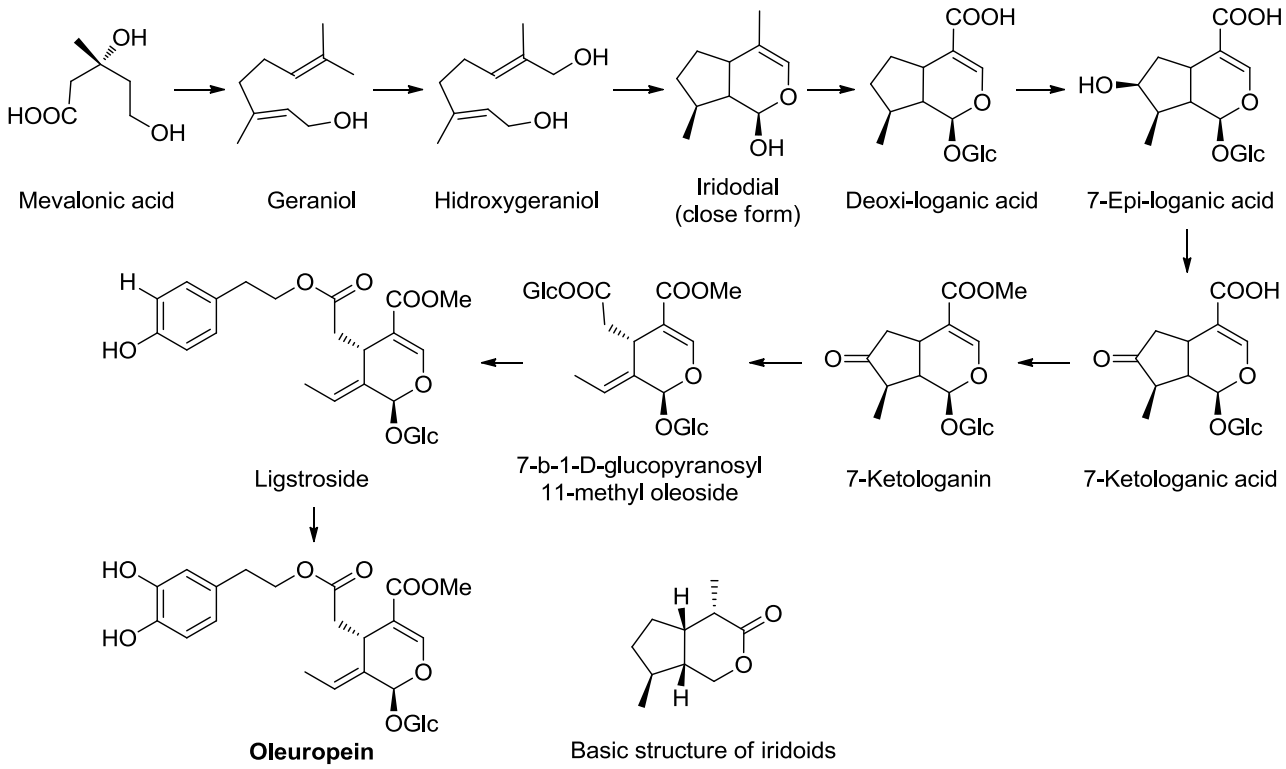


I.5.b *Η Ελαιοευρωπεΐνη*

Η ελαιοευρωπεΐνη (1) (oleuropein, άλλες ελληνικές αποδόσεις: ελευρωπαΐνη, ελαιοευρωπαΐνη, ολευρωπαΐνη, ολευρωπεΐνη) είναι ένας σεκοϊριδοειδής γλυκοζίτης, χαρακτηριστικός της οικογένειας των Ολεασών (Oleaceae) και αποτελεί το κύριο φαινολικό συστατικό της ελιάς (*Olea europaea*), από την οποία και ονομάστηκε.

Όπως προαναφέρθηκε, βρίσκεται στα φύλλα και το φλοιό της ελιάς, αλλά και στον ελαιόκαρπο, ενώ η περιεκτικότητα σε ελαιοευρωπεΐνη (1) είναι μεγαλύτερη στους ανώριμους, πράσινου χρώματος, ελαιόκαρπους. Τα τελευταία χρόνια, η ελαιοευρωπεΐνη (1) και ορισμένες άλλες φαινόλες, όπως και διάφορα παράγωγά τους, έχουν μελετηθεί ως προς τη φαρμακολογική και προστατευτική τους δράση.

Η βιοσυνθετική πορεία της ελαιοευρωπεΐνης (1) [56] ξεκινάει από το μεβαλονικό οξύ και δίνεται στο Σχήμα 1.



Σχήμα 1. *Βιοσύνθεση της ελαιοευρωπεΐνης (1) και βασική δομή ιριδοειδών (Damtoft et al.* ***[56]****)*

I.5.b.1 *Ιστορική Αναδρομή*

Η ελαιοευρωπεΐνη (1), ως ξεχωριστή ουσία, ανακαλύφθηκε το 1908 από τους Bourquelot και Vintilescu [57], [58], οι οποίοι απομόνωσαν το πικρό αυτό συστατικό από τους καρπούς της ελιάς, καθώς και από το φλοιό και τα φύλλα, ενώ του έδωσαν και τη χαρακτηριστική του ονομασία. Το περιέγραψαν ως ένα πικρό [59], μη κρυσταλλικό γλυκοζίτη, ευδιάλυτο σε αλκοόλη, αρκετά διαλυτό στο νερό και πρακτικώς αδιάλυτο σε αιθέρα.

Οι Hilts και Hollingsheada [60] πρότειναν ότι η ελαιοευρωπεΐνη (1) είναι μια ουσία που μοιάζει δομικά με ταννίνη, ενώ οι Cruess και Alsberg [61] επιβεβαίωσαν ορισμένα κοινά, με τις ταννίνες, χαρακτηριστικά. Επίσης, κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι η ελαιοευρωπεΐνη (1) περιέχει στη δομή της ένα διπλό δεσμό και φαινολικές ομάδες και άρα πρόκειται για γλυκοζίτη, ενώ περιέγραψαν το καφεϊκό οξύ (6), ως ένα συστατικό του άγλυκου.

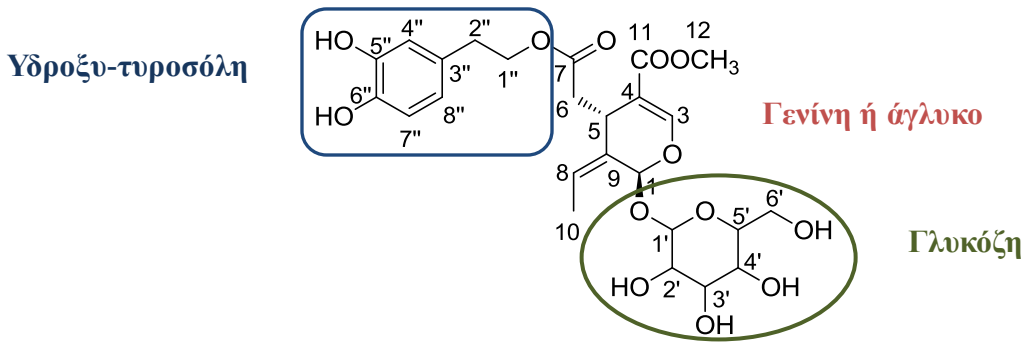
Σύμφωνα με τους τελευταίους, η ελαιοευρωπεΐνη (1) μπορεί να εξαχθεί από πράσινες ελιές, κατά τους καλοκαιρινούς μήνες και από τα φύλλα, τους μίσχους και τις ρίζες του ελαιόδεντρου καθ' όλη τη διάρκεια του έτους, ενώ βρέθηκε ότι αποτελεί το 0,6% της ξηρής μάζας της σάρκας του πράσινου καρπού και μέχρι το 6% του φλοιού των ριζών. Η ταύτιση του πικρού συστατικού της ελιάς με την ουσία ελαιοευρωπεΐνη (1) προκύπτει ως συμπέρασμα από το γεγονός ότι η τελευταία μπορεί να βρεθεί μόνο στις άγουρες και πικρές πράσινες ελιές και όχι στις ώριμες μαύρες, οι οποίες στερούνται της χαρακτηριστικής πικρής γεύσης.

Πολύ αργότερα, το 1960, οι Panizzi, Scarpati και Oriente [62] υπέδειξαν ότι το μόριο της ελαιοευρωπεΐνης (1) περιέχει γλυκόζη, β-3,4-διυδροξυ-φαινυλαιθανόλη (υδροξυτυροσόλη) (2) και ένα οξύ το οποίο είναι γνωστό ως ελενολικό οξύ (55). Το οξύ αυτό ήταν ήδη γνωστό (παρασκευαζόταν με υδρόλυση εκχυλίσματος των ελαιοκάρπων με φωσφορικό οξύ) και είχε προταθεί από το 1960, ως αντιϊικό και από το 1962, ως φάρμακο κατά της υπέρτασης [63]. Επιπλέον, μια σειρά από εργαστηριακά πειράματα με ελενολικό ασβέστιο, ένα άλας του ελενολικού οξέος (55), έδειξε μια ισχυρή επίδραση έναντι όχι μόνο ιών, αλλά και βακτηρίων και παρασιτικών πρωτοζώων.

Το 1973, οι Walter, Fleming και Etchells [64], σε μια μελέτη της αντιμικροβιακής δράσης των ενώσεων που προκύπτουν με υδρόλυση της ελαιοευρωπεΐνης (1), επιβεβαίωσαν το χημικό της τύπο. Ακόμη, στην ίδια εργασία περιγράφηκε μια μέθοδος απομόνωσης της ελαιοευρωπεΐνης (1) από τις ελιές, με την τεχνική της εκχύλισης κατ' αντιρροή (*counter-current extraction*).

I.5.b.2 *Δομή και περιγραφή*

Σε δομικό επίπεδο, η ελαιοευρωπεΐνη (1) είναι ένας φαινολικός σεκοϊριδοειδής γλυκοσίδης, με σημαντική βιολογική δράση, που έχει την ακόλουθη δομή *(Εικόνα 4)*:



Εικόνα 4. *Δομή της Ελαιοευρωπεΐνης (1)*

Τρία διαφορετικά μέρη συνθέτουν αυτή τη δομή:

- ✓ μία φυσική φαινόλη, η 3,4-διυδροξυ-φαινυλαιθανόλη, με κοινή ονομασία υδροξυτυροσόλη (2)

- ✓ μία γενίνη (ονομάζεται επίσης άγλυκο), το ελενολικό οξύ (55), που αποτελείται από δύο ασύμμετρα κέντρα C (*C1, C5*), 2 ακόρεστους διπλούς δεσμούς (*Δ3-4, Δ8-9*), μαζί με έναν μεθυλο εστερα στη θέση *4* και μια ομάδα οξέος στη θέση *7*, εστεροποιημένη με την ομάδα της υδροξυτυροσόλης (2) και τέλος,
- ✓ ένα μονοσακχαρίτη, τη γλυκόζη

I.5.b.3 *Πηγές Ελαιοευρωπεΐνης*

Η ελαιοευρωπεΐνη (1) δεν απαντάται μόνο στο γένος *Olea* [65], αλλά συχνά και σε πολλά άλλα γένη της οικογένειας Oleaceae [66] και πιο συγκεκριμένα, στα γένη *Fraxinus*, [56], [67], [68], [69] *Syringa*, [56] και *Ligustrum* [56]. Παρόλα αυτά, η ελαιοευρωπεΐνη (1) ταυτοποιήθηκε επίσης στις οικογένειες Amaranthaceae (*Gomphrena serrata*) [70], Simaroubaceae (*Brucea amarissima*) [71], Apocynaceae (*Carissa edulis*) [72], Aquifoliaceae (*Ilex pubescens*) [73] (*Πίνακες 3, 4*).

Η ελαιοευρωπεΐνη (1) και ο λιγκστροσίδης (56) είναι οι συνηθέστερα απαντώμενες ενώσεις στα είδη της οικογένειας Oleaceae. Οι συγκεντρώσεις αυτών των δύο ενώσεων, αλλά και των παραγώγων τους, στη δρόγη, εξαρτώνται από το στάδιο ωρίμανσης, το τμήμα του φυτού που αναλύεται, την ποικιλία, καθώς επίσης και την εποχή της συγκομιδής [69], [74], [75].

Η ελαιοευρωπεΐνη (1) είναι το επικρατέστερο φαινολικό συστατικό στις διάφορες ποικιλίες του είδους *Olea europaea*. Η περιεκτικότητα του καρπού σε ελαιοευρωπεΐνη (1) ελαττώνεται [76], ενώ των φύλλων αυξάνεται [77], καθώς η ελιά ωριμάζει και μπορεί να φτάσει σε συγκεντρώσεις έως και 140 mg/g ξηρής μάζας, σε νεαρούς ελαιόκαρπους [78] και έως 60-90 mg/g ξηρής μάζας, στα φύλλα [79].

Πίνακας 3. *Οικογένειες και είδη όπου απαντάται η ελαιοευρωπεΐνη* ***(1)***

	Ιριδοειδές: Ελαιοευρωπεΐνη	
Οικογένειες	***Είδη***	
Oleaceae	*Olea europaea*	*Syringa oblata*
	Olea capensis	*Syringa pubescens*
	Olea africana	*Syringa reticulata*
	Fraxinus chinensis Roxb	*Syringa velutina Kom*
	Fraxinus rhynchophylla	*Syringa vulgaris*
	Fraxinus velutina Torr	*Ligustrum vulgare*
	Fraxinus americana	*Ligustrum lucidum*
	Fraxinus ornus	*Ligustrum ovalifolium*
	Fraxinus oxycarba Wild	*Ligustrum sinense*
	Fraxinus excelsior	*Ligustrum obtusifolium*
	Fraxinus chinensis	*Ligustrum japonicum*
	Fraxinus mandshurica japonica	*Osmanthus asiaticus*
	Fraxinus japonica	*Osmanthus cymosus*
	Jasminum officinale f. var. grandiflorum	*Osmanthus ilicifolius*
	Jasminium grandiflorum L.	*Chionanthus retusus*
	Jasminum polyanthum	*Chionanthus virginicus*
		Phillyrea angustifolia
Amaranthaceae	*Gomphrena serrata*	
Simaroubaceae	*Brucea amarissima*	
Apocynaceae	*Carissa edulis*	
Aquifoliaceae	*Ilex pubescens*	



Olea europaea



Fraxinus excelsior



Jasminum polyanthum



Syringa vulgaris



Ligustrum vulgare



Osmanthus asiaticus

Εικόνα 5. *Μερικά είδη όπου απαντάται η ελαιοευρωπεΐνη* ***(1)***

Πίνακας 4. *Μερικά γένη και είδη της οικογένειας Oleaceae, στα οποία απαντάται, μεταξύ άλλων φαινολικών συστατικών, η ελαιοευρωπεΐνη* ***(1)***

Οικογένεια	***Υποοικογένεια***	***Γένος***	***Είδος***	***Φαινολικά Συστατικά***
Oleaceae	*Jasminoideae*	*Jasminum*	*J. polyanthum*	*Jaspolyside, oleoside dimethyl ester, 10-hydroxyoleoside dimethyl ester, oleoside 11-methyl ester, methyl-glucooleoside, 8-epikingiside, ligustroside, angustifoioside B, oleuropein, oleoacetoside, jaspolyanthoside, many other formulations*
	Oleoideae	*Fraxinus*	*F. excelsior*	*Main: 7-β-1-D-glucopyranosyl 11-methyl oleoside, oleoside dimethyl ester, excelsioside, ligustroside* Minor: **oleuropein**, 10-hydroxyligustroside, oleoside 11-methyl ester
			F. angustifolia	*Ligustroside, oleuropein, ligstral, angustifolioside A, (6"-O(β-D-glucopyranosyl)-oleuropein), angustifolioside B, (6"-O(β-D-glucopyranosyl)-ligustroside*
			F. chinensis	*Oleuropein, neooleuropein, cichoriin, frachinoside*
			F. mandshurica var japonica	*Ligustroside, oleuropein*
		Syringa	*S. josikaea*	*Main: oleuropein, Minor: 11-methyl oleoside, ligustroside*
			S. vulgaris	*Ligustroside, oleuropein*
		Ligustrum	*L. ovalifolium*	*Main: ligustroside B, auroside, lamiide* Minor: secologanoside, 8-epikingisidic acid, 7-epiloganic acid
			L. vulgare	*Ligustroside, oleuropein*
		Olea	*O. europaea*	*Verbascoside, oleuropein, demethyl oleuropein, ligustroside, cornoside, halleridone, tyrosol, hydroxytyrosol glucoside, nuzhenide*
		Osmanthus	*O. asiaticus*	*Secologanoside 7-methyl ester, 8-epikingiside, oleuropein, 10-hydroxyoleuropein, 10-acetoxyoleuropein, ligustroside, 10-hydroxyligustroside, 10-acetoligustroside, oleoside dimethyl ester, 10-hydroxyoleoside dimethyl ester, 10-hydroxyoleoside 11-methyl ester*
		Phillyrea	*P. latifolia*	*Main: oleuropein, Minor: ligustroside, secologanoside, secoxyloganin, 8-epikingisidic acid*

I.5.c *Βιολογικές και φαρμακολογικές δράσεις της Ελαιοευρωπεΐνης*

Η πηγή των ωφελειών του ελαιολάδου στην υγεία είναι, μεταξύ άλλων, το ελαϊκό οξύ (79) (ένα μονοακόρεστο λιπαρό οξύ), τα φαινολικά συστατικά και το σκουαλένιο (82). Στα κύρια φαινολικά συστατικά περιλαμβάνονται η ολεασίνη (ή ελεασίνη) (57), η ολεοκανθάλη (ή ελεοκανθάλη) (83), η τυροσόλη (3), η υδροξυτυροσόλη (2) και η ελαιοευρωπεΐνη (1), που παρέχουν εξαιρετική αντιοξειδωτική δράση, καθώς συμβάλλουν στην εξουδετέρωση επιβλαβών, οξειδωτικών ριζών. Οι οξειδωτικοί παράγοντες είναι υπεύθυνοι για την εμφάνιση πολλών ασθενειών και παθήσεων, όπως οι καρδιαγγειακές διαταραχές, ο καρκίνος, η οστεοπόρωση, η νόσος Alzheimer, και το προεμμηνορροϊκό σύνδρομο. Επίσης, τα φαινολικά συστατικά του ελαιολάδου αναστέλλουν την οξείδωση της λιποπρωτεΐνης LDL[1], μιας πρωτεΐνης που παίζει μεγάλο ρόλο στην ανάπτυξη της καρδιαγγειακής νόσου. Επιπλέον, υπάρχουν ισχυρές ενδείξεις για την αντιμικροβιακή δράση αυτών των συστατικών, σύμφωνα με τις οποίες, τα φαινολικά συστατικά καταστρέφουν αποικίες ή στελέχη μικροοργανισμών που εμπλέκονται σε εντερικές δυσλειτουργίες, καθώς και σε λοιμώξεις του αναπνευστικού ή του γενετικού συστήματος. Αν και η πλειοψηφία των ερευνών έχει διεξαχθεί επί του ελαίου, η κατανάλωση ολόκληρων των ελαιόκαρπων θα μπορούσε επίσης να παρέχει οφέλη για την υγεία [3].

Ένας μεγάλος αριθμός βιβλιογραφικών αναφορών, παρέχει πληροφορίες για το ευρύ φάσμα φαρμακολογικών δράσεων που εμφανίζουν τα φαινολικά συστατικά του ελαιολάδου και κυρίως η ελαιοευρωπεΐνη (1) και η υδροξυτυροσόλη (2), κατόπιν *in vitro* αλλά και *in vivo* μελέτης, σε πειραματόζωα και εθελοντές, ασθενείς ή υγιείς.

Μεταξύ των δράσεων αυτών συγκαταλέγονται οι:

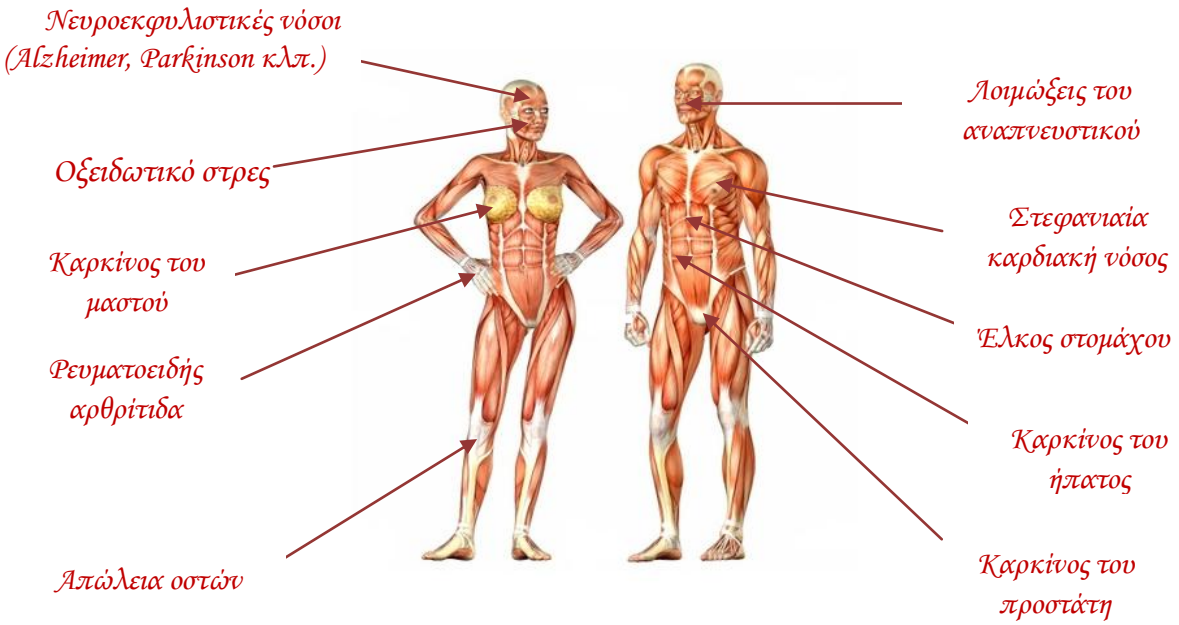
- Αντιοξειδωτική δράση
- Αντιμικροβιακή δράση
- Αντιφλεγμονώδης δράση
- Αντιϊκή δράση
- Αντικαρκινική δράση
- Αντιθρομβωτική ή αντισυσσωματική δράση
- Δράση έναντι της στεφανιαίας καρδιακής νόσου
- Αντιδιαβητική
- Αντι-νευροεκφυλιστική – Νευροπροστατευτική
- Άλλες βιολογικές δράσεις

I.5.c.1 *Αντιοξειδωτική δράση*

Τα αποτελέσματα μελετών πάνω στον προσδιορισμό της *in vitro* και *in vivo* αντιοξειδωτικής δράσης του παρθένου ελαιολάδου [80], έδειξαν ότι αυτή εξαρτάται από τη συγκέντρωση των φαινολικών συστατικών [81] και την πολικότητα τους [82].

Υψηλότερη αντιοξειδωτική δράση παρουσιάζουν, σύμφωνα με πληθώρα μελετών, οι ενώσεις με μία ο-διφαινολική ομάδα στη δομή τους, όπως η υδροξυτυροσόλη (2) και η ελαιοευρωπεΐνη (1) [80], με την πρώτη να αποδεικνύεται ισχυρότερη της δεύτερης [83]. Οι ευεργετικές ιδιότητες του εξαιρετικά παρθένου ελαιολάδου, λόγω αντιοξειδωτικής δράσης, μπορούν να διατηρηθούν καθ' όλη τη διάρκεια ζωής του προϊόντος. Ακόμη, μετά από μελέτες

πάνω στην ανθεκτικότητα των φαινολικών σε συνθήκες όπως το τηγάνισμα, η ελαιοευρωπεΐνη (1) και το άγλυκό της (54) έδειξαν αξιοσημείωτη αντοχή, ενώ η υδροξυτυροσόλη (2) διασπάστηκε ταχύτερα [84].



Σχήμα 2. *Μερικές από τις παθήσεις στις οποίες δρα ευεργετικά η ελαιοευρωπεΐνη* ***(1)***

I.5.c.1.1 Δράση ανασταλτική της οξείδωσης της LDL[1] λιποπρωτεΐνης

Πολυάριθμες μελέτες έχουν δείξει ότι τα φαινολικά συστατικά του ελαιολάδου είναι ισχυροί αναστολείς της οξείδωσης της LDL[1] *in vitro* [85], [86], αλλά και *in vivo*, σε κουνέλια [87] και απομονωμένες καρδιές αρουραίου [88]. Ακόμη, δίαιτα εμπλουτισμένη με ελαιοευρωπεΐνη (1) αυξάνει την ικανότητα της LDL[1] να ανθίσταται στην οξείδωση και μειώνει τα επίπεδα της χοληστερόλης στο πλάσμα [83].

I.5.c.1.2 Αντι-αθηρωγόνος δράση

Οι Visioli et al. ανέφεραν ότι η ελαιοευρωπεΐνη (1) παρουσιάζει αντιαθηρωγόνο/ αντιαθηρωματική δράση [89], ενώ η υδροξυτυροσόλη (2) και το άγλυκο της ελαιοευρωπεΐνης (54), μπορούν να παίξουν, *in vivo*, ένα σημαντικό ρόλο σε φλεγμονώδεις παθολογίες όπως η αθηροσκλήρωση/ αθηρωμάτωση [90], [91].

I.5.c.1.3 Δράση ως δεσμευτές ελευθέρων ριζών

Μελέτες έδειξαν ότι η υδροξυτυροσόλη (2) και η ελαιοευρωπεΐνη (1) είναι ισχυροί δεσμευτές ελευθέρων ριζών [50], [92], ενώ η ικανότητα των συστατικών του εκχυλίσματος των φύλλων της *Olea europaea* να δεσμεύουν ελεύθερες ρίζες, διαφοροποιείται από παραμέτρους, όπως η ποικιλία, η ηλικία των φύλλων, και η ημερομηνία δειγματοληψίας [93].

Ένα φαινόμενο που σχετίζεται με τη δημιουργία ελευθέρων ριζών οξυγόνου (ROS[10]) και τη γήρανση των κυττάρων είναι το *Οξειδωτικό Στρες*. Σε καλλιέργειες όπου χορηγήθηκε ελαιοευρωπεΐνη (1), παρουσίαστηκε καθυστέρηση στην εμφάνιση μορφολογικής γήρανσης και η διάρκεια ζωής τους παρατάθηκε κατά περίπου 15% [94], [95].

I.5.c.1.4 Δράση έναντι της υπεριώδους ακτινοβολίας UV-B

Το μεσογειακό κλίμα χαρακτηρίζεται από υψηλές θερμοκρασίες, και από ισχυρή υπεριώδη B (UV-B[11]) ακτινοβολία, που προκαλεί γήρανση και πάχυνση του δέρματος, αύξηση της ρυτίδωσης, μελάγχρωση, ακόμα και καρκίνο. *In vivo* μελέτες σε ποντίκια [96], έδειξαν ότι τα εκχυλίσματα φύλλων ελιάς και η ελαιοευρωπεΐνη (1) ανέστειλαν την αύξηση του πάχους του δέρματος, που προκαλείται από την ακτινοβολία. Άλλοι ερευνητές [97] απέδειξαν ότι τα σκευάσματα της ελαιοευρωπεΐνης (1) εμφανίζουν προστατευτικές/μαλακτικές/καλλυντικές ιδιότητες, μειώνοντας το, επαγόμενο από UV-B[11], ερύθημα, την επιδερμική απώλεια νερού και τη ροή του αίματος [98].

I.5.c.2 *Αντιμικροβιακή δράση*

Μεγάλος αριθμός φυτών, βοτάνων και μπαχαρικών χρησιμοποιούνται στη λαϊκή ιατρική, στη συντήρηση τροφίμων, στην παρασκευή καλλυντικών, και σε άλλες εφαρμογές, από την αρχαιότητα, λόγω της αντιμικροβιακής τους δράσης, ενώ σήμερα, υπάρχει ανανεωμένο ενδιαφέρον για τα φυσικά αντιμικροβιακά [99],[100].

Μελέτες [101] έδειξαν ότι η ελαιοευρωπεΐνη (1) μπορεί να αναστείλει την πρωτεϊνική έκκριση από το *Staphylococcus aureus* και την ανάπτυξή του. Η υδροξυτυροσόλη (2) και η ελαιοευρωπεΐνη (1) εμφανίζουν δράση έναντι βακτηριακών στελεχών της ATCC[12] και κλινικών βακτηριακών στελεχών. Έχει προταθεί ότι αυτή η δράση οφείλεται στις δύο ο-φαινολικές ομάδες στη δομή τους [102]. Αργότερα, διεξήχθησαν μελέτες [103] που κατέδειξαν την *in vitro* και *in vivo* αντι-τοξοπλασματική δράση της ελαιοευρωπεΐνης (1).

I.5.c.3 *Αντιφλεγμονώδης δράση*

Η ελαιοευρωπεΐνη (1) αποκτά αντιφλεγμονώδεις ιδιότητες, αναστέλλοντας τη δράση της λιποξυγενάσης, τη παραγωγής του λευκοτριενίου B4, [104] και τη βιοσύνθεσης προ-φλεγμονωδών κυτοκινών [105], [106] ή ρυθμίζοντας φλεγμονώδεις παραμέτρους [107]. Μελέτες [108] για τον καθορισμό της δράσης της σε τραύματα του νωτιαίου μυελού, έδειξαν ότι η χορήγησή της περιόρισε σημαντικά τη φλεγμονή, ενώ άλλες μελέτες [109], δείχνουν ότι εμφανίζει ευεργετικές ιδιότητες, ως προς το πεπτικό έλκος, *in vivo*.

I.5.c.3.1 Ρευματοειδής Αρθρίτιδα

Το αντιοξειδωτικό αποτέλεσμα κατανάλωσης ελαιολάδου έχει αποδειχθεί ότι μειώνει τη φλεγμονή που παρατηρείται στις αρθρώσεις λόγω των υψηλών επιπέδων ROS[10] [110]. Επίσης, παρατηρήθηκε μείωση του πόνου και της πρωινής δυσκαμψίας και βελτιωμένη αξιολόγηση των ασθενών της νόσου παγκοσμίως [111]. Η κατανάλωση ελαιολάδου περιορίζει τον κίνδυνο εμφάνισης ρευματοειδούς αρθρίτιδας, δρώντας και προληπτικά, εκτός από θεραπευτικά [112].

I.5.c.3.2 Επούλωση πληγών

Τα φύλλα (και το υδατικό εκχύλισμα αυτών) και οι καρποί της *Olea europaea L.* έχουν χρησιμοποιηθεί για εξωτερική χρήση, σαν μαλακτικό για τα έλκη του δέρματος και την επούλωση φλεγμονωδών τραυμάτων [113].

I.5.c.4 *Αντιϊκή δράση*

Μελέτες έχουν δείξει ότι η ελαιοευρωπεΐνη (1) εμφανίζει ισχυρή αντιϊική δράση έναντι ιών του αναπνευστικού (αναπνευστικού συγκυτιακού ιού RSV[13] και *parainfluenza* τύπου 3 ιού hPIV-3[14] [114], της οικογένειας Paramyxoviridae), έναντι της λοιμώδους μονοπυρήνωσης IM[15] από τον Epstein–Barr ιό (EBV[16]), καθώς και έναντι του ιού της ηπατίτιδας, του ροταϊού, του ρινοϊού των βοοειδών και του ιού της λευχαιμίας των αιλουροειδών [115]. Εκχυλίσματα των φύλλων έδειξαν ανασταλτική *in vitro* δράση, έναντι της προσβολής από τον HIV-1[17], της μετάδοσης και της αντιγραφής του [116], [117].

I.5.c.5 *Αντικαρκινική δράση*

Πρόσφατα δημοσιευμένες επιδημιολογικές μελέτες έχουν δείξει μια ξεκάθαρη συσχέτιση μεταξύ της κατανάλωσης ελαιόλαδου και του μειωμένου κινδύνου εμφάνισης καρκίνου διαφόρων τύπων, όπως μαστού [118], [119], [120], προστάτη [121], πνευμόνων [122], λάρυγγα [123], ωοθηκών [123] και παχέος εντέρου [124]. Ακόμη, εκκλεκτικές αντικαρκινικές δράσεις της ελαιοευρωπεΐνης (1) και άλλων φαινολικών του ελαιολάδου, έναντι συγκεκριμένων κυττάρων-στόχων αναλύθηκαν σε μεγάλο αριθμό μελετών [125], [126], [127].

I.5.c.5.1 Καρκίνος του παχέος εντέρου

Μελέτες [128] έδειξαν ότι, ακόμα και όταν τηγανιστεί, το ελαιόλαδο έχει προστατευτική επίδραση κατά του καρκίνου παχέος εντέρου, ενώ εκχύλισμα με υδροξυτυροσόλη (2), τυροσόλη (3) και σεκοϊριδοειδή παράγωγα, συμπεριλαμβανομένης της ελαιοευρωπεΐνης (1) ασκεί ισχυρή ανασταλτική (χημειοπροστατευτική) δράση επί του πολλαπλασιασμού των καρκινικών κυττάρων, σε ανθρώπινα κύτταρα αδενοκαρκινώματος του παχέος εντέρου [129].

I.5.c.5.2 Καρκίνος του μαστού

Μελέτες που διεξήχθησαν και εξέτασαν τις γυναίκες σε πολλές χώρες της Μεσογείου υποδεικνύουν μια αντίστροφη συσχέτιση μεταξύ της κατανάλωσης ελαιολάδου και της συχνότητας εμφάνισης καρκίνου του μαστού [130], [131], ενώ πρόσφατες μελέτες, [132] κατέδειξαν την αντιπολλαπλασιαστική δράση της ελαιοευρωπεΐνης (1).

I.5.c.5.3 Καρκίνος του προστάτη

Μελέτη πάνω στην επίδραση της ελαιοευρωπεΐνης (1) στις κυτταρικές σειρές, LNCaP[18] (Lymph Node Carcinoma of the Prostate) και DU145[19] του καρκίνου του προστάτη και σε επιθηλιακά κύτταρα του προστάτη BPH-1[20] (Benign Prostatic Hyperplasia) [133], έδειξε ότι με έκθεση των κυτταρικών καλλιεργειών στην ελαιοευρωπεΐνη (1), επάγεται μία αντιοξειδωτική επίδραση επί των BPH-1[20] κυττάρων και μία προ-οξειδωτική επί των καρκινικών, αποτελέσματα που την καθιστούν κατάλληλη ως ανοσοενισχυτικό μέσο στη θεραπεία της προστατίτιδας.

I.5.c.6 *Κυτταροτοξική δράση*

Όσον αφορά στην κυτταροτοξικότητα που εμφανίζουν τα φαινολικά συστατικά του ελαιολάδου, σε *in vitro* δοκιμασία ελέγχου, [134] χρησιμοποιήθηκαν ανθρώπινα κύτταρα από ιστούς της στοματικής κοιλότητας. Για όλους τους τύπους κυττάρων, η φθίνουσα σειρά κυτταροτοξικότητας ήταν: ελενολικό οξύ (55)> ελαιοευρωπεΐνη (1), καφεϊκό οξύ (6)> ο-κουμαρικό οξύ> κινναμωμικό οξύ (69)>> τυροσόλη (3), συριγγικό οξύ (74), βανιλικό οξύ (5).

I.5.c.7 *Αντιθρομβωτική και anti-PAF δράση*

Τα αποτελέσματα μελέτης [135] της αντισυσσωρευτικής των αιμοπεταλίων (anti-PAF[21]) δράσης της ελαιοευρωπεΐνης (1), υποδεικνύουν ότι αναστέλλει τη θρομβίνη και μειώνει την ικανότητά της να διεγείρει τη συσσωμάτωση των αιμοπεταλίων. Ακόμη, τα μικροσυστατικά του ελαιολάδου (όπως, για παράδειγμα, τα ω-3 λιπαρά οξέα) ρυθμίζουν τη διεργασία αιμόστασης και ασκούν αντιθρομβωτική δράση [10].

I.5.c.8 *Δράση έναντι της στεφανιαίας καρδιακής νόσου*

Αρκετές μελέτες έχουν υποστηρίξει τις αντιυπερτασικές ιδιότητες του ελαιολάδου [136], [137-139], [140], [141]. Άλλοι ερευνητές [142] έδειξαν ότι χορήγηση ελαιοευρωπεΐνης (1) για 3 ή 6 εβδομάδες σε κουνέλια που υποβλήθηκαν σε ισχαιμία, μείωσε την έκταση του εμφράγματος και την οξειδωτική βλάβη.

Τέλος, η ελαιοευρωπεΐνη (1) έχει αποδειχθεί [143] ότι ασκεί προστατευτική επίδραση, έναντι της *in vivo*, επαγόμενης από την Δοξορουβικίνη (DXR[22]), καρδιοτοξικότητας.

I.5.c.9 *Αντιδιαβητική δράση*

Αποδεικτικά στοιχεία από επιδημιολογικές μελέτες υποστηρίζουν μία προστατευτική επίδραση της μεσογειακής διατροφής, έναντι της πρόσληψης βάρους και της ανάπτυξης του διαβήτη τύπου 2 [144], [145], [146], [147].

I.5.c.10 *Αντι-νευροεκφυλιστική – Νευροπροστατευτική δράση*

In vitro [148] και επιδημιολογικές [149] μελέτες έχουν επισημάνει το θετικό αντίκτυπο των φαινολών, στην περίπτωση συσχετιζόμενων, με την ηλικία, διαταραχών, όπως η άνοια και το Alzheimer.

Μία άλλη παθολογική κατάσταση, που σχετίζεται με το νευρικό σύστημα και επηρεάζεται ευεργετικά από την ελαιοευρωπεΐνη (1) και γενικά, από τα φαινολικά συστατικά της ελιάς [150], είναι η εγκεφαλική ανοξία, κατά την οποία ο εγκέφαλος πάσχει από έλλειψη οξυγόνου.

I.5.c.11 *Άλλες βιολογικές δράσεις*

Στις περαιτέρω φαρμακολογικές δράσεις της ελαιοευρωπεΐνης (1) περιλαμβάνονται οι: αγγειοδιασταλτική [89], υποτασική [91, 92], διουρητική [91] αντιπυρετική [93], υπογλυκαιμική [151], [152] υπολιπιδαιμική [153], οστεοπροστατευτική [154], [155], ηπατοπροστατευτική [156], ανασταλτική της παραγωγής φλεγμονωδών ενζύμων, όπως των λιποξυγενασών [104] και επαγωγική της παραγωγής άλλων, όπως της λιπάσης, μέσω ζυμών [157], μυοχαλαρωτική του

στομάχου [158], καθώς και ως παράγοντας κατά της παχυσαρκίας [159] και του πεπτικού έλκους [160]. Επιπλέον, ενώ στον άνθρωπο και στα ζώα, η πρόσληψη ελαιοευρωπεΐνης (1) προάγει την όρεξη [161], στα φυτά της οικογένειας *Oleaceae* δρα ως αμυντικός μηχανισμός, μέσω του οποίου προστατεύονται από τους παθογόνους μικροοργανισμούς–εισβολείς [162].

Οργανοληπτικά χαρακτηριστικά του ελαιολάδου

Το εξαιρετικά παρθένο ελαιόλαδο, ο ακρογωνιαίος λίθος της Μεσογειακής διατροφής, χαρακτηρίζεται από τρεις θετικές οργανοληπτικές ιδιότητες: τη «στυπτικότητα» (δηλαδή, καυστική γεύση), την «πικράδα» και τη «φρουτώδη γεύση». Σύμφωνα με τις επίσημες οργανοληπτικές περιγραφές του Διεθνούς Συμβουλίου Ελαιολάδου (International Olive Council – IOC), η αίσθηση της «στυπτικότητας» γίνεται αντιληπτή κυρίως στη στοματοφαρυγγική περιοχή του λαιμού, ενώ της «πικράδας» στο πίσω μέρος τις γλώσσας και συγκεκριμένα στις γευστικές θηλές, ενώ η «φρουτώδης γεύση», είτε απευθείας από τη μύτη, μέσω της αίσθησης της οσμής, είτε στο πίσω μέρος της μύτης [163].

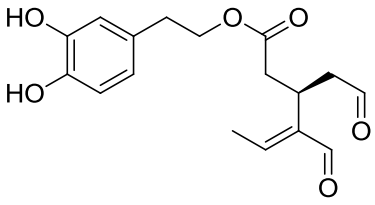
Τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά του παρθένου ελαιολάδου, επηρεάζονται σημαντικά από τη φαινολική του σύσταση. Η απόδοση από τα διάφορα φαινολικά κλάσματα, πικρής γεύσης στο ελαιόλαδο, δριμύτητας και οξύτητας έχει αποδειχθεί από πολλές μελέτες [164]. Γενικά, οι υπεύθυνοι για την "πικάντικη" και "πικρή" γεύση του ελαιολάδου, θεωρούνται ότι είναι η τυροσόλη (3), η υδροξυτυροσόλη (2), και τα διάφορα παράγωγά τους.

Από την άλλη, οι περισσότερες από τις μελέτες, ανέφεραν στατιστικούς συσχετισμούς μεταξύ της απόδοσης στο παρθένο ελαιολάδου των εννοιών *«στυπτικότητα»* και *«πικράδα»*, για την περιγραφή της γεύσης του, και της συνολικής συγκέντρωσης των σεκοϊριδοειδών, ενώ πολύ λίγοι ήταν οι συγγραφείς που παρήγαγαν δεδομένα για να εξηγήσουν κάποια σχέση μεταξύ σεκοϊριδοειδικών χημικών δομών και γευστικών ιδιοτήτων. Στο πλαίσιο αυτό, αρκετοί συγγραφείς πρότειναν ότι τα σεκοϊριδοειδικά παράγωγα της ελαιοευρωπεΐνης (1) και της δεμεθυλ-ελαιοευρωπεΐνης (28), είναι οι κύριοι συνεισφέροντες πικρή γεύση στο παρθένο ελαιόλαδο. [165], [166].

Σε κάθε περίπτωση, παράμετροι που μπορούν να επηρεάσουν το περιεχόμενο, σε φαινολικές ενώσεις, του ελαιολάδου και τις οργανοληπτικές του ιδιότητες, σχετίζονται με την ποικιλία της ελιάς (*Olea europaea L.*), τη γεωγραφική περιοχή, τις αγρονομικές πρακτικές, τους περιβαλλοντικούς παράγοντες, το δείκτη ωρίμανσης του ελαιόκαρπου, τις τεχνικές εκχύλισης και εξαγωγής του ελαιολάδου, τις συνθήκες αποθήκευσης (ηλιακό φως, θερμοκρασία κ.ά.) [167].

Προστασία ελαιολάδου από οξείδωση

Όλα τα παραπάνω δεδομένα, επιβεβαίωσαν το σημαντικό ρόλο που διαδραματίζουν οι πολικές φαινολικές ενώσεις και τα σεκοϊριδοειδικά παράγωγα, στην προστασία του εξαιρετικά παρθένου ελαιολάδου από οξειδωτική υποβάθμιση της σταθερότητάς του. Μια συνεχής αύξηση των πρωτογενών και δευτερογενών προϊόντων οξείδωσης (ιδιαίτερα σε δείγματα με χαμηλότερη περιεκτικότητα σε φαινολικά), καθώς και μια σημαντική αποικοδόμηση των σεκοϊριδοειδών και μια αύξηση της ισομερούς δικαρβοξυμεθυλο- μορφής του άγλυκου της ελαιοευρωπεΐνης (54), παρατηρήθηκαν κατά την αποθήκευση.


HO
HO
O
O
O
O

I.6 Ολεασίνη, το ισχυρότερο αντιοξειδωτικό του ελαιολάδου

I.6.a *Εισαγωγή*

Ένα από τα κυριότερα φαινολικά συστατικά του εξαιρετικά παρθένου ελαιολάδου, που εξαιτίας της αφθονίας του στο ελαιόλαδο, διαδραματίζει καθοριστικό ρόλο στις ευεργετικές ιδιότητες αυτού, για την υγεία, είναι η ολεασίνη (57). Η περιεκτικότητα της ολεασίνης (57) στο ελαιόλαδο ποικίλει και αυξάνεται κατά το στάδιο πρώιμης ωρίμανσης της ελιάς από την οποία θα παραχθεί το εκάστοτε ελαιόλαδο.

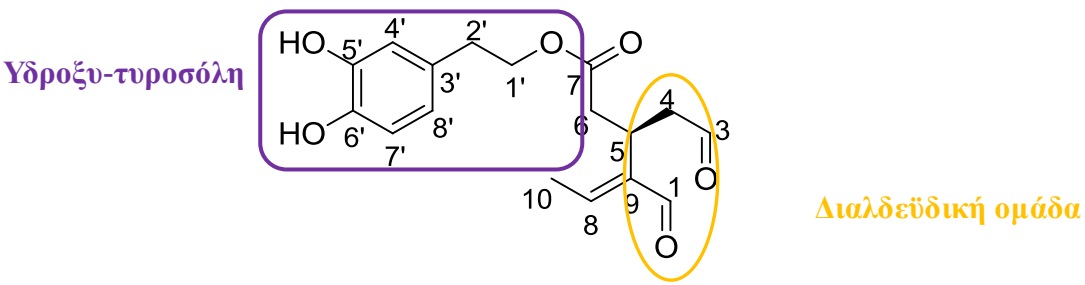
Σύμφωνα με πολλές μελέτες, το περιεχόμενο της ολεασίνης (57) στο εξαιρετικά παρθένο ελαιόλαδο κυμαίνεται από 111 έως 285 mg/ kg [168] ή μπορεί να φθάσει ακόμη και τα 780 mg/ kg [169]. Ακόμη, τα επίπεδα ολεασίνης (57) αυξάνονται εντυπωσιακά στην ελαιόπαστα. Όλες οι σχετικές μελέτες, αναφέρουν ότι τα επίπεδα της ολεασίνης (57) αυξάνονται σημαντικά αμέσως μετά την σύνθλιψη του καρπού, ανεξάρτητα με την ποικιλία της ελιάς ή την παρουσία ολεασίνης (57) ήδη στον καρπό [170]. Επιπλέον, άλλη μελέτη κατέδειξε πολύ υψηλές συγκεντρώσεις ολεασίνης (57) σε δείγμα πάστας που προέκυψε κατόπιν μάλαξης ελαιόκαρπων. Στις μελέτες του Vierhuis και συνεργατών [171], η περιεκτικότητα σε ολεασίνη (57) της θρυμματισμένης ελιάς ήταν 515 mg/ kg και μειώθηκε κατά την μάλαξη, στα 317 mg/ kg. Τέλος, οι Κανάκης και συνεργάτες κατέγραψαν ακόμη υψηλότερες συγκεντρώσεις ολεασίνης (57) σε ελαιόπαστα - 2000 mg/ kg [18].

I.6.b *Η ολεασίνη*

Η ολεασίνη (57) είναι η διαλδεϋδική μορφή του δικαρβοξυμέθυλο ελενολικού οξέος συζευμένου με υδροξυτυροσόλη (2) ή όπως αλλιώς είναι γνωστή, η διαλδεϋδική μορφή του άγλυκου της ελαιοευρωπεΐνης. Είναι σεκοϊριδοειδές ανάλογο της ελαιοευρωπεΐνης (1), θεωρείται επίσης, ανάλογο της υδροξυτυροσόλης (2) και είναι από τα πιο άφθονα φαινολικά συστατικά στο εξαιρετικά παρθένο ελαιόλαδο.

I.6.b.1 Δομή και περιγραφή της ολεασίνης

Η δομή της ολεασίνης (57) είναι συγγενής της ελαιοευρωπεΐνης (1), από την οποία έχει όμως αποσπαστεί η καρβοξυμεθυλο ομάδα και η ομάδα του σακχάρου της γλυκόζης, ενώ ταυτόχρονα ο σεκοϊριδοειδικός δακτύλιος έχει διανοιχτεί, σχηματίζοντας δύο αλδευδικές ομάδες.

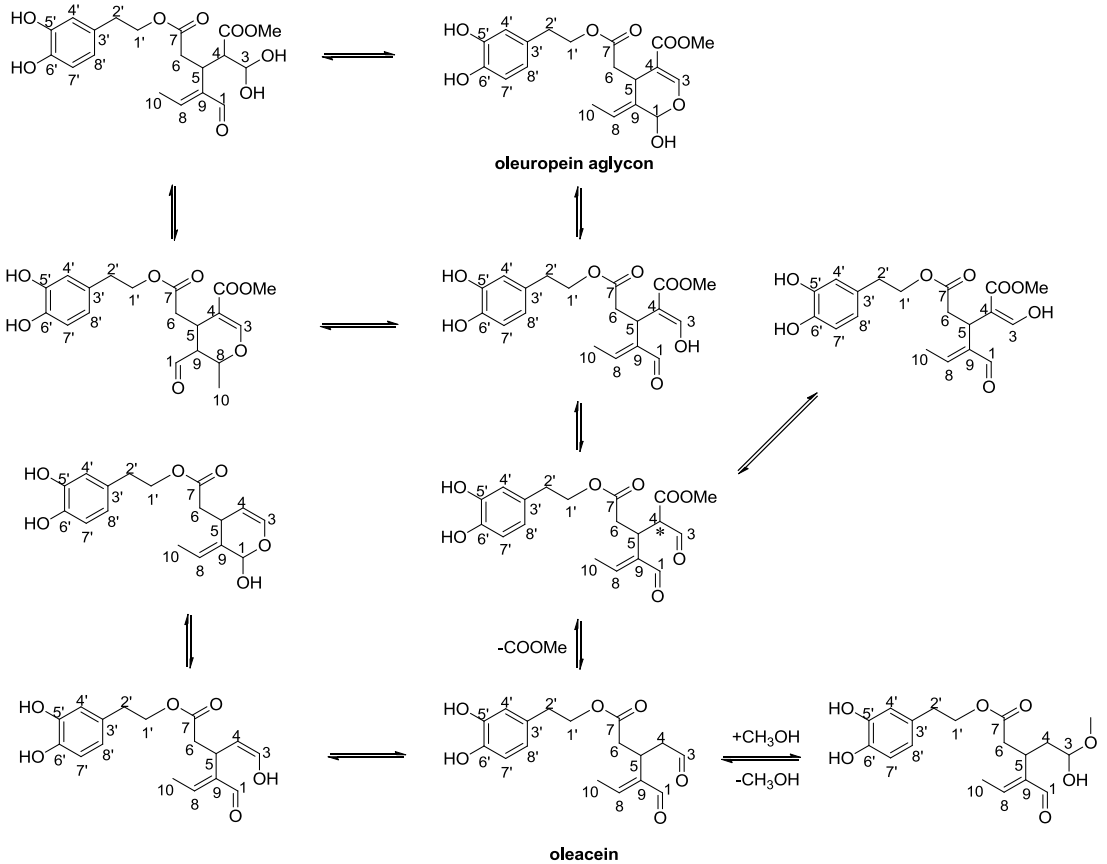


Εικόνα 6. *Δομή της ολεασίνης*

Σύμφωνα με τη μελέτη των Michel και συνεργατών [172], η ανάλυση, η ανίχνευση και η ποσοτικοποίηση φαινολικών συστατικών, όπως η ολεασίνη (57) και συγγενών, σε αυτήν, ενώσεων, σε εκχυλίσματα λαδιού και σε βιολογικά υγρά είναι ακόμη αρκετά πολύπλοκη. Πράγματι, η διαλδεϋδική φύση αυτών των ενώσεων τις καθιστά ιδιαίτερα ασταθείς, λόγω της δυνατότητας σχηματισμού ημι-ακεταλών ή κετο-ενολικών ταυτομερών, σχηματισμός που εμπεριέχει κλείσιμο δακτυλίου, με όλες αυτές τις δομές να βρίσκονται σε ισορροπία και ικανές να αλληλομετατρέπονται, συναρτήσει του διαλύτη. Έτσι προκύπτουν συγγενείς δομές της ολεασίνης (57), που δυσχεραίνουν το έργο του αναλυτή και την ανίχνευσή τους.

Χάρη στην ασταθή χημεία των σεκοϊριδοειδών ενώσεων, η ολεασίνη (57) μπορεί να προκύψει εύκολα, είτε από την ελαιοευρωπεΐνη (1) [173] είτε από το ανάλογό της, την 11-δεμεθυλ-ελαιοευρωπεΐνη (28) [174], [175]. Οι αντιδράσεις που μεσολαβούν περιλαμβάνουν υδρόλυση της 11-μεθυλεστερικής [176], αλλά και της γλυκοσιδικής ομάδας, με ακόλουθη διάνοιξη του λακτονικού δακτυλίου, κετονοποίηση και αποκαρβοξυλίωση της 11 θέσης. Οι αντιδράσεις υδρόλυσης που προαναφέρθηκαν καταλύονται από ένζυμα, όπως ειδικές εστεράσες [176] και ενδογενείς β-γλυκοσιδάσες [177], κατά τη διάρκεια της ξήρανσης και της εξαγωγής του φυτικού υλικού, καθώς επίσης και κατά τη διάρκεια ωρίμανσης του ελαιόκαρπου [175], [178]. Οι β-γλυκοσιδάσες πιθανότατα ενεργοποιούνται κατά την σύνθλιψη του καρπού και τη διαδικασία της μάλαξης, για την εξαγωγή του εξαιρετικά παρθένου ελαιολάδου [169].

Το μονοπάτι μετασχηματισμού του άγλυκου της ελαιοευρωπεΐνης (54) σε ολεασίνη (57), μέσω διαφόρων, συγγενών με την ολεασίνη (57), ενδιάμεσων δομών, δίδεται στο Σχήμα 3.



Σχήμα 3. *Πιθανό μονοπάτι μετασχηματισμού του άγλυκου της ελαιοευρωπεΐνης σε ολεασίνη (57), αλλά και συγγενείς δομές, κατά την εξαγωγή του ελαιολάδου, αλλά και ως αποτέλεσμα ενζυμικών διεργασιών που λαμβάνουν χώρα μέσα στα φύλλα της ελιάς* [173], [174].

I.6.b.2 Ιστορική αναδρομή

Για πρώτη φορά η ολεασίνη (57) απομονώθηκε από το ελαιόλαδο και ταυτοποιήθηκε το 1993, από τους Montedoro και συνεργάτες [173], με χρήση φασματοσκοπικών τεχνικών (φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού, NMR[39], καθώς και υπερύθρου και υπεριώδους φασματοσκοπίας, IR και UV, αντιστοίχως).

I.6.c Οργανοληπτικά χαρακτηριστικά και φαρμακολογικές δράσεις της ολεασίνης

Οργανοληπτικά, η ολεασίνη (57) πιστεύεται ότι συνδέεται ιδιαίτερα με την πικρή γεύση του εξαιρετικά παρθένου ελαιολάδου, ενώ σύμφωνα με σχετικές μελέτες, η ένταση της πικρής αυτής γεύσης είναι ανάλογη της περιεκτικότητας σε ολεασίνη (57) του υπό ανάλυση ελαιολάδου [163]. Ως εκ τούτου – και λαμβάνοντας υπ' όψιν το ευρύ φάσμα των ευεργετικών για την υγεία ιδιοτήτων της ολεασίνης (57), όπως θα αναλυθεί εκτενώς στο επόμενο υποκεφάλαιο – ελαιόλαδα με πιο έντονα πικρή γεύση, αναμένονται να είναι και πιο ευεργετικά για την ανθρώπινη υγεία. Άλλωστε, σύμφωνα με τους Gomes da Silva και συνεργάτες, τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά αποτελούν ένα καθοριστικό παράγοντα για την ποιότητα του ελαιολάδου [179].

Οι Hansen και συνεργάτες απομόνωσαν την ολεασίνη (57) από υδατικά εκχυλίσματα φύλλων της *Olea europaea*. Ανακάλυψαν επίσης για πρώτη φορά ότι η χημική αυτή ουσία, ανέστειλε το μετατρεπτικό ένζυμο της αγγειοτενσίνης (ACE[23]) [180], *in vitro*, σε πνεύμονες κουνελιών [175, 181]. Βασιζόμενη σ' αυτή τη δράση της, ονόμασαν την ουσία, ολεασίνη (57) (oleacein: ole(a)- (εκ της ελιάς), ACE[23]- (Angiotensin Converting Enzyme), in- (από το inhibitor- *αναστολέας*) [181].

Μεταξύ των βιολογικών δράσεων της ολεασίνης (57) και ίσως η σημαντικότερη, είναι η αντιοξειδωτική, στην οποία πιστεύεται ότι υπερτερεί όλων των υπολοίπων φαινολικών συστατικών του εξαιρετικά παρθένου ελαιολάδου [163]. Άλλες βιολογικές δράσεις της είναι η αντιφλεγμονώδης, η αντισυσσωματική, η αντιβακτηριακή και η αντικαρκινική.

I.6.c.1 Αντιοξειδωτική δράση

Όσον αφορά στην αντιοξειδωτική δράση της ολεασίνης (57), οι πρώτες μελέτες πραγματοποιήθηκαν με τεχνητές δοκιμές δέσμευσης ελευθέρων ριζών. Στις μελέτες των Paiva-Martins και συνεργατών, η ολεασίνη (57) έδειξε να δεσμεύει την ελεύθερη ρίζα DPPH[24] (1,1 διφαινυλ-2-πικρυλυδραζυλίου), σε βαθμό συγκρίσιμο με τον αντίστοιχο της α-τοκοφερόλης (50), ενώ ήταν ικανή να δεσμεύσει και την ρίζα ABTS[25] (2,2-αζινοδις-(3-αιθυλβενζοθειαζολίνη)-6-σουλφονικού), στον ίδιο βαθμό που την δεσμεύει η α-τοκοφερόλη (50) [182]. Ακόμη, στη μελέτη των Fogliano και συνεργατών, η ολεασίνη (57) επέδειξε την μεγαλύτερη αντιοξειδωτική ικανότητα [183], σε σύγκριση με άλλες φαινόλες του ελαιολάδου, συμπεριλαμβανομένης της υδροξυτυροσόλης (2) [184], [185]. Ωστόσο, άλλες μελέτες υποστηρίζουν ότι οι φαινόλες του ελαιολάδου, όπως η ολεασίνη (57), μπορούν να δράσουν όχι μόνο ως δεσμευτές ελευθέρων ριζών, αλλά και ως χηλικοποιητές μεταλλικών ιόντων [186]. Τέλος, σύμφωνα με την μελέτη των Fabiani και συνεργατών, η ολεασίνη (57) έδειξε προστατευτική δράση σε μονοπυρηνικά κύτταρα ανθρώπινου αίματος (peripheral blood

mononuclear cells, PBMC[26]), αλλά και στην κυτταρική σειρά HL-60[31], έναντι της, από το υπεροξείδιο του υδρογόνου H_2O_2, επαγόμενης, βλάβης του DNA[28] [187].

Η αντιοξειδωτική δράση της ολεασίνης (57) σχετίζεται και με την αντιγηραντική της δράση, καθώς εμποδίζει την οξείδωση της LDL[1], περιορίζει το οξειδωτικό στρες και την οξειδωτική βλάβη του DNA[28]. Εξάλλου, η ολεασίνη (57) περιορίζει τη γήρανση που επάγεται από την αγγειοτενσίνη ΙΙ και αναστέλλει τον σχηματισμό δραστικών μορφών οξυγόνου (Reactive Oxygen Species- ROS[10]).

I.6.c.2 Αντιφλεγμονώδης δράση

Η μελέτη της αντιφλεγμονώδους δράσης της ολεασίνης (57) στο ενεργό κέντρο της 5-λιποξυγενάσης – ένα ένζυμο που καταλύει τα αρχικά στάδια της βιοσύνθεσης των προφλεγμονωδών λευκοτριενίων – έδειξε ότι η πρώτη είναι ο πιο ικανός αναστολέας (90%, για IC_{50}= 2 μM), μεταξύ των φαινολικών συστατικών που ελέχθηκαν (υδροξυτυροσόλη (2), ελαιοευρωπεΐνη (1), ολεοκανθάλη (83) κ.ά.). Αυτό μπορεί να υποδεικνύει την συμμετοχή των υδροξυ- ομάδων και της ανοιχτής σεκοϊριδοειδούς δομής της ολεασίνης (57), σ' αυτή τη διεργασία αναστολής [188]. Οι Rosignoli και συνεργάτες μελέτησαν την επίδραση της ολεασίνης (57) στην έκφραση του mRNA[29] της κυκλοοξυγενάσης-2 (COX[30]-2), σε ανθρώπινα μονοκύτταρα, όπου κατέδειξε ελάττωση της έκφρασης, κατά 88 ± 4% [189].

I.6.c.3 Αντισυσσωματική δράση

Οι Fabiani και συνεργάτες, μελέτησαν την αντισυσσωματική και επαγωγική της απόπτωσης, δράση της ολεασίνης (57), σε κύτταρα καρκινικής σειράς HL-60[31]. Η ολεασίνη (57) ανέστειλε τον πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων (IC_{50}= 30-35 μM), ενώ η σημαντική επαγωγή (68%), από την ολεασίνη (57), της αργής απόπτωσης αυτών των κυττάρων, παρατηρήθηκε σε συγκέντρωση 256 mM. Στην υψηλότερη συγκέντρωση, των 512 μM, η ολεασίνη (57) ήταν κυτταροτοξική, όπως υποδεικνύει η αύξηση των νεκρωτικών κυττάρων [187].

I.6.c.4 Αντιβακτηριακή δράση

Η βακτηριοκτόνος επίδραση της ολεασίνης (57) έναντι του βακτηρίου *Listeria monocytogenes* μελετήθηκε από τους Medina και συνεργάτες. Συγκέντρωση 250 μM ολεασίνης (57) επέδειξε αντιβακτηριακή δράση, ενώ πρέπει επίσης να σημειωθεί ότι η ολεασίνη (57) στατιστικά συσχετίζεται με την επιβίωση άλλων Gram (+) και Gram (-) βακτηρίων [190].

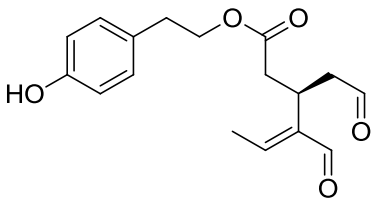
Η τοξικότητα της ολεασίνης (57) προσδιορίστηκε *in vivo* σε προνύμφες γαρίδων άλμης και αυτές έδειξαν σχετικά καλή ανεκτικότητα σε αυτή [181]. Παρόλα αυτά, δεν υπάρχουν περαιτέρω πληροφορίες για την τοξικότητα της ολεασίνης (57) στον άνθρωπο ή σε ζώα. Για το λόγο αυτό, μελέτες σχετικά με την δραστικότητα και την τοξικότητά της, θα πρέπει να εξακολουθήσουν, ώστε να διευκρινιστεί ο μηχανισμός δράσης της.

Τα δεδομένα που συλλέγονται μέχρι στιγμής όσον αφορά στη βιολογική δραστικότητα της ολεασίνης (57), υποδεικνύουν ότι αυτή η φυσική ουσία μπορεί να χρησιμοποιηθεί στην πρόληψη και θεραπεία των καρδιαγγειακών παθήσεων. Αυτό φαίνεται επίσης πολύ πιθανό, εξαιτίας του γεγονότος ότι *in vitro* πειράματα που έχουν πραγματοποιηθεί, δεν επιδεικνύουν κυτταροτοξικότητα της ολεασίνης (57), ακόμη και σε υψηλές συγκεντρώσεις. Συνοψίζοντας την αντι-αρτηριοσκληρωτική δράση της ολεασίνης (57), τα ακόλουθα γεγονότα πρέπει να ληφθούν

υπόψη: η ολεασίνη (57) αναστέλλει, όπως προαναφέρθηκε, την οξείδωση της LDL[1], περιορίζει την απελευθέρωση μυελοϋπεροξειδάσης (και άρα λειτουργεί προστατευτικά, έναντι της καρδιαγγειακής νόσου), μειώνει την έκφραση των μορίων προσκόλλησης σε ενδοθηλιακά κύτταρα, όπως επίσης μπορεί να μειώσει την παραγωγή της αγγειοτενσίνης ΙΙ. Ως εκ τούτου, όλα τα παραπάνω επαρκούν για τη διαμόρφωση της υπόθεσης ότι η ολεασίνη (57) έχει την ικανότητα να λειτουργήσει στο μέλλον προληπτικά, τόσο στα πρώιμα στάδια της αθηροσκλήρωσης που σχετίζονται με ενδοθηλιακή δυσλειτουργία, όσο και σε προχωρημένα στάδια, αναστέλλοντας το σχηματισμό πλάκας, μία υπόθεση ωστόσο που χρήζει επιβεβαίωσης με μελέτες σε ζωικά μοντέλα αθηροσκλήρωσης [191].

I.6.c.5 Αντικαρκινική δράση

Η ολεασίνη (57) έχει επιδείξει σημαντική δράση έναντι του καρκίνου του μαστού [192], ενώ, σύμφωνα με μία άλλη μελέτη, αναστέλλει και τον πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων της, ανθρώπινης προέλευσης, προμυελοκυτταρικής καρκινικής σειράς HL-60[31], με την πλήρη αναστολή να επιτυγχάνεται σε συγκέντρωση ολεασίνης (57) 130 mmol/ L [187].


HO
O
O
O
O

I.7 Ολεοκανθάλη, το φαινολικό συστατικό του ελαιολάδου με την καυστική γεύση

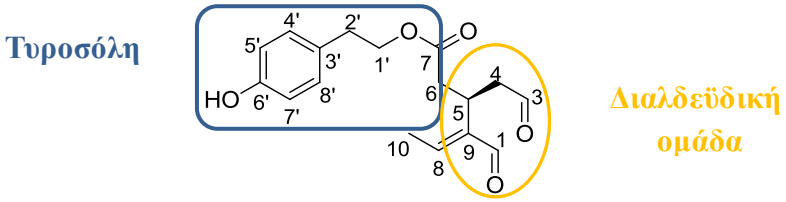
I.7.a *Εισαγωγή*

Μία φαινολική ένωση του ελαιολάδου, με ιδιαίτερο ενδιαφέρον, λόγω των ωφέλιμων για την υγεία, ιδιοτήτων της, είναι η διαλδεϋδική μορφή του αποκαρβοξυλιωμένου άγλυκου του λιγκστροσίδη, γνωστή ως ολεοκανθάλη (83). Κάποιες μελέτες [170] υποστηρίζουν ότι, τα μονο-υδροξυλιωμένα παράγωγα, όπως η ολεοκανθάλη (83), παράγονται από την ελαιοευρωπεΐνη (1) και όχι από το λιγκστροσίδη (56), ο οποίος, πολλές φορές, απουσιάζει από τον καρπό. Άλλες μελέτες διαφωνούν μ' αυτή τη θέση [193]. Η ολεοκανθάλη (83) αποτελεί το 10% του συνολικού φαινολικού περιεχομένου του εξαιρετικά παρθένου ελαιολάδου και του προσδίδει χαρακτηριστική καυστική γεύση. Αντίθετα με την ολεασίνη (57), η ολεοκανθάλη (83), σύμφωνα με κάποιες μελέτες, πολλές φορές δεν ανιχνεύεται στην πάστα της ελιάς, παρά μόνο στο ελαιόλαδο [193].

I.7.b *Η ολεοκανθάλη*

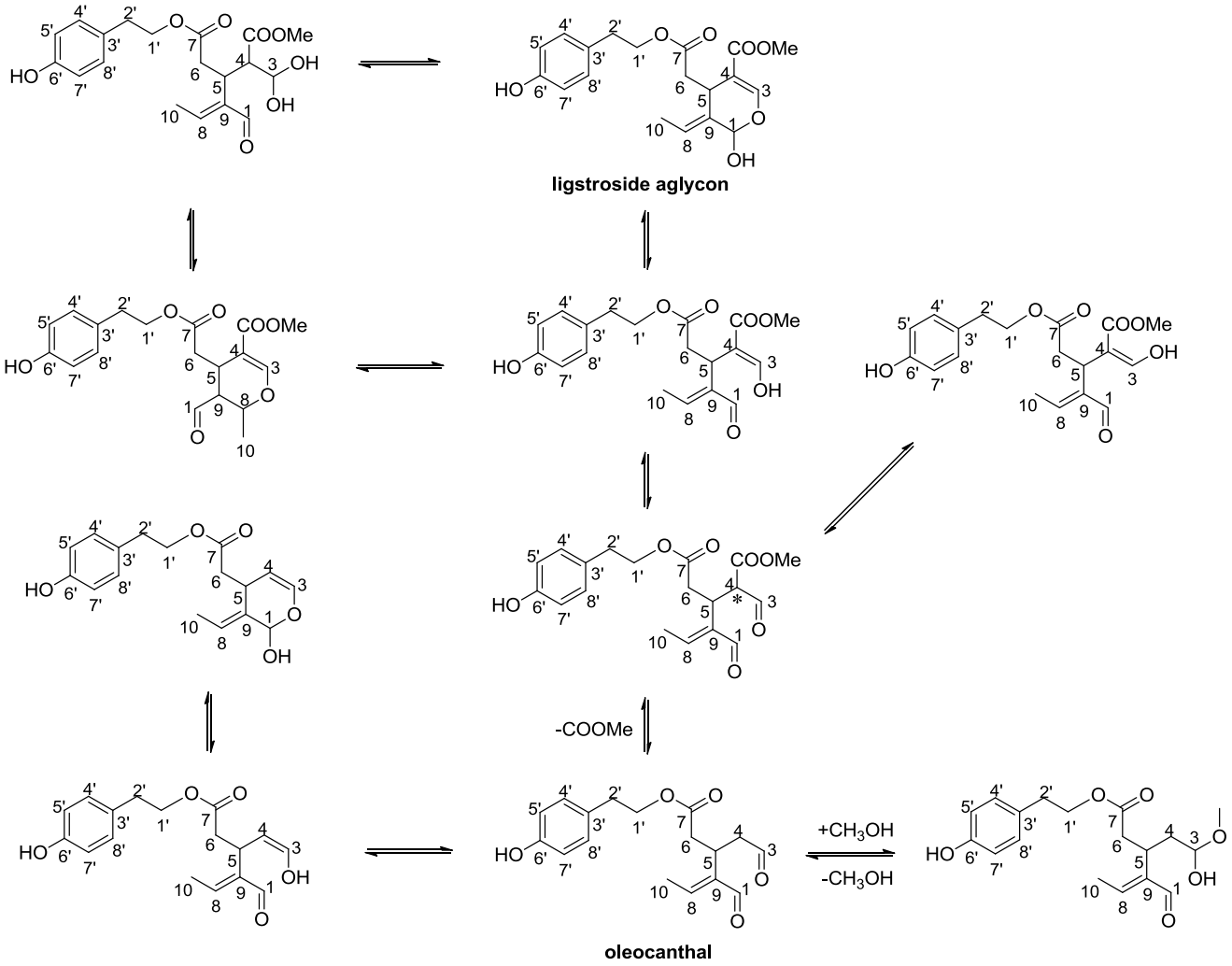
I.7.b.1 Δομή και περιγραφή

Η ολεοκανθάλη (83) είναι καρβοξυλικός εστέρας της τυροσόλης (3), με δομή που σχετίζεται με το λιγκστροσίδη (56), έχοντας αποσπαστεί από αυτόν οι καρβοξυμέθυλο και γλυκοζυλο ομάδες, ακολουθούμενες από διάσπαση του δακτυλίου και σχηματισμό δύο αλδεϋδικών ομάδων.



Εικόνα 7. *Δομή της ολεοκανθάλης (83)*

Σύμφωνα με τη μελέτη των Michel και συνεργατών [172], η διαλδεϋδική φύση της ολεοκανθάλης (83), όπως προαναφέρθηκε για την περίπτωση της ολεασίνης (57), καθιστά τις ενώσεις αυτές ιδιαίτερα ασταθείς, λόγω του εν δυνάμει σχηματισμού ημι-ακεταλών ή κετο-ενολικών ταυτομερών, με ταυτόχρονο κλείσιμο δακτυλίου. Προκύπτουν έτσι, όμοια με την περίπτωση της ολεασίνης (57), συγγενείς, με την ολεοκανθάλη (83), δομές, σε ισορροπία και ικανές να αλληλομετατρέπονται, συναρτήσει του διαλύτη, δυσκολεύοντας τη διαδικασία της ανάλυσης. Το μονοπάτι μετασχηματισμού του άγλυκου του λιγκστροσίδη (90) σε ολεοκανθάλη (83), μέσα από ποικίλες ενδιάμεσες δομές, δίδεται στο Σχήμα 4.



Σχήμα 4. *Πιθανό μονοπάτι μετασχηματισμού του άγλυκου του λιγκστροσίδη σε ολεοκανθάλη (83), αλλά και συγγενείς δομές, κατά την εξαγωγή του ελαιολάδου, αλλά και ως αποτέλεσμα ενζυμικών διεργασιών που λαμβάνουν χώρα μέσα στα φύλλα της ελιάς* [173], [174].

I.7.b.2 Ιστορική αναδρομή

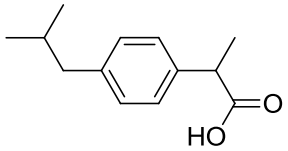
Όπως η ολεασίνη (57), έτσι και η ολεοκανθάλη (83), για πρώτη φορά, απομονώθηκε από το ελαιόλαδο και ταυτοποιήθηκε το 1993, από τους Montedoro και συνεργάτες [173], με χρήση φασματοσκοπικών τεχνικών (φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού, NMR[39], καθώς και υπερύθρου και υπεριώδους φασματοσκοπίας, IR και UV, αντιστοίχως).

I.7.c *Οργανοληπτικά χαρακτηριστικά και Φαρμακολογικές δράσεις της ολεοκανθάλης*

Τα τελευταία χρόνια, που παρατηρείται συνεχώς αυξανόμενο ενδιαφέρον για αναζήτηση φυσικών ενώσεων με φαρμακολογικές ιδιότητες, η ολεοκανθάλη (83) έχει βρεθεί στο επίκεντρο μελετών. Σχετικές έρευνες [194], [195] αναφέρουν ότι παρουσιάζει ποικίλους μηχανισμούς δράσης, στη μείωση παθήσεων που σχετίζονται με φλεγμονή, συμπεριλαμβανομένων της εκφυλιστικής των αρθρώσεων νόσου, της νευροεκφυλιστικής νόσου και ειδικών μορφών καρκίνων. Ως εκ τούτου, η μακροχρόνια κατανάλωση παρθένου ελαιολάδου, υψηλής

περιεκτικότητας σε ολεοκανθάλη (83), μπορεί να προσφέρει οφέλη για την υγεία, στα πλαίσια του προτύπου μεσογειακής διατροφής.

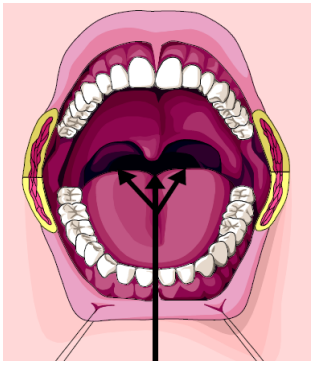
Σύμφωνα με τη μελέτη των Andrewes και συνεργατών, [196], αναφορικά με τα βασικά οργανοληπτικά χαρακτηριστικά ενός ελαιολάδου (πικρή, καυστική ή στυφή γεύση), και κατόπιν αξιολόγησης των οργανοληπτικών ιδιοτήτων των απομονωμένων πολυφαινολών, η ολεοκανθάλη (83) είναι υπεύθυνη για την έντονα καυστική γεύση, του εξαιρετικά παρθένου ελαιολάδου. Αυτή η αίσθηση καύσου που αφήνει στη γλώσσα η, περιεχόμενη στο εξαιρετικά παρθένο ελαιόλαδο, ολεοκανθάλη (83), είναι, σύμφωνα με τους Beauchamp και συνεργάτες [197], παρόμοια με αυτή του μη-στεροειδούς αντιφλεγμονώδους φαρμάκου (NSAID[32]), ιβουπροφαίνη (91) (*Εικόνα 8*). Αυτή η διαπίστωση φαίνεται να αποτελεί ένδειξη κοινής φαρμακολογικής δράσης των δύο ενώσεων, με την ολεοκανθάλη (83) να λειτουργεί ως φυσικό αντιφλεγμονώδες συστατικό, με δραστικότητα και προφίλ εντυπωσιακά παρόμοια με εκείνα της ιβουπροφαίνης (91). Αν και δομικά ανόμοια, και τα δύο αυτά μόρια αναστέλλουν τα ίδια ένζυμα κυκλοοξυγενάσης (COX[30]-1 και COX[30]-2), στο μονοπάτι βιοσύνθεσης της προσταγλανδίνης [198]. Συγκεκριμένα, η ολεοκανθάλη (83) αναστέλλει τα ένζυμα COX[30]-1 και COX[30]-2 κατά 41-57%, ενώ η ιβουπροφαίνη κατά 13-18%. Στατιστικά, 50 g ελαιολάδου παρέχουν την ποσότητα εκείνη της ολεοκανθάλης (83), που ισοδυναμεί με το 10% της κανονικής δόσης ιβουπροφαίνης για ενήλικες [197].



Εικόνα 8. *Δομή της ιβουπροφαίνης (ibuprofen) (91)*

Ο παράγοντας, λοιπόν, που είναι υπεύθυνος για τον ερεθισμό του λαιμού, κατά την κατανάλωση εξαιρετικά παρθένου ελαιολάδου, θεωρείται ότι είναι η ολεοκανθάλη (83), κάτι που μαρτυράει και η ετυμολογία της ονομασίας της: ολεο- (εκ της ελιάς), κανθ- (*αγγλ. sting*, το «τσίμπημα»), άλη- (από τις αλδεϋδικές ομάδες που περιέχονται στη δομή της) [197]. Μάλιστα, η ένταση αυτού του ερεθισμού είναι δοσοεξαρτώμενη και αυξάνεται με την αύξηση της περιεκτικότητας της ολεοκανθάλης (83), στο παρθένο ελαιόλαδο.

Ένα σημείο ιδιαίτερου ενδιαφέροντος είναι ότι ο ερεθισμός που προκαλείται από την ολεοκανθάλη (83) εστιάζεται στη στοματοφαρυγγική περιοχή (στο λαιμο) (*Εικόνα 5*), ενώ γενικά οι ερεθιστικές ή πικάντικες ενώσεις γίνονται αντιληπτές σε όλη την έκταση της στοματικής κοιλότητας και όχι εντοπισμένα σε μία διακριτή περιοχή αυτής. Αυτό υποδεικνύει ότι, αφενός υπάρχει ένας αισθητήριος υποδοχέας, ειδικά για την ολεοκανθάλη (83), στην στοματοφαρυγγική περιοχή [199], αφετέρου ο υποδοχέας αυτός, ανατομικά, περιορίζεται στην περιοχή του φάρυγγα (*Εικόνα 9*). Οι Peyrot des Gachons et al. [200] υπέδειξαν ότι η ολεοκανθάλη (83) είναι ενεργοποιητής του διαύλου ιόντων TRPA1[33], που ενεργοποιείται από την ιβουπροφαίνη (91). Σε αυτό οφείλεται το αίσθημα καύσου κατά την κατανάλωση του εξαιρετικά παρθένου ελαιολάδου.



Εικόνα 9. *Στοματοφαρυγγική περιοχή (μαύρη σκίαση)*

I.7.c.1 Αντιφλεγμονώδης δράση

Η ιδιότητα, της ολεοκανθάλης (83) να δρα ως φυσικό αντιφλεγμονώδες και φυσικός αναστολέας της COX, πιστεύεται ότι ευθύνεται για τη θεραπευτική επίδραση του παρθένου ελαιολάδου στην υγεία, καθώς η φλεγμονή παίζει σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη πολλών χρόνιων ασθενειών, όπως η καρδιαγγειακή νόσος, καθώς και ορισμένα είδη καρκίνου [192].

Η πρόσφατη διαπίστωση της ισχυρής αντιφλεγμονώδους δράσης της ολεοκανθάλης (83) και της ολεασίνης (57) και του οφέλους των φαινολικών αυτών συστατικών στην υγεία, ώθησε την επιστημονική ομάδα των Κάρκουλα και συνεργατών [201], στη θεώρηση ότι οι διάφορες ποικιλίες του ελαιολάδου μπορούν να χαρακτηριστούν και να καταταχθούν ως περισσότερο ή λιγότερο ευεργετικές, βάσει της περιεκτικότητάς τους σε ολεοκανθάλη (83) και ολεασίνη (57).

I.7.c.1.1 Ρευματοειδής αρθρίτιδα και Νευροπροστατευτική δράση

Επιπλέον, πρόσφατη μελέτη ανέδειξε την ολεοκανθάλη (83) ως πολλά υποσχόμενο θεραπευτικό παράγοντα έναντι εκφυλιστικών ασθενειών των αρθρώσεων (π.χ. οστεοαρθρίτιδα και ρευματοειδής αρθρίτιδα) [202]. Εξ' άλλου, κατά τους Pitt et al. [203] και Li et al. [204] η ολεοκανθάλη (83) μπορεί να είναι ένας δυνητικά χρήσιμος παράγοντας για την ανάπτυξη νέων θεραπειών, για νευροεκφυλιστικές παθήσεις, όπως η νόσος του Alzheimer.

I.7.c.2 Αντιμικροβιακή δράση

Πρόσφατες έρευνες [205] έχουν δείξει ότι η ολεοκανθάλη (83) είναι σταθερή στο γαστρικό υγρό και εμφανίζει αντιμικροβιακή δράση έναντι του ελικοβακτηριδίου του πυλωρού, που συνδέεται με την πλειοψηφία των πεπτικών ελκών και ορισμένους τύπους καρκίνου του στομάχου.

I.7.c.3 Άλλες δράσεις

Μία άλλη ιδιότητα της ολεοκανθάλης (83) είναι ότι μπορεί να ρυθμίσει τη γήρανση του δέρματος. Ως εκ τούτου, μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τη θεραπεία του κατεστραμμένου δέρματος (αναπλαστική δράση) [206], ενώ μπορεί και να περιορίσει μια ποικιλία από διαταραχές που οφείλονται σε μεταβολικό σύνδρομο [206, 207].

ΓΕΝΙΚΕΣ ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΕΣ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΕΣ

Τις τελευταίες δεκαετίες, η τεχνολογία και η τεχνογνωσία έχουν διαδραματίσει καταλυτικό ρόλο όσον αφορά στην έρευνα και την ανάπτυξη, στον τομέα των φυσικών προϊόντων και φαρμάκων, ενώ νέες μέθοδοι και τεχνικές έχουν συμβάλει, σε πολλές περιπτώσεις, στην απομόνωση ή σύνθεση νέων φαρμακολογικά δραστικών συστατικών, αλλά και στην ανακάλυψη νέων φαρμακολογικών δράσεων, ήδη γνωστών ενώσεων.

Κατά την διάρκεια λοιπόν της εκπόνησης του πειραματικού μέρους της παρούσας διατριβής, χρησιμοποιήθηκαν σε περισσότερα του ενός στάδια τα ακόλουθα υλικά, όργανα-εξοπλισμός και τεχνικές.

Συμπυκνώσεις: Η συμπύκνωση των διαλυμάτων έγινε, όπου χρειάστηκε, υπό μειωμένη πίεση, με χρήση του Rotavapor R-114 Büchi (*Εικόνα 19α*).

Χρωματογραφία Λεπτής Στιβάδας (TLC[34]): Χρησιμοποιήθηκε για τον έλεγχο της πορείας των αντιδράσεων και των χρωματογραφιών στήλης, τον έλεγχο του περιεχομένου των εκάστοτε κλασμάτων καθώς και για την συγκριτική ταυτοποίηση των προϊόντων.

Χρησιμοποιήθηκαν κυρίως πλάκες αλουμινίου κανονικής φάσης (Silica gel 60 F_{254}) και σπανιότερα, όπου χρειάστηκε, πλάκες αλουμινίου αντιστρόφου φάσης (Silica gel 60 RP-18 F_{254}s).

Η παρατήρηση των χρωματογραφημάτων έγινε σε λάμπα υπεριώδους–ορατού (UV-Vis), σε μήκη κύματος 254 nm και 366 nm (*Εικόνα 19ε*). Σε ορισμένα εξ αυτών έγινε λήψη φωτογραφίας, στα αντίστοιχα μήκη κύματος ή στο ορατό, με χρήση του CAMAG TLC[34] Visualizer. Τέλος, κάποια χρωματογραφήματα ψεκάστηκαν στην πορεία, με χρήση, ως αντιδραστηρίου εμφάνισης, μεθανολικού διαλύματος θειικής βανιλίνης 5%, παρασκευασμένου με τα ακόλουθα αντιδραστήρια:

Διάλυμα Α: βανιλλίνη 5% σε MeOH

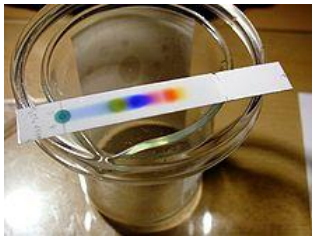
Διάλυμα Β: π. H_2SO_4 5% σε MeOH

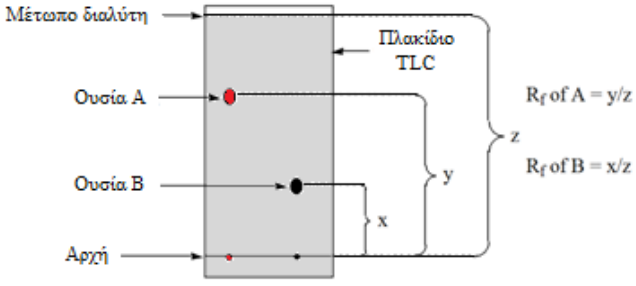
Ίσοι όγκοι των δύο διαλυμάτων αναμιγνύονται αμέσως πριν το ψεκασμό και το χρωματογράφημα θερμαίνεται για 5 min στους 105°C.

Για την ταυτοποίηση των προϊόντων των αντιδράσεων, απαιτήθηκε, ορισμένες φορές, μέτρηση του R_f[50] (παράγων συγκράτησης ή συντελεστής επιβράδυνσης) τους (*Εικόνα 10*) στα χρωματογραφήματα και σύγκριση της τιμής αυτής με την αναφερόμενη στη βιβλιογραφία.

Ο R_f[50] μιας ουσίας προσδιορίζεται από τον τύπο:

$$R_f = \frac{\text{Απόσταση που διένυσε η ουσία}}{\text{Απόσταση που διένυσε το μέτωπο του διαλύτη}}$$





Εικόνα 10. *Χρωματογραφία λεπτής στιβάδας (TLC[34])*

Παρασκευαστική Χρωματογραφία Λεπτής Στιβάδας (Preparative TLC[34]): Χρησιμοποιήθηκε για τον διαχωρισμό των επιθυμητών προϊόντων, από τα παραπροϊόντα των αντιδράσεων, ή για την απομόνωση επιθυμητών δευτερογενών μεταβολιτών από εκχυλίσματα πολύπλοκου προφίλ (για συνολική ποσότητα δείγματος, έως 50 mg) ή, γενικά, στις περιπτώσεις όπου η Χρωματογραφία Στήλης δεν κρίθηκε ως αποτελεσματική μέθοδος.

Έγινε σε πλάκες γυάλινες ή αλουμινίου, επιστρωμένες με silica κανονικής φάσης (Silica gel 60 F_{254}) και η παρατήρηση των χρωματογραφημάτων πραγματοποιήθηκε, όπως και προηγούμενα, σε λάμπα υπεριώδους–ορατού (UV-Vis), σε μήκη κύματος 254 nm και 366 nm (*Εικόνα 19ε*).

Χρωματογραφία Μοριακού Αποκλεισμού (SEC[35]): Η χρωματογραφία μοριακού αποκλεισμού (SEC[35], Size Exclusion Chromatography) ανακαλύφθηκε από τους Grant Henry Lathe και Colin R. Ruthven το 1955 [208], [209] που δούλευαν στο Queen Charlotte's Hospital στο Λονδίνο. Ο όρος, ωστόσο, χρωματογραφία διάχυσης σε gel (Gel Permeation Chromatography), αναφέρθηκε για πρώτη φορά από το J.C. Moore το 1964. ο οποίος εργαζόμενος για την εταιρία Dow Chemical Company, ανέπτυξε τη χρωματογραφία διάχυσης σε πηκτή (gel) [210].

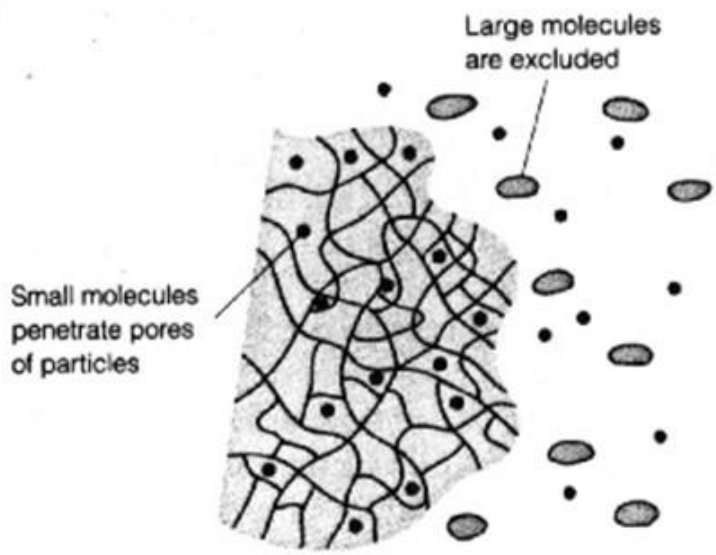
Ο διαχωρισμός πραγματοποιείται με βάση το σχήμα και το μέγεθος των μορίων των αναλυόμενων ενώσεων και βρίσκει εφαρμογές στην ανάλυση και το χαρακτηρισμό των πολυμερών. Τα μόρια μεγαλύτερου μοριακού βάρους (π.χ. πρωτεΐνες, λιπίδια κ.ά.) εκλούονται πρώτα από τη στήλη, ενώ τα μικρότερου μοριακού βάρους μόρια, που συνήθως είναι αυτά που μας ενδιαφέρουν περισσότερο, κατακρατούνται από τη στατική φάση και εκλούονται μόνο από συγκεκριμένους διαλύτες.

Η SEC[35] χρησιμοποιήθηκε για την απομάκρυνση των μεγάλου μοριακού βάρους συστατικών από πολύπλοκα μίγματα. Λόγω της διαφοράς μοριακού βάρους μεταξύ των συστατικών αυτών και των δευτερογενών μεταβολιτών του ενδιαφέροντός μας, η συγκεκριμένη χρωματογραφική τεχνική αποτελεί μέθοδο εκλογής για τον διαχωρισμό τους.

Τα υποστρώματα διήθησης σε πηκτή (στατική φάση) παρασκευάζονται συχνά από σταυροσυνδεμένη δεξτράνη (Sephadex), πολυακρυλαμίδιο ή σφαιρίδια αγαρόζης (Sepharose). Η στατική φάση που χρησιμοποιήθηκε στο εργαστήριό μας ήταν Sephadex LH-20, ενεργοποιημένη σε MeOH, ενώ ο διαλύτης έκλουσης (κινητή φάση) ήταν συνήθως EtOH 100%. Το προς ανάλυση δείγμα προστίθετο ως διάλυμα σε EtOH, επίσης. Τα κλάσματα που εκλούονταν από τη στήλη ελέγχονταν με χρωματογραφία TLC[34] κανονικής φάσης.

Τα υποστρώματα δεξτράνης (Sephadex) και πολυακρυλαμιδίου διαχωρίζουν ικανοποιητικά πρωτεΐνες μικρού ή μετρίου μοριακού βάρους, ενώ τα υποστρώματα αγαρόζης διαθέτουν μεγαλύτερους πόρους και είναι ικανά να διαχωρίσουν πολύ μεγαλύτερου μεγέθους μόρια πρωτεΐνης. Σε ιδανικές συνθήκες δεν παρατηρείται αλληλεπίδραση των συστατικών του μίγματος και της στατικής φάσης.

Η υγρή ή αέρια κινητή φάση διέρχεται μέσα από πορώδη πηκτή, με μέγεθος πόρων τέτοιο που να επιτρέπει την είσοδο στο δίκτυο της πηκτής, μόνο μικρών μορίων, αποκλείοντας τα μεγάλα. Έτσι, τα μόρια μεγάλου μεγέθους εξέρχονται ταχέως από τη στήλη, χωρίς να εισέρχονται στο δίκτυο της πηκτής, ενώ τα μόρια μικρού μεγέθους, αργούν να εξέλθουν της στήλης, καθώς εισέρχονται στους πόρους των σωματιδίων της στατικής φάσης και χρειάζονται μεγαλύτερο όγκο κινητής φάσης για να τα παρασύρει (*Εικόνα 11*).



Εικόνα 11. *Μηχανισμός χρωματογραφίας μοριακού αποκλεισμού.*



Χρωματογραφία Στήλης Χαμηλής Πίεσης: Χρησιμοποιήθηκε για τον διαχωρισμό μιγμάτων αντιδράσεων και εκχυλισμάτων, στα συστατικά τους. Αυτό έγινε με τη βοήθεια διαλυτών έκλουσης αυξανόμενης πολικότητας και τα προϊόντα συλλέχθηκαν σε κλάσματα, ανάλογα με την πολικότητα τους.

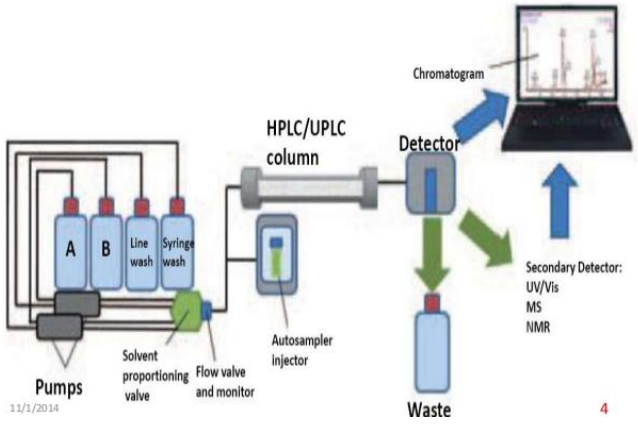
Η στατική φάση ήταν SiO_2 (Silica gel 40-63μm/ Silica flash) και κάθε φορά προστίθετο στη διαχωριστική στήλη, ως εναιώρημα στον πρώτο διαλύτη έκλουσης.

Ακόμη, εφαρμόστηκε η τεχνική της ξηρής εναπόθεσης («ξηρό ντεπώ»), για την προετοιμασία του στερεού μίγματος των ουσιών που θα διαχωρίζονταν. Στην τεχνική αυτή, προστίθεται αρχικά στο στερεό, ποσότητα SiO_2 (Silica gel 70-200μm) περίπου διπλάσια από το βάρος του στερεού και κατόπιν, το μίγμα διαλύεται σε ένα επιλεγμένο σύστημα διαλυτών (MeOH, μίγμα MeOH/ CH_2Cl_2, ή ακετόνη), το οποίο και εξατμίζεται, στη συνέχεια, υπό μειωμένη πίεση. Ως αποτέλεσμα, το στερεό παραλαμβάνεται σε μορφή σκόνης, με καλές ρεολογικές ιδιότητες.

Τέλος, για να αποφασιστεί ποια από τα κλάσματα της στήλης θα έπρεπε να συνενωθούν κάθε φορά, πραγματοποιούνταν χρωματογραφήματα TLC[34] κανονικής φάσης.

Αναλυτική Χρωματογραφία Υψηλής Πίεσης (Analytical HPLC[36]): Χρησιμοποιήθηκε για την ανάλυση διαφόρων εκχυλισμάτων ελιάς (φύλλων, καρπού) ή δειγμάτων ελαιολάδου. Επίσης, χρησιμοποιήθηκε για την ανάλυση αποτελεσμάτων ενζυμικών αντιδράσεων και δοκιμών pH, με πρώτη ύλη την ολεασίνη (57), όπως θα περιγραφεί σε επόμενο κεφάλαιο.

Ο διαθέσιμος εξοπλισμός ήταν ένα σύστημα THERMO Finnigan που αποτελείται από: αντλία SpectraSystem P4000, απαερωτή SpectraSystem 1000, αυτόματο δειγματολήπτη SpectraSystem AS3000 και ανιχνευτή UV SpectraSystem UV2000. Επίσης χρησιμοποιήθηκε ανιχνευτής πολλαπλής διόδου (PDA) SpectraSystem UV6000LP. Η στήλη ήταν Lichrosorb RP-18 με διαστάσεις 5 μm, 250 x 4 mm (*Εικόνα 12*).



Εικόνα 12. *Λειτουργία της HPLC[36] χρωματογραφίας*

Παρασκευαστική Χρωματογραφία Υψηλής Πίεσης (Preparative HPLC[36]): Χρησιμοποιήθηκε για την απομόνωση δευτερογενών μεταβολιτών υψηλής καθαρότητας, από εκχυλίσματα ελιάς ή συστατικών από κλάσματα πολυφαινολικού εκχυλίσματος ελαιολάδου. Αυτό έγινε με τη βοήθεια διαλυτών έκλουσης μειούμενης πολικότητας.

Πρόκειται και πάλι για ένα σύστημα THERMO Finnigan που αποτελείται από: αντλία SpectraSystem P2000 και ανιχνευτή UV SpectraSystem UV2000, ο οποίος κατέγραφε σε δυο επιλεγμένα μήκη κύματος, στο υπεριώδες ή στο ορατό. Σαν βοηθητικό αέριο χρησιμοποιήθηκε Ήλιο (He).

Η στατική φάση ήταν μια στήλη Nucleosil 100-7, RP-18, προγεμισμένη με silica αντιστρόφου φάσεως, διαστάσεων 7 μm, 250x21 mm. Το δείγμα προστίθετο κάθε φορά ως διάλυμα γνωστής συγκέντρωσης, σε MeOH/ H_2O: 50/ 50 και η εισαγωγή του γινόταν με ένεση όγκου 10 mL, μέσω του συστήματος εισαγωγής (injection loop).

Τέλος, για να αξιολογηθούν τα κλάσματα της ανάλυσης πραγματοποιούνταν έλεγχος αυτών με χρωματογραφήματα TLC[34] αντίστροφης φάσης.

Φυγόκεντρος Χρωματογραφία Κατανομής (Fast Centrifugal Partition Chromatography, FCPC[37]): Ο διαθέσιμος εξοπλισμός είναι της Kromaton και χρησιμοποιήθηκε για την κλασμάτωση εκχυλίσματος φύλλων της *Olea europaea*, πολυφαινολικού εκχυλίσματος ελαιολάδου, αλλά και υγρού ελαιουργικού αποβλήτου («Κατσίγαρου», Olive Mill Waste Water (OMWW[8])).

SPE[38] (Solid-Phase Extraction, Εκχύλιση Στερεάς Φάσης): Η αρχή λειτουργίας της μεθόδου αυτής είναι η διαφορετική κατανομή κάθε συστατικού ενός δείγματος, μεταξύ ενός υγρού (διαλύτη) και ενός στερεού προσροφητικού μέσου. Ο διαχωρισμός οφείλεται σε διαφορετική διαλυτότητα/ κατανομή του συστατικού στις δύο φάσεις (ισχύουν αρχές χρωματογραφίας προσρόφησης). Η συσκευή απαρτίζεται από στήλες που περιέχουν το προσροφητικό υλικό, από δεσμευμένο διοξείδιο του πυριτίου C_8, C_{18} (n-alkyl, phenyl- bonded silica gel), ενώ η επιλογή των προσροφητικών & διαλυτών καθορίζεται από την πολικότητα των συστατικών που θα εκχυλισθούν και το είδος του δείγματος (τις πιθανές προσμίξεις του). Χρησιμοποιούνται μικρές στήλες, τύπου σύριγγας, πλαστικές, μιας χρήσεως, που περιέχουν το προσροφητικό (25-500mg). Στην παρούσα διατριβλη χρησιμοποιήθηκαν στήλες των 500mg με C_{18}. Μπορούν να προσαρμοσθούν σε κατάλληλη συσκευή για την ταυτόχρονη ανάλυση πολλών δειγμάτων συγχρόνως. (*Εικόνα 19η*).

Όλη η διαδικασία της εκχύλισης στερεάς φάσης πραγματοποιείται σε τέσσερα βήματα:

1. Ενεργοποίηση της στήλης (επιδιαλύτωση προσροφητικού). Η στήλη διαβρέχεται με τον διαλύτη στον οποίο είναι διαλυμένο το δείγμα που θέλουμε να εκχυλίσουμε.
2. Εισαγωγή του δείγματος.
3. Έκπλυση στήλης, με προσθήκη διαλύτη, για την απομάκρυνση προσμίξεων.
4. Έκλουση και παραλαβή του ενζύμου, με προσθήκη νερού.

Συνήθως, η μέθοδος αυτή χρησιμοποιείται για την αξιοποίηση του συστατικού που προσροφάται στη στήλη και απομακρύνεται τελευταίο από αυτήν. Στην παρούσα διατριβή, η μέθοδος χρησιμοποιήθηκε αντιστρόφως. Δηλαδή, το επιθυμητό προϊόν ήταν αυτό που εκλούσθηκε πρώτο από τη στήλη, ενώ το ένζυμο που έμεινε στο τέλος, το απορρίπτουμε.

Η μέθοδος αυτή χρησιμοποιήθηκε για το διαχωρισμό ενζύμων από μίγματα ενζυμικών αντιδράσεων, μετά το πέρας της αντίδρασης.

Για την ταυτοποίηση της δομής των ενώσεων που συντέθηκαν και για τον ποιοτικό και ποσοτικό έλεγχο αυτών, χρησιμοποιήθηκαν οι εξής τεχνικές:

- Ποιοτικός Έλεγχος:

Φασματοσκοπία Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού NMR[39]: Τα φάσματα NMR[39], μιας (^{1}H NMR[39] και ^{13}C NMR[39]) και δυο – (COSY[40] (Correlation sprectroscopy), COSY-LR[40] (Long Range Correlation sprectroscopy), HMQC[41] (Heteronuclear Multiple Quantum Coherence) και HMBC[42] (Heteronuclear Multiple Bond Coherence) – διαστάσεων, λήφθηκαν για την ταυτοποίηση και τον έλεγχο της καθαρότητας, τόσο των προϊόντων που παρασκευάστηκαν συνθετικά όσο και αυτών που απομονώθηκαν, ως φυσικά.

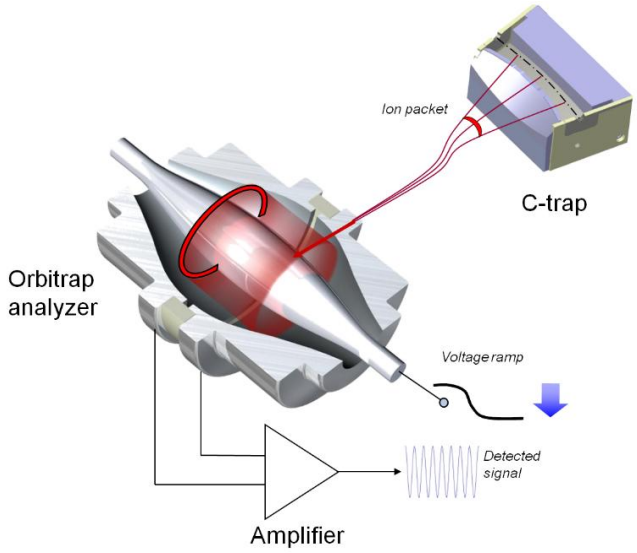
Για την λήψη τους χρησιμοποιήθηκαν οι συσκευές πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού NMR[39] Bruker Ultrashield™ Plus 600 (600MHz) (*Εικόνα 19β*) και NMR[39] Bruker DRX 400 (400MHz), ενώ τα δείγματα προς ανάλυση τοποθετούνταν σε ειδικούς σωλήνες NMR[39] (*Εικόνα 19β*).

Οι χημικές μετατοπίσεις εκφράζονται σε τιμές δ (ppm), με εσωτερικό πρότυπο TMS και οι σταθερές σύζευξης *J*, σε Hz. Η πολλαπλότητα των κορυφών εκφράζεται ως s=απλή, d=διπλή, t=τριπλή, q=τετραπλή, dd=διπλή-διπλών, ddd=διπλή-διπλών-διπλών, m=πολλαπλή, br=ευρεία.

Οι διαλύτες που χρησιμοποιήθηκαν στη λήψη των φασμάτων, ήταν: δευτεριωμένο χλωροφόρμιο, $CDCl_3$ (7.26 ppm, για το ^{1}H NMR[39] και 77.0 ppm, για το ^{13}C NMR[39]), δευτεριωμένο νερό, D_2O (4.79 ppm, για το ^{1}H NMR[39]) και δευτεριωμένη MeOD (4.87 ppm και 3.31 ppm, για το ^{1}H NMR[39] και 49.00 ppm, για το ^{13}C NMR[39]).

Φασματοφωτομετρία Μάζας (MS[43]): Τα φάσματα MS[43] λήφθηκαν για την διαπίστωση της ταυτότητας, τόσο των προϊόντων που παρασκευάστηκαν συνθετικά, όσο και αυτών που απομονώθηκαν, ως φυσικά.

Τα φάσματα μάζας υψηλής διακριτικής ικανότητας (HRMS[43]) ελήφθησαν με τη χρήση υβριδικού φασματογράφου μάζας (*Εικόνα 19γ*), που αποτελείται από γραμμική παγίδα ιόντων (LTQ), σε σειρά με κυκλοτρονιακού τύπου αναλυτή μαζών (*Εικόνα 13*) μετασχηματισμού Fourier (Orbitrap) – (LTQ-Orbitrap Discovery -ThermoFinnigan, San Jose, USA). Η πηγή ιονισμού ήταν ESI(+) και ESI(-). Για όλες τις μετρήσεις m/z, ως όριο εμπιστοσύνης (mass tolerance) ορίστηκαν τα 5 ppm.



Εικόνα 13. *Σχηματική αναπαράσταση του Αναλυτή Μαζών, Orbitrap*

Χρωματογραφία Υπερκρίσιμων Ρευστών (SFC[44]): Είναι μια μορφή χρωματογραφίας κανονικής φάσης, που χρησιμοποιήθηκε για πρώτη φορά το 1962, [211]. Χρησιμοποιείται για την ανάλυση και τον καθαρισμό μορίων χαμηλού έως μέτριου μοριακού βάρους και θερμικά ευαίσθητων. Μπορεί επίσης να χρησιμοποιηθεί για τον διαχωρισμό χειρόμορφων ενώσεων.

Οι αρχές λειτουργίας της μεθόδου είναι παρόμοιες με αυτές της HPLC[36], ωστόσο η SFC[44] τυπικά χρησιμοποιεί διοξείδιο του άνθρακα (CO_2), ως κινητή φάση, ως εκ τούτου, η χρωματογραφική ροή θα πρέπει, καθ' όλη τη διάρκεια της χρωματογραφίας, να είναι υπό πίεση. Επειδή η υπερκρίσιμη φάση αντιπροσωπεύει μια κατάσταση στην οποία οι ιδιότητες υγρού και αερίου συγκλίνουν, η χρωματογραφία υπερκρίσιμων ρευστών ονομάζεται μερικές φορές και "χρωματογραφία σύγκλισης".

Ο πρώτος χειρόμορφος διαχωρισμός με SFC[44] χρωματογραφία δημοσιεύτηκε το 1985, από τους Mourier και συνεργάτες, με χρήση ενός οικιακού συστήματος SFC[44]. Όταν, τη δεκαετία του 1980, χειρόμορφες στήλες υψηλής απόδοσης έγιναν εμπορικά διαθέσιμες, ο χειρόμορφος διαχωρισμός με SFC[44] χρωματογραφία εξετάστηκε και αποδείχθηκε η καταλληλότητά του, τόσο στα πλαίσια αναλυτικών όσο και παρασκευαστικών εφαρμογών.

Χειρόμορφοι διαχωρισμοί μπορούν να εφαρμοστούν για το διαχωρισμό πολλών φαρμακευτικών ενώσεων. Επιπλέον, το SFC[44] χρησιμοποιείται κυρίως για μη πολικές ενώσεις, λόγω της αδυναμίας του διοξειδίου του άνθρακα, της συνηθέστερα χρησιμοποιούμενης κινητής φάσης υπερκρίσιμου ρευστού, να διαλύει πολικά διαλύματα, αποτελεσματικά [211], [212].

Προσδιορισμός Στροφικής Ικανότητας, $[\alpha]_D^t$:

Για τον υπολογισμό της στροφικής ικανότητας, $[\alpha]_D^t$ ή $[\alpha]_\lambda^t$, χρησιμοποιήθηκε πολωσίμετρο (*Εικόνα 19δ*), αποτελούμενο από τα εξής:

α. λυχνία νατρίου που παράγει μονοχρωματικό φως σε μήκος κύματος 521 nm

β. πολωτή του φωτός (πρίσμα Nicol)

γ. κυκλικό διάφραγμα από ειδική ύαλο

δ. ειδικό υποδοχέα (κυψελίδα) του υγρού ή του διαλύματος της προς μελέτη ουσίας (*Εικόνα 19δ*)

ε. αναλυτή του πολωμένου φωτός (πρίσμα Nicol)

στ. σύστημα μέτρησης της γωνίας στροφής

Το μέγεθος της οπτικής στροφής που προκαλείται από μια ουσία εξαρτάται από το μήκος κύματος του χρησιμοποιούμενου φωτός (λ), τη διαδρομή που διανύει το φως (μήκος κυψέλης, μ, σε dm), τη θερμοκρασία (t), τη φύση του διαλύτη και τη συγκέντρωση της διαλυμένης ουσίας (c).

Η $[\alpha]_D^t$ υπολογίζεται από την εξίσωση:

$$[\alpha]_D^t = \beta \frac{100}{\mu d}$$

όπου β: η γωνία στροφής του επιπέδου πόλωσης του φωτός (deg) (αναγνωσθείσα γωνία στροφής)

d: η συγκέντρωση της οπτικά ενεργής ουσίας (%w/v, δηλαδή g/ 100 mL)

μ: το μήκος διαδρομής του φωτός (dm)

$[\alpha]_D^t$: η *ειδική στροφική ικανότητα* για συγκεκριμένη θερμοκρασία, t και μήκος κύματος φωτός, λ. Η γωνία στροφής για d= 1g/ 100 mL και μ= 1dm.

Το όργανο παρέχει την τιμή της γωνίας στροφής, β, για μήκος κυψελίδας μ= 1dm και συγκέντρωση διαλυμένης ουσίας, εκφρασμένη, ως πυκνότητα d, σε g/ 100 mL.

ᔓ Ποσοτικός έλεγχος

Φυγόκεντρος χρωματογραφία κατανομής (FCPC[37] ή CPC[37]): Η φυγόκεντρος χρωματογραφία κατανομής (CPC[37]) [213] (*Εικόνα 14*) είναι μία από τις τεχνικές που συνθέτουν την Χρωματογραφία κατ' Αντιρροή (CCC[45]). Η αρχή λειτουργίας της μεθόδου, στηρίζεται στην περιστροφική κίνηση της χρωματογραφικής στήλης, γύρω από ένα μόνο άξονα περιστροφής.

Η CPC[37] είναι μια τεχνική χρωματογραφίας υγρού-υγρού, επομένως, ο χρωματογράφος φυγόκεντρου κατανομής, λειτουργεί με βάση τις αρχές της χρωματογραφίας κατανομής υγρού-υγρού: δύο αναμίξιμες υγρές φάσεις αναμιγνύονται μεταξύ τους, για να σχηματίσουν ένα διφασικό σύστημα και στη συνέχεια διαχωρίζονται πολλές φορές. Τα μεμονωμένα συστατικά απομονώνονται με βάση τους διαφορετικούς συντελεστές κατανομής τους, σε αυτό το διφασικό σύστημα.

Μία από τις υγρές φάσεις του διφασικού συστήματος χρησιμοποιείται ως σταθερή και τροφοδοτείται στη στήλη (ρότορας), ενώ η τελευταία περιστρέφεται με μέτρια περιστροφική ταχύτητα. Η στατική φάση συγκρατείται εντός του ρότορα, λόγω φυγόκεντρου δύναμης.

Η δεύτερη φάση του διφασικού συστήματος, χρησιμοποιείται ως κινητή φάση που φέρει τις διαλυμένες ουσίες που πρόκειται να εξαχθούν. Τροφοδοτείται υπό πίεση στον ρότορα και αντλείται μέσω της στατικής φάσης.

Όταν οι δύο φάσεις αναμειγνύονται, πραγματοποιείται η ανταλλαγή μορίων μεταξύ τους. Ο διαχωρισμός των συστατικών επιτυγχάνεται, ως συνάρτηση του ειδικού συντελεστή κατανομής (K_d) κάθε διαλυτής ουσίας, μεταξύ της κινητής και της στατικής φάσης και στη συνέχεια, η κινητή φάση αποχύνεται.

Τα εκλουσθέντα κλάσματα της κινητής και της στατικής φάσης συλλέγονται σε διάστημα αρκετών λεπτών έως ωρών. Αυτά τα κλάσματα, ή εκλούσματα, περιέχουν τις μεμονωμένες καθαρισμένες, διαλυμένες ουσίες.

Η φυγόκεντρος χρωματογραφία κατανομής προσφέρει πολλά πλεονεκτήματα:

α. **Προσιτό κόστος.** Δεν υπάρχει στερεό υλικό συσκευασίας, το οποίο είναι δαπανηρό για αγορά, αντικατάσταση ή επαναχρησιμοποίηση. Επίσης, η κατανάλωση σημαντικά μικρότερης ποσότητας διαλυτών (10 έως 25% λιγότερο), συγκριτικά με άλλες μεθόδους.

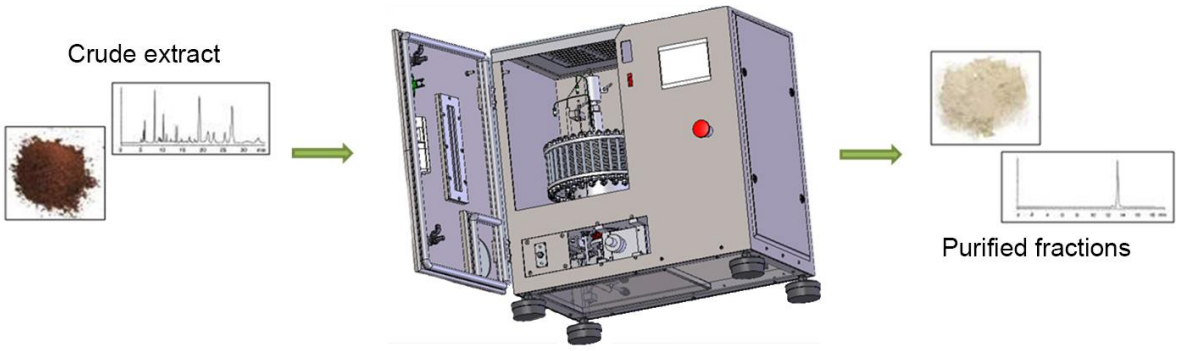
β. **Ήπια τεχνική.** Δεν υπάρχει μη αναστρέψιμη προσρόφηση ή απώλεια δείγματος, όπως στην περίπτωση τεχνικών όπου η στατική φάση αποτελείται από πορώδες υλικό (πχ. silica gel, στη χρωματογραφία στήλης, ρητίνες κλπ) και, ως εκ τούτου, επιτυγχάνεται 100% ανάκτηση του δείγματος. Καμία αλλοίωση εύθραυστων μορίων, λόγω αλληλεπίδρασης με silica, με αποτέλεσμα η μέθοδος να βρίσκει εφαρμογή και στο διαχωρισμό ευαίσθητων μορίων.

γ. **Αποτελεσματικότητα.** Η μέθοδος εξασφαλίζει υψηλά επίπεδα καθαρισμού, μέχρι 99.9%.

δ. **Γρήγορη τεχνική.** Η φυγόκεντρος χρωματογραφία κατανομής, είναι 3 έως 5 φορές ταχύτερη από άλλες αντίστοιχες τεχνικές χρωματογραφίας.

ε. **Ευκολία στη χρήση.** Η μέθοδος προσαρμόζεται σε όλα τα είδη προϊόντων, φυσικά ή συνθετικά, καθώς επίσης και σε ευρύ φάσμα πολικότητας.

στ. **Ιδανική μέθοδος για scale-up διαχωρισμό.** Η φυγόκεντρος χρωματογραφία κατανομής αποτελεί μία ενιαία τεχνική διαχωρισμού/ καθαρισμού, προσαρμόσιμη σε ποσότητες δειγμάτων από μερικά mg, έως και πολλά κιλά.



Εικόνα 14. *Φυγόκεντρος χρωματογραφία κατανομής*

Χρωματογραφία στήλης (CC[46]): Στη χρωματογραφία στήλης χαμηλής πίεσης [214] σε παρασκευαστική κλίμακα, η ουσία τοποθετείται σε μία κυλινδρική στήλη, η οποία πληρώνεται με στερεή στατική φάση, αποτελούμενη από ένα λεπτόκοκκο στερεό υλικό, με προσροφητικές ιδιότητες (συνήθως SiO_2, silica gel, στην περίπτωση της χρωματογραφίας προσρόφησης), δια μέσου του οποίου περνά η κινούμενη υγρή φάση, είτε λόγω βαρύτητας είτε με εφαρμογή μικρής πίεσης (Flash chromatography) στο σύστημα των διαλυτών. Ο διαχωρισμός στηρίζεται στην εκλεκτική προσρόφηση των συστατικών του μίγματος πάνω στην επιφάνεια του στερεού και την έκλουσή τους με μία κινητή φάση, που είναι ένας διαλύτης ή μίγμα διαλυτών.

Η εκλογή του κατάλληλου υλικού που χρησιμοποιείται για την πλήρωση της στήλης εξαρτάται από το είδος της χρωματογραφικής μεθόδου που θα εφαρμοστεί για τον εκάστοτε διαχωρισμό, π.χ. χρωματογραφίες προσρόφησης, ιονανταλλαγής ή πηκτής.

Η χρωματογραφία προσρόφησης εφαρμόζεται αρκετά στην παρασκευαστική Οργανική Χημεία, όπου γίνεται συνήθως καθαρισμός των αντιδρώντων και των προϊόντων της αντίδρασης. Στη χρωματογραφία προσρόφησης, η αλουμίνα (Al_2O_3, οξείδιο του αργιλίου) είναι το συνηθέστερα χρησιμοποιούμενο υλικό στην αλκαλική (pH= 10), ουδέτερη (pH= 7) και όξινη μορφή του (pH= 4).

Σε κάθε περίπτωση πρέπει να χρησιμοποιείται το σωστό είδος αλουμίνας, προκειμένου να αποφευχθούν ανεπιθύμητες αντιδράσεις. Η βασική αλουμίνα π.χ. είναι δυνατόν να οδηγήσει σε αφυδάτωση των εστέρων, ενώ η όξινη είναι δυνατόν να οδηγήσει σε αφυδάτωση των αλκοολών (ιδιαίτερα των τριτοταγών) ή να προκαλέσει ισομερίωση διπλών δεσμών. Σε τέτοιες περιπτώσεις συνίσταται η ουδέτερη αλουμίνα. Άλλα υλικά που χρησιμοποιούνται στη χρωματογραφία προσρόφησης είναι το διοξείδιο του πυριτίου (SiO_2, silica gel) (όταν δεν περιέχει περισσότερο από ορισμένο ποσό νερού, πέρα από το οποίο ο διαχωρισμός θα στηρίζεται πλέον στην κατανομή και λιγότερο στην προσρόφηση), το MgO, το $MgCO_3$, το $BaCO_3$, το $Ca(OH)_2$, το $CaSO_4$, η λακτόζη, το άμυλο και η κυτταρίνη.

Ο χρωματογραφικός διαχωρισμός με ιονανταλλακτικές ρητίνες, είναι μια χρήσιμη αναλυτική και παρασκευαστική τεχνική για τον διαχωρισμό μιγμάτων οξέων και βάσεων (π.χ. αμινοξέων, αμινοφαινολών κ.λ.π.) και για την απομόνωση ουδέτερων οργανικών υλικών από υδατικά διαλύματα που περιέχουν κατιονικές ή ανιοντικές ουσίες.

Η χρωματογραφία πηκτής είναι μια χρήσιμη τεχνική για την ποσοτική ανάλυση μιγμάτων φυσικών προϊόντων μεγάλου μοριακού βάρους (π.χ. πρωτεΐνες, πεπτίδια, ένζυμα, ορμόνες κ.λ.π.).

Η προσροφητική ισχύς εξαρτάται από το προσροφητικό υλικό, αλλά και από την προσροφημένη ουσία.

Οι πολικές ουσίες προσροφώνται/ κολλούν στην αφετηρία (κορυφή) της στήλης και χρειάζονται πιο πολικό διαλύτη για να τη διασχίσουν, ενώ οι άπολες, συνήθως την διασχίζουν ευκολότερα, ακόμη και με διαλύτες χαμηλής πολικότητας. Επομένως, η φύση της κινούμενης φάσης είναι μεγάλης σπουδαιότητας για κάθε χρωματογραφικό πείραμα. Ο διαλύτης μπορεί επίσης να προσροφηθεί πάνω στο στερεό υλικό, με συνέπεια, να παρατηρείται ένας ανταγωνισμός μεταξύ διαλυτών και συστατικών του προς ανάλυση μίγματος, ως προς την προσροφητικότητά τους στην επιφάνεια του προσροφητικού υλικού. Αν ο διαλύτης που χρησιμοποιείται στην έκλουση είναι περισσότερο πολικός και προσροφάται ισχυρότερα από τα συστατικά του μίγματος, τα συστατικά θα παραμένουν, σχεδόν πλήρως, στην κινούμενη φάση και δεν θα γίνει ο διαχωρισμός.

Για να γίνει ένας αποτελεσματικός διαχωρισμός, ο διαλύτης έκλουσης πρέπει να είναι λιγότερο πολικός από τα συστατικά του μίγματος. Επιπλέον, τα συστατικά του προς ανάλυση δείγματος πρέπει να είναι αρκετά διαλυτά στο διαλύτη έκλουσης, γιατί σε αντίθετη περίπτωση θα παραμείνουν μόνιμα προσροφημένα στη στατική φάση της στήλης.

Όσο πολικότεροι διαλύτες χρησιμοποιούνται, τόσο γρηγορότερα εκλούονται τα συστατικά ενός μίγματος. Οι μη πολικές ουσίες δεν διαχωρίζονται με έναν πολικό διαλύτη, όπως επίσης πολικές ουσίες δεν διαχωρίζονται με έναν μη πολικό διαλύτη. Για να ξεπερασθεί αυτό το πρόβλημα και να διαχωριστούν τόσο οι πολικές όσο και οι μη πολικές ουσίες σε ένα μίγμα, μπορούμε να αυξάνουμε σταδιακά την αναλογία του πιο πολικού διαλύτη σε ένα μίγμα δύο διαλυτών.

Τέλος, ανάλογα με τη πολικότητα των φάσεων, η χρωματογραφία χαρακτηρίζεται ως κανονικής φάσης, όταν η πολικότητα της στατικής φάσης είναι μεγαλύτερη από την πολικότητας της κινητής φάσης, και ως ανάστροφης φάσης (RP[47]), όταν η πολικότητα της στατικής φάσης είναι μικρότερη από τη πολικότητα της κινητής φάσης.

Στη χρωματογραφία ανάστροφης φάσης, το υλικό πλήρωσης της στήλης είναι συνήθως silica ανάστροφης φάσης (RP[47]). Όσον αφορά στους χρησιμοποιούμενους διαλύτες στην περίπτωση αυτή, το σύστημα που επιλέγεται αρχικά είναι αρκετά πολικό, ώστε να παραληφθεί σε μικρότερο χρόνο, το επιθυμητό προϊόν και έπειτα, η πολικότητα του διαλύτη μειώνεται, ώστε να εκλουστούν από τη στήλη οι πιο άπολες προσμίξεις.

Χρωματογραφία ανοικτής στήλης υπό κενό (Shot): Σε περιπτώσεις όπου απαιτούνται μεγάλες ποσότητες ελαιοευρωπεΐνης (1), καθαρότητας >80%, αντί χρωματογραφίας στήλης, πραγματοποιείται χρωματογραφία ανοικτής στήλης υπό κενό (Shot), που ονομάζεται έτσι διότι το silica gel τοποθετείται στο χωνί ξηρό, χωρίς τη χρήση διαλύτη και καθόλη τη διάρκεια απαιτείται κενό.

Στη χρωματογραφία ανοικτής στήλης υπό κενό (Shot), το στερεό προσροφητικό υλικό (silica) αποχύνεται σε μία γυάλινη στήλη – διηθητικό χωνί, με πάτο από πορώδες γυαλί (μεγάλο χωνί Büchner) (*Εικόνα 15*), όσο γίνεται πιο ομοιόμορφα.

Το προς διαχωρισμό μίγμα μετατρέπεται σε «ξηρό ντεπώ» και προστίθεται στην κορυφή της στήλης. Ο διαλύτης έκλουσης αφήνεται τότε να διατρέξει ελεγχόμενα τη στήλη, με εφαρμογή κενού. Η έκλουση του διαλύτη και ο διαχωρισμός γίνεται με την χρησιμοποίηση του κενού της βρύσης, σαν μια συσκευή διήθησης κενού, ενώ τα κλάσματα συλλέγονται σε κωνικές φιάλες κενού. Μετά από κάθε έκλουση, σε αντίθεση με την συμβατική στήλη χρωματογραφίας, ο διαλύτης απομακρύνεται πλήρως, ενώ πραγματοποιούνται διαδοχικές εκλούσεις.

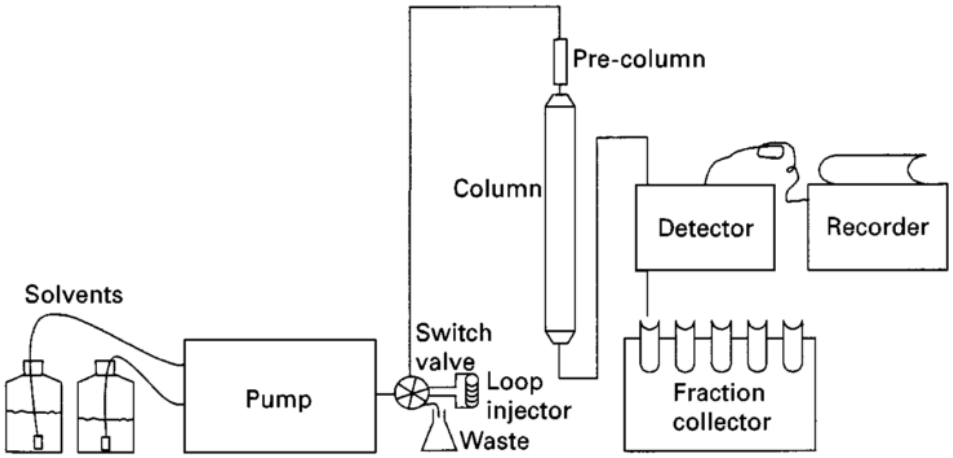
Συγκεντρώνονται τα κλάσματα και ελέγχονται με TLC[34]. Ακολουθεί συνένωση των επιθυμητών, με συγγενή προφίλ, κλασμάτων και συμπύκνωσή τους, υπό κενό. Είναι μια παραλλαγή της χρωματογραφίας στήλης, με τη διαφορά ότι στην προκειμένη περίπτωση, «πακετάρεται» η στήλη με ξηρό προσροφητικό υλικό και όχι με αιώρημα αυτού.



Εικόνα 15. *Διάταξη χρωματογραφίας ανοικτής στήλης υπό κεντό (Shot)*

Η χρωματογραφία ανοικτής στήλης υπό κενό είναι αρκετά πιο γρήγορη από τη συμβατική χρωματογραφία στήλης, καθώς η εφαρμογή κενού στο κάτω μέρος του χωνιού, επιταχύνει σημαντικά την διέλευση του συστήματος διαλυτών, διαμέσου της στήλης.

Υγρή χρωματογραφία μέσης πίεσης (MPLC[48]): Η υγρή χρωματογραφία μέσης πίεσης (Medium Pressure Liquid Chromatography, MPLC[48]) (*Εικόνα 16*) [215] είναι μία από τις διάφορες τεχνικές παρασκευαστικής χρωματογραφίας στήλης. Ο διαχωρισμός υπό πίεση, καθιστά δυνατή τη χρήση υποστρωμάτων με μικρότερου μεγέθους σωματίδια και αυξάνει την ποικιλία των χρησιμοποιήσιμων στατικών φάσεων. Η τεχνική MPLC[48] εισήχθη τη δεκαετία του 1970, ως αποτελεσματική τεχνική για τον παρασκευαστικό διαχωρισμό των οργανικών ενώσεων.



Εικόνα 16. *Οργανολογία ενός κοινού MPLC[48] χρωματογράφου.*

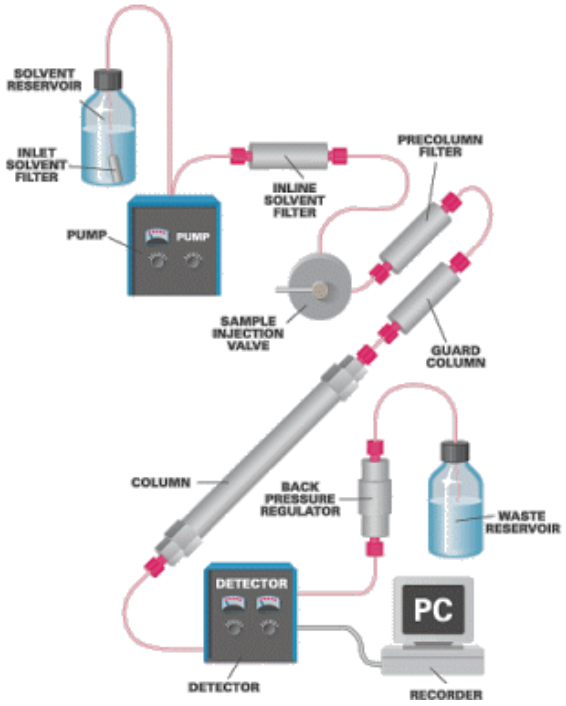
Η MPLC[48] επιτρέπει τον καθαρισμό μεγάλων ποσοτήτων ενώσεων και, αντίθετα με τη χρωματογραφία στήλης (CC[46]) και τη χρωματογραφία ανοικτής στήλης υπό κενό, επιτυγχάνονται ταχύτεροι και βελτιωμένοι διαχωρισμοί. Το «πακετάρισμα» υπό πίεση, στατικής φάσης με μικρότερο μέγεθος σωματιδίων, αυξάνει την ποιότητα του διαχωρισμού και επιπλέον, η στατική φάση μπορεί να επαναχρησιμοποιηθεί, κάτι που καθιστά την τεχνική οικονομικότερη αλλά και πιο οικολογική.

Επιπλέον, η ποσοτική αυτή μέθοδος ανάλυσης χρησιμοποιείται για τον διαχωρισμό ενός εκχυλίσματος σε κορεσμένους υδρογονάνθρακες, αρωματικούς υδρογονάνθρακες και πολικά συστατικά. Χρησιμοποιείται μία προ-στήλη που περιέχει θερμικά απενεργοποιημένη silica, μία

κύρια στήλη με ενεργοποιημένη silica, ως στατική φάση και σύστημα διαλυτών με απεσταγμένο n-Hexane, ως κινητή φάση. Το δείγμα, αφού πρώτα αφαλατωθεί, στη συνέχεια διέρχεται μέσω της προ-στήλης αδρανοποιημένου SiO_2 και της κύριας στήλης. Τα αρωματικά συστατικά διατηρούνται στην αρχή της κύριας στήλης, ενώ τα κορεσμένα εκλούονται από τη στήλη και συλλέγονται. Με την αναστροφή της ροής του διαλύτη στην κύρια στήλη, τα αρωματικά εκλούονται από αυτή και συλλέγονται.

Υγρή χρωματογραφία υψηλής πίεσης ή απόδοσης υψηλής (HPLC[36]): Η χρωματογραφία HPLC[36] (High Pressure Liquid Chromatography ή High Performance Liquid Chromatography – Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Πίεσης ή Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Απόδοσης) ανήκει επίσης στις χρωματογραφικές τεχνικές, επομένως ο διαχωρισμός είναι αποτέλεσμα της συνδυαστικής δράσης μιας στατικής και μιας κινητής φάσης. Αποτελεί σημαντικά εξελιγμένη μορφή της χρωματογραφίας στήλης, όπου η κινητή φάση πλέον δεν ρέει υπό την επίδραση της βαρύτητας, αλλά με τη βοήθεια αντλίας. Αυτό επιταχύνει την ανάλυση και επιτρέπει τη χρήση χρωματογραφικών στηλών με μικρό μέγεθος σωματιδίων υλικού πλήρωσης, αυξάνοντας έτσι το εμβαδόν της επιφάνειας της στατικής φάσης, που είναι διαθέσιμο να αλληλεπιδράσει με τα μόρια του δείγματος που μεταφέρονται μέσω της κινητής φάσης. Κατά συνέπεια, βελτιώνεται ο διαχωρισμός των αναλυόμενων μορίων και μειώνεται σημαντικά το μέγεθος της στήλης που απαιτείται για έναν διαχωρισμό.

Το δείγμα εισάγεται στη κορυφή της στήλης (*Εικόνα 17*) και με τη βοήθεια της κινητής φάσης, τα συστατικά του μετακινούνται με τη μορφή ζωνών, μέχρι να εκλουστούν τελικά το ένα μετά το άλλο. Οι αναλυόμενες ουσίες κατανέμονται μεταξύ της στατικής και της κινητής φάσης, με αποτέλεσμα να μετακινούνται με διαφορετικές ταχύτητες κατά μήκος της στήλης.



Εικόνα 17. *Οργανολογία HPLC[36] χρωματογραφίας*

Ανάλογα με την ικανότητα των αντλιών του οργάνου, κατατάσσονται σε όργανα αναλυτικής και παρασκευαστικής HPLC[36] (preparative HPLC[36]), αντίστοιχα. Η αναλυτική HPLC[36] χρησιμοποιείται για τον ποιοτικό έλεγχο ενός δείγματος και εφαρμόζεται συνήθως, με

χρήση προτύπων των περιεχόμενων στο δείγμα, συστατικών. Η παρασκευαστική HPLC[36] χρησιμοποιείται για την κλασματοποίηση ενός δείγματος στα συστατικά του και τα κλάσματα συλλέγονται, μέσω αυτόματου κολλέκτορα, σε ογκομετρικούς σωλήνες.

Η ποσότητα του δείγματος που μπορεί να διοχετευθεί σε μια αναλυτική HPLC[36] είναι της τάξης του 1 mg και η ροή του διαλύτη έκλουσης, της τάξης του 1 mL/ min. Οι αναλυτικές στήλες έχουν διαστάσεις 4-5 mm x 250 mm. Αντίθετα, στη παρασκευαστική HPLC[36], ανάλογα και με το μέγεθος της στήλης, μπορεί να ενεθεί δείγμα της τάξης του γραμμαρίου. Η διαδικασία που ακολουθείται συνήθως είναι η διερεύνηση των καλύτερων συνθηκών διαχωρισμού (στήλη, διαλύτη έκλουσης, ταχύτητα ροής) στην αναλυτική HPLC[36] και στη συνέχεια, λαμβάνοντας υπ' όψην τις αναλογίες της στήλης (όγκος παρασκευαστικής/ όγκος αναλυτικής στήλης), προσδιορίζεται η ταχύτητα ροής στη παρασκευαστική μέθοδο. Για παράδειγμα, αν στην αναλυτική HPLC[36] η ταχύτητα ροής είναι 1 ml/ min και η αναλογία των όγκων των στηλών είναι 25, τότε η ταχύτητα ροής στην παρασκευαστική στήλη, θα είναι 25 mL/ min.

Υγρή Χρωματογραφία συζευγμένη με Φασματογράφο Μάζας (LC-MS[49]): Χρησιμοποιήθηκε για την ποσοτικοποίηση των προϊόντων που προέκυψαν από τις ενζυμικές αντιδράσεις και τις δοκιμές αλλαγής του pH, με πρώτη ύλη την ολεασίνη (57), όπως θα αναλυθεί σε επόμενο κεφάλαιο.

Ο διαθέσιμος εξοπλισμός ήταν ένα Agilent 6460 QQQ, όπου ο ιονισμός πραγματοποιούταν με ηλεκτροψεκασμό (ESI). Η στήλη ήταν Poroshell 120 RP με διαστάσεις: 150×2,1 mm^2.

Ζύγιση αντιδραστηρίων και προϊόντων: Η ζύγιση των στερεών αντιδραστηρίων που χρησιμοποιήθηκαν, καθώς και των προϊόντων που συντέθηκαν – για τον υπολογισμό της απόδοσης της εκάστοτε αντίδρασης, όπως θα αναφερθεί στη συνέχεια –, έγινε σε ζυγό ακριβείας, τεσσάρων δεκαδικών ψηφίων, της εταιρείας Santorius (*Εικόνα 19ζ*).

Συμπληρωματικά, για τη ταχύτερη και ευκολότερη διεξαγωγή των πειραματικών διαδικασιών, σε συγκεκριμένες συνθήκες, χρησιμοποιήθηκαν, σε πολλές περιπτώσεις, οι κάτωθι συσκευές:

Μικροκύματα: Η μέθοδος των μικροκυμάτων χρησιμοποιήθηκε σε αντιδράσεις που, σε κανονικές συνθήκες, απαιτούν μεγάλη διάρκεια για να περατωθούν, είτε σε περιπτώσεις όπου απαιτήθηκαν ισχυρές συνθήκες αντίδρασης, από άποψη κινητικής της αντίδρασης, αλλά δεν ήταν επιθυμητή η υπέρμετρη αύξηση της θερμοκρασίας, για λόγους ευαισθησίας των αντιδρώντων συστατικών. Η συσκευή μικροκυμάτων που χρησιμοποιήθηκε είναι της εταιρείας Milestone (*Εικόνα 19ι*).

Επωαστήρας κλίβανος ελεγχόμενης θερμοκρασίας (incubator): Κατά τη διεξαγωγή ενζυμικών, κυρίως, βιομετατροπών, αλλά και αντιδράσεων που απαιτούσαν σταθερή θερμοκρασία και ταυτόχρονη ανάδευση, χρησιμοποιήθηκε ο επωαστήρας κλίβανος ελεγχόμενης θερμοκρασίας (incubator) ZHWY-200B της εταιρείας ZHICHENG (*Εικόνα 19θ*).

Syncore Büchi (Switzerland): Σε ορισμένα στάδια της σύνθεσης, ήταν απαραίτητη η ταυτόχρονη διεξαγωγή πολλαπλών αντιδράσεων, ή η εξασφάλιση ειδικών συνθηκών. Στις περιπτώσεις αυτές χρησιμοποιήθηκε η συσκευή Syncore Büchi, για τη διεξαγωγή παράλληλων

αντιδράσεων, με σκοπό την διερεύνηση των συνθηκών των αντιδράσεων και την ταυτόχρονη εφαρμογή μιας αντίδρασης σε πολλά παράγωγα. Πρόκειται για ένα Syncore ® Polyvap/ Analyst/ Reactor της Büchi (*Εικόνα 19στ*).

Επιπλέον, σε αρκετά από τα στάδια της σύνθεσης ήταν απαραίτητη η χρήση άνυδρου THF ή άλλων διαλυτών.

Για την παρασκευή του άνυδρου THF, ακολουθήθηκε η εξής διαδικασία:

Παρασκευή άνυδρου τετραϋδροφουρανίου (THF): Το άνυδρο THF χρησιμοποιήθηκε, ως διαλύτης, όταν απαιτούταν άνυδρο περιβάλλον αντίδρασης. Παρασκευάζεται ως ακολούθως:

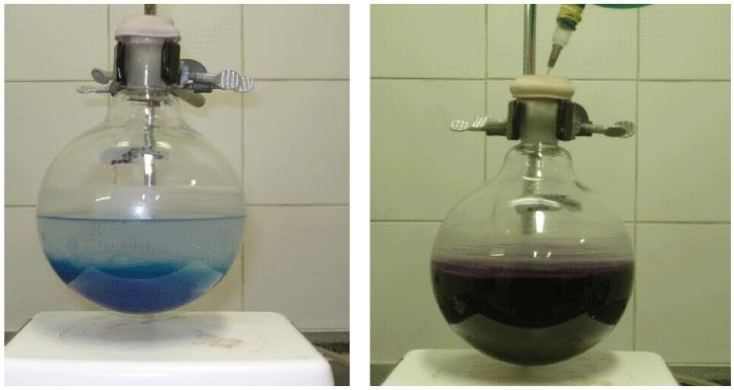
Σε μεγάλη σφαιρική φιάλη (όγκου ~1000 ml) προστίθεται ικανή ποσότητα THF. Η σφαιρική τοποθετείται σε θερμαντικό μανδύα. Προστίθενται στη συνέχεια μικρά τεμάχια μεταλλικού Na, το οποίο φυλάσσεται σε καλά κλεισμένο φιαλίδιο, μέσα σε παραφινέλαιο, καθώς και μικρή ποσότητα βενζοφαινόνης, η οποία είναι ο δείκτης. Έπειτα, αφήνεται το μείγμα να θερμανθεί μέχρι βρασμού, έως ότου το διάλυμα γίνει, μετά τον βρασμό, μπλε χρώματος. Αυτό δείχνει το πέρας της αντίδρασης, δηλαδή ότι το THF έχει απαλλαγεί από κάθε ίχνος H_2O (*Εικόνα 18*), με μετατροπή του σε αέριο υδρογόνο (H_2), σύμφωνα με την αντίδραση:

$$2Na + 2H_2O \rightleftharpoons 2Na^+ + H_2 + 2OH^-$$

Στο τελικό σημείο, λοιπόν, όπου όλη η περιεχόμενη ποσότητα H_2O έχει μετατραπεί σε H_2, η πρώτη περίσσεια Na ανάγει την βενζοφαινόνη προς το αντίστοιχο ενολικό ανιόν, το οποίο εμφανίζεται στο διάλυμα ως μετα νατρίου άλας και του δίνει μπλέ χρώμα, σύμφωνα με την αντίδραση:

$$Na + Ph_2CO \longrightarrow NaPh_2CO^{+\bullet -}$$ Ενδεικτική αντίδραση

Πριν χρησιμοποιηθεί το THF, θερμαίνεται ξανά μέχρι να γίνει το διάλυμα μπλε. Τότε πρέπει να χρησιμοποιηθεί αμέσως, προκειμένου να μην προσροφήσει υγρασία από την ατμόσφαιρα.



Εικόνα 18. *Αλλαγή χρώματος του THF από άχρωμο σε σκούρο μπλε-μωβ, κατόπιν προσθήκης Na και βενζοφαινόνης (δείκτης): με την έναρξη της ανάδευσης (αριστερά) και κατόπιν συνεχόμενης ανάδευσης, σε συνθήκες αργού (δεξιά)*

Τέλος, σε κάθε αντίδραση σύνθεσης είναι απαραίτητο να υπολογιστεί η απόδοσή της, η οποία καταδεικνύει εάν η αντίδραση είχε τα αναμενόμενα, όχι μόνο ποιοτικά, αλλά και ποσοτικά, αποτελέσματα.

Υπολογισμός απόδοσης αντίδρασης: Αρχικά, υπολογίζεται η θεωρητική απόδοση, σε g, από τη στοιχειομετρία της αντίδρασης και κατόπιν, η πρακτική απόδοση, σε g, από την μέτρηση της ποσότητας συστατικού που έχει παραχθεί.

Τότε υπολογίζεται η % απόδοση της αντίδρασης από τον ακόλουθο τύπο:

$$\%\,\text{Απόδοση} = \frac{\text{Πρακτική Απόδοση}}{\text{Θεωρητική Απόδοση}} \times 100$$

Η Πρακτική Απόδοση είναι η ποσότητα, σε g, του επιθυμητού προϊόντος που παραλαμβάνεται στο τέλος κάθε αντίδρασης, ενώ η Θεωρητική Απόδοση υπολογίζεται από τον τύπο:

$$\text{Θεωρητική Απόδοση} = \frac{m_{αρχική\ (g)} \times MB_{τελικό}\left(\frac{g}{mol}\right)}{MB_{αρχικό}\left(\frac{g}{mol}\right)}$$

Η μετατροπή των mol σε g ή αντίστροφα, όπου χρειάζεται, για τους παραπάνω υπολογισμούς, γίνεται μέσω της εξίσωσης:

$$n = \frac{m}{Mr}$$



Εικόνα 19. Οργανολογία που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα διατριβή
α) Rotavapor R-114, της Büchi, β) φασματογράφος NMR[39], της Bruker UltrashieldTM Plus 600 (600MHz) και σωληνάκια NMR[39], γ) φασματογράφος μάζας, Orbitrap, της ThermoFinnigan, δ) πολωσίμετρο και ειδικός υποδοχέας (κυψελίδα), ε) λάμπα υπεριώδους–ορατού (UV-Vis), CAMAG TLC Visualizer, στ) Syncore ® Polyvap/ Analyst/ Reactor, της Büchi, ζ) ζυγός ακριβείας, της Santorius, η) συσκευή SPE[38] (Εκχύλισης Στερεάς Φάσης), θ) επωαστήρας-κλίβανος, ελεγχόμενης θερμοκρασίας (incubator) ZHWY-200B, της ZHICHENG, ι) συσκευή μικροκυμάτων, της Milestone

Στο επόμενο κεφάλαιο θα περιγραφεί η απομόνωση και φυτοχημική ανάλυση φυσικών προϊόντων. Η διαδικασία της φυτοχημικής ανάλυσης περιλαμβάνει τρία βασικά στάδια:
α. την εκχύλιση του φυτικού υλικού,
β. την απομόνωση και τον καθαρισμό των δευτερογενών μεταβολιτών και
γ. την ταυτοποίηση της δομής τους.

Οι αναλυτικές τεχνικές με την έννοια της χρήσης αναλυτικών συστημάτων και μεθοδολογιών εμπλέκονται αποτελεσματικά και στα τρία αυτά στάδια. Συγκεκριμένα, χρησιμοποιούνται για:

α) ποιοτικό έλεγχο εκχυλισμάτων

Πλήθος αναλυτικών τεχνικών (π.χ. χρωματογραφίες HPLC[36], LC-MS[49], φασματοσκοπία NMR[39]) βρίσκουν ευρεία εφαρμογή στον χαρακτηρισμό φυτικών εκχυλισμάτων, βάσει των περιεχόμενων δευτερογενών μεταβολιτών τους, με στόχο το φυτοχημικό τους αποτύπωμα (profiling).

β) ταυτοποίηση δευτερογενών μεταβολιτών

Για την ταυτοποίηση των μεταβολιτών, η εμπειρία του αναλυτή στη χρήση μεθόδων και οργάνων, αλλά και στην ερμηνεία πληροφοριών που συλλέγονται από τη χρωματογραφική, κυρίως, διαδικασία, είναι καταλυτικής σημασίας. Χαρακτηριστικά παραδείγματα τέτοιων πληροφοριών είναι, το φάσμα UV-Vis και ο παράγων συγκράτησης, R_f[50], ενός συστατικού, σε ορισμένο σύστημα διαλυτών (στην χρωματογραφία λεπτής στιβάδας), ο προσδιορισμός του χρόνου συγκράτησης (Rt) σε ένα χρωματογράφημα, καθώς και το Μοριακό Βάρος (MB), ο Μοριακός Τύπος (MT) ή το προφίλ θραυσματοποίησης στη φασματοσκοπία μάζας (MS[43]), ενός δευτερογενούς μεταβολίτη.

Φασματοσκοπικές μέθοδοι προσδιορισμού, όπως οι φασματοσκοπίες NMR[39] και MS[43], κατέχουν πρωτεύοντα ρόλο στη διαδικασία της ταυτοποίησης, ενώ το χρησιμοποιούμενο επιστημονικό λογισμικό, που βρίσκεται σε σύνδεση με τα αναλυτικά όργανα, διευκολύνει την εξαγωγή συμπερασμάτων, σχετικά με τη δομή των προς ταυτοποίηση, μορίων.

Τα δεδομένα που προκύπτουν οργανώνονται ή/ και αξιολογούνται, μέσω σύγκρισης με βιβλιογραφικές αναφορές ή μέσω εξειδικευμένων βιβλιοθηκών, προσαρμοσμένων στην εκάστοτε τεχνική ή μεθοδολογία (πχ. MS[43]). Έτσι, η διαδικασία ταυτοποίησης αυτοματοποιείται και επιταχύνεται σημαντικά.

γ) ποσοτικό προσδιορισμό δευτερογενών μεταβολιτών

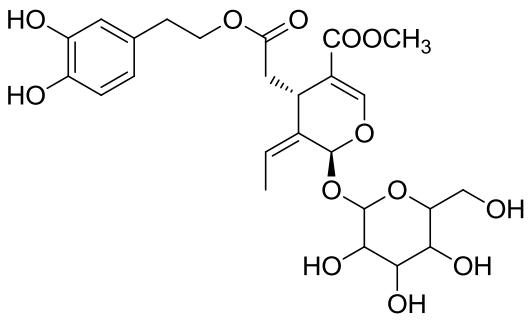
Διάφορες αναλυτικές τεχνικές και μέθοδοι (HLPC[36], LC-MS[49], κ.ά.) βρίσκουν ευρεία εφαρμογή στον ποσοτικό προσδιορισμό δευτερογενών μεταβολιτών. Η εύρεση του ποσοστού ενός συγκεκριμένου μεταβολίτη σε ένα ή περισσότερα ολικά φυτικά εκχυλίσματα ή κλάσματα και η μελέτη καθαρότητας ή σταθερότητας ενός δείγματος με την πάροδο του χρόνου, είναι μερικά παραδείγματα, όπου εφαρμόζονται οι παραπάνω αναλυτικές τεχνικές.

❖ Υποσημείωση Κεφαλαίου Ι:

Η αρίθμηση των ενώσεων, όπως αυτή παριστάνεται στο κεφάλαιο Ι, είναι μοναδική και ξεχωριστή αυτής που χρησιμοποιείται στα επόμενα κεφάλαια, σχετιζόμενη, ωστόσο, και πάλι με την σειρά εμφάνισης των ενώσεων αυτών στη ροή του κειμένου.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΔΕΥΤΕΡΟ: ΙΙ. ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΚΑΙ ΦΥΤΟΧΗΜΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ ΦΥΣΙΚΩΝ ΠΡΟΙΟΝΤΩΝ

ΠΡΟΣΩΠΙΚΑ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ


HO
HO
O
O
COOCH3
O
O
O
OH
HO
OH
OH

II.1 Μέθοδοι απομόνωσης Ελαιοευρωπεΐνης από την *Olea europaea*

Το πιο σημαντικό, για την παρούσα διδακτορική μελέτη, συστατικό, ήταν αδιαμφισβήτητα η ελαιοευρωπεΐνη (1), κύριο φαινολικό συστατικό των φύλλων και τον ακατέργαστων καρπών της *Olea europaea*, το οποίο παρουσιάστηκε αναλυτικά στο Κεφάλαιο Ι.5.

Οι Μπόκα και συνεργάτες [216], πρόσφατα έδειξαν ότι οι τεράστιες ποσότητες φύλλων ελιάς, που συλλέγονται κατά την ελαιοκομική περίοδο, μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως μία βιώσιμη πρώτη ύλη για την απομόνωση ελαιοευρωπεΐνης (1), σε μεγάλη κλίμακα. Μάλιστα, τα τελευταία χρόνια, έχει υπάρξει μεγάλο ενδιαφέρον για τις επιπτώσεις στην υγεία, των διαφόρων αφεψημάτων βοτάνων που περιέχουν ελαιοευρωπεΐνη (1), ως πιθανή πηγή υψηλής αντιοξειδωτικής ικανότητας [217], [180], [218].

Αυτό το αυξανόμενο ενδιαφέρον καθιστά αναγκαία την ανάπτυξη γρήγορων, απλών και αποτελεσματικών μεθόδων, για την απομόνωση και τον ποσοτικό προσδιορισμό της ελαιοευρωπεΐνης (1), στα φυτικά εκχυλίσματα.

Επιπλέον, ένα ακόμα ισχυρό κίνητρο για την εξασφάλιση επαρκών ποσοτήτων, υψηλής καθαρότητας, ελαιοευρωπεΐνης (1), αποτελεί η προοπτική της ημισύνθεσης ενός εύρους βιοδραστικών αναλόγων αυτής.

II.1.a *Μέθοδοι και τεχνικές απομόνωσης της ελαιοευρωπεΐνης από φύλλα της Olea europaea*

Η απομόνωση της ελαιοευρωπεΐνης (1), στην παρούσα μελέτη, πραγματοποιήθηκε από εκχυλίσματα φύλλων της *Olea europaea*, από φύλλα που, είτε είχαν συλλεχθεί και βρίσκονταν αποθηκευμένα σε συνθήκες συντήρησης, ήδη από την ελαιοκομική περίοδο, είτε συλλέχθησαν από την ομάδα μας, κατά τη διάρκεια της περιόδου αυτής και αξιοποιήθηκαν άμεσα.

Ακολουθήθηκαν, με κριτήριο την επιδιωκόμενη καθαρότητα, δύο διαφορετικές χρωματογραφικές μέθοδοι απομόνωσης της ελαιοευρωπεΐνης (1), οι οποίες έχουν ήδη παρουσιασθεί στο τέλος του Κεφαλαίου 1:

1. Η φυγόκεντρος χρωματογραφία κατανομής (CPC[37]) και
2. Η χρωματογραφία στήλης (CC[46])

II.1.a.1.1 Περιγραφή μεθόδου

II.1.a.1.1.1 Φυγόκεντρος χρωμαρογραφία κατανομής (CPC)

Στην περίπτωση της απομόνωσης της ελαιοευρωπεΐνης (1), οι διαλύτες που χρησιμοποιήθηκαν ήταν EtOAc/ EtOH/ H_2O, σε αναλογία 9: 1: 9 και ορισμένο όγκο. Η μέθοδος ξεκινάει με προετοιμασία του συστήματος διαλυτών, ως εξής:

Σε διαχωριστικό χωνί, αναμιγνύονται οι δύο φάσεις, υδατική και οργανική και κατόπιν αφήνονται να διαχωριστούν. Η αρχή του διαχωρισμού γίνεται ήδη από τα πρώτα 30 δευτερόλεπτα, ενώ ο διαχωρισμός ολοκληρώνεται μέσα σε διάστημα μίας ώρας, οπότε και συλλέγονται ξεχωριστά η κάτω (LOWER) και η πάνω (UPPER) φάση. Στην περίπτωση της

απομόνωσης της ελαιοευρωπεΐνης (1) από εκχύλισμα της *Olea europaea*, η πάνω φάση αποτελείται από EtOAc και η κάτω από H_2O (όπου υπάρχει μικρή ποσότητα EtOH).

Η κάτω φάση χρησιμοποιείται, ως στατική, διοχετεύεται με σωληνάκι στην αντλία του χρωματογράφου και εκκινείται η μέθοδος, με ρύθμιση της ροής. Πριν την εισαγωγή του δείγματος, επιλέγεται είτε η αύξουσα ή η φθίνουσα λειτουργία, με προτίμηση στην αύξουσα, ενώ πάντα ελέγχεται η πίεση στο σύστημα, ώστε να μην υπερβεί τα 400 PSI (27.6 bar).

Όταν παρατηρηθεί συλλογή διαλύτη στα απόβλητα του συστήματος, τότε αυξάνεται η ροή και η πλήρωση της στήλης υπολογίζεται σε περίπου 30 λεπτά. Είναι σημαντικό σε αυτό το σημείο να εξασφαλιστεί ότι η πλήρωση της στήλης γίνεται με στατική φάση.

Στη συνέχεια, εκκινείται η περιστροφική λειτουργία του οργάνου, προσαρμόζεται η ροή σε χαμηλότερες τιμές και γίνεται η προετοιμασία του προς έγχυση δείγματος, ως εξής:

Σε σφαιρική φιάλη, ζυγίζεται ορισμένη ποσότητα του εκχυλίσματος της *Olea europaea* και διαλύεται σε ίσους όγκους στατικής και κινητής φάσης.

Πριν την έγχυση του δείγματος, εκκινείται η άντληση κινητής φάσης, σε αύξουσα λειτουργία, και συλλέγεται τόσος όγκος κινητής φάσης, ώστε να παρατηρηθούν δύο φάσεις στην κωνική φιάλη των αποβλήτων. Μ' αυτόν τον τρόπο, επιβεβαιώνεται ο όγκος της στατικής φάσης που έχει εξέλθει της στήλης (Vm, «νεκρός όγκος»). Με την αύξηση της πίεσης, η κινητή φάση πιέζει την στατική, ενώ όταν η πίεση σταθεροποιηθεί, ο όγκος της στατικής φάσης σταματάει να αυξάνεται και το σύστημα θεωρείται σταθερό.

Ο Vm σημειώνεται, καθώς λαμβάνεται υπόψη κατά τον υπολογισμό του ποσοστού συγκράτησης της στατικής φάσης, sf %, που υπολογίζεται από τον τύπο:

$$\%sf = \frac{Vc - (Vm - Vextra - column)}{Vc} x100\%$$

όπου, Vc = ο όγκος της στήλης

Vm = ο «νεκρός όγκος»

Οι ογκομετρικοί σωλήνες τοποθετούνται στην έξοδο της στήλης, γίνεται προσεκτικά η έγχυση ορισμένου όγκου του δείγματος και ρυθμίζεται η ροή του αυτόματου κολλέκτορα. Σε κάθε ογκομετρικό σωλήνα, συλλέγεται ορισμένος όγκος διαλύτη. Αφού συλλεχθούν τα επιθυμητά κλάσματα εκχυλίσματος της *Olea europaea*, παρασκευάζεται σύστημα 50:50 MeOH/ H_2O και το όργανο ρυθμίζεται στην φθίνουσα λειτουργία.

Το κάθε κλάσμα που συλλέγεται, διαχωρίζεται σταδιακά στις δύο φάσεις, οργανική και υδατική και πραγματοποιείται TLC[34] για κάθε φάση ξεχωριστά.

Η CPC[37] χρωματογραφία επιστρατεύτηκε, ως ιδιαίτερα αποτελεσματική μέθοδος, σε κάθε περίπτωση όπου απαιτήθηκε απομόνωση μεγάλης ποσότητας καθαρής ελεαιοευρωπεΐνης (1).

II.1.a.1.1.2 Χρωματογραφία στήλης (CC)

Στην περίπτωση της ελαιοευρωπεΐνης (1), η χρωματογραφία στήλης πραγματοποιείται συνήθως σε κλάσματα, που έχουν ήδη απομονωθεί, μέσω CPC[37] από εκχύλισμα της *Olea europaea* και είναι ήδη κάποιας στοιχειώδους καθαρότητας, της τάξης του 60%.

Πραγματοποιείται, κατά περίπτωση, χρωματογραφία στήλης κανονικής φάσης ή ανάστροφης φάσης. Η κατάλληλη χρωματογραφία στήλης, επιλέγεται στην κάθε περίπτωση,

κατόπιν δοκιμαστικών TLC[34] του δείγματος, σε ένα εύρος συστημάτων διαλυτών. Στις περιπτώσεις όπου το δείγμα περιέχει, σε R_f[50] μικρότερα της ελαιοευρωπεΐνης (1), αρκετά πολικότερα αυτής συστατικά (π.χ. σάκχαρα), επιλέγεται η κανονικής φάσης χρωματογραφία. Αντίθετα, όταν οι ανεπιθύμητες προσμίξεις στο προς καθαρισμό δείγμα έχουν R_f[50] μεγαλύτερο της ελαιοευρωπεΐνης (1), επιλέγεται η αντίστροφης φάσης χρωματογραφία, η οποία καθιστά την διαδικασία του καθαρισμού της ελαιοευρωπεΐνης (1), σημαντικά πιο σύντομη και απλή.

Επιπλέον, ανάλογα με την ποσότητα του δείγματος, χρησιμοποιούνται στήλες, κοντές ή ψηλές, με μικρή ή μεγάλη διάμετρο, ενώ για την καλύτερη κατανομή της ελαιοευρωπεΐνης (1) στη στήλη, εφαρμόζεται η τεχνική της ξηρής εναπόθεσης («ξηρό ντεπώ»), με Silica 70-200 μm και διαλύτη MeOH (τέλος Κεφαλαίου Ι).

✓ Για την χρωματογραφία κανονικής φάσης, χρησιμοποιείται για την πλήρωση της στήλης Silica 40-63 μm/ Silica flash, ενώ το σύστημα διαλυτών που επιλέγεται είναι CH_2Cl_2/ MeOH 95:5 → 80:20. Μετά το τέλος του διαχωρισμού, πραγματοποιείται TLC[34] των κλασμάτων που συλλέγονται, σε σύστημα διαλυτών CH_2Cl_2/ MeOH 90:10. Τα κλάσματα συμπυκνώνονται υπό κενό και ζυγίζονται.

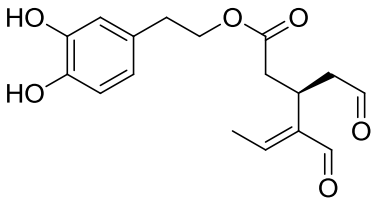
✓ Για την χρωματογραφία ανάστροφης φάσης, χρησιμοποιείται, για την πλήρωση της στήλης, Silica 40-63 μm RP[47], ενώ το σύστημα διαλυτών που επιλέγεται είναι H_2O/ MeOH 90:10. Μετά το τέλος του διαχωρισμού, πραγματοποιείται TLC[34] των κλασμάτων που συλλέγονται, σε σύστημα διαλυτών CH_2Cl_2/ MeOH 90:10. Τα κλάσματα συμπυκνώνονται υπό κενό και ζυγίζονται.

II.1.a.1.1.3 Χρωματογραφία ανοικτής στήλης υπό κενό (Shot)

Για τον καθαρισμό της ελαιοευρωπεΐνης (1) με χρωματογραφία ανοικτής στήλης υπό κενό (Shot), σε μεγάλο γυάλινο χωνί Büchner, των 250 mL, τοποθετείται ξηρή silica 60H και η στήλη «πακετάρεται» με σύστημα διαλυτών, αυξανόμενης πολικότητας, CH_2Cl_2 → CH_2Cl_2/ MeOH 95:5.

Μεγάλη ποσότητα ελαιοευρωπεΐνης (1), καθαρότητας <60%, μετατρέπεται σε «ξηρό ντεπώ», με προσθήκη διπλάσιας ποσότητας Silica 70-200 μm και διαλύτη MeOH, που εξατμίζεται υπό κενό. Το ντεπώ απλώνεται ομοιόμορφα πάνω από την πακεταρισμένη Silica και κατόπιν, η στήλη εκλούεται με τον πιο άπολο διαλύτη του συστήματος διαλυτών, εν προκειμένω με CH_2Cl_2.

Η συλλογή των κλασμάτων γίνεται σε κωνικές φιάλες κενού και ελέγχεται το περιεχόμενό τους με TLC[34]. Τα κλάσματα που περιέχουν ελαιοευρωπεΐνη (1) συνενώνονται και ζυγίζονται.


HO
HO
O
O
O
O

II.2 Μέθοδοι απομόνωσης Ολεασίνης από την *Olea europaea*

II.2.a *Απομόνωση ολεασίνης από πολυφαινολικό εκχύλισμα εξαιρετικά παρθένου ελαιολάδου*

Το δεύτερο, μετά την ελαιοευρωπεΐνη (1), σημαντικότερο συστατικό για την παρούσα διδακτορική μελέτη, ήταν η ολεασίνη (2), που αποτελεί ένα από τα κυριότερα φαινολικά συστατικά του εξαιρετικά παρθένου ελαιολάδου και που παρουσιάστηκε αναλυτικά στο Κεφάλαιο Ι.6.

Όπως προαναφέρθηκε, οι, αναφερόμενες στη βιβλιογραφία, ευεργετικές ιδιότητες του εξαιρετικά παρθένου ελαιολάδου, οφείλονται, μεταξύ άλλων, στα φαινολικά συστατικά που περιέχονται σε αυτό και κυρίως στην ολεασίνη (2), που αποτελεί το πιο ισχυρό αντιοξειδωτικό συστατικό του.

Το συνεχώς αυξανόμενο ενδιαφέρον για το φαινολικό αυτό συστατικό, αφ' ενός για την μελέτη της συσχέτισης της δομής με τη δράση του, αφ' ετέρου για την αξιοποίησή του, στα πλαίσια της ημισύνθεσης βιοδραστικών αναλόγων του, με ποικιλία στη δομή, καθιστά αναγκαία την ανάπτυξη γρήγορων, απλών και αποτελεσματικών μεθόδων, για την απομόνωση της ολεασίνης (2) από το εξαιρετικά παρθένο ελαιόλαδο.

II.2.a.1 *Περιγραφή Μεθόδου*

Το εξαιρετικά παρθένο ελαιόλαδο που χρησιμοποιήθηκε για την απομόνωση της ολεασίνης (2), προέρχεται από την περιοχή Ζαρός, του Ηρακλείου Κρήτης.

Για την απομόνωση της ολεασίνης (2) από το εξαιρετικά παρθένο ελαιόλαδο, σε πρώτη φάση το ελαιόλαδο υπόκειται σε SPE[38] εκχύλιση (βλ. τέλος Κεφαλαίου Ι), η οποία πραγματοποιείται με διάλυση του ελαιολάδου σε n-Hexane και αναλογία n-Hexane/ ελαιολάδου 3:2. Ως στατική φάση, χρησιμοποιείται EtOH/ H_2O και ως αποτέλεσμα της μεθόδου, οι πολυφαινόλες κατακρατούνται από τη στατική φάση, ενώ τα λιπίδια παρασέρνονται από την κινητή φάση του n-Hexane. Κατόπιν κατεργασίας έπειτα με ακετονιτρίλιο (ACN), παραλαμβάνεται το πολυφαινολικό εκχύλισμα του ελαιολάδου, απαλλαγμένο από λιπίδια. Για αποτελεσματικότερη απομάκρυνση των λιπιδίων, η κατεργασία με n-Hexane επαναλαμβάνεται περισσότερες της μίας, φορές.

Στη συνέχεια, το πολυφαινολικό εκχύλισμα του ελαιολάδου, καθαρότητας <60% υπόκειται σε CPC[37], με σύστημα διαλυτών Hex/ EtOAc/ EtOH/ H_2O και βαθμιδωτή έκλουση (gradient). Η βαθμιδωτή έκλουση παρέχει έναν εύκολο τρόπο για την κλασματοποίηση διαλυμένων ουσιών με πολύ διαφορετικές πολικότητες και συντελεστές κατανομής και ταυτόχρονα, σημαντική μείωση του χρόνου κλασματοποίησης.

Τα κλάσματα που προκύπτουν από τον CPC[37] διαχωρισμό ελέγχονται, για το περιεχόμενό τους, με χρωματογραφία TLC[34] και τα κλάσματα που περιέχουν ολεασίνη (2), συνενώνονται και ζυγίζονται, για περαιτέρω επεξεργασία. Η καθαρότητα των κλασμάτων ολεασίνης (2) που προέκυψαν με την τεχνική της CPC[37], είναι της τάξης του 70%.

Με κριτήριο την επιδιωκόμενη καθαρότητα της ολεασίνης (2) και αρχικό δείγμα τα συνενωμένα κλάσματα που προέκυψαν από τον CPC[37] διαχωρισμό, ακολουθήθηκαν τέσσερις διαφορετικές τεχνικές χρωματογραφίας, που έχουν ήδη παρουσιασθεί στο Κεφάλαιο 1:

1. Η χρωματογραφία μοριακού αποκλεισμού (SEC[35])
2. Η χρωματογραφία στήλης (CC[46])
3. Η υγρή χρωματογραφία μέσης πίεσης (MPLC[48]) και
4. Η υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC[36])

II.2.a.1.1 Χρωματογραφία μοριακού αποκλεισμού (SEC)

Η τεχνική αυτή είναι γνωστή και ως χρωματογραφία διηθήσεως πηκτής ή χρωματογραφία διαπερατότητας πηκτής και εφαρμόστηκε για τον καθαρισμό του κλάσματος CPC[37] της ολεασίνης (2), από μόρια μεγαλύτερου από αυτής, όγκου, τα οποία εξήλθαν πρώτα της στήλης Sephadex. Χρησιμοποιήθηκε διαλύτης EtOH και στήλη επιλεγμένης διαμέτρου, ανάλογα με την εκάστοτε ποσότητα δείγματος ολεασίνης (2) προς καθαρισμό.

Κατά την χρωματογραφία μοριακού αποκλεισμού σε στήλη πληρωμένη με Sephadex, δεν εφαρμόζεται καθόλου πίεση στο σύστημα και τα κλάσματα συλλέγονται σε ογκομετρικούς σωλήνες, μόνο με τη βαρύτητα. Τα συλλεχθέντα κλάσματα ελέγχονται με TLC[34] και συνενώνονται αυτά που περιέχουν ολεασίνη (2), συμπυκνώνονται υπό κενό, για την απομάκρυνση της EtOH και ζυγίζονται, για τον υπολογισμό της απόδοσης του διαχωρισμού. Η καθαρότητα του προκύπτοντος κλάσματος υπολογίζεται σε >75%.

Σε περιπτώσεις όπου απαιτήθηκε υψηλότερη καθαρότητα ολεασίνης (2) (π.χ. ημισυνθετικές αντιδράσεις), εφαρμόστηκε και σε αυτή την περίπτωση, η τεχνική της CC[46], που παρουσιάσθηκε αναλυτικά στο Κεφάλαιο 1 και, ως μέθοδος, περιγράφεται στην παρακάτω υποενότητα.

II.2.a.1.2 Χρωματογραφία στήλης (CC)

Αρχικά, ανάλογα με την ποσότητα του δείγματος προς καθαρισμό, επιλέγεται η κατάλληλη, από άποψη ύψους και διαμέτρου, στήλη. Στη συνέχεια, για την επιλογή του ιδανικότερου συστήματος διαλυτών και για την επίτευξη του αποτελεσματικότερου διαχωρισμού της ολεασίνης (2) από τις ανεπιθύμητες προσμίξεις, πραγματοποιούνται, πριν την έναρξη της χρωματογραφίας, δοκιμαστικές πλάκες TLC[34], σε ένα εύρος συστημάτων διαλυτών. Τελικά, το σύστημα που επιλέγεται για TLC[34] είναι το CH_2Cl_2/ MeOH 95:5.

Για την χρωματογραφία στήλης, ωστόσο, δεν επιλέγεται, στην περίπτωση της ολεασίνης (2), σύστημα διαλυτών που να περιέχει MeOH, καθώς οι δύο αλδεϋδικές ομάδες που υπάρχουν στο μόριό της, είναι ιδιαίτερα ευαίσθητες στην παρουσία MeOH και μετατρέπονται σε ημιακετάλες. Για το λόγο αυτό, το υλικό πλήρωσης silica gel της χρωματογραφικής στήλης προετοιμάζεται με 100% CH_2Cl_2, και έπειτα η πολικότητα αυξάνεται σταδιακά κατά 5% EtOAc, κάθε 10-15 κλάσματα, μέχρι που ο καθαρισμός ολοκληρώνεται με σύστημα CH_2Cl_2/ EtOAc 85:15. Η έκλουση της ολεασίνης (2) από τη στήλη, ξεκινάει σε πολικότητα 5% σε EtOAc.

Τα περιεχόμενα ολεασίνη (2) κλάσματα, κατόπιν ελέγχου και πάλι με TLC[34], συνενώνονται και ζυγίζονται, ώστε να υπολογιστεί η απόδοση του διαχωρισμού, με χρωματογραφία στήλης, της ολεασίνης (2) από λιγοστές πλέον, εναπομείνασες ανεπιθύμητες προσμίξεις.

II.2.a.1.3 Υγρή χρωματογραφία μέσης πίεσης (Medium Pressure Liquid Chromatography, MPLC)

Εκτός από την αξιοποίηση της ολεασίνης (2), ως πρώτης ύλης, για την ημισύνθεση αναλόγων, σε ορισμένες περιπτώσεις η ολεασίνη (2) χρησιμοποιήθηκε ως υπόστρωμα για αντιδράσεις βιοκατάλυσης με επιλεγμένα ένζυμα (βλ. Κεφάλαιο IV.5) ή ακόμα και ως αντιδρών, σε δοκιμαστικές αντιδράσεις προσαρμογής των τιμών του pH.

Στις ανωτέρω περιπτώσεις, απαιτείται υψηλής καθαρότητας πρώτη ύλη και για το σκοπό αυτό, τα προκύπτοντα, από τις τεχνικές χρωματογραφίας SEC[35] και CC[46], κλάσματα, υποβάλλονται σε υγρή χρωματογραφία μέσης πίεσης (Medium Pressure Liquid Chromatography, MPLC[48]).

Χρησιμοποιείται ως κινητή φάση, σύστημα απεσταγμένων διαλυτών c-Hex/ EtOAc και η ροή προσαρμόζεται έτσι, ώστε η πίεση να κυμαίνεται μεταξύ 8-10 bar (~25 mL/ min). Ο καθαρισμός ξεκινάει με πολικότητα 4% σε EtOAc και κάθε 20 κλάσματα των 10 mL, που συλλέγονται σε ογκομετρικούς σωλήνες, η πολικότητα αυξάνεται κατά 2% σε EtOAc. Σε πολικότητα πλέον, 20% σε EtOAc αρχίζει να κινείται το μέτωπο του δείγματος, στη χρωματογραφική στήλη και να εκλούονται συστατικά.

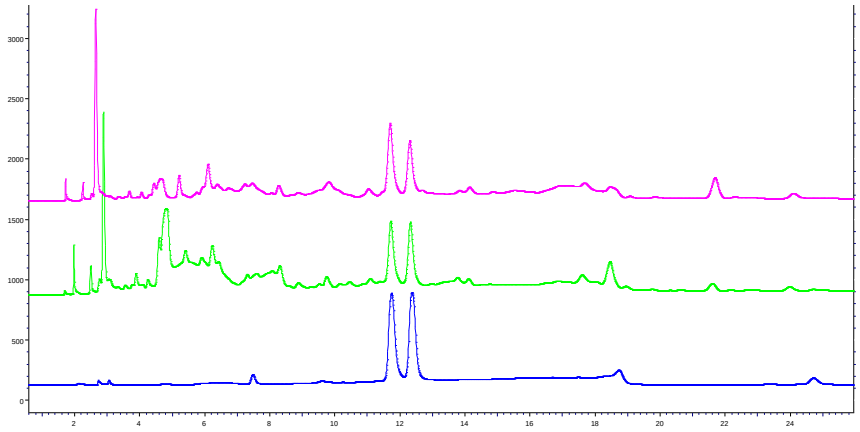
Με την τεχνική MPLC[48], επιτυγχάνεται πολύ ικανοποιητικός διαχωρισμός της ολεασίνης (2), από ένα συστατικό-πρόσμιξη με ελαφρώς μεγαλύτερο R_f[50] από αυτής. Ο εν λόγω διαχωρισμός δεν είχε επιτευχθεί με χρήση των προηγούμενων τεχνικών χρωματογραφίας, και τα δύο συστατικά εκλούονταν στον ίδιο χρόνο έκλουσης από τη χρωματογραφική στήλη.

Τα κλάσματα που συλλέγονται, ελέγχονται με TLC[34], πριν την εκάστοτε αύξηση πολικότητας του συστήματος διαλυτών και όταν ολοκληρώνεται ο διαχωρισμός, συνενώνονται και ζυγίζονται αυτά που περιέχουν ολεασίνη (2), ώστε να υπολογιστεί και σ' αυτή την περίπτωση η απόδοση του διαχωρισμού. Η καθαρότητα της ολεασίνης (2) που επιτυγχάνεται με τη χρωματογραφική τεχνική MPLC[48], υπολογίζεται ότι ξεπερνάει το 85%.

II.2.a.1.4 Υγρή χρωματογραφία υψηλής πίεσης ή απόδοσης υψηλής (HPLC)

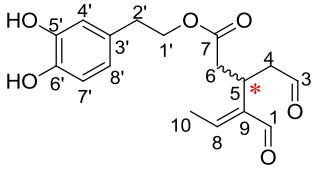
Στην παρούσα διατριβή, συχνά χρησιμοποιήθηκε η αναλυτική HPLC[36] χρωματογραφία, για τον έλεγχο της σταθερότητας δειγμάτων ολεασίνης (2), υψηλής καθαρότητας (>90%), με την πάροδο του χρόνου.

Έτσι, σε περιπτώσεις όπου στο δείγμα της ολεασίνης (2) εμπεριέχονται προσμίξεις, λόγω σταδιακής, με την πάροδο του χρόνου, διάσπασης του μορίου, εμφανίζονται δύο ή περισσότερες κορυφές στο χρωματογράφημα, επιπλέον της χαρακτηριστικής διπλής κορυφής της ολεασίνης (2) (*Εικόνα 20*).



Εικόνα 20. *HPLC [36]χρωματογράφημα καθαρής ολεασίνης (2) (μπλε) και με προσμίξεις (πράσινο και ροζ).*

Η παρασκευαστική HPLC[36] (semi-prep HPLC[36]) χρωματογραφία, στην περίπτωση της ολεασίνης (2), αξιοποιήθηκε όταν κρίθηκε απαραίτητη η εξασφάλιση ποσότητας ολεασίνης (2), καθαρότητας >90%, για τη μέτρηση της στροφικής ικανότητας του μορίου και επομένως, για τη διευκρίνιση της στερεοχημείας του μορίου, λόγω της ύπαρξης σε αυτό, ενός ασύμμετρου κέντρου άνθρακα (*Εικόνα 21*).



Εικόνα 21. **Ασύμμετρο κέντρο άνθρακα, στο μόριο της ολεασίνης (2).*

Για τον διαχωρισμό, λοιπόν, της ολεασίνης (2) από ανεπιθύμητες προσμίξεις, σε κλάσμα ολεασίνης (2) που προέκυψε από της τεχνικές χρωματογραφίας που περιγράφηκαν σε προηγούμενες υποενότητες, εφαρμόστηκε η τεχνική της semi-prep HPLC[36].

Πριν την έναρξη του διαχωρισμού, δημιουργείται μία μέθοδος στο λογισμικό της semi-prep HPLC[36], που περιλαμβάνει τις αναλογίες των διαλυτών στο επιλεγόμενο σύστημα, καθώς και την επιθυμητή ροή, συναρτήσει του χρόνου, μέχρι το τέλος του διαχωρισμού (40 λεπτά). Το δείγμα εγχύεται στη στήλη, σε ποσότητες της τάξης των 0.010 g ή των 0.100 g, ανάλογα με την χωρητικότητα της χρησιμοποιούμενης στήλης.

Με την έναρξη λειτουργίας του οργάνου, το σύστημα διαλυτών, αρχίζει να ρέει διαμέσου της στήλης και του δείγματος, με αποτέλεσμα να εκλούονται σταδιακά από αυτή, τα επιμέρους συστατικά του, τα οποία συλλέγονται και ελέγχονται με TLC[34]. Τα περιεχόμενα ολεασίνη (2), κλάσματα, συνενώνονται και ζυγίζονται, ώστε να υπολογιστεί και στην περίπτωση αυτή, η απόδοση του διαχωρισμού.

Για έναν επιτυχή διαχωρισμό της ολεασίνης (2) από τις ανεπιθύμητες προσμίξεις, ο χρόνος έκλουσης αυτής, θα πρέπει να διαφέρει από τον χρόνο έκλουσης των υπολοίπων συστατικών, κάτι που εξαρτάται από την καταλληλότητα του επιλεγόμενου συστήματος διαλυτών. Για το λόγο αυτό, πριν τον διαχωρισμό, πραγματοποιούνται δοκιμαστικές TLC[34], σε ένα εύρος συστημάτων, διαφόρων πολικοτήτων, ώστε να επιλεχθεί το κατάλληλο, για την χρωματογραφία HPLC[36], σύστημα.

Η καθαρότητα της ολεασίνης (2) που εξασφαλίζεται με την συγκεκριμένη χρωματογραφική τεχνική, είναι της τάξης του 90%.

II.2.b *Απομόνωση ολεασίνης από φύλλα της Olea europaea*

Η ολεασίνη (2) είναι το κύριο φαινολικό συστατικό του εξαιρετικά παρθένου ελαιολάδου, ενώ σύμφωνα με τους Paiva-Martins και συνεργάτες [219], έχει αποδειχθεί ότι εκχυλίσματα φύλλων της *Olea europaea* αποτελούν σημαντική πηγή σεκοϊριδοειδών, παρόμοιων με αυτά που υπάρχουν στο ελαιόλαδο.

Τα φύλλα της ελιάς, είναι διαθέσιμα ως πρώτη ύλη, καθ' όλη τη διάρκεια του έτους και δεν υπόκεινται σε ταχεία ενζυμική αποικοδόμηση, όπως συμβαίνει σε άλλες πιθανές πηγές άγλυκων ελαιοευρωπεΐνης (1), όπως οι ελαιοπυρήνες. Ως εκ τούτου, η απομόνωση των ενώσεων αυτών από τα φύλλα, σε ποσότητες μεγαλύτερες από εκείνες που λαμβάνονται απευθείας από το ελαιόλαδο, επέτρεψε την πραγματοποίηση ορισμένων από τις πρώτες μελέτες, σχετικά με τη βιολογική και αντιοξειδωτική τους δραστικότητα.

II.2.b.1 *Περιγραφή μεθόδου*

Στην παρούσα διατριβή, εργαστήκαμε με βάση και μία άλλη μελέτη των Paiva-Martins και Pinto [174], σχετικά με την αξιοποίηση των φύλλων της *Olea europaea* για την απομόνωση ολεασίνης (2) [219]. Δύο δοκιμές πραγματοποιήθηκαν:

1) Με αποθηκευμένα σε απλή ψύξη, φύλλα ελιάς από τα Χανιά της Κρήτης.

2) Με φρέσκα φύλλα ελιάς, που συλλέξαμε από ελαιόδεντρα της Πανεπιστημιούπολης.

II.2.b.1.1 Δοκιμή με φύλλα ελιάς από την Κρήτη

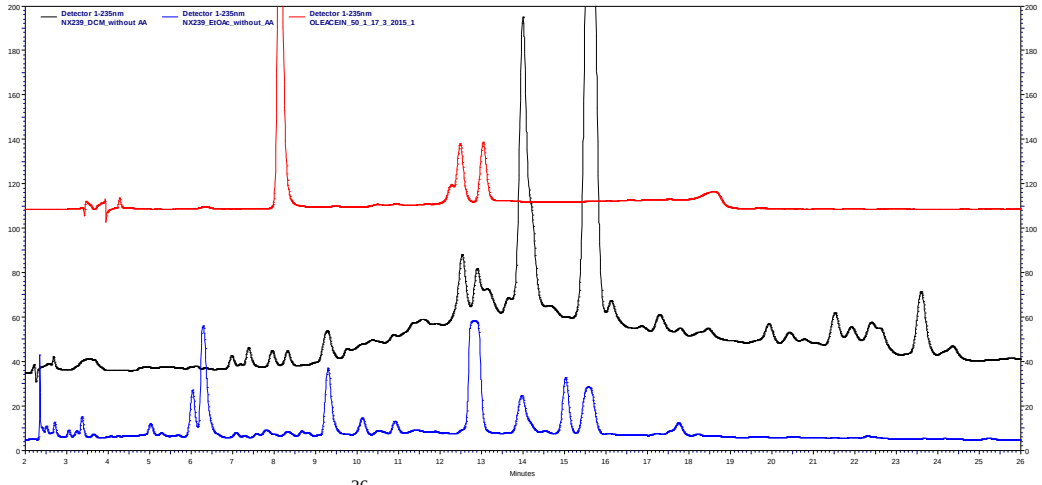
Φύλλα ελιάς από τα Χανιά της Κρήτης, που ήταν αποθηκευμένα για μικρό χρονικό διάστημα σε συνθήκες ψύξης, τοποθετούνται σε πλαστική σακούλα, κλεισμένη αεροστεγώς, η οποία τοποθετείται με τη σειρά της στο φούρνο, στους 37^{o}C και στο σκοτάδι, για 22 ώρες.

Λίγες ώρες μετά το κλείσιμο των φύλλων στη σακούλα, παρατηρείται δημιουργία υδρατμών στο εσωτερικό της. Μετά την πάροδο 22 ωρών, τα φύλλα αφαιρούνται από τη σακούλα, τοποθετούνται σε κωνική φιάλη, τυλιγμένη με αλουμινόχαρτο, για εξασφάλιση και πάλι σκοτεινών συνθηκών και προστίθεται στην κωνική MeOH (analytical grade). Ακολουθεί ανακίνηση και ανάδευση της κωνικής φιάλης, ώστε να καλυφθεί όλη η επιφάνεια των φύλλων από τον προστιθέμενο διαλύτη και η κωνική τοποθετείται, για διάστημα 5 ημερών, σε σκοτεινό μέρος, όπου αναδεύεται το περιεχόμενό της, σε τακτά χρονικά διαστήματα.

Μετά το πέρας των 5 ημερών, το περιεχόμενο της φιάλης διηθείται και το διήθημα συμπυκνώνεται υπό κενό, προς εξάτμιση της MeOH. Κατόπιν, το προκύπτον υπόλειμμα διαλύεται σε μίγμα ακετόνης/ H_2O και εκχυλίζεται αρκετές φορές με n-Hexane, ώστε να απομακρυνθούν κατά το δυνατόν, οι περιεχόμενες χλωροφύλλες, κάτι που διαπιστώνεται από την σημαντική εξασθένιση του πράσινου χρώματος, της φάσης του n-Hexane.

Έπειτα, η υδατική στιβάδα εκχυλίζεται με απεσταγμένο CH_2Cl_2 και η προκύπτουσα οργανική, συμπυκνώνεται υπό κενό (οργ.1). Ακολουθεί, τέλος, εκ νέου εκχύλιση της υδατικής με EtOAc, μέχρις ότου η φάση του EtOAc να πάψει να είναι κίτρινη και η νέα οργανική φάση ξηραίνεται με άνυδρο Na_2SO_4 και συμπυκνώνεται υπό κενό (οργ.2). Οι δύο οργανικές φάσεις συγχρωματογραφούνται, αρχικά, σε πλάκα TLC[34], με χρήση, ως πρότυπου δείγματος, καθαρής

ολεασίνης (2) και έπειτα υποβάλλονται σε HPLC[36] ανάλυση, όπου επιβεβαιώνεται η παρουσία ολεασίνης (2) στα δείγματα και επομένως, στα φύλλα της ελιάς. Τα χρωματογραφήματα των δειγμάτων των δύο οργανικών φάσεων που παραλήφθηκαν, παρατίθενται παρακάτω (*Εικόνα 22*).



Εικόνα 22. *Χρωματογραφήματα HPLC[36] των δύο οργανικών φάσεων, CH_2Cl_2 (μαύρο) και EtOAc (μπλε), που προέκυψαν από την κατεργασία φύλλων ελιάς από την Κρήτη, σε αντιπαραβολή με χρωματογράφημα προτύπου δείγματος ολεασίνης (2) (κόκκινο χρώμα).*

II.2.b.1.2 Δοκιμή με φύλλα ελιάς που συλλέχθηκαν από εμάς

Στα πλαίσια της μελέτης μας, πραγματοποιήσαμε παραλλαγές της μεθόδου που περιγράφηκε στην προηγούμενη υποενότητα, ώστε να οπτικοποιηθεί η διεργασία εκχύλισης των φύλλων και να βρεθεί η καταλληλότερη και αποδοτικότερη μέθοδος. Έτσι, μετά την συλλογή των φύλλων και κλαδιών από την ομάδα μας (*Εικόνα 23*), έγιναν οι παρακάτω Δοκιμές, με πρώτη ύλη:

1. Φύλλα ολόκληρα και διαλύτη MeOH «analytical grade»
2. Φύλλα τεμαχισμένα και διαλύτη MeOH «analytical grade»
3. [Φύλλα και κλαδιά] ολόκληρα και διαλύτη MeOH «analytical grade»
4. [Φύλλα και κλαδιά] τεμαχισμένα και διαλύτη MeOH «analytical grade»
5. Φύλλα τεμαχισμένα και διαλύτη H_2O «HPLC[36] grade»
6. [Φύλλα και κλαδιά] τεμαχισμένα και διαλύτη H_2O «HPLC[36] grade»
7. Φύλλα ολόκληρα και διαλύτη βραστό H_2O
8. Φύλλα τεμαχισμένα και διαλύτη H_2O «HPLC[36] grade», στους 37^oC.



Εικόνα 23. *Συλλογή και επεξεργασία φύλλων ελιάς.*

Στις περιπτώσεις όπου χρειάστηκε τεμαχισμός της πρώτης ύλης, αυτός πραγματοποιήθηκε με το χέρι ή με ψαλίδι. Σε κάθε περίπτωση, η ξηρή μάζα τοποθετήθηκε και πάλι σε σακούλα με αεροστεγές κλείσιμο και οι οκτώ σακούλες τοποθετήθηκαν για 20 h στο φούρνο, στους 37^{o}C.

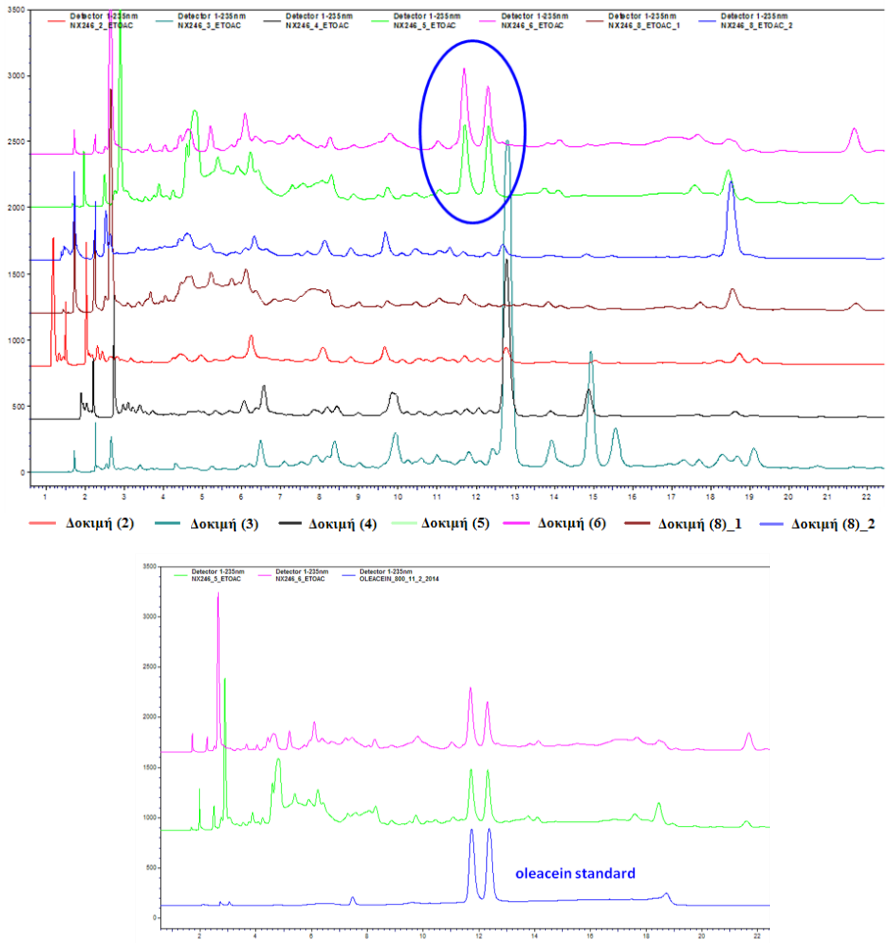
Μετά την πάροδο 20 ωρών, παρατηρήθηκε σχηματισμός υδρατμών στο εσωτερικό κάθε σακούλας και έπειτα, κάθε δοκιμή μεταφέρθηκε σε κωνική φιάλη (του 1L ή των 2L, αναλόγως του όγκου της ξηρής μάζας) και τοποθετήθηκε στην κάθε κωνική, ο αντίστοιχος διαλύτης, συγκεκριμένου, κάθε φορά, όγκου. Οι κωνικές φιάλες καλύφθηκαν με αλουμινόχαρτο και τοποθετήθηκαν σε σκοτεινό μέρος, για 5 ημέρες.

Στη Δοκιμή 7, μετά την τοποθέτηση του βραστού H_2O, για διάστημα 10-15 λεπτών (παρασκευή τσαγιού-αφεψήματος) ακολούθησε διήθηση, εξάτμιση, για την παραλαβή του ξηρού εκχυλίσματος των φύλλων της ελιάς και έλεγχος με TLC[34].

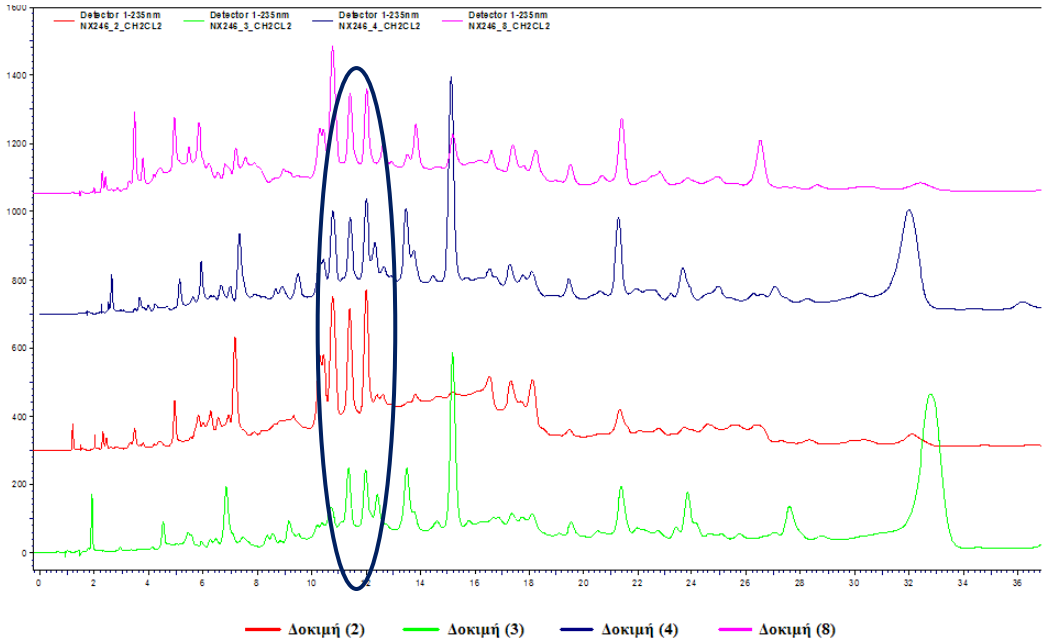
Κατά την ανάδευση της Δοκιμής 8 στον επωαστήρα κλίβανο, στους 37^{o}C και στις 180 rpm, παρατηρείται αφρισμός. Μετά το πέρας συνολικά 26 h από την τοποθέτηση της κωνικής φιάλης 8 στον επωαστήρα, λαμβάνεται δείγμα υπερκειμένου και πραγματοποιείται εκχύλιση με EtOAc και έλεγχος με TLC[34]. Ακολουθεί διήθηση του μίγματος, 3 φορές εκχύλιση, όλου του όγκου της υδατικής φάσης, με CH_2Cl_2, 3 φορές με EtOAc και 3 φορές εκχύλιση των φύλλων, με MeOH, στους υπερήχους, για 30 λεπτά, κάθε φορά. Κατόπιν μίας τελικής διήθησης, και εξάτμισης του διηθήματος, προκύπτει το ξηρό μεθανολικό εκχύλισμα των τεμαχισμένων φύλλων.

Οι Δοκιμές 1, 2, 3, 4, 5 και 6 κατεργάστηκαν, μετά το πέρας των 5 ημερών, με τον ίδιο τρόπο που κατεργάστηκε η δοκιμή της προηγούμενης υποενότητας. Έτσι, για καθεμία, προέκυψαν 2 οργανικές φάσεις, μία του CH_2Cl_2 και μία του EtOAc, οι οποίες, μελετήθηκαν με TLC[34] και HPLC[36]. Εξαίρεση αποτελούν οι Δοκιμές 5 και 6, όπου μελετήθηκαν χρωματογραφικά μόνο οι φάσεις του EtOAc.

Τα δείγματα των παραπάνω Δοκιμών υποβλήθηκαν σε ανάλυση με HPLC[36], για την διερεύνηση, αφ' ενός της παρουσίας ή όχι, ολεασίνης (2), στο εκάστοτε δείγμα, αφ' ετέρου, για την εύρεση της ενδεικτικότερης μεθόδου εκχύλισης των φύλλων της ελιάς, με σκοπό την μέγιστη αξιοποίησή τους, ως πηγή ολεασίνης (2). Τα χρωματογραφήματα των δύο οργανικών φάσεων (CH_2Cl_2 και EtOAc) κάθε δοκιμής, παρατίθενται παρακάτω (*Εικόνες 24, 25*).



Εικόνα 24. *Πάνω: Χρωματογραφήματα HPLC[36] των οργανικών φάσεων EtOAc, για τις Δοκιμές 2, 3, 4, 5, 6 και 8, στα 235 nm. Κάτω: Χρωματογραφήματα των Δοκιμών 5 και 6, σε αντιπαραβολή με το χρωματογράφημα του προτύπου δείγματος ολεασίνης (2) (σκούρο μπλε).*



Εικόνα 25. *Χρωματογραφήματα HPLC[36] των οργανικών φάσεων CH_2Cl_2, για τις Δοκιμές 2, 3, 4 και 8, στα 235 nm.*

Συμπερασματικά, μεταξύ των δειγμάτων που αναλύθηκαν:

- Από τα δείγματα οργανικής φάσης EtOAc, μόνο αυτά των Δοκιμών 5 και 6 περιλαμβάνουν ολεασίνη (2), με το δείγμα της Δοκιμής 6, να δίνει την καλύτερη απόδοση, όπως φαίνεται και από την Εικόνα 24.
- Από τα δείγματα οργανικής φάσης CH_2Cl_2, μόνο αυτά των Δοκιμών 2, 3, 4 και 8 περιλαμβάνουν ολεασίνη (2) (*Εικόνα 25*).

Από τα παραπάνω, καταλήγουμε στο συμπέρασμα ότι, αφ' ενός, ο τεμαχισμός της πρώτης ύλης ενισχύει την περιεκτικότητα σε ολεασίνη (2), του προς ανάλυση δείγματος, αφ' ετέρου, η παραλλαγή της μεθόδου, κατά την οποία συμπεριλαμβάνονται, στην πρώτη ύλη, τα κλαδιά της *Olea europaea,* λειτουργεί επίσης συνεργιστικά σε αυτό το αποτέλεσμα. Αυτό το αποτέλεσμα μπορεί να οφείλεται στην παρουσία ενζύμων, όπως η β-γλυκοσιδάση, στα φύλλα και τα κλαδιά της ελιάς, που μετατρέπουν τους, περιεχόμενους σ' αυτά, σεκοϊριδοειδείς γλυκοσίδες σε ολεασίνη (2) και άλλα αλδεϋδικά παράγωγα, όπως η ολεοκανθάλη (3).

Επιπλέον, η χρήση απεσταγμένου H_2O, ως διαλύτη στις αντίστοιχες Δοκιμές, φαίνεται ασφαλέστερη, για την εξασφάλιση μεγαλύτερων ποσοτήτων ολεασίνης (2), απ' ότι η χρήση MeOH, λόγω της χαρακτηριστικής ευαισθησίας των αλδεϋδικών ομάδων στο μόριο αυτής.

II.2.c *Απομόνωση ολεασίνης από καρπούς της Olea europaea*

Οι Roberto Lo Scalzo και Maria Luisa Scarpati [32], στη μελέτη τους, του 1993, υπογραμμίζουν τη διαφοροποίηση στο φαινολικό προφίλ των ώριμων μαύρων ελαιόκαρπων από αυτό των άγουρων πράσινων ελαιόκαρπων. Συγκεκριμένα, στη μελέτη τους διασαφηνίζεται η δομή της νέας ένωσης που απομονώθηκε από το χυμό ώριμων μαύρων ελιών, που δεν είναι άλλη από την ολεασίνη (2).

Ιδιαίτερης σημασίας στην εν λόγω μελέτη, είναι η αναφορά ότι, ενώ στις άγουρες πράσινες ελιές, κύριο φαινολικό συστατικό αποτελεί η ελαιοευρωπεΐνη (1), κατά την ωρίμανση, ποσότητα της ελαιοευρωπεΐνης (1) μετατρέπεται στο όξινο ανάλογό της, την δεμεθυλ-ελαιοευρωπεΐνη. Στις ώριμες, πλέον, μαύρες ελιές, υπάρχει αποκλειστικά η δεμεθυλ-ελαιοευρωπεΐνη. Μετά την κατεργασία των καρπών, οι δύο αυτοί γλυκοσίδες απουσιάζουν από τον χυμό του ελαιόκαρπου, καθώς υδρολύονται γρήγορα, παρουσία ενζύμων β-γλυκοσιδασών.

II.2.c.1 *Περιγραφή μεθόδου*

Ακολουθώντας, λοιπόν τη μελέτη των Lo Scalzo και Scarpati [32], στα πλαίσια της αξιοποίησης των ελαιόκαρπων, ως πρώτη ύλη για την απομόνωση ολεασίνης (2), πραγματοποιήθηκαν δύο δοκιμές, με δύο διαφορετικά δείγματα ελαιόκαρπων:

1. Φρέσκοι ώριμοι ελαιόκαρποι («μαυροελιές») από την Κρήτη
2. Ελαιόκαρποι (μαύρες «λιανοελιές») προχωρημένης ωρίμανσης, από την Κέρκυρα

II.2.c.1.1 Απομόνωση ολεασίνης από φρέσκες, ώριμες μαυροελιές

Η πρώτη δοκιμή έγινε με πρώτη ύλη φρέσκες ώριμες μαυροελιές από την Κρήτη. Οι ελιές αρχικά ζυγίζονται ολόκληρες, πριν την αφαίρεση των πυρήνων τους και κατόπιν τοποθετούνται σε πορσελάνινο γουδί, όπου προστίθεται μικρή ποσότητα απεσταγμένου H_2O, τόση ώστε να διευκολυνθεί η κατεργασία και πολτοποίησή τους. Η διαδικασία της πολτοποίησης διαρκεί αρκετή ώρα, μέχρις ότου να παραληφθούν οι χυμοί των καρπών και να παραμείνουν, στο τέλος της διεργασίας, μόνο οι φλοιοί.

Σε τακτά χρονικά διαστήματα γίνεται προσθήκη μικρών ποσοτήτων απεσταγμένου H_2O, ώστε να αραιώνεται το μίγμα και ακολουθεί διήθηση υπό κενό, σε φίλτρο πορώδους 2.

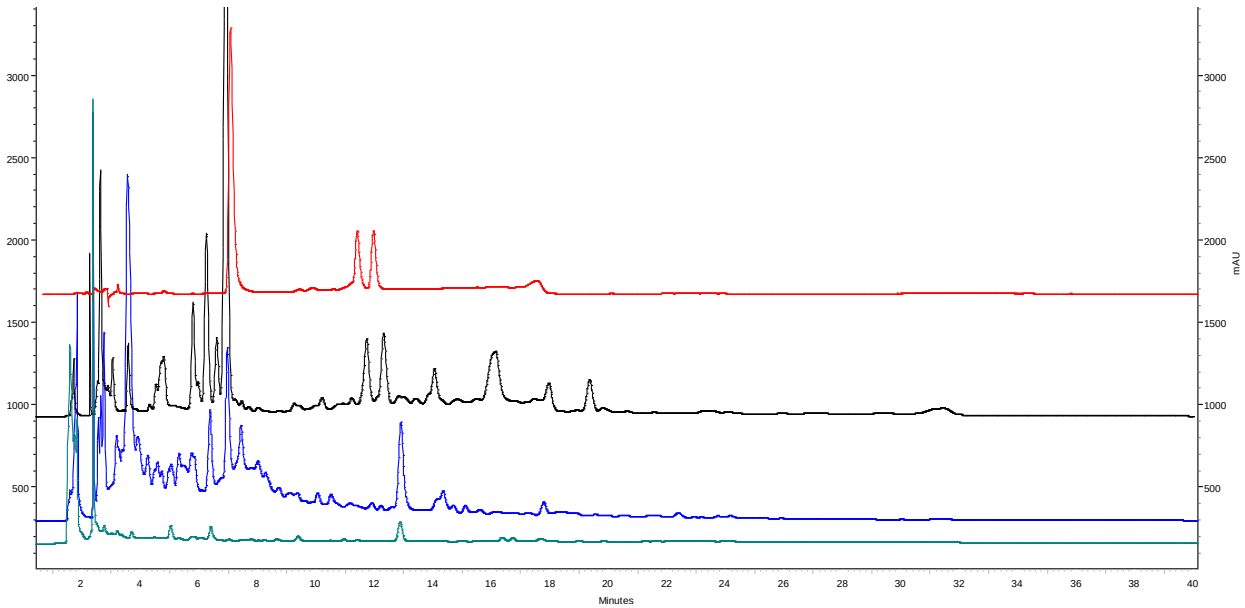
Το προκύπτον διήθημα, απαλλαγμένο πλέον από τον πολτό της ελιάς, τοποθετείται καθ' όλη τη διάρκεια της νύχτας στο ψυγείο και την επόμενη ημέρα μοιράζεται σε 14 πλαστικούς σωλήνες φυγοκέντρου, με καπάκι. Ακολουθεί φυγοκέντρηση στις 4000 rpm, για διάστημα 15 λεπτών και έπειτα, με πιπέτα Pasteur, αφαιρείται από τον κάθε σωλήνα, η υπερκείμενη ελαιοστιβάδα. Κατόπιν, οι σωλήνες επανατοποθετούνται στη συσκευή φυγοκέντρησης και, επαναλαμβάνεται η φυγοκέντρηση των δειγμάτων, αυτή τη φορά στις 4250 rpm, ώστε να απομακρυνθεί περαιτέρω ποσότητα λαδιού, με χρήση και πάλι πιπέτας Pasteur.

Έπειτα, οι υδατικές φάσεις συνενώνονται και η κατεργασία συνεχίζεται με εκχύλιση της υδατικής φάσης με n-Hex, για την απομάκρυνση της μέγιστης δυνατής ποσότητας λιπαρών και τριτερπενικών οξέων, καθώς και άλλων ελαφρώς πολικών συστατικών (απολύπανση).

Στη συνέχεια, η υδατική φάση εκχυλίζεται μία φορά με CH_2Cl_2 και εκ νέου 3 φορές, με ίσους όγκους, διαιθυλαιθέρα (Et_2O), η προκύπτουσα, συνενωμένη, οργανική φάση ξηραίνεται με Na_2SO_4 και συμπυκνώνεται υπό κενό, για να παραληφθεί το ξηρό εκχύλισμα των ελαιόκαρπων, που αναλύεται με TLC[34] και HPLC[36]. Το χρωματογράφημα HPLC[36] του προκύπτοντος εκχυλίσματος, παρατίθεται στην Εικόνα 26.

Οι φλοιοί που προέκυψαν από την πολτοποίηση των ελαιόκαρπων τοποθετούνται σε γυάλινο δοχείο με καπάκι και προστίθεται EtOH. Το δοχείο τοποθετείται κλειστό σε σκοτεινό σημείο, για διάστημα 2-3 ημερών. Κατόπιν, ακολουθεί διήθηση του μίγματος και το διήθημα υποβάλλεται σε συμπύκνωση υπό κενό, προς απομάκρυνση της EtOH. Το προκύπτον αιθανολικό εκχύλισμα αναλύεται χρωματογραφικά, με TLC[34] και HPLC[36] και το χρωματογράφημα HPLC[36] αυτού, παρατίθεται επίσης στην Εικόνα 26.

Από τα παρακάτω χρωματογραφήματα συμπεραίνεται ότι μόνο η οργανική φάση του CH_2Cl_2 που προέκυψε από την κατεργασία του εκχυλίσματος ελαιόκαρπων από την Κρήτη, περιείχε ολεασίνη (2).



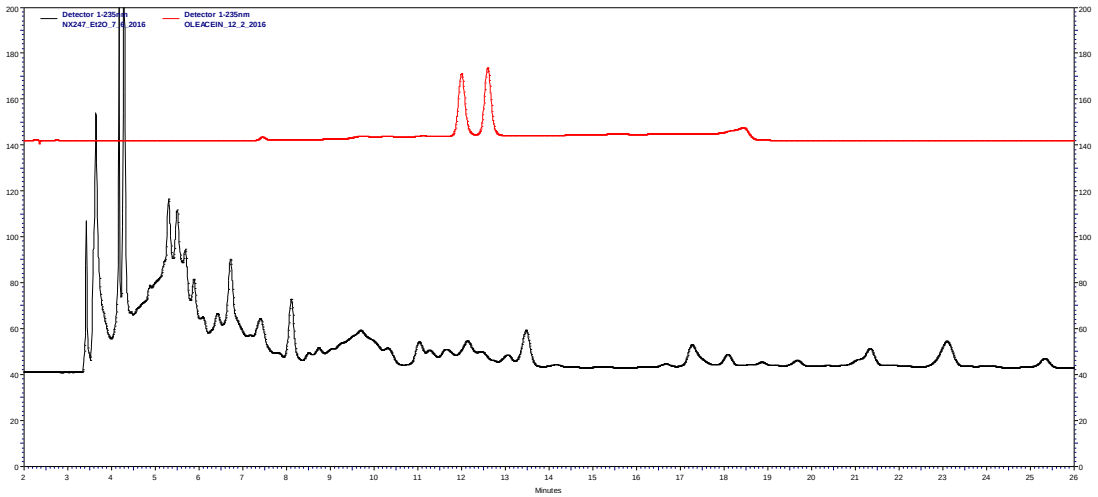
Εικόνα 26. *Χρωματογραφήματα των οργανικών φάσεων CH_2Cl_2 (μαύρο), Et_2O (σκούρο μπλε) και EtOH (ανοικτό μπλε), σε αντιπαραβολή με το χρωματογράφημα πρότυπης ολεασίνης (2) (κόκκινο), στα 235 nm.*

II.2.c.1.2 Απομόνωση ολεασίνης από προχωρημένης ωρίμανσης, μαύρες «λιανοελιές»

Με την μέθοδο που περιγράφηκε στην προηγούμενη υποενότητα, πραγματοποιήθηκε η κατεργασία και των μαύρων «λιανοελιών» (μικρές ελιές), προχωρημένης ωρίμανσης, με προέλευση από την Κέρκυρα.

Οι ελιές αυτές, σε αντίθεση με αυτές από την Κρήτη, δεν συλλέχθηκαν κατά την ελαιοκομική περίοδο (η οποία ξεκινάει από τον Οκτώβριο), αλλά 6-7 μήνες μετά και επομένως, σε αρκετά προχωρημένο στάδιο ωρίμανσης.

Μετά την κατεργασία των ελαιόκαρπων, όπως προηγουμένως, προέκυψε το αντίστοιχο ξηρό εκχύλισμα, το οποίο αναλύθηκε χρωματογραφικά, με TLC[34] και HPLC[36]. Το χρωματογράφημα HPLC[36] για το εν λόγω εκχύλισμα, δίνεται στην Εικόνα 27.



Εικόνα 27. *Χρωματογράφημα εκχυλίσματος υπερώριμων ελαιόκαρπων, σε αντιπαραβολή με πρότυπο δείγμα ολεασίνης (2), στα 235nm.*

Από το χρωματογράφημα HPLC[36] συμπεραίνεται ότι δεν περιέχεται καθόλου ολεασίνη (2) στο εν λόγω εκχύλισμα. Το φαινόμενο αυτό πιθανόν να οφείλεται στη χαρακτηριστική ευαισθησία των αλδεϋδικών ομάδων του μορίου της ολεασίνης (2), απέναντι στη δράση των ενζύμων που εμπεριέχονται φυσικά στον καρπό της ελιάς, αλλά και στις μεταβαλλόμενες τιμές του pH και της θερμοκρασίας, σε προχωρημένης ωρίμανσης ελαιόκαρπους.

II.2.d *Απόλυτη στερεοχημεία της ολεασίνης, ως προϊόν απομόνωσης από την Olea europaea*

Στη δομή της ολεασίνης (2), όπως προαναφέρθηκε, υπάρχει ένα ασύμμετρο κέντρο άνθρακα, κάτι που σημαίνει ότι η ολεασίνη (2) αποτελεί χειρόμορφο μόριο και επομένως, αναμένεται να υφίστανται δύο εναντιομερή αυτής, το (+) εναντιομερές και το (-) εναντιομερές.

Η χειρομορφία της φυσικής ολεασίνης (2) δεν έχει ακόμη διευκρινιστεί, ενώ τα δεδομένα που πηγάζουν από την υπάρχουσα βιβλιογραφία, είναι λίγα και αντιφατικά. Ωστόσο, η αποσαφήνιση της χειρομορφίας του μορίου είναι καίριας σημασίας, τόσο από χημικής απόψεως, όσο και από άποψη βιολογικής δραστικότητας.

Στην μελέτη των Lo Scalzo και Scarpati [32], σχετικά με την απομόνωση ολεασίνης (2) από το χυμό ώριμων, μαύρων ελαιόκαρπων, κατόπιν μέτρησης της στροφικής ικανότητας του μορίου, αυτή είχε την τιμή $[\alpha]_D$= + 6.5, σε διαλύτη $CHCl_3$.

Αντίθετα σε μία άλλη μελέτη, αυτή των Smith και συνεργατών [220], πραγματοποιήθηκε η σύνθεση του (-) εναντιομερούς της ολεασίνης (2), της οποίας η στροφική ικανότητα μετρήθηκε ως $[\alpha]_D$= - 70, σε διαλύτη $CHCl_3$.

Στην παρούσα διατριβή, η ολεασίνη (2) απομονώθηκε από το εξαιρετικά παρθένο ελαιόλαδο, όπως θα περιγραφεί αναλυτικά στην υποενότητα ΙΙ.3. Η στροφική ικανότητα του κλάσματος ολεασίνης (2) (καθαρότητας > 90%) που προέκυψε από την παρασκευαστική HPLC[36] (semi-prep HPLC[36]) χρωματογραφία, μετρήθηκε, σε συγκέντρωση 1.2 g/ 100 mL και με διαλύτη $CHCl_3$, για να δώσει την τιμή $[a_D]^{20} = -1.08$. Η τιμή αυτή υποδεικνύει ότι η φυσική ολεασίνη (2) που απομονώνεται από το ελαιόλαδο, αποτελεί ρακεμικό μίγμα των δύο εναντιομερών μορφών, (+) και (-).

Η υπόθεση αυτή συνάδει με τα αποτελέσματα της χειρόμορφης SFC[44] χρωματογραφίας, στην οποία υποβλήθηκε το εν λόγω δείγμα, που παρατίθενται στα χρωματογραφήματα της Εικόνας 28.

Στην περίπτωση της ολεασίνης (2), ως προϊόν απομόνωσης από το εξαιρετικά παρθένο ελαιόλαδο, χρησιμοποιήθηκε η χειρόμορφη SFC[44] χρωματογραφία, για την διερεύνηση της ύπαρξης ή όχι, δύο εναντιομερών μορφών του μορίου στο δείγμα. Για το σκοπό αυτό, δοκιμάστηκαν τέσσερις διαφορετικές χειρόμορφες στήλες:

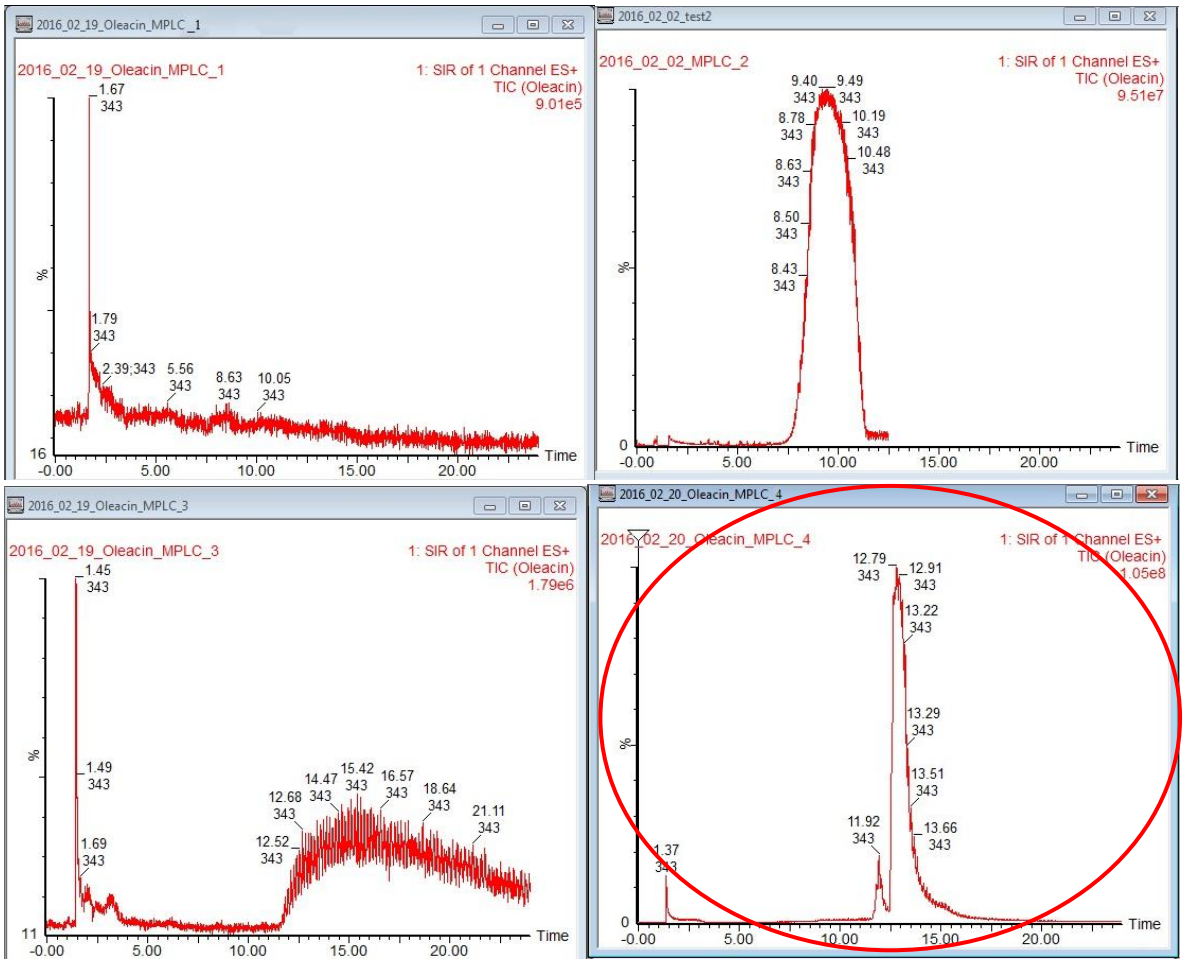
1. Anal_chiralpack_IA
2. Anal_chiralpack_IB
3. Anal_chiralpack_IC
4. Anal_chiralpack_ID

Η συγκέντρωση του εγχυόμενου δείγματος ήταν 1 mg/ mL και το σύστημα διαλυτών που χρησιμοποιήθηκε ήταν CO_2/ ACN, σε ισοκρατική ή βαθμωτή έκλουση. Επιπλέον, η μέθοδος που ακολουθήθηκε για την ανάλυση, δίνεται στον παρακάτω Πίνακα.

Πίνακας 5. *Μέθοδος για χειρόμορφη SFC[44] χρωματογραφία σε δείγμα ολεασίνης (2), από εξαιρετικά παρθένο ελαιόλαδο.*

Start. perc.	End perc.	Start/ End Flow	Total Duration (sec)
5	5	5.0/ 5.0	1200
50	50	5.0/ 5.0	300
50	5	5.0/ 5.0	300
5	5	5.0/ 5.0	150

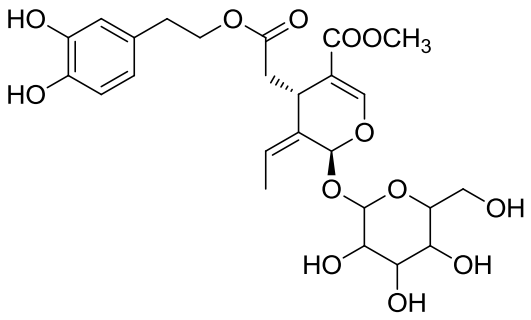
Τα χρωματογραφήματα της SFC[44] χρωματογραφίας που προέκυψαν από τις δοκιμές των τεσσάρων χειρόμορφων στηλών παρατίθενται στην Εικόνα 28.



Εικόνα 28. *Χρωματογραφήματα SFC[44], με χρήση χειρόμορφων στηλών: Πάνω (από αριστερά προς δεξιά): Anal._chiralpack_IA, Anal._chiralpack_IB, Κάτω (από αριστερά προς δεξιά): Anal._chiralpack_IC, Anal._chiralpack_ID.*

Από τα παραπάνω χρωματογραφήματα, συμπεραίνεται ότι η καταλληλότερη χειρόμορφη στήλη, για τον προσδιορισμό της οπτικής καθαρότητας της ολεασίνης (2), είναι η στήλη Anal. chiralpack_ID. Ωστόσο, ακόμα και με τη χρήση της χειρόμορφης αυτής στήλης, δεν επιτυχάνθηκε ο επιθυμητός διαχωρισμός.

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ


HO
HO
O
O
COOCH3
O
O
O
OH
HO
OH
OH

II.3 Απομόνωση ελαιοευρωπεΐνης από την *Olea europaea*

II.3.a *Φυγόκεντρος χρωματογραφία κατανομής (CPC)*

Το σύστημα διαλυτών που χρησιμοποιήθηκε για την απομόνωση της ελαιοευρωπεΐνης (1) από το εκχύλισμα της *Olea europaea*, ήταν EtOAc/ EtOH/ H_2O, σε αναλογία 9: 1: 9 και συνολικό όγκο 3 L (1421 mL: 158 mL: 1421 mL).

Η μέθοδος ξεκινάει με προετοιμασία του συστήματος διαλυτών ως εξής:

Σε διαχωριστικό χωνί, αναμιγνύονται η υδατική και η οργανική φάση και κατόπιν αφήνονται να διαχωριστούν. Η αρχή του διαχωρισμού γίνεται από τα πρώτα 30 δευτερόλεπτα, ενώ ο διαχωρισμός ολοκληρώνεται μέσα σε διάστημα μίας ώρας. Μετά τον διαχωρισμό, η κάτω φάση (LOWER) αποτελείται από H_2O (όπου υπάρχει μικρή ποσότητα EtOH) και έχει όγκο 1640 mL και η πάνω (UPPER), αποτελείται από EtOAc και έχει όγκο 1350 mL.

Η κάτω φάση χρησιμοποιείται, ως στατική και η ροή ρυθμίζεται σε 20 mL/ min. Πριν την εισαγωγή του δείγματος, επιλέγεται κατά προτίμηση η αύξουσα λειτουργία, ενώ η πίεση στο σύστημα ελέγχεται τακτικά, ώστε να μην υπερβεί τα 400 PSI (27.6 bar).

Όταν παρατηρηθεί συλλογή διαλύτη στα απόβλητα του συστήματος, τότε αυξάνεται η ροή σε 30 mL/ min και η στήλη γεμίζει σε περίπου 30 λεπτά.

Στη συνέχεια, ενεργοποιείται η περιστροφή, η ροή μειώνεται στα 15 mL/ min και προετοιμάζεται το προς έγχυση δείγμα. Σε σφαιρική φιάλη των 100 mL, ζυγίζονται 10 g εκχυλίσματος της *Olea europaea* και διαλύονται, υπό ανάδευση, σε 25 mL μίγματος στατικής με κινητή φάση (LOWER + UPPER).

Πριν την έγχυση του δείγματος, υπολογίζεται ο όγκος στατικής φάσης που έχει εξέλθει της στήλης, Vm, ο οποίος σταματάει να αυξάνεται όταν η πίεση στο σύστημα σταθεροποιείται και τότε αυτό θεωρείται σταθερό. Ο Vm στην περίπτωση του εν λόγω καθαρισμού της ελαιοευρωπεΐνης (1), μετρήθηκε ως Vm= 180 mL και λαμβάνεται υπόψη κατά τον υπολογισμό του ποσοστού συγκράτησης της στατικής φάσης, sf %, σε κατάσταση υδροδυναμικής ισορροπίας, ο οποίος υπολογίζεται από τον τύπο:

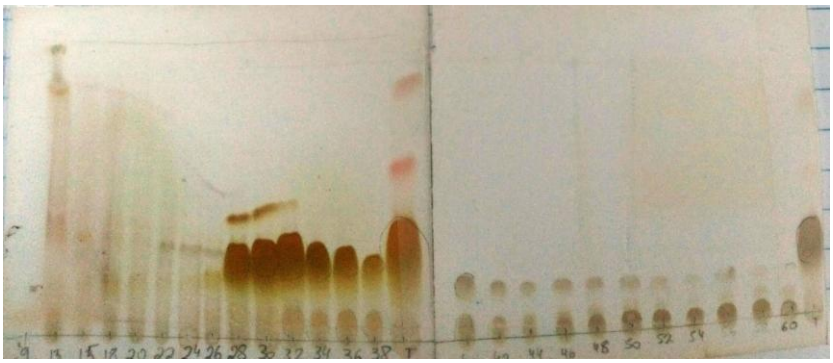
$$\%sf = \frac{Vc - (Vm - Vextra - column)}{Vc} x100\% = \frac{1000 - (180 - 40)}{1000} x100\% = 86\%$$

όπου, Vc = ο όγκος της στήλης
Vm = ο «νεκρός όγκος»

Οι ογκομετρικοί σωλήνες τοποθετούνται στην έξοδο της στήλης, εγχύονται προσεκτικά 25 mL του δείγματος στη στήλη και ρυθμίζεται η ροή του κολλέκτορα σε 15 mL/ min. Σε κάθε κλάσμα συλλέγεται όγκος 30 mL (120 δευτερόλεπτα συλλογής, σε κάθε κλάσμα). Μετά τη συλλογή του επιθυμητού αριθμού κλασμάτων, παρασκευάζεται σύστημα 50:50 MeOH/ H_2O και το όργανο ρυθμίζεται στην φθίνουσα λειτουργία, ώστε να παραληφθούν και τα τελευταία υπολείμματα ελαιοευρωπεΐνης (1) που υπάρχουν στο σύστημα.

Τέλος, πραγματοποιείται TLC[34], με σύστημα διαλυτών CH_2Cl_2/ MeOH 90:10, συγκεντρωτική, για όλα τα κλάσματα που συλλέγονται από τη στήλη, διαχωρισμένα σε υδατικές και οργανικές φάσεις (*Εικόνα 29*).

Κατόπιν συμπύκνωσης υπό κενό των κλασμάτων που προέκυψαν από την φυγόκεντρο χρωματογραφία κατανομής, με πρώτη ύλη το εκχύλισμα της *Olea europaea*, παραλήφθηκαν περίπου 4 g ελαιοευρωπεΐνης (1) (απόδοση 40%).



Εικόνα 29. *TLC[34] χρωματογραφία (CH_2Cl_2/ MeOH 90:10) των κλασμάτων που απομονώθηκαν από την CPC[37] χρωματογραφία εκχυλίσματος της Olea europaea, για παραλαβή ελαιοευρωπεΐνης (1).*

II.3.b *Χρωματογραφία στήλης (CC)*

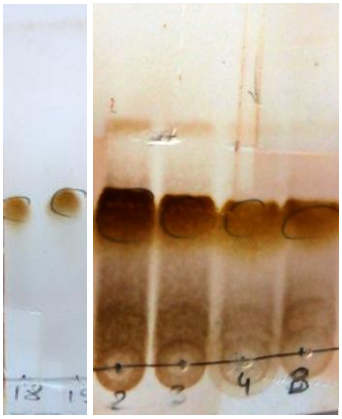
Με πρώτη ύλη δείγμα ελαιοευρωπεΐνης (1), απομονωμένης, μέσω χρωματογραφίας CPC[37], από εκχύλισμα της *Olea europaea* και καθαρότητας, της τάξης του 50%, πραγματοποιήθηκαν, ανάλογα με τη πολικότητα των φάσεων:

- ✓ χρωματογραφία στήλης κανονικής φάσης και
- ✓ χρωματογραφία στήλης ανάστροφης φάσης.

Πραγματοποιήθηκαν δοκιμαστικές TLC[34] του δείγματος, σε συστήματα διαλυτών CH_2Cl_2/ MeOH 90:10 και H_2O/ MeOH 80:20, για χρωματογραφία στήλης κανονικής και ανάστροφης φάσης, αντίστοιχα.

✓ Για τη χρωματογραφία κανονικής φάσης, χρησιμοποιήθηκε, για την πλήρωση της στήλης Silica gel 40-63 μm/ Silica flash, ενώ το σύστημα διαλυτών που επιλέχθηκε ήταν CH_2Cl_2/MeOH 95:5 → 80:20. Σε 1.8 g δείγματος ελαιοευρωπεΐνης (1), καθαρότητας ~50% προστέθηκαν 4 g περίπου Silica gel 70-200 μm και το μίγμα διαλύθηκε σε 5 mL MeOH. Κατόπιν συμπύκνωσης υπό κενό, παραλήφθηκαν 6 g «ξηρό ντεπώ», το οποίο προστέθηκε στη χρωματογραφική στήλη, ακολουθούμενο από 1 g άμμου. Ακολούθησε διέλευση επαρκούς ποσότητας διαλύτη από τη στήλη, ώστε να επιτευχθεί η δημιουργία ομοιογενών στρώσεων δείγματος – άμμου. Αριθμημένοι ογκομετρικοί σωλήνες τοποθετήθηκαν, για τη συλλογή των κλασμάτων, ενώ μετά το τέλος του διαχωρισμού, πραγματοποιήθηκε TLC[34] των κλασμάτων που συλλέχθηκαν, σε σύστημα διαλυτών CH_2Cl_2/ MeOH 90:10. Παραλήφθηκαν 0.407 g (22% απόδοση) καθαρής ελαιοευρωπεΐνης (1), της τάξης του 85% (*Εικόνα 30α*).

✓ Για τη χρωματογραφία ανάστροφης φάσης, χρησιμοποιήθηκε Silica gel 40-63 μm RP[47], ενώ το σύστημα διαλυτών που επιλέχθηκε ήταν H_2O/ MeOH 90:10. Από 3.6 g ελαιοευρωπεΐνης (1), καθαρότητας ~50%, μετά το τέλος του διαχωρισμού και TLC[34] των κλασμάτων που συλλέχθηκαν, σε σύστημα διαλυτών CH_2Cl_2/ MeOH 90:10, παραλήφθηκαν 1.8 g (50% απόδοση) καθαρής ελαιοευρωπεΐνης (1), της τάξης του 75% (*Εικόνα 30β*).



α) **β)**

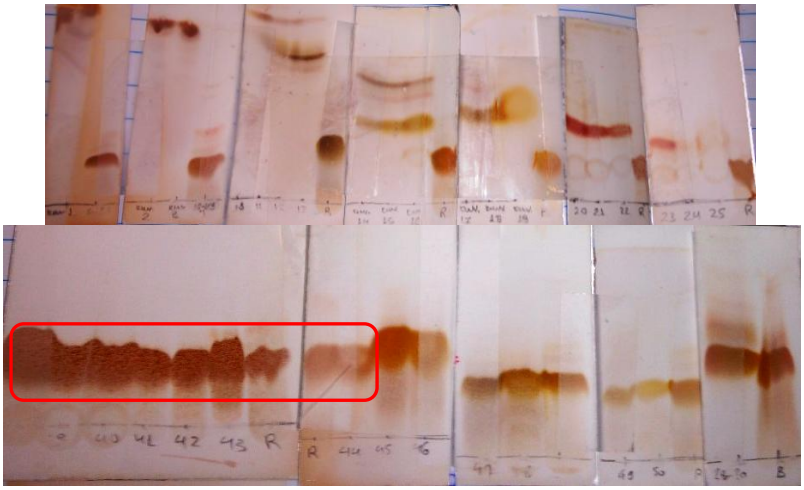
Εικόνα 30. α) *TLC[34] χρωματογράφημα κλασμάτων της ελαιοευρωπεΐνης (1), από χρωματογραφία στήλης κανονικής φάσης (καθαρότητα >85%),* ***β)*** *TLC[34] χρωματογράφημα κλασμάτων της ελαιοευρωπεΐνης (1), από χρωματογραφία στήλης ανάστροφης φάσης (καθαρότητα <75%), σε σύστημα διαλυτών CH_2Cl_2/ MeOH 90:10.*

II.3.c *Χρωματογραφία ανοικτής στήλης υπό κενό (Shot)*

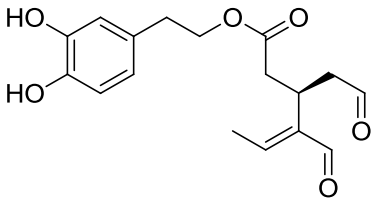
Για τον καθαρισμό μεγάλων ποσοτήτων ελαιοευρωπεΐνης (1) με χρωματογραφία ανοικτής στήλης υπό κενό, σε μεγάλο γυάλινο χωνί Büchner, των 250 mL, τοποθετήθηκε ξηρή silica 60H και η στήλη «πακεταρήστηκε» με σύστημα διαλυτών CH_2Cl_2 100% → CH_2Cl_2/ MeOH 95:5.

Σε 6 g ελαιοευρωπεΐνης (1) καθαρότητας ~50% διαλύθηκαν σε MeOH, προστέθηκαν 12 g Silica 70-200 μm και ο διαλύτης εξατμίστηκε υπό κενό, για τη δημιουργία «ξηρού ντεπώ». Αυτό απλώθηκε ομοιόμορφα πάνω από την πακεταρισμένη Silica και κατόπιν η στήλη εκλούστηκε με CH_2Cl_2, αρχικά και κατόπιν, σταδιακά αυξήθηκε η πολικότητα του συστήματος διαλυτών.

Τα κλασματα συλλέχθηκαν σε κωνικές φιάλες κενού και το περιεχόμενό τους ελέγχθηκε με TLC[34] (*Εικόνα 31*). Τα κλάσματα με ελαιοευρωπεΐνη (1) μεγαλύτερης καθαρότητας, συνενώθηκαν και ζυγίστηκαν. Με την ανωτέρω τεχνική χρωματογραφίας, παραλήφθηκαν 3.28 g ελαιοευρωπεΐνης (1) (απόδοση 55%), καθαρότητας >85%. Τα επόμενα κλάσματα περιείχαν ελαιοευρωπεΐνη (1), αλλά οι προσμίξεις σε σάκχαρα ήταν απαγορευτικές, ώστε τα κλάσματα αυτά να συμπεριληφθούν στα επιλεγμένα.



Εικόνα 31. *TLC[34] χρωματογραφία κλασμάτων από χρωματογραφία ανοικτής στήλης υπό κενό, σε δείγμα ελαιοευρωπεΐνης (1).*

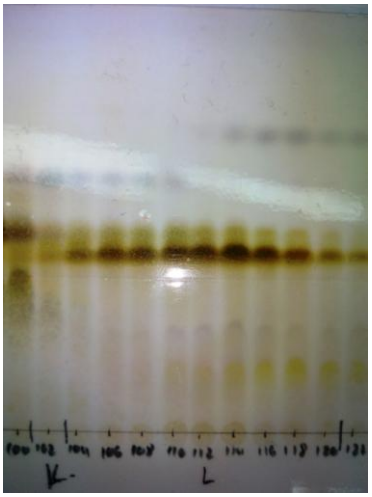

HO
HO
O
O
O
O

II.4 Απομόνωση ολεασίνης από την *Olea europaea*

II.4.a *Απομόνωση ολεασίνης από πολυφαινολικό εκχύλισμα εξαιρετικά παρθένου Ελαιολάδου*

Ως πρώτη ύλη για την απομόνωση ολεασίνης (2), χρησιμοποιήθηκε εξαιρετικά παρθένο ελαιόλαδο κρητικής προέλευσης. Κατόπιν SPE[38] εκχύλισης του δείγματος ελαιολάδου, όπως περιγράφηκε στην υποενότητα II.3.a.1, προς απομάκρυνση των περιεχόμενων λιπιδίων, προέκυψε πολυφαινολικό εκχύλισμα, καθαρότητας <60%.

Το εκχύλισμα αυτό, υποβλήθηκε σε CPC[37] χρωματογραφία, με σύστημα διαλυτών Hex/ EtOAc/ EtOH/ H_2O και βαθμιδωτή έκλουση (gradient). Τα κλάσματα που συλλέχθηκαν ελέγχθηκαν με TLC[34] (*Εικόνα 32*), συνενώθηκαν όσα περιείχαν ολεασίνη (2) και το συνενωμένο κλάσμα ζυγίστηκε για να δώσει 1.8 g ολεασίνης (2), καθαρότητας ~70%.



Εικόνα 32. *TLC[34] των κλασμάτων ολεασίνης (2) (CH_2Cl_2/ MeOH 90:10), από τον CPC[37] διαχωρισμό.*

Με κριτήριο την επιδιωκόμενη καθαρότητα της ολεασίνης (2), ακολουθήθηκαν τέσσερεις διαφορετικές τεχνικές χρωματογραφίας:

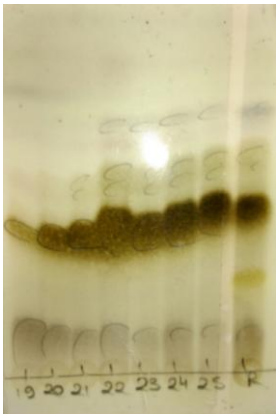
1. Η χρωματογραφία μοριακού αποκλεισμού (SEC[35])
2. Η χρωματογραφία στήλης (CC[46])
3. Η υγρή χρωματογραφία μέσης πίεσης (MPLC[48]) και
4. Η υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC[36])

II.4.a.1 *Χρωματογραφία μοριακού αποκλεισμού (SEC)*

Η τεχνική της χρωματογραφίας μοριακού αποκλεισμού, εφαρμόστηκε για το διαχωρισμό της ολεασίνης (2), από μεγαλύτερα, συνυπάρχοντα, στο κλάσμα CPC[37], μόρια. Μ' αυτόν τον τρόπο, η ολεασίνη (2) διαχωρίστηκε από μικρότερα μόρια που συνήθως, σε απλή χρωματογραφία στήλης, έχουν παρόμοιο χρόνο έκλουσης με αυτή. Παράδειγμα τέτοιου μορίου αποτελεί το ελενολικό οξύ.

Χρησιμοποιήθηκε ως διαλύτης κινητής φάσης, η EtOH και στήλη πληρωμένη με Sephadex. 0.390 g ολεασίνης (2) καθαρότητας ~70% διαλύθηκαν σε μικρή ποσότητα EtOH και

προστέθηκαν σε στήλη Sephadex, διαμέτρου 2.2 cm. Δεν εφαρμόστηκε καθόλου πίεση στο σύστημα και τα κλάσματα συλλέχθηκαν σε ογκομετρικούς σωλήνες των 10 mL, ελέγχθηκαν με TLC[34] (*Εικόνα 33*) και σύστημα διαλυτών CH_2Cl_2/ MeOH 96:4. Κατόπιν συνένωσης των κλασμάτων ολεασίνης (2), ακολούθησε συμπύκνωση υπό κενό και ζύγιση, για την παραλαβή 0.305 g (απόδοση διαχωρισμού 78%) ολεασίνης (2), καθαρότητας >75%.



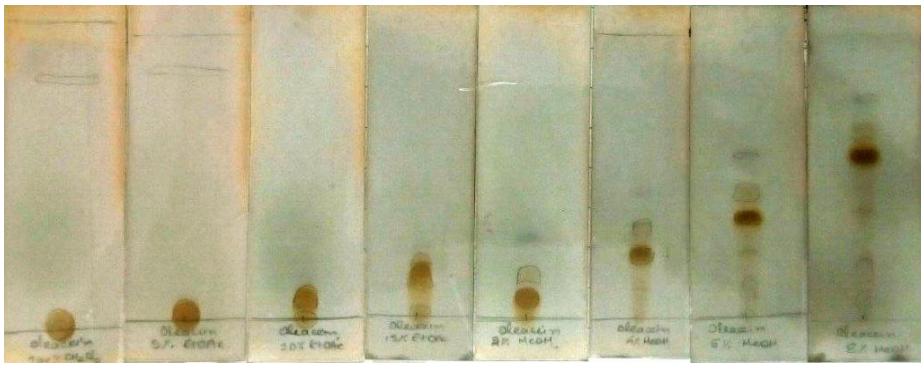
Εικόνα 33. *TLC[34] χρωματογραφία (CH_2Cl_2/ MeOH 96:4) των κλασμάτων ολεασίνης (2), από χρωματογραφία μοριακού αποκλεισμού (SEC[35])*

Ποσότητα αυτού του κλάσματος, χρησιμοποιήθηκε για δοκιμαστικές αντιδράσεις, όπου δεν απαιτείται υψηλής καθαρότητας πρώτη ύλη ολεασίνης (2) και το υπόλοιπο κλάσμα, υποβλήθηκε σε περαιτέρω καθαρισμό, με χρήση άλλης χρωματογραφικής τεχνικής (βλ επόμενες υποενότητες).

II.4.a.2 *Χρωματογραφία στήλης (CC)*

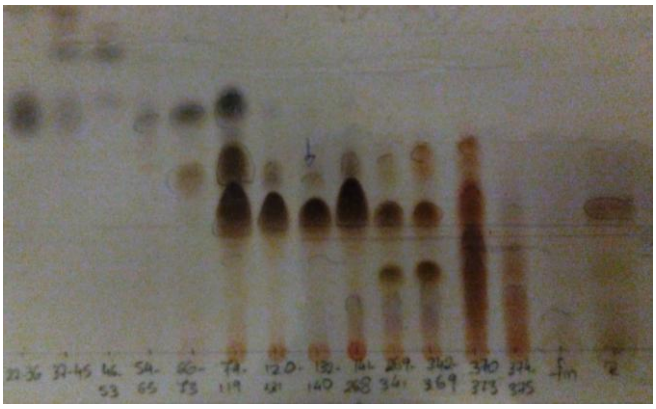
Για την εφαρμογή της χρωματογραφίας στήλης στην περίπτωση της ολεασίνης (2), χρησιμοποιήθηκαν 0.150 g από το κλάσμα CPC[37] της ολεασίνης (2), καθαρότητας 70% , που με τη μορφή «ξηρό ντεπώ» τοποθετήθηκαν στην κορυφή στήλης, διαμέτρου 1 cm.

Μετά από δοκιμαστικές TLC[34] σε ένα εύρος συστημάτων διαλυτών (*Εικόνα 34*), επιλέχθηκε για την έναρξη του καθαρισμού, σύστημα CH_2Cl_2/ EtOAc 97.5: 2.5, ενώ η πολικότητα αυξήθηκε σταδιακά κατά 5% EtOAc, κάθε 10-15 κλάσματα, μέχρι που ο καθαρισμός ολοκληρώθηκε με σύστημα CH_2Cl_2/ EtOAc 85:15. Η έκλουση, τέλος, της ολεασίνης (2) από τη στήλη, ξεκίνησε σε πολικότητα 5% σε EtOAc. Ως σύστημα διαλυτών για TLC[34], επιλέχθηκε CH_2Cl_2/ MeOH 90:10.



Εικόνα 34. *Δοκιμαστικές TLC[34] συστημάτων διαλυτών για χρωματογραφία στήλης (CC[46]) ολεασίνης (2).*

Τα περιεχόμενα ολεασίνη (2) κλάσματα, κατόπιν ελέγχου και πάλι με TLC[34] (*Εικόνα 35*), συνενώνονται και ζυγίζονται, για να παραληφθούν 0.095 g (απόδοση διαχωρισμού 63%) ολεασίνης (2), καθαρότητας ~85%.



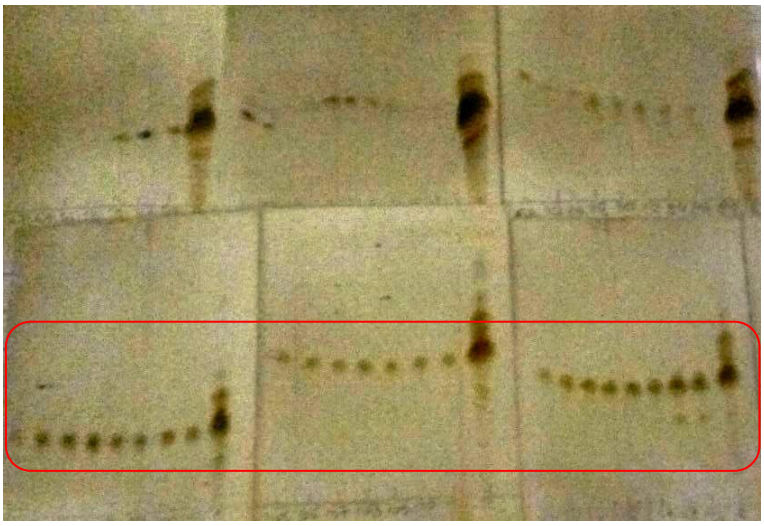
Εικόνα 35. *TLC[34] χρωματογραφία (CH_2Cl_2/ MeOH 90:10) των κλασμάτων από CC[46] της ολεασίνης (2).*

II.4.a.3 *Υγρή χρωματογραφία μέσης πίεσης (MPLC)*

Για την εξασφάλιση υψηλής καθαρότητας ολεασίνης (2), ως πρώτη ύλη για ενζυμικές αντιδράσεις ή αντιδράσεις προσαρμογής των τιμών pH, εφαρμόστηκε η MPLC[48] χρωματογραφία, σε κλάσματα που προέκυψαν από χρωματογραφία μοριακού αποκλεισμού σε στήλη Sephadex.

0.5 g ολεασίνης (2) καθαρότητας ~75%, διαλύθηκαν σε μικρό όγκο του συστήματος διαλυτών c-Hex dist/ EtOAc dist 96:4, που χρησιμοποιήθηκε ως κινητή φάση στην MPLC[48] και τοποθετήθηκαν στην κορυφή της προστήλης. Η ροή προσαρμόστηκε στα 25 mL/ min, ώστε η πίεση να κυμαίνεται μεταξύ 8-10 bar και άρχισε η συλλογή των κλασμάτων.

Η χρωματογραφική μέθοδος, ξεκίνησε με σύστημα διαλυτών c-Hex dist/ EtOAc dist 96:4 και κάθε 20 κλάσματα των 10 mL, που συλλέχθηκαν, η πολικότητα αυξήθηκε, κατά 2% σε EtOAc. Σε πολικότητα 20% σε EtOAc άρχισαν να εκλούονται συστατικά και τα κλάσματα που συλλέχθηκαν, ελέγχθηκαν με TLC[34] (*Εικόνα 36*), συνενώθηκαν τα κλάσματα που περιείχαν ολεασίνη (2) και ζυγίστηκαν, για να παραληφθούν ~0.250 g ολεασίνης (2) (απόδοση διαχωρισμού 50%), καθαρότητας >85%.



Εικόνα 36. *TLC[34] χρωματογραφία (CH_2Cl_2/ MeOH 95:5) των κλασμάτων που συλλέχθηκαν από τον καθαρισμό δείγματος ολεασίνης (2), με MPLC[48] χρωματογραφία.*

II.4.a.4 *Υγρή χρωματογραφία υψηλής πίεσης ή υψηλής απόδοσης (HPLC[36])*

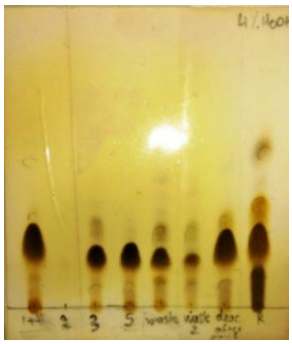
Η παρασκευαστική HPLC[36] (semi-prep HPLC[36]), αξιοποιήθηκε για την εξασφάλιση ποσότητας ολεασίνης (2), καθαρότητας >90%, για τη μέτρηση της στροφικής ικανότητας του μορίου και για χρήση ως υπόστρωμα, σε αντιδράσεις βιοκατάλυσης με ένζυμα, όπου απαιτήθηκε καθαρότερο δείγμα ολεασίνης (2), από αυτό που εξασφαλίζεται με MPLC[48].

Πριν την έγχυση του δείγματος, δημιουργείται μία μέθοδος για τον διαχωρισμό (*Πίνακας 6*), η οποία ονομάστηκε OLEA OLIVE OIL μέθοδος. Με την επιλογή της μεθόδου, εκκινείται η ροή του, επιλεγμένου στη μέθοδο, συστήματος διαλυτών, προκειμένου να προετοιμαστεί η χρωματογραφική στήλη, για την επικείμενη έγχυση.

Πίνακας 6. *Μέθοδος χρωματογραφίας HPLC[36] semi-prep,για τον καθαρισμό δείγματος ολεασίνης (2).*

	H_2O	**ACN**	**Flow (mL/ min)**
initial (t= 0)	80	20	4
20 min	70	30	4
35 min	70	30	4
initial	80	20	4

Στη συνέχεια, σε δόσεις των 0.010 g, το κλάσμα που συλλέχθηκε από κάποια CC[46] της ολεασίνης (2), εγχύεται στη στήλη της semi-prep HPLC[36] και το σύστημα διαλυτών, αρχίζει να ρέει μέσω του δείγματος, με αποτέλεσμα να εκλούονται σταδιακά από τη στήλη, τα επιμέρους συστατικά, που συλλέγονται και ελέγχονται με TLC[34] (*Εικόνα 37*). Τα περιεχόμενα ολεασίνη (2), κλάσματα, συνενώνονται και ζυγίζονται, ώστε να παραληφθούν 0.004 g (απόδοση διαχωρισμού 40%) ολεασίνης (2), καθαρότητας >90%.



Εικόνα 37. *TLC[34] χρωματογραφία (CH_2Cl_2/MeOH 96:4) των κλασμάτων που συλλέχθηκαν από τον semi-prep HPLC[36] καθαρισμό της ολεασίνης (2).*

Για έναν επιτυχή διαχωρισμό της ολεασίνης (2) από τις ανεπιθύμητες προσμίξεις, ο χρόνος έκλουσης αυτής, από τη στήλη, θα πρέπει να διαφέρει από το χρόνο έκλουσης των υπολοίπων συστατικών, κάτι που εξαρτάται από την καταλληλότητα του επιλεγόμενου συστήματος διαλυτών. Για το λόγο αυτό, πριν το διαχωρισμό, πραγματοποιούνται δοκιμαστικές TLC[34], σε ένα εύρος συστημάτων διαλυτών, διαφόρων πολικοτήτων, ώστε να επιλεχθεί το κατάλληλο, για τη χρωματογραφία HPLC[36], σύστημα. Στη μέθοδο που επιλέξαμε, η ολεασίνη (2) εκλούεται στα 10-15 λεπτά περίπου, από τη στήλη, ενώ το ελενολικό οξύ περίπου στα 5-7 λεπτά. Για να εκλουστεί, ωστόσο, το άγλυκο της ελαιοευρωπεΐνης που συνυπάρχει στο δείγμα, θα πρέπει να επιλεχθεί διαφορετική μέθοδος, στην HPLC[36] semi-prep. Η καθαρότητα της ολεασίνης (2) που εξασφαλίζεται με τη συγκεκριμένη χρωματογραφική τεχνική, είναι της τάξης του 90%.

II.4.b *Απομόνωση ολεασίνης από φύλλα της Olea europaea*

Στα πλαίσια της αξιοποίησης των φύλλων της *Olea europaea* για την απομόνωση ολεασίνης (2), εφαρμόσαμε τη μέθοδο των Paiva-Martins και Pinto [174], [219], πραγματοποιώντας δύο δοκιμές με πρώτη ύλη:

1) αποθηκευμένα σε απλή ψύξη, φύλλα ελιάς από τα Χανιά της Κρήτης και

2) φρέσκα φύλλα ελιάς, που συλλέξαμε από ελαιόδεντρα της Πανεπιστημιούπολης.

II.4.b.1 *Δοκιμή με φύλλα ελιάς από την Κρήτη*

185 g ξερά φύλλα ελιάς από τα Χανιά της Κρήτης, που ήταν αποθηκευμένα για μικρό χρονικό διάστημα σε συνθήκες ψύξης, τοποθετήθηκαν σε πλαστική σακούλα, μεγέθους 23 x 33 cm, με αεροστεγές κλείσιμο, η οποία τοποθετήθηκε με τη σειρά της στο φούρνο, στους 37^{o}C και στο σκοτάδι, για 22 ώρες.

Λίγες ώρες μετά, παρατηρήθηκε δημιουργία υδρατμών στο εσωτερικό της σακούλας, ενώ, μετά από 22 συνολικά ώρες, τα φύλλα αδειάστηκαν σε κωνική φιάλη, τυλιγμένη με αλουμινόχαρτο και ακολούθησε προσθήκη 610 mL MeOH (analytical grade) και ανακίνηση της φιάλης. Τέλος, η φιάλη τοποθετήθηκε σε σκοτεινό ντουλάπι, για 5 ημέρες, διάστημα κατά το οποίο αναδευόταν, σε τακτά χρονικά διαστήματα, το περιεχόμενό της.

Μετά από 5 ημέρες, το διάλυμα διηθήθηκε και το διήθημα συμπυκνώθηκε υπό κενό. Ακολούθησε διάλυση του στερεού υπολείμματος σε 50 mL μίγματος ακετόνης/ H_2O 50:50 και εκχύλιση 10 φορές, με όγκους 150 mL, n-Hex, προς απομάκρυνση του μέγιστου δυνατού ποσοστού χλωροφυλλών από το εκχύλισμα (εξασθένιση πράσινου χρώματος, της φάσης του n-Hex).

Στη συνέχεια, κατόπιν εκχύλισης της υδατικής φάσης 3 φορές, με όγκους 150 mL απεσταγμένου CH_2Cl_2, η προκύπτουσα οργανική στιβάδα, ξηράνθηκε με άνυδρο Na_2SO_4 και συμπυκνώθηκε υπό κενό (*Βλ. Εικόνα 38 οργ.1*). Η υδατική φάση επανεκχυλίστηκε εκ νέου 10 φορές, με όγκους 100 mL απεσταγμένου EtOAc, μέχρις ότου παρατηρηθεί εξασθένιση του κίτρινου χρώματος της οργανικής φάσης και η τελευταία, κατόπιν ξήρανσης με άνυδρο Na_2SO_4, συμπυκνώθηκε υπό κενό (*Βλ. Εικόνα 38 οργ.2*).

Οι δύο οργανικές φάσεις που συλλέχθηκαν συγχρωματογραφήθηκαν σε πλάκα TLC[34] (*Εικόνα 38*), με χρήση, ως πρότυπου δείγματος, καθαρής ολεασίνης (2) και έπειτα υποβλήθηκαν σε HPLC[36] ανάλυση. Από την TLC[34] συμπεραίνεται ότι υπάρχει ποσότητα ολεασίνης (2) στα δύο δείγματα, κάτι που επιβεβαιώνεται από το αντίστοιχο χρωματογράφημα της HPLC[36] ανάλυσης που παρατέθηκε προηγούμενα (*Εικόνα 22*).



Εικόνα 38. *TLC[34] συγχρωματογράφηση (CH_2Cl_2/ MeOH 95:5) οργανικών φάσεων από την κατεργασία φύλλων ελιάς.* ***Από αριστερά προς δεξιά:*** *δείγμα οργανικής φάσης CH_2Cl_2, οργ.1, δείγμα οργανικής φάσης EtOAc, οργ.2, πρότυπο δείγμα ολεασίνης (2), ως μάρτυρας.*

II.4.b.2 *Δοκιμή με φύλλα ελιάς που συλλέχθηκαν από την ομάδα μας*

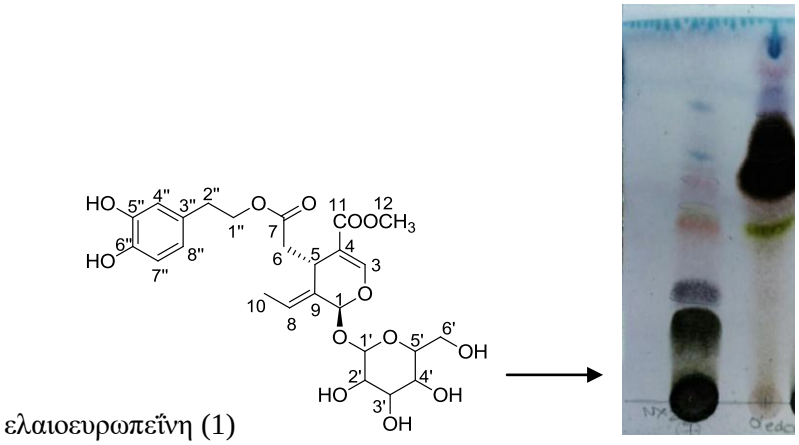
Κατά τη διάρκεια της μελέτης μας, σχετικά με την περιεκτικότητα των φύλλων της ελιάς σε ολεασίνη (2), εφαρμόσαμε παραλλαγές τις μεθόδου των Paiva-Martins και Pinto [174], [219], με σκοπό την οπτικοποίηση της διεργασίας εκχύλισης και την εύρεση της μεθόδου με τη μέγιστη δυνατή απόδοση.

Έτσι, έγιναν οι παρακάτω Δοκιμές:

1. 250 g φύλλα ολόκληρα και 1350 mL MeOH «analytical grade», σε κωνική φιάλη των 2L
2. 250 g φύλλα κομμένα και 700 mL MeOH «analytical grade», σε κωνική φιάλη του 1L
3. 250 g [φύλλα & κλαδιά] ολόκληρα και 1500 mL MeOH «analytical grade», σε φιάλη 2L
4. 250 g [φύλλα & κλαδιά] κομμένα και 600 mL MeOH «analytical grade», σε φιάλη 1L
5. 250 g φύλλα κομμένα και 700 mL H_2O «HPLC[36] grade», σε κωνική φιάλη του 1L
6. 250 g [φύλλα και κλαδιά] κομμένα και 600 mL H_2O «HPLC[36] grade», σε κωνική του 1L
7. 250 g φύλλα ολόκληρα και 800 mL βραστό H_2O
8. 250 g φύλλα κομμένα και 1050 mL H_2O «HPLC[36] grade», στον incubator, στους 37^oC.

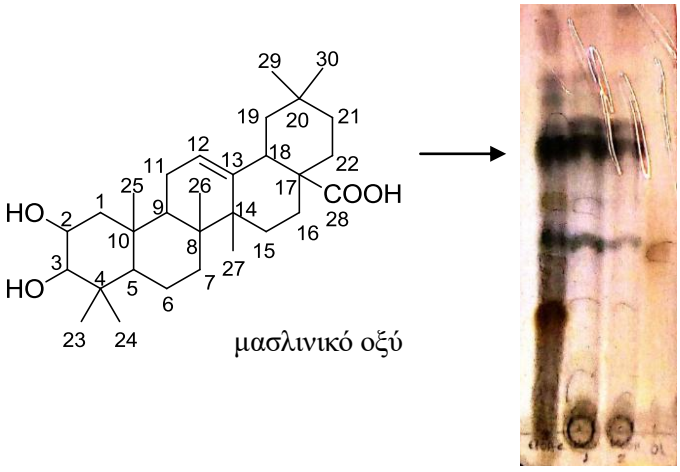
Πριν την προσθήκη του εκάστοτε διαλύτη, η ξηρή μάζα, σε κάθε περίπτωση, τοποθετήθηκε και πάλι σε αεροστεγή σακούλα και οι οκτώ σακούλες τοποθετήθηκαν για 20h στο φούρνο, στους 37^{o}C. Μετά από 20h, παρατηρήθηκαν υδρατμοί στο εσωτερικό κάθε σακούλας και κατόπιν, η κάθε Δοκιμή μεταφέρθηκε σε κωνική φιάλη, του 1L ή των 2L και τοποθετήθηκε στην κάθε μία ο αντίστοιχος διαλύτης, όπως περιγράφηκε παραπάνω. Οι κωνικές φιάλες καλύφθηκαν με αλουμινόχαρτο και τοποθετήθηκαν στο σκοτάδι, για 5 ημέρες.

Η Δοκιμή 7, μετά από 10-15 λεπτά από την προσθήκη του βραστού H_2O, διηθήθηκε και συμπυκνώθηκε υπό κενό, για την παραλαβή του ξηρού εκχυλίσματος και ακολούθησε έλεγχος με TLC[34] (*Εικόνα 39, Δοκιμή 7*), από την οποία συμπεραίνεται ότι δεν υπάρχει καθόλου ολεασίνη (2) στο δείγμα, ενώ παρατηρείται υψηλή συγκέντρωση ελαιοευρωπεΐνης (1), κάτι που είναι αναμενόμενο στα φύλλα της ελιάς.



Εικόνα 39. *TLC[34] χρωματογραφία Δοκιμής 7 (CH_2Cl_2/ MeOH 90:10), της κατεργασίας φύλλων ελιάς.*

Η Δοκιμή 8 τοποθετήθηκε στον incubator, στους 37°C και κατά την ανάδευση, στις 180 rpm, παρατηρήθηκε αφρισμός. Μετά το πέρας 26h ακολούθησε διήθηση του μίγματος και εκχύλιση 3 φορές, με όγκους 500 mL απεσταγμένου CH_2Cl_2, διαδοχικά με όγκους 600 mL απεσταγμένου EtOAc, για την παραλαβή, και σε αυτή την περίπτωση, κατόπιν ξήρανσης και συμπύκνωσης υπό κενό, των ξηρών υπολειμμάτων των οργανικών φάσεων CH_2Cl_2 και EtOAc (*Εικόνα 41* και *Εικόνα 40, Δοκιμή 8-οργ.1,* αντίστοιχα). Τα φύλλα από τη διήθηση της Δοκιμής 8 τοποθετήθηκαν σε κωνική φιάλη, όπου εκχυλίστηκαν 3 φορές, με όγκους 560 mL MeOH και χρήση υπερήχων. Κατόπιν εκ νέου διήθησης, προέκυψε, μετά από ξήρανση και συμπύκνωση υπό κενό, το ξηρό μεθανολικό υπόλειμμα (*Εικόνα 40, Δοκιμή 8-οργ.2*). Τα δείγματα των φάσεων CH_2Cl_2, EtOAc και MeOH συγχρωματογραφήθηκαν σε πλάκα TLC[34], με πρότυπο δείγμα ολεασίνης (2), ως δείγμα αναφοράς (*Εικόνες 40, 41*).



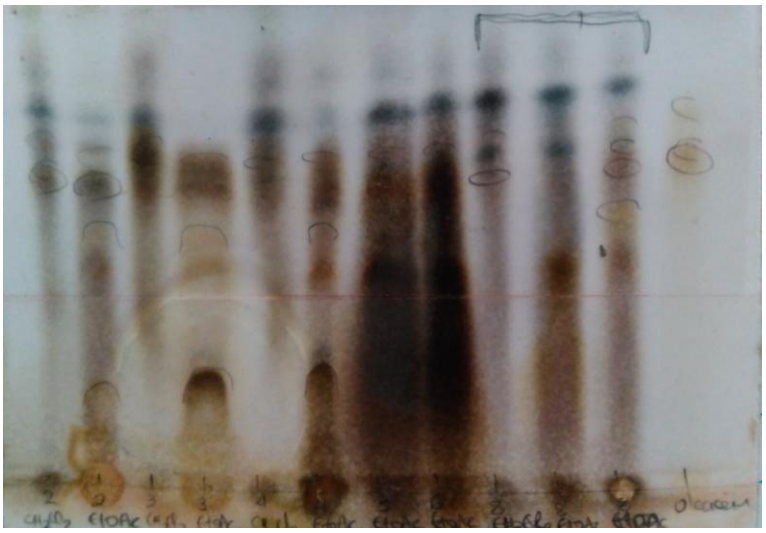
Εικόνα 40. *TLC[34] χρωματογραφία δειγμάτων Δοκιμής 8 (CH_2Cl_2/ MeOH 95:5), της κατεργασίας φύλλων ελιάς. Από αριστερά προς δεξιά: οργανική φάση EtOAc (οργ. 1), οργανική φάση MeOH (1η εκχύλιση), οργανική φάση MeOH (2η εκχύλιση) (συνένωση: οργ. 2), πρότυπο δείγμα ολεασίνης (2), ως μάρτυρας*

Από τη χρωματογραφία λεπτής στιβάδας TLC[34], παρατηρείται ότι μεταξύ των ξηρών υπολειμμάτων που προέκυψαν από τη δοκιμή 8, υπάρχει ίχνος ολεασίνης (2) μόνο στο διχλωρομεθανικό υπόλειμμα, κάτι που επιβεβαιώνεται και από τα χρωματογραφήματα HPLC[36] των δειγμάτων (*Εικόνες 24, 25*). Ωστόσο, στα δύο υπολείμματα EtOAc και MeOH της εν λόγω Δοκιμής, παρατηρείται, από την TLC[34] αλλά και από την HPLC[36], παρουσία μασλινικού οξέος (*Εικόνες 24, 40*).

Όσον αφορά στις υπόλοιπες δοκιμές:

Η Δοκιμή 1, που αποτελεί επανάληψη, σε μεγαλύτερη κλίμακα, της μεθόδου που περιγράφηκε στην προηγούμενη υποενότητα, καθώς και οι Δοκιμές 2, 3, 4, 5 και 6, μετά την πάροδο των 5 ημερών στο σκοτάδι, κατεργάστηκαν με τον τρόπο που περιγράφηκε στην προηγούμενη υποενότητα.

Έτσι, από κάθε Δοκιμή προέκυψαν δύο οργανικές φάσεις, CH_2Cl_2 και EtOAc, για τις οποίες πραγματοποιήθηκε TLC[34] και τα δείγματα υποβλήθηκαν σε HPLC[36] ανάλυση. Συγκεκριμένα για τις δοκιμές 5 και 6 ελέγχθηκαν με TLC[34] και HPLC[36], μόνο οι οργανικές φάσεις που προέκυψαν από εκχύλιση με EtOAc (*Εικόνα 41*).



Εικόνα 41. *TLC[34] χρωματογραφία (CH_2Cl_2/ MeOH 90:10) δειγμάτων των Δοκιμών 2, 3, 4, 5, 6 και 8 (οργανικών φάσεων CH_2Cl_2 και EtOAc), σε σύγκριση με πρότυπο δείγμα ολεασίνης (2).*

II.4.c *Απομόνωση ολεασίνης από καρπούς της Olea europaea*

Με βάση τη μελέτη των Roberto Lo Scalzo και Maria Luisa Scarpati [32], και στα πλαίσια της αξιοποίησης ελαιοπυρήνων της *Olea europaea*, ως πρώτης ύλης για απομόνωση ολεασίνης (2), πραγματοποιήθηκαν δύο δοκιμές, με δύο διαφορετικά δείγματα ελαιόκαρπων:

1. Φρέσκους ώριμους ελαιόκαρπους («μαυροελιές») από την Κρήτη
2. Ελαιόκαρπους («λιανοελιές» μαύρες) προχωρημένης ωρίμανσης, από την Κέρκυρα

II.4.c.1 *Απομόνωση ολεασίνης από φρέσκες, ώριμες μαυροελιές*

400 g ελιές τοποθετήθηκαν, κατόπιν αφαίρεσης των πυρήνων τους, σε πορσελάνινο γουδί, όπου προστέθηκαν 50 mL απεσταγμένου H_2O, προς διευκόλυνση της διεργασίας πολτοποίησης.

Αυτή διήρκησε αρκετή ώρα, ενώ στο τέλος της διεργασίας και αφού είχαν χρησιμοποιηθεί συνολικά περίπου 300 mL απεσταγμένου H_2O, παραλήφθηκε ο χυμός των ελαιόκαρπων και οι φλοιοί απομακρύνθηκαν με διήθηση υπό κενό, σε φίλτρο πορώδους 2.

Το προκύπτον διήθημα, μοιράστηκε σε 14 σωλήνες φυγοκέντρου, με καπάκι και ακολούθησε φυγοκέντρηση στις 4000 rpm, για διάστημα 15 λεπτών. Έπειτα, με πιπέτα Pasteur, αφαιρέθηκε από τον κάθε σωλήνα, η υπερκείμενη ελαιοστιβάδα και οι σωλήνες επανατοποθετήθηκαν στη φυγόκεντρο, στις 4250 rpm, ώστε να απομακρυνθεί, στη συνέχεια, επιπλέον ποσότητα λαδιού, με χρήση πιπέτας Pasteur.

Οι υδατικές φάσεις συνενώθηκαν και εκχυλίστηκαν 2 φορές, με όγκους 100 mL, n-Hex, για την απομάκρυνση των λιπαρών συστατικών, στη φάση του n-Hex. Ακολούθησε εκ νέου εκχύλιση της υδατικής φάσης, 1 φορά με 200 mL CH_2Cl_2 και έπειτα, 3 φορές, με 150 mL, κάθε φορά, διαιθυλαιθέρα (Et_2O), ξήρανση της προκύπτουσας οργανικής φάσης με Na_2SO_4 και συμπύκνωση αυτής, υπό κενό, για την παραλαβή του ξηρού εκχυλίσματος των ελαιόκαρπων, που αναλύθηκε με TLC[34], σε συγχρωματογράφηση με την υδατική φάση και το πρότυπο δείγμα ολεασίνης (2) (*Εικόνα 42)*.

Στους φλοιούς, μάζας 52 g, που προέκυψαν από την πολτοποίηση των ελαιόκαρπων προστέθηκαν 150 mL EtOH και το μίγμα αφέθηκε σε κλειστό δοχείο και στο σκοτάδι, για 2-3 ημέρες. Κατόπιν, ακολούθησε εξάτμιση της EtOH και το προκύπτον αιθανολικό εκχύλισμα αναλύθηκε με TLC[34] και HPLC[36] (*Εικόνες 26, 43*).



Εικόνα 42*. TLC[34] χρωματογραφία (CH_2Cl_2/ MeOH 95:5) των δειγμάτων υδατικής φάσης (αριστερά) και φάσης CH_2Cl_2 (κέντρο), από την κατεργασία ελαιόκαρπων από την Κρήτη, με πρότυπο δείγμα ολεασίνης (2) (δεξιά), ως μάρτυρα.*



Εικόνα 43. *TLC[34] χρωματογραφία (CH_2Cl_2/ MeOH 90:10) του αιθανολικού εκχυλίσματος των φλοιών, από την κατεργασία ελαιόκαρπων από την Κρήτη, με πρότυπο δείγμα ολεασίνης (2) (δεξιά), ως μάρτυρα.*

Από την TLC[34] της Εικόνας 42, συμπεραίνεται η παρουσία ολεασίνης (2), στην οργανική φάση CH_2Cl_2 που προέκυψε από την κατεργασία των ελαιόκαρπων από την Κρήτη. Το χρωματογραφικό προφίλ ωστόσο, του εν λόγω εκχυλίσματος παρουσιάζει μεγάλη πολυπλοκότητα.

Τέλος, στην περίπτωση του αιθανολικού εκχυλίσματος των φλοιών, δεν παρατηρείται παρουσία ολεασίνης (2) (*Εικόνα 43*), κάτι που συνάδει και με την HPLC[36] ανάλυση του εν λόγω δείγματος, το χρωματογράφημα της οποίας παρατέθηκε στην Εικόνα 26. Το χρωματογραφικό, μάλιστα, προφίλ υποδεικνύει την πιθανή παρουσία λακτονών, οι οποίες δεν απορροφούν στη UV ακτινοβολία, αλλά, κατόπιν ψεκασμού με διάλυμα θειϊκής βανιλλίνης, χρωματίζονται μπλε.

II.4.c.2 *Απομόνωση ολεασίνης από προχωρημένης ωρίμανσης, μαύρες «λιανοελιές»*

Τον Μάϊο του 2016, συλλέχθηκε από ελαιώνα της Κέρκυρας, δείγμα 122 g ελαιόκαρπων, σε αρκετά προχωρημένο στάδιο ωρίμανσης. Οι καρποί πολτοποιήθηκαν σε γουδί, μετά την αφαίρεση των πυρήνων τους και με την σταδιακή προσθήκη, συνολικά 250 mL H_2O, προς διευκόλυνση της διαδικασίας πολτοποίησης.

Ακολούθησε διήθηση υπό κενό, του προκύπτοντος μίγματος, προς απομάκρυνση των φλοιών και το διήθημα μοιράστηκε σε 7 σωλήνες φυγοκέντρου με καπάκι και φυγοκεντρήστηκε για 15 λεπτά, στις 4000 rpm. Μετά την απομάκρυνση με πιπέτα Pasteur της ελαιώδους στιβάδας, η αντίστοιχη υδατική, εκχυλίστηκε 5 φορές, με δόσεις των 150 mL n-Hex, προς απομάκρυνση των λιπαρών συστατικών και η προκύπτουσα υδατική φάση εκχυλίστηκε εκ νέου 3 φορές, με δόσεις των 150 mL Et_2O.

Τέλος, μετά από ξήρανση των συνενωμένων οργανικών φάσεων του Et_2O, με Na_2SO_4 και συμπύκνωση υπό κενό, το ξηρό εκχύλισμα που προέκυψε αναλύθηκε με TLC[34] και HPLC[36], με σκοπό τη μελέτη του προφίλ του. Το χρωματογράφημα TLC[34] για το εν λόγω εκχύλισμα, δίνεται στην Εικόνα 44.



Εικόνα 44. *TLC[34] χρωματογραφία των δειγμάτων υδατικής φάσης (αριστερά) και φάσης Et_2O (επισημασμένο), κατά την κατεργασία των ελαιόκαρπων από την περιοχή της Κέρκυρας, με μάρτυρα δείγμα ολεασίνης (2) (δεξιά).*

Από την TLC[34] που πραγματοποιήθηκε για το εν λόγω εκχύλισμα, συμπεραίνονται, σε πρώτη φάση, η αξιοσημείωτη πολυπλοκότητα του προφίλ του εκχυλίσματος και η μη παρουσία ολεασίνης (2) στο δείγμα, με την τελευταία να επιβεβαιώνεται και από το χρωματογράφημα HPLC[36] του δείγματος (*Εικόνα 27*). Η πληθώρα των συστατικών που περιέχονται σε αυτό, είναι πιθανότατα αποτέλεσμα των χημικών και ενζυμικών μεταβολών που λαμβάνουν χώρα στο εσωτερικό του ελαιοκάρπου, σε όλα τα στάδια της ωρίμανσης, μεταβολές που έχουν μελετηθεί από πλήθος επιστημονικών ομάδων [221], [222], [223], [224].

ΠΡΟΣΩΠΙΚΑ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

II.5 Απομόνωση και ταυτοποίηση φυσικών προϊόντων από υγρό ελαιουργικό απόβλητο («*Κατσίγαρος*») – OMWW

II.5.a *Εισαγωγή*

Το OMWW[8], είναι το κυριότερο παραπροϊόν της ελαιουργικής βιομηχανίας και περιέχει μια σειρά ενώσεων που σχετίζονται με την *Olea europaea* και τα συστατικά του ελαιολάδου. Το OMWW[8] αποτελεί σημαντικό περιβαλλοντικό πρόβλημα στις χώρες παραγωγής ελαιολάδου, αλλά είναι επίσης πολύτιμο υλικό για την απομόνωση ενώσεων υψηλής θρεπτικής αξίας [225].

Η σύγχρονη παραγωγή του εξαιρετικά παρθένου ελαιολάδου βασίζεται στην φυγοκέντρηση της πάστας της ελιάς, που προκύπτει από τη σύνθλιψη των δρυπών και στο σχηματισμό σταγονιδίων ελαίου. Η υδατική και ελαιώδης φάση διαχωρίζονται με τη χρήση τριφασικών και διφασικών τεχνικών διαχωρισμού. Η κύρια διαφορά μεταξύ αυτών των δύο μεθόδων έγκειται στην ποσότητα νερού που χρησιμοποιείται. Στον τριφασικό διαχωρισμό προστίθενται μεγάλες ποσότητες νερού, με αποτέλεσμα την παραγωγή υγρών ελαιουργικών αποβλήτων, ως μείζον παραπροϊόν. Από την άλλη πλευρά, σε διφασικούς μύλους, η ποσότητα του προστιθέμενου νερού είναι πολύ χαμηλή, με αποτέλεσμα να προκύπτουν κυρίως στερεά απόβλητα [226].

Πολλές μέθοδοι έχουν προταθεί για την διαχείριση των υγρών αποβλήτων ελαιοτριβείων, υπό το πρίσμα του περιορισμού της βλαβερής επίδρασης αυτών. Παραδείγματα τέτοιων μεθόδων, αποτελούν η επεξεργασία των αποβλήτων με βιολογικούς παράγοντες, για την παραγωγή βιοκαυσίμων [227] και η προηγμένη οξειδωτική επεξεργασία, για την απομάκρυνση του οργανικού περιεχομένου [228]. Μερικές από τις πιο φιλοδοξες, προτείνουν την ταυτόχρονη εκμετάλλευση αυτού του υλικού, για την ανάκτηση ενώσεων με προστιθέμενη αξία, όπως τα αντιοξειδωτικά συστατικά [229].

Οι Βουγογιαννοπούλου και συνεργάτες, στη μελέτη τους, σχετικά με την περιεκτικότητα, σε σεκοϊριδοειδή συστατικά, των υγρών ελαιουργικών αποβλήτων [225], περιέγραψαν την απομόνωση επτά συνολικά σεκοϊριδοειδών αναλόγων. Επιπλέον, το εύρος των απομονωμένων συστατικών ενίσχυσε την υπόθεση για τη βιομετατροπή των σεκοϊριδοειδών της ελιάς, κατά την παραγωγή υγρών ελαιουργικών αποβλήτων.

II.5.b *Περιγραφή Μεθόδου*

Το υγρό ελαιουργικό απόβλητο που επεξεργαστήκαμε και αναλύσαμε ποιοτικά στην παρούσα διατριβή προήλθε από τριφασικό ελαιοτριβείο του Ηρακλείου Κρήτης και είχε προηγουμένως υποβληθεί σε χρωματογραφία προσρόφησης, με ρητίνη τύπου XAD-4. Η υδρόφοβη ρητίνη XAD-4 είναι ένα μη πολικό (μη ιονικό) συμπολυμερές του πολυστυρενίου - διβινυλοβενζολίου (πορώδες 0,35 - 0,50 ml πόρου/ ml κόκκου ξ.β., ειδική επιφάνεια 700 m^2/ g επί ξηρού, μέση διάμετρος πόρων 50 Α επί ξηρού και μέσο μέγεθος σωματιδίων 40 mesh).

Ακολουθεί χρωματογραφία CPC[37], σε προζυγισμένη ποσότητα δείγματος του επεξεργασμένου, με την προαναφερθείσα μέθοδο, αποβλήτου («*Κατσίγαρος*»). Το δείγμα διαλυτοποιείται σε ορισμένο όγκο μίγματος στατικής και κινητής φάσης.

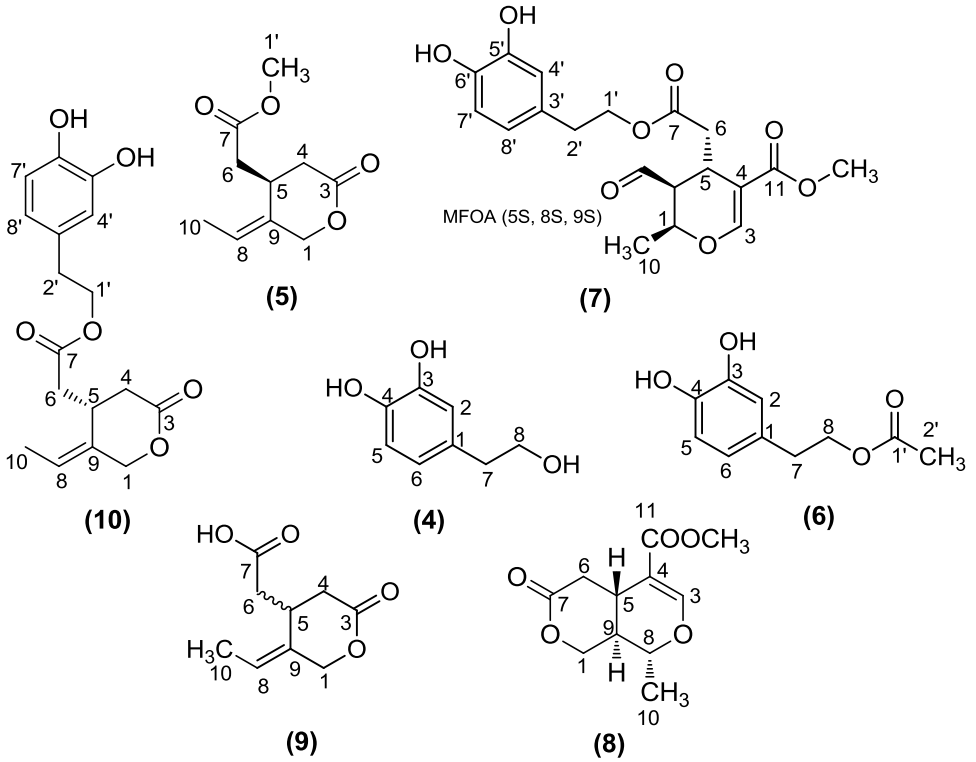
Στον εν λόγω διαχωρισμό, η στατική φάση αποτελείται από σύστημα H_2O/ MeOH 80:20 και η κινητή, από σύστημα c-Hex/ EtOAc. Κατά την ανάμιξη των δύο φάσεων στη διαχωριστική χοάνη, η πάνω φάση που προκύπτει αποτελεί την στατική φάση και η κάτω, την κινητή.

Μετά από την προετοιμασία της στήλης, με τον τρόπο που έχει περιγραφεί στην υποενότητα II.2.a.1, και κατόπιν έγχυσης του δείγματος, μέσω φίλτρου, ώστε αυτό να απαλλαχθεί από τυχόν στερεά σωματίδια, η ροή των διαλυτών ρυθμίζεται στα 17 mL/ min και οι στροφές στα 500 rpm.

Έπειτα, αρχίζει η συλλογή των κλασμάτων και κάθε 20 κλάσματα, η πορεία του διαχωρισμού ελέγχεται TLC[34] και όταν κρίνεται απαραίτητο, αυξάνεται η πολικότητα της κινητής φάσης, μέχρις ότου να εκλουσθούν όλα τα συστατικά που απαρτίζουν το προς ανάλυση δείγμα υγρού ελαιουργικού αποβλήτου.

Μετά το τέλος του διαχωρισμού, πραγματοποιείται μία συγκεντρωτική TLC[34] και τα επιμέρους κλάσματα καθαρίζονται περαιτέρω, με χρήση CC[46] ή prep-TLC[34], προς παραλαβή και ταυτοποίηση 8 φυσικών προϊόντων, 7 εκ των οποίων έχουν ήδη απομονωθεί από το υγρό ελαιουργικό απόβλητο, στη μελέτη των Βουγογιαννοπούλου και συνεργατών [225]. Το όγδοο προϊόν αποτελεί νέο φυσικό προϊόν, του οποίου η δομή η δομή δεν έχει ακόμη πλήρως ταυτοποιηθεί (*Παράρτημα Ι*).

Οι δομές των προϊόντων που απομονώθηκαν και ταυτοποίηθηκαν από το υγρό ελαιουργικό απόβλητο («*Κατσίγαρος*»), δίνονται στην Εικόνα 45.



Εικόνα 45. *Δομές απομονωμένων από τον υγρό ελαιουργικό απόβλητο, φυσικών προϊόντων.*

Για τα προϊόντα που απομονώθηκαν, μετρήθηκαν οι στροφικές ικανότητες $[\alpha]_D$, με σκοπό τον προσδιορισμό της απόλυτης στερεοχημείας, ενώ δείγματα αυτών εστάλησαν για βιολογικούς ελέγχους, ώστε να μελετηθεί η δράση τους ως COX[30] αναστολείς και η δραστικότητά τους έναντι της νόσου του Alzheimer.

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

II.6 Απομόνωση και ταυτοποίηση φυσικών προϊόντων από υγρό ελαιουργικό απόβλητο («*Κατσίγαρος*») – OMWW

II.6.a *Περιγραφή Μεθόδου*

Για τον χρωματογραφικό διαχωρισμό του ελαιουργικού αποβλήτου με CPC[37], σε πρώτη φάση, προετοιμάστηκαν τα συστήματα διαλυτών στατικής και κινητής φάσης, ως εξής:

Σε διαχωριστική χοάνη, τοποθετήθηκαν 2 L του συστήματος διαλυτών H_2O/ MeOH 80:20 και 1L c-Hex. Κατόπιν έντονης ανακίνησης, με σκοπό τον κορεσμό της στατικής φάσης στην κινητή και αντίστροφα, προέκυψαν η κάτω φάση (LOWER-στατική), όγκου 1970 mL και η πάνω φάση (UPPER-κινητή), όγκου ~1000 mL.

Δείγμα 5 g του επεξεργασμένου με χρωματογραφία προσρόφησης σε ρητίνη XAD-4, υγρού ελαιουργικού αποβλήτου, διαλύθηκαν αρχικά σε μίγμα 5 mL στατικής και 5 mL κινητής φάσης και κατόπιν διαλύσεως, προστέθηκαν ακόμα 5 mL από την κάθε φάση, ώστε ο τελικός όγκος του διαλυτοποιημένου δείγματος, να είναι 20 mL.

Για την προετοιμασία της στήλης, διοχετεύτηκαν αρχικά, μέσω αντλίας, περίπου 1.5 L της στατικής φάσης, με ροή 30 mL/ min και σε χαμηλές στροφές, περίπου 200 rpm και εν συνεχεία, οι στροφές προσαρμόστηκαν στις 500 rpm και διοχετεύτηκαν στη στήλη περίπου 600 mL της κινητής φάσης, με ροή 15 mL/ min.

Μετρήθηκε έπειτα ο νεκρός όγκος, 280 mL (στατική φάση) και το ποσοστό συγκράτησης της στατικής φάσης, sf % υπολογίστηκε ως 76%.

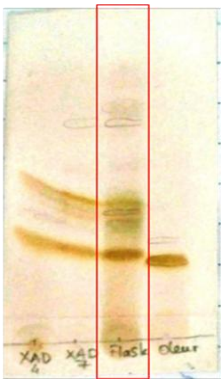
Στη συνέχεια, ακολούθησε η έγχυση του δείγματος, η ροή των διαλυτών προσαρμόστηκε στα 17 mL/ min και οι στροφές στις 500 rpm, ενώ ταυτόχρονα ξεκίνησε η συλλογή των κλασμάτων, σε ογκομετρικούς σωλήνες, ενώ ο όγκος κάθε κλάσματος ήταν περίπου 35 mL (2 λεπτά συλλογής, για κάθε κλάσμα).

Μετά τη συλλογή των πρώτων 25 κλασμάτων σε διαλύτη κινητής φάσης 100% c-Hex, πραγματοποιήθηκε TLC[34], σε σύστημα διαλυτών CH_2Cl_2/ MeOH 95:5 και έπειτα, η πολικότητα της κινητής φάσης αυξήθηκε κατά 10%, σε EtOAc. Επαναλήφθηκε η διαδικασία για τα επόμενα 20 κλάσματα και η πολικότητα αυξήθηκε εκ νέου, στα 80:20 c-Hex/ EtOAc. Ο διαχωρισμός συνεχίστηκε ομοίως, μέχρις ότου, μετά τη συλλογή συνολικά 220 κλασμάτων, η πολικότητα κατέληξε στο 20:80 c-Hex/ EtOAc, οπότε και παραλήφθηκαν τα πιο πολικά συστατικά του υγρού ελαιουργικού αποβλήτου, κυρίως σάκχαρα (TLC[34] σε σύστημα διαλυτών CH_2Cl_2/ MeOH 90:10.

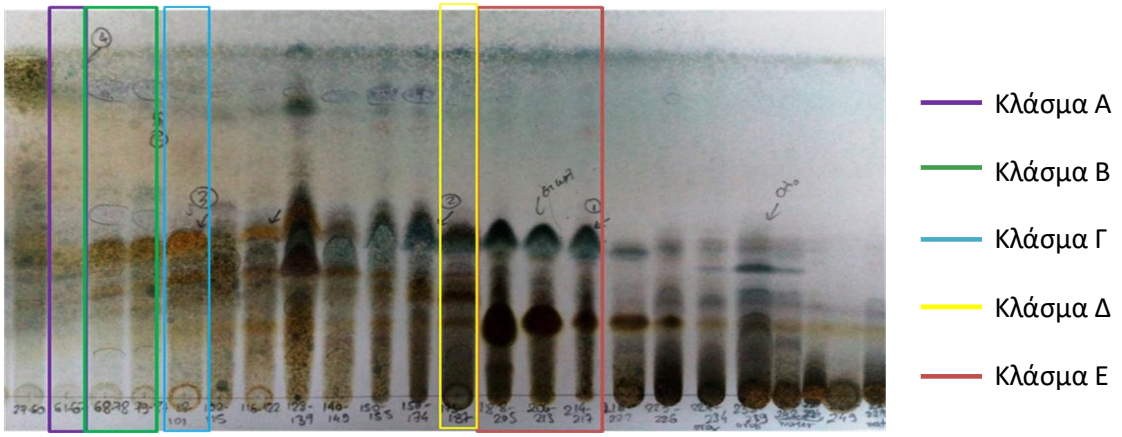
Ακολούθησε συνένωση των κλασμάτων με παρόμοιο χρωματογραφικό προφίλ και προέκυψαν 22 κλάσματα, τα οποία χρωματογραφήθηκαν εκ νέου, σε συγκεντρωτική πλάκα TLC[34]. Τα κλάσματα με ενδιαφέρον στο χρωματογραφικό προφίλ, καθαρίστηκαν περαιτέρω, με CC[46] και prep-TLC[34], απ' όπου απομονώθηκαν και ταυτοποιήθηκαν φασματοσκοπικά 8 φυσικά προϊόντα, 7 εκ των οποίων είχαν ήδη απομονωθεί από υγρό ελαιουργικό απόβλητο [225] και ένα νέο προϊόν, του οποίου η δομή δεν έχει ακόμη αποσαφηνιστεί πλήρως (*Παράρτημα Ι*).

Παρακάτω, παρατίθενται οι TLC[34] του αρχικού δείγματος ελαιουργικού αποβλήτου (*Εικόνα 46*), καθώς και η συγκεντρωτική πλάκα TLC[34] των απομονωθέντων, από τη CPC[37], κλασμάτων (*Εικόνα 47*). Από την Εικόνα 46 της TLC[34] πλάκας, υποδεικνύεται το λακτονικό προφίλ του ελαιουργικού αποβλήτου, καθώς παρουσιάζονται πλήθος συστατικών που δεν απορροφούν στη

UV ακτινοβολία, αλλά μετά τον ψεκασμό με διάλυμα θειϊκής βανιλίνης, χρωματίζονται μπλε, φαινόμενο χαρακτηριστικό των λακτονών.

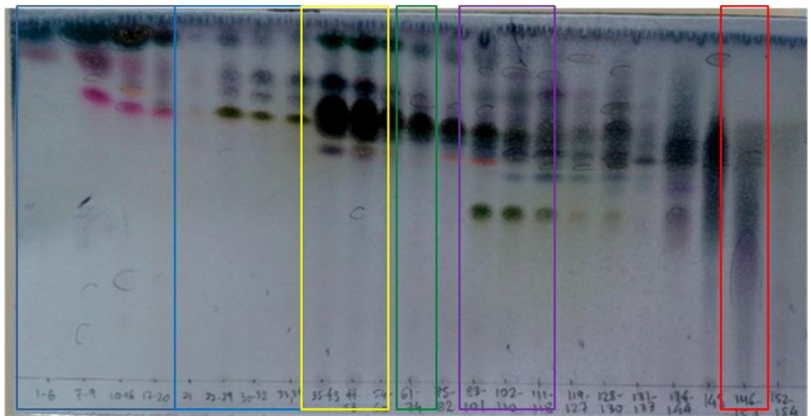


Εικόνα 46. *TLC[34] χρωματογραφία (CH_2Cl_2/ MeOH 90:10) του δείγματος υγρού ελαιουργικού αποβλήτου, που χρησιμοποιήθηκε ως πρώτη ύλη για τον CPC[37] διαχωρισμό.*



Εικόνα 47. *Συγκεντρωτική TLC[34] (CH_2Cl_2/ MeOH 90:10) των συνενωμένων κλασμάτων που προέκυψαν από τον CPC[37] διαχωρισμό του υγρού ελαιουργικού αποβλήτου. Τα επισημασμένα κλάσματα είναι αυτά που, λόγω του ενδιαφέροντος χρωματογραφικού προφίλ, επεξεργάστηκαν περαιτέρω με CC[46] και παρασκευαστική χρωματογραφία TLC[34] (prep-TLC[34])*

Από το κλάσμα Β (*Εικόνα 47*), κατόπιν χρωματογραφίας στήλης, προέκυψε νέα συνένωση κλασμάτων, η TLC[34] των οποίων δίνεται στην Εικόνα 48.



Εικόνα 48. *Συγκεντρωτική TLC[34] χρωματογραφία (CH_2Cl_2/ MeOH 80:20) κλασμάτων που απομονώθηκαν, κατόπιν χρωματογραφίας στήλης επιλεγμένου κλάσματος του CPC[37] διαχωρισμού.*

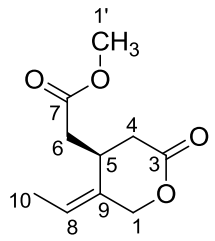
Τα προϊόντα που απομονώθηκαν από τους παραπάνω χρωματογραφικούς διαχωρισμούς, με χρωματογραφία στήλης και παρασκευαστική χρωματογραφία λεπτής στιβάδας, αναλύονται φασματοσκοπικά στην επόμενη υποενότητα.

II.6.b *Ταυτοποίηση φυσικών προϊόντων που απομονώθηκαν από υγρό ελαιουργικό απόβλητο*

II.6.b.1 *Προϊόντα ήδη γνωστά από προηγούμενη μελέτη*

*Η αρίθμηση στην ονοματολογία των απομονωμένων, από τον Κατσίγαρο, μορίων, αποτελεί την κατά IUPAC αποδεκτή αρίθμηση και διαφέρει, στις περισσότερες περιπτώσεις, από αυτή των δομών, όπου χρησιμοποιείται η απλουστευμένη αρίθμηση, χάριν ευκολίας.

ꕥ (*S*,*E*)-μεθυλο 2-(5-αιθυλιδενο-2-οξοτετραϋδρο-*2H*-πυραν-4-υλ) μεθυλεστέρας (5)



Μοριακός τύπος: $C_{10}H_{14}O_4$
Μοριακό βάρος: 198.2158 g/ mol
Χρώμα: Λευκό
Μορφή: Άμορφο

Από το κλάσμα **A** του CPC[37] διαχωρισμού του υγρού ελαιουργικού αποβλήτου, συνολικής μάζας 0.070 g, κατόπιν χρωματογραφίας στήλης, απομονώθηκαν 0.0288 g (απόδοση: 41.2 %) της λακτόνης (5).

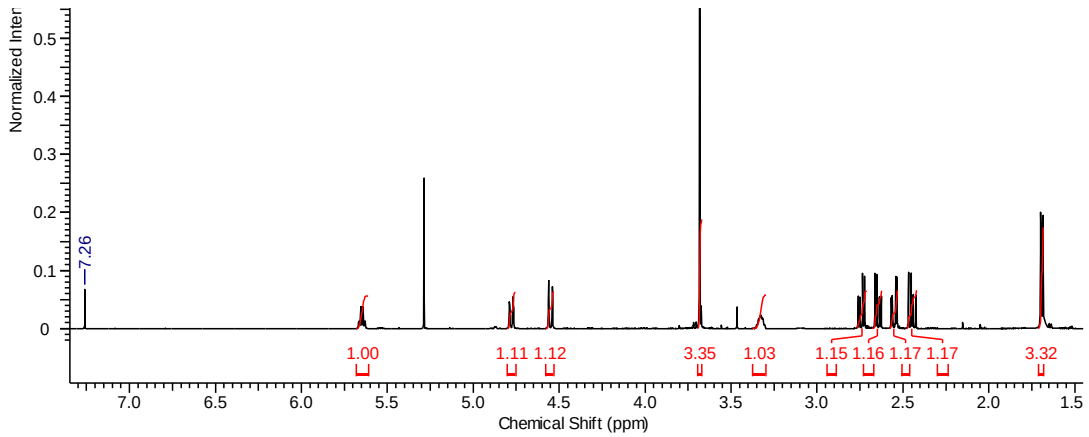
^{1}H NMR (600MHz, $CDCl_3$): δ 5.65 (q, *J*= 6.8 Hz, 1H, H_8), 4.78 (d, *J*= 12.7 Hz, 1H, H_{1a}), 4.55 (d, *J*= 12.7 Hz, 1H, H_{1b}), 3.68 (s, 3H, CH_3), 3.33 (m, 1H, H_5), 2.75 (dd, *J*= 15.6 Hz/ 6.7 Hz, 1H, H_{4a}), 2.65 (dd, *J*= 15.6 Hz/ 6.7 Hz, 1H, H_{4b}), 2.55 (dd, *J*= 16.6 Hz/ 4.4 Hz, 1H, H_{6a}), 2.45 (dd, *J*= 16 Hz/ 10 Hz, 1H, H_{6b}), 1.69 (d, *J*= 6.9 Hz, 3H, H_{10})

^{13}C NMR (600 MHz, $CDCl_3$): δ 171.90 (CO, C_3), 171.51 (CO, C_7), 132.17 (C, C_9), 125.01 (CH, C_8), 71.89 (CH_2, C_1), 51.67 (CH_3, $C_{1'}$), 38.22 (CH_2, C_6), 35.01 (CH_2, C_4), 29.43 (CH, C_5), 13.50 (CH_3, C_{10})

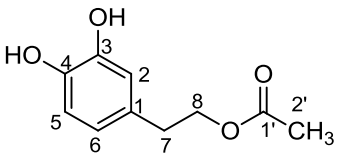
HRMS (ESI+), m/z calcd: 221.0790, found: 221.0782; [M+Na^+]

$[\alpha]_D^{20}$ = + 4.71 (c= 0.763, $CHCl_3$)

- **^{1}H NMR**



ꕥ 3,4-διυδροξυ φαινυλοξικός αιθυλεστέρας (6)

	Μοριακός τύπος: $C_{10}H_{12}O_4$ Μοριακό βάρος: 196.1999 g/mol Χρώμα: Υποκίτρινο Μορφή: Στερεό

Από το κλάσμα **B** του CPC[37] διαχωρισμού του υγρού ελαιουργικού αποβλήτου, συνολικής μάζας 0.1885 g, κατόπιν χρωματογραφίας στήλης και παρασκευαστικής TLC[34], απομονώθηκαν 0.002 g (απόδοση: 1 %) του εστέρα (6).

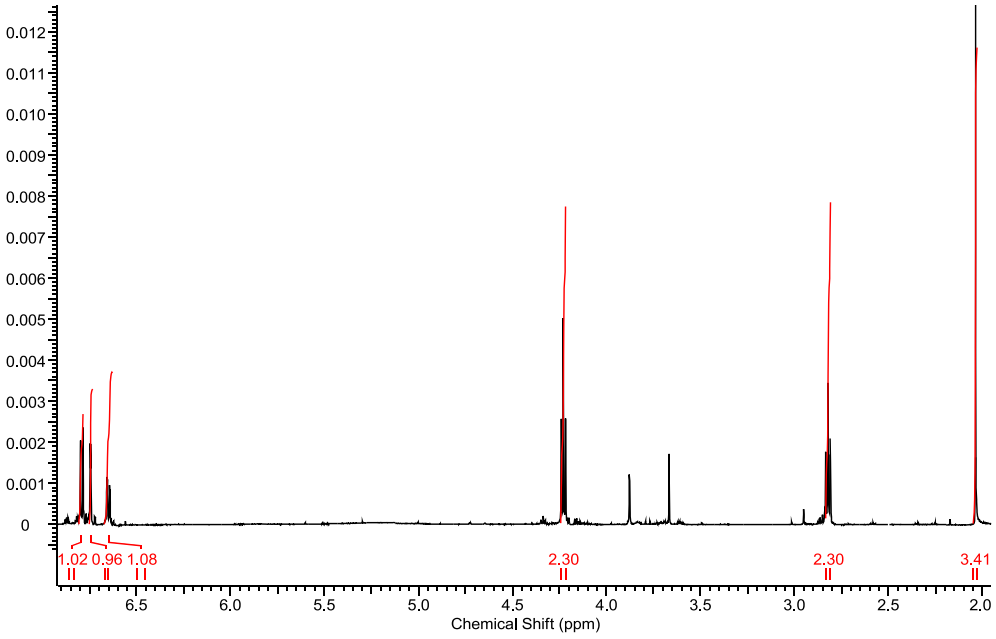
^{1}H NMR (600MHz, $CDCl_3$): δ 6.79 (d, *J*= 8.0 Hz, 1H, H_5), 6.74 (d, *J*= 1.9 Hz, 1H, H_2), 6.65 (dd, *J*= 8.0/ 1.9 Hz, 1H, H_6), 4.23 (t, *J*= 7.2 Hz, 2H, H_8), 2.82 (t, *J*= 7.0 Hz, 2H, H_7), 2.04 (s, 3H, $H_{2'}$)

^{13}C NMR (600 MHz, $CDCl_3$): δ 171.03 (CO, $C_{1'}$), 143.02 (C-OH, C), 142.15 (C-OH, C), 130.88 (C, C_1), 120.99 (CH, C_6), 115.52 (CH, C_2), 114.84 (CH, C_5), 64.61 (CH_2, C_8), 34.14 (CH_2, C_7), 20.59 (CH_3, $C_{2''}$)

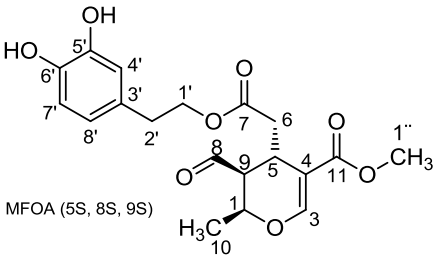
HRMS (ESI+), m/z calcd: 219.0633, found: 219.0629; [M+Na^+]

$[\alpha]_D^{20}$ = -

❖ **^{1}H NMR**



ꕥ MFOA-μονοαλδεϋδική μορφή του άγλυκου της ελαιοευρωπεΐνης (7)



MFOA (5S, 8S, 9S)

Μοριακός τύπος: $C_{19}H_{22}O_8$
Μοριακό βάρος: 378.1315 g/mol
Χρώμα: Λευκό
Μορφή: Στερεό

Από το κλάσμα **B** του CPC[37] διαχωρισμού του υγρού ελαιουργικού αποβλήτου, συνολικής μάζας 0.1885 g, κατόπιν χρωματογραφίας στήλης και παρασκευαστικής TLC[34], απομονώθηκαν 0.0154 g (απόδοση: 8.2 %) του (7).

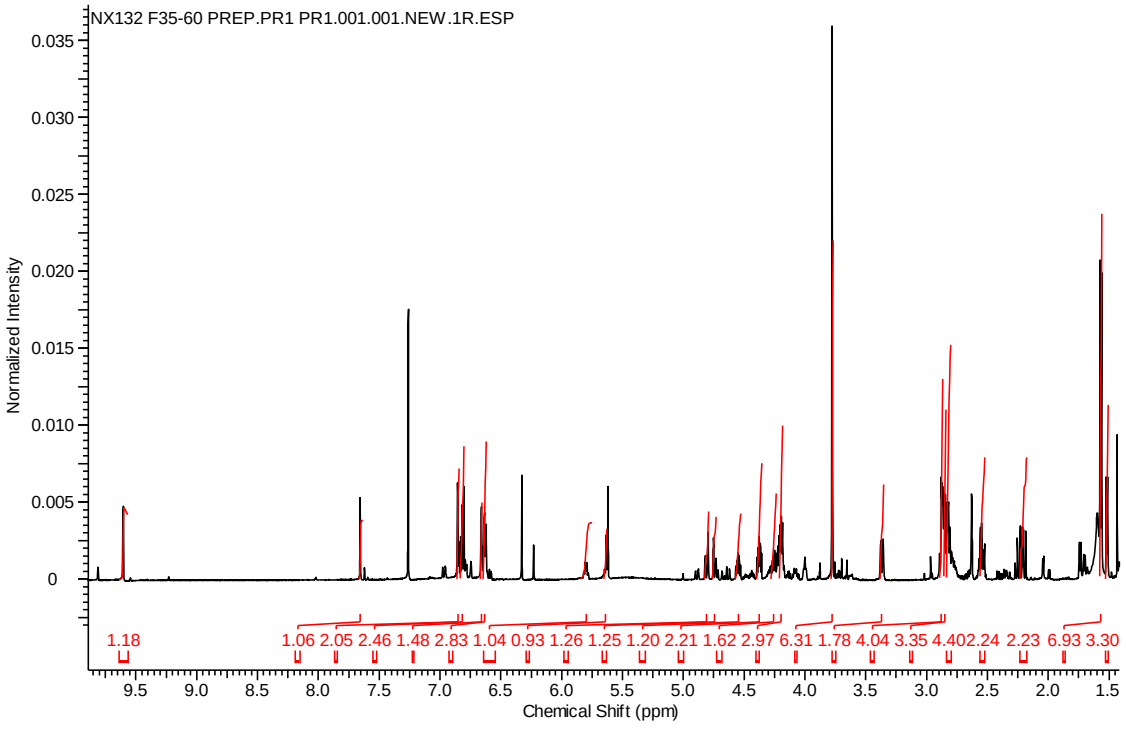
^{1}H NMR (600MHz, $CDCl_3$): δ 9.60 (s, 1H, H_8), 7.65 (s, 1H, H_3), 6.85 (d, *J*= 1.5 Hz , 1H, $H_{4'}$,), 6.81 (d, *J*= 8.0 Hz, 1H, $H_{7'}$), 6.66 (d, *J*= 7.8/ 1.3 Hz, 1H, $H_{8'}$), 5.83 (q, *J*= 8.0 Hz, 1H, $H_{7'}$), 4.55 (m, 1H, $H_{1'a}$), 4.37 (m, 1H, $H_{1'b}$), 4.26-4.19 (m, 1H, H_1), 3.77 (s, 3H, $H_{1''}$), 2.86 (m, 2H, $H_{2'}$), 2.82 (m, 1H, H_5), 2.54 (dd, *J*= 15.0/ 6.7 Hz, 1H, H_{6a}), 2.21 (dd, *J*= 15.0/ 11.0 Hz, 1H, H_{6b}), 1.57 (d, 3H, H_{10})

^{13}C NMR (600 MHz, $CDCl_3$): δ 198.7 (CO, C_8), 171.8 (CO, C_7), 167.2 (CO, C_{11}), 154.7 (CH, C_3), 144.8 (C-OH, $C_{5'}$), 143.9 (C-OH, $C_{6'}$), 131.0 (C, $C_{3'}$), 121.8 (CH, $C_{8'}$), 116.0 (CH, $C_{4'}$), 115.1 (CH, $C_{7'}$), 105.7 (C, C_4), 73.5 (CH, C_1), 64.9 (CH_2, $C_{1'}$), 52.0 (CH_3, $C_{1''}$), 50.6 (CH, C_9), 37.7 (CH_2, C_6), 34.5 (CH_2, $C_{2''}$), 28.0 (CH, C_5), 18.2 (CH_3, C_{10})

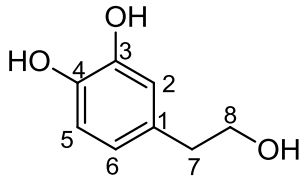
HRMS (ESI-), m/z calcd: 377.1236, found: 377.1233; [M-H$^+$]

$[\alpha]_D^{20}$ = - 12.17 (c= 0.052, $CHCl_3$)

❖ **^{1}H NMR**



ꕥ 3,4-διϋδροξυ-φαινυλο-αιθανόλη (υδροξυτυροσόλη) (4)

	Μοριακός τύπος: $C_8H_{10}O_3$ Μοριακό βάρος: 154.0630 g/mol Χρώμα: Υποκίτρινο Μορφή: Ελαιώδες

Από το κλάσμα **B** του CPC[37] διαχωρισμού του υγρού ελαιουργικού αποβλήτου, συνολικής μάζας 0.1885 g, κατόπιν χρωματογραφίας στήλης και παρασκευαστικής TLC[34], απομονώθηκαν 0.0042 g (απόδοση: 2.2 %) του (4).

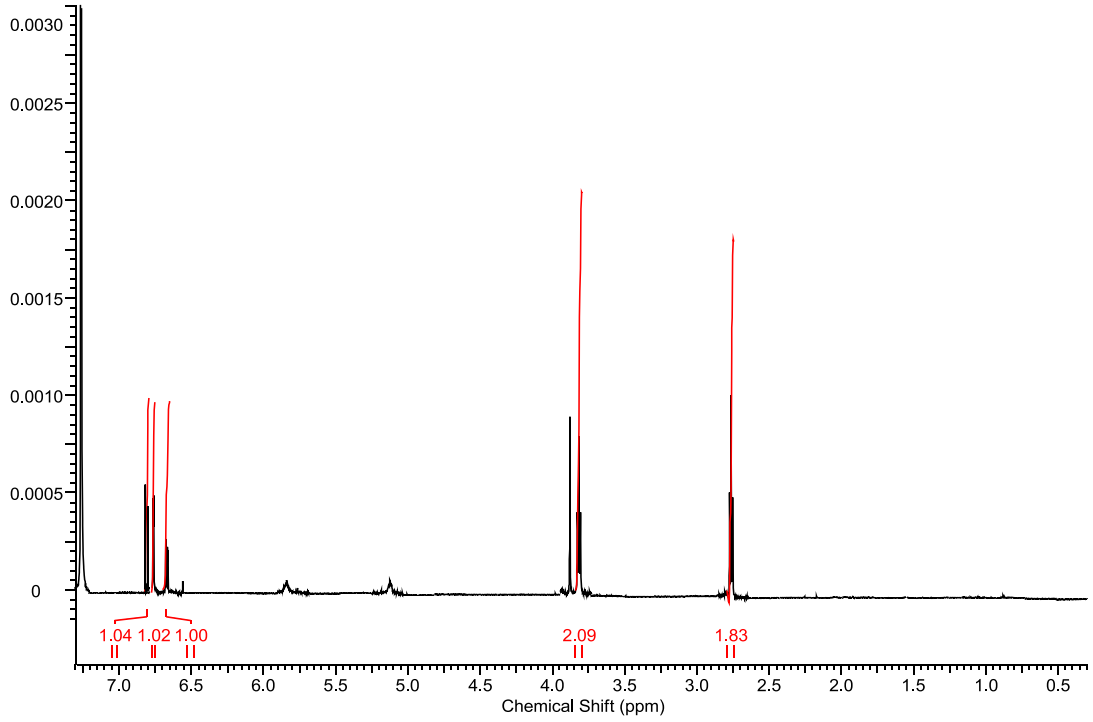
^{1}H NMR (600MHz, $CDCl_3$): δ 6.81 (d, J= 8.2 Hz, 1H, H_5), 6.76 (d, J= 1.9 Hz, 1H, H_2), 6.67 (dd, J= 7.8/ 1.9 Hz, 1H, H_6), 5.30 (s, OH-4), 5.00 (s, OH-3), 3.88 (s, OH-8), 3.82 (t, J= 6.5 Hz, 2H, H_8), 2.76 (t, J= 6.7 Hz, 2H, H_7)

^{13}C NMR (600 MHz, $CDCl_3$): δ 151.33 (C, C_3), 149.71 (C, C_4), 131.27 (C, C_1), 121.40 (CH, C_6), 115.93 (CH, C_2), 115.38 (CH, C_5), 63.48 (CH_2, C_8), 38.32 (CH_2, C_7)

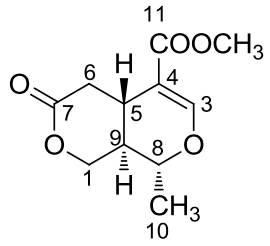
HRMS (ESI-), m/z calcd: 153.0552, found: 153.0560; [M-H^+]

$[\alpha]_D^{20}$= -

❖ **^{1}H NMR**



ᘐ (4aS,8R, 8aR)-8-μεθυλο-3-οξο-1*H*,3*H*-πυρανο[3,4-c]πυρανο-4,4a,8,8a-τετραϋδρο-5-καρβοξυλικός εστέρας (8)



Μοριακός τύπος: $C_{11}H_{14}O_5$

Μοριακό βάρος: 226.2259 g/mol

Χρώμα: Λευκό

Μορφή: Άμορφο στερεό

Από το κλάσμα **B** του CPC[37] διαχωρισμού του υγρού ελαιουργικού αποβλήτου, συνολικής μάζας 0.1885 g, κατόπιν χρωματογραφίας στήλης και παρασκευαστικής TLC[34], απομονώθηκαν 0.0035 g (απόδοση: 1.8 %) της δικυκλικής λακτόνης (8).

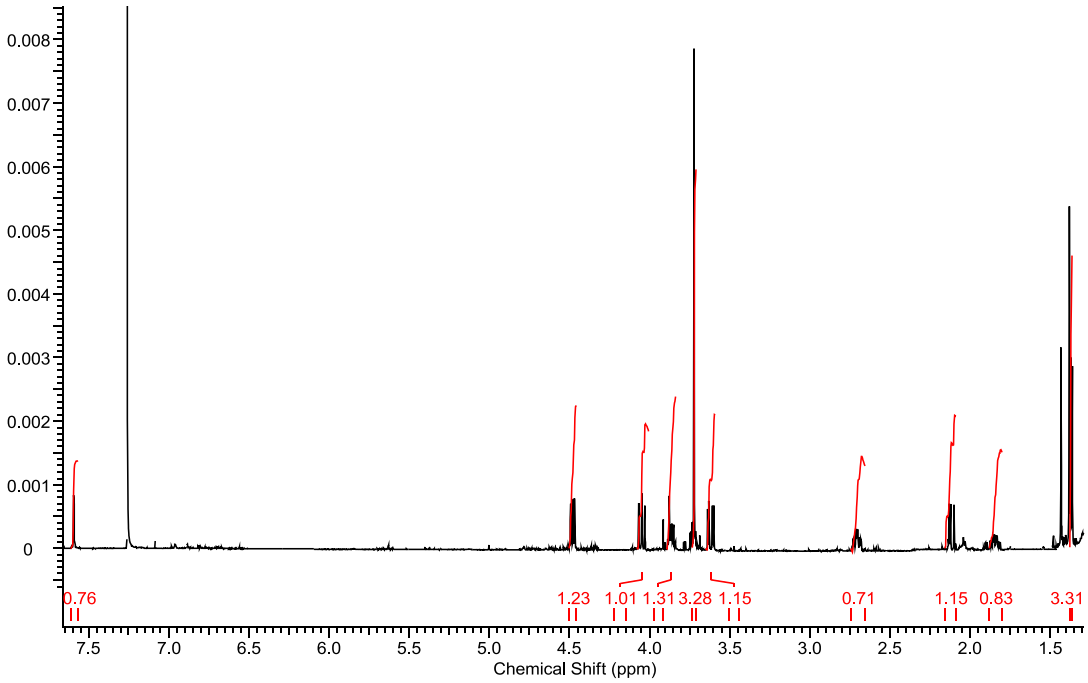
^{1}H NMR (600MHz, $CDCl_3$): δ 7.60 (d, *J*= 1.3 Hz, 1H, H_3), 4.48 (dd, *J*= 10.6/ 5.0 Hz, 1H, H_{1b}), 4.05 (d, *J*= 11.6/ 10.8 Hz, 1H, H_{1a}), 3.86 (*J*= 10.09/ 6.3 Hz, 1H, H_8), 3.72 (s, 3H, OCH_3), 3.62 (dd, 18.5/ 4.6 Hz, 1H, H_{6a}), 2.70 (m, 1H, H_5), 2.13 (dd, *J*= 18.2/ 12.9 Hz, 1H, H_{6b}), 1.84 (m, 1H, H_9), 1.37 (d, *J*= 6.0 Hz, 3H, H_{10})

^{13}C NMR (600 MHz, $CDCl_3$): δ 169.11 (CO, C_7), 166.45 (CO, C_{11}), 156.52 (CH, C_3), 73.01 (CH, C_8), 70.20 (CH_2, C_1), 50.69 (CH_3, OCH_3), 39.79 (CH, C_9), 35.71 (CH_2, C_6), 31.16 (CH, C_5). 29.73 (CH_3, C_{10})

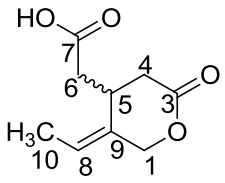
HRMS (ESI-), m/z calcd: 227.0914, found: 227.0909; $[M\text{-}H^+]$

$[\alpha]_D^{20}$= + 5.33 (c= 0.281, $CHCl_3$)

❖ **^{1}H NMR**



ᘐ (*E*) -2- (5-αιθυλιδενο-2-οξοτετραϋδρο-*2H*-πυραν-4-υλ) οξικό οξύ (9)

	Μοριακός τύπος: $C_9H_{12}O_4$ Μοριακό βάρος: 184.1892 g/mol Χρώμα: Άσπρο Μορφή: Άμορφο στερεό

Από το κλάσμα **B** του CPC[37] διαχωρισμού του υγρού ελαιουργικού αποβλήτου, συνολικής μάζας 0.1885 g, απομονώθηκαν, κατόπιν χρωματογραφίας στήλης και παρασκευαστικής TLC[34], 0.0061 g (απόδοση: 3.2 %) της λακτόνης (9), σε αναλογία ~50/ 50 των δύο ισομερών (5S, 5R).

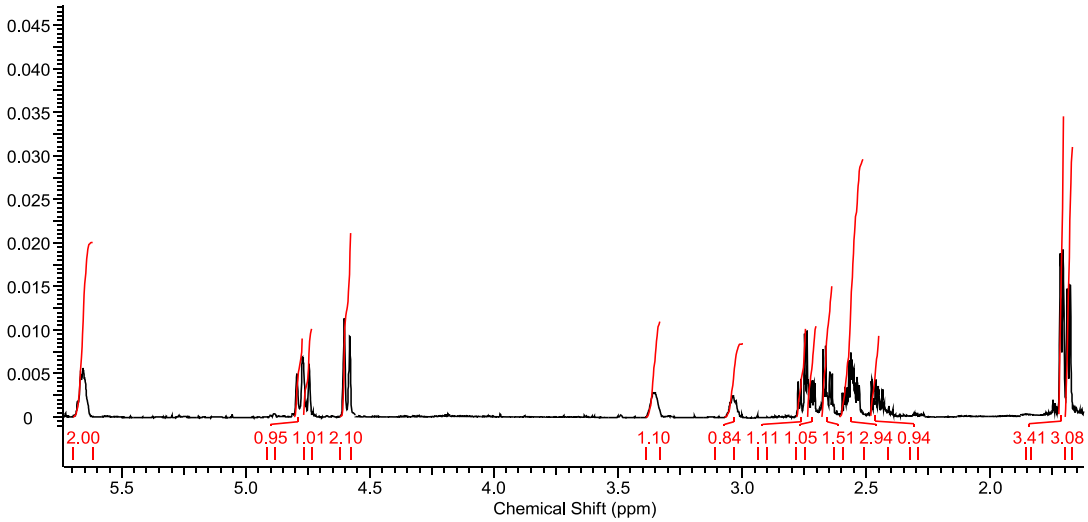
^{1}H NMR (600MHz, $CDCl_3$): δ 5.66 (qdd, *J* = 7.0/ 1.3/ 1.3 Hz, 2H, H_8, H_8), 4.78 (d, *J*= 13.5 Hz, 1H, H_{1a}), 4.76 (d, *J*= 12.7 Hz, 1H, H_{1a}), 4.59 (d, *J*= 12.8 Hz, 2H, H_{1b}, H_{1b}), 3.35 (m, 1H, H_5), 3.04 (m, 1H, H_5), 2.76 (dd, *J*= 15.9/ 6.3 Hz, 1H, H_{4a}), 2.73 (dd, *J*= 15.9/ 7.2 Hz, 2H, H_{4b}, H_{4b}), 2.65 (dd, *J*= 16.0/ 6.4 Hz, 1H, H_{4a}), 2.57 (1H, dd, *J*= 16.3/ 3.4 Hz, H_{6a}), 2.55 (1H, dd, *J*= 16.0/ 3.1 Hz, H_{6a}), 2.46 (dd, *J*= 16.3/ 9.6 Hz, 1H, H_{6b}), 2.45 (dd, *J*= 16.2/ 9.5 Hz, 1H, H_{6b}), 1.71 (d, *J*= 6.7 Hz, 3H, H_{10}), 1.68 (d, *J*= 7.1 Hz, 3H, H_{10})

^{13}C NMR (600 MHz, $CDCl_3$): δ 172.05 (CO, C_3), 171.81 (CO, C_3), 170.91 (2xCO, C_7, C_7), 125.49 (2xCH, C_8, C_8), 72.63 (2xCH_2, C_1, C_1), 39.19 (CH_2, C_6), 38.94 (CH_2, C_6), 35.82 (CH_2, C_4), 35.51 (CH_2, C_4), 30.48 (CH, C_5), 30.11 (CH, C_5), 14.18 (CH_3, C_{10}), 14.05 (CH_3, C_{10})

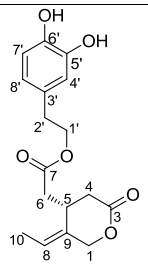
HRMS (ESI-), m/z calcd: 185.0808, found: 185.0805; [M-H^+]

$[\alpha]_D^{20}$ = 0 (ρακεμικό μίγμα)

❖ **^{1}H NMR**



ꕥ Σεκοϊριδοειδής λακτόνη συζευγμένη με υδροξυτυροσόλη
(R, E)-3,4-διύδροξυ-φαιναίθυλο 2-(5-αιθυλίδενο-2-οξοτετράυδρο-*2H*-πυραν-4-υλ) οξικός εστέρας (10)



Μοριακός τύπος: $C_{17}H_{20}O_6$
Μοριακό βάρος: 320.1260 g/mol
Χρώμα: Άχρωμο
Μορφή: Άμορφο στερεό

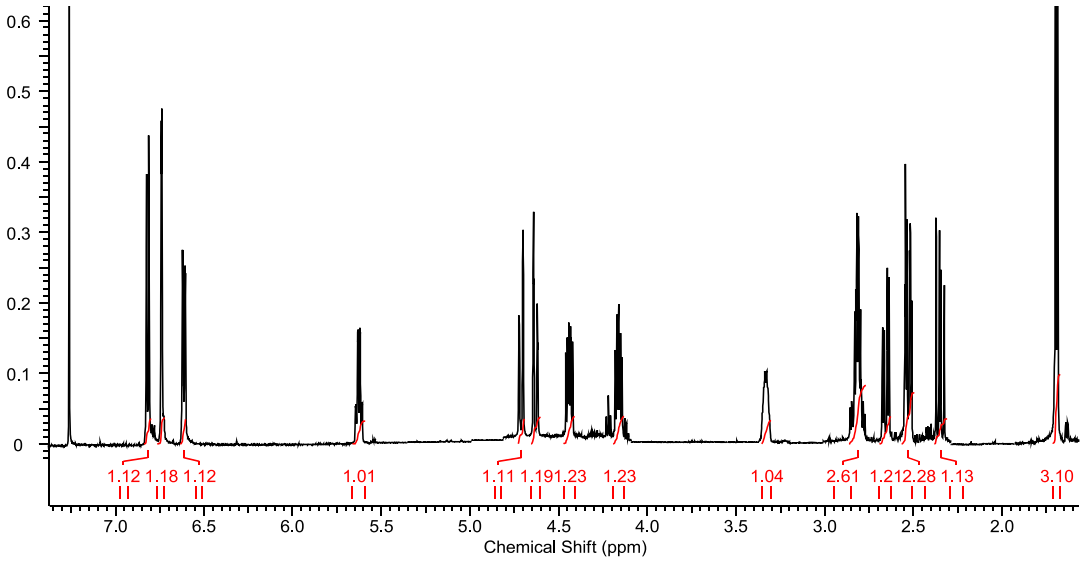
Από το κλάσμα **Γ** του CPC[37] διαχωρισμού του υγρού ελαιουργικού αποβλήτου, συνολικής μάζας 0.1089 g, κατόπιν χρωματογραφίας στήλης και παρασκευαστικής TLC[34], απομονώθηκαν 0.011 g (απόδοση: 10.2 %) της λακτόνης (10).

^{1}H NMR (600MHz, $CDCl_3$): δ 6.82 (d, *J*= 8.0 Hz, 1H, $H_{7'}$), 6.74 (d, *J*= 1.7 Hz, 1H, $H_{4'}$), 6.62 (dd, *J*= 8.0/ 1.7 Hz, 1H, $H_{8'}$), 5.63 (q, *J*= 7.0 Hz, 1H, H_8), 4.72 (d, *J*= 13.2 Hz, 1H, H_{1a}), 4.65 (d, *J*= 13.4 Hz, 1H, H_{1b}), 4.47 (ddd, *J*= 12.2/ 7.8/ 4.7 Hz, 1H, $H_{1'a}$), 4.15 (ddd, *J*= 11.3/ 6.5/ 5.2 Hz, 1H, $H_{1'b}$), 3.35 (m, 1H, H_5), 2.82 (2xt, *J*= 6.4 Hz, 1H, $H_{2'}$), 2.66 (dd, *J*= 15.8/ 6.4 Hz, 1H, H_{4a}), 2.53 (dd, *J*= 16.2/ 3.4 Hz, 1H, H_{6a}), 2.52 (dd, *J*= 15.9/ 5.2 Hz, 1H, H_{4b}), 2.34 (dd, *J*= 16.0/ 11.2 Hz, 1H, H_{6b}), 1.70 (d, *J*= 7.0 Hz, 3H, H_{10})

^{13}C NMR (600 MHz, $CDCl_3$): δ 174.16 (CO, C_3), 170.76 (CO, C_7), 143.43 (C-OH, $C_{5'}$), 143.17 (C-OH, $C_{6'}$), 131.76 (C, C_9), 130.46 (C, $C_{3'}$), 124.59 (CH, C_8), 121.26 (CH, $C_{7'}$), 116.13 (CH, $C_{4'}$), 115.33 (CH, $C_{8'}$), 72.23 (CH_2, C_1), 65.65 (CH_2, $C_{1'}$), 38.58 (CH_2, C_6), 34.69 (CH_2, C_4), 34.33 (CH_2, $C_{2'}$), 29.48 (CH, C_5), 13.34 (CH_3, C_{10})

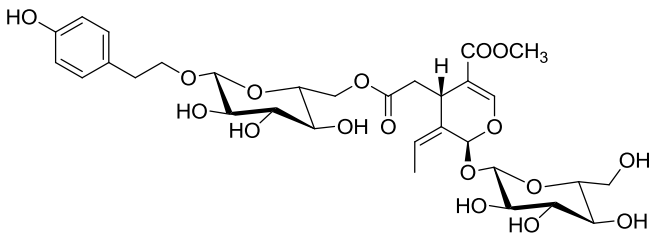
HRMS (ESI-), m/z calcd: 321.1338, found: 321.1328; [M-H$^+$]
$[\alpha]_D^{20}$ = -17.54 (c= 0.057, $CHCl_3$)

❖ **^{1}H NMR**



ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΤΡΙΤΟ: ΙΙΙ. ΣΥΝΘΕΣΗ ΦΥΣΙΚΩΝ ΠΡΟΙΟΝΤΩΝ

ΠΡΟΣΩΠΙΚΑ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ


HO
O
O
HO
HO
OH
O
O
COOCH3
H
O
O
O
HO
HO
OH
OH

III.1. *Απόπειρα ολικής σύνθεσης του φυσικού προϊόντος νουζενίδη*

III.1.a. *Εισαγωγή*

Η μελέτη των Servili και συνεργατών, απέδειξε, για πρώτη φορά την παρουσία του σεκοϊριδοειδούς νουζενίδη (11), ως το βασικό συστατικό του πυρήνα του ελαιόκαρπου, όλων των ποικιλιών που αναλύθηκαν και σε όλα τα στάδια ωρίμανσης [33]. Ο σεκοϊριδοειδής γλυκοσίδης αυτός, γνωστός ως "nuzhenide" είχε προηγουμένως βρεθεί στα φρούτα του *Ligustrum lucidum* [230], τους πυρήνες του *Fraxinus Americana* [231], και στο *Syringa vulgaris* και υπήρχε η υπόθεση για την παρουσία του στον πυρήνα της ελιάς [13]. Η πρώτη απομόνωση από τον πυρήνα και η πρώτη πλήρης ταυτοποίηση, με φασματοσκοπία NMR[39], έγινε από τους Servili και συνεργάτες [33].

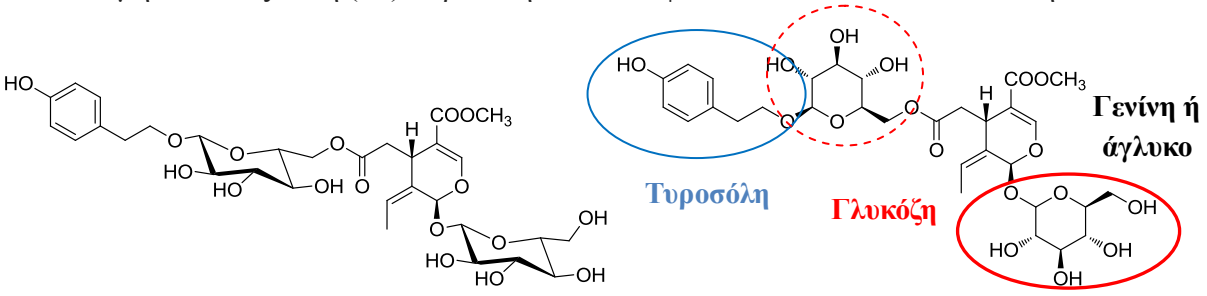
Στην μελέτη των Κανάκη και συνεργατών [18], ο νουζενίδης (11), μαζί με τον γλυκοσίδη του και τη μονοαλδεϋδική μορφή του άγλυκου της ελαιοευρωπεΐνης (7), έδειξαν να είναι τα κύρια συστατικά των εκχυλισμένων σπόρων. Επιπλέον, ο νουζενίδης (11) δεν ανιχνεύτηκε στην σάρκα του καρπού, ούτε στο ελαιόλαδο, αλλά βρέθηκε στην πάστα της ελιάς σε μικρότερες ποσότητες απ' ότι στον ελαιοπυρήνα. Θα μπορούσε να θεωρηθεί ότι η αποδόμηση του νουζενίδη (11), κατά την διεργασία της μάλαξης, συμβάλλει στην συσσώρευση της υδροξυτυροσόλης (4) στην πάστα. Το δι-υδροξυ ανάλογο του, ο *νεο*-νουζενίδης, βρέθηκε στην πάστα αλλά όχι στον καρπό [232], κάτι που υποδεικνύει την πιθανή υδροξυλίωση του νουζενίδη (11), κατά τη διεργασία της μάλαξης. Ο 11-μεθυλο ολεοσίδης του νουζενίδη είναι ένα πιο πολύπλοκο ανάλογο, που έχει επίσης βρεθεί στα φρούτα και στην πάστα.

III.1.b. *Παρουσίαση του νουζενίδη*

Ο νουζενίδης (11) είναι σεκοϊριδοειδής γλυκοσίδης που ανήκει στην οικογένεια των μονοτερπενίων. Συνώνυμα του νουζενίδη (11) (nüzhenide), είναι αγγλ. nuezhenide και specnuezhenide. Επιπλέον, ανήκει στην κατηγορία των οργανικών ενώσεων που είναι γνωστές ως «σακχαρολιπίδια». Αυτές είναι ενώσεις στις οποίες τα λιπαρά οξέα συνδέονται άμεσα με μία μονάδα σακχάρου. Στα σακχαρολιπίδια, η μονάδα του σακχάρου υποκαθιστά την μονάδα γλυκερόλης που υπάρχει στα γλυκερολιπίδια και γλυκεροφωσφολιπίδια. Τα πιο γνωστά σακχαρολιπίδια, περιέχουν μία ακυλιωμένη γλυκοζαμίνη. Σε αντίθεση με άλλα γλυκολιπίδια, το λιπαρό οξύ δεν είναι συνδεδεμένο, μέσω γλυκοσιδικού δεσμού, με την ομάδα του σακχάρου.

III.1.b.1. Δομή του νουζενίδη

Η δομή του νουζενίδη (11) παρατέθηκε στο Κεφάλαιο Ι, αλλά δίδεται και στην Εικόνα 49.



Εικόνα 49. *Η δομή του νουζενίδη (11)*

III.1.b.2. Πηγές νουζενίδη

Είδη απ' όπου έχει απομονωθεί ο νουζενίδης (11), είναι, όπως προαναφέρθηκε, το *Ligustrum lucidum* [230], το *Fraxinus americana* [231], το *Syringa vulgaris*, το *Fraxinus augustifolia* [233] και το *Fraxinus excelsior* [234] και συγκεκριμένα, από εκχυλίσματα σπόρων των ειδών αυτών.

III.1.c. *Φαρμακολογικές δράσεις του νουζενίδη*

Μελέτες [235] απέδειξαν ότι ο νουζενίδης (11) ενεργοποιεί τον υποδοχέα άλφα των πολλαπλασιαστών των υπεροξυσωμάτων (PPARα[51]) και αναστέλλει τη διαφοροποίηση των λιποκυττάρων σε καλλιεργημένα λιποκύτταρα. Έτσι, παρέχει ένα πιθανό μοριακό μηχανισμό που υπογραμμίζει την ρυθμιστική μεταβολική δράση του εκχυλίσματος σπόρων του είδους Fraxinus excelsior [234]. Αυτό το σεκοϊριδοειδές έχει, έτσι, προταθεί, ως το κύριο βιοδραστικό συστατικό του εκχυλίσματος του *Fraxinus excelsior* και δυνητικά υπεύθυνο για τις ευεργετικές του ιδιότητες [236], [237], [234]. Ωστόσο, οι βιολογικές δράσεις αυτής της ένωσης, εντός του οργανισμού, εξαρτώνται σε μεγάλο βαθμό από το μεταβολισμό και την πρόσληψή της από τη γαστρεντερική οδό.

Άλλες μελέτες [238], που αξιολόγησαν την αντικαρκινική δράση εκχυλισμάτων σπόρων της άγριας ποικιλίας ελιάς "zambujeiro", συγκριτικά με αυτή άλλων ποικιλιών, απέδειξαν ότι το εκχύλισμα των σπόρων της συγκεκριμένης ποικιλίας, ήταν το μοναδικό με αντιπολλαπλασιαστική επίδραση στην ανθρώπινη καρκινική κυτταρική σειρά παχέος εντέρου (HT29[52]).

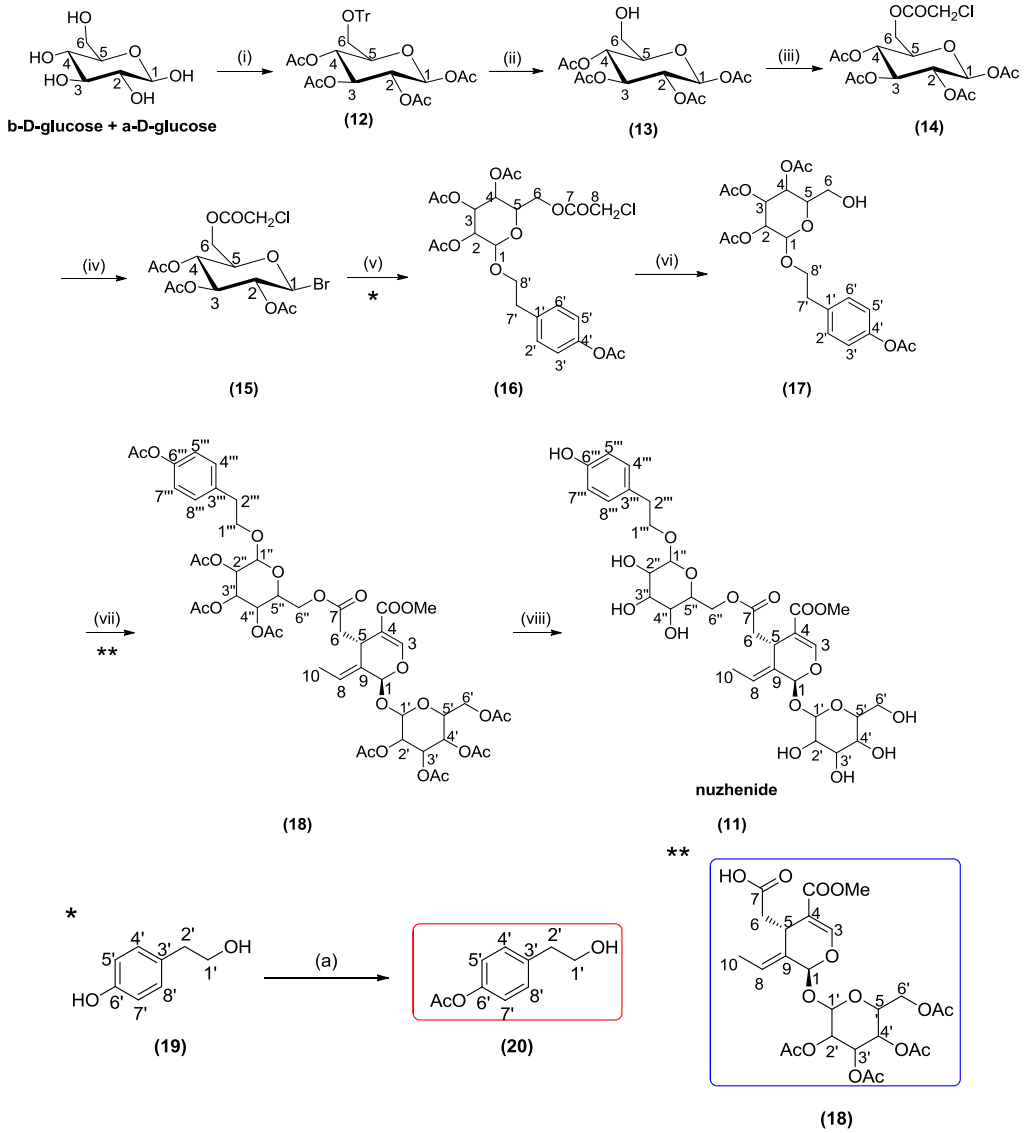
Αυτό το αποτέλεσμα μπορεί να σχετίζεται με το υψηλότερο ποσοστό σε πολυφαινόλες αλλά και την αντιοξειδωτική δράση. Παρόλα αυτά, επειδή και άλλες ποικιλίες σπόρων έχουν αντιοξειδωτική δράση, αλλά και πολυφαινόλες σε υψηλό ποσοστό, προτείνεται ότι υπάρχουν συγκεκριμένες ενώσεις στο εκχύλισμα της "zambujeiro" που συμμετέχουν σ' αυτή την επίδραση, ενώσεις όπως ο νουζενίδης (11). Ο νουζενίδης (11), σύμφωνα με τη συγκεκριμένη μελέτη [238], ήταν σε μεγαλύτερη συγκέντρωση στο εκχύλισμα σπόρων της ποικιλίας "zambujeiro", απ' ότι σε εκχυλίσματα άλλων ποικιλιών.

III.1.d. *Ολική σύνθεση του νουζενίδη*

Με έναυσμα την αναφερόμενη στη βιβλιογραφία αντιοξειδωτική δράση του νουζενίδη (11) [239], επιχειρήθηκε η ολική σύνθεση του φαινολικού αυτού συστατικού, που, όπως αναφέρθηκε, είναι απομονώσιμο σε περιορισμένη ποσότητα από τον πυρήνα του ελαιόκαρπου.

Μέχρι σήμερα, δεν υπάρχουν γνωστές αναφορές σχετικά με την ολική σύνθεση του νουζενίδη (11). Έτσι, στην παρούσα διατριβή, αυτή επιχειρήθηκε σε οκτώ συνολικά στάδια, χωρίς ωστόσο να επιτευχθεί η ολοκλήρωση της σύνθεση αυτού.

Το συνθετικό σχήμα που επιχειρήθηκε παρατίθεται στο Σχήμα 5.



Σχήμα 5. *Συνθετικό σχήμα ολικής σύνθεσης του νουζενίδη (11)*
*i: 1)TrCl, pyridine, 12h, RT, 2) Ac_2O, 6.5h, RT, ii: 40% HBr/ HOAc, HOAc, 1min, 15°C, iii: $ClCH_2COCl$ (chloroacetyl chloride), ether anhydrous, pyridine anhydrous, 4h, RT, iv: 1) 1,2-dichloroethane or CH_2Cl_2 anhydrous, 2) *33% HBr/ HOAc, 5min, 0°C, 15min, RT, v: 1) HgO, molecular sieves powder, 2) *, CH_2Cl_2 anhydrous, vi: thiourea, MeOH, 24h, 50°C, vii: 1) Et_3N, 2,4,6-trichlorobenzoyl chloride, 2h, RT, 2) 4-DMAP, **, CH_2Cl_2 anhydrous, 2h30min, viii: Et_2NH, MeOH, 6h, RT*
a: 1) NaOH pellets aq. sol., isopropanol, 2) acetic anhydride, 30min, RT

Παρακάτω, περιγράφονται αναλυτικά όλα τα στάδια της σύνθεσης του νουζενίδη (11), σύμφωνα με την αντίστοιχη, για το κάθε στάδιο, βιβλιογραφία.

III.1.d.1. <u>Στάδιο 1ο:</u> Σύνθεση της 1,2,3,4-τετρα-O-ακετυλο-6-τριτυλο-β-D-γλυκοπυρανόζης (12), με πρώτη ύλη τη γλυκόζη

III.1.d.1.1. Περιγραφή μεθόδου

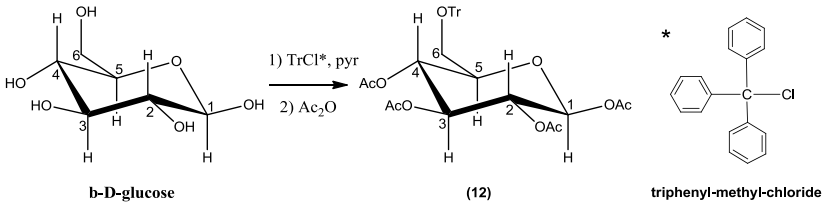
Οι συνθετικοί πολυσακχαρίτες αποτελούν απαραίτητα μοντέλα για τις φυσικοχημικές και βιολογικές μελέτες, που στοχεύουν στην αποσαφήνιση του ρόλου των υδατανθράκων στις βιολογικές διεργασίες και στην κατανόηση της σχέσης δομής-δράσης τους. Η ποικιλομορφία των δομών των φυσικών πολυσακχαριτών, οδήγησε στην ταχεία ανάπτυξη μεθόδων, για τη σύνθεση αναλόγων τους [240].

Η μελέτη των Kasuya και συνεργατών [241], πάνω στη σύνθεση πολυσακχαριτών, αποτέλεσε τη βάση για την εκτέλεση του πρώτου σταδίου της ολικής σύνθεσης του νουζενίδη (11). Το στάδιο αυτό δεν είναι άλλο, από την εκλεκτική προστασία της πρωτοταγούς αλκοόλης της γλυκόζης με τριφαινυλο-μεθυλο-χλωρίδιο (τριτυλο-χλωρίδιο, TrCl), με ταυτόχρονη ακετυλίωση των υπολοίπων υδροξυλομάδων της (*Σχήμα 6*). Την ίδια μεθοδολογία προτείνουν στη μελέτη τους και οι Yu και συνεργάτες [242].

Με πρώτη ύλη τη β-D-γλυκόζη και κατεργασία, σε πρώτη φάση, με TrCl και άνυδρη πυριδίνη, ως διαλύτη, παρατηρείται, μετά από ανάδευση 10-12 ωρών, θολότητα στο μίγμα. Έλεγχος TLC[34], δείχνει ότι δεν υπάρχει, πλέον, ποσότητα γλυκόζης στο αντιδρών μίγμα. Ακολουθεί η προσθήκη οξικού ανυδρίτη και το μίγμα αμέσως γίνεται κίτρινο διαυγές, ενώ η θερμοκρασία ξεκινάει να αυξάνεται (εξώθερμη). 30 λεπτά μετά την προσθήκη του οξικού ανυδρίτη, παρατηρήθηκε ξανά θολότητα του αντιδρώντος μίγματος, με ταυτόχρονη επαναφορά της θερμοκρασίας σε φυσιολογικά επίπεδα (RT). Η αντίδραση αφήνεται σε ανάδευση για ακόμη 10 ώρες, οπότε και επαναλαμβάνεται ο έλεγχος με TLC[34]. Κατά την παρατήρηση της πλάκας TLC[34], αφού αυτή ψεκάστηκε με διάλυμα θειϊκής βανιλίνης, απαιτήθηκε παρατεταμένη θέρμανση ώστε να επιτευχθεί ο χρωματισμός του επιθυμητού προϊόντος. Αυτή η παρατήρηση είναι χαρακτηριστική των σακχάρων.

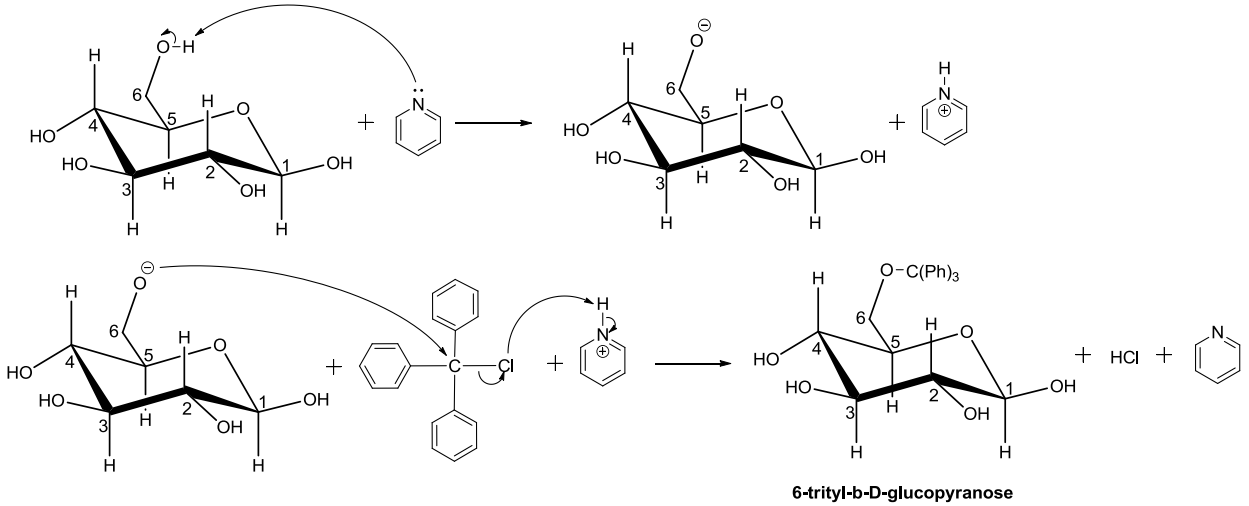
Τέλος, για την εξάτμιση της πυριδίνης, προστίθεται ποσότητα τολουολίου ή νερού, προς σχηματισμό αζεοτροπικού μίγματος και ακολουθεί συμπύκνωση υπό κενό. Πλύση με H_2O και υδατικό διάλυμα NaCl, ξήρανση με άνυδρο Na_2SO_4, διήθηση, συμπύκνωση και καθαρισμός του προϊόντος με χρωματογραφία στήλης (silica 20:40, Hexane/ EtOAc, 2:1), δίνει το επιθυμητό προϊόν (12), σε σχετικά χαμηλή απόδοση, της τάξης του 35%. Ως παραπροϊόν, παραλαμβάνεται η, μη ορατή στο UV, ακετυλιωμένη γλυκόζη, με μικρότερο R_f[50] αυτού του επιθυμητού προϊόντος.

Με τη μέθοδο αυτή, επιτυγχάνεται ο εκλεκτικός σχηματισμός αιθέρα της πρωτοταγούς αλκοόλης της γλυκόζης, με τριτυλο-ομάδα, ενώ οι υπόλοιπες υδροξυλομάδες εστεροποιούνται με ακετυλο ομάδες, ώστε να παραμείνουν ανεπηρέαστες στο επόμενο βήμα της σύνθεσης.



Σχήμα 6. *Αντίδραση πρώτου σταδίου της ολικής σύνθεσης του νουζενίδη (11).*

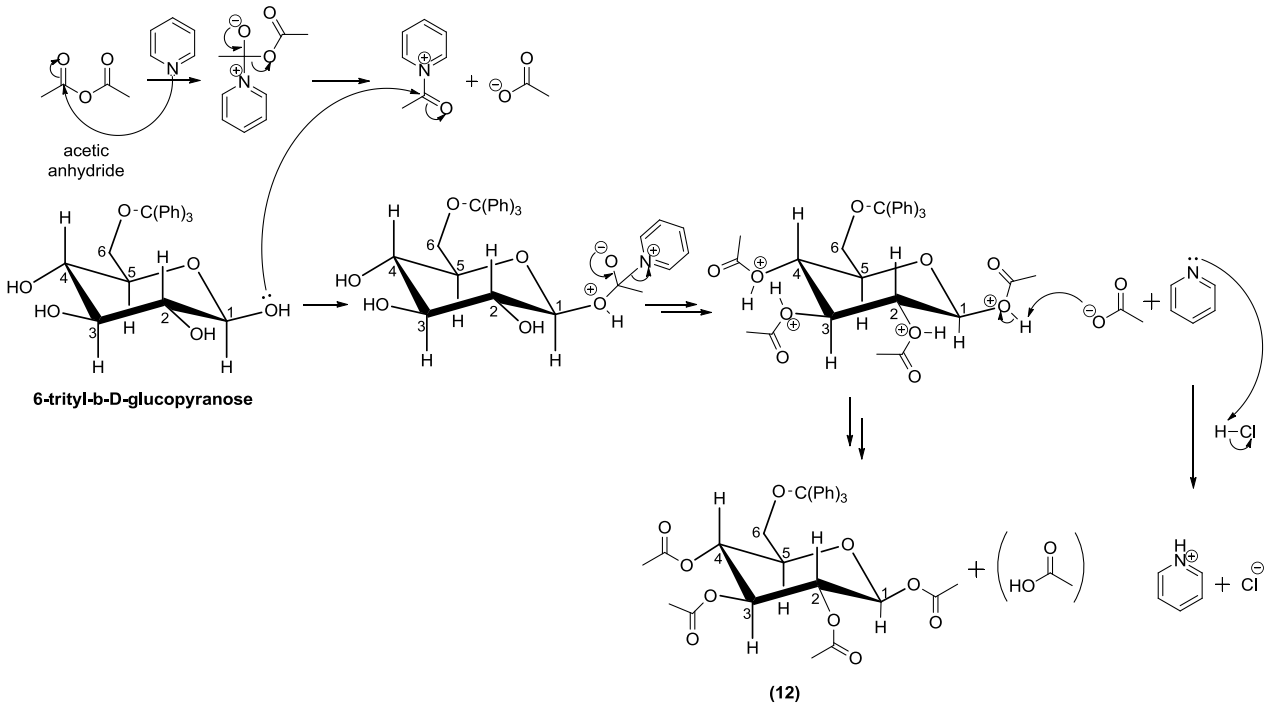
Σε πρώτη φάση, ο σχηματισμός του τριτυλο- αιθέρα μεταξύ της υδροξυλομάδας της θέσης 6 της γλυκόζης και του τριφαινυλο-μεθυλο-χλωριδίου, ακολουθεί τη μέθοδο σύνθεσης αιθέρων κατά Williamson και ο μηχανισμός δίνεται στο Σχήμα 7.



Σχήμα 7. *Μηχανισμός σύνθεσης της 6-τριτυλο-β-D-γλυκοπυρανόζης, προϊόν του πρώτου βήματος, του πρώτου σταδίου της σύνθεσης του νουζενίδη (11)*

Πρώτα, λοιπόν, η πυριδίνη, ως βάση, αποπρωτονιώνει το υδροξύλιο της θέσης 6 της γλυκόζης, προς σχηματισμό του αλκοξειδίου της γλυκόζης και του κατιόντος της πρωτονιωμένης, πλέον, πυριδίνης. Κατόπιν, το αλκοξείδιο επιτίθεται στον τριτοταγή άνθρακα του τριφαινυλο-μεθυλο-χλωριδίου, με ταυτόχρονη αποχώρηση του χλωρίου. Σχηματίζεται έτσι ο αιθέρας, ενώ το χλωριούχο ιόν αποπρωτονιώνει, με τη σειρά του, το κατιόν της πρωτονιωμένης πυριδίνης, απελευθερώνοντας HCl και πυριδίνη.

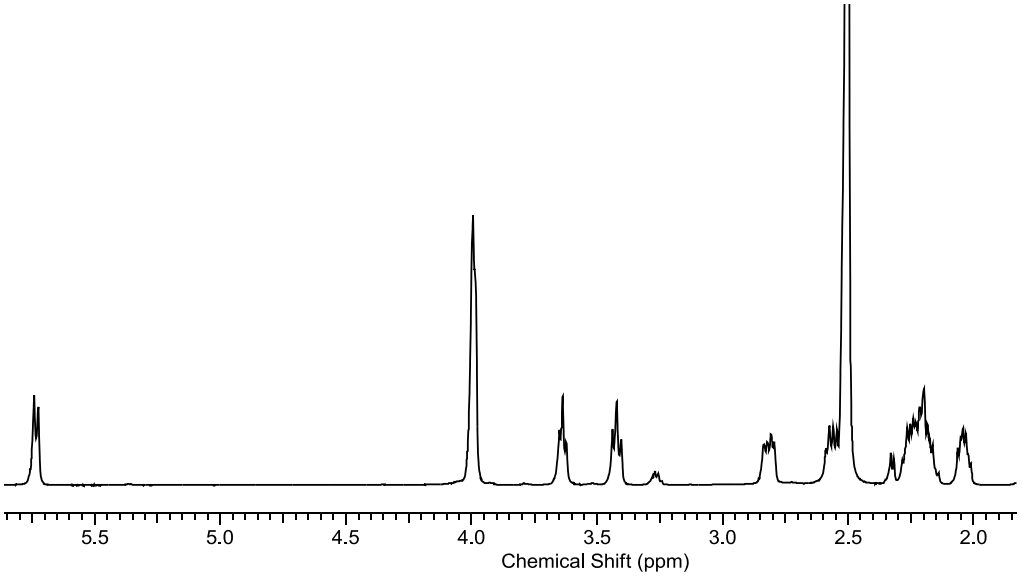
Μετά την πάροδο 12 ωρών, όπως προαναφέρθηκε, γίνεται η προσθήκη του οξικού ανυδρίτη, για τον σχηματισμό του τελικού προϊόντος πρώτου σταδίου της σύνθεσης του νουζενίδη (11), 1,2,3,4-τετρα-*O*-ακετυλο-6-τριτυλο-β-D-γλυκοπυρανόζη (12), ενώ ο μηχανισμός της ακετυλίωσης που συντελείται στο στάδιο αυτό, παρατίθεται στο Σχήμα 8 και θα περιγραφεί αναλυτικότερα σε επόμενο υποκεφάλαιο.



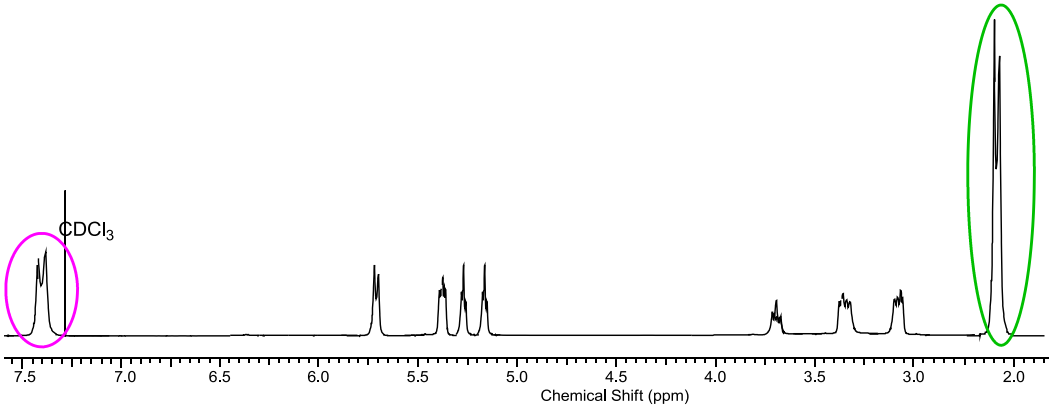
Σχήμα 8. *Προτεινόμενος μηχανισμός για την αντίδραση ακετυλίωσης.*

III.1.d.1.2. Μελέτη δομής

Η δομή της 1,2,3,4-τετρα-*O*-ακετυλο-6-τριτυλο-β-D-γλυκοπυρανόζης (12) ταυτοποιήθηκε με χρήση της φασματοσκοπίας NMR[39], και διαφοροποιείται από τη γλυκόζη, καθώς εμφανίζει τη χαρακτηριστική κορυφή των τριών φαινυλομάδων της τριτυλο-ομάδας στην αρωματική περιοχή, στα 7.45 ppm (όλα τα αρωματικά πρωτόνια είναι περίπου ισοδύναμα και γι' αυτό δίνουν την εικόνα σχεδόν μίας απλής κορυφής), αλλά και τις χαρακτηριστικές απλές κορυφές των μεθυλίων των τεσσάρων ισοδύναμων ακετυλο-ομάδων, στα 2.23 ppm. Επίσης, οι μετατοπίσεις των πρωτονίων των θέσεων 1,2,3,4,5 είναι σημαντικά μετατοπισμένες προς χαμηλότερα πεδία, συγκριτικά με τις αντίστοιχες μετατοπίσεις των πρωτονίων της γλυκόζης, λόγω της παρουσίας των ακετυλο ομάδων.



Εικόνα 50. *Φάσμα ^{1}HNMR (400MHz) της γλυκόζης, σε DMSO*



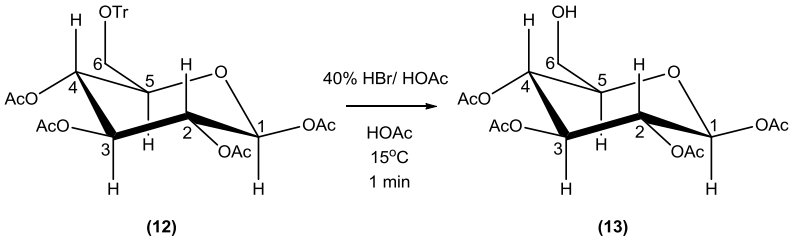
Εικόνα 51. *Φάσμα ^{1}H NMR (400MHz) της 1,2,3,4-τετρα-*O*-ακετυλο-6-τριτυλο-β-D-γλυκοπυρανόζης (12), σε $CDCl_3$*

III.1.d.2. Στάδιο 2^o: Σύνθεση της 1,2,3,4-τετρα-O-ακέτυλο-β-D-γλυκοπυρανόζης

III.1.d.2.1. Περιγραφή μεθόδου

Το δεύτερο στάδιο της σύνθεσης του νουζενίδη (11), περιλαμβάνει την εκλεκτική αποπροστασία του υδροξυλίου της θέσης 6 και ταυτόχρονη διατήρηση των ακέτυλο ομάδων ανέπαφων.

Η μέθοδος που προτείνουν οι Kasuya και συνεργάτες [241], περιλαμβάνει την κατεργασία της 1,2,3,4-τετρα-*O*-ακετυλο-6-τριτυλο-β-D-γλυκοπυρανόζης (12) με κορεσμένο HCl οξύ και διαλύτη χλωροφόρμιο, υπό συνθήκες αργού, για 30 λεπτά. Στη συνέχεια, εξουδετέρωση του μίγματος με όξινο ανθρακικό νάτριο, πλύση με κορεσμένο υδατικό διάλυμα NaCl και νερό, ξήρανση με άνυδρο Na_2SO_4 και συμπύκνωση υπό κενό για την παραλαβή, κατόπιν καθαρισμού με χρωματογραφία στήλης, του επιθυμητού προϊόντος, 1,2,3,4-τετρα-O-ακέτυλο-β-D-γλυκοπυρανόζη (13).



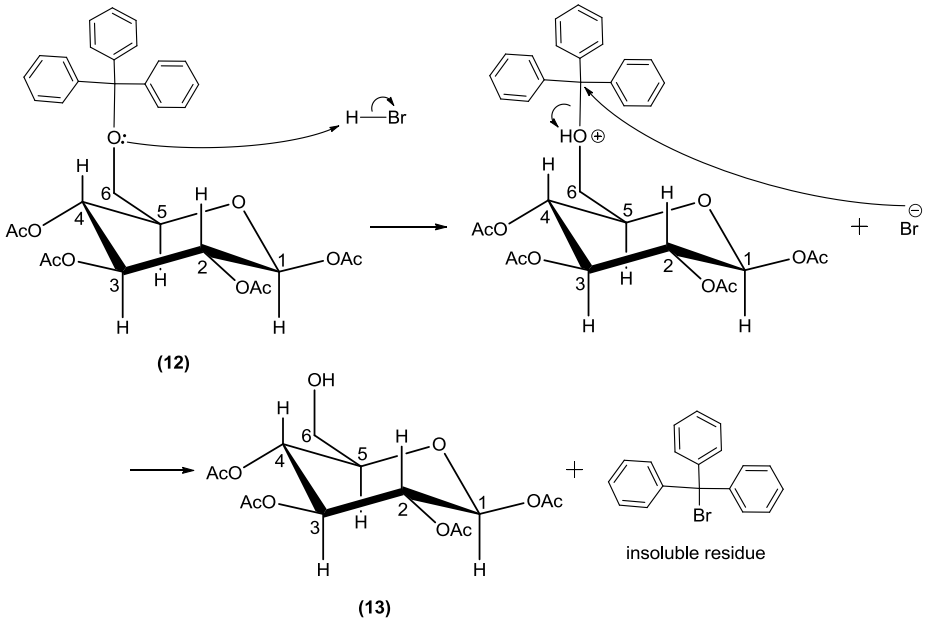
Σχήμα 9. *Αντίδραση δευτέρου σταδίου της ολικής σύνθεσης του νουζενίδη (11).*

Η μέθοδος που ακολουθήσαμε εμείς, των Yu και συνεργατών [242], περιλαμβάνει την διάλυση του προϊόντος του πρώτου σταδίου της σύνθεσης, (12), σε οξικό οξύ, προσθήκη διαλ/τος 33% HBr σε HOAc, στους 10^{o}C και ανάδευση για 1 λεπτό. Παρατηρείται καθίζηση του τριφαινυλο-μεθυλο-βρωμιδίου, το οποίο απομακρύνεται από το αντιδρών μίγμα με διήθηση υπό κενό. Το διήθημα πλένεται με κρύο νερό και εκχυλίζεται με διχλωρομεθάνιο. Ξήρανση της οργανικής φάσης με Na_2SO_4 και συμπύκνωση υπό κενό, δίνει, κατόπιν χρωματογραφίας στήλης (EtOAc/ Hexane 1:4 →1:2), το τελικό επιθυμητό προϊόν 1,2,3,4-τετρα-O-ακέτυλο-β-D-γλυκοπυρανόζης (13), σε αρκετά ικανοποιητική απόδοση, της τάξης των 85%.

Μία άλλη μέθοδος που δοκιμάσαμε [243], με εξίσου ικανοποιητικά αποτελέσματα, ήταν η εκλεκτική αποπροστασία της υδροξυλομάδας της 6 θέσης, με κατεργασία με τριφθοροξικό οξύ (TFA), το οποίο προστέθηκε στάγδην, στο διάλυμα με διχλωρομεθάνιο της 1,2,3,4-τετρα-*O*-ακετυλο-6-τριτυλο-β-D-γλυκοπυρανόζης (12), μέχρι το διάλυμα να χρωματιστεί κίτρινο. Το πλεονέκτημα αυτής της μεθόδου ήταν ότι πραγματοποιήθηκε σε μικρότερο χρόνο από την προηγούμενη. Ο καθαρισμός του προϊόντος έγινε και πάλι με χρωματογραφία στήλης (c-Hex/ EtOAc 80:20 → 65:35), ενώ η απόδοση της αντίδρασης ήταν της τάξης του 70%.

Στην TLC[34], το προϊόν του δευτέρου σταδίου, (13), έχει R_f[50] κατά πολύ μικρότερο από αυτό του (12), κάτι που διευκολύνει αρκετά την παρακολούθηση της περάτωσης της αντίδρασης.

Ο μηχανισμός που προτείνεται βιβλιογραφικά για την εκλεκτική αποπροστασία του υδροξυλίου της 6 ομάδας, δίνεται στο Σχήμα 10.

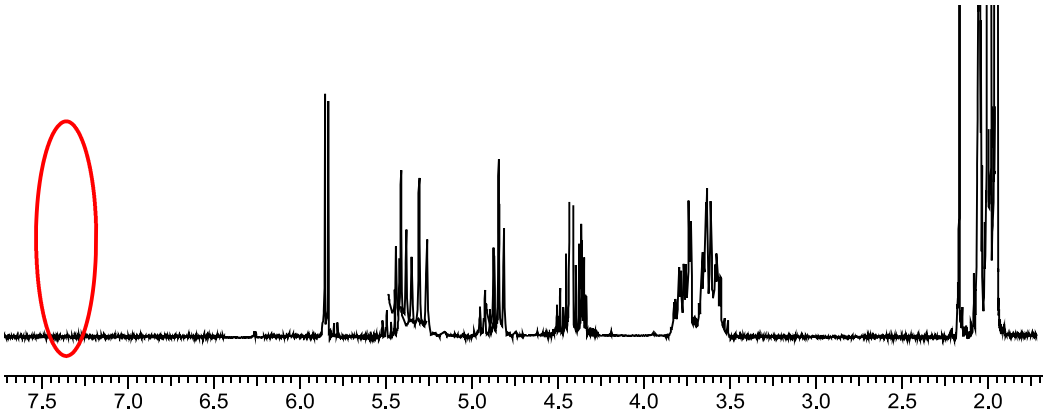


Σχήμα 10. *Μηχανισμός σύνθεσης του προϊόντος δευτέρου σταδίου της σύνθεσης του νουζενίδη (11), για την εκλεκτική αποπροστασία του ΟΗ-6 της γλυκόζης, από την τρίτυλο-ομάδα*

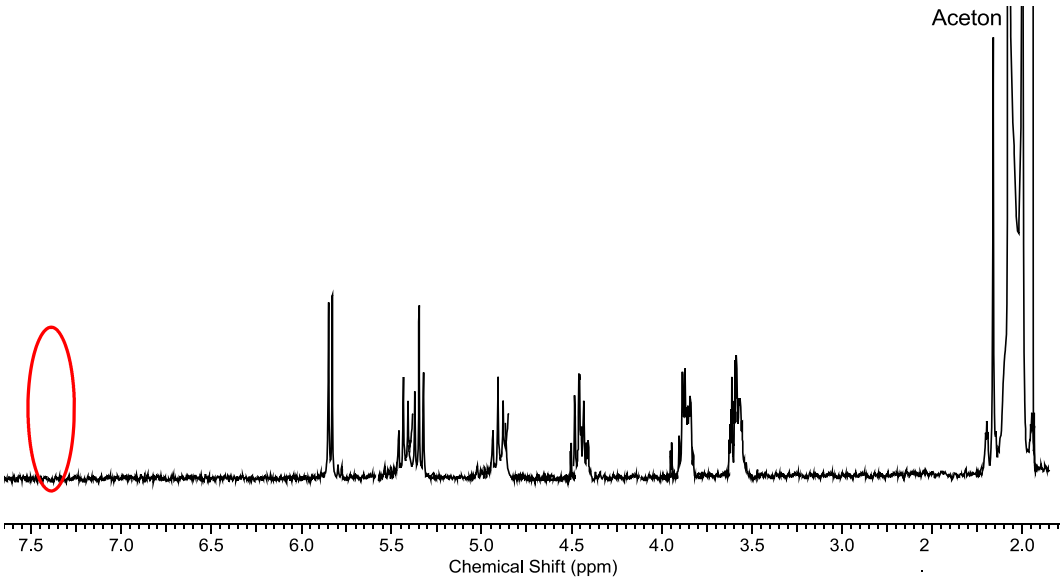
Σε πρώτη φάση, το οξυγόνο της τριτυλο-ομάδας πρωτονιώνεται από το HBr, σχηματίζοντας την κατιοντική μορφή του αρχικού προϊόντος και το ελεύθερο ανιόν βρωμίου. Το τελευταίο επιτίθεται, σε δεύτερη φάση, στον τριτοταγή άνθρακα της τριτυλο-ομάδας, σχηματίζοντας το επιθυμητό προϊόν, (13) και το τριφαινυλο-μεθυλο-βρωμίδιο, ως παραπροϊόν που σχηματίζει ίζημα στον πάτο της φιάλης αντίδρασης, το οποίο, όπως προαναφέρθηκε, διηθείται υπό κενό.

III.1.d.2.2. Μελέτη δομής

Το προϊόν της εκλεκτικής αποπροστασίας και από τις δύο μεθόδους που ακολουθήθηκαν, 1,2,3,4-τετρα-O-ακέτυλο-β-D-γλυκοπυρανόζη (13), μπορεί να ταυτοποιηθεί εύκολα και να διαφοροποιηθεί από την 1,2,3,4-τετρα-*O*-ακετυλο-6-τριτυλο-β-D-γλυκοπυρανόζη (12), καθώς, όπως φαίνεται και στα φάσματα ^{1}H NMR της 1,2,3,4-τετρα-O-ακέτυλο-β-D-γλυκοπυρανόζης προϊόντος (13) και από τις δύο μεθόδους (το φάσμα του (12) παρατέθηκε στην Εικόνα 51), απουσιάζουν οι χαρακτηριστικές κορυφές της τριτυλο-ομάδας, από την αρωματική περιοχή, ενώ εξακολουθούν να υπάρχουν οι χαρακτηριστικές απλές κορυφές των ακετυλο ομάδων.



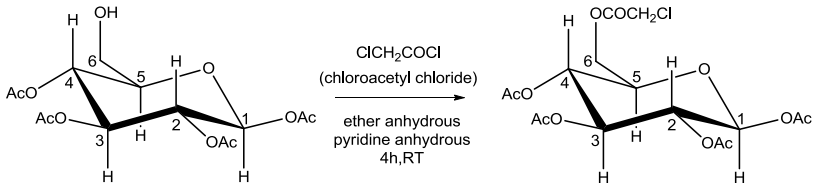
Εικόνα 52. *Φάσμα ^{1}HNMR (400MHz) της 1,2,3,4-τετρα-O-ακετυλο-β-D-γλυκοπυρανόζης (13), σε ακετόνη, ως προϊόν κατεργασίας με 33% HBr σε HOAc.*



Εικόνα 53. *Φάσμα ^{1}HNMR (400MHz) της 1,2,3,4-τετρα-O-ακετυλο-β-D-γλυκοπυρανόζης (13), σε ακετόνη – ως προϊόν κατεργασίας με TFA*

III.1.d.3. Στάδιο 3ο: Σύνθεση της 1,2,3,4-τετρα-O-ακετυλο-6-χλωροακετυλο-β-D-γλυκοπυρανόζης (14)

III.1.d.3.1. Περιγραφή μεθόδου



Σχήμα 11. *Αντίδραση τρίτου σταδίου της ολικής σύνθεσης του νουζενίδη (11).*

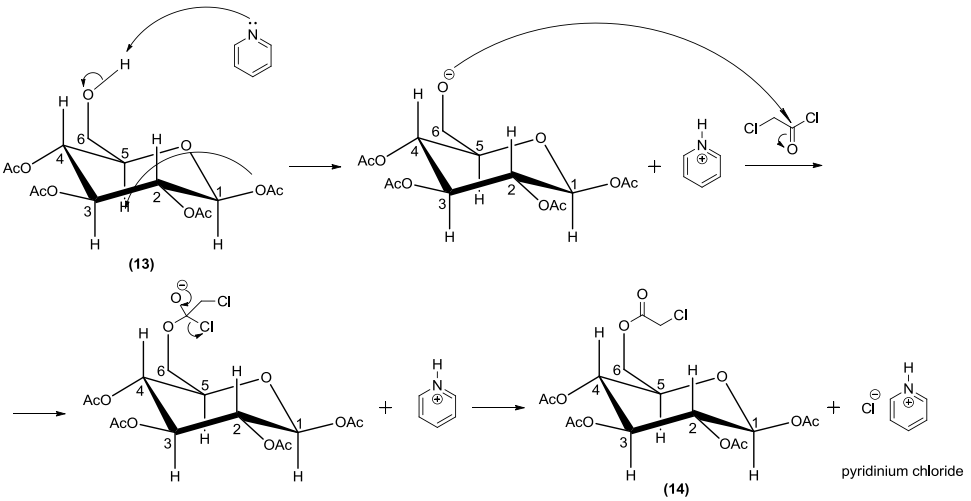
Το επόμενο βήμα της σύνθεσης του νουζενίδη (11), περιλαμβάνει την εκλεκτική προστασία της, ελεύθερης πλέον, υδροξυλομάδας της θέση 6, με χρήση του αντιδραστηρίου χλωροακέτυλο χλωριδίου, πυριδίνη και αιθέρα ως διαλύτες, σε άνυδρες συνθήκες και θερμοκρασία δωματίου.

Οι Gagnaire και συνεργάτες, στη μελέτη τους το 1973 [244], πρότειναν τη χρήση του χλωροακέτυλο χλωριδίου, για την εκλεκτική και προσωρινή προστασία της πρωτοταγούς αλκοόλης σακχάρων, χωρίς καμία επίδραση σε συνυπάρχουσες, στο μόριο, ομάδες. Η μελέτη

τους αποσκοπούσε στη σύνθεση γλυκοσιδικών μονομερών, με υδροξύλια προστατευμένα με ποικίλες ομάδες, με απώτερο σκοπό τη σύνθεση ολιγοσακχαριτών (πολυμερών).

Ξεκινώντας με πρώτη ύλη την 1,2,3,4-τετρα-O-ακετυλο-β-D-γλυκοπυρανόζη (13), προσθέτουμε, ως διαλύτη, άνυδρο αιθυλαίθερα και μικρή ποσότητα άνυδρης πυριδίνης και το διάλυμα αναδεύεται. Έπειτα, με τη βοήθεια παγόλουτρου, το διάλυμα ψύχεται για μερικά λεπτά και ακολουθεί στάγδην προσθήκη του χλωροακέτυλο χλωριδίου, διαλυμένου σε μικρή ποσότητα άνυδρου αιθέρα. Ήδη από την αρχή της προσθήκης του αντιδραστηρίου, παρατηρείται σχηματιζόμενο ίζημα στο αντιδρών διάλυμα, που σηματοδοτεί το σχηματισμό χλωριούχου πυριδινίου. Μετά το τέλος της προσθήκης, η ανάδευση συνεχίζεται, σε θερμοκρασία δωματίου, για 4 ώρες. Ακολουθεί διάλυση σε επιπλέον ποσότητα διαιθυλαιθέρα και πλύση, μία φορά με παγωμένο νερό και μία, με HCl 1M. Εξουδετέρωση με κορεσμένο διάλυμα όξινου ανθρακικού νατρίου, ξήρανση με άνυδρο Na_2SO_4 και συμπύκνωση υπό κενό, δίνουν το επιθυμητό προϊόν, 1,2,3,4-τετρα-O-ακετυλο-6-χλωροακετυλο-β-D-γλυκοπυρανόζη (14), σε πολύ ικανοποιητική απόδοση, της τάξης του 95%. Η αντίδραση προσθήκης της χλωροακετυλο ομάδας στο υδροξύλιο της θέσης 6, είναι ποσοτική και δίνει προϊόν σε μορφή σιροπιού, με μεγάλο ιξώδες, που δεν κρυσταλλώνει, αλλά δίνει μόνο μία κηλίδα στην πλάκα TLC[34].

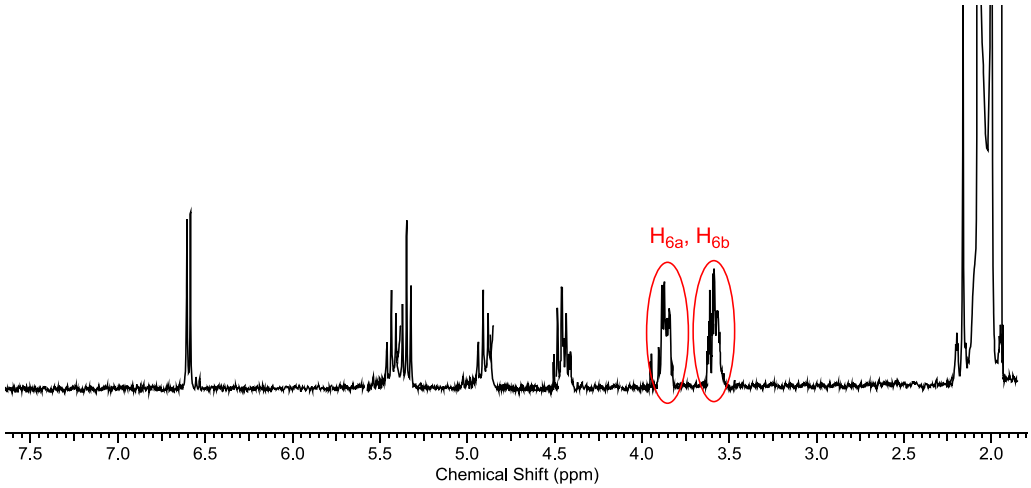
Ο μηχανισμός του τρίτου σταδίου της σύνθεσης του νουζενίδη (11), δίνεται στο Σχήμα 12.



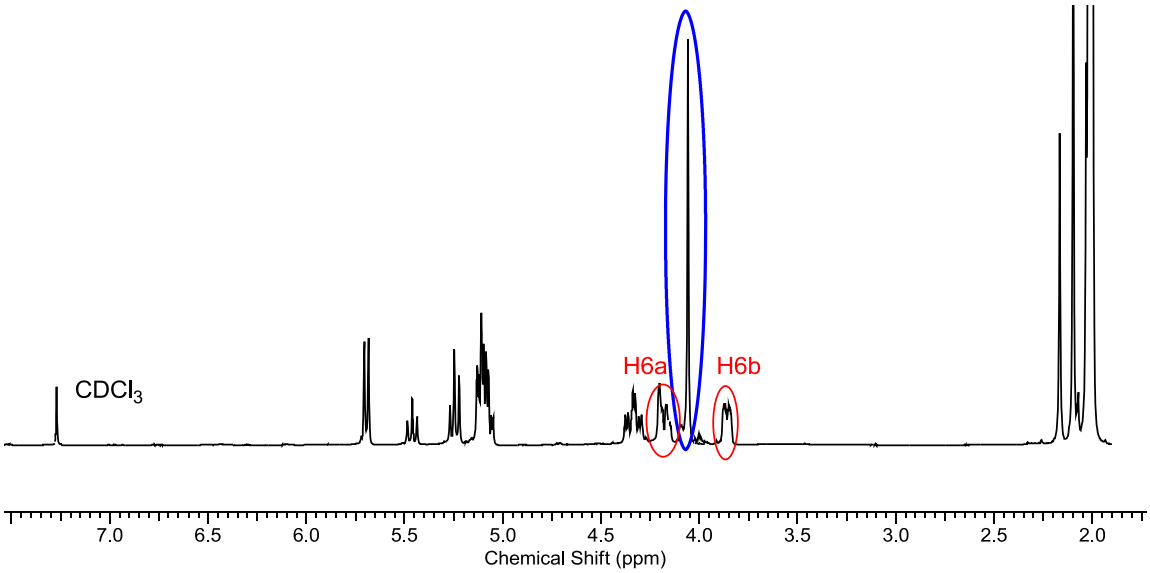
Σχήμα 12. *Προτεινόμενος μηχανισμός σύνθεσης του προϊόντος τρίτου σταδίου της σύνθεσης του νουζενίδη (11).*

III.1.d.3.2. Μελέτη δομής

Η μελέτη της δομής του προϊόντος τρίτου σταδίου της σύνθεσης του νουζενίδη (11), 1,2,3,4-τετρα-O-ακετυλο-6-χλωροακετυλο-β-D-γλυκοπυρανόζη (14), μπορεί να γίνει με χρήση της φασματοσκοπίας NMR[39]. Συγκεκριμένα, κατόπιν σύγκρισης των φασμάτων ^{1}H NMR της 1,2,3,4-τετρα-O-ακετυλο-β-D-γλυκοπυρανόζης (13) και της 1,2,3,4-τετρα-O-ακετυλο-6-χλωροακετυλο-β-D-γλυκοπυρανόζης (14) (*Εικόνα 55*), στο φάσμα της τελευταίας, παρατηρείται μία χαρακτηριστική απλή κορυφή, που αντιστοιχεί στα δύο πρωτόνια που βρίσκονται μεταξύ του καρβονυλίου και του χλωρίου, της χλωροακετυλο-ομάδας. Αυτά είναι ισοδύναμα, γι' αυτό και δίνουν μία μόνο απλή κορυφή. Επιπλέον, λόγω της παρουσίας της χλωροακετυλο ομάδας, οι μετατοπίσεις των πρωτονίων της θέσης 6 έχουν αποθωρακιστεί από 3.60 ppm και 3.87 ppm, σε χαμηλότερες τιμές πεδίου, στα 3.86 ppm και 4.21 ppm, αντίστοιχα.



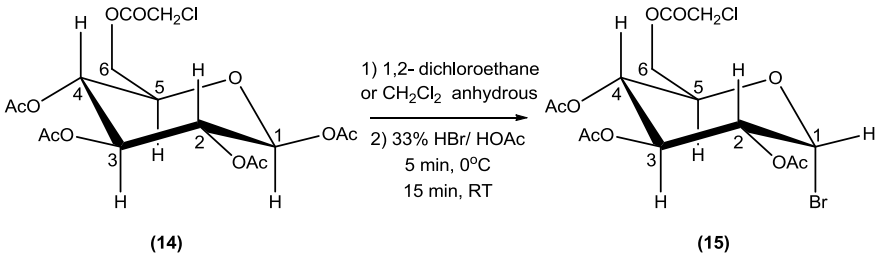
Εικόνα 54. *Φάσμα ^{1}HNMR (400MHz) της 1,2,3,4-τετρα-O-ακετυλο-β-D-γλυκοπυρανόζης (22), προϊόντος δευτέρου σταδίου της σύνθεσης του νουζενίδη (11), σε $(CD_3)_2CO$.*



Εικόνα 55. *Φάσμα ^{1}HNMR (400MHz) της 1,2,3,4-τετρα-O-ακετυλο-6-χλωροακετυλο-β-D-γλυκοπυρανόζης (14), προϊόντος τρίτου σταδίου της σύνθεσης του νουζενίδη (11), σε $CDCl_3$*

III.1.d.4. <u>Στάδιο 4^o</u>: Σύνθεση της 2,3,4-τρι-O-ακετυλο-1-βρωμο-6-χλωροακετυλο-β-D-γλυκοπυρανόζης (15)

III.1.d.4.1. Περιγραφή μεθόδου



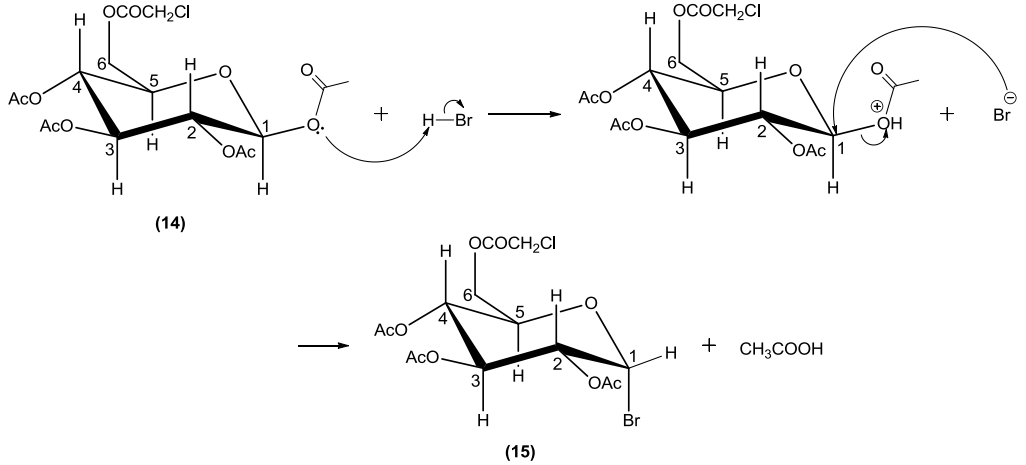
(14) **(15)**

Σχήμα 13. *Αντίδραση τετάρτου σταδίου της ολικής σύνθεσης του νουζενίδη (11).*

Στο επόμενο στάδιο της σύνθεσης του νουζενίδη (11), πραγματοποιήθηκε η βρωμίωση της ανωμερικής θέσης της 1,2,3,4-τετρα-O-ακετυλο-6-χλωροακετυλο-β-D-γλυκοπυρανόζης (14), με χρήση οξέος HBr, πυκνότητας 33%, σε οξικό οξύ (HOAc).

Η μέθοδος, έχει περιγραφεί και πάλι από τους Gagnaire και συνεργάτες [244] και περιλαμβάνει την διάλυση, αρχικά, του 1,2,3,4-τετρα-O-ακετυλο-6-χλωροακετυλο-β-D-γλυκοπυρανόζης (14), σε άνυδρο 1,2-διχλωροαιθάνιο και ψύξη της φιάλης αντίδρασης στους 0^oC, με τη βοήθεια παγόλουτρου και τη στάγδην προσθήκη HBr, προς αποφυγήν ανόδου της θερμοκρασίας. Μετά από 5 λεπτά ανάδευσης στους 0^oC, το διάλυμα αφήνεται να αναδευτεί για 15 λεπτά ακόμη, σε θερμοκρασία δωματίου. Το αντιδρών μίγμα μεταγγίζεται σε 25-30 mL, περίπου, παγωμένου νερού, ακολουθεί έντονη ανάδευση για 15 λεπτά και απόχυση. Προσθήκη χλωροφορμίου για διπλασιασμό της οργανικής φάσης, εξουδετέρωση με κορεσμένο διάλυμα όξινου ανθρακικού νατρίου ($NaHCO_3$), πλύση με νερό μέχρι εκ νέου εξουδετέρωσης, ξήρανση με άνυδρο Na_2SO_4 της οργανικής στιβάδας και τέλος, συμπύκνωσή της υπό κενό, δίνει το επιθυμητό, βρωμιωμένο στην θέση 1, προϊόν, σε μορφή σιροπιού και σε πολύ ικανοποιητική απόδοση, της τάξης του 95%. Το προϊόν είναι ήδη υψηλής καθαρότητας και δεν απαιτείται καθαρισμός με χρωματογραφία στήλης.

Ο μηχανισμός του τετάρτου σταδίου της σύνθεσης του νουζενίδη (11), δίνεται στο Σχήμα 14.



Σχήμα 14. *Προτεινόμενος μηχανισμός (S_N2) βρωμίωσης της 1,2,3,4-τετρα-O-ακετυλο-6-χλωροακετυλο-β-D-γλυκοπυρανόζης (14) στην ανωμερική θέση, για το σχηματισμό του προϊόντος τετάρτου σταδίου, 2,3,4-τρι-O-ακετυλο-1-βρωμο-6-χλωροακετυλο-β-D-γλυκοπυρανόζης (15).*

Η αντίδραση που συντελείται στο στάδιο αυτό, είναι πυρηνόφιλη αντικατάσταση με S_N2 μηχανισμό. Αρχικά, το ζεύγος ηλεκτρονίων του οξυγόνου που βρίσκεται ανάμεσα στον ανωμερικό άνθρακα (θέση 1) της 1,2,3,4-τετρα-O-ακετυλο-6-χλωροακετυλο-β-D-γλυκοπυρανόζης (14) και το καρβονύλιο της ακέτυλο ομάδας της θέσης 1, αποπρωτονιώνει το HBr, με αποτέλεσμα να σχηματίζονται το κατιόν του σακχάρου, με το θετικό φορτίο πάνω στο εν λόγω οξυγόνο, και το ελεύθερο ανιόν του βρωμίου. Στη μεταβατική κατάσταση της αντίδρασης, συμμετέχουν και τα δύο αντιδρώντα και η ταχύτητα της αντίδρασης αυτού του τύπου εξαρτάται από τη συγκέντρωση των δύο αντιδρώντων στο διάλυμα της αντίδρασης. Έτσι, το ανιόν του βρωμίου επιτίθεται στον ανωμερικό άνθρακα, με ταυτόχρονη αποχώρηση μίας μονάδας CH_3COOH από την 1,2,3,4-τετρα-O-ακετυλο-6-χλωροακετυλο-β-D-γλυκοπυρανόζη (14). Σχηματίζεται έτσι το επιθυμητό βρωμιωμένο προϊόν, 2,3,4-τρι-O-ακετυλο-1-βρωμο-6-χλωροακετυλο-β-D-γλυκοπυρανόζη (15).

Η διεύθυνση από την οποία το βρωμιούχο ανιόν πλησιάζει τον ηλεκτρονιόφιλο ανωμερικό άνθρακα, είναι αντιδιαμετρική της διεύθυνσης αποχώρησης της ομάδας CH_3COOH, ενώ η προσέγγιση του βρωμίου επιταχύνει τη διαδικασία αποχώρησης. Στην τελική φάση της αντίδρασης, η ομάδα CH_3COOH αποχωρεί πλήρως, ενώ οι υπόλοιπες, διατηρώντας τη σχετική, μεταξύ τους, θέση, έχουν βρεθεί σε αντίθετη θέση από την αντίστοιχη αρχική τους. Το φαινόμενο αυτό που συντελείται λοιπόν είναι η λεγόμενη «αναστροφή κατά Walden» ή «αναστροφή της απόλυτης στερεοχημικής δομής».

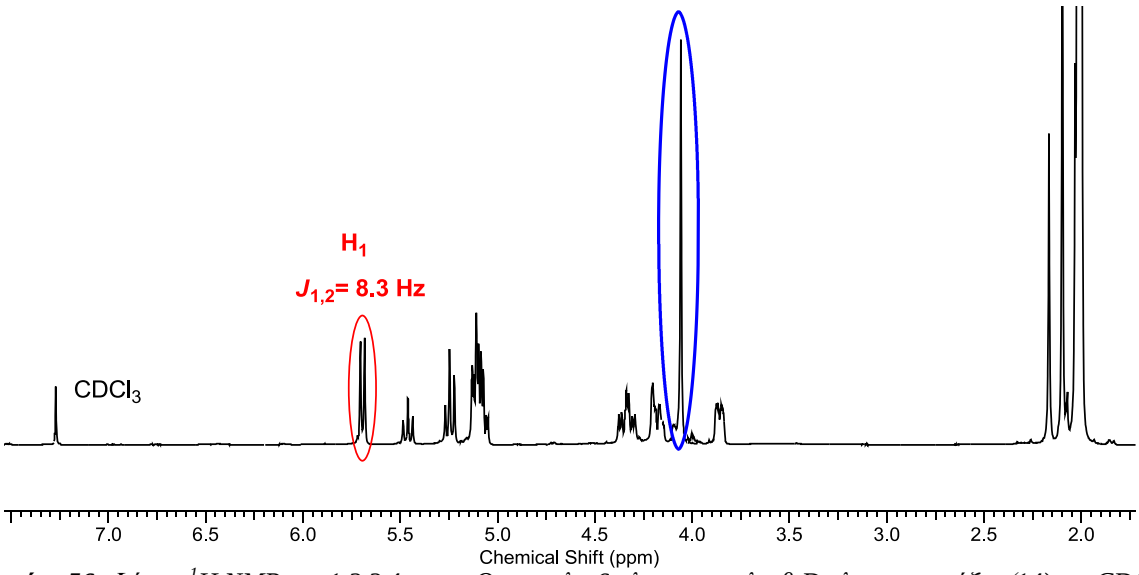
Ο μηχανισμός αυτός είναι S_N2 και επιφέρει αλλαγή της στερεοχημείας, με το Br να συνδέεται σε αξονική θέση στον ανωμερικό άνθρακα, σε αντίθεση με την ακετυλο ομάδα που βρισκόταν σε ισημερινή, στην 1,2,3,4-τετρα-O-ακετυλο-6-χλωροακετυλο-β-D-γλυκοπυρανόζη (14).

III.1.d.4.2. Μελέτη δομής

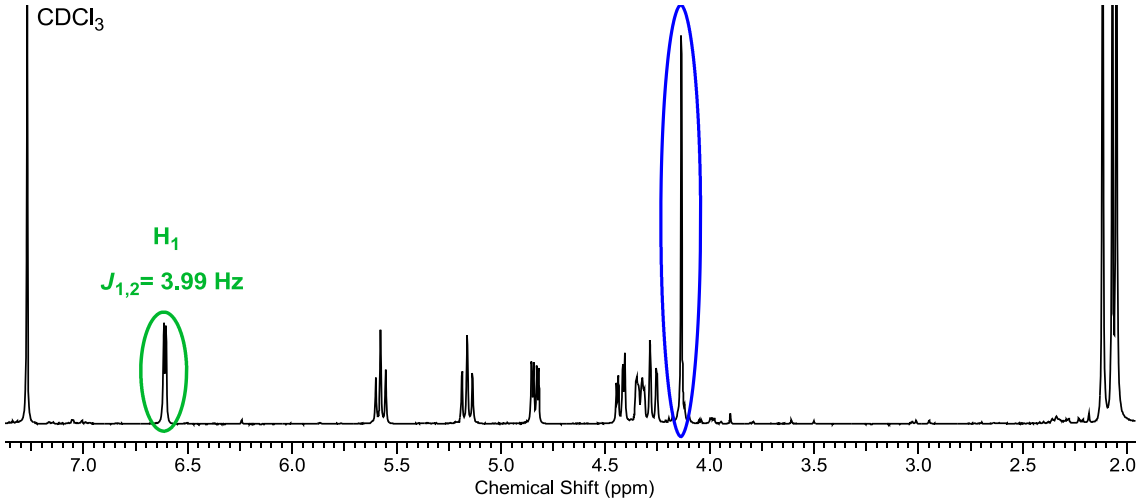
Η επιβεβαίωση της επίτευξης του τετάρτου βήματος, μπορεί να γίνει εύκολα με τη φασματοσκοπία NMR[39], καθώς, το φάσμα ^{1}H NMR της 2,3,4-τρι-O-ακετυλο-1-βρωμο-6-χλωροακετυλο-β-D-γλυκοπυρανόζης (15) διαφοροποιείται από το φάσμα της 1,2,3,4-τετρα-O-ακετυλο-6-χλωροακετυλο-β-D-γλυκοπυρανόζης (14). Εκτός από τη χαρακτηριστική κορυφή του μεθυλενίου της χλωροακετυλο ομάδας, μία χαρακτηριστική διπλή κορυφή για το ανωμερικό υδρογόνο υπάρχει επίσης και στα δύο προϊόντα, με τη διαφορά ότι, στο φάσμα της 2,3,4-τρι-O-ακετυλο-1-βρωμο-6-χλωροακετυλο-β-D-γλυκοπυρανόζης (15), εμφανίζεται σημαντικά μετατοπισμένη προς χαμηλότερο πεδίο, λόγω της σύνδεσης του ανωμερικού άνθρακα με το βρώμιο. Συγκεκριμένα, ενώ στο προϊόν (14) το ανωμερικό πρωτόνιο δίνει μία διπλή κορυφή στα 5.68 ppm, στο προϊόν (15), η κορυφή αυτή έχει μετατοπιστεί στα 6.60 ppm.

Ακόμη, από τη σταθερά σύζευξης της διπλής κορυφής του ανωμερικού υδρογόνου, αποδεικνύεται και επιβεβαιώνεται ότι η στερεοχημεία του προϊόντος ως προς το υδρογόνο αυτό, είναι αυτή που προαναφέρθηκε και ότι ο μηχανισμός που ακολουθήθηκε είναι S_N2, με αναστροφή κατά Walden. Συγκεκριμένα, στην περίπτωση της 1,2,3,4-τετρα-O-ακετυλο-6-χλωροακετυλο-β-D-γλυκοπυρανόζης (14), έχουμε $J_{1,2}$= *J*ax-ax= 8.3 Hz, ενώ στην περίπτωση της 2,3,4-τρι-O-ακετυλο-1-βρωμο-6-χλωροακετυλο-β-D-γλυκοπυρανόζη (15), έχουμε $J_{1,2}$= *J*eq-ax= 3.99 Hz.

Το φάσμα της 2,3,4-τρι-O-ακετυλο-1-βρωμο-6-χλωροακετυλο-β-D-γλυκοπυρανόζης (15) δίνεται στην Εικόνα 57, συγκριτικά και με το φάσμα της 1,2,3,4-τετρα-O-ακετυλο-6-χλωροακετυλο-β-D-γλυκοπυρανόζης (14) που παρατίθεται ξανά στην Εικόνα 56.



Εικόνα 56. *Φάσμα ^{1}H NMR της 1,2,3,4-τετρα-O-ακετυλο-6-χλωροακετυλο-β-D-γλυκοπυρανόζης (14), σε $CDCl_3$*



Εικόνα 57. *Φάσμα ^{1}HNMR της 2,3,4-τρι-O-ακετυλο-1-βρωμο-6-χλωροακετυλο-β-D-γλυκοπυρανόζης (15), σε $CDCl_3$*

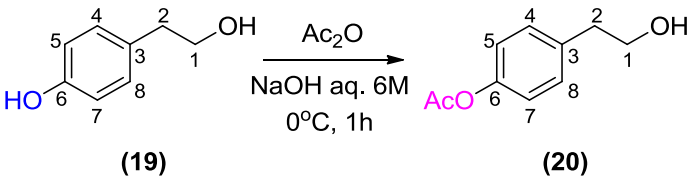
- Για το επόμενο στάδιο της σύνθεσης του νουζενίδη (11), απαιτήθηκε, όπως παρατίθεται στο συνθετικό σχήμα του Σχήματος 5, η εκλεκτική ακετυλίωση του φαινολικού υδροξυλίου της τυροσόλης (19). Η μέθοδος της ακετυλίωσης θα περιγραφεί εκ νέου στην υποενότητα III.3.c.1.

Για την εκλεκτική αυτή προστασία, στις περισσότερες περιπτώσεις χρησιμοποιείται ο οξικός ανυδρίτης ($(Ac)_2O$), σε αλκαλικό περιβάλλον καυστικού νατρίου (6M), στους 0^{o}C, καθώς η αντίδραση θεωρείται εξώθερμη και η θερμοκρασία δεν πρέπει να ξεπεράσει τους 10^{o}C. Η προσθήκη του οξικού ανυδρίτη γίνεται με προσοχή και σταδιακά, σε διάστημα μίας ώρας, σε παγόλουτρο και υπό ισχυρή ανάδευση, με το pH να διατηρείται στα 7-8.

Σ' αυτές τις συνθήκες ασθενούς αλκαλικού περιβάλλοντος, το φαινολικό υδροξύλιο είναι σε θέση να ιονιστεί, αντίθετα με το αλκοολικό υδροξύλιο. Κατά τη διεξαγωγή της αντίδρασης, ενδεχομένως να παρατηρηθεί η σταδιακή μετάβαση του αντιδρώντος μίγματος, από τη μορφή διαλύματος, σε ένα ιξώδες μίγμα (εξαιτίας της συσσώρευσης NaOAc στο μίγμα – αντιμετωπίζεται με προσθήκη κρύου νερού ή πάγου στο αντιδρών διάλυμα–), γεγονός που

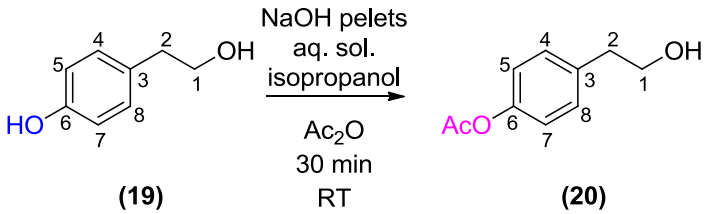
καθιστά δύσκολη την ανάδευση, και, αν δεν τηρηθούν οι προαναφερθείσες προφυλάξεις, είναι υπαρκτός ο κίνδυνος παραλαβής του διακετυλιωμένου προϊόντος.

Μετά από αντίδραση μίας ώρας από το τέλος της προσθήκης του ανυδρίτη, παραλαμβάνεται, κατόπιν εκχύλισης με EtOAc, πλύσης με υδατικό διάλυμα χλωριούχου νατρίου, ξήρανσης και εξάτμισης του διαλύτη, το επιθυμητό άχρωμο και ελαιώδες προϊόν, (20) *(Σχήμα 15)* [245], με απόδοση της τάξης του 80%. Αυτό είναι εκλεκτικά προστατευμένο και έτοιμο να χρησιμοποιηθεί στην αντίδραση γλυκοζυλίωσης που θα ακολουθήσει, κατά την οποία το φαινολικό υδροξύλιο παραμένει ακετυλιωμένο και αδρανές, ενώ το αλειφατικό δρα ως πυρηνόφιλο, δίνοντας ένα και μοναδικό αιθέρα. Στο Σχήμα 15 δίνεται η αντίδραση εκλεκτικής προστασίας του φαινολικού υδροξυλίου της τυροσόλης (19), από την οποία προκύπτει η αλκοόλη (20) που χρησιμοποιήθηκε για τη σύνθεση του επιθυμητού αιθέρα, στο επόμενο στάδιο της σύνθεσης του νουζενίδη (11).



Σχήμα 15. *Εκλεκτική ακετυλίωση φαινολικού υδροξυλίου τυροσόλης (19) (1ος τρόπος)*

Μια άλλη μέθοδος εκλεκτικής ακετυλίωσης του φαινολικού υδροξυλίου, που περιγράφηκε από τους Srivastava και συνεργάτες [246] δίνεται στο Σχήμα 16.



Σχήμα 16*. Εκλεκτική ακετυλίωση φαινολικού υδροξυλίου τυροσόλης (19) (2ος τρόπος)*

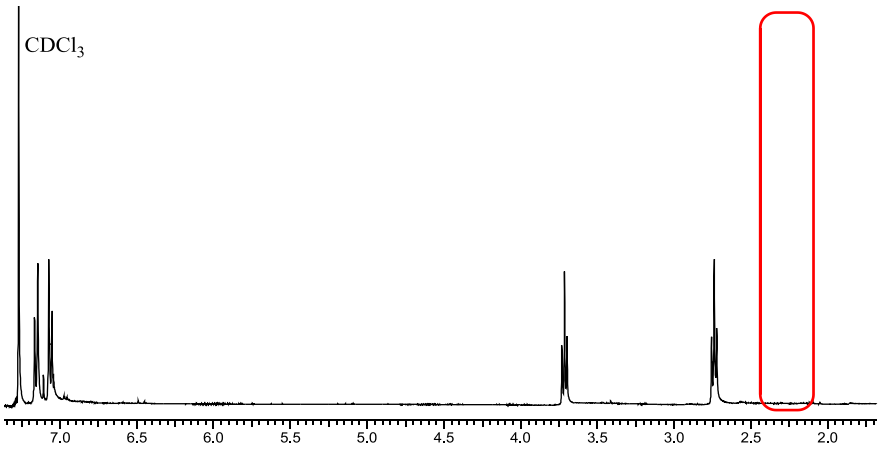
Η μέθοδος αυτή περιλαμβάνει και πάλι την προσθήκη NaOH και οξικού ανυδρίτη, εμπεριέχει όμως, επιπλέον, την προσθήκη ισοπροπανόλης στο αντιδρών μίγμα. Η αντίδραση λαμβάνει χώρα σε ένα διφασικό σύστημα υγρών φάσεων, που αποτελείται από υδατικό διάλυμα NaOH (στερεό NaOH διαλυμένο σε ελάχιστη ποσότητα νερού) και ισοπροπανόλη. Το pH του διαλύματος κυμαίνεται περίπου στο 7-8 (όπου και διατηρείται, κατά την σταδιακή προσθήκη του οξικού ανυδρίτη), επιτρέποντας τον ιονισμό εκλεκτικά του φαινολικού υδροξυλίου, όπως στην περίπτωση της πρώτης μεθόδου που περιγράφηκε. Το αντιδρών μίγμα αφήνεται προς ανάδευση, για 30 λεπτά, σε θερμοκρασία δωματίου και έπειτα η ισοπροπανόλη απομακρύνεται υπό κενό.

Ακολουθεί εκχύλιση με EtOAc, πλύση με νερό και υδατικό διάλυμα NaCl, μέχρι εξουδετέρωσης (pH~7), ξήρανση με άνυδρο Na_2SO_4 και τέλος, συμπύκνωση για παραλαβή του ελαιώδους, επιθυμητού προϊόντος, της 2-(4-ακετοξυ-φαινυλο) αιθανόλης (20).

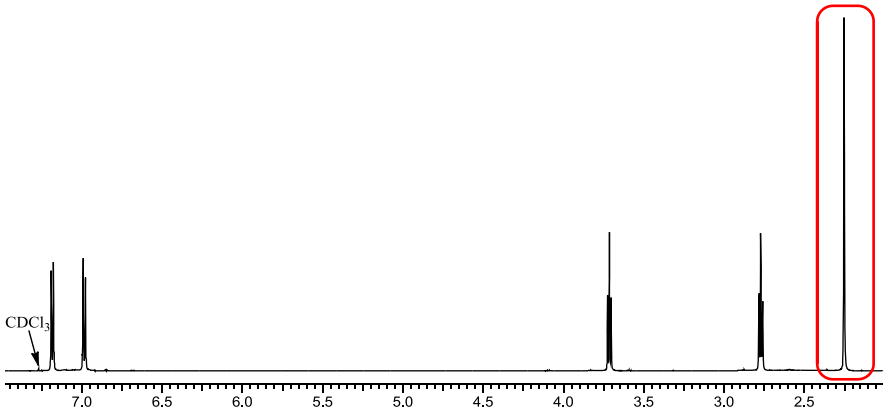
Με τον τρόπο αυτό - και αυτό είναι ένα σημείο στο οποίο πλεονεκτεί η μέθοδος αυτή της πρώτης – η εκλεκτική ακετυλίωση του φαινολικού υδροξυλίου, πραγματοποιείται σε μικρότερο χρονικό διάστημα και μάλιστα σε θερμοκρασία δωματίου, χωρίς να απαιτείται ψύξη του

αντιδρώντος μίγματος. Η απόδοση αυτής της μεθόδου είναι εξαιρετική, της τάξης του 95% και αυτό είναι ένα ακόμα πλεονέκτημά της έναντι της πρώτης.

Η εκλεκτική ακετυλίωση του φαινολικού υδροξυλίου έναντι του αλειφατικού, μπορεί να επιβεβαιωθεί, κατόπιν σύγκρισης των φασμάτων ^{1}H NMR της τυροσόλης (19) (*Εικόνα 58*) και της 2-(4-ακετοξυ-φαινυλο) αιθανόλης (20) (*Εικόνα 59*). Παρατηρούμε ότι στο φάσμα του (20), υπάρχει η χαρακτηριστική κορυφή της μεθυλομάδας του φαινολικού ακετυλίου, που απουσιάζει από το φάσμα της τυροσόλης (19).



Εικόνα 58. *Φάσμα ^{1}H NMR της τυροσόλης (19), σε $CDCl_3$*

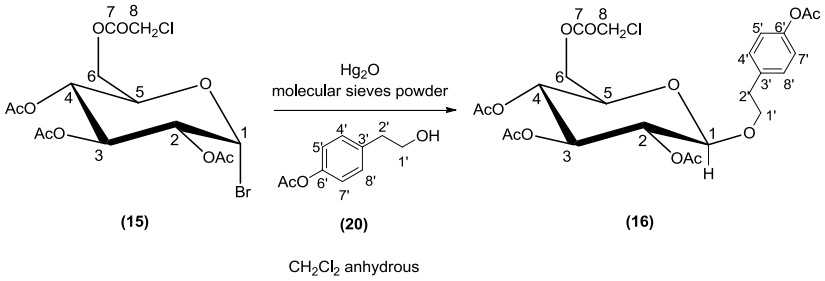


Εικόνα 59. *Φάσμα ^{1}H NMR της 2-(4-ακετοξυ-φαινυλο) αιθανόλης (20), σε $CDCl_3$*

Η 2-(4-ακετοξυ-φαινυλο) αιθανόλη (20), είναι το αντιδραστήριο που, σε μια αντίδραση πυρηνόφιλης υποκατάστασης, θα δώσει με την 2,3,4-τρι-*O*-ακετυλο-1-βρωμο-6-χλωροακετυλο-β-D-γλυκοπυρανόζη (15) τον επιθυμητό αιθέρα (16).

III.1.d.5. <u>Στάδιο 5^o</u>: Σύνθεση της 1-[2-(4-ακετοξυ-φαινυλο)αιθανόλη]-2,3,4-τρι-O-ακετυλο-6-χλωροακετυλο-β-D-γλυκοπυρανόζης (16)

III.1.d.5.1. Περιγραφή μεθόδου



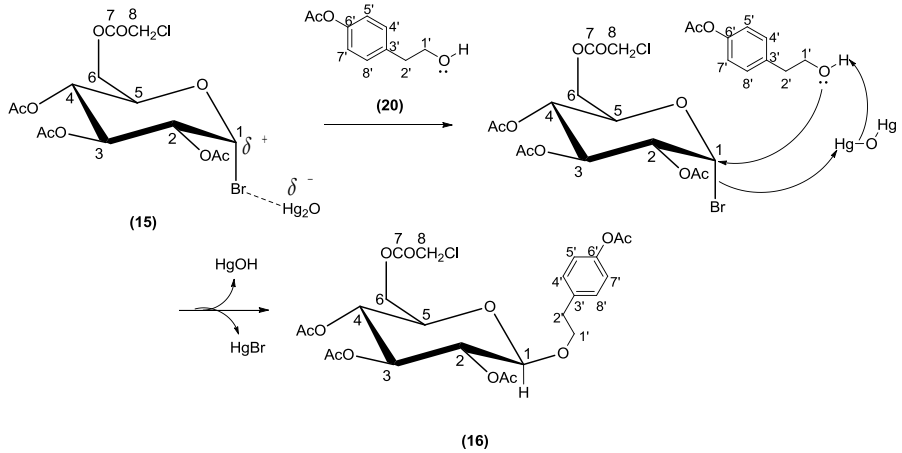
Το στάδιο αυτό της σύνθεσης του νουζενίδη (11), αξιοποιεί το βρωμιωμένο προϊόν του τετάρτου σταδίου (15), σε μία αντίδραση πυρηνόφιλης υποκατάστασης Koenigs-Knorr, με πυρηνόφιλο αντιδραστήριο την, επίσης συνθετική, 2-(4-ακετοξυ-φαινυλο) αιθανόλη (20).

Η αντίδραση Koenigs-Knorr [247] είναι μία αντίδραση υποκατάστασης μεταξύ ενός γλυκοζυλο-αλογονιδίου και μίας αλκοόλης, προς σχηματισμό ενός γλυκοσίδη. Είναι μία από της παλαιότερες και απλούστερες αντιδράσεις γλυκοζυλίωσης.

Μίγμα της 2,3,4-τρι-*O*-ακετυλο-1-βρωμο-6-χλωροακετυλο-β-D-γλυκοπυρανόζης (15) (βρωμίδιο) και της 2-(4-ακετοξυ-φαινυλο) αιθανόλης (20), διαλύεται σε άνυδρο διχλωρομεθάνιο και προστίθεται σε αυτό οξείδιο του υδραργύρου, Hg_2O και μοριακά κόσκινα σε μορφή πούδρας (molecular sieves powder), ώστε να εξασφαλιστούν όσο το δυνατό περισσότερο άνυδρες συνθήκες. (Ακόμη, για τον ίδιο λόγο, τα δύο κύρια αντιδρώντα συστατικά τοποθετήθηκαν, κατά τη διάρκεια της προηγούμενης, της αντίδρασης, νύχτας, σε αντλία κενού).

Το μίγμα αφήνεται να αντιδράσει για 15 ώρες, στο σκοτάδι και σε θερμοκρασία δωματίου. Προσθήκη χλωροφορμίου, διήθηση υπό κενό, πλύση με όξινο ανθρακικό νάτριο και νερό, ξήρανση με άνυδρο Na_2SO_4, συμπύκνωση υπό κενό και χρωματογραφία στήλης, έδωσε το επιθυμητό προϊόν, σε σχετικά ικανοποιητική απόδοση, της τάξης του 56%.

Η αντίδραση Koenigs-Knorr, όταν εκτελείται με χρήση (ως υποκινητών-καταλυτών), αλάτων βαρέων μετάλλων, όπως, εν προκειμένω, το οξείδιο του υδραργύρου, Hg_2O, ονομάζεται αλλιώς και μέθοδος Helferich [248]. Ο μηχανισμός της μεθόδου Helferich, λοιπόν, για το πέμπτο βήμα της σύνθεσης του νουζενίδη (11), δίνεται στο Σχήμα 17.



Σχήμα 17. *Προτεινόμενος μηχανισμός της μεθόδου Helfericheε, στο πέμπτο στάδιο της σύνθεσης του νουζενίδη (11).*

Στην πρώτη φάση του μηχανισμού, το οξείδιο του υδραργύρου «συντονίζεται» με το άτομο του βρωμίου και πολώνει τον δεσμό άνθρακα-βρωμίου. Έπειτα, συντελείται υποκατάσταση S_N2, που οδηγεί στον σχηματισμό του β-γλυκοσίδη, με ταυτόχρονη απελευθέρωση HgBr και HgOH.

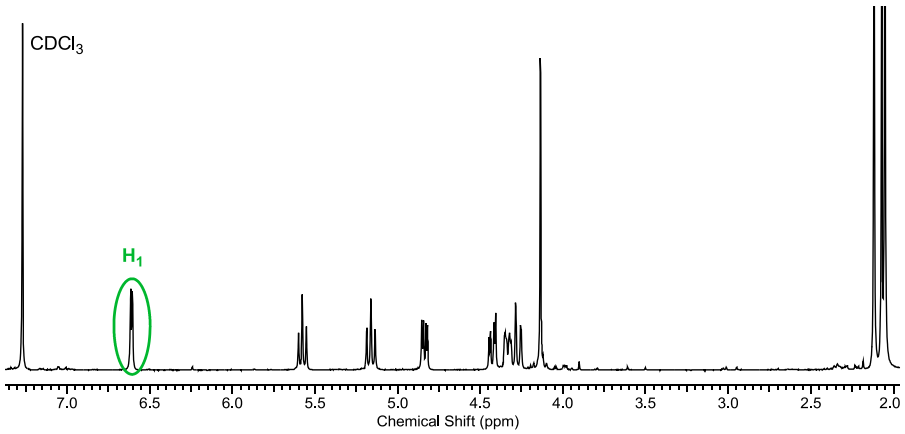
III.1.d.5.2. Μελέτη δομής

Η μελέτη της δομής του προϊόντος πέμπτου σταδίου της σύνθεσης του νουζενίδη (11), 1-[2-(4-ακετοξυ-φαινυλο)αιθανόλη]-2,3,4-τρι-O-ακετυλο-6-χλωροακετυλο-β-D γλυκοπυρανόζη (16), μπορεί να γίνει με χρήση της φασματοσκοπίας NMR[39] και του MS[43].

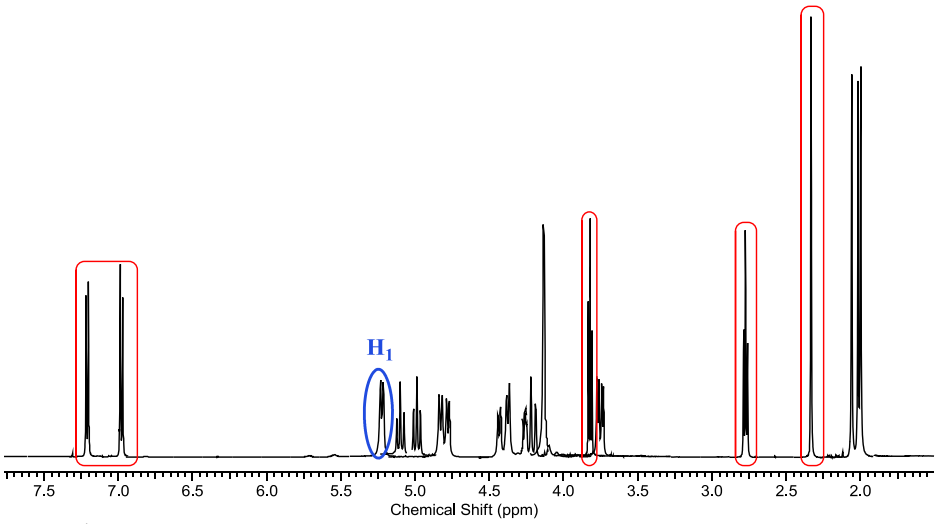
Συγκρίνοντας τα φάσματα ^{1}H NMR της 2,3,4-τρι-O-ακετυλο-1-βρωμο-6-χλωροακετυλο-β-D-γλυκοπυρανόζη (15) και της 1-[2-(4-ακετοξυ-φαινυλο) αιθανόλη]-2,3,4-τρι-O-ακετυλο-6-χλωροακετυλο-β-D-γλυκοπυρανόζης (16), στο φάσμα του (16), παρατηρούνται – εκτός από τις χαρακτηριστικές απλές κορυφές στα 2 ppm περίπου, που αντιστοιχούν στις μεθυλομάδες των

ακετυλίων και την απλή κορυφή στα 4 ppm περίπου, που αντιστοιχεί στο μεθυλένιο της χλωροακετυλο ομάδας – δύο διπλές κορυφές στην αρωματική περιοχή, στα 7.00 ppm και στα 7.21 ppm, που αντιστοιχούν στα πρωτόνια της ομάδας της 2-(4-ακετοξυ-φαινυλο) αιθανόλης (20) και δύο τριπλές κορυφές στα 2.82 ppm και 3.79 ppm, που αντιστοιχούν στα δύο μεθυλένια της ομάδας αυτής. Επιπλέον, το ανωμερικό πρωτόνιο, έχει μετατοπιστεί και πάλι σε τιμές υψηλότερου πεδίου, στα 5.24 ppm.

Στην Εικόνα 60 παρατίθεται και πάλι το φάσμα ^{1}H NMR της 2,3,4-τρι-O-ακετυλο-1-βρωμο-6-χλωροακετυλο-β-D-γλυκοπυρανόζης (15), χάριν ευκολίας στη σύγκριση με το φάσμα του (16) που δίνεται στην Εικόνα 61.



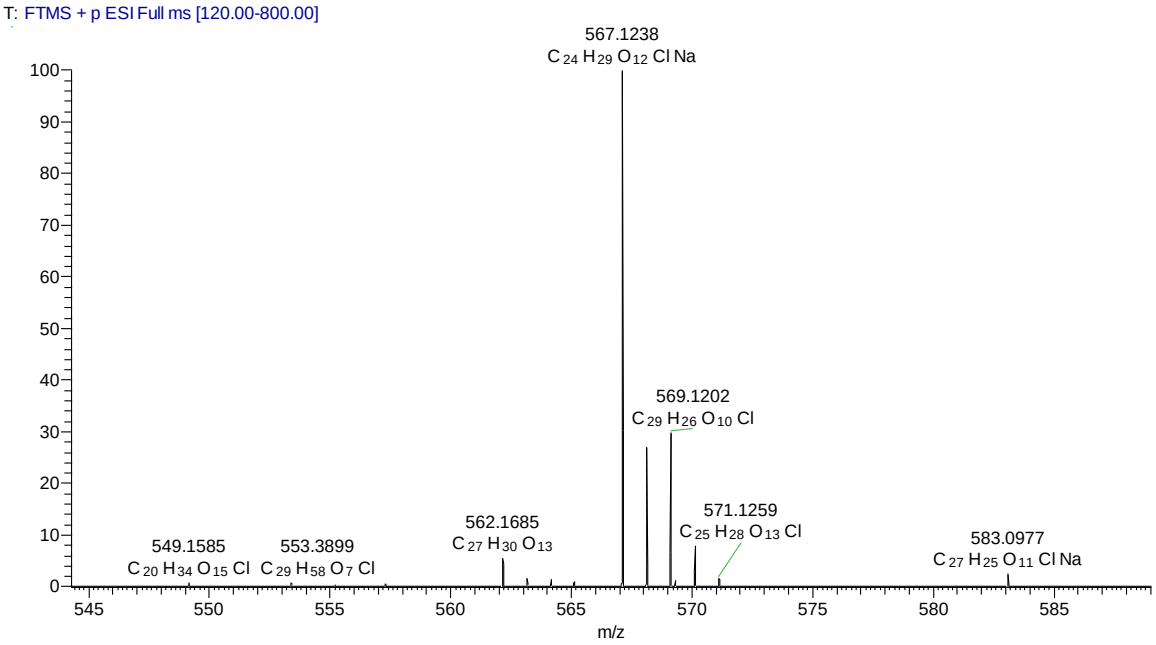
Εικόνα 60. *Φάσμα ^{1}H NMR της 2,3,4-τρι-O-ακετυλο-1-βρωμο-6-χλωροακετυλο-β-D-γλυκοπυρανόζης (15), σε $CDCl_3$*



Εικόνα 61. *Φάσμα ^{1}H NMR της 1-[2-(4-ακετοξυ-φαινυλο) αιθανόλη]-2,3,4-τρι-O-ακετυλο-6-χλωροακετυλο-β-D-γλυκοπυρανόζης (16), σε $CDCl_3$*

Στην Εικόνα 61, με κόκκινο σημειώνονται οι κορυφές που αντιστοιχούν στα πρωτόνια της 2-(4-ακετοξυ-φαινυλο) αιθανόλης (20). Το πρωτόνιο της ανωμερικής θέσης, ο άνθρακας του οποίου είναι συνδεδεμένος πλέον με δύο άτομα οξυγόνου και όχι με βρώμιο, έχει μετατοπιστεί στα 5.25 ppm, από τα 6.60 ppm, που ήταν στο φάσμα ^{1}H NMR της 2,3,4-τρι-O-ακετυλο-1-βρωμο-6-χλωροακετυλο-β-D-γλυκοπυρανόζης (15).

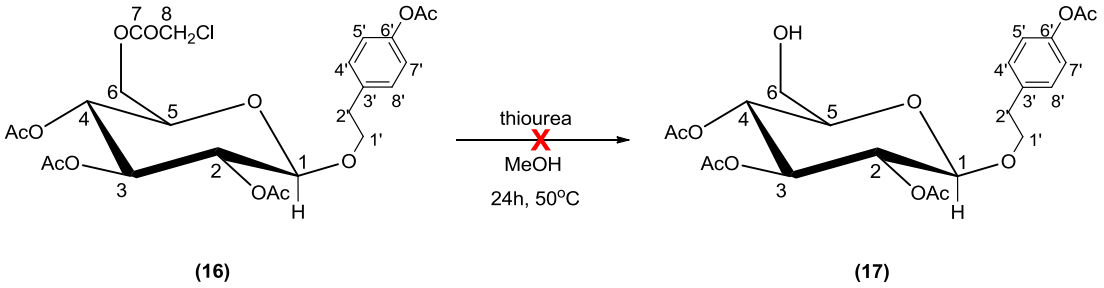
Η επιθυμητή δομή, επιβεβαιώνεται επίσης από τη φασματομετρία μάζας (*Εικόνα 62*), όπου παρατηρούνται 3 ισοτοπικές κορυφές, λόγω παρουσίας του ατόμου του χλωρίου στη δομή, με κύριο μοριακό ιόν, m/z =M+Na^+= 567.1238, που αντιστοιχεί στην επιθυμητή δομή.



Εικόνα 62. *Φάσμα μάζας της 1-[2-(4-ακετοξυ-φαινυλο) αιθανόλη]-2,3,4-τρι-O-ακετυλο-6-χλωροακετυλο-β-D-γλυκοπυρανόζης (16), προϊόντος πέμπου σταδίου της σύνθεσης του νουζενίδη (11).*

III.1.d.6. <u>Στάδιο 6ο</u>: Σύνθεση της 1-[2-(4-ακετοξυ-φαινυλο)αιθανόλη]-2,3,4-τρι-O-ακετυλο-β-D-γλυκοπυρανόζης

III.1.d.6.1. Περιγραφή μεθόδου



Σχήμα 18. *Αποτυχημένη απόπειρα αντίδρασης έκτου σταδίου της σύνθεσης του νουζενίδη (11).*

Στο στάδιο αυτό της ολικής σύνθεσης του νουζενίδη (11), επιχειρήθηκε η εκλεκτική αποπροστασία του OH της 6 θέσης, από την χλωροακέτυλο ομάδα που είχαμε εισάγει στο τρίτο στάδιο της σύνθεσης. Είναι γνωστό ότι διαφορετικές μέθοδοι προστασίας, απαιτούν συνήθως, τις αντίστοιχες μεθόδους αποπροστασίας. Επομένως, για την απόσπαση της χλωροακετυλο-ομάδας, υπάρχει εκλεκτικό αντιδραστήριο, σε συγκεκριμένες συνθήκες αντίδρασης, που μπορεί να χρησιμοποιηθεί.

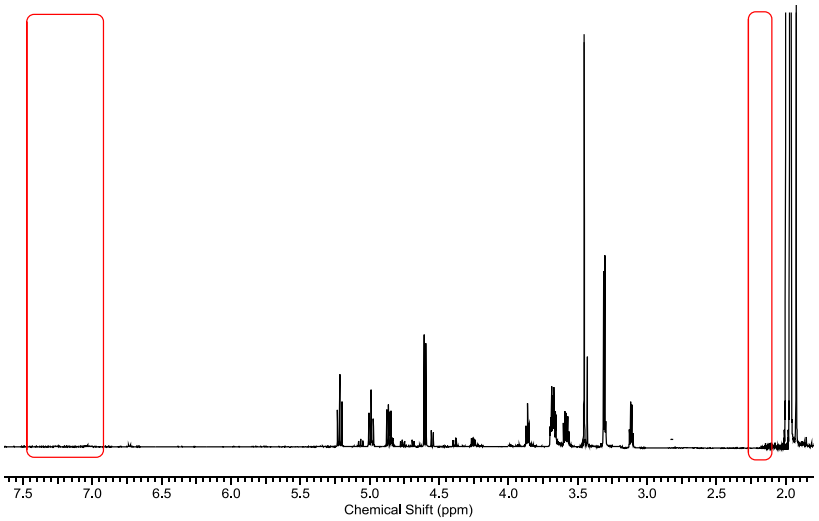
Οι Gagnaire και συνεργάτες, πρότειναν, εκτός από τη μέθοδο προστασίας του OH-6 με χρήση χλωροακετυλο χλωριδίου (υποενότητα III.1.d.3), την απόσπαση αυτής της ομάδας, με χρήση θειουρίας και το σχηματισμό και πάλι, του ελεύθερου υδροξυλίου στη θέση 6 [244], ώστε αυτό να δύναται να συμμετάσχει στην εστεροποίηση που ακολουθεί, στο έβδομο στάδιο της σύνθεσης.

Οι Gagnaire και συνεργάτες, αναφέρουν την επίτευξη της αντίδρασης, με απόδοση 60%, ως προς την 1-[2-(4-ακετοξυ-φαινυλο)αιθανόλη]-2,3,4-τρι-O-ακετυλο-β-D-γλυκοπυρανόζη (17), αλλά με ταυτόχρονο σχηματισμό ενός παραπροϊόντος, η συγκέντρωση του οποίου, στο αντιδρών

μίγμα, αυξάνεται με την πάροδο του χρόνου, με την 1-[2-(4-ακετοξυ-φαινυλο) αιθανόλη]-2,3,4-τρι-Ο-ακετυλο-6-χλωροακετυλο-β-D-γλυκοπυρανόζη (16), να έχει καταναλωθεί πλήρως. Θέρμανση για περαιτέρω χρονικό διάστημα, επιφέρει μετατροπή όλου του επιθυμητού προϊόντος (17), σε παραπροϊόν ή παραπροϊόντα, πιθανότατα με αποπροστατευμένα περισσότερα του ενός υδροξύλια και με κάποιες ακετυλο ομάδες να έχουν αποσπαστεί από το μόριο. Οι Gagnaire και συνεργάτες ισχυρίζονται την αδυναμία επίτευξης πλήρους μετατροπής της 1-[2-(4-ακετοξυ-φαινυλο) αιθανόλη]-2,3,4-τρι-Ο-ακετυλο-6-χλωροακετυλο-β-D-γλυκοπυρανόζης (16) στην 1-[2-(4-ακετοξυ-φαινυλο)αιθανόλη]-2,3,4-τρι-Ο-ακετυλο-β-D-γλυκοπυρανόζη (17), με μόνη αποπροστατευμένη υδροξυλομάδα, αυτή της θέσης 6.

III.1.d.6.2. Μελέτη δομής

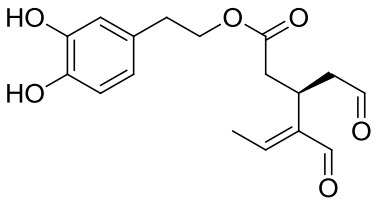
Η εφαρμογή της παραπάνω μεθόδου δεν έφερε, στην περίπτωσή μας, τα επιθυμητά αποτελέσματα. Μετά την κατεργασία του αντιδρώντος μίγματος, τον έλεγχο με χρωματογραφία λεπτής στιβάδας και τον καθαρισμό με χρωματογραφία στήλης, παρατηρήθηκε διαχωρισμός περισσοτέρων από ένα προϊόντων, κανένα εκ των οποίων δεν ανταποκρινόταν φασματοσκοπικά στο επιθυμητό προϊόν (17). Συγκεκριμένα, το κυριότερο δείγμα για την αποτυχία αυτού του σταδίου της σύνθεσης, αποτελεί η απουσία των χαρακτηριστικών κορυφών, των αρωματικών πρωτονίων της 2-(4-ακετοξυ-φαινυλο) αιθανόλης (20), από το φάσμα ^{1}H NMR του προϊόντος (*Εικόνα 63*).



Εικόνα 63. *Φάσμα ^{1}H NMR (σε $(CD_3)_2CO$) ενός εκ των προϊόντων της αντίδρασης αποπροστασίας του ΟΗ-6, από την χλωροακετυλο ομάδα.*

Η αντίδραση αυτού του σταδίου επιχειρήθηκε αρκετές φορές, χωρίς όμως να καταφέρουμε να φτάσουμε στο επιθυμητό προϊόν (17). Ως εκ τούτου, η σύνθεση του νουζενίδη (11), είναι ένας στόχος που δεν κατάφερε να ολοκληρωθεί, καθώς επιτεύχθηκαν μόνο τα πέντε από τα οκτώ, συνολικά, βήματα για την ολική σύνθεση του φυσικού αυτού προϊόντος.

Για το λόγο αυτό, τα βήματα 7 και 8 της σύνθεσης δε θα περιγραφούν.


HO
HO
O
O
O
O

III.2 *Ημισύνθεση της ολεασίνης, με πρώτη ύλη την ελαιοευρωπεΐνη*

III.2.a *Εισαγωγή – Περιγραφή μεθόδου*

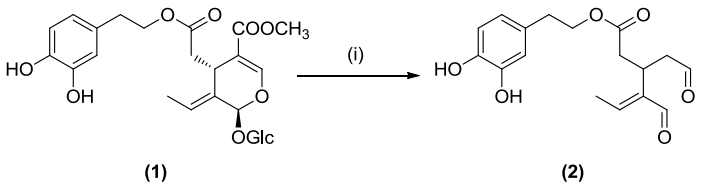
Η ολεασίνη (2) είναι ένα συστατικό του ελαιολάδου, στο οποίο η πρόσβαση, φυτοχημικά, όπως προαναφέρθηκε στο Κεφάλαιο ΙΙ.3, είναι μία ιδιαίτερα χρονοβόρα διαδικασία, λόγω της πολυπλοκότητας του προφίλ του ελαιολάδου και του εύρους των δευτερογενών μεταβολιτών που συνυπάρχουν με την ολεασίνη (2), σε αυτό. Επιπλέον, η αναγκαιότητα για υψηλής καθαρότητας ολεασίνη (2), καθιστά ολοένα και πιο απαραίτητη την εύρεση εναλλακτικών πηγών ή μεθόδων πρόσβασης σε αυτή.

Όπως προαναφέρθηκε στο κεφάλαιο Ι, η ολεασίνη (2) είναι στενά συνδεδεμένη δομικά με την ελαιοευρωπεΐνη (1), η οποία με τη σειρά της, αποτελεί συστατικό που συναντάται σε αφθονία στα φύλλα της *Olea europaea*. Εκμεταλλευόμενοι, λοιπόν, την σημαντική αυτή πηγή ελαιοευρωπεΐνης (1) και σύμφωνα με την μελέτη των Βουγογιαννοπούλου και συνεργατών [188], οδηγηθήκαμε στην ημισύνθεση της ολεασίνης (2), με πρώτη ύλη ελαιοευρωπεΐνη (1), σε ένα και μόνο βήμα και σε συνθήκες αντίδρασης αποκαρβοξυλίωσης Krapcho [211].

Οι συνθήκες της αντίδρασης Krapcho, συνήθως περιλαμβάνουν υψηλές θερμοκρασίες (> 130° C) και ανόργανα άλατα (π.χ. NaCl), σε υδατικό διάλυμα DMSO. Κατά τη θέρμανση της ελαιοευρωπεΐνης (1) στους 150° C, πραγματοποιείται υδρόλυση της χαρακτηριστικής ομάδας του σακχάρου.

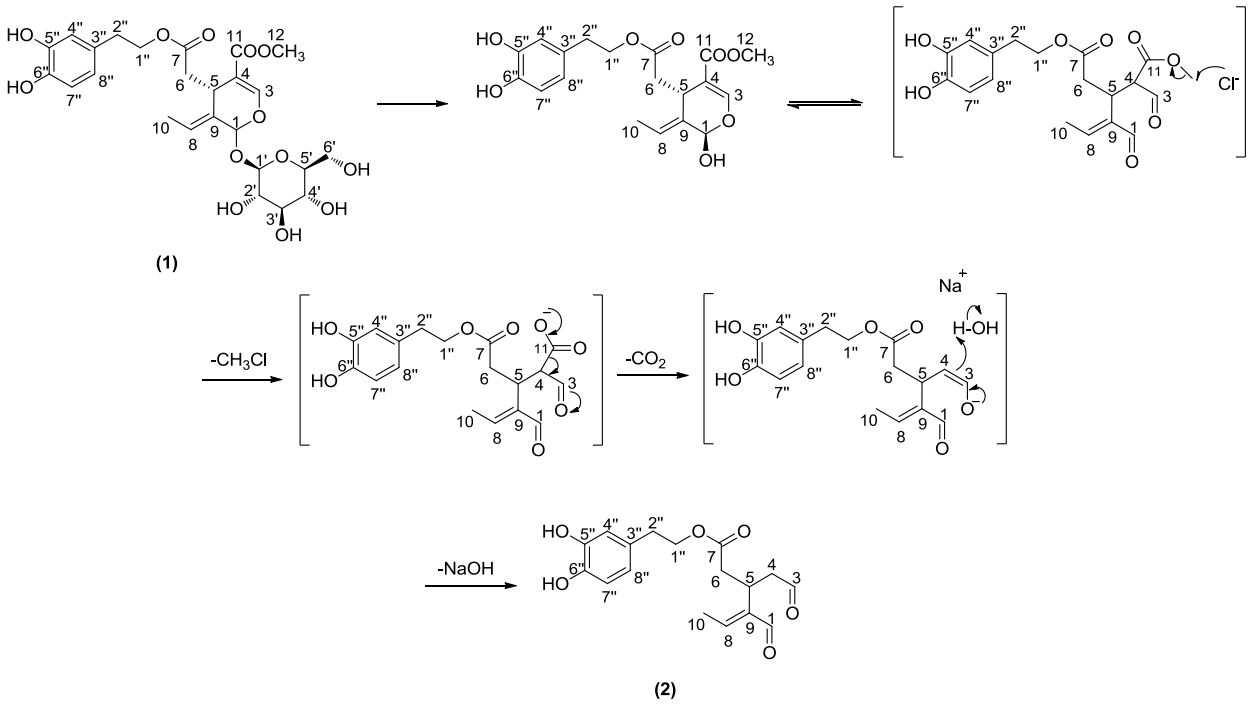
Η αποκαρβοξυλίωση Krapcho εφαρμόστηκε προκειμένου να εκτελεστεί η απογλυκοζυλίωση, με ταυτόχρονο άνοιγμα του ολεοσιδικού δακτυλίου και απομάκρυνση της καρβοξυμεθοξυ ομάδας της ελαιοευρωπεΐνης (1) και όλα αυτά σε ένα στάδιο. Αυτή η αντίδραση χρησιμοποιείται για την απομάκρυνση της καρβοξυμεθοξυ ομάδας των β-κετο εστέρων [249, 250], ενώ είναι σημαντικό, ότι η ημιακετάλη που σχηματίζεται, βρίσκεται σε ισορροπία με την ανοιχτή διαλδεϋδική μορφή.

Η ημισυνθετική αντίδραση που ακολουθήθηκε για την παραλαβή της ολεασίνης (2), από την ελαιοευρωπεΐνη (1), δίνεται στο Σχήμα 19:



Σχήμα 19. *Συνθήκες αντίδρασης για την αποκαρβοξυλίωση Krapcho στην ελαιοευρωπεΐνη (1), προς σχηματισμό ολεασίνης (2). i) NaCl., DMSO, H_2O, 150°C*

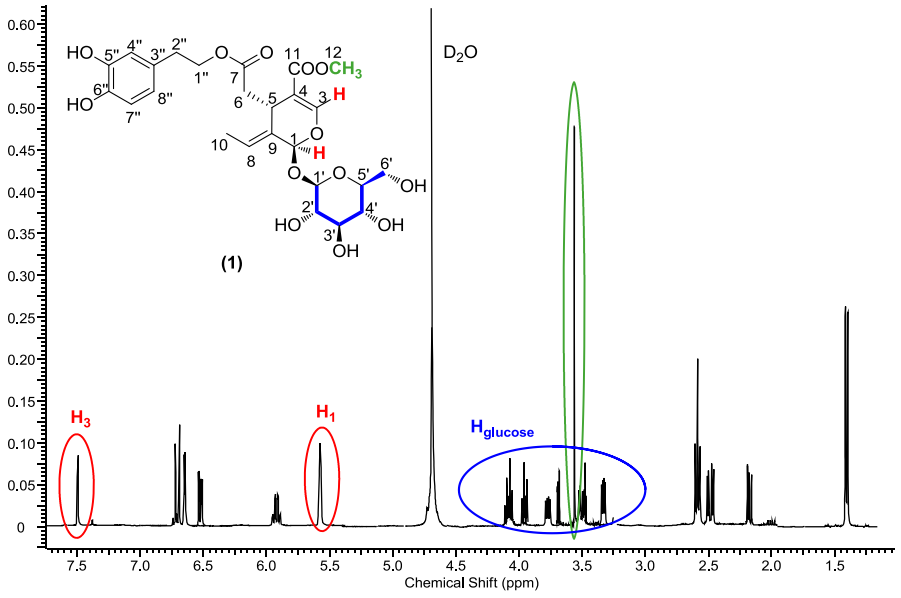
Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία [250], [188], ο μηχανισμός της αντίδρασης προτείνεται ως εξής: Το πρώτο στάδιο της αντίδρασης περιλαμβάνει την υδρόλυση, όπως προαναφέρθηκε, της ομάδας του σακχάρου, κατά τη θέρμανση της ελαιοευρωπεΐνης (1) στους 150°C. Το δεύτερο στάδιο του μηχανισμού της αντίδρασης, ακολουθεί μια κλασική οδό BAL2, όπου το χλωριούχο ιόν επιτίθεται στην αλκοξυ ομάδα της 11 θέσης (C_{12}), με αποτέλεσμα να σχηματίζεται ένα β-κετο οξύ, το οποίο υφίσταται, στο τρίτο, πλέον, στάδιο, μια απλή αποκαρβοξυλίωση, δίνοντας το τελικό προϊόν, την ολεασίνη (2), σε απόδοση 35%. Σχηματική αναπαράσταση του μηχανισμού δίνεται στο Σχήμα 20.



Σχήμα 20. *Υπόθεση για το μηχανισμό της αντίδρασης αποκαρβοξυλίωσης Krapcho, στην ελαιοευρωπεΐνη (1)* [188].

III.2.b *Μελέτη δομής*

Η δομή της ολεασίνης (2), ταυτοποιείται με χρήση της φασματοσκοπίας NMR[39], και διαφοροποιείται από αυτή της ελαιοευρωπεΐνης (1), η οποία εμφανίζει μία χαρακτηριστική απλή κορυφή στα 3.63 ppm, των 3Η της μεθοξυ ομάδας της θέσης 11, χαρακτηριστικές κορυφές των Η του γλυκοσιδικού τμήματος, στην περιοχή από 3.25 – 4.25 ppm, καθώς επίσης και δύο απλές κορυφές, περίπου στα 5.5 ppm η μία και στα 7.5 ppm η άλλη, που αντιστοιχούν στα H_1 και H_3, αντιστοίχως (*Εικόνα 64*).

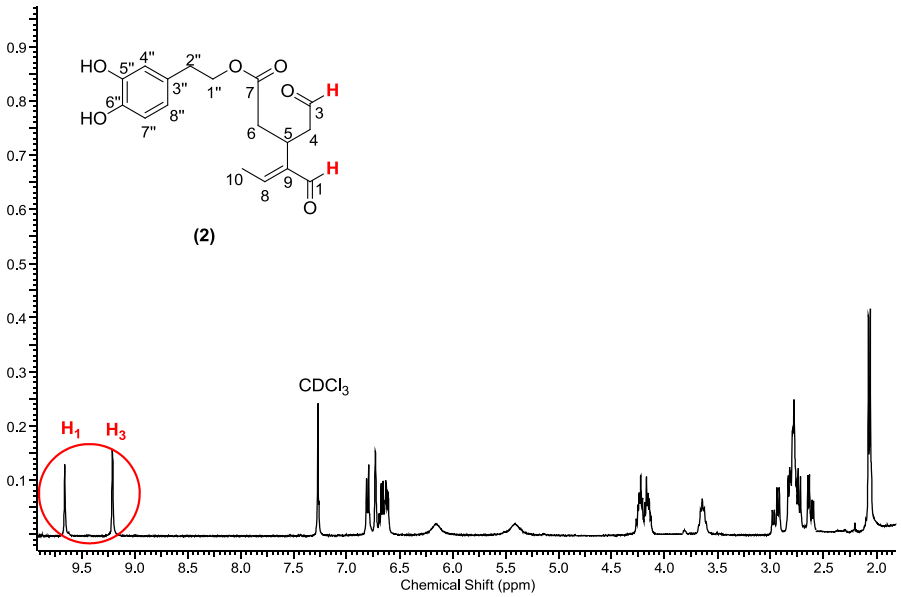


Εικόνα 64. *Φάσμα ^{1}H NMR (600MHz) της ελαιοευρωπεΐνης (1), σε D_2O*

Σύμφωνα, λοιπόν, με το φάσμα της ολεασίνης (2) (*Εικόνα 65*), υπάρχουν σημαντικές διαφορές με αυτό της ελαιοευρωπεΐνης (1), καθώς οι αντίστοιχες κορυφές των H_1 και H_3 είναι

μετατοπισμένες σε τιμές 9.65 και 9.20 ppm, αντιστοίχως, ενώ απουσιάζουν οι χαρακτηριστικές κορυφές των πρωτονίων του σακχάρου και των 3H της μεθοξυ ομάδας της θέσης 11. Οι διαφορές αυτές οφείλονται, αφ' ενός, στην υδρόλυση της χαρακτηριστικής ομάδας του σακχάρου, που πραγματοποιείται κατά τη θέρμανση της ελαιοευρωπεΐνης (1) στους 150° C, αφ' ετέρου, στην αποκαρβοξυμεθυλίωση που συντελείται στο δεύτερο στάδιο του μηχανισμού της αντίδρασης Krapcho.

Το μόνο δομικά κοινό σημείο της ολεασίνης (2) με την ελαιοευρωπεΐνη (1) είναι οι χαρακτηριστικές κορυφές του τμήματος της υδροξυτυροσόλης (4), σε παρόμοιες χημικές μετατοπίσεις.

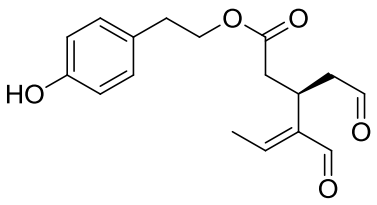


Εικόνα 65. *Φάσμα ^{1}H NMR (600MHz) της ολεασίνης (2), σε $CDCl_3$*

III.2.c *Απόλυτη στερεοχημεία της ολεασίνης, ως προϊόν ημισύνθεσης της ελαιοευρωπεΐνης*

Στα πλαίσια του προσδιορισμού της οπτικής καθαρότητας της ολεασίνης (2), μετρήθηκε η στροφική ικανότητα αυτής, ως προϊόν ημισύνθεσης, με πρώτη ύλη την ελαιοευρωπεΐνη (1). Χρησιμοποιήθηκε δείγμα καθαρότητας >90% και συγκέντρωσης 0.108 g/ 100 mL και διαλύτης $CHCl_3$. Η τιμή της στροφικής ικανότητας του δείγματος ήταν $[a_D]^{20} = -4.62$, ενώ η τιμή αυτή, συγκρινόμενη με την τιμή της στροφικής ικανότητας του, απομονωμένου από το εξαιρετικά παρθένο ελαιόλαδο, δείγματος ολεασίνης (2), όπως περιγράφηκε στην ενότητα II.2.d, υποδεικνύει ότι από την αντίδραση ημισύνθεσης της ολεασίνης (2) από ελαιοευρωπεΐνη (1), μόνο ο σχηματισμός του (-) εναντιομερούς ευνοείται.

Η τιμή αυτή, ωστόσο, συμφωνεί αφ' ενός με την τιμή που προτείνουν οι Smith και συνεργάτες [251], ως προς τον ευνοϊκό σχηματισμό του (-) εναντιομερούς, της συνθετικής ολεασίνης (2).


HO
O
O
O
O

III.3. Ημισύνθεση της ολεοκανθάλης, με πρώτη ύλη την ελαιοευρωπεΐνη

III.3.a. Εισαγωγή

Η συγκέντρωση της ολεοκανθάλης (3) στο εξαιρετικά παρθένο ελαιόλαδο είναι αρκετά μεταβλητή και κυμαίνεται από 0.2 mg/ kg έως 498 mg/ kg. Η διαβάθμιση της τιμής αυτής, εξαρτάται από την μέθοδο ελαιοποίησης, τη γεωγραφική προέλευση και ποικιλία της ελιάς, τις καλλιεργητικές τεχνικές, τον βαθμό ωρίμανσης και τις συνθήκες αποθήκευσης. Ενδεικτικά αναφέρεται ότι, στις Ηνωμένες Πολιτείες Αμερικής έχουν παρατηρηθεί τιμές 22.6 ± 0.6 mg/ kg, ενώ στην Ιταλία 191.8 ± 2.7 mg/ kg.

Συγκεκριμένα, το υπερβολικό πότισμα του ελαιόδενδρου, είναι γνωστό ότι ελαττώνει την περιεκτικότητα σε ολεοκανθάλη (3). Ενδεικτικά, ελαιόδενδρα με ρυθμό άρδευσης 46 mm νερού ανά έτος έδωσαν συγκέντρωση 50.9 ± 6.5 mg/ kg σε ολεοκανθάλη (3), σε αντίθεση με αυτά ρυθμού άρδευσης 259 mm νερού ανά έτος, που έδωσαν συγκέντρωση 23.1 ± 1.3 mg/ kg. Επίσης, η προχωρημένη ωρίμανση του ελαιόκαρπου, δεν ευνοεί την περιεκτικότητα, σε ολεοκανθάλη (3), του ελαιολάδου. Αν το διάστημα που μεσολαβεί ανάμεσα σε δύο χρόνους συλλογής είναι μεγαλύτερο από το ενδεδειγμένο, η περιεκτικότητα σε ολεοκανθάλη (3) του ελαιολάδου μπορεί να σημειώσει πτώση από 20 έως 54%. Ενδιαφέρον έχει η παρατήρηση ότι, όταν η σύνθλιψη του καρπού για την παραγωγή ελαιολάδου γίνεται μαζί με τον ελαιοπυρήνα, η απόδοση σε ολεοκανθάλη (3) είναι μικρότερη απ' ότι στις περιπτώσεις όπου έχει αφαιρεθεί ο πυρήνας· 43.8 ± 3.1 mg/ kg έναντι 54.8 ± 3.1 mg/ kg, αντιστοίχως. Πιθανή εξήγηση αυτού του φαινομένου, είναι η οξειδωτική δράση του ενζύμου υπεροξειδάση, που προέρχεται από τον πυρήνα.

Όλοι οι παραπάνω παράγοντες είναι ικανοί να επιφέρουν σημαντική ελάττωση στην περιεχόμενη ποσότητα ολεοκανθάλης (3) στο ελαιόλαδο, γεγονός που δυσχεραίνει το έργο του αναλυτή, κατά την απομόνωσή της με χρήση φυτοχημικών μεθόδων, από το πολυφαινολικό εκχύλισμα του ελαιολάδου. Επιπλέον, όπως στην περίπτωση της ολεασίνης (2), το εξαιρετικά ευρύ φάσμα φαινολικών συστατικών, με παρόμοιες, συχνά, φυσικοχημικές ιδιότητες με αυτές της ολεοκανθάλης (3), καθιστά το έργο του αναλυτή δυσκολότερο, κατά τον διαχωρισμό της. Ως εκ τούτου, η εύρεση εναλλακτικών μεθόδων πρόσβασης σ' αυτή, είναι καταλυτικής σημασίας, με απώτερο σκοπό την σύσταση μίας «βιβλιοθήκης» νέων δομικών αναλόγων ολεοκανθάλης (3), τη μελέτη των σχέσεων δομής – δράσης αυτών και τη βιολογική τους αξιολόγηση. Τα νέα αυτά δομικά ανάλογα θα μπορούσαν κάλλιστα να δημιουργήσουν μία νέα γενιά, πολλά υποσχόμενων NSAID[32] φαρμάκων, με λιγότερες ανεπιθύμητες δράσεις, σε σχέση με τα υπάρχοντα στην αγορά αντιφλεγμονώδη.

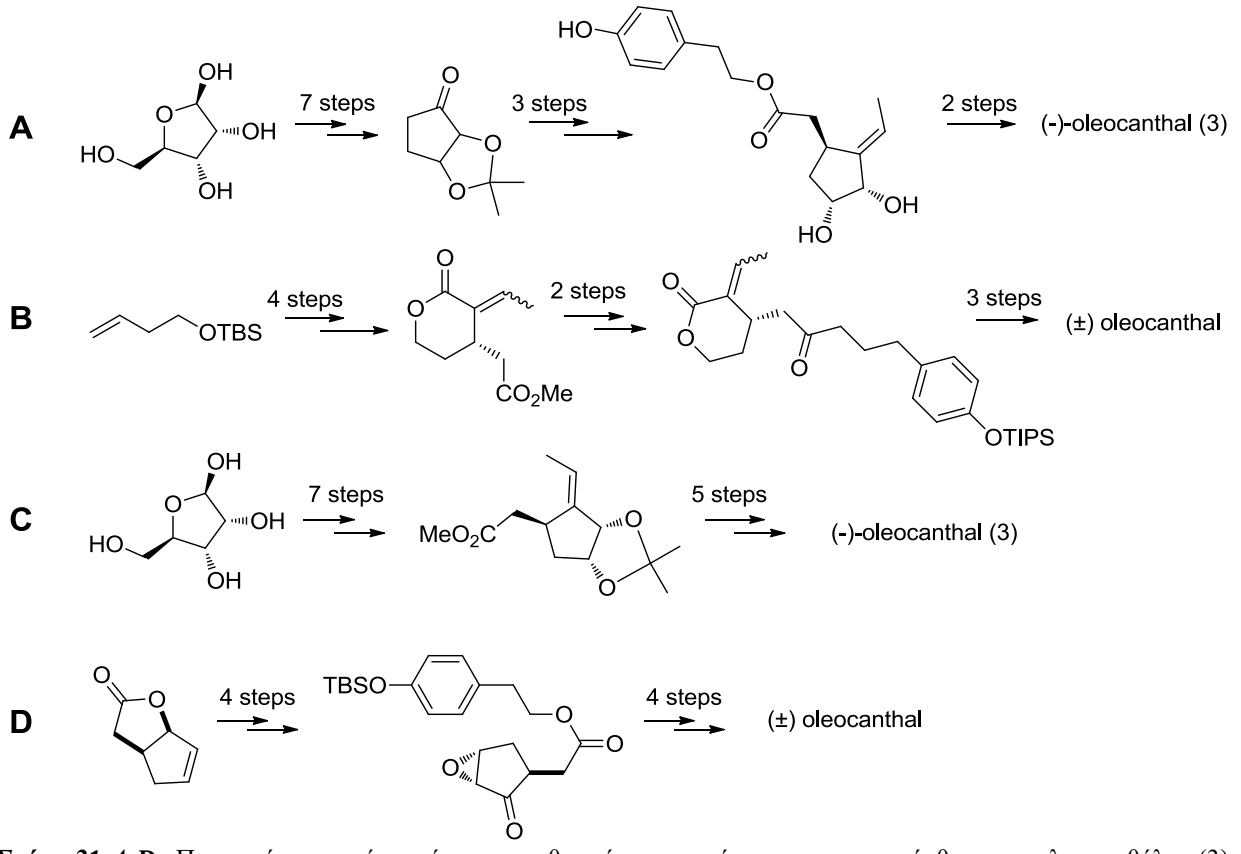
Το μεγάλο ενδιαφέρον για αυτό το προϊόν υψηλής προστιθέμενης αξίας, ενέπνευσε την ανάπτυξη διαφόρων συνθετικών προσεγγίσεων την τελευταία δεκαετία, με κοινό χαρακτηριστικό τους την ολική σύνθεση πολλών σταδίων. Η πρώτη προσέγγιση πραγματοποιήθηκε το 2007 από την ερευνητική ομάδα των Smith και συνεργατών [251]. Ο Smith πρότεινε μία ημισυνθετική πορεία 12 σταδίων, συνολικής απόδοσης 14%, που, με πρώτη ύλη την εμπορικά διαθέσιμη D-λυξόζη και ενδιάμεσα στάδια που περιελάμβαναν την τροποποίηση της κυκλοπεντανόνης και την οξείδωσή της σε ανοιχτή διαλδεϋδική δομή, οδηγούσε στο σχηματισμό, του φυσικού εναντιομερούς (-) ολεοκανθάλης (3) (*Σχήμα 21-Α*).

Δύο χρόνια αργότερα, οι English και συνεργάτες πραγματοποίησαν την ημισύνθεση του ρακεμικού μίγματος των (+) και (-) εναντιομερών της ολεοκανθάλης (3), μέσω μίας ημισυνθετικής πορείας 9 σταδίων, βασιζόμενης στο άνοιγμα ενός σεκολογανικού παραγώγου, που προέκυψε μέσω διαδοχικής κυκλοποίησης Michael/ αντίδρασης σχηματισμού ολεφίνης Horner- Woodworth-Emmons (*Σχήμα 21-B*) [252]. Αυτή η σύνθεση, αν και βραχύτερη, βρήκε περιορισμό, λόγω έλλειψης ελέγχου της στερεοχημείας, κατά τη διάρκεια του βασικού σταδίου κυκλοποίησης που οδήγησε στο ρακεμικό μίγμα της (±) -ολεοκανθάλης (3).

Ακόμα πιο πρόσφατα, το 2012, οι Takahashi και συνεργάτες εισήγαγαν μία νέα προσέγγιση στη σύνθεση της (-) ολεοκανθάλης (3), με πρώτη ύλη το σάκχαρο D-ριβόζη. Σημείο κλειδί ενός κομβικού βήματος αυτής της ημισυνθετικής πορείας, αποτελεί το ιωδιούχο σαμάριο, το οποίο χρησιμοποιήθηκε ως καταλύτης της ενδομοριακής αντίδρασης σύζευξης μεταξύ ενός βρωμοαλκυνίου και ενός α, β- ακόρεστου εστέρα, παρέχοντας έναν χαρακτηριστικό πενταμελή καρβοκυκλικό ή ετεροκυκλικό δακτύλιο, με υψηλή διαστερεοεκλεκτικότητα και εξαιρετικές αποδόσεις [253], ως ενδιάμεσο προϊόν (*Σχήμα 21-C*).

Η πιο πρόσφατη μελέτη, ένα χρόνο μετά, ήταν αυτή των Valli και συναδέλφων [254], οι οποίοι περιέγραψαν την ολική σύνθεση ρακεμικού μίγματος των (+) και (-) εναντιομερών της ολεοκανθάλης (3), μέσω μιας εποξυκυκλοπεντανόνης, ως βασικού ενδιαμέσου προϊόντος, σε 8 μόλις βήματα και με συνολική απόδοση 9%, με άμεσα διαθέσιμα συστατικά, ως πρώτες ύλες (*Σχήμα 21-D*).

Επιπλέον, ανάλυση του προκύπτοντος ρακεμικού μίγματος, με χρήση χειρόμορφης στήλης HPLC[36], παρείχε μεμονωμένα, τα δύο εναντιομερή της ολεοκανθάλης (3), για την πραγματοποίηση εξατομικευμένων βιολογικών μελετών.



Σχήμα 21-A-D. Προτεινόμενες, μέχρι σήμερα, συνθετικές προσεγγίσεις για την ημισύνθεση της ολεοκανθάλης (3).

Παρά την κομψότητα των προτεινόμενων, μέχρι σήμερα, συνθετικών προσεγγίσεων, βασικό τους μειονέκτημα αποτελεί η έλλειψη ευελιξίας, ιδιαίτερα όταν απώτερος στόχος είναι ο σχηματισμός αναλόγων, για την ανάπτυξη φαρμακευτικών παραγόντων.

Στην παρούσα διατριβή, όπως προαναφέρθηκε στο κεφάλαιο ΙΙΙ.2, καταφέραμε να εκτελέσουμε την ημισύνθεση της ολεασίνης (2), από την ελαιοευρωπεΐνη (1), υπό δραστικές συνθήκες αποκαρβοξυλίωσης. Παρόλα αυτά, αντίστοιχες απόπειρες σύνθεσης της ολεοκανθάλης (3), στις ίδιες συνθήκες (υποενότητα ΙΙΙ.2.a) και με πρώτη ύλη τον λιγκστροσίδη (21), αντί της ελαιοευρωπεΐνης (1), δεν απέδωσαν το επιθυμητό αποτέλεσμα.

Ενδιαφέρον, ωστόσο, παρουσιάζει προηγούμενη μελέτη, των Lo Scalzo και συνεργατών [32], που περιγράφει την ημισύνθεση της ολεασίνης (2), μέσω επώασης της δεμεθυλο-ελαιοευρωπεΐνης, απομονωμένης από μαύρους ελαιόκαρπους, με το ένζυμο β-γλυκοσιδάση.

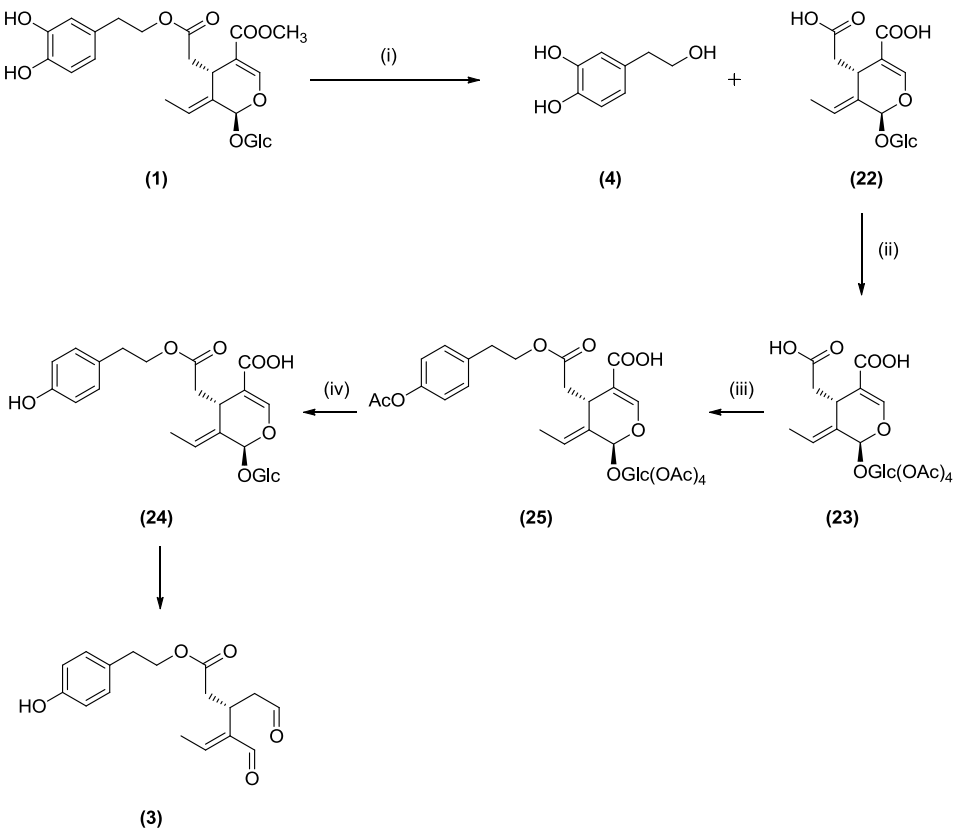
Νέες προσπάθειες σύνθεσης της ολεοκανθάλης (3) ακολούθησαν, με επιτυχημένη προσέγγιση να αποδεικνύεται τελικά μία ημισυνθετική πορεία 5 σταδίων, με πρώτη ύλη την ελαιοευρωπεΐνη (1) και συνολική απόδοση 16%.

Οραματιστήκαμε ως πρόδρομη ένωση της ολεοκανθάλης (3), τον ολεοσίδη (22), ως προϊόν βασικής υδρόλυσης των εστέρων της 7 αλλά και της 11 θέσης της ελαιοευρωπεΐνης (1). Ακετυλίωση της γλυκοσιδικής ομάδας του ολεοσίδη (22) και εστεροποίηση, με 2-(4-ακετοξυ-φαινυλο) αιθανόλη (20), της 7-θέσης του προκύπτοντος ακετυλιωμένου παραγώγου, τετραοξικού ολεοσίδη (23), ακολουθούμενη από αποπροστασία του συνόλου των υδροξυλίων [255], οδήγησε στο σχηματισμό του 7-[2-(4-υδροξυφαινυλ)-αιθυλ]εστέρα του ολεοσίδη (ή αλλιώς, δεμεθυλο-λιγκστροσίδη) (24), άμεσα πρόδρομης ένωσης της ολεοκανθάλης (3). Στο τελικό στάδιο της ημισυνθετικής πορείας, κατόπιν αντίδρασης βιοκατάλυσης του τελευταίου, με χρήση του ενζύμου β-γλυκοσιδάση [32], ολοκληρώνεται η σύνθεση της ολεοκανθάλης (3). Είναι σημαντικό ότι αυτή η στρατηγική άνοιξε το δρόμο για την πρόσβαση, μέσω μιας νέας, γρήγορης και, ως επί το πλείστον, «πράσινης» σύνθεσης της ολεοκανθάλης (3), σε μια σειρά από ανάλογα αυτής, διαθέσιμα για μελέτες δομής – δράσης και βιολογική αξιολόγηση.

Με γνώμονα την οικολογική συνείδηση, η ομάδα μας επικεντρώθηκε στην ανάκτηση δευτερογενών μεταβολιτών υψηλής προστιθέμενης αξίας από παραπροϊόντα που προκύπτουν από τη βιομηχανία τροφίμων και τη γεωργία [256], [257]. Χιλιάδες τόνοι φύλλων ελιάς συλλέγονται κάθε χρόνο σε ελαιοκομικές περιοχές, που καταλήγουν να καίγονται, ως ανεπιθύμητα, ή να αξιοποιούνται ως τροφή, στην κτηνοτροφία.

Εντούτοις, τα φύλλα της ελιάς αντιπροσωπεύουν μια βιώσιμη πηγή ελαιοευρωπεΐνης (1), που είναι ο κύριος, περιεχόμενος σε αυτά, μεταβολίτης. Η ελαιοευρωπεΐνη μπορεί να χρησιμοποιηθεί, μετά την απομόνωσή της, όπως αυτή περιγράφηκε στο Κεφάλαιο ΙΙ.2, ως πρώτη ύλη για την ημισύνθεση του ολεοσίδη (22).

Επιγραμματικά, το συνθετικό σχήμα που εφαρμόσαμε, για τη σύνθεση της ολεοκανθάλης (3), δίνεται στο Σχήμα 22.



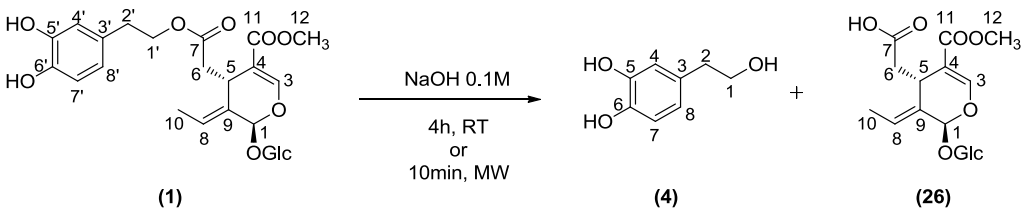
Σχήμα 22. *Συνθετικό σχήμα της ολεοκανθάλης (3), με πρώτη ύλη την ελαιοευρωπεΐνη (1).*
i: NaOH 0,1M, RT, 4d, ii: Ac_2O, πυριδίνη, RT, 2h, iii: 1) Et_3N, 2,4,6-τριχλωροβενζοϋλο χλωρίδιο, 2h, 2) 4-DMAP (4-διμεθυλαμινο πυριδίνη), 2-(4-ακετοξυ-φαινυλο) αιθανόλη (20), CH_2Cl_2, 2h, iv: Et_2NH, MeOH, RT, 6h, v: β-γλυκοσιδάση, H_2O, 35°C, 20h

Στην πορεία, θα αναλυθούν τα βήματα της ανωτέρω ημισύνθεσης, συγκριτικά με τα περιγεγραμμένα στις αντίστοιχες δημοσιεύσεις.

III.3.b. *Σύνθεση του ενδιαμέσου ολεοσίδη, με πρώτη ύλη την ελαιοευρωπεΐνη*

III.3.b.1. *Περιγραφή μεθόδου*

ΣΤΑΔΙΟ 1°: *Σύνθεση του 11-μεθυλεστέρα του ολεοσίδη (26), με πρώτη ύλη την ελαιοευρωπεΐνη (1)*



Η σαπωνοποίηση αποτελεί τη βασική υδρόλυση ενός εστέρα, η οποία αποδίδει δύο μόρια, ένα οξύ, (26) και μία αλκοόλη, (4). Αποτελεί ιδιαίτερα σημαντική αντίδραση, καθώς, μέσω της σαπωνοποίησης ανακυκλώνονται, ουσιαστικά, σημαντικά προϊόντα, τα οποία μπορούν να επαναχρησιμοποιηθούν εργαστηριακά για περαιτέρω αντιδράσεις.

Σύμφωνα με πολυάριθμες δημοσιευμένες μελέτες [255], [258], η βασική υδρόλυση της ελαιοευρωπεΐνης (1), με εξασφάλιση σχετικά ήπιων αλκαλικών συνθηκών – με χρήση

ισομοριακής, με την ελαιοευρωπεΐνη (1), ποσότητας υδατικού διαλύματος NaOH 0.1M – επιτρέπει την εκλεκτική διάσπαση του εστερικού δεσμού της θέσης 7 της δομής της, δίνοντας ένα μίγμα ισομοριακών ποσοτήτων 11-μεθυλεστέρα του ολεοσίδη (26) και υδροξυτυροσόλης (4), δύο ενώσεων χημικού και φαρμακολογικού ενδιαφέροντος. Αυτά τα δύο παράγωγα αποτελούν φυσικά μόρια, τα οποία απαντώνται στο γένος *Olea europaea*.

Η βασική υδρόλυση της ελαιοευρωπεΐνης (1), επιτυχάνθηκε, από την ομάδα μας, με δύο τρόπους:

1ος τρόπος: Κλασική σαπωνοποίηση
2ος τρόπος: Σαπωνοποίηση με χρήση μικροκυμάτων (MW[53])

1ος τρόπος: Κλασική σαπωνοποίηση

Εφαρμόζοντας την αντίδραση στην ελαιοευρωπεΐνη (1), ακολουθώντας την κλασσική, απλή μέθοδο, οι συνθήκες αντίδρασης περιελάμβαναν τη χρήση υδατικού διαλύματος καυστικού νατρίου (NaOH aq), σε θερμοκρασία δωματίου, για 4 ώρες. Το προκύπτον ανιονικό ενδιάμεσο κατεργάστηκε με υδατικό διάλυμα υδροχλωρίου, (HCl 1M) μέχρι pH 4-5, ώστε να πρωτονιωθεί και να παραληφθεί το όξινο παράγωγο της ελαιοευρωπεΐνης (1), δηλαδή ο 11-μεθυλεστέρας του ολεοσίδη (26), σε μίγμα με την υδροξυτυροσόλη (4) [258], [176]. Με τον τρόπο αυτό «ανακυκλώνεται», όπως προαναφέρθηκε, η υδροξυτυροσόλη (4), ώστε να επαναχρησιμοποιηθεί.

Ωστόσο, η οξίνιση του αντιδρώντος μίγματος, μετά το τέλος της αντίδρασης, με προσθήκη υδατικού διαλύματος HCl, θα πρέπει να γίνεται σταδιακά και κατά σταγόνες, ώστε το pH να μη γίνει μικρότερο του 5, καθώς, σε αντίθετη περίπτωση, υπάρχει κίνδυνος διάσπασης του σακχάρου.

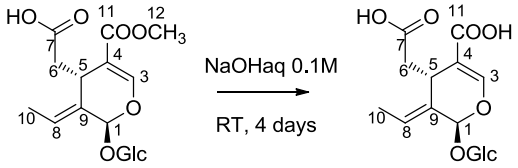
2ος τρόπος: Σαπωνοποίηση με χρήση μικροκυμάτων (MW)

Για την ολοκλήρωση της αντίδρασης σε σημαντικά λιγότερο χρόνο, χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος των μικροκυμάτων.

Σε μια χημική αντίδραση, η συσκευή των μικροκυμάτων προκαλεί άμεση ενεργοποίηση των ιόντων, καθώς και των περισσότερων από τα μόρια που εμφανίζουν διπολική ροπή. Δεδομένου ότι η μεταφορά ενέργειας μεταξύ των μικροκυμάτων και των μορίων είναι εξαιρετικά γρήγορη (της τάξης των νανοδευτερολέπτων), τα μόρια του αντιδραστηρίου ή του διαλύτη δεν είναι σε θέση να χαλαρώσουν εντελώς, ώστε να επιτευχθεί θερμική ισορροπία. Δημιουργείται, έτσι, μία κατάσταση μη ισορροπίας για το αντιδρών μίγμα, η οποία χαρακτηρίζεται από μία στιγμιαία θερμοκρασία (Ti). Η υποβοηθούμενη, από μικροκύματα, σύνθεση βρήκε, για πρώτη φορά, εφαρμογή στην οργανική χημεία, όπου ορισμένες αντιδράσεις επιτυγχάνονται έως και 1000 φορές πιο γρήγορα, με θέρμανση μέσω μικροκυμάτων, απ' ότι με την κλασσική μέθοδο θέρμανσης, ενώ ταυτοχρόνως αποφεύγεται η αλλοίωση των ευαίσθητων, σε παρατεταμένη έκθεση σε υψηλή θερμοκρασία, αντιδρώντων συστατικών. Σε αυτές τις συνθήκες, ο 11-μεθυλεστέρας του ολεοσίδη (26) παραλήφθηκε, σε 10 λεπτά, με απόδοση 65%.

Με τις δύο μεθόδους σαπωνοποίησης, την κλασσική και των μικροκυμάτων, επιτυγχάνουμε παραλαβή του προϊόντος, με παρόμοια απόδοση αντίδρασης, αλλά στη δεύτερη μέθοδο σε υποτετραπλάσσιο χρόνο, γι' αυτό και η μέθοδος αυτή προτιμάται, όταν υπάρχει ο κατάλληλος εξοπλισμός.

ΣΤΑΔΙΟ 2°: *Σύνθεση του ολεοσίδη, με πρώτη ύλη τον 11-μεθυλεστέρα του ολεοσίδη (26)*



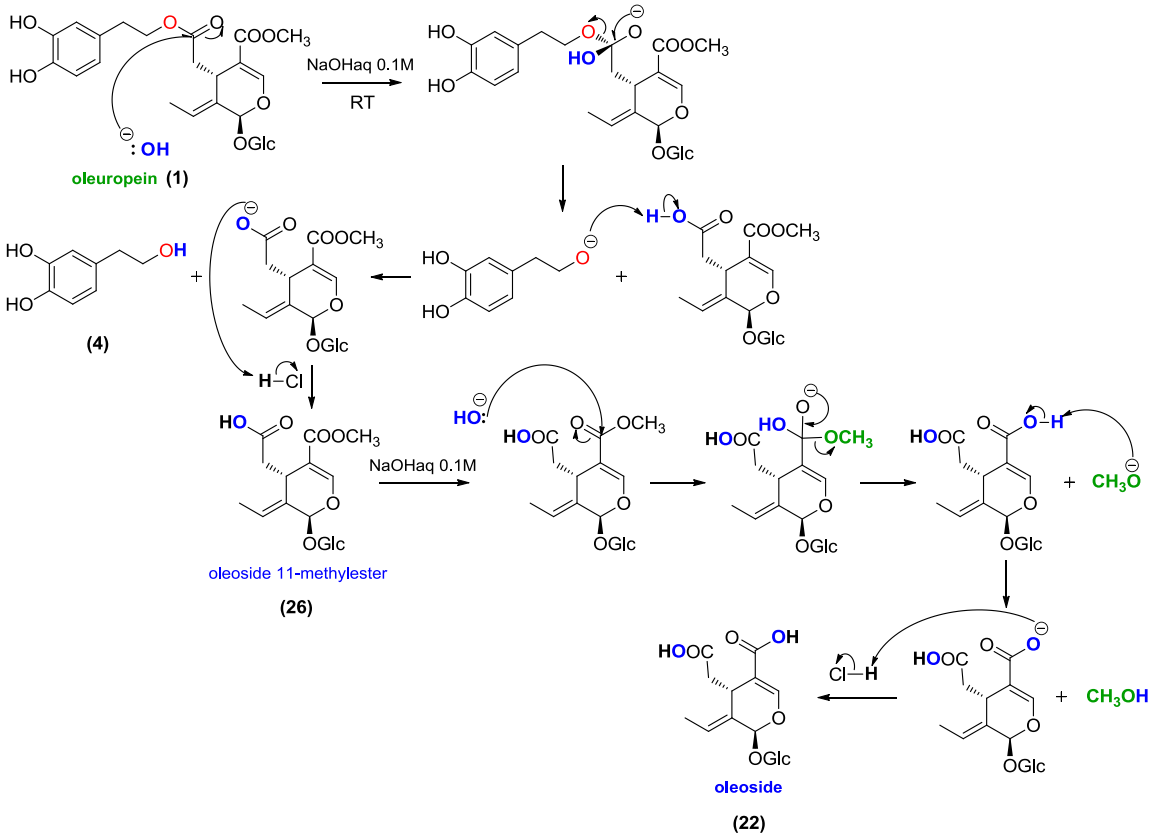
(26) **(22)**

Σαπωνοποίηση του 11-μεθυλεστέρα του ολεοσίδη (26), προκαλεί διάσπαση του εστέρα της 11 θέσης, σχηματίζοντας το φυσικό ολεοσίδη (22), σε απόδοση 90%, ο οποίος αποτελεί μία, εν δυνάμει χρησιμοποιήσιμη, πρώτη ύλη, για την ημισύνθεση παραγώγων της ελαιοευρωπεΐνης (1), με ποικιλία στη δομή.

Η βασική υδρόλυση της ελαιοευρωπεΐνης (1) προς ολεοσίδη (22) μπορεί να συντελεστεί, χωρίς την ενδιάμεση απομόνωση του 11-μεθυλεστέρα του ολεοσίδη (26), σε ένα στάδιο, με την προϋπόθεση ότι το αντιδρών μίγμα αφήνεται να αντιδράσει για τουλάχιστον 4 μέρες, στις αλκαλικές συνθήκες που περιγράφηκαν προηγούμενα.

Ωστόσο, επειδή στην περίπτωση της δικής μας μελέτης, επιθυμούσαμε την αξιοποίηση όχι μόνο του ολεοσίδη (22), αλλά και του 11-μεθυλεστέρα του ολεοσίδη (26), για τη σύνθεση δομικών αναλόγων και των δύο, εφαρμόσαμε τη μέθοδο βασικής υδρόλυσης των δύο σταδίων.

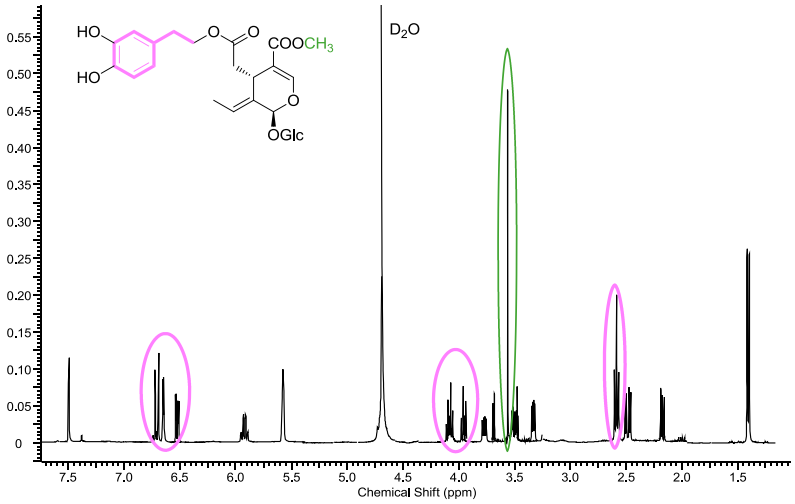
Ο προτεινόμενος μηχανισμός για την αντίδραση σαπωνοποίησης της ελαιοευρωπεΐνης (1), παρουσιάζεται σχηματικά στο Σχήμα 23.



Σχήμα 23. *Προτεινόμενος μηχανισμός βασικής υδρόλυσης της ελαιοευρωπεΐνης (1) [258].*

III.3.b.2. *Μελέτη δομής*

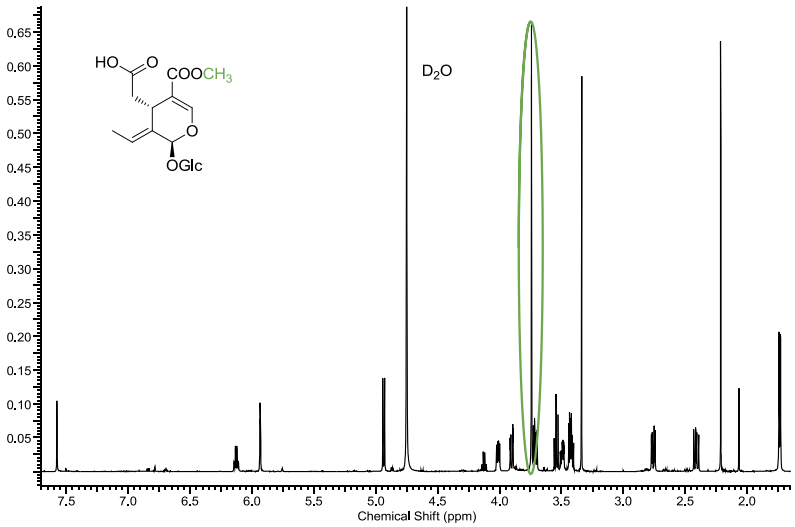
Οι δομές των δύο προϊόντων σαπωνοποίησης, ταυτοποιούνται με χρήση της φασματοσκοπίας NMR[39], και διαφοροποιούνται από την ελαιοευρωπεΐνη (1), η οποία εμφανίζει τρεις χαρακτηριστικές κορυφές στην αρωματική περιοχή, που αντιστοιχούν στα 3H του φαινολικού δακτυλίου του τμήματος της υδροξυτυροσόλης (4), καθώς και δύο πολλαπλές κορυφές, περίπου στα 4 ppm και μία, στα 2.7 ppm, που αντιστοιχούν στα H της αιθυλομάδας, που βρίσκεται μεταξύ του εστερικού οξυγόνου και του φαινολικού δακτυλίου της υδροξυτυροσόλης (4) (*Εικόνα 66*).



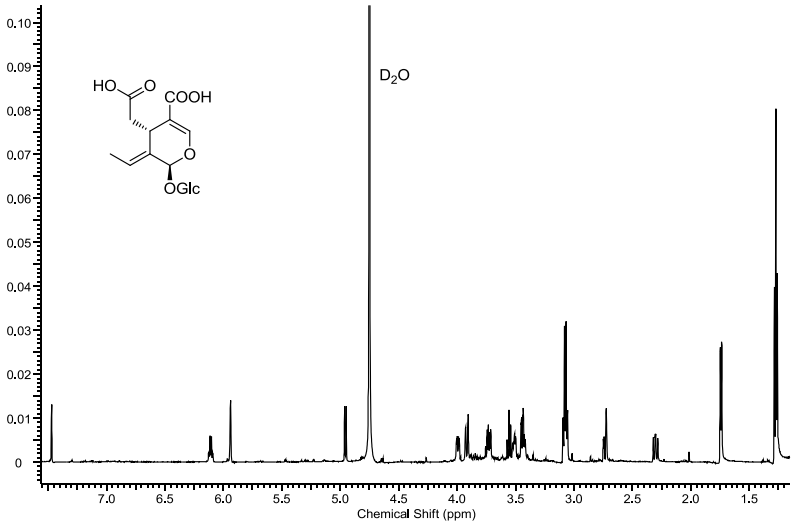
Εικόνα 66. *Φάσμα ^{1}H NMR (600MHz) της ελαιοευρωπεΐνης (1), σε D_2O*

Στις Εικόνες 67 και 68 φαίνεται ότι δεν υπάρχουν, στα φάσματα των 11-μεθυλεστέρα του ολεοσίδη (26) και ολεοσίδη (22), οι χαρακτηριστικές κορυφές των υδρογόνων της υδροξυτυροσόλης (4), κάτι που αποδεικνύει την απουσία των ομάδων αυτών στα δύο προϊόντα, κατόπιν της μερικής και ολικής, αντίστοιχα, σαπωνοποίησης.

Επιπλέον, συγκρίνοντας τα φάσματα των 11-μεθυλεστέρα του ολεοσίδη (26) και ολεοσίδη (22), διαπιστώνουμε την απουσία, στο φάσμα του ολεοσίδη (22), της χαρακτηριστικής κορυφής των 3H της μεθοξυ ομάδας της θέσης 11, η οποία (στο φάσμα του 11-μεθυλεστέρα του ολεοσίδη (26)) εμφανίζεται στα 3.68 ppm.



Εικόνα 67. *Φάσμα ^{1}H NMR (600MHz) του 11-μεθυλεστέρα του ολεοσίδη (26), σε D_2O*

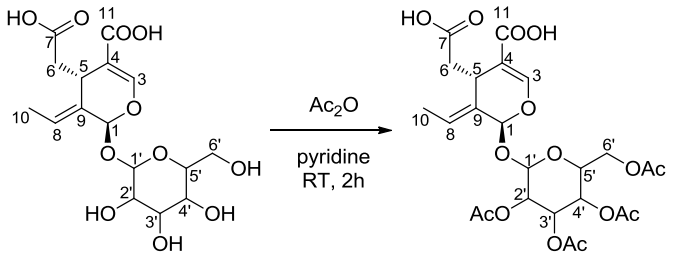


Εικόνα 68. *Φάσμα ^1H NMR (600MHz) του ολεοσίδη (22), σε D_2O*

III.3.c. *Σύνθεση του 7-[2-(4-υδροξυφαινυλ)-αιθυλ] εστέρα του ολεοσίδη, πρόδρομη ένωση της ολεοκανθάλης, με πρώτη ύλη τον ολεοσίδη*

III.3.c.1. *Περιγραφή μεθόδου*

ΣΤΑΔΙΟ 1ο*: Σύνθεση του τετραοξικού ολεοσίδη (23), με πρώτη ύλη τον ολεοσίδη (22)*



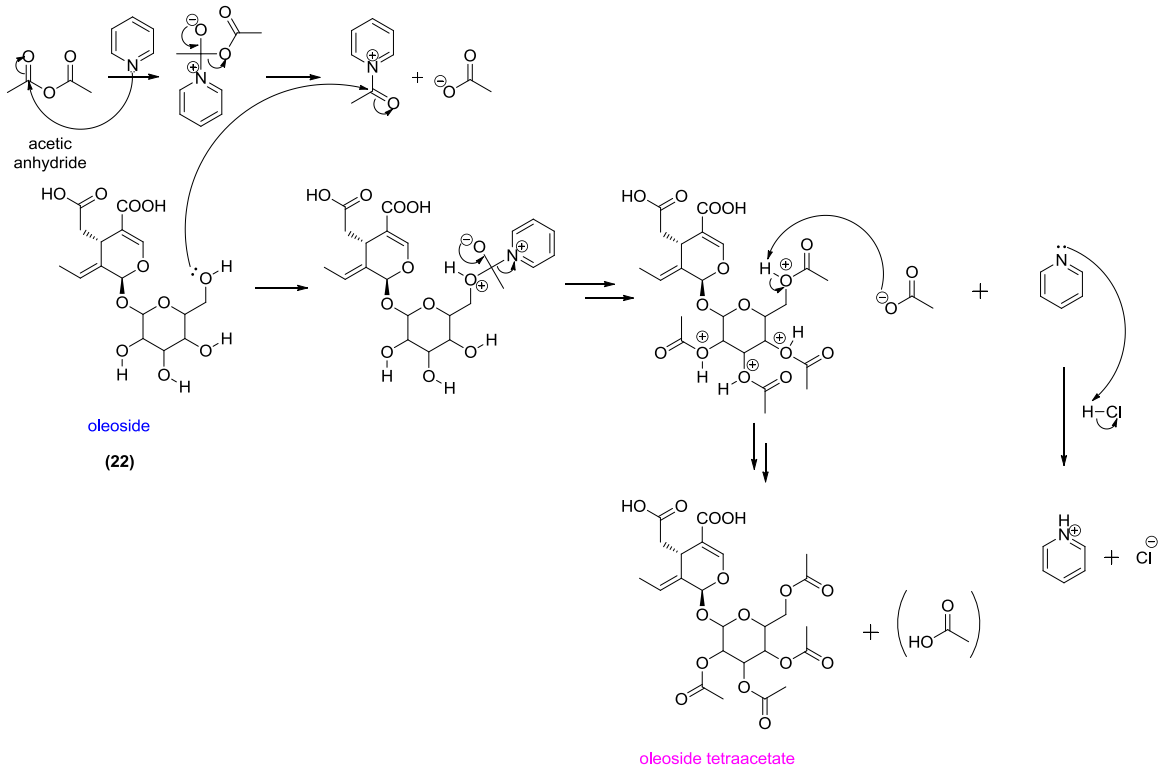
(22) **(23)**

Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία [259], [260], [261] η ακετυλίωση των σακχάρων, μέχρι τώρα, περιλαμβάνει τη χρήση οξικού ανυδρίτη, και ενός καταλύτη όπως οξικό νάτριο, χλωριούχο ψευδάργυρο, θειικό οξύ ή πυριδίνη. Επιπλέον, δεν είναι απαραίτητη η παροχή θερμότητας για την πραγματοποίηση της αντίδρασης.

Στην παρούσα διατριβή, όποτε απαιτήθηκε η ακετυλίωση υδροξυλίων, ακολουθήθηκε η παραπάνω μέθοδος, ενώ ο χρησιμοποιούμενος καταλύτης, ήταν η πυριδίνη, η οποία δημιουργεί ένα αλκαλικό περιβάλλον. Η ακετυλίωση αποτελεί μια αντίδραση προστασίας, εν προκειμένω, των ελεύθερων ομάδων υδροξυλίου της γλυκόζης, εν όψει μίας επιχειρούμενης αντίδρασης, όπως είναι η εστεροποίηση, που αναλύεται στο επόμενο υποκεφάλαιο.

Με εκτέλεση της αντίδρασης στον φυσικό ολεοσίδη (22), προέκυψε ο τετραοξικός ολεοσίδης (23), σε απόδοση 10%.

Ο μηχανισμός της ακετυλίωσης του ολεοσίδη (22), δίνεται στο Σχήμα 24.



Σχήμα 24. *Προτεινόμενος μηχανισμός για την αντίδραση ακετυλίωσης.*

Πρώτο βήμα της ακετυλίωσης, αποτελεί η προσθήκη στο αντιδρών, πυριδίνης, υπό ταυτόχρονη ψύξη στους 0^{o}C και υπό ατμόσφαιρα αργού, ώστε να εξασφαλιστεί αλκαλικό και άνυδρο περιβάλλον, πριν την ακόλουθη προσθήκη του οξικού ανυδρίτη. Η ταυτόχρονη ψύξη, έχει ως στόχο την αποφυγή απότομης αύξησης της θερμοκρασίας, καθώς η αντίδραση προσθήκης της πυριδίνης είναι εξώθερμη. Αντίστοιχα, οι άνυδρες συνθήκες εξασφαλίζονται ώστε να προστατευτεί η πυριδίνη από πιθανή πρωτονίωση, και να είναι ικανή να δράσει ως πυρηνόφιλο, κατά την προσθήκη, στο επόμενο βήμα, του οξικού ανυδρίτη. Η προσθήκη αυτή γίνεται και πάλι στους 0^{o}C και κατά σταγόνες. Η αλληλεπίδραση της πυριδίνης με τον οξικό ανυδρίτη, απεικονίζεται στο Σχήμα 24, όπως επίσης η ακόλουθη πυρηνόφιλη προσβολή του προκύπτοντος κατιόντος, από τα οξυγόνα των ελεύθερων υδροξυλίων της γλυκόζης.

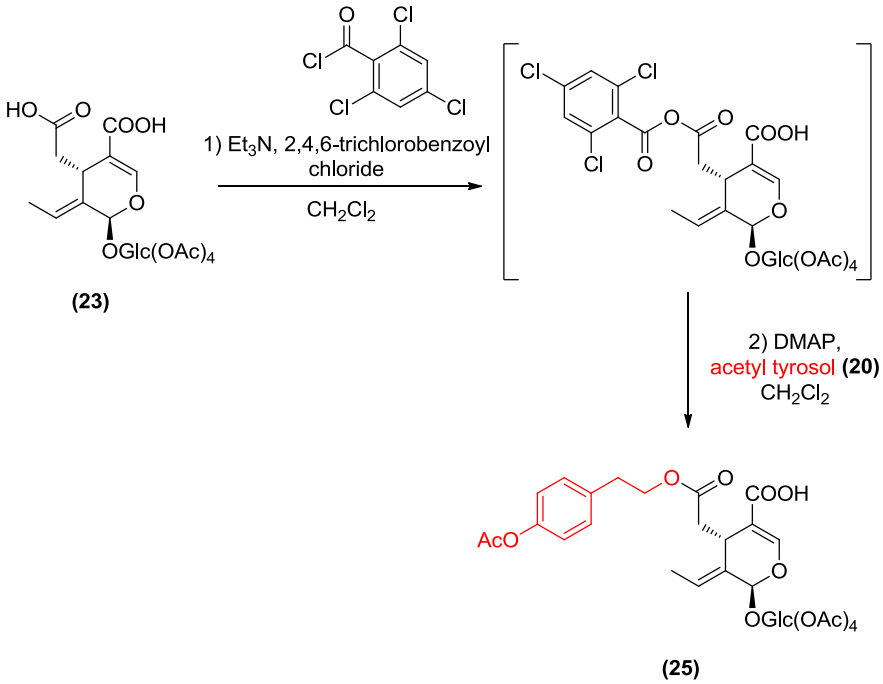
Κατόπιν μιας περίπου ώρας ανάδευσης, το αντιδρών διάλυμα κατεργάζεται με μίγμα υδατικού διαλύματος HCl 1M και πάγου, μέχρι το pH να φτάσει στο 5. Η προσθήκη του διαλύματος υδροχλωρίου έχει ως στόχο την πρωτονίωση της πυριδίνης, ώστε αυτή, κατόπιν εκχύλισης του μίγματος με διχλωρομεθάνιο (CH_2Cl_2), να αποβληθεί στην υδατική στιβάδα. Η προσεκτική προσθήκη του υδροχλωρίου, σ' αυτή τη φάση, έχει μεγάλη σημασία, καθώς το pH δεν πρέπει να γίνει μικρότερο του 5, διότι το ακετυλιωμένο παράγωγο του ολεοσίδη, (23), όπως και όλα τα ακετυλιωμένα παράγωγα που θα περιγραφούν στη συνέχεια, είναι ιδιαίτερα ευαίσθητα, λόγω των «εύθραυστων» υδροξυλίων της γλυκόζης.

Η αντίδραση ακετυλίωσης, παρά τη χαμηλή της, γενικά, απόδοση, αποτελεί, ίσως, το σημαντικότερο βήμα, για την παραγωγή ημισυνθετικών αναλόγων της ελαιοευρωπεΐνης (1), καθώς εξασφαλίζει, όπως προαναφέρθηκε, την αδρανοποίηση των υδροξυλίων της γλυκόζης, ενόψει της αντίδρασης εστεροποίησης που ακολουθεί.

ΣΤΑΔΙΟ 2ο: *Σύνθεση του τετραοξικού 7-[2-(4-ακετοξυφαινυλ)-αιθυλ]εστέρα του ολεοσίδη (25), με πρώτη ύλη τον τετραοξικό ολεοσίδη (23)*

Για τη σύνθεση του τετραοξικού 7-[2-(4-ακετοξυφαινυλ)-αιθυλ] εστέρα του ολεοσίδη (25), χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος εστεροποίησης με αλκοόλες. Η μέθοδος αυτή είναι γνωστή ως εστεροποίηση Yamaguchi και προτάθηκε για πρώτη φορά από τους Masaru Yamaguchi και συνεργάτες, το 1979 [262].

Η εστεροποίηση, λοιπόν, με αλκοόλες, ακολουθεί το πρωτόκολλο Yamaguchi, σύμφωνα με το οποίο χρησιμοποιούνται ήπιες, μη όξινες, συνθήκες αντίδρασης. Έτσι, η εστεροποίηση Yamaguchi αποτελεί μία χημική αντίδραση, μεταξύ ενός καρβοξυλικού οξέος (εδώ, του τετραοξικού ολεοσίδη (23)) και του αντιδραστηρίου Yamaguchi, 2,4,6- τριχλωροβενζόϋλο χλωρίδιο. Από την αντίδραση αυτή προκύπτει ένας μικτός ανυδρίτης, ο οποίος, αντιδρώντας περαιτέρω με ένα πυρηνόφιλο (αλκοόλη, αμίνη, θειόλη), παρουσία στοιχειομετρικής ποσότητας 4-DMAP (4-διμεθυλάμινο-πυριδίνης), δίνει τον επιθυμητό εστέρα, (25) *(Σχήμα 25)*. Η παρουσία της 4-DMAP, ουσιαστικά σε θέση καταλύτη της αντίδρασης, καθιστά δυνατή την ταχύτερη αλληλεπίδραση του, ενδιάμεσα σχηματιζόμενου, ανυδρίτη, με μία ποικιλία πυρηνόφιλων.



Σχήμα 25. *Αντίδραση εστεροποίησης κατά Yamaguchi και σχηματισμός ενδιάμεσου προϊόντος*

Μία παράμετρος που θα πρέπει να συζητηθεί στο σημείο αυτό, είναι η προστασία ή όχι του ενός εκ των δύο ελεύθερων υδροξυλίων της χρησιμοποιούμενης, ως πυρηνόφιλο, αλκοόλης.

Στην περίπτωση μη εκλεκτικής προστασίας κάποιου εκ των υδροξυλίων της χρησιμοποιούμενης αλκοόλης, κατά την εστεροποίηση, στη συνέχεια, του καρβοξυλικού οξέος, παραλαμβάνονται συνήθως δύο αρυλο εστερικά προϊόντα, κάτι που ελαττώνει, αναπόφευκτα, την απόδοση της αντίδρασης, ως προς το επιθυμητό προϊόν.

Στην περίπτωση που, εξ' αρχής, δεν επιθυμούμε να παραλάβουμε δύο αρυλο εστερικά προϊόντα, θα πρέπει να προηγηθεί του σταδίου της εστεροποίησης, η εκλεκτική προστασία της μιας εκ των δύο ομάδων υδροξυλίου της τυροσόλης (19), όπως παρουσιάστηκε αναλυτικά στην

υποενότητα III.1.d.4. Με τον τρόπο αυτό, η αντίδραση Yamaguchi δίνει έναν και μόνο αρυλο εστέρα, τον τετραοξικό 7-[2-(4-ακετοξυφαινυλ)-αιθυλ] εστέρα του ολεοσίδη (25).

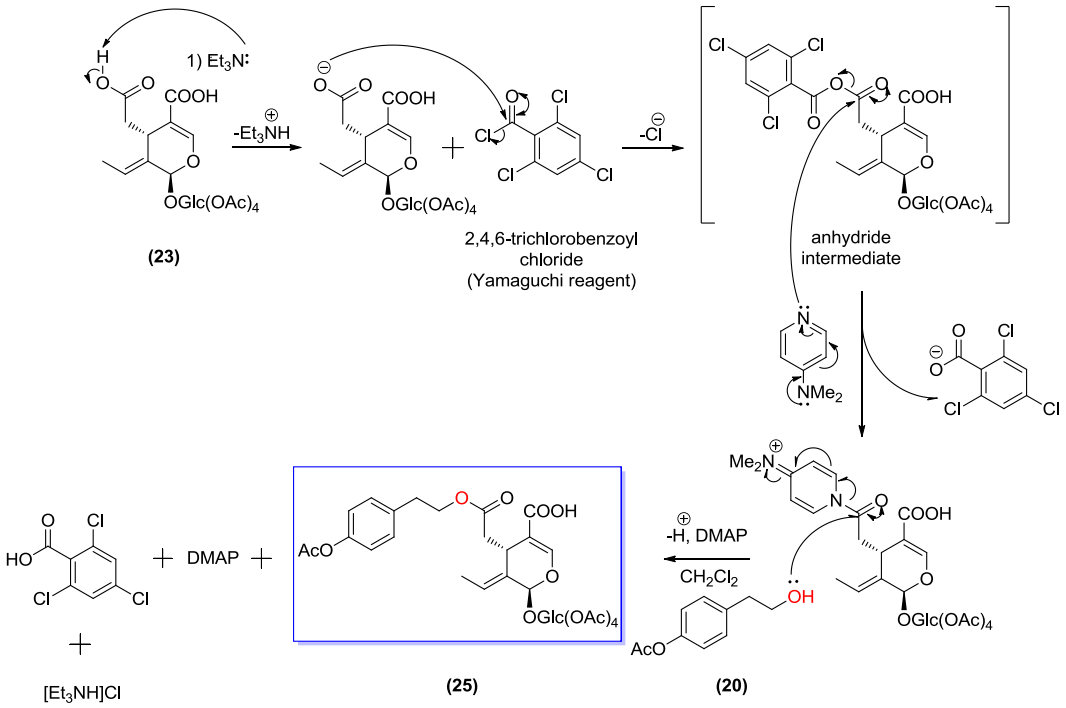
Όπως προαναφέρθηκε, στις περισσότερες περιπτώσεις, το φαινολικό υδροξύλιο προστατεύεται εκλεκτικά, με προσθήκη οξικού ανυδρίτη ($(Ac)_2O$), σε αλκαλικό περιβάλλον καυστικού νατρίου (6M), στους 0^oC, σε διάστημα μίας ώρας και υπό ισχυρή ανάδευση, με το pH να διατηρείται στα 7-8.

Μετά από αντίδραση μίας ώρας από το τέλος της προσθήκης του ανυδρίτη, παραλαμβάνεται με την κατεργασία που προαναφέρθηκε στην υποενότητα III.1.d.4, το επιθυμητό άχρωμο, ελαιώδες και εκλεκτικά προστατευμένο, στο φαινολικό υδροξύλιο, προϊόν, (20), *(Σχήμα 15)* [245].

Και στην περίπτωση της εστεροποίησης για την παραλαβή του τετραοξικού 7-[2-(4-ακετοξυφαινυλ)-αιθυλ]εστέρα του ολεοσίδη (25), χρησιμοποιήθηκε εναλλακτικά η προαναφερόμενη, στην υποενότητα III.1.d.4, μέθοδος εκλεκτικής ακετυλίωσης της τυροσόλης (19), που περιλαμβάνει την κατεργασία με NaOH και οξικό ανυδρίτη, παρουσία, όμως, ισοπροπανόλης στο αντιδρών μίγμα [246] (*Σχήμα 16*). Ο δεύτερος αυτός τρόπος, όπως προαναφέρθηκε, πλεονεκτεί του πρώτου, ως προς το χρόνο, τις συνθήκες και την απόδοση εκτέλεσης.

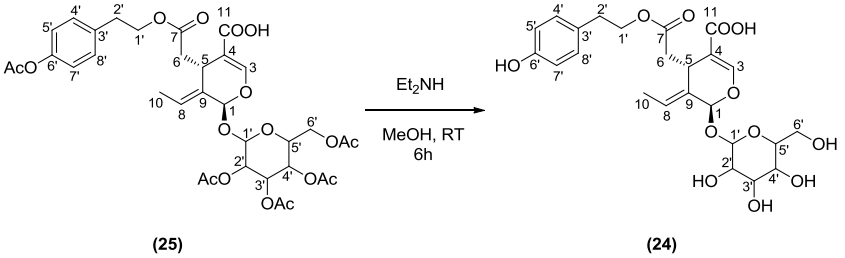
Η επιβεβαίωση της ορθής εκλεκτικής ακετυλίωσης γίνεται, όπως παρουσιάστηκε στις Εικόνες 58 και 59, μέσω φασματοσκοπίας NMR[39]. Το εκλεκτικά προστατευμένο στο φαινολικό υδροξύλιο, αντιδραστήριο είναι έτοιμο να χρησιμοποιηθεί στην αντίδραση εστεροποίησης που ακολουθεί, καθώς, το μόνο ελεύθερο και διαθέσιμο υδροξύλιο, το αλειφατικό, δρα ως πυρηνόφιλο, δίνοντας τον ένα και μοναδικό αρυλο εστέρα (25).

Στην προκειμένη, λοιπόν, περίπτωση εστεροποίησης, ως πυρηνόφιλο χρησιμοποιήθηκε η 2-(4-ακετοξυ-φαινυλο) αιθανόλη (20), η αντίδραση εστεροποίησης κατά Yamaguchi πραγματοποιήθηκε με απόδοση 14 %, ενώ στο Σχήμα 26 δίνεται ο μηχανισμός της.



Σχήμα 26. *Μηχανισμός εστεροποίησης του τετραοξικού ολεοσίδη (23) με 2-(4-ακετοξυ-φαινυλο) αιθανόλη (20), κατά Yamaguchi*

ΣΤΑΔΙΟ 3ο: *Σύνθεση του 7-[2-(4-υδροξυφαινυλ)-αιθυλ]εστέρα του ολεοσίδη (24), με πρώτη ύλη τον τετραοξικό 7-[2-(4-ακετοξυφαινυλ)-αιθυλ]εστέρα του ολεοσίδη (25)*

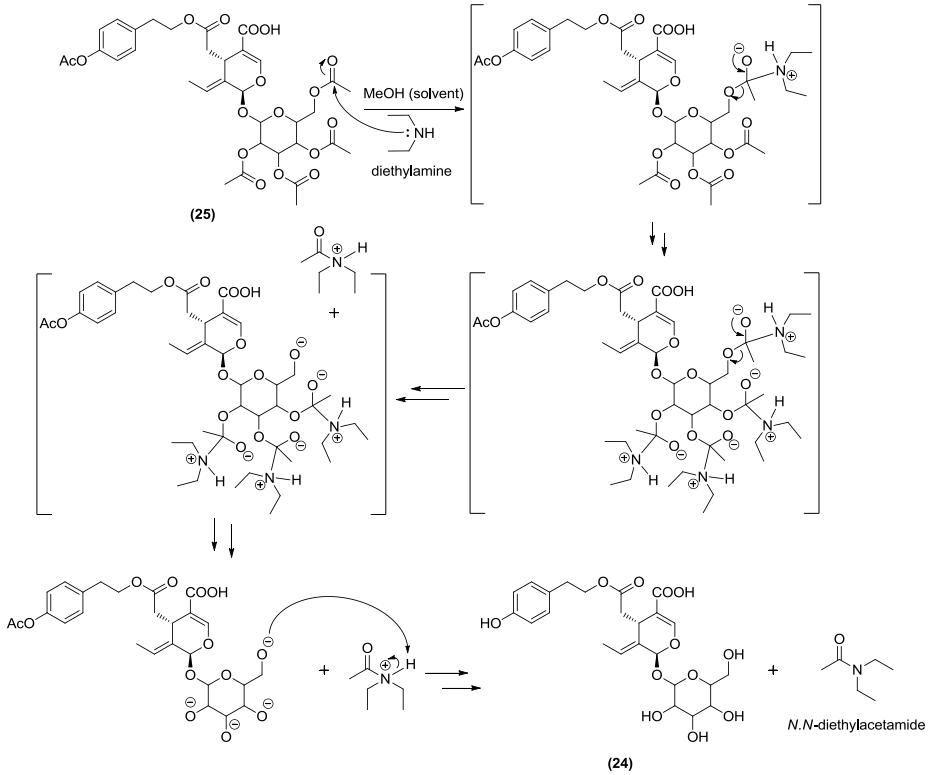


Σχήμα 27. *Αντίδραση αποπροστασίας των υδροξυλίων της γλυκόζης του τετραοξικού 7-[2-(4-ακετοξυφαινυλ)-αιθυλ]εστέρα του ολεοσίδη (25)*

Το επόμενο στάδιο της ημισύνθεσης της ολεοκανθάλης (3), είναι η αποπροστασία των υδροξυλίων της γλυκόζης, του εστεροποιημένου, πλέον, προϊόντος (25). Η αντίδραση αποπροστασίας γίνεται με περίσσεια διαιθυλαμίνης (Et_2NH), σε διαλύτη MeOH και σε θερμοκρασία περιβάλλοντος, για 6 ώρες. Το αντιδρών μίγμα, μετά την περάτωση της αντίδρασης, δεν απαιτεί κατεργασία, παρά μόνο προσθήκη μιας μικρής ποσότητας οξειδίου του πυριτίου (SiO_2), το οποίο, λόγω της οξύτητάς του, εξουδετερώνει την εναπομείνουσα ποσότητα Et_2NH, ώστε το pH να γίνει 5-6 και να σταματήσει η αντίδραση. Μετά από εξάτμιση της MeOH, ακολουθεί απ' ευθείας καθαρισμός του προϊόντος με χρωματογραφία στήλης, ενώ η απόδοση της αντίδρασης ήταν 75% [261].

Η αντίδραση αποπροστασίας είναι μια απλή διαδικασία και δεν απαιτεί ιδιαίτερες προφυλάξεις, καθώς λαμβάνει χώρα σε θερμοκρασία δωματίου. Ως μοναδικό, ίσως, σημείο προσοχής, θεωρείται η προσθήκη της διαιθυλαμίνης, κατά σταγόνες, στο μεθανολικό διάλυμα του εστέρα και, κατά προτίμηση, στους 0^oC, ώστε να αποφευχθεί η αύξηση της θερμοκρασίας.

Ο προτεινόμενος μηχανισμός για την αντίδραση απακετυλίωσης, λοιπόν, των υδροξυλίων του εστέρα (25), δίνεται στο Σχήμα 28.

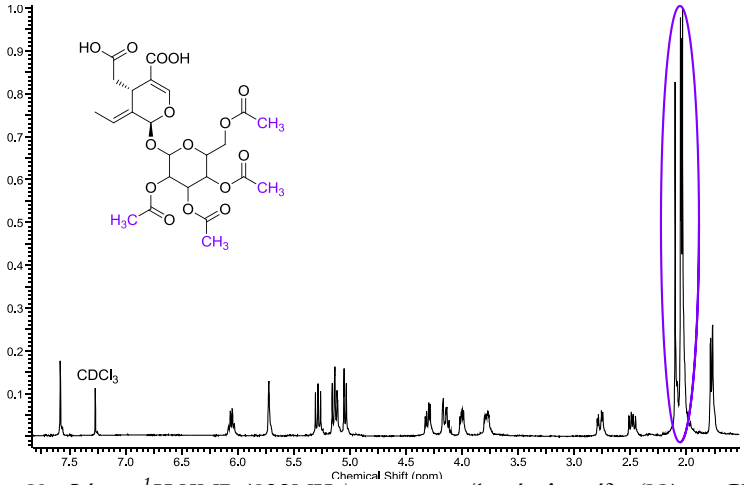


Σχήμα 28. *Προτεινόμενος μηχανισμός για την απακετυλίωση των υδροξυλίων του γλυκοσιδικού τμήματος*

III.3.c.2. *Μελέτη δομής*

Η δομή των προϊόντων καθενός από τα τρία στάδια που περιγράφηκαν, ταυτοποιείται με χρήση της φασματοσκοπίας NMR[39], και διαφοροποιείται από το αρχικό προϊόν, ολεσίδη.

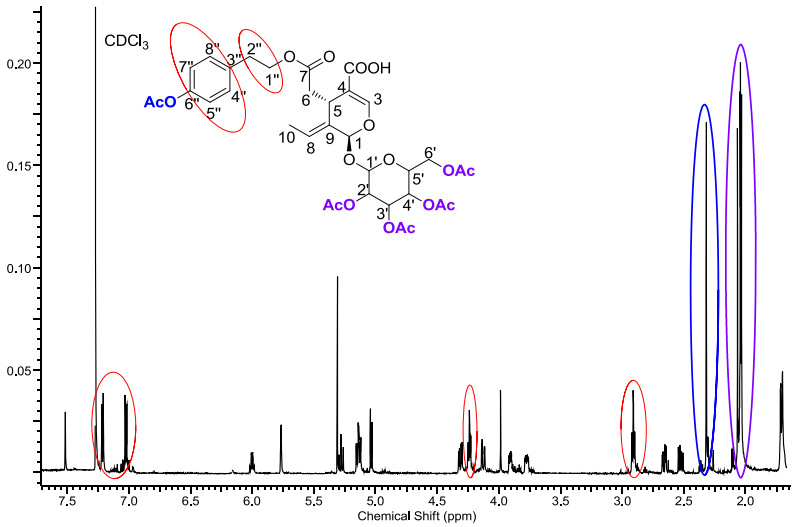
Συγκεκριμένα, ο τετραοξικός ολεοσίδης (23) (*Εικόνα 69*), ως προϊόν ακετυλίωσης του ολεοσίδη (22), εμφανίζει τις χαρακτηριστικές απλές κορυφές, στα 2.04-2.10 ppm, οι οποίες αντιστοιχούν στις μεθυλομάδες των ακετυλο εστέρων του γλυκοσιδικού τμήματος (12H), κορυφές που δεν υπάρχουν στο φάσμα του ολεοσίδη (22) που παρατέθηκε στην Εικόνα 68.



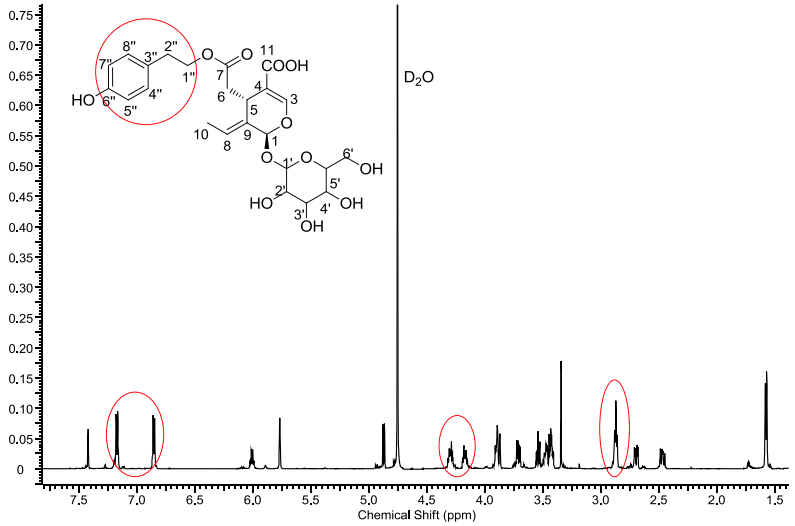
Εικόνα 69. *Φάσμα ^{1}H NMR (600MHz) του τετραοξικού ολεοσίδη (23), σε $CDCl_3$*

Αντιστοίχως, στο φάσμα ^{1}H NMR[39] του τετραοξικού 7-[2-(4-ακετοξυφαινυλ)-αιθυλ] εστέρα του ολεοσίδη (25) (*Εικόνα 70)*, εμφανίζονται, εκτός από τις κορυφές των τεσσάρων μεθυλίων των ακετυλο ομάδων του γλυκοσιδικού τμήματος (μωβ χρώμα), ακόμα μία απλή κορυφή, στα 2.32 ppm, που αντιστοιχεί στο μεθύλιο της ακετυλο- ομάδας του φαινολικού δακτυλίου (3H) (μπλε χρώμα) και οι χαρακτηριστικές κορυφές των αρωματικών πρωτονίων της 2-(4-ακετοξυ-φαινυλο) αιθανόλης (20) (στα 7.01 ppm και στα 7.20 ppm, κάθε μία αντιστοιχώντας σε 2H) και δύο τριπλές κορυφές στα 2.90 ppm και στα 4.23 ppm, που αντιστοιχούν στα H της αιθυλομάδας, που βρίσκεται μεταξύ του εστερικού οξυγόνου και του φαινολικού δακτυλίου της 2-(4-ακετοξυ-φαινυλο) αιθανόλης (20) (κόκκινο χρώμα).

Από το φάσμα πρωτονίου, επιπλέον, του 7-[2-(4-υδροξυ-φαινυλ)-αιθυλ] εστέρα του ολεοσίδη (24) (*Εικόνα 71*), επιβεβαιώνεται η υδρόλυση των ακετυλο εστέρων της γλυκόζης, καθώς δεν παρατηρούνται οι πέντε χαρακτηριστικές απλές κορυφές των μεθυλίων τους, στα 2 περίπου ppm. Ωστόσο, υπάρχουν οι χαρακτηριστικές κορυφές της τυροσόλης (19), με τα φαινολικά υδροξύλια, να δίνουν δύο διπλές κορυφές (στα 6.89 ppm και 7.21 ppm, με κάθε μία να αντιστοιχεί σε 2H) και τα $H_{1''a}$ και $H_{1''b}$, να δίνουν δύο πολλαπλές κορυφές στα 4.21 και 4.34 ppm και τα $H_{2''}$, μία πολλαπλή κορυφή στα 2.90 ppm.



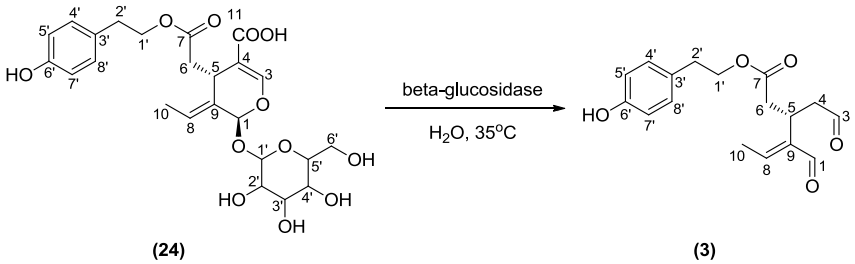
Εικόνα 70. *Φάσμα ^1H NMR (600MHz) του τετραοξικού 7-[2-(4-ακετοξυφαινυλ)-αιθυλ]εστέρα του ολεοσίδη (25), σε $CDCl_3$*



Εικόνα 71. *Φάσμα ^1H NMR (600MHz) του 7-[2-(4-υδοξυφαινυλ)-αιθυλ]εστέρα του ολεοσίδη (24), σε D_2O*

III.3.d. *Σύνθεση της ολεοκανθάλης, με πρώτη ύλη τον 7-[2-(4-υδροξυφαινυλ)-αιθυλ]εστέρα του ολεοσίδη*

III.3.d.1. *Περιγραφή μεθόδου*



Σχήμα 29. *Ενζυμική αντίδραση του 7-[2-(4-υδροξυφαινυλ)-αιθυλ]εστέρα του ολεοσίδη (24) με β-γλυκοσιδάση, προς σχηματισμό ολεοκανθάλης (3)*

Οι Servili και συνεργάτες [263], έχουν αποδείξει ότι η τελική συγκέντρωση των φαινολικών ενώσεων στο ελαιόλαδο επηρεάζεται σε μεγάλο βαθμό από παραμέτρους επεξεργασίας, όπως η θερμοκρασία, ο χρόνος, ή η έκθεση στον ατμοσφαιρικό αέρα. Οι παράγοντες αυτοί, είναι πιθανό

να επηρεάζουν τη δραστικότητα των ενζύμων-κλειδιών, που συμμετέχουν στον μεταβολισμό των φαινολικών ενώσεων, κατά τη διάρκεια των σταδίων σύνθλιψης και μάλαξης, κατά τη βιομηχανική διαδικασία εξαγωγής του παρθένου ελαιολάδου.

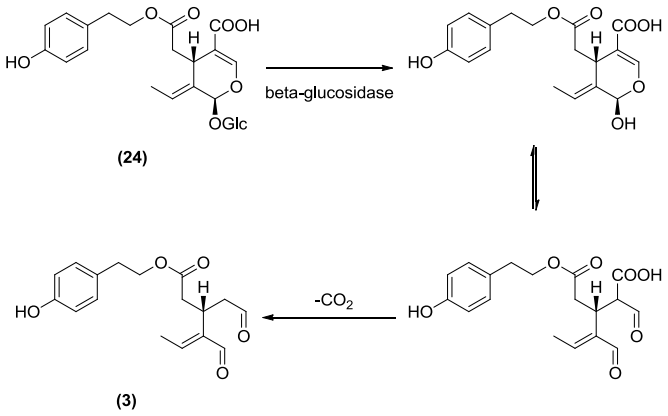
Έρευνες της τελευταίας δεκαπενταετίας [177], [264], [265], [32] κατόπιν μελετών πάνω στην εκλεκτικότητα του ενζύμου της *Olea europaea*, β-γλυκοσιδάση, ως προς τους φαινολικούς γλυκοσίδες της, έχουν υπογραμμίσει τον κρίσιμο ρόλο που κατέχει το ένζυμο αυτό, στη διαμόρφωση του φαινολικού προφίλ του παρθένου ελαιολάδου.

Η συμμετοχή της β-γλυκοσιδάσης στη βιοχημική μετατροπή της ελαιοευρωπεΐνης (1) σε ολεασίνη (2) και ολεοκανθάλη (3), έχει αποτελέσει αντικείμενο των παραπάνω ερευνών.

Μιμούμενοι αυτή την ενζυμική βιομετατροπή, ξεκινώντας με πρώτη ύλη τον 7-[2-(4-υδροξυφαινυλ)-αιθυλ]εστέρα του ολεοσίδη (24) και με προσθήκη του ενζύμου β-γλυκοσιδάση από αμύγδαλα (*"beta-glucosidase from almonds"*), πραγματοποιήσαμε την ημισύνθεση της ολεοκανθάλης (3). Οι συνθήκες τις αντίδρασης περιλαμβάνουν, μικρή ποσότητα νερού στο αντιδρών μίγμα και επώαση με ανάδευση, σε επωαστήρα με ελεγχόμενη θερμοκρασία (incubator), στους 35^{o}C. Η διάρκεια της αντίδρασης, ποικίλει ανάλογα με την ποσότητα και τη φύση του αρχικού προϊόντος και κυμαίνεται από 2-20 ώρες. Στην περίπτωση της ολεοκανθάλης (3), χρειάστηκαν 20 ώρες. Η απόδοση της αντίδρασης εκτιμήθηκε σε υψηλά ποσοστά, της τάξης του 85%.

Μετά την περάτωση της αντίδρασης, πραγματοποιήθηκε SPE[38] (solid-phase extraction) εκχύλιση, προς απομάκρυνση του ενζύμου και διαχωρισμό του από το προϊόν της αντίδρασης και, κατόπιν εκχύλισης με EtOAc, η ολεοκανθάλη (3) παραλήφθηκε στην οργανική φάση.

Ο μηχανισμός της αντίδρασης, όπως προτείνεται από τους Lo Scalzo και συνεργάτες [32], δίνεται στο Σχήμα 30.



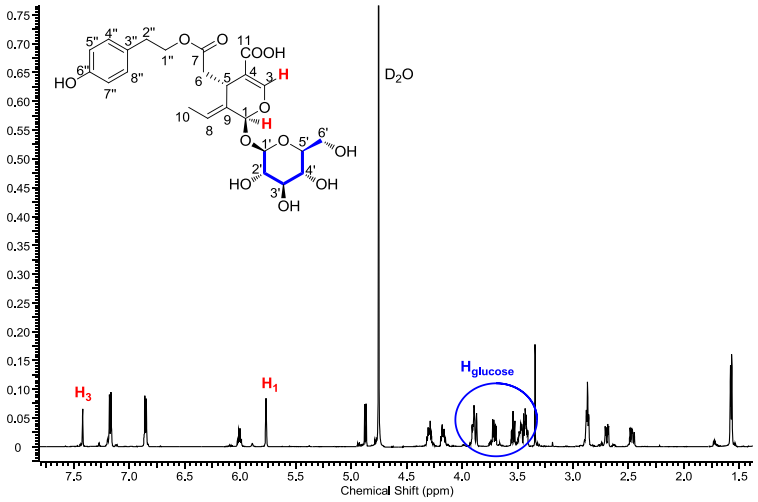
Σχήμα 30. *Μηχανισμός της ενζυμικής υδρόλυσης του 7-[2-(4-υδροξυφαινυλ)αιθυλ] εστέρα (24), με β-γλυκοσιδάση, προς το σχηματισμό ολεοκανθάλης (3)*

Στο πρώτο στάδιο του μηχανισμού, η β-γλυκοσιδάση καταλύει την υδρόλυση του σακχάρου, με αποτέλεσμα να σχηματίζεται το άγλυκο του δεμεθυλο-λιγκστροσίδη, το οποίο βρίσκεται σε ισορροπία με την ανοιχτή διαλδεϋδική μορφή αυτού, η οποία κατόπιν αυθόρμητης αποκαρβοξυλίωσης, δίνει την τελική μορφή της ολεοκανθάλης (3) [32].

III.3.d.2. *Μελέτη δομής*

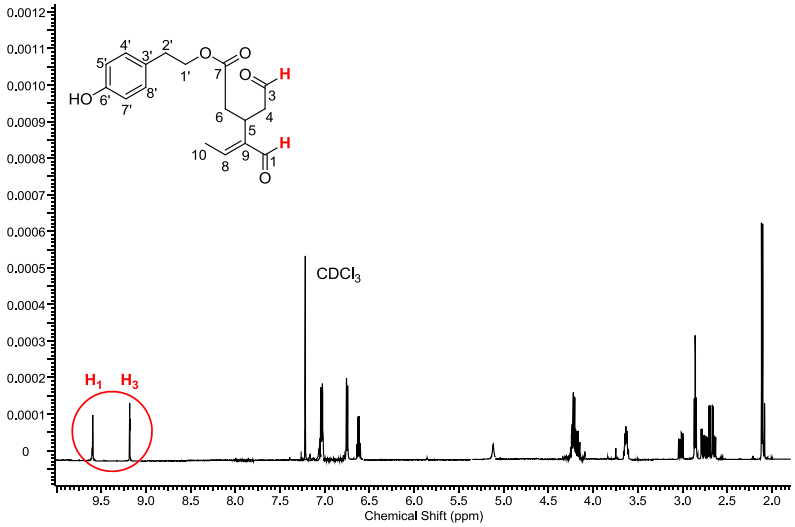
Η δομή της ολεοκανθάλης (3), ταυτοποιείται με χρήση της φασματοσκοπίας NMR[39], και διαφοροποιείται από αυτή του 7-[2-(4-υδοξυφαινυλ)-αιθυλ]εστέρα του ολεοσίδη (24), ο οποίος

εμφανίζει τις χαρακτηριστικές κορυφές των Η του γλυκοσιδικού τμήματος, στην περιοχή από 3.35 – 3.90 ppm, καθώς επίσης και δύο απλές κορυφές, περίπου στα 5.75 ppm, η μία και στα 7.4 ppm, η άλλη, που αντιστοιχούν στα H_1 και H_3, αντιστοίχως (*Εικόνα 72*).



Εικόνα 72. *Φάσμα ^{1}H NMR (600 MHz) του 7-[2-(4-υδοξυφαινυλ)-αιθυλ]εστέρα του ολεοσίδη (24), σε D_2O*

Σύμφωνα, λοιπόν, με το φάσμα της ολεοκανθάλης (3) (*Εικόνα 73)*, υπάρχουν σημαντικές διαφορές με αυτό του 7-[2-(4-υδοξυφαινυλ)-αιθυλ]εστέρα του ολεοσίδη (24) (*Εικόνα 72*), καθώς οι αντίστοιχες κορυφές των H_1 και H_3 είναι μετατοπισμένες σε τιμές 9.65 και 9.20 ppm, αντιστοίχως, ενώ απουσιάζουν οι χαρακτηριστικές κορυφές των Η του σακχάρου. Οι διαφορές αυτές οφείλονται, όπως προαναφέρθηκε στην υποενότητα III.2.b, αφ' ενός, στην υδρόλυση της χαρακτηριστικής ομάδας του σακχάρου, που πραγματοποιείται από την β-γλυκοσιδάση, αφ' ετέρου, στην αποκαρβοξυλίωση που συντελείται αυθορμήτως στο δεύτερο στάδιο του μηχανισμού της αντίδρασης. Το μόνο δομικά κοινό σημείο των δύο ενώσεων, είναι οι χαρακτηριστικές κορυφές του τμήματος της υδροξυτυροσόλης (4), σε παρόμοιες χημικές μετατοπίσεις.

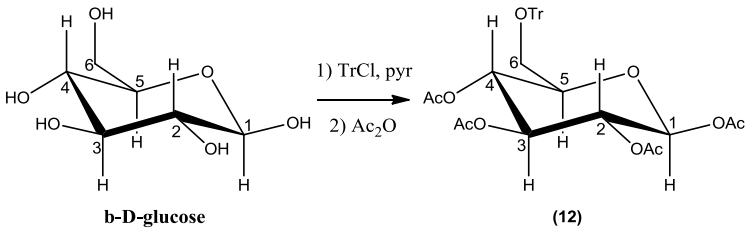


Εικόνα 73. *Φάσμα ^{1}H NMR (600MHz) της ολεοκανθάλης (3), σε $CDCl_3$*

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

III.4 Ολική σύνθεση του νουζενίδη

III.4.a *Στάδιο 1ο: Σύνθεση της 1,2,3,4-τετρα-O-ακετυλο-6-τριτυλο-β-D-γλυκοπυρανόζης (12), με πρώτη ύλη τη γλυκόζη*



b-D-glucose **(12)**

Σε σφαιρική φιάλη των 250 mL, ζυγίζονται 10 g (55 mmol) **D-γλυκόζης** και 12.54 g (45 mmmol) TrCl (τριφαινυλο-μεθυλο-χλωριδίου) και διαλύονται σε 62 mL πυριδίνης. Ακολουθεί ανάδευση σε θερμοκρασία δωματίου και συνθήκες αργού, για μία νύχτα (10 ώρες). Μετά το πέρας των 10 ωρών, ακολουθεί στάγδην προσθήκη 36.8 mL οξικού ανυδρίτη και το αντιδρών μίγμα αφήνεται και πάλι να αναδευτεί κατά τη διάρκεια της νύχτας, σε θερμοκρασία δωματίου. Επιβεβαίωση του τέλους της αντίδρασης, με χρωματογραφία λεπτής στιβάδας σε σύστημα διαλυτών c-Hex/EtOAc 1:1 και εξάτμιση της πυριδίνης, σε αζεοτροπικό με νερό, έδωσε στερεό υπόλειμμα. Το τελευταίο, κατόπιν διαλυτοποίησης με $CHCl_3$, εξουδετέρωσης με $NaHCO_3$, πλύσης με νερό και υδατικό διάλυμα NaCl, ξήρανσης με άνυδρο Na_2SO_4 και συμπύκνωσης υπό κενό, έδωσε μίγμα δύο προϊόντων, απ' το οποίο, κατόπιν καθαρισμού με χρωματογραφία στήλης και σύστημα έκλουσης c-Hex/ EtOAc 8:2→ 2:1, έδωσε 10.18 g (35%), προέκυψε το επιθυμητο προϊόν πρώτου σταδίου, η 1,2,3,4-τετρα-O-ακετυλο-6-τριτυλο-β-D-γλυκοπυρανόζη (12) [241].

Προϊόν με μορφή λευκού αφρού, M= 590.6171 g/ mol, $C_{33}H_{34}O_{10}$.

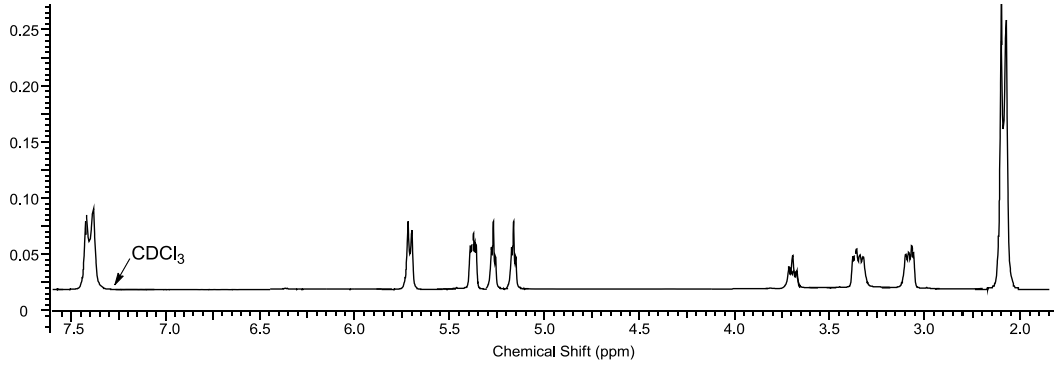
❖ Ως παραπροϊόν της αντίδρασης, παραλαμβάνεται η, μη ορατή στο UV (αλλά μόνο κατά τον ψεκασμό με θειϊκή βανιλίνη και ισχυρή θέρμανση), πλήρως ακετυλιωμένη γλυκόζη, με R_f[50] μικρότερο αυτού του0 επιθυμητού προϊόντος,.

^{1}H NMR (600 MHz, $CDCl_3$): 7.45-7.32 (2xm, 15H, Ph_3), 5.73 (d, $J_{1,2}$= 8.0 Hz, 1H, H_1), 5.37 (t, $J_{4,3,5}$= 7.8 Hz, 1H, H_4), 5.26 (t, $J_{2,1,3}$= 8.0 Hz, 1H, H_2), 5.18 (t, $J_{3,2,4}$= 7.8 Hz, 2H, H_3), 3.69 (m, 1H, H_5), 3.33 (dd, $J_{6a,6b}$= 12.1 Hz, $J_{6a,5}$= 4.9 Hz, 1H, H_{6a}), 3.07 (dd, $J_{6b,6a}$= 12.4 Hz, $J_{6b,5}$= 2.3 Hz, 1H, H_{6b}), 2.10-2.05 (4xs, 12H, Ac)

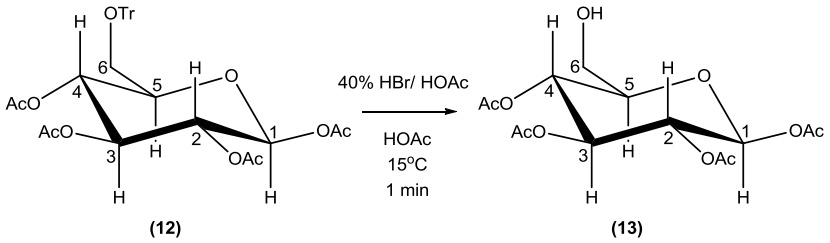
^{13}C NMR (600 MHz, $CDCl_3$): δ 170.28 (CO, OAc), 169.98 (CO, OAc), 169.52 (CO, OAc), 169.15 (CO, OAc), 143.95 (C, Ph_3), 129.44 (CH, Ph_3), 127.15 (CH, Ph_3), 126.12 (CH, Ph_3), 91.73 (C, C-Ph3), 91.42 (CH, C_1), 73.67 (CH, C_5), 72.78 (CH, C_2), 69.99 (CH, C_3), 69.93 (CH, C_4), 61.10 (CH_2, C_6), 20.41 (4xCH_3, OAc)

HRMS (ESI+), m/z calcd: 613.2050, found: 612.1965; ($M+Na^+$)

- **^{1}H NMR**



III.4.b *<u>Στάδιο 2ο</u>: Σύνθεση της 1,2,3,4-τετρα-O-ακέτυλο-β-D-γλυκοπυρανόζης (13)*



(12) (13)

<u>1ος τρόπος – Μέθοδος Yu και συνεργατών [242]</u>:

0.562 g (0.952 mmol) του (12) διαλύονται σε 2.5 mL οξικού οξέος και ακολουθεί προσθήκη 170.7 μL διαλύματος 33% HBr σε HOAc, στους 10°C και ανάδευση για 1 λεπτό. Γίνεται έλεγχος με χρωματογραφία λεπτής στιβάδας, για διαπίστωση του τέλους της αντίδρασης. Παρατηρείται καθίζηση του τριφαινυλο-μεθυλο-βρωμιδίου, το οποίο απομακρύνεται από το αντιδρών μίγμα με διήθηση υπό κενό. Το διήθημα πλένεται με κρύο νερό και εκχυλίζεται με διχλωρομεθάνιο. Κατόπιν ξήρανσης της οργανικής φάσης με Na_2SO_4 και συμπύκνωσης υπό κενό, παραλήφθηκαν, κατόπιν χρωματογραφίας στήλης (EtOAc/ Hexane 1:4 →1:2), 0.282 g (85%) του (13).

<u>2ος τρόπος – μέθοδος López και συνεργατών [243]</u>:

0.1 g (0.169 mmol) του (12), διαλύονται σε διχλωρομεθάνιο και πραγματοποιείται στάγδην προσθήκη τριφθοροξικού οξέος (TFA), μέχρι να παρατηρηθεί κίτρινος χρωματισμός του διαλύματος. Το πλεονέκτημα αυτής της μεθόδου ήταν ότι πραγματοποιήθηκε σε μικρότερο χρόνο από την προηγούμενη. Ο καθαρισμός του προϊόντος έγινε και πάλι με χρωματογραφία στήλης (c-Hex/EtOAc 80:20 → 65:35) και παραλήφθηκαν 0.041 g (70%) του (13).

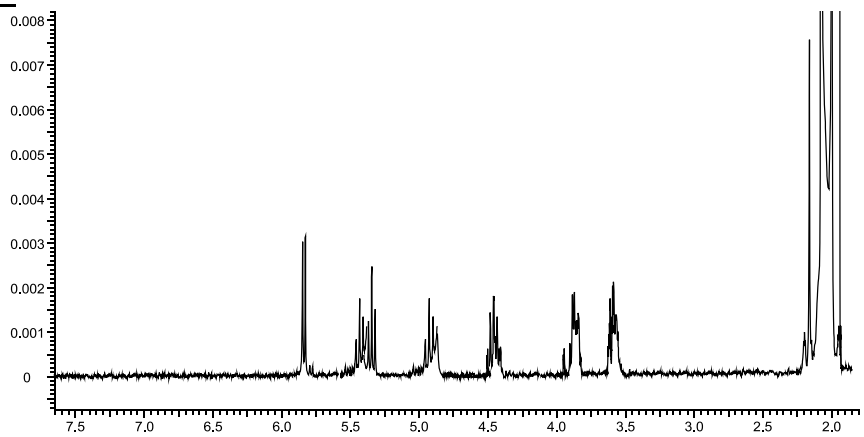
Λευκό αφρώδες προϊόν, M= 348.3026 g/ mol, $C_{14}H_{20}O_{10}$

<u>^{1}H NMR (400 MHz, $(CD_3)_2CO$):</u> 5.86 (d, $J_{1,2}$= 8.2 Hz, 1H, H_1), 5.43 (dd, $J_{3,2}$= 3.5 Hz, $J_{3,4}$= 9.5 Hz, 1H, H_3), 5.36 (t, $J_{4,3,5}$= 9.6 Hz, 1H, H_4), 4.93 (dd, $J_{2,1}$= 8.0 Hz, $J_{2,3}$= 3.4 Hz, 1H, H_2), 4.45 (m, 1H, H_5), 3.87 (dd, $J_{6b,6a}$= 12.1 Hz, $J_{6b,5}$= 4.4 Hz, 1H, H_{6b}), 3.61 (dd, $J_{6a,6b}$= 12.3 Hz, $J_{6a,5}$= 2.4 Hz, 1H, H_{6a}), 2.00-1.93 (4xs, 12H, Ac)

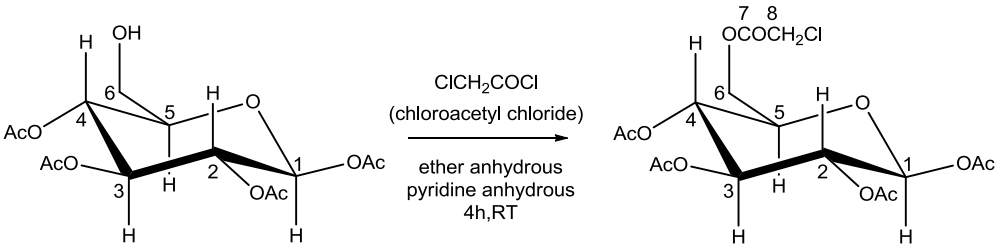
<u>^{13}C NMR (400 MHz, $(CD_3)_2CO$):</u> δ 170.55 (CO, OAc), 170.20 (CO, OAc), 169.92 (CO, OAc), 168.75 (CO, OAc), 90.78 (CH, C_1), 73.07 (CH, C_5), 68.78 (CH, C_2), 68.56 (CH, C_3), 66.01 (CH, C_4), 61.20 (CH_2, C_6), 21.10-20.79 (4xCH_3, OAc)

<u>HRMS (ESI+),</u> m/z calcd: 371.0954, found: 371.0947; ($M+Na^+$)

- **<u>^{1}H NMR</u>**



III.4.c *<u>Στάδιο 3ο</u>: Σύνθεση της 1,2,3,4-τετρα-O-ακετυλο-6-χλωροακετυλο-β-D-γλυκοπυρανόζης (14)*



(13) (14)

0.088 g (0.252 mmol) του (13) διαλύονται σε 28 mL άνυδρου διαιθυλαιθέρα και στο διάλυμα προστίθενται 80 μL άνυδρης πυριδίνης. Το αντιδρών μίγμα ψύχεται για κάποια λεπτά σε παγόλουτρο και κατόπιν, προστίθενται σ' αυτό 80 μL χλωροακετυλο χλωριδίου, διαλυμένου σε 2 mL διαιθυλαιθέρα. Ήδη με την έναρξη της προσθήκης, αρχίζει να σχηματίζεται στο διάλυμα, ίζημα άλατος χλωριούχου πυριδινίου. Μετά το τέλος της προσθήκης, συνεχίζουμε την ανάδευση σε θερμοκρασία περιβάλλοντος, για 4h. Κατόπιν διάλυσης σε 30 mL διαιθυλαιθέρα, πλύσης, δύο φορές, με 20 mL παγωμένου νερού και μία φορά, με 10 mL HCl 1M, εξουδετέρωσης του μίγματος με κορεσμένο διάλυμα $NaHCO_3$, ξήρανσης με Na_2SO_4 και συμπύκνωσης υπό κενό, παραλαμβάνονται 0.044 g (40%) του (14).

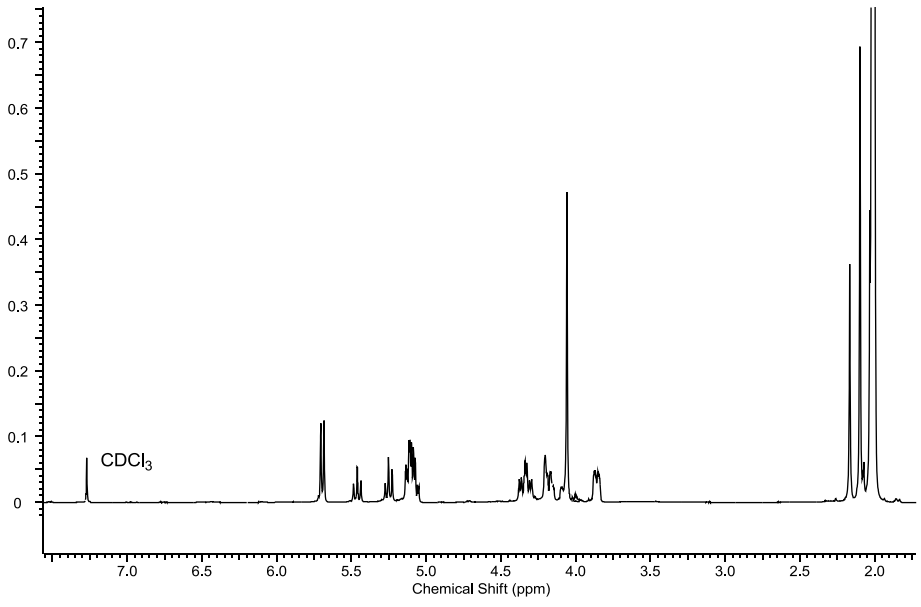
Λευκό στερεό προϊόν, M= 424.7843 g/ mol, $C_{16}H_{21}O_{11}Cl$

<u>^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$):</u> 5.69 (d, $J_{1,2}$= 8.2 Hz, 1H, H_1), 5.46 (t, $J_{3,2,4}$= 9.8 Hz, 1H, H_3), 5.25 (t, $J_{2,1,3}$ = 9.5 Hz, 1H, H_2), 5.10 (m, 1H, H_5), 4.34 (t, $J_{4,3,5}$= 9.6 Hz, 1H, H_4), 4.21 (dd, $J_{6b,6a}$= 12.5 Hz, $J_{6b,5}$= 4.3 Hz, 1H, H_{6b}), 4.10 (s, 2H, H_8), 3.86 (dd, $J_{6a,6b}$= 12.4 Hz, $J_{6a,5}$= 2.5 Hz, 1H, H_{6a}), 2.17-2.00 (4xs, 12H, Ac)

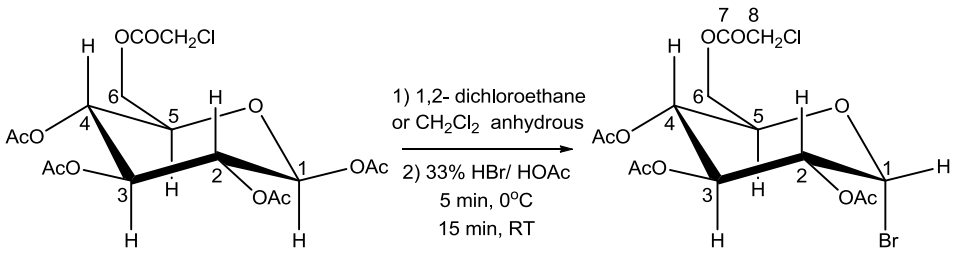
<u>^{13}C NMR (400 MHz, $CDCl_3$):</u> δ 170.33 (CO, OAc), 170.22 (CO, OAc), 169.97 (CO, OAc), 166.75 (CO, C_7), 91.18 (CH, C_1), 74.67 (CH, C_5), 69.78 (CH, C_3), 69.56 (CH, C_2), 68.91 (CH, C_4), 61.81 (CH_2, C_6), 40.41 (CH_2, C_8), 21.08-20.95 (4xCH_3, OAc)

<u>HRMS (ESI+),</u> m/z calcd: 447.0670, found: 447.0664; ($M+Na^+$)

- **<u>^{1}H NMR</u>**



III.4.d *<u>Στάδιο 4ο</u>: Σύνθεση της 2,3,4-τρι-Ο-ακετυλο-1-βρωμο-6-χλωροακετυλο-β-D-γλυκοπυρανόζης (15)*



(14) **(15)**

0.040 g (0.094 mmol) του (14) διαλύονται σε 500 μL άνυδρου 1,2-διχλωροαιθανίου, και το διάλυμα αναδεύεται στους 0°C. Στη συνέχεια, προστίθενται κατά σταγόνες, 290 μL διαλύματος 33% HBr σε οξικό οξύ. Το αντιδρών μίγμα αφήνεται να αναδευτεί, για 5 λεπτά, στους 0°C και έπειτα, για 15 λεπτά, σε θερμοκρασία περιβάλλοντος. Έπειτα, μεταγγίζεται σε 25-30 mL, περίπου, παγωμένου νερού, ακολουθεί έντονη ανάδευση για 15 λεπτά και απόχυση. Κατόπιν προσθήκης χλωροφορμίου, εξουδετέρωσης με κορεσμένο διάλυμα όξινου ανθρακικού νατρίου ($NaHCO_3$), πλύσης με νερό, μέχρι εκ νέου εξουδετέρωσης, ξήρανσης με άνυδρο Na_2SO_4 της οργανικής στιβάδας, συμπύκνωσής της υπό κενό και καθαρισμού με χρωματογραφία στήλης, παραλήφθηκαν 0.028 g (67%) του (15).

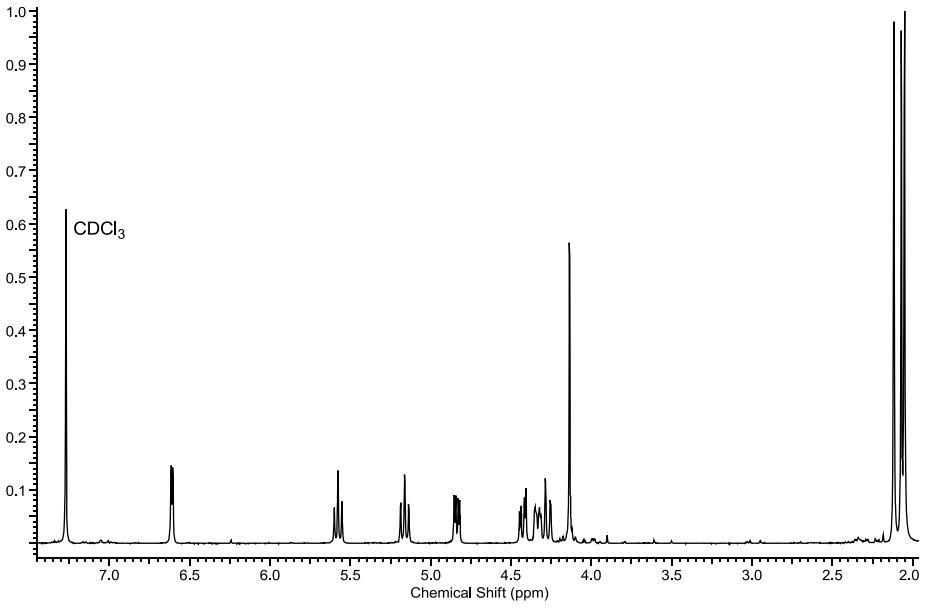
Προϊόν σε μορφή σιροπιού, M= 445.6443 g/ mol, $C_{14}H_{18}O_9BrCl$

<u>^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$):</u> 6.61 (d, $J_{1,2}$= 3.9 Hz, 1H, H_1), 5.57 (t, $J_{3,2,4}$= 9.7 Hz, 1H, H_3), 5.17 (t, $J_{2,1,3}$ = 9.9 Hz, 1H, H_2), 4.83 (dd, $J_{4,3}$= 10.0 Hz, $J_{4,5}$= 4.0 Hz, 1H, H_4), 4.44 (dd, $J_{6a,6b}$= 12.6 Hz, $J_{6a,5}$= 3.8 Hz, 1H, H_{6a}), 4.35 (m, 1H, H_5), 4.28 (dd, $J_{6b,6a}$= 12.5 Hz, $J_{6b,5}$= 1.81 Hz, 1H, H_{6b}), 4.15 (s, 2H, H_8), 2.13 (s, 3H, Ac), 2.09 (s, 3H, Ac), 2.06 (s, 3H, Ac)

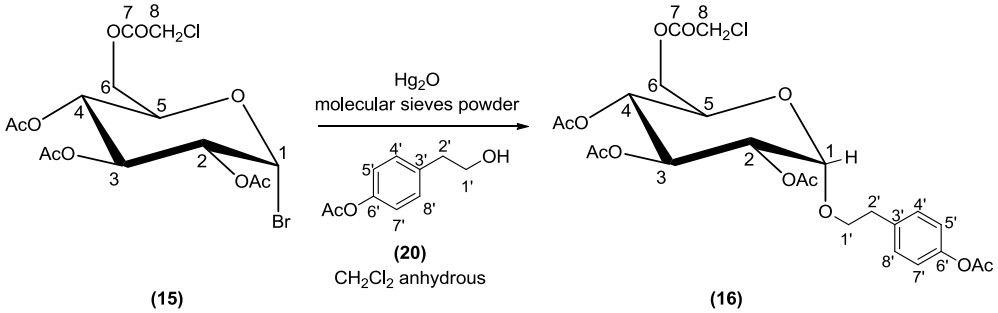
<u>^{13}C NMR (400 MHz, $CDCl_3$):</u> δ 170.54 (CO, OAc), 170.32 (CO, OAc), 170.01 (CO, OAc), 166.86 (CO, C_7), 91.98 (CH, C_1), 73.99 (CH, C_5), 69.87 (CH, C_2), 68.96 (CH, C_3), 68.30 (CH, C_4), 61.41 (CH_2, C_6), 40.31 (CH_2, C_8), 21.10-20.08 (3xCH_3, OAc)

<u>HRMS (ESI+),</u> m/z calcd: 466.9720, found: 466.9714; ($M+Na^+$)

- **<u>^{1}H NMR</u>**



III.4.e *<u>Στάδιο 5ο</u>: Σύνθεση της 1-[2-(4-ακετοξυ-φαινυλο)αιθανόλη]-2,3,4-τρι-Ο-ακετυλο-6-χλωροακετυλο-β-D-γλυκοπυρανόζης (16)*



❖ Η πειραματική διαδικασία και τα φασματοσκοπικά δεδομένα που αφορούν στη σύνθεση της 2-(4-ακετοξυ-φαινυλ)αιθανόλης (20) θα παρατεθούν αναλυτικά στην υποενότητα III.6.d.

Μίγμα 0.073 g (0.164 mmol, 1eq) του (15) και 0.029 g (0.164 mmol, 1eq) του (20) διαλύονται, σε συνθήκες αργού, σε άνυδρο διχλωρομεθάνιο και στο διάλυμα, προστίθενται 0.040 g «molecular sieves powder», για την εξασφάλιση πλήρως άνυδρων συνθηκών στην αντίδραση. Στη συνέχεια, προστίθενται σταδιακά 0.068 g Hg_2O (0.164 mmol, 1eq) και το αντιδρών μίγμα αφήνεται να αναδευτεί για 15 ώρες, στο σκοτάδι και σε θερμοκρασία δωματίου. Έλεγχος της αντίδρασης με TLC[34], μετά το πέρας των 15 ωρών, επιβεβαιώνει το τέλος αυτής. Κατόπιν προσθήκης χλωροφορμίου, διήθησης υπό κενό, πλύσης με $NaHCO_3$ και νερό, ξήρανσης με άνυδρο Na_2SO_4, συμπύκνωσης υπό κενό και καθαρισμού με χρωματογραφία στήλης, παραλήφθηκαν 0.050 g (0.091 mmol) (56%) του (16) .

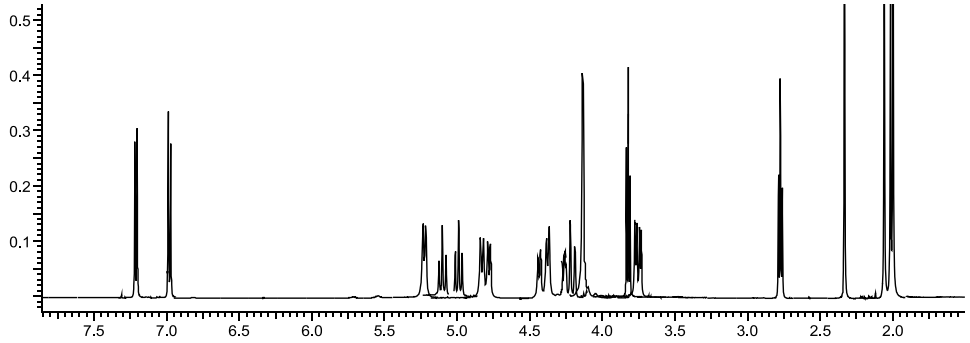
Λευκό στερεό προϊόν, M= 544.9329 g/ mol, $C_{24}H_{29}O_{12}Cl$

<u>^{1}H NMR (600 MHz, $CDCl_3$):</u> 7.21 (d, $J_{5',4'/7',8'}$= 8.4 Hz, 2H, $H_{5',7'}$), 7.00 (d, $J_{4',5'/8',7'}$= 8.3 Hz, 2H, $H_{4',8'}$), 5.24 (d, $J_{1,2}$= 3.9 Hz, 1H, H_1), 5.10 (t, $J_{3,2,4}$= 9.7 Hz, 1H, H_3), 4.96 (t, $J_{2,1,3}$ = 9.9 Hz, 1H, H_2), 4.80 (dd, $J_{4,3}$= 9.8 Hz, $J_{4,5}$= 3.9 Hz, 1H, H_4), 4.40 (dd, $J_{6a,6b}$= 12.6 Hz, $J_{6a,5}$= 3.8 Hz, 1H, H_{6a}), 4.24 (m, 1H, H_5), 3.75 (dd, $J_{6b,6a}$= 12.5 Hz, $J_{6b,5}$= 1.81 Hz, 1H, H_{6b}), 4.10 (s, 2H, H_8), 3.80 (t, $J_{1',2'}$= 7.0 Hz, 2H, $H_{1'}$), 2.82 (t, $J_{2',1'}$= 6.8 Hz, 2H, $H_{2'}$), 2.27 (s, 3H, Ac), 2.03 (s, 3H, Ac), 2.02 (s, 3H, Ac), 1.99 (s, 3H, Ac)

<u>^{13}C NMR (600 MHz, $CDCl_3$):</u> δ 170.06 (CO, OAc), 169.74 (CO, OAc), 169.44 (CO, OAc), 169.31 (CO, OAc), 166.88 (CO, C_7), 149.41 (C, $C_{6'}$), 136.20 (C, $C_{3'}$), 129.98 (2xCH, $C_{5',7'}$), 121.31 (2xCH, $C_{4',8'}$), 101.34 (CH, C_1), 72.68 (CH, C_5), 70.96 (CH, C_3), 68.35 (CH, C_2), 68.05 (CH, C_4), 63.23 (CH_2, $C_{1'}$), 63.14 (CH_2, C_6), 56.72 (CH_2, C_8), 38.20 (CH_2, $C_{2'}$), 20.78 (CH_3, OAc), 20.29 (3xCH_3, OAc)

<u>HRMS (ESI+),</u> m/z calcd: 567.1245, found: 567.1238; ($M+Na^+$)

- **<u>^{1}H NMR</u>**



III.4.f *<u>Στάδιο 6ο</u>: Σύνθεση της 1-[2-(4-ακετοξυ-φαινυλο)αιθανόλη]-2,3,4-τρι-Ο-ακετυλο-6-χλωροακετυλο-β-D-γλυκοπυρανόζης (17)*

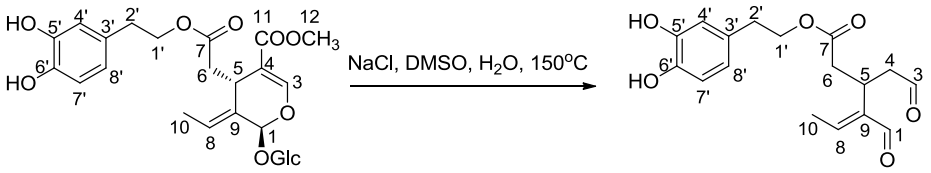
Η μέθοδος αποπροστασίας του ΟΗ-6 από την χλωροακετυλο ομάδα, περιλαμβάνει την, εν θερμώ, διάλυση σε MeOH της 1-[2-(4-ακετοξυ-φαινυλο) αιθανόλη]-2,3,4-τρι-Ο-ακετυλο-6-χλωροακετυλο-β-D-γλυκοπυρανόζης (16), προσθήκη θειουρίας, διαλυμένης σε μικρή ποσότητα MeOH, ανάδευση, αρχικά, για 24 ώρες και αύξηση της θερμοκρασίας στους 50^{o}C, κατά τη διάρκεια, με σκοπό τη βελτίωση της απόδοσης.

0.050 g (0,091 mmol) του (16) διαλύονται σε 5 mL MeOH. Κατόπιν, προστίθεται διάλυμα 0.012 mg θειουρίας, σε 1 mL MeOH και το αντιδρών μίγμα αναδεύεται για 24h. Έλεγχος με TLC[34] της πορείας της αντίδρασης, δεν έδειξε πρόοδο της αντίδρασης, ενώ αύξηση της θερμοκρασίας στη συνέχεια στους 50^{o}C και ανάδευση συνολικά δύο ημερών στις ανωτέρω συνθήκες, δεν κατάφερε να δώσει τα επιθυμητά αποτελέσματα.

Επιβεβαίωση της αποτυχίας του σταδίου αυτού της σύνθεσης αποτελεί το φάσμα πρωτονίου του προϊόντος, από το οποίο, όπως προαναφέρθηκε στην υποενότητα III.1.d.6.2., απουσιάζουν τελείως οι χαρακτηριστικές κορυφές της 2-(4-ακετοξυ-φαινυλο)αιθανόλης (20).

Επομένως, στο στάδιο αυτό, καθώς και στα δύο επόμενα, λόγω αποτυχημένης έκβασης της αντίδρασης, δεν παρατίθενται φασματοσκοπικά δεδομένα.

III.5 Ημισύνθεση ολεασίνης, με πρώτη ύλη ελαιοευρωπεΐνη – αντίδραση Krapcho



(1) **(2)**

Σε σφαιρική φιάλη των 100 mL διαλύονται 0.492 g (0.91 mmol) του (1), σε 14 mL DMSO. 2eq NaCl και 10eq H_2O προστίθενται στο διάλυμα και προσαρμόζεται στη φιάλη κάθετος ψυκτήρας. Το διάλυμα θερμαίνεται στους 150°C, υπό ανάδευση, για 10 ώρες.

Μετά το πέρας των 10 ωρών, η αντίδραση ελέγχεται με TLC[34], το αντιδρών μίγμα αφήνεται να κρυώσει και το DMSO εξατμίζεται υπό κενό. Το στερεό υπόλειμμα εκχυλίζεται 3 φορές με H_2O και CH_2Cl_2 και οι οργανικές φάσεις συλλέγονται, ακολουθεί εξάτμιση υπό κενό και ξήρανση με προσθήκη ξηραντικού Na_2SO_4.

Ακολουθεί καθαρισμός του προϊόντος με χρωματογραφία στήλης και σύστημα διαλυτών (CH_2Cl_2/ EtOAc 8:2) [188]. Παραλήφθηκαν 0.103 g του (2), με τη μορφή άχρωμου ελαιώδους προϊόντος (απόδοση 35%) (R_f[50]= 0.24). Το προϊόν ταυτοποιήθηκε φασματοσκοπικά, με φασματοσκοπία ^{1}H NMR και MS[43], ενώ λήφθηκε επίσης η στροφική του ικανότητα.

Άχρωμο ελαιώδες προϊόν, M= 320.3371 g/ mol, $C_{17}H_{20}O_6$

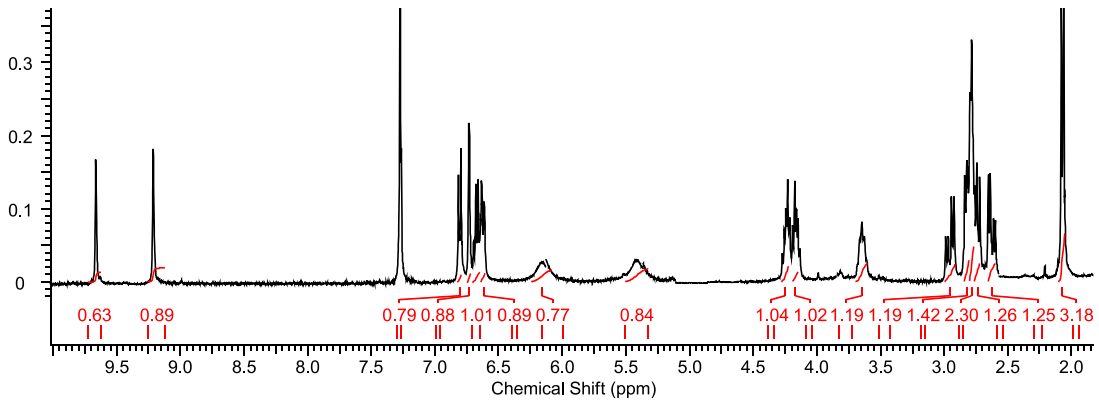
^{1}H NMR (600 MHz, $CDCl_3$): δ 9.65 (s, 1H, H_1), 9.20 (d, J= 2.0 Hz, 1H, H_3), 6.79 (d, $J_{7',8'}$=8.1 Hz, 1H, $H_{7'}$), 6.72 (d, $J_{4',8'}$=1.9 Hz, 1H, $H_{4'}$), 6.65 (q, $J_{8,10}$= 7.0 Hz, 1H, H_8), 6.61 (dd, $J_{8',7'}$=8.0 Hz, $J_{8',4'}$=1.8 Hz, 1H, $H_{8'}$), 6.13 (brs, 1H, OH(6΄)), 5.39 (brs, 1H, OH(5΄)), 4.23 (m, 1H, $H_{1'a}$), 4.15 (m, 1H, $H_{1'b}$), 3.63 (m, 1H, H_5), 2.94 (dd, $J_{4a,4b}$= 18.1 Hz, $J_{4a,5}$= 8.2 Hz, 1H, H_{4a}), 2.79 (dd, $J_{4b,4a}$= 18.5 Hz, $J_{4b,5}$= 5.7 Hz, 1H, H_{4b}), 2.77 (m, 2H, $H_{2''}$), 2.74 (dd, $J_{6a,6b}$= 15.6 Hz, $J_{6a,5}$= 8.7 Hz, 1H, H_{6a}), 2.61 (dd, $J_{6b,6a}$= 15.9 Hz, $J_{6b,5}$= 6.4 Hz, 1H, H_{6b}), 2.06 (d, $J_{10,8}$= 7.2 Hz, 3H, H_{10})

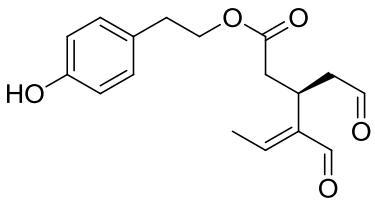
^{13}C NMR (600 MHz, $CDCl_3$): δ 200.68 (CO, C_1), 195.43 (CO, C_3), 171.99 (CO, C_7), 155.03 (CO, C_8), 142.82 (C, $C_{6'}$), 143.35 (C, $C_{5'}$), 143.12 (C, C_9), 130.50 (C, $C_{3'}$), 120.76 (CH, $C_{8'}$), 115.80 (CH, $C_{4'}$), 114.89 (CH, $C_{7'}$), 64.92 (CH_2, $C_{1'}$), 45.79 (CH_2, C_4), 36.52 (CH_2, C_6), 33.73 (CH_2, $C_{2''}$), 26.68 (CH, C_5), 14.81 (CH_3, C_{10})

HRMS (ESI-), m/z calcd: 319.1182, found: 319.1194; (M-H)

$[\alpha]_D^{20}$= -4.62 (c 0.108, $CHCl_3$)

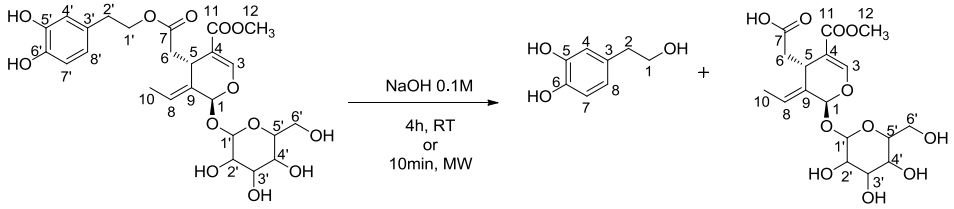
- **^{1}H NMR**




HO
O
O
O
O

III.6 Ημισύνθεση της ολεοκανθάλης, με πρώτη ύλη την ελαιοευρωπεΐνη

III.6.a *Σύνθεση του 11-μεθυλεστέρα του ολεοσίδη (26)*



(1) (4) (26)

Μέθοδος Α: Κλασική

1g (1.85 mmol) του (1) και 50 mL (περίσσεια) υδατικού διαλύματος καυστικού νατρίου (NaOH) 0,1M αναδεύονται σε θερμοκρασία δωματίου (RT). Μετά από 4 ώρες ανάδευσης, με TLC[34], διαπιστώνεται ότι η αντίδραση έχει τελειώσει. Εξουδετέρωση του μίγματος με προσθήκη υδροχλωρικού οξέος (HCl) 1N, κατά σταγόνες, μέχρι pH= 4-5. Εξάτμιση του διαλύτη και ακολούθως, καθαρισμός του προϊόντος, σε μορφή «ξηρού ντεπώ» (silica 70-200μm), με χρωματογραφία στήλης (silica flash (40-63μm)/ CH_2Cl_2/ MeOH: 95/5→50/50) δίνει, κατόπιν λυοφιλοποίησης, το επιθυμητό προϊόν (26) [255], [266].

Μέθοδος Β: Μικροκυμάτων (MW[53])

Ίδιες ποσότητες αντιδρώντων συστατικών χρησιμοποιούνται και για τη μέθοδο μικροκυμάτων, με τη διαφορά ότι η σαπωνοποίηση λαμβάνει χώρα μέσα στη συσκευή, ενώ ο απαιτούμενος χρόνος αντίδρασης στην περίπτωση αυτή είναι 6-9 λεπτά. Έλεγχος με TLC[34], υποδεικνύει το τέλος της αντίδρασης και ακολουθεί κατεργασία του αντιδρώντος μίγματος, όπως περιγράφηκε στην κλασική μέθοδο σαπωνοποίησης. Κατόπιν καθαρισμού, παραλαμβάνεται το επιθυμητό προϊόν.

Σύμφωνα με τη κλασσική μέθοδο σαπωνοποίησης, παραλήφθηκαν 0.483 g (απόδοση 65%) του (26), με χρωματογραφία στήλης (silica flash (40-63μm)/ CH_2Cl_2/ MeOH: 95/5→50/50, $R_{f(CH2Cl2/MeOH: 8/2)}$= 0.22).

Η μέθοδος μικροκυμάτων έδωσε 0.365 g του (26) (απόδοση 48%) [176].

Λευκό στερεό προϊόν, M= 404.1319 g/ mol, $C_{17}H_{24}O_{11}$

Το φάσμα του (26) παρατέθηκε στην Εικόνα 67 και δεν παρατίθεται ξανά, χάριν συντομίας.

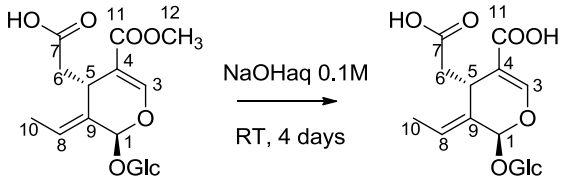
^{1}H NMR (600 MHz, D_2O): δ 7.50 (s, 1H, H_3), 6.08 (q, $J_{8,10}$=7.0Hz, 1H, H_8), 5.85 (s, 1H, H_1), 4.87 (d, $J_{1',2'}$=8.0Hz, 1H, $H_{1'}$), 3.92 (dd, $J_{5,6b}$=9.3Hz, $J_{5,6a}$=4.8Hz, 1H, H_5), 3.84 (dd, $J_{6'b,6'a}$=12.5Hz, $J_{6'b,5'}$=2.2Hz, 1H, $H_{6'b}$), 3.68 (s, 3H, H_{12}), 3.66 (dd, $J_{6'a,6'b}$=12.5Hz, $J_{6'a,5'}$=6.0Hz, 1H, $H_{6'a}$), 3.51 (t, $J_{3',2',4'}$=9.2Hz, 1H, $H_{3'}$), 3.44 (ddd, $J_{5',4'}$=9.8Hz, $J_{5',6'b}$=5.9Hz, $J_{5',6'a}$=2.1Hz, 1H, $H_{5'}$), 3.38 (t, $J_{2',3',1'}$=9.2Hz, 1H, $H_{2'}$), 3.37 (t, $J_{4',5',3'}$=9.7Hz, 1H, $H_{4'}$), 2.70 (dd, $J_{6b,6a}$=13.5Hz, $J_{6b,5}$=4.9Hz, 1H, H_{6b}), 2.32 (dd, $J_{6a,6b}$=13.5Hz, $J_{6a,5}$=9.4Hz, 1H, H_{6a}), 1.68 (d, $J_{10,8}$=7.1Hz, 3H, H_{10})

^{13}C NMR (600 MHz, D_2O): δ 177.77 (CO, C_7), 169.64 (CO, C_{11}), 154.63 (CH, C_3), 128.72 (C, C_4), 125.08 (C, C_9), 108.97 (CH, C_8), 99.91 (CH, $C_{1'}$), 95.20 (CH, C_1), 76.71 (CH, $C_{5'}$), 75.96 (CH, $C_{3'}$), 72.96 (CH, $C_{2'}$), 69.77 (CH, $C_{4'}$), 60.91 (CH_2, $C_{6'}$), 52.19 (CH_3, C_{12}), 41.63 (CH_2, C_6), 31.11 (CH, C_5), 13.15 (CH_3, C_{10})

HRMS (MH+), **m/z** calcd: 427.1216, found: 427.1204; ($M+Na^+$)

$[\alpha]_D^{20}$= -241 (c 0.03, MeOH)

III.6.b *Σύνθεση του ολεοσίδη (22)*



(26) **(22)**

Σύμφωνα με την πειραματική διαδικασία της σαπωνοποίησης, που παρατέθηκε στην υποενότητα III.3.b.1, 0.650 g του ολεοσίδη (22) (απόδοση 90%) παραλήφθηκαν από 0.750 g του (26) [176].

Λευκό στερεό προϊόν, κατόπιν καθαρισμού και λυοφιλοποίησης. M= 390.1162g/mol, $C_{16}H_{22}O_{11}$. Το φάσμα ^{1}H NMR του ολεοσίδη (22) παρατέθηκε στην Εικόνα 68, αλλά παρατίθεται εκ νέου, χάριν ευκολίας.

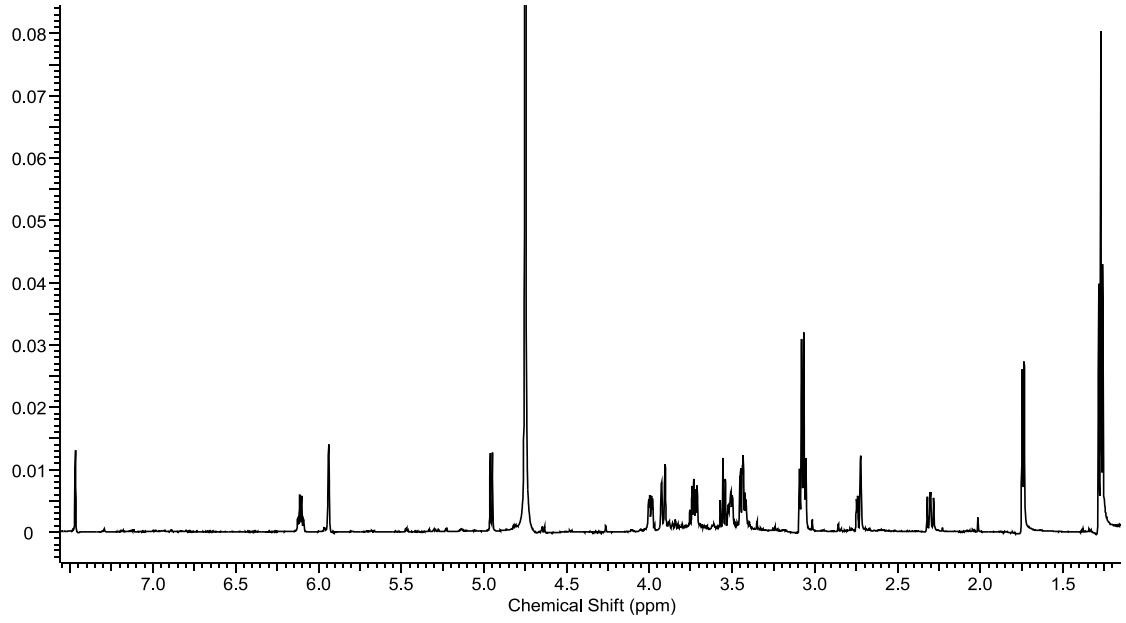
^{1}H NMR (600 MHz, D_2O): δ 7.17 (s, 1H, H_3), 6.01 (q, $J_{8,10}$= 7.0Hz, 1H, H_8), 5.85 (s, 1H, H_1), 4.89 (d, $J_{1',2'}$= 7.9Hz, 1H, $H_{1'}$), 3.93 (ddd, $J_{5',4'}$= 9.7Hz, $J_{5',6'a}$= 4.6Hz, $J_{5',6'b}$=1.9Hz, 1H, $H_{5'}$), 3.86 (dd, $J_{6'b,6'a}$= 12.4Hz, $J_{6'b,5'}$=1.9Hz, 1H, $H_{6b'}$), 3.67 (dd, $J_{6'a,6'b}$= 12.4Hz, $J_{6'a,5'}$=4.6Hz, 1H, $H_{6'a}$), 3.51 (t, $J_{2',1',3'}$= 9.4Hz, 1H, $H_{3'}$), 3.46 (dd, $J_{5,6b}$= 4.4Hz, $J_{5,6a}$= 8.8Hz, 1H, H_5), 3.38-3.40 (2xt, $J_{2',3',1'/4',5',3'}$= 9.4Hz, 2H, $H_{2',4'}$), 2.58 (dd, $J_{6b,6a}$= 14.6Hz, $J_{6b,5}$= 4.4Hz, 1H, H_{6b}), 2.06 (dd, $J_{6a,6b}$= 14.6Hz, $J_{6a,5}$= 8.8Hz, 1H, H_{6a}), 1.68 (d, $J_{10,8}$= 6.9Hz, 3H, H_{10})

^{13}C NMR (600 MHz, D_2O): δ 181.44 (CO, C_7), 169.54 (CO, C_{11}), 149.43 (CH, C_3), 129.96 (C, C_4), 123.39 (C, C_9), 115.39 (CH, C_8), 99.66 (CH, $C_{1'}$), 94.50 (CH, C_1), 76.43 (CH, $C_{5'}$), 75.71 (CH, $C_{3'}$), 72.76 (CH, $C_{2'}$), 69.55 (CH, $C_{4'}$), 60.65 (CH_2, $C_{6'}$), 43.65 (CH_2, C_6), 32.55 (CH, C_5), 12.98 (CH_3, C_{10})

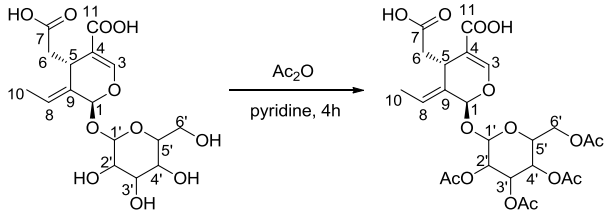
HRMS (ESI+), m/z calcd: 413.1060, found: 413.1035; ($M+Na^+$)

$[\alpha]_D^{20}$= -294 (c 0.017, MeOH)

- **^{1}H NMR**



III.6.c *Σύνθεση του τετραοξικού ολεοσίδη (23)*



(22) (23)

Σε 0.140 g (1eq) του (22) προστίθεται πυριδίνη και το μίγμα αναδεύεται, υπό συνθήκες αργού. Στο διάλυμα προστίθενται 35 eq οξικού ανυδρίτη, στους 0°C. (Εμπειρικά, η ποσότητα της πυριδίνης που χρησιμοποιείται είναι περίπου η μισή σε όγκο, απ' αυτή του οξικού ανυδρίτη). Μετά από ανάδευση 4 ωρών σε θερμοκρασία δωματίου, το μίγμα αραιώνεται με χλωροφόρμιο ($CHCl_3$), πλένεται με νερό στους 0°C, και εξουδετερώνεται, με υδατικό διάλυμα HCl 1M, κατά σταγόνες, μέχρι pH= 5. Το διάλυμα εκχυλίζεται και οι δύο φάσεις, οργανική και υδατική, διαχωρίζονται. Η υδατική φάση εκχυλίζεται περαιτέρω, με EtOAc. Οι οργανικές στιβάδες που συλλέγονται ξηραίνονται με άνυδρο θειϊκό νάτριο (Na_2SO_4) και συμπυκνώνονται, υπό μειωμένη πίεση. Ακολουθεί καθαρισμός του προϊόντος, με χρωματογραφία στήλης, (silica flash (40-63μm)/ CH_2Cl_2/MeOH: 99/1→ 9/1, $R_{f(CH2Cl2/MeOH:\ 9/1)}$= 0.56). Από 0.140 g (3 mmol) του (22), παραλήφθηκαν 0.020 g (απόδοση 10%) του (23) [255].

Προϊόν, με μορφή λευκού αφρού, κατόπιν καθαρισμού και λυοφιλοποίησης. M= 558.1585 g/mol, $C_{24}H_{30}O_{15}$

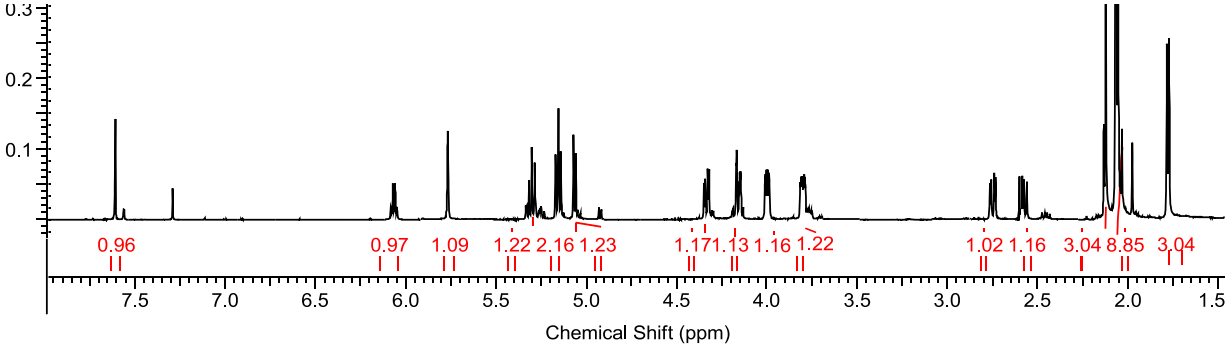
^{1}H NMR (600 MHz, $CDCl_3$): δ 7.60 (s, 1H, H_3), 6.09 (q, $J_{8,10}$=7.0Hz, 1H, H_8), 5.74 (s, 1H, H_1), 5.31 (t, $J_{3',4',2'}$=9.4Hz, 1H, $H_{3'}$), 5.15 (t, $J_{2',3',1'/4',5',3'}$=9.4Hz, 2H, $H_{2',4'}$), 5.06 (d, $J_{1',2'}$=7.9Hz, 1H, $H_{1'}$), 4.32 (dd, $J_{6'a,6'b}$=12.4Hz, $J_{6'a,5'}$=4.6Hz, 1H, $H_{6'a}$), 4.24 (dd, $J_{6'b,6'a}$=12.4Hz, $J_{6'b,5'}$=1.9Hz, 1H, $H_{6b'}$), 4.02 (ddd, $J_{5',4'}$=9.7Hz, $J_{5',6'a}$=4.6Hz, $J_{5',6'b}$=1.9Hz, 1H, $H_{5'}$), 3.78 (dd, $J_{5,6b}$=4.4Hz, $J_{5,6a}$=8.8Hz, 1H, H_5), 2.76 (dd, $J_{6b,6a}$=14.6Hz, $J_{6b,5}$=4.4Hz, 1H, H_{6b}), 2.52 (dd, $J_{6a,6b}$=14.6Hz, $J_{6a,5}$=8.8Hz, 1H, H_{6a}), 2.12 (s, 3H, Ac), 2.08 (2xs, 9H, Ac), 1.78 (d, $J_{10,8}$=6.9Hz, 3H, H_{10})

^{13}C NMR (600 MHz, $CDCl_3$): δ 173.91 (CO, C_7), 170.23 (CO, C_{11}), 170.11 (CO, Ac), 169.33 (CO, Ac), 169.29 (CO, Ac), 168.24 (CO, Ac), 154.33 (CH, C_3), 130.82 (C, C_4), 124.84 (C, C_9), 109.56 (CH, C_8), 107.51 (CH, $C_{1'}$), 104.42 (CH, C_1), 74.83 (CH, $C_{5'}$), 72.09 (CH, $C_{3'}$), 71.16 (CH, $C_{2'}$), 69.35 (CH, $C_{4'}$), 62.71 (CH_2, $C_{6'}$), 43.25 (CH_2, C_6), 25.44 (CH, C_5), 21.18 (CH_3, Ac), 21.11 (CH_3, Ac), 21.06 (CH_3, Ac), 20.75 (CH_3, Ac), 13.78 (CH_3, C_{10})

HRMS (ESI+), m/z calcd: 581.1482, found: 581.1605; ($M+Na^+$), calcd: 597.1222, found: 597.1350; ($M+K^+$)

$[\alpha]_D^{20}$= -400 (c 0.01, MeOH)

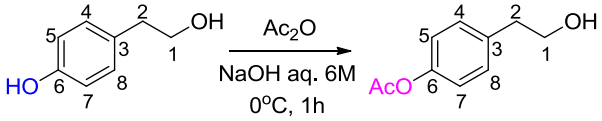
^{1}H NMR



III.6.d *Σύνθεση του τετραοξικού 7-[2-(4-ακετοξυφαινυλ)-αιθυλ]εστέρα του ολεοσίδη (25)*

III.6.d.1 *Σύνθεση της 2-(4-ακετοξυ-φαινυλο) αιθανόλης (20)*

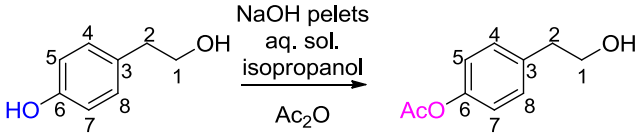
III.6.d.1.1 1ος τρόπος



(19) **(20)**

Ο πρώτος τρόπος σύνθεσης της 2-(4-ακετοξυ-φαινυλο) αιθανόλης (20) [245] περιλαμβάνει την διάλυση 0.050 g (0.362 mmol) του (19) σε 90 μL υδατικού διαλύματος 6M NaOH και προσθήκη 0.271 g πάγου στο διάλυμα. Μετά την πτώση της θερμοκρασίας στους 0°C, 44 μL (0.434 mmol) οξικού ανυδρίτη προστίθενται κατά σταγόνες, σε διάστημα 40 λεπτών, υπό έντονη ανάδευση, με το pH να διατηρείται στα 7-8. Η αντίδραση είναι εξώθερμη και η θερμοκρασία δεν ξεπέρασε τους 10°C. Η ανάδευση συνεχίστηκε, σ' αυτή τη θερμοκρασία για 1h, οπότε ο έλεγχος με χρωματογραφία λεπτής στιβάδας, σε σύστημα διαλυτών n-hex/ EtOAc 3:1, έδειξε ότι δεν υπάρχει πλέον ποσότητα του (19) στο μίγμα. Κατόπιν εκχύλισης του αντιδρώντος μίγματος, τρεις φορές με EtOAc, συνένωση των οργανικών φάσεων, πλύση με υδατικό διάλυμα NaCl, ξήρανση με άνυδρο Na_2SO_4 και συμπύκνωσης υπό κενό, παραλήφθηκαν 0.058 g (90%) του (20), ικανοποιητικής καθαρότητας, ως εκ τούτου δεν απαιτήθηκε καθαρισμός με χρωματογραφία στήλης.

III.6.d.1.2 2ος τρόπος



(19) **(20)**

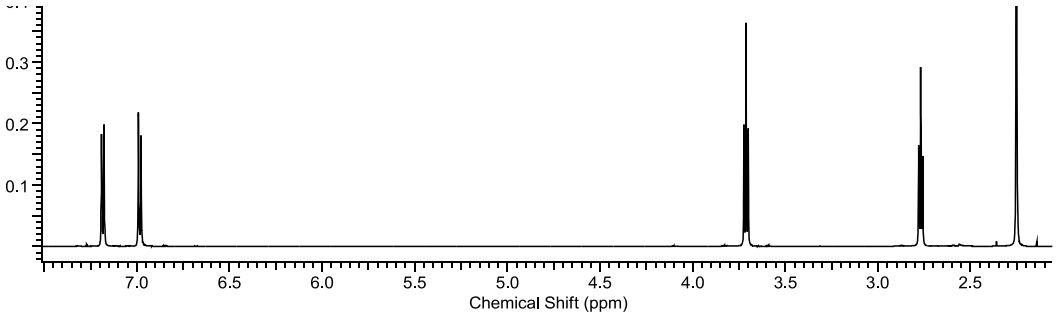
Ο δεύτερος τρόπος σύνθεσης της 2-(4-ακετοξυ-φαινυλο) αιθανόλης (20) [246] περιλαμβάνει τη διάλυση 0.050 g (0.362 mmol) του (19) σε 1.25 mL ισοπροπανόλης, περιεχόμενης 0.020 g NaOH, διαλυμένα σε 0.5 mL νερό. Ακολουθεί ανάδευση του διαλύματος και στάγδην προσθήκη 99 μL (0.991 mmol) οξικού ανυδρίτη, με διατήρηση του pH στα 7-8. Το αντιδρών μίγμα αφέθηκε να αναδευτεί για ακόμα 30 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Η ισοπροπανόλη απομακρύνθηκε υπό κενό και κατόπιν εκχύλισης του στερεού υπολείμματος με EtOAc, πλύσης με νερό και υδατικό διάλυμα NaCl, μέχρι εξουδετέρωσης, ξήρανσης με άνυδρο Na_2SO_4 και συμπύκνωσης υπό κενό, παραλήφθηκαν 0.061 g (95%) του (20), ικανοποιητικής, επίσης, καθαρότητας.

Άχρωμο ελαιώδες προϊόν, M= 180.2005 g/ mol, $C_{10}H_{12}O_3$

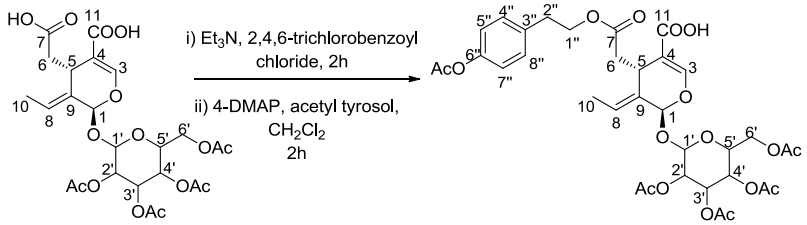
^{1}H NMR (600 MHz, $CDCl_3$): 7.18 (d, $J_{5,4/7,8}$= 8.4 Hz, 2H, $H_{5,7}$), 6.98 (d, $J_{4,5/8,7}$= 8.3 Hz, 2H, $H_{4,8}$), 3.71 (t, $J_{1,2}$= 7.0 Hz, 2H, H_1), 2.77 (t, $J_{2,1}$= 6.8 Hz, 2H, H_2), 2.25 (s, 3H, Ac)
^{13}C NMR (600 MHz, $CDCl_3$): δ 129.75 (CH, $C_{5,7}$), 121.37 (CH, $C_{4,8}$), 62.68 (CH_2, C_1), 38.27 (CH_2, C_2), 20.64 (CH_3, OAc(C_6))

HRMS (ESI+), m/z calcd: 203.0684, found: 203.0678; ($M+Na^+$)

❖ **^{1}H NMR**



III.6.d.2 Σύνθεση του τετραοξικού 7-[2-(4-ακετοξυφαινυλ)-αιθυλ]εστέρα του ολεοσίδη (25)



(23) **(25)**

0.050 g (1 eq) του (23) διαλύονται σε 3 mL CH_2Cl_2, υπό συνθήκες αργού. Έπειτα προστίθενται 1.2 eq του 2,4,6-τριχλωροβενζόϋλο χλωριδίου και 1.4 eq της Et_3N, στους 0^o C, το μίγμα αναδεύεται για 2 ώρες σε συνθήκες περιβάλλοντος (RT) και το διάλυμα γίνεται πορτοκαλί. Μίγμα 1.5 eq της επιλεγμένης αλκοόλης (20) με 1.4 eq της DMAP και το CH_2Cl_2 (3 mL) προστίθεται κατά σταγόνες, στους 0^oC. Έπειτα από 2h30min ανάδευσης, στο μίγμα προστίθεται υδατικό διάλυμα χλωριούχου αμμωνίου (NH_4Cl), κατά σταγόνες, μέχρι pH= 5-6 και το μίγμα εκχυλίζεται 2 φορές με 30 mL CH_2Cl_2. Η υδατική στιβάδα εκχυλίζεται εκ νέου, 2 φορές, με EtOAc, και οι οργανικές στιβάδες συλλέγονται και ξηραίνονται με Na_2SO_4. Ακολουθεί διήθηση υπό κενό, πλύση με CH_2Cl_2, εξάτμιση του διαλύτη και καθαρισμός με χρωματογραφία στήλης, (silica flash (40-63μm)/ c-Hex/ EtOAc: 8/2→ 7/3, που δίνει τον επιθυμητό εστέρα (25) [261]. Παραλήφθηκαν 0.032 g (απόδοση 14%) του (25) από 0.050 g του (23).

Λευκό στερεό προϊόν, M= 720.6712 g/ mol, $C_{34}H_{40}O_{17}$

^{1}H NMR (600 MHz, $CDCl_3$): 7.50 (s, 1H, H_3), 7.20 (d, $J_{5'',4''/7'',8''}$= 8.4 Hz, 2H, $H_{5'',7''}$), 7.01 (d, $J_{4'',5''/8'',7''}$= 8.3 Hz, 2H, $H_{4'',8''}$), 5.99 (q, $J_{8,10}$= 6.6 Hz, 1H, H_8), 5.75 (s, 1H, H_1), 5.27 (t, $J_{3',4',2'}$= 9.4 Hz, 1H, $H_{3'}$), 5.13 (2xt, 2H, $H_{2',4'}$), 5.02 (d, $J_{1',2'}$= 8.0 Hz, 1H, $H_{1'}$), 4.30 (dd, $J_{6'a,6'b}$= 12.4 Hz, $J_{6'a,5'}$= 5.0 Hz, 1H, $H_{6'a}$), 4.23 (2xt, $J_{1'',2''}$= 6.8 Hz, 2H, $H_{1''}$), 4.12 (dd, $J_{6'b,6'a}$= 12.4 Hz, $J_{6'b,5'}$= 2.4 Hz, 1H, $H_{6'b}$), 3.90 (dd, $J_{5,6a}$= 8.2 Hz, $J_{5,6b}$= 4.0 Hz, 1H, H_5), 3.76 (ddd, $J_{5',4'}$= 10.1 Hz, $J_{5',6'a}$= 4.7 Hz, $J_{5',6'b}$= 2.4 Hz, 1H, $H_{5'}$), 2.90 (t, $J_{2'',1''}$= 6.8 Hz, 2H, $H_{2''}$), 2.65 (dd, $J_{6b,6a}$= 14.6 Hz, $J_{6b,5}$= 4.0 Hz, 1H, H_{6b}), 2.51 (dd, $J_{6a,6b}$= 14.4 Hz, $J_{6a,5}$= 8.2 Hz, 1H, H_{6a}), 2.31 (s, 3H, Ac($C_{6''}$), 2.05 (s, 3H, Ac), 2.03 (2xs, 6H, Ac), 2.02 (s, 3H, Ac), 1.69 (d, $J_{10,8}$= 7.1 Hz, 3H, H_{10})

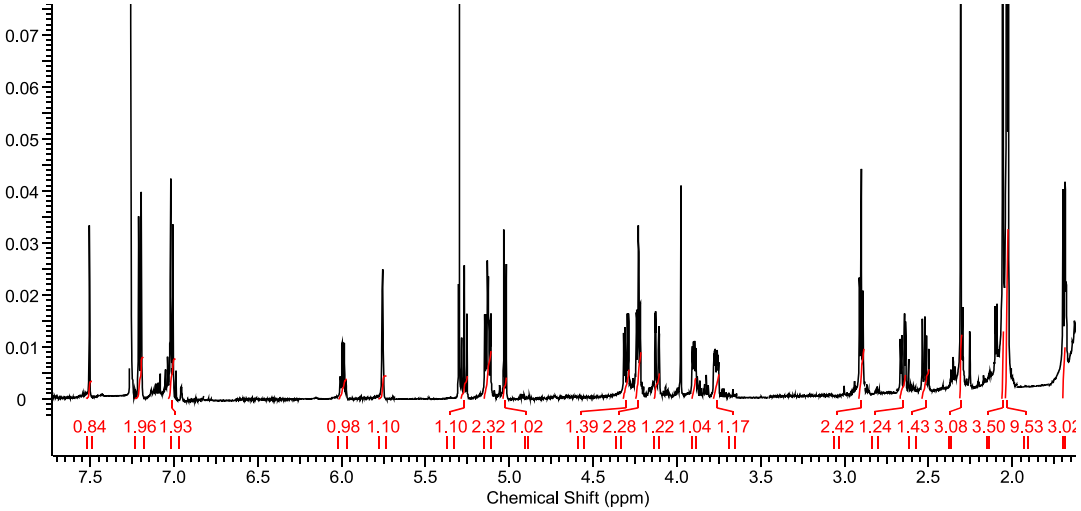
^{13}C NMR (600 MHz, $CDCl_3$): δ 171.22 (CO, C_7), 170.28 (CO, OAc), 169.98 (CO, OAc), 169.55 (2xCO, OAc), 169.52 (CO, OAc), 169.02 (CO, C_{11}), 154.05 (CH, C_3), 129.68 (CH, $C_{5'',7''}$), 124.55 (CH, C_8), 121.12 (CH, $C_{4'',8''}$), 96.68 (CH, $C_{1'}$), 93.49 (CH, C_1), 72.13 (CH, $C_{3'}$), 71.87 (CH, $C_{5'}$), 70.27 (CH, $C_{2'}$), 67.82 (CH, $C_{4'}$), 64.32 (CH_2, $C_{1''}$), 61.36 (CH_2, $C_{6'}$), 53.04

(CH, $C_{3'}$), 39.33 (CH_2, C_6), 33.91 (CH_2, $C_{2''}$), 29.50 (CH, C_5), 20.63 (CH_3, OAc($C_{6'}$), 20.16 (4xCH_3, OAc), 13.11 (CH_3, C_{10})

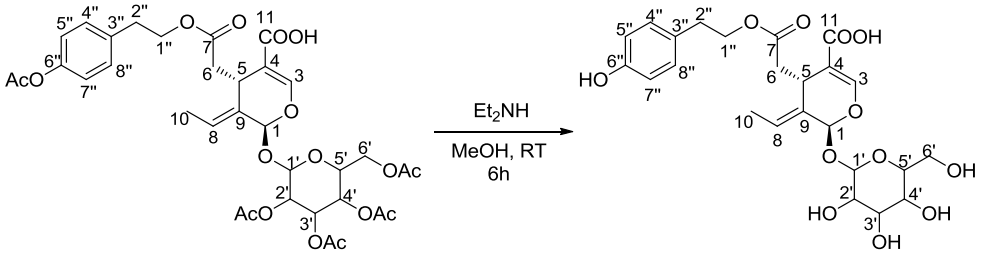
HRMS (ESI+), m/z calcd: 743.2163, found: 743.2153; ($M+Na^+$)

$[\alpha]_D^{20}$= -28.72 (c 0.181, $CHCl_3$)

❖ **^{1}H NMR**



III.6.d.3 *Σύνθεση του 7-[2-(4-υδροξυφαινυλ)-αιθυλ]εστέρα του ολεοσίδη (24)*



(25) **(24)**

0.017 g του (25) διαλύονται σε 4mL MeOH και κατόπιν προστίθενται, κατά σταγόνες, 5-10 eq διαιθυλαμίνης (Et_2NH). Μετά από 6 ώρες ανάδευσης σε θερμοκρασία περιβάλλοντος, το μίγμα αραιώνεται με MeOH και προστίθεται μικρή ποσότητα silica (70-200μm), ώστε το pH να γίνει 5-6. Ακολουθεί εξάτμιση της MeOH και καθαρισμός του προϊόντος με χρωματογραφία στήλης (silica 20-40μm, CH_2Cl_2/ MeOH: 95/5). [255] Παραλήφθηκαν 0.006 g (απόδοση 74%) του (24) από 0.017 g του (25).

Λευκό στερεό προϊόν, M= 510.4878 g/ mol, $C_{24}H_{30}O_{12}$

^{1}H NMR (600 MHz, D_2O): 7.46 (s, 1H, H_3), 7.21 (d, $J_{5'',4''/7'',8''}$= 8.5 Hz, 2H, $H_{5'',7''}$), 6.89 (d, $J_{4'',5''/8'',7''}$= 8.1 Hz, 2H, $H_{4'',8''}$), 6.05 (q, $J_{8,10}$= 6.7 Hz, 1H, H_8), 5.81 (s, 1H, H_1), 4.91 (d, $J_{1',2'}$= 8.1 Hz, 1H, $H_{1'}$), 4.34 (m, 1H, $H_{1''a}$), 4.21 (m, 1H, $H_{1''b}$), 3.94 (m, 1H, H_5), 3.93 (dd, $J_{6'a,6'b}$= 12.5 Hz, $J_{6'a,5'}$= 9.7 Hz, 1H, $H_{6'a}$), 3.75 (dd, $J_{6'b,6'a}$= 12.5 Hz, $J_{6'b,5'}$= 5.6 Hz, 1H, $H_{6'b}$), 3.58 (t, $J_{3',4',2'}$= 9.2 Hz, 1H, $H_{3'}$), 3.51 (m, 1H, $H_{5'}$), 3.48 (m, 1H, $H_{4'}$), 3.46 (m, 1H, $H_{2'}$), 2.90 (t, $J_{2'',1''}$= 6.2 Hz, 2H, $H_{2''}$), 2.73 (dd, $J_{6b,6a}$= 13.6 Hz, $J_{6b,5}$= 4.8 Hz, 1H, H_{6b}), 2.50 (dd, $J_{6a,6b}$= 13.6 Hz, $J_{6a,5}$= 9.0 Hz, 1H, H_{6a}), 1.61 (d, $J_{10,8}$= 7.1 Hz, 3H, H_{10})

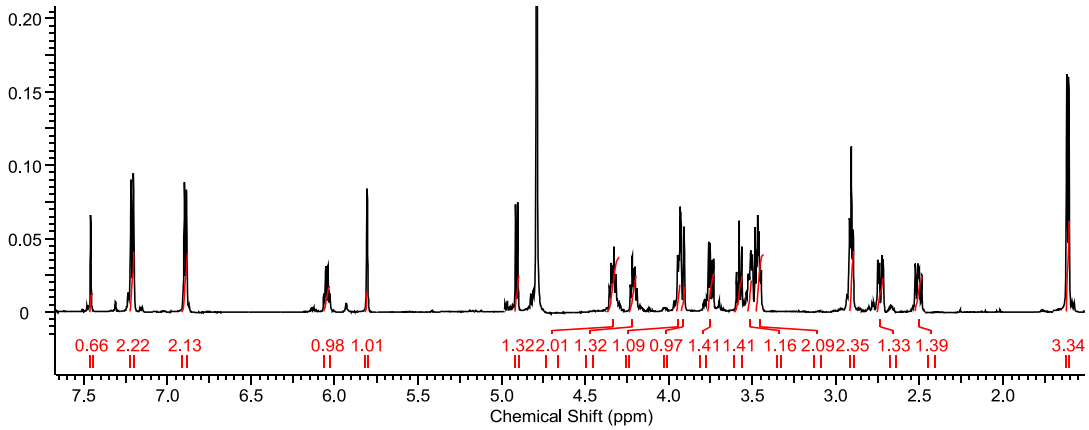
^{13}C NMR (600 MHz, D_2O): δ 174.33 (CO, C_7), 171.55 (CO, C_{11}), 153.94 (C, $C_{6''}$), 152.82 (CH, C_3), 130.29 (2xCH, $C_{5'',7''}$), 130.27 (C, $C_{3''}$), 128.63 (C, C_9), 124.64 (CH, C_8), 115.33 (2xCH, $C_{4'',8''}$), 110.28 (C, C_4), 99.41 (CH, $C_{1'}$), 94.51 (CH, C_1), 76.13 (CH, $C_{5'}$), 75.54 (CH, $C_{3'}$), 72.66

(CH, $C_{2'}$), 69.30 (CH, $C_{4'}$), 66.16 (CH_2, $C_{1''}$), 60.52 (CH_2, $C_{6'}$), 39.65 (CH_2, C_6), 33.11 (CH_2, $C_{2''}$), 30.57 (CH, C_5), 12.44 (CH_3, C_{10})

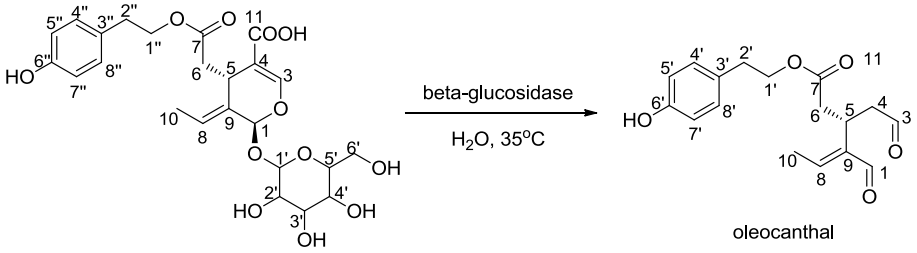
HRMS (ESI+), m/z calcd: 533.1635, found: 533.1616; ($M+Na^+$)

$[\alpha]_D^{20}$= -81.03 (c 0.290, H_2O)

❖ **^{1}H NMR**



III.6.d.4 Σύνθεση της ολεοκανθάλης (3)



(24) **(3)**

0.050 g του (24) διαλύονται σε 1 mL H_2O και προστίθενται 0.020 g του ενζύμου β-γλυκοσιδάση. Το μίγμα τοποθετείται στον επωαστή ελεγχόμενης θερμοκρασίας (incubator) και η θερμοκρασία ρυθμίζεται στους 35°C, με ταυτόχρονη ανάδευση. Μετά από 2 h και μετά από 4 h, η αντίδραση ελέγχεται με χρωματογραφία λεπτής στιβάδας. Σε περίπτωση που παρατηρείται ακόμα παρουσία του (24) στο αντιδρών μιγμα, αυτό τοποθετείται για όλη τη διάρκεια της νύχτας στον επωαστή.

Μετά το τέλος της αντίδρασης, όπως προαναφέρθηκε στην υποενότητα III.3.d.1, το προκύπτον μίγμα υποβάλλεται σε εκχύλιση SPE[38], ώστε να απομακρυνθεί το ένζυμο και να παραλάβουμε, κατόπιν ακόλουθης εκχύλισης με EtOAc και H_2O, το επιθυμητό προϊόν, στην οργανική φάση. Το προϊόν δεν χρειάζεται σημαντικό καθαρισμό και στην περίπτωση της ολεοκανθάλης (3) πραγματοποιήθηκε παρασκευαστική χρωματογραφία λεπτής στιβάδας (preparative TLC[34]), ώστε να παραληφθεί σε μεγάλη καθαρότητα η ολεοκανθάλη (3). Παραλήφθηκαν 0.004 g (84%) του (3) ($R_{f(CH2Cl2/MeOH: 95/5)}$= 0.48) από 0.006 g του (24).

Άχρωμο ελαιώδες προϊόν, M= 304.3377 g/mol, $C_{17}H_{20}O_5$

^{1}H NMR (600 MHz, $CDCl_3$): δ 9.64 (s, 1H, H_1), 9.24 (d, *J*= 1.8 Hz, 1H, H_3), 7.06 (d, $J_{4',5'/8',7'}$=8.4 Hz, 2H, $H_{4',8'}$), 6.76 (dd, $J_{5',4'/7',8'}$= 8.0 Hz, 2H, $H_{5',7'}$), 6.63 (q, $J_{8,10}$= 7.0 Hz, 1H, H_8), 4.22 (m, 2H, $H_{1'}$), 3.61 (m, 1H, H_5), 2.96 (dd, $J_{4a,4b}$= 18.3 Hz, $J_{4a,5}$= 9.7 Hz, 1H, H_{4a}), 2.82 (t, $J_{2',1'}$= 10.0 Hz, 2H, $H_{2'}$), 2.74 (dd, $J_{4b,4a}$= 18.1 Hz, $J_{4b,5}$= 5.6 Hz, 1H, H_{4b}), 2.68 (dd, $J_{6a,6b}$=

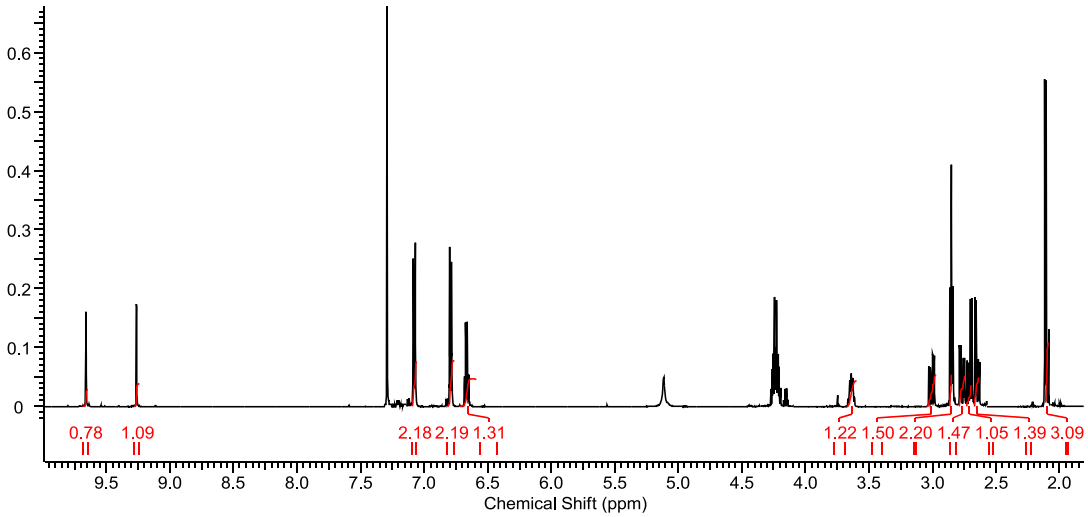
16.0 Hz, $J_{6a,5}$= 8.3 Hz, 1H, H_{6a}), 2.61 (dd, $J_{6b,6a}$= 16.0 Hz, $J_{6b,5}$= 6.6 Hz, 1H, H_{6b}), 2.08 (d, $J_{10,8}$= 7.0 Hz, 3H, H_{10})

^{13}C NMR (600 MHz, $CDCl_3$): δ 200.25 (CO, C_1), 195.04 (CO, C_3), 171.66 (CO, C_7), 154.35 (CO, C_8), 143.15 (C, C_9), 130.81 (C, $C_{3'}$), 130.06 (2xCH, $C_{4',8'}$), 155.35 (C, $C_{6'}$), 115.22 (2xCH, $C_{5',7'}$), 64.92 (CH_2, $C_{1'}$), 45.79 (CH_2, C_4), 36.52 (CH_2, C_6), 33.73 (CH_2, $C_{2'}$), 26.68 (CH, C_5), 14.81 (CH_3, C_{10})

HRMS (ESI+), m/z calcd: 327.1208, found: 327.1248; ($M+Na^+$)

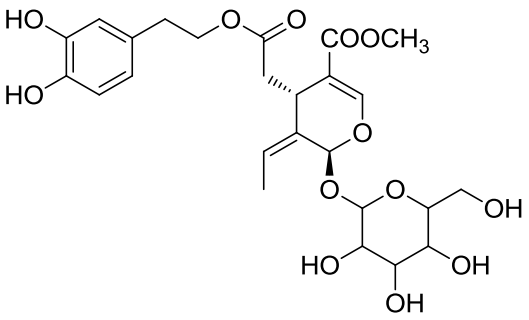
$[\alpha]_D^{20}$= 0 (c 0.654, $CHCl_3$)

- **^{1}H NMR**



ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΤΕΤΑΡΤΟ: IV. ΗΜΙΣΥΝΘΕΣΗ ΑΝΑΛΟΓΩΝ ΕΛΑΙΟΕΥΡΩΠΕΪΝΗΣ & ΟΛΕΑΣΙΝΗΣ

ΠΡΟΣΩΠΙΚΑ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ


HO
HO
O
O
COOCH3
O
O
O
OH
HO
OH
OH

IV.1. Ημισύνθεση παραγώγων της Ελαιοευρωπεΐνης

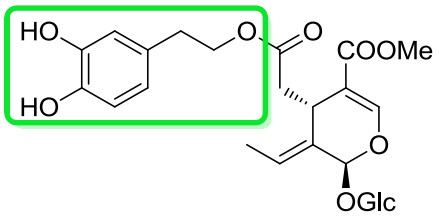
Σε πολύ λίγες δημοσιευμένες εργασίες έχει χρησιμοποιηθεί η ελαιοευρωπεΐνη (1)**,** ως αρχικό υλικό για την ημισύνθεση.

Στην παρούσα διατριβή, ακολουθήθηκε η ημισυνθετική πορεία, μέσω της υποκατάστασης του φαινολικού τμήματος της ελαιοευρωπεΐνης (1) *(Εικόνα 74)*, από διάφορες ομάδες. Οι ενώσεις που σχηματίζονται προσφέρουν πολλές προοπτικές για τη μελέτη του βιολογικού ρόλου (σχέση δομής – δράσης), καθώς και για την εξακρίβωση του μηχανισμού δράσης της ελαιοευρωπεΐνης (1), ο οποίος παραμένει αρκετά ασαφής.

IV.1.a. *Η Ελαιοευρωπεΐνη, ως πρώτη ύλη*

Η ελαιοευρωπεΐνη (1) που χρησιμοποιήθηκε ως πρώτη ύλη, απομονώθηκε σε μεγάλες ποσότητες από την *Olea europaea*, όπως περιγράφηκε αναλυτικά στην υποενότητα II.1, με χρήση χρωματογραφικών τεχνικών (CPC[37], CC[46], κ.ά.).

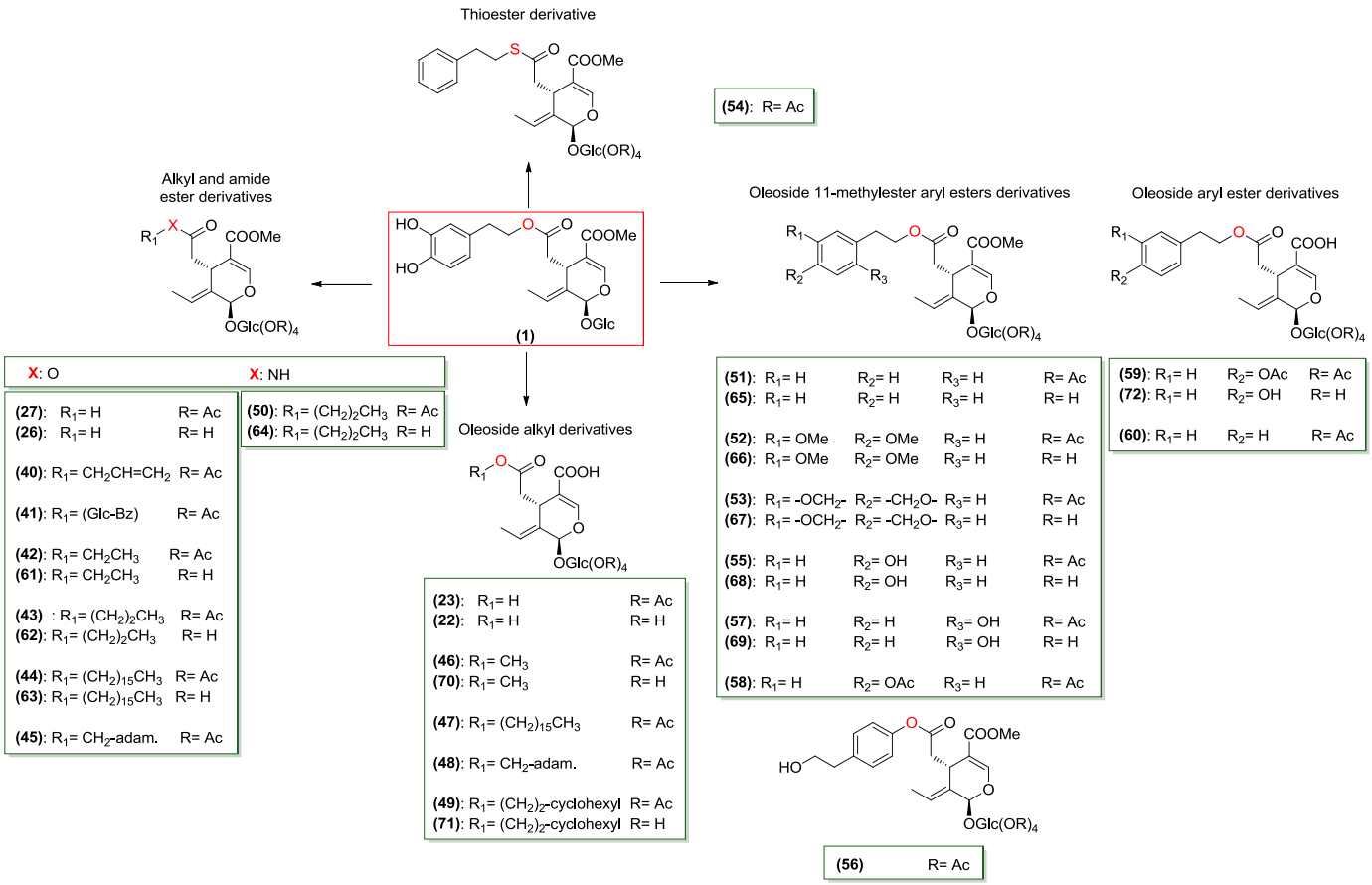
Κατόπιν, τροποποίησαμε, αρχικά, το βαθμό υδροξυλίωσης του αρωματικού δακτυλίου της ελαιοευρωπεΐνης (1). Επιπλέον, καθώς η βιολογική δραστικότητά της, συχνά αποδίδεται στην παρουσία του αντιοξειδωτικού τμήματος υδροξυτυροσόλης (4), πραγματοποιήσαμε την αντικατάσταση του τμήματος αυτού, από αλκυλο και αρυλο ομάδες, προκειμένου να επιβεβαιωθεί ή να εγκαταλειφθεί αυτή η υπόθεση.



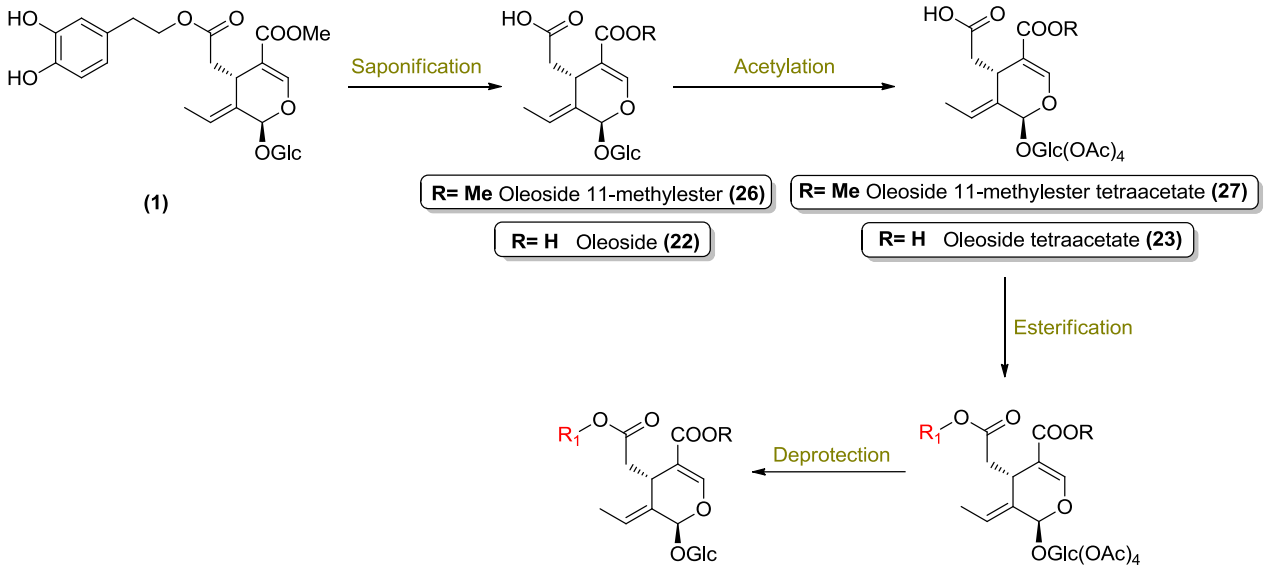
Εικόνα 74. *Φαινολικό τμήμα της ελαιοευρωπεΐνης (1)*

Η μέθοδος απαιτεί το σχηματισμό του φυσικού σεκοϊριδοειδούς 11-μεθυλεστέρα του ολεοσίδη (26), ως βασικού ενδιαμέσου. Αυτό προκύπτει με εκλεκτική διάσπαση του τμήματος της υδροξυτυροσόλης (4). Μετά την προστασία των ομάδων υδροξυλίου της γλυκόζης, ακολουθεί εστεροποίηση, μέσω σύζευξης με διάφορες αλκοόλες/ αμίνες, προς σχηματισμό των αντίστοιχων τετραοξικών εστέρων/ αμιδίων. Ακολουθεί η αποπροστασία των υδροξυλίων της γλυκόζης για να προκύψουν τα εκάστοτε τελικά προϊόντα.

Στα σχήματα που ακολουθούν περιλαμβάνονται όλες οι χημικές τροποποιήσεις της ελαιοευρωπεΐνης (1) που πραγματοποιήθηκαν, οι οποίες έχουν ήδη περιγραφεί μεμονωμένα στην ενότητα III.3 και θα περιγραφούν ξανά παρακάτω, χάριν ευκολίας, καθώς και η συνθετική πορεία που ακολουθήθηκε (*Σχήματα 31, 32*).



Σχήμα 31. *Χημικές τροποποιήσεις της ελαιοευρωπείνης (1)*

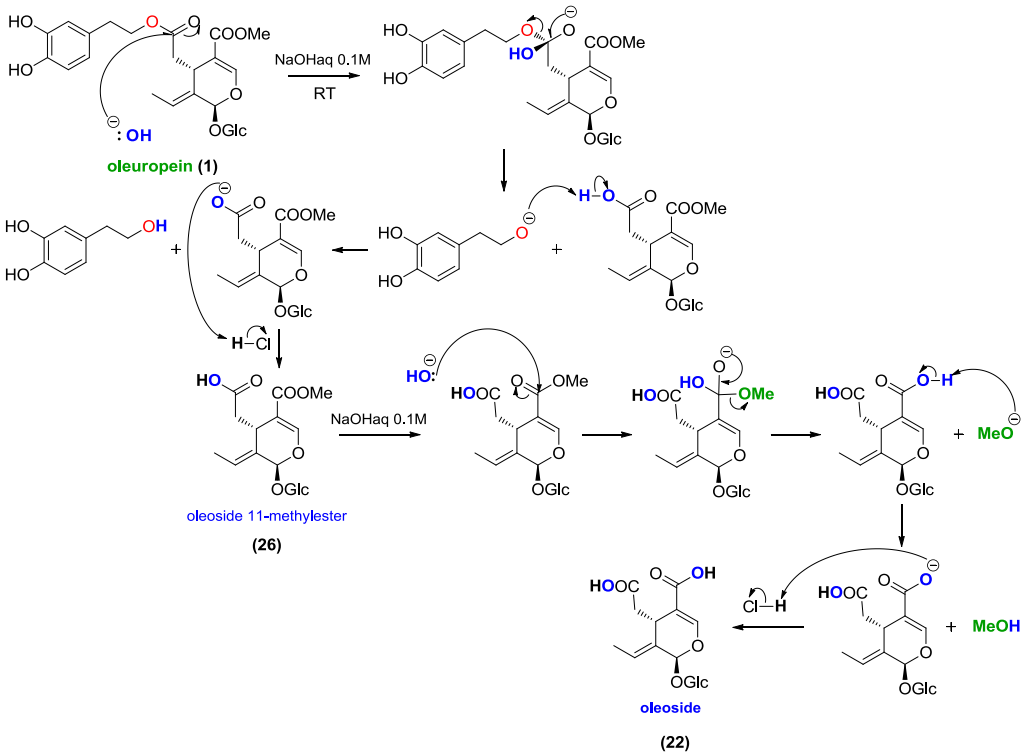


Σχήμα 32. *Συνθετική πορεία για το σχηματισμό αναλόγων της ελαιοευρωπεΐνης (1)*

IV.1.b. Γενική μέθοδος σαπωνοποίησης

IV.1.b.1. Περιγραφή μεθόδου

Σύμφωνα με πολυάριθμες δημοσιευμένες μελέτες, η σαπωνοποίηση της ελαιοευρωπεΐνης (1) επιτρέπει την εκλεκτική διάσπαση του εστερικού δεσμού στη θέση 7, δίνοντας ένα μίγμα του 11-μεθυλεστέρα του ολεοσίδη (26) με την υδροξυτυροσόλη (4), δύο φυσικές ενώσεις, χημικού και φαρμακολογικού ενδιαφέροντος.



Σχήμα 33. *Μηχανισμός βασικής υδρόλυσης - σαπωνοποίησης ελαιοευρωπεΐνης (1)* [258]

Ακολουθήθηκαν δύο μέθοδοι σαπωνοποίησης της ελαιοευρωπεΐνης (1):

- Η κλασσική μέθοδος
- Η μέθοδος μικροκυμάτων (MW[53])

IV.1.b.1.1. Κλασσική Μέθοδος

Η σαπωνοποίηση αποτελεί τη βασική υδρόλυση ενός εστέρα, η οποία αποδίδει δύο μόρια, ένα οξύ και μία αλκοόλη. Αποτελεί ιδιαίτερα σημαντική αντίδραση, καθώς, μέσω της σαπωνοποίησης ανακυκλώνονται, ουσιαστικά, σημαντικά προϊόντα, τα οποία μπορούν να επαναχρησιμοποιηθούν εργαστηριακά για περαιτέρω αντιδράσεις.

Εφαρμόζοντας την αντίδραση στην ελαιοευρωπεΐνη (1), ακολουθώντας την κλασσική, απλή μέθοδο, οι συνθήκες αντίδρασης περιελάμβαναν τη χρήση υδατικού διαλύματος καυστικού νατρίου (NaOHaq), σε θερμοκρασία δωματίου, για 5 ώρες. Το προκύπτον ανιονικό ενδιάμεσο κατεργάστηκε με υδατικό διάλυμα υδροχλωρίου, (HCl 1M) μέχρι pH 4-5, ώστε να πρωτονιωθεί και να παραληφθεί το όξινο παράγωγο της ελαιοευρωπεΐνης (1), ο 11-μεθυλεστέρας του ολεοσίδη (26), σε μίγμα με την υδροξυτυροσόλη (4) (*Σχήμα 33)* [258], [176]. Με τον τρόπο

αυτό «ανακυκλώνεται», όπως προαναφέρθηκε, η υδροξυτυροσόλη (4), ώστε να επαναχρησιμοποιηθεί. Αυτά τα δύο παράγωγα αποτελούν φυσικά μόρια, τα οποία απαντώνται στο γένος *Olea europaea*.

IV.1.b.1.2. Μέθοδος Μικροκυμάτων

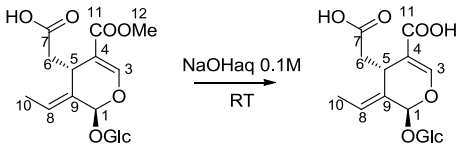
Για την ολοκλήρωση της αντίδρασης σε σημαντικά λιγότερο χρόνο, χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος των μικροκυμάτων.

Σε μια χημική αντίδραση, η συσκευή των μικροκυμάτων προκαλεί άμεση ενεργοποίηση των ιόντων, καθώς και των περισσότερων από τα μόρια που εμφανίζουν διπολική ροπή. Δεδομένου ότι η μεταφορά ενέργειας μεταξύ των μικροκυμάτων και των μορίων είναι εξαιρετικά γρήγορη (της τάξης των νανοδευτερολέπτων), τα μόρια του αντιδραστηρίου ή του διαλύτη δεν είναι σε θέση να χαλαρώσουν εντελώς, ώστε να επιτευχθεί θερμική ισορροπία. Δημιουργείται, έτσι, μία κατάσταση μη ισορροπίας για το αντιδρών μίγμα, η οποία χαρακτηρίζεται από μία στιγμιαία θερμοκρασία (Ti). Η υποβοηθούμενη, από μικροκύματα, σύνθεση, βρήκε, για πρώτη φορά, εφαρμογή στην οργανική χημεία, όπου ορισμένες αντιδράσεις επιτυγχάνονται έως και 1000 φορές πιο γρήγορα με θέρμανση μέσω μικροκυμάτων, απ' ότι με την κλασσική μέθοδο θέρμανσης.

Σε αυτές τις συνθήκες, ο 11-μεθυλεστέρας του ολεοσίδη (26) παραλήφθηκε, σε 10 λεπτά, με απόδοση 68%.

Κατά την οξίνιση του αντιδρώντος μίγματος, μετά την πάροδο 5 ωρών (με την κλασσική μέθοδο) ή 10 λεπτών (με τη μέθοδο μικροκυμάτων), η προσθήκη του υδατικού διαλύματος HCl θα πρέπει να γίνεται σταδιακά και κατά σταγόνες, ώστε το pH να μην γίνει μικρότερο του 5, καθώς σε αντίθετη περίπτωση, υπάρχει κίνδυνος διάσπασης του σακχάρου του ολεοσίδη (22).

Περαιτέρω σαπωνοποίηση του 11-μεθυλεστέρα του ολεοσίδη (26), προκαλεί διάσπαση της μεθυλεστερικής ομάδας στη θέση 4, σχηματίζοντας το φυσικό ολεοσίδη (22) *(Σχήματα 33 και 34)*. Ο τελευταίος, αποτελεί ένα ακόμα ενδιάμεσο, ώστε να προκύψουν παράγωγα της ελαιοευρωπεΐνης (1), με ποικιλία στη δομή.



(26) **(22)**

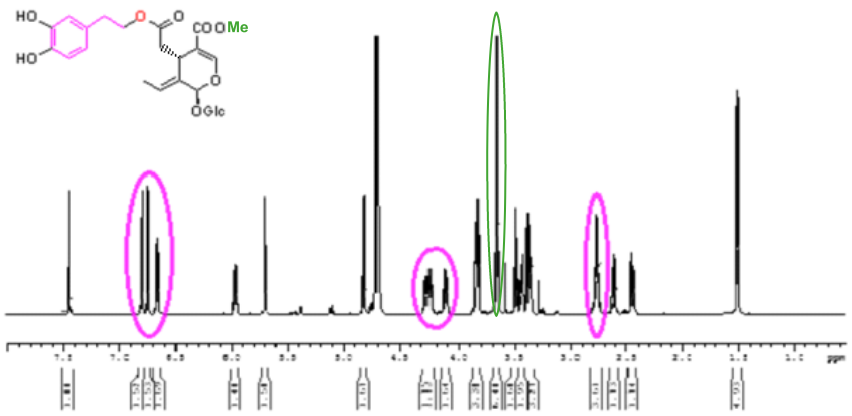
Σχήμα 34. *Σαπωνοποίηση του 11-μεθυλεστέρα του ολεοσίδη (26)*

Με τις δύο μεθόδους σαπωνοποίησης, την κλασσική και των μικροκυμάτων, επιτυγχάνουμε παραλαβή του προϊόντος, με παρόμοια απόδοση αντίδρασης, αλλά στη δεύτερη μέθοδο σε υποτετραπλάσσιο χρόνο, γι' αυτό και η μέθοδος αυτή προτιμάται, όταν είναι διαθέσιμος ο κατάλληλος εξοπλισμός.

IV.1.b.2. Μελέτη Δομής

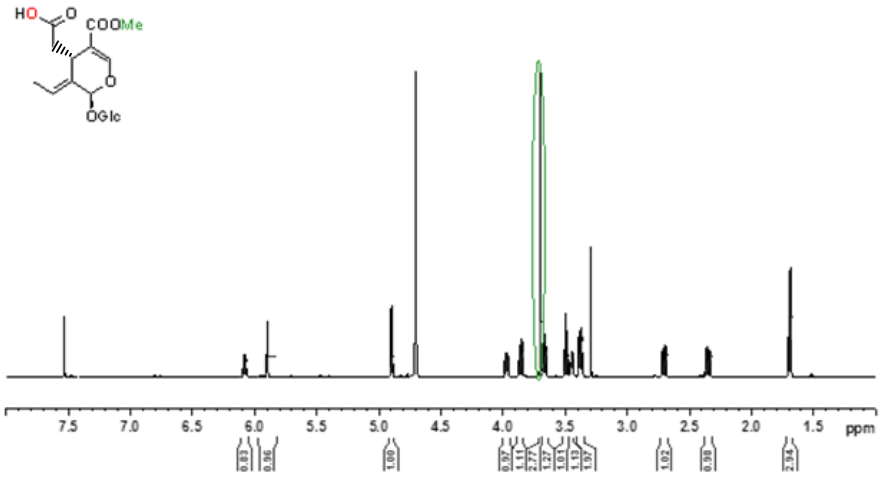
Η δομή των δύο προϊόντων σαπωνοποίησης, ταυτοποιείται με φασματοσκοπία NMR[39], και διαφοροποιείται από την ελαιοευρωπεΐνη (1), η οποία εμφανίζει τρεις χαρακτηριστικές κορυφές στην αρωματική περιοχή, που αντιστοιχούν στα 3Η του φαινολικού δακτυλίου του τμήματος της

υδροξυτυροσόλης (4), καθώς και δύο πολλαπλές κορυφές στα 4 ppm και μία στα 2.7 ppm, που αντιστοιχούν στα Η της αίθυλο ομάδας, που βρίσκεται μεταξύ του εστερικού οξυγόνου και του φαινολικού δακτυλίου της υδροξυτυροσόλης (4).

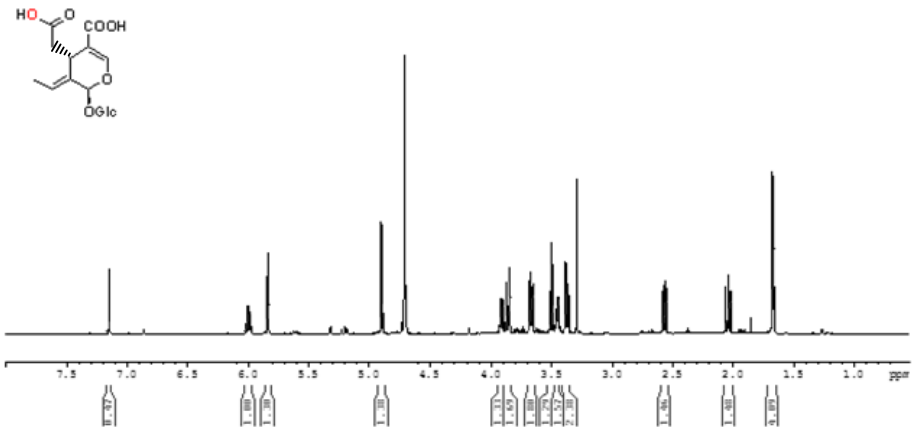


Εικόνα 75. *Φάσμα ^{1}H NMR (600MHz) της ελαιοευρωπεΐνης (1) σε D_2O*

Στις Εικόνες 76 και 77 φαίνεται ότι δεν υπάρχουν, αντίστοιχα, στο φάσμα του 11-μεθυλεστέρα του ολεοσίδη (26) και του ολεοσίδη (22), οι χαρακτηριστικές κορυφές των υδρογόνων της υδροξυτυροσόλης (4), κάτι που αποδεικνύει την απουσία της ομάδας αυτής στα δύο προϊόντα, κατόπιν της μερικής και ολικής σαπωνοποίησης της ελαιοευρωπεΐνης (1).



Εικόνα 76. *Φάσμα ^{1}H NMR (600MHz) του 11-μεθυλεστέρα του ολεοσίδη (26), σε D_2O*



Εικόνα 77. *Φάσμα ^{1}H NMR (600MHz) του ολεοσίδη (22), σε D_2O*

IV.1.c. *Γενική μέθοδος ακετυλίωσης*

Όπως έχει ήδη περιγραφεί στην υποενότητα III.3.c.1, η αντίδραση ακετυλίωσης των σακχάρων, περιλαμβάνει τη χρήση οξικού ανυδρίτη και πυριδίνης, ως καταλύτη, με την τελευταία να δημιουργεί ένα αλκαλικό περιβάλλον. Η ακετυλίωση αποτελεί μια αντίδραση προστασίας, εν προκειμένω, των ελεύθερων ομάδων υδροξυλίου της γλυκόζης, εν όψει μίας επιχειρούμενης αντίδρασης, όπως είναι η εστεροποίηση, που αναλύεται στην επόμενη υποενότητα.

Σε προζυγισμένη ποσότητα (1eq) του ολεοσίδη (22) ή του τετραοξικού ολεοσίδη (23) προστίθεται πυριδίνη και το μίγμα αναδεύεται, υπό συνθήκες αργού. Στο διάλυμα προστίθεται οξικός ανυδρίτης (35eq), στους 0^oC. Μετά από ανάδευση 2 ωρών, σε θερμοκρασία δωματίου, το μίγμα αραιώνεται με χλωροφόρμιο ($CHCl_3$), πλένεται με νερό στους 0^oC, και εξουδετερώνεται, με υδατικό διάλυμα HCl 1M, κατά σταγόνες, μέχρι pH= 5. Το διάλυμα εκχυλίζεται και οι δύο φάσεις, οργανική και υδατική, διαχωρίζονται. Η υδατική φάση εκχυλίζεται περαιτέρω με EtOAc. Οι οργανικές στιβάδες που συλλέγονται ξηραίνονται με άνυδρο θειϊκό νάτριο (Na_2SO_4) και συμπυκνώνονται, υπό μειωμένη πίεση. Ακολουθεί καθαρισμός του προϊόντος, με χρωματογραφία στήλης, που δίνει, κατόπιν καθαρισμού και λυοφιλοποίησης, το αντίστοιχο επιθυμητό ακετυλιωμένο προϊόν, τον τετραοξικό ολεοσίδη (23) ή τον τετραοξικό 11-μεθυλεστέρα του ολεοσίδη (27), αντίστοιχα, σε μορφή λευκού αφρού [261].

Ο μηχανισμός της ακετυλίωσης παρατέθηκε στην υποενότητα III.3.c.1.

Η αντίδραση ακετυλίωσης, παρά τη χαμηλή της, γενικά, απόδοση, αποτελεί, ίσως, το σημαντικότερο βήμα, για την παραγωγή ημισυνθετικών αναλόγων της ελαιοευρωπεΐνης (1), καθώς εξασφαλίζει, όπως προαναφέρθηκε, την αδρανοποίηση των υδροξυλίων της γλυκόζης, ενόψει της αντίδρασης εστεροποίησης που ακολουθεί.

IV.1.d. *Γενικές μέθοδοι εστεροποίησης*

Στην παρούσα διατριβή, χρησιμοποιήθηκαν δύο μέθοδοι παραγωγής εστέρων:

- η αντίδραση με μηχανισμό πυρηνόφιλης υποκατάστασης S_N2, με βρωμίδια και
- η εστεροποίηση με αλκοόλες, αμίνες ή θειόλες (αλκυλο και αρυλο εστέρες, αμίδια ή θειοεστέρες, ως παράγωγα)

IV.1.d.1. Γενική μέθοδος εστεροποίησης με βρωμίδια

Η αντίδραση υποκατάστασης S_N2 με βρωμίδια, πραγματοποιείται σε ένα μόνο στάδιο που συμπεριλαμβάνει και το αλκυλαλογονίδιο και το πυρηνόφιλο. Στο στάδιο, του οποίου η ταχύτητα μετριέται, συμμετέχουν δύο μόρια.

Είναι γνωστό ότι για την πραγματοποίηση της αντίδρασης υποκατάστασης με μηχανισμό S_N2, απαιτούνται ορισμένες προϋποθέσεις, που σχετίζονται με το είδος και τη στερεοχημεία του υποστρώματος, την ισχύ της χρησιμοποιούμενης βάσης, την πολικότητα του διαλύτη, καθώς επίσης και τη σταθεροποίηση ή όχι του ενδιάμεσα σχηματιζόμενου καρβοκατιόντος.

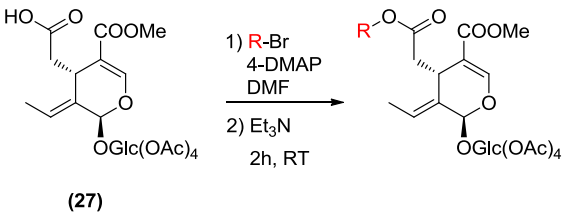
Οι αντιδράσεις S_N2 ευνοούνται από πρωτοταγή υποστρώματα, με τη στερεοχημική παρεμπόδιση να αποτελεί το βασικό εμπόδιο σε περιπτώσεις δευτεροταγών ή τριτοταγών υποστρωμάτων, παρεμποδίζοντας την «εκ των όπισθεν» προσβολή από το πυρηνόφιλο

αντιδραστήριο. Επιπρόσθετα, οι καλές αποχωρούσες ομάδες, δηλαδή τα σταθερότερα ανιόντα, είναι ένας ακόμα ευνοϊκός παράγοντας, για το μηχανισμό S_N2.

Τέλος, δύο άλλοι παράγοντες που ευνοούν το μηχανισμό S_N2 έναντι του S_N1, είναι η ύπαρξη πολικού απρωτικού διαλύτη (π.χ. DMSO, DMF), καθώς και ισχυρής βάσης (π.χ. Et_3N), στο αντιδρών σύστημα.

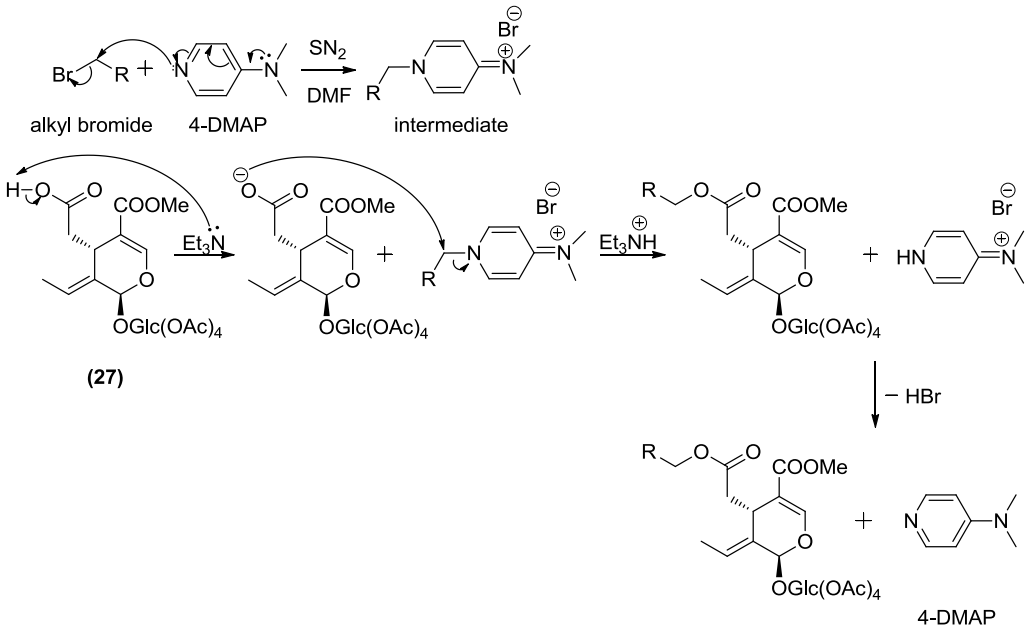
Στην περίπτωση της εστεροποίησης, με αλκυλοβρωμίδια, του 11-μεθυλεστέρα του ολεοσίδη (26), που πραγματοποιήθηκε στην παρούσα διατριβή, προστίθεται αρχικά στο καρβοξυλικό οξύ, μίγμα του επιλεγμένου αλκυλοβρωμιδίου, με το 4-DMAP και το διαλύτη DMF, στους 0^oC (σε παγόλουτρο) και υπό ταυτόχρονη ανάδευση. Ακολουθεί στάγδην προσθήκη τριαιθυλαμίνης (Et_3N), σε θερμοκρασία δωματίου και το διάλυμα αφήνεται να αντιδράσει για 1,5-2 ώρες. Κατόπιν ελέγχου της πορείας της αντίδρασης με TLC[34], το μίγμα κατεργάζεται με υδατικό διάλυμα χλωριούχου αμμωνίου (NH_4Claq) και ακολουθεί εκχύλιση με CH_2Cl_2, για την παραλαβή, κατόπιν ξήρανσης και εξάτμισης της οργανικής στιβάδας, του, προς καθαρισμό με χρωματογραφία στήλης, εστερικού προϊόντος. Στην υδατική στιβάδα αποβάλλεται η εναπομείνουσα ποσότητα Et_3N και ένα μεγάλο ποσοστό του DMF [267].

Η αντίδραση εστεροποίησης με αλκυλοβρωμίδια δίνεται στο Σχήμα 35, ενώ ο μηχανισμός της αντίδρασης στο Σχήμα 36.



(27)

Σχήμα 35. *Αντίδραση εστεροποίησης με αλκυλοβρωμίδια*

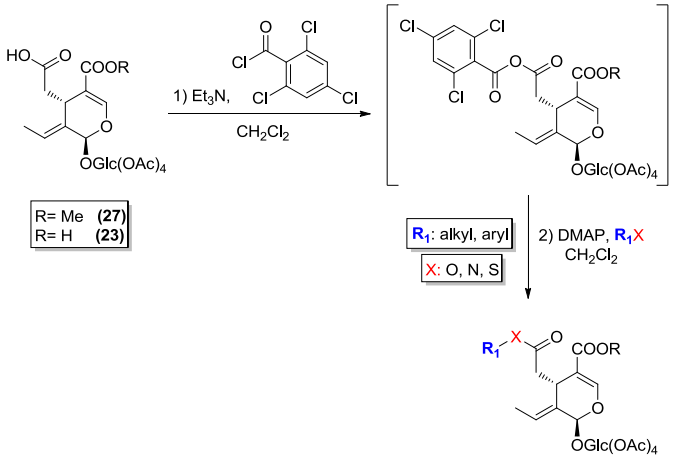


Σχήμα 36. *Καταλυτικός μηχανισμός υποκατάστασης S_N2* [267]

IV.1.d.2. Γενική μέθοδος εστεροποίησης με αλκοόλες, αμίνες ή θειόλες

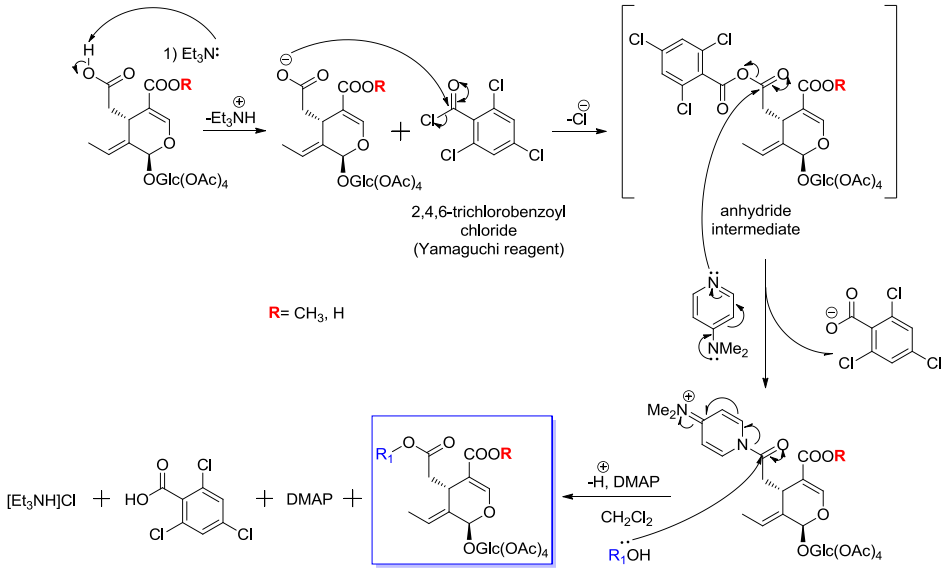
Η μέθοδος που χρησιμοποιήθηκε για την εστεροποίηση με αλκοόλες, αμίνες ή θειόλες, είναι γνωστή ως εστεροποίηση Yamaguchi και προτάθηκε για πρώτη φορά από τους Masaru Yamaguchi και συνεργάτες, το 1979 [262].

Η εστεροποίηση, λοιπόν, αυτή, ακολουθεί το πρωτόκολλο Yamaguchi, σύμφωνα με το οποίο χρησιμοποιούνται ήπιες, μη όξινες, συνθήκες αντίδρασης. Έτσι, η εστεροποίηση Yamaguchi αποτελεί μία χημική αντίδραση, μεταξύ ενός καρβοξυλικού οξέος και του αντιδραστηρίου Yamaguchi, 2,4,6-τριχλωροβενζόϋλο χλωριδίου. Από την αντίδραση αυτή προκύπτει ένας μικτός ανυδρίτης, ο οποίος, αντιδρώντας περαιτέρω με ένα πυρηνόφιλο (αλκοόλη, αμίνη, θειόλη), παρουσία στοιχειομετρικής ποσότητας 4-DMAP, σε θέση καταλύτη, δίνει τον επιθυμητό εστέρα *(Σχήμα 37)*. Η παρουσία της 4-DMAP, καθιστά δυνατή την ταχύτερη αλληλεπίδραση του, ενδιάμεσα σχηματιζόμενου, ανυδρίτη, με μία ποικιλία πυρηνόφιλων.



Σχήμα 37. *Αντίδραση εστεροποίησης κατά Yamaguchi.*

Στο Σχήμα 38 δίνεται ο μηχανισμός της αντίδρασης εστεροποίησης κατά Yamaguchi.



Σχήμα 38. *Μηχανισμός εστεροποίησης κατά Yamaguchi*

Με τη μέθοδο της εστεροποίησης με αλκοόλες, αμίνες και θειόλες, συντέθηκαν συνολικά **19** ακετυλιωμένα παράγωγα, εκ των οποίων, **8 αλκυλο εστέρες, 1 αμίδιο** και **10 αρυλο εστέρες**. Σε

αυτές τις ομάδες ενώσεων, την κύρια διαφορά στη δομή αποτελεί η ομάδα R_1 (αλκυλο, αρυλο, αμινο, ή θειο- ομάδα). Επομένως, εύκολα συμπεραίνεται ότι το φασματοσκοπικό προφίλ των ενώσεων αυτών θα είναι παρόμοιο, ως προς το βασικό ολεοσιδικό σκελετό και θα διαφοροποιείται, ως προς την ομάδα R_1.

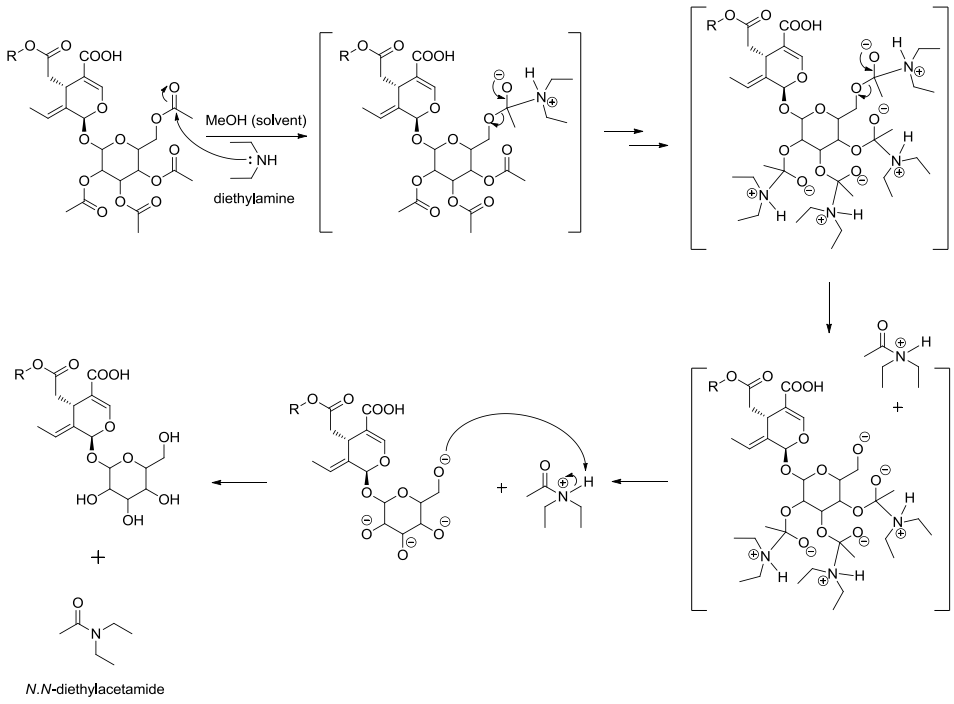
Από τους αλκυλο εστέρες, οι **4** προέρχονται από τον τετραοξικό 11-μεθυλεστέρα του ολεοσίδη (27), ενώ οι άλλοι **4** από τον τετραοξικό ολεοσίδη (23). Αυτή η διάκριση αποτελεί ένα ακόμα σημείο ενδιαφέροντος, σε ότι αφορά το φασματοσκοπικό προφίλ των προϊόντων. Οι 8 αλκυλο εστέρες, λοιπόν, διαφοροποιούνται φασματοσκοπικά, όχι μόνο ως προς το είδος της ομάδας R_1, αλλά και από την ύπαρξη ή όχι μεθυλο ομάδας στη θέση 11 (R= CH_3 ή H) του ολεοσιδικού σκελετού. Όσον αφορά στους αρυλο εστέρες, **8** προέρχονται από τον τετραοξικό 11-μεθυλεστέρα του ολεοσίδη (27) (R= CH_3) και **2** από τον τετραοξικό ολεοσίδη (23) (R= H).

IV.1.e. *Γενική μέθοδος αποπροστασίας*

Η αντίδραση αποπροστασίας γίνεται με περίσσεια Et_2NH, σε διαλύτη MeOH και σε θερμοκρασία περιβάλλοντος, για 6 ώρες. Το αντιδρών μίγμα, μετά την περάτωση της αντίδρασης, δεν απαιτεί κατεργασία, παρά μόνο προσθήκη μιας μικρής ποσότητας οξειδίου του πυριτίου (SiO_2), το οποίο, λόγω της οξύτητάς του, εξουδετερώνει την εναπομείνουσα ποσότητα Et_2NH, ώστε το pH να γίνει 5-6 και να σταματήσει η αντίδραση. Μετά από εξάτμιση της MeOH, ακολουθεί απ' ευθείας καθαρισμός του προϊόντος με χρωματογραφία στήλης [261].

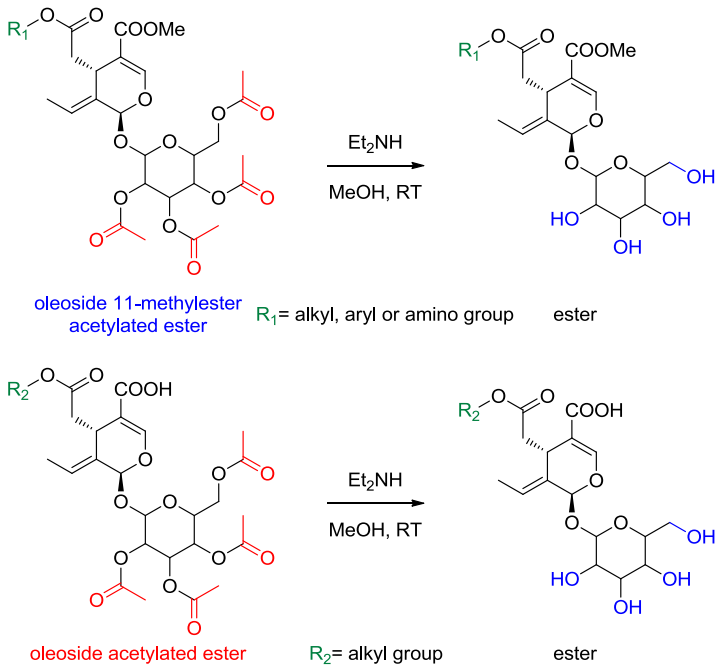
Η αντίδραση αποπροστασίας είναι μια απλή διαδικασία και δεν απαιτεί ιδιαίτερες προφυλάξεις, καθώς λαμβάνει χώρα σε θερμοκρασία δωματίου. Ως μοναδικό, ίσως, σημείο προσοχής θεωρείται η προσθήκη της διαιθυλαμίνης, κατά σταγόνες, στο μεθανολικό διάλυμα του εστέρα και, κατά προτίμηση, στους 0^oC, ώστε να αποφευχθεί η αύξηση της θερμοκρασίας.

Ο προτεινόμενος μηχανισμός για την αντίδραση απακετυλίωσης, λοιπόν, των υδροξυλίων της γλυκόζης, δίνεται στο Σχήμα 39.



Σχήμα 39. *Προτεινόμενος μηχανισμός για την απακετυλίωση των υδροξυλίων του γλυκοσιδικού τμήματος*

Με τη μέθοδο της αποπροστασίας, παρασκευάστηκαν **12** προϊόντα, μερικά από τα οποία παρασκευάστηκαν για πρώτη φορα και αποτελούν φυσικά προϊόντα. Τα **9** από αυτά είναι προϊόντα του τετραοξικού 11-μεθυλεστέρα του ολεοσίδη (27), ενώ **3,** προϊόντα του τετραοξικού ολεοσίδη (23).



IV.2. Ημισύνθεση παραγώγων της Ολεασίνης

Στο δεύτερο μέρος του τετάρτου κεφαλαίου, θα παρατεθούν μερικά ημισυνθετικά ανάλογα της ολεασίνης (2), που παρασκευάστηκαν, αφενός, με πρώτη ύλη την ολεασίνη (2), που απομονώθηκε, σε επαρκείς ποσότητες, από το ελαιόλαδο, όπως περιγράφηκε στην Υποενότητα II.2, αφετέρου, με πρώτη ύλη την ελαιοευρωπεΐνη (1) και μέσω της αλληλουχίας των αντιδράσεων που έχουν ήδη αναλυθεί διεξοδικά στην υποενότητα III.3.b:

- σαπωνοποίηση
- ακετυλίωση
- εστεροποίηση
- αποπροστασία
- ενζυμική υδρόλυση

Για όλα τα συνθετικά ανάλογα της ολεασίνης (2), θα παρατεθούν τα φυσικοχημικά (Μοριακός Τύπος, Μοριακό Βάρος (MB), φυσική κατάσταση και χρώμα) και φασματοσκοπικά (^{1}H-NMR, ^{13}C-NMR, MS[43]) δεδομένα, καθώς επίσης και η στροφική τους ικανότητα, $[\alpha]_D^t$.

Τέλος, με σκοπό την μελέτη και τη μίμηση των βιοχημικών διεργασιών που λαμβάνουν χώρα κατά την σύνθλιψη του ελαιόκαρπου και την εξαγωγή του ελαιολάδου, πραγματοποιήθηκαν αντιδράσεις με προσαρμογή των τιμών του pH, αλλά και αντιδράσεις καταλυόμενες από ένζυμα, ενώ τα αποτελέσματα των αντιδράσεων αυτών, μελετήθηκαν με LC-MS[49] και HPLC[36].

*Η αρίθμηση στην ονοματολογία των συνθετικών αναλόγων της ολεασίνης (2) που ακολουθεί, αποτελεί την κατά IUPAC αποδεκτή αρίθμηση και διαφέρει από αυτή των δομών, όπου χρησιμοποιείται η απλουστευμένη αρίθμηση, χάριν ευκολίας.

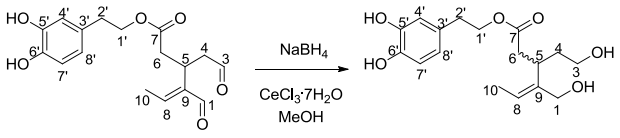
Επίσης, χάριν συντομίας, στη ροή του κειμένου δε θα αναφέρεται η συνολική ονομασία του εκάστοτε αναλόγου, αλλά ο αριθμός αναφοράς αυτού.

IV.2.a. *Ημισυνθετικά ανάλογα ολεασίνης*

IV.2.a.1. Σύνθεση αναλόγων με πρώτη ύλη την ολεασίνη

IV.2.a.1.1. Αναγωγή – Σύνθεση της διόλης (28)

IV.2.a.1.1.1. Περιγραφή μεθόδου



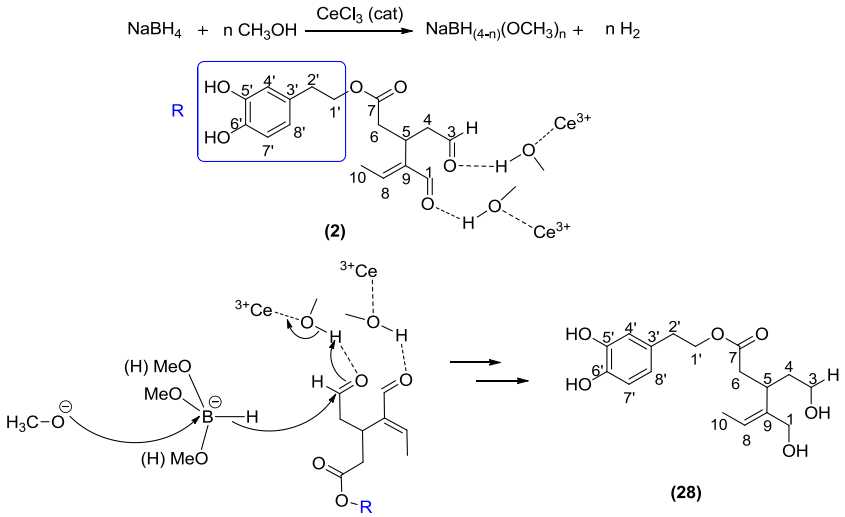
(2) **(28)**

Η αντίδραση αναγωγής που λαμβάνει χώρα κατά την μετατροπή της διαλδεϋδικής ομάδας της ολεασίνης (2), σε διόλη (28), ονομάζεται αναγωγή "Luche" και περιλαμβάνει την κατεργασία των αλδεϋδικών ομάδων με το αναγωγικό αντιδραστήριο βοροϋδρίδιο του νατρίου ($NaBH_4$), παρουσία επταένυδρου τριχλωριούχου κεσίου ($CeCl_3 \cdot 7H_2O$), ως καταλύτη και σε διαλύτη MeOH ή EtOH. Το $CeCl_3$ είναι ένα εκκλεκτικό οξύ κατά Lewis, που ενεργοποιεί την MeOH και δρα καταλυτικά στη μεθανόλυση του $NaBH_4$.

Αρχικά, ποσότητα ολεασίνης (2) διαλύεται σε MeOH και στο διάλυμα προστίθεται $CeCl_3 \cdot 7H_2O$. Ακολουθεί ανάδευση 5 λεπτών σε θερμοκρασία δωματίου, μέχρι διαλύσεως του

καταλύτη και κατόπιν, ψύξη του μίγματος στους -10°C, με τη βοήθεια παγόλουτρου. Η προσθήκη του $NaBH_4$, έπειτα, γίνεται σταδιακά και υπό ανάδευση, για 15 λεπτά. Εκχύλιση του αντιδρώντος μίγματος, μετά το τέλος της αντίδρασης, με κορεσμένο υδατικό διάλυμα χλωριούχου αμμωνίου (NH_4Cl), διχλωρομεθάνιο και EtOAc και έπειτα, με νερό και υδατικό διάλυμα NaCl, συλλογή των οργανικών φάσεων, ξήρανση με Na_2SO_4 και συμπύκνωση υπό κενό, δίνει το επιθυμητό προϊόν (28), σε απόδοση 50% [268].

Ο μηχανισμός της αναγωγής "Luche", παρουσία $CeCl_3 \cdot 7H_2O$, δίνεται στο Σχήμα 40.

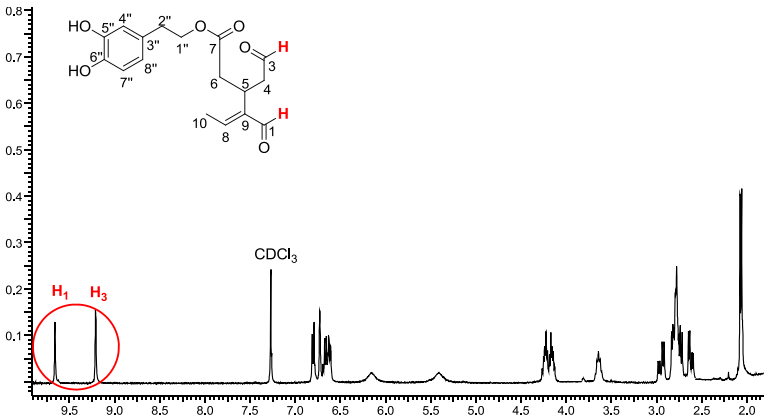


Σχήμα 40. *Μηχανισμός αναγωγής "Luche", παρουσία καταλύτη $CeCl_3 \cdot 7H_2O$ και MeOH ως διαλύτη*

Παρόλα αυτά, η αναγωγή των δύο αλδεϋδικών ομάδων στο μόριο της ολεασίνης (2), προς σχηματισμό δύο πρωτοταγών αλκοολών, επιτεύχθηκε και χωρίς την παρουσία του $CeCl_3 \cdot 7H_2O$, με παρόμοια απόδοση.

IV.2.a.1.1.2. Μελέτη δομής

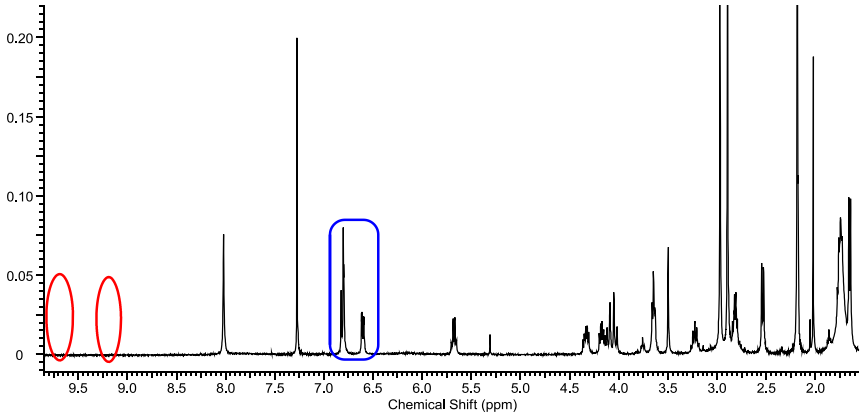
Το φασματοσκοπικό προφίλ της ολεασίνης (2) διαφοροποιείται από αυτό του ανηγμένου αναλόγου της, (28), καθώς στο φάσμα ^{1}H NMR της ολεασίνης (2), που παρατέθηκε προηγουμένως στην υπονενότητα III.2.b και παρατίθεται ξανά στην Εικόνα 78, υπάρχουν οι δύο χαρακτηριστικές κορυφές των αλδεϋδικών πρωτονίων, H_1 και H_3, στα 9.65 και 9.20 ppm, αντίστοιχα.



Εικόνα 78. *Φάσμα ^{1}HNMR (600MHz) της ολεασίνης (2), σε $CDCl_3$*

Αντιθέτως, όσον αφορά στο φάσμα ^{1}H NMR της διόλης (28), το οποίο παρατίθεται στην Εικόνα 79, απουσιάζουν οι χαρακτηριστικές κορυφές των αλδεϋδικών πρωτονίων, ενώ

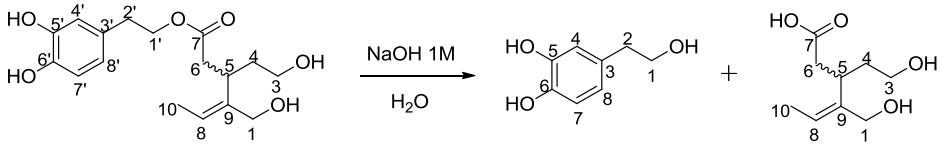
εξακολουθούν να υπάρχουν οι χαρακτηριστικές κορυφές του τμήματος της υδροξυτυροσόλης (4), σε παρόμοιες χημικές μετατοπίσεις.



Εικόνα 79. *Φάσμα ^{1}H NMR (600MHz) της διόλης (28), σε $CDCl_3$*

IV.2.a.1.2. Σαπωνοποίηση – Σύνθεση του οξέος της διόλης (29)

IV.2.a.1.2.1. Περιγραφή μεθόδου



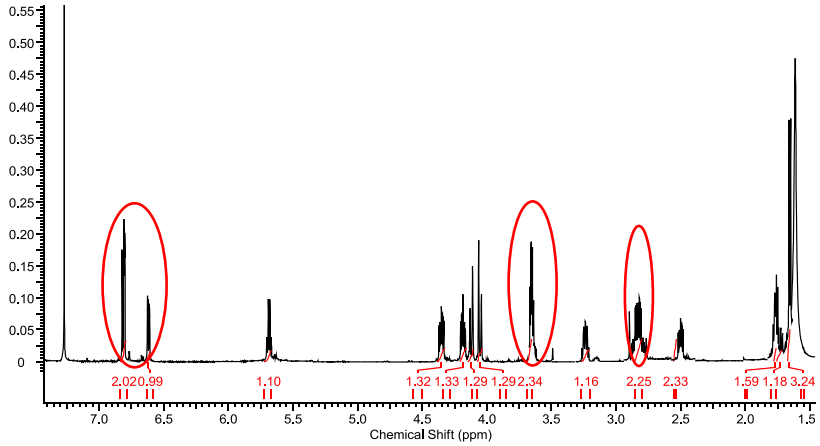
(28) **(4)** **(29)**

Η υδρόλυση της διόλης (28) ακολουθεί την, πλέον γνωστή, μέθοδο σαπωνοποίησης [255], [266], με χρήση υδατικού διαλύματος NaOH 1M. Κατ' αυτόν τον τρόπο, η διόλη (28) δίνει ισομοριακές ποσότητες της υδροξυτυροσόλης (4) και του οξέος της διόλης ((E)-3-(2-υδροξυαιθυλο)-4-(υδροξυμεθυλο)4-εξενοϊκό οξύ) (29) και αυτός, όπως έχει προαναφερθεί, είναι ένας εύκολος τρόπος «ανακύκλωσης» της υδροξυτυροσόλης (4), ώστε αυτή να μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε περαιτέρω αντιδράσεις.

Αρχικά, σε σφαιρική φιάλη, διαλύεται η διόλη (28) σε νερό. Κατόπιν, προστίθεται στο διάλυμα, NaOH 1M και αμέσως παρατηρείται καφέ χρωματισμός αυτού. Το αντιδρών μίγμα, αφήνεται σε ανάδευση, σε θερμοκρασία περιβάλλοντος, ενώ αμέσως μετά την προσθήκη του NaOH aq πραγματοποιείται TLC[34], ώστε να ελεγχθεί η πρόοδος της αντίδρασης. Το μίγμα αφήνεται σε ανάδευση καθ' όλη τη διάρκεια της νύχτας και την επόμενη ημέρα, κατόπιν μικροεκχύλισης με EtOAc, η πρόοδος της αντίδρασης ελέγχεται εκ νέου με TLC[34]. Η απουσία ποσότητας διόλης στο μίγμα, υποδηλώνει το τέλος της αντίδρασης και ακολουθεί εξουδετέρωση του NaOH με HCl 1M, προσεκτικά και με ταυτόχρονο έλεγχο του pH, ώστε αυτό να κυμαίνεται περίπου στο 7. Ακολουθεί εκχύλιση με EtOAc, πλύση με κορεσμένο υδατικό διάλυμα NaCl, ξήρανση της οργανικής φάσης με άνυδρο Na_2SO_4 και συμπύκνωση υπό κενό, για παραλαβή του, προς καθαρισμό, με χρωματογραφία στήλης, μίγματος προϊόντων. Κατόπιν καθαρισμού, λοιπόν, με σύστημα διαλυτών CH_2Cl_2/ MeOH 95:5→90:10, παραλαμβάνονται δύο προϊόντα, η υδροξυτυροσόλη (4) και το επιθυμητό οξύ (29), σε απόδοση περίπου 80%.

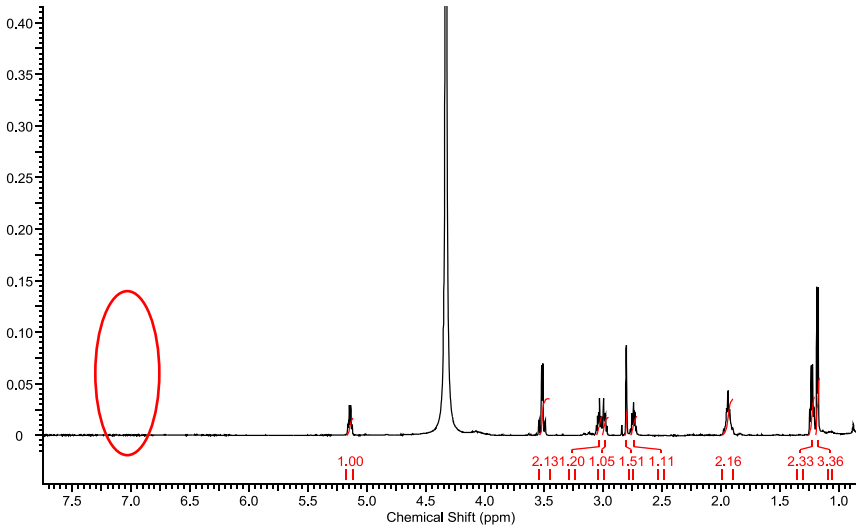
IV.2.a.1.2.2. Μελέτη δομής

Η δομή του προϊόντος σαπωνοποίησης της διόλης, ταυτοποιείται με χρήση της φασματοσκοπίας NMR[39], ενώ το φάσμα ^{1}H NMR αυτού, διαφοροποιείται από αυτό της διόλης (28), η οποία εμφανίζει τρεις χαρακτηριστικές κορυφές στην αρωματική περιοχή, που αντιστοιχούν στα 3H του φαινολικού δακτυλίου του τμήματος της υδροξυτυροσόλης (4), καθώς και δύο πολλαπλές κορυφές, μία στα 3.65 ppm και μία στα 2.85 ppm, που αντιστοιχούν στα H της αιθυλομάδας, που βρίσκεται μεταξύ του εστερικού οξυγόνου και του φαινολικού δακτυλίου της υδροξυτυροσόλης (4) (*Εικόνα 80*).



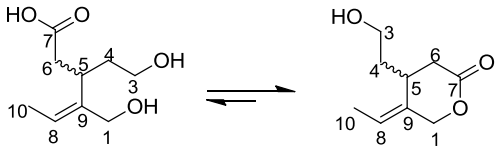
Εικόνα 80. *Φάσμα ^{1}H NMR (600MHz) της διόλης (28), σε $CDCl_3$*

Στην Εικόνα 81 φαίνεται ότι δεν υπάρχουν, στο φάσμα ^{1}H NMR του οξέος (29), οι χαρακτηριστικές κορυφές των υδρογόνων της υδροξυτυροσόλης (4), κάτι που αποδεικνύει την απουσία των ομάδων αυτών, μετά την σαπωνοποίηση.



Εικόνα 81. *Φάσμα ^{1}HNMR (600MHz) του οξέος της διόλης (29), σε D_2O*

IV.2.a.1.3. Κυκλοποίηση του οξέος της διόλης (29) – Σύνθεση της λακτόνης (30)

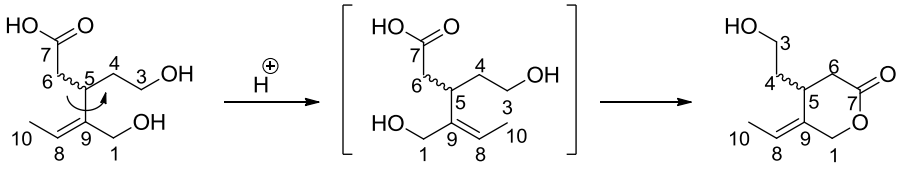


(29) **(30)**

Κατά την αποθήκευση του οξέος (29), ακόμα και στους -4°C, για περισσότερο από 30 ημέρες, παρατηρήθηκε μετατροπή ποσότητας αυτού, στην λακτονική του μορφή (30), ενώ αποκαταθιστάται η ισορροπία μεταξύ των δύο μορφών, σε συγκεκριμένη αναλογία.

Διαπιστώθηκε, ακόμη, ότι η λακτονική μορφή δε μετατρέπεται ξανά στην ανοικτή μορφή του οξέος (29). Επιπλέον, ακόμα και όταν οι δύο μορφές διαχωρίστηκαν χρωματογραφικά, ώστε να επιτευχθεί η μεμονωμένη μελέτη της κάθε μορφής (φασματοσκοπικά και πολωσιμετρικά), η μετατροπή της ανοικτής μορφής (29) στη λακτονική (30), μέσα σε μικρό χρονικό διάστημα, ήταν αναπόφευκτη.

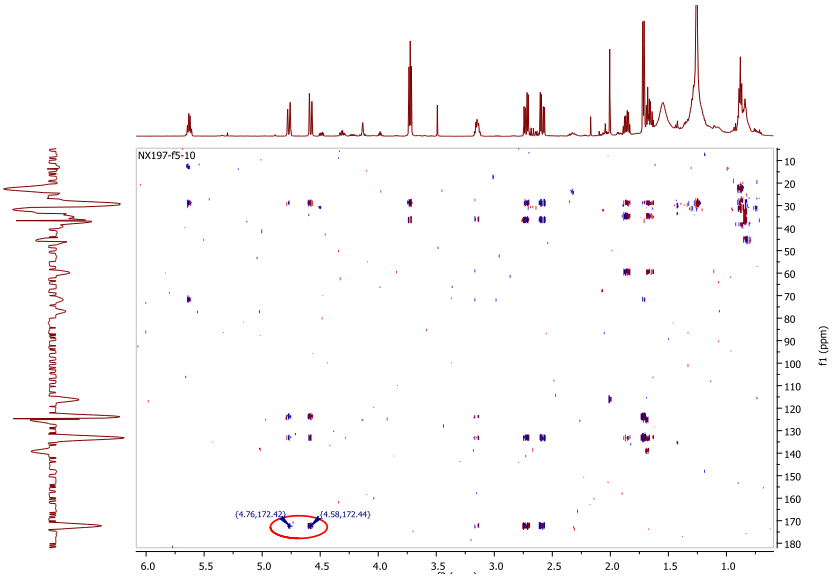
Ο προτεινόμενος μηχανισμός μετατροπής του οξέος (29) στη λακτονική μορφή (30), δίνεται στο Σχήμα 41.



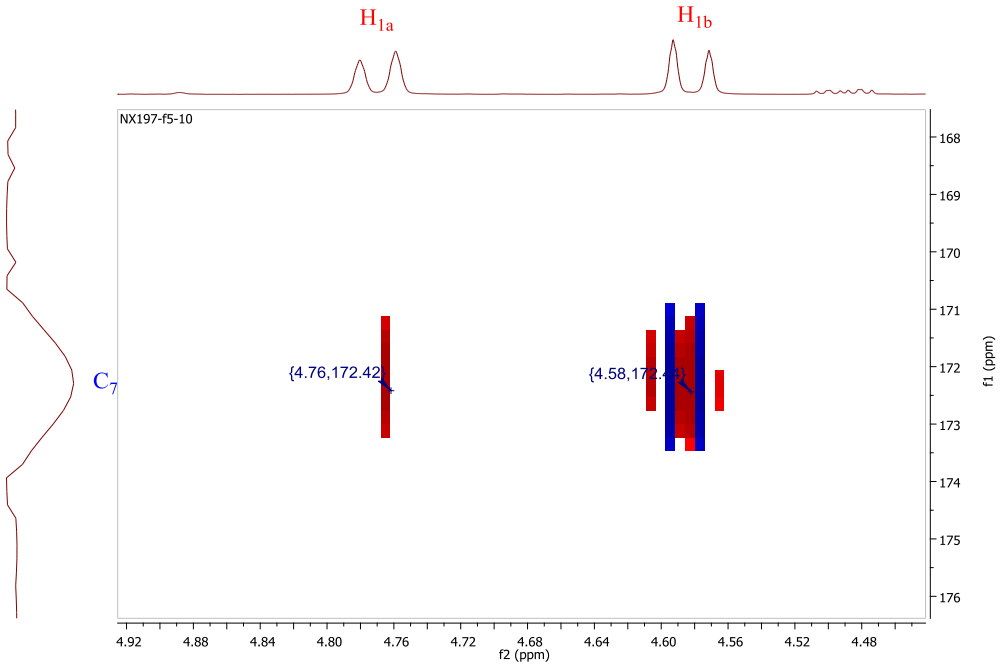
Σχήμα 41. *Προτεινόμενος μηχανισμός μετατροπής του οξέος (29) στη λακτονική του μορφή (30).*

IV.2.a.1.3.1. Μελέτη δομής

Η διαπίστωση της κυκλοποίησης του οξέος της διόλης (29), επιτυγχάνεται μέσω της μελέτης του φάσματος δύο διαστάσεων, HMBC[42] (*Εικόνες 82, 83*), της λακτόνης (30) που σχηματίζεται, της οποίας το φάσμα ^{1}H NMR δε διαφοροποιείται σημαντικά από αυτό του οξέος (29).



Εικόνα 82. *Φάσμα HMBC[42] (600MHz) της λακτονικής μορφής του οξέος (30), σε $CDCl_3$*

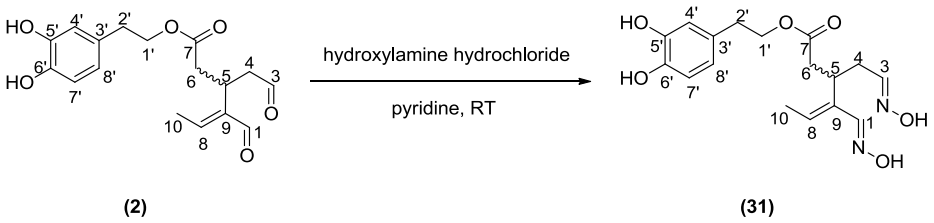


Εικόνα 83. *Φάσμα HMBC[42] (600MHz) της λακτόνης του οξέος (30), σε $CDCl_3$ (επιλεγμένη χαρακτηριστική περιοχή)*

Όπως υποδεικνύεται στην Εικόνα 83, στο φάσμα HMBC[42] της λακτόνης (30), τα πρωτόνια του μεθυλενίου της θέσης 1, εμφανίζουν σύζευξη J_3 με τον καρβονυλικό άνθρακα C_7, κάτι που αποδεικνύει ότι είναι δυνατή η περιστροφή του μορίου του οξέος (29), λόγω παρουσίας του ασύμμετρου κέντρου C_5 και κατόπιν η κυκλοποίηση αυτού, προς σχηματισμό της λακτόνης (30).

IV.2.a.1.4. Σύνθεση της διοξίμης (31)

IV.2.a.1.4.1. Περιγραφή μεθόδου



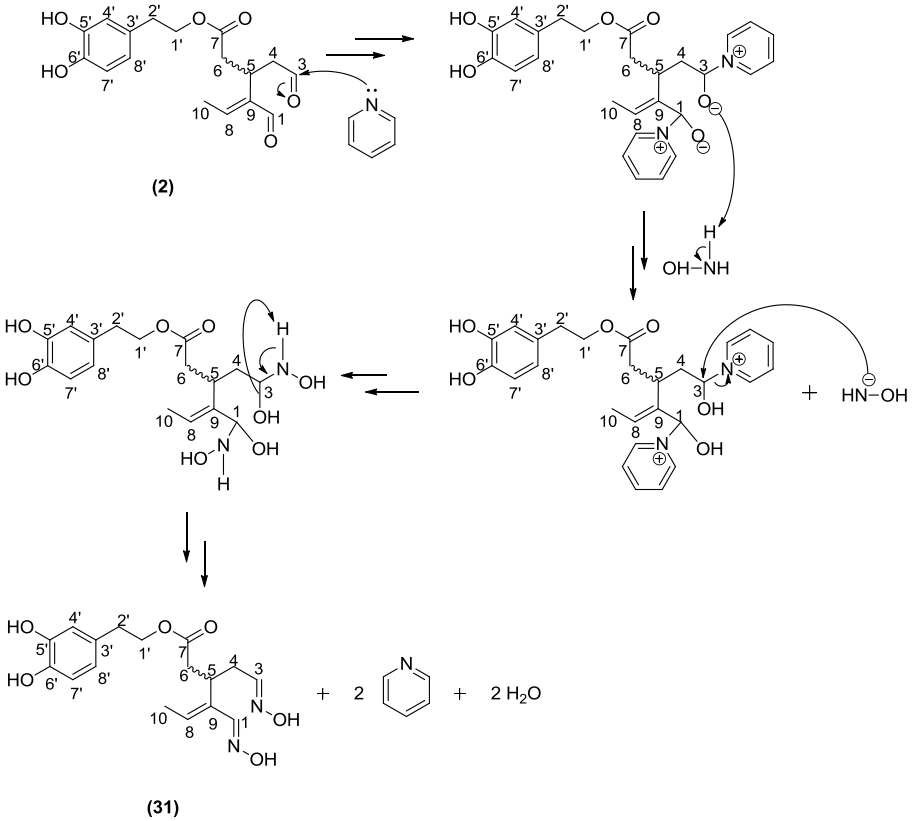
(2) **(31)**

Η μετατροπή καρβονυλικών ομάδων σε οξίμες, αποτελεί σημαντική αντίδραση στην οργανική χημεία. Οι οξίμες είναι κρυσταλλικές ενώσεις που χρησιμοποιούνται, όχι μόνο ως προστατευτικές ομάδες, αλλά και για τον καθαρισμό και την ταυτοποίηση καρβονυλικών ενώσεων. Κλασικά, οι οξίμες παρασκευάζονται με αντίδραση αλκοολικού διαλύματος της εκάστοτε καρβονυλικής ένωσης, με υδροχλωρική υδροξυλαμίνη και πυριδίνη. [269] Στην παρούσα διατριβή, η αντίδραση πραγματοποιήθηκε σε θερμοκρασία δωματίου.

Ποσότητα ολεασίνης (2), λοιπόν, διαλυτοποιείται στην ελάχιστη δυνατή ποσότητα πυριδίνης και στο διάλυμα προστίθεται υδροχλωρική υδροξυλαμίνη ($NH_2OH{\cdot}HCl$). Το αντίδρών μίγμα αφήνεται σε ανάδευση, στους 50°C, κατά τη διάρκεια της νύχτας. Την επόμενη μέρα, μετά από διαπίστωση του τέλους της αντίδρασης με TLC[34], το μίγμα εκχυλίζεται με EtOAc, πλένεται με H_2O και, κατόπιν ξήρανσης της οργανικής φάσης με άνυδρο Na_2SO_4 και συμπύκνωσή της υπό κενό, παραλαμβάνεται, το προς καθαρισμό μίγμα. Έπειτα, κατόπιν χρωματογραφίας στήλης

και παρασκευαστικής TLC[34] (prep-TLC[34]), παραλαμβάνεται η επιθυμητή διοξίμη (31), σε απόδοση της τάξης του 60%.

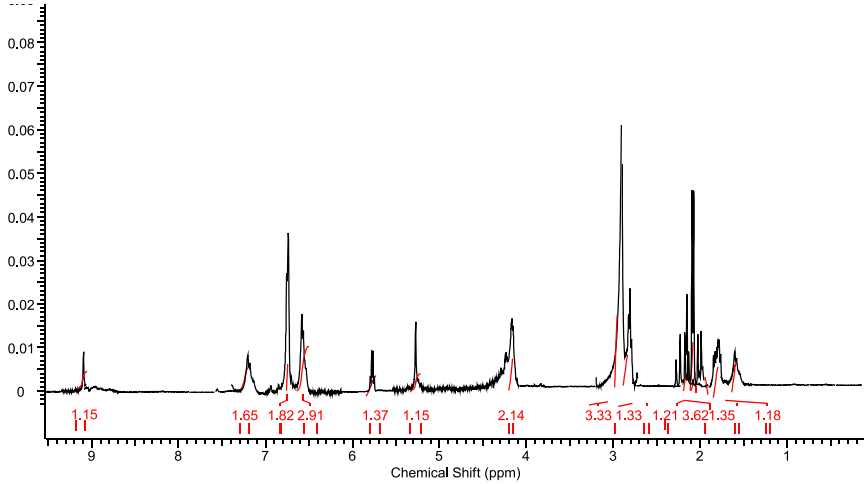
Ο μηχανισμός ημισύνθεσης της διοξίμης, δίνεται στο Σχήμα 42.



Σχήμα 42. *Προτεινόμενος μηχανισμός ημισύνθεσης της διοξίμης (31)* [270].

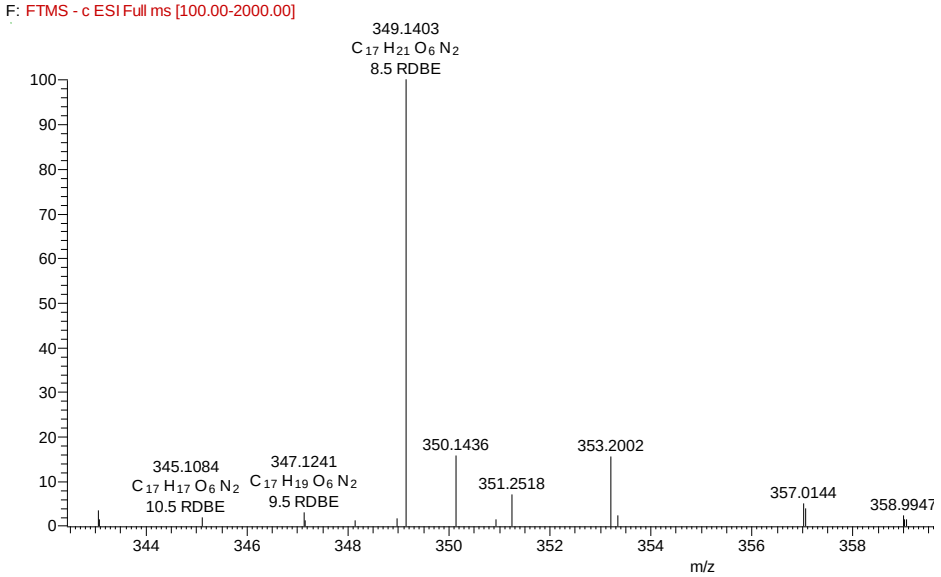
IV.2.a.1.4.2. Μελέτη δομής

Η μετατροπή των αλδεϋδικών ομάδων, σε ομάδες οξίμης, διαπιστώνεται εύκολα, μέσω φασματοσκοπίας NMR[39] (*Εικόνα 84*), καθώς οι χαρακτηριστικές κορυφές των δύο αλδεϋδικών πρωτονίων της ολεασίνης (2), H_1 και H_3, στα 9.65 και 9.20 ppm (*Εικόνα 65*), αντιστοίχως, απουσιάζουν από το φάσμα ^{1}H NMR της διοξίμης (31), με ταυτόχρονη παρουσία της χαρακτηριστικής ευρείας κορυφής των OH, στα 9.05 ppm.



Εικόνα 84. *Φάσμα ^{1}H NMR (600MHz) της διοξίμης (31), σε $CDCl_3$*

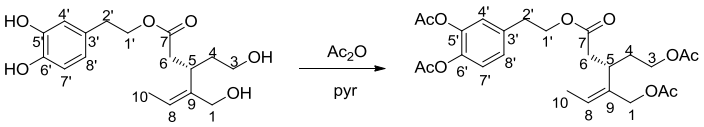
Επιπλέον, μέσω του MS[43], διαπιστώνεται, επίσης, η επιτυχής έκβαση της αντίδρασης μετατροπής της ολεασίνης (2) στο ανάλογο της, διοξίμη (31). Το εν λόγω φάσμα, δίνεται στην Εικόνα 85.



Εικόνα 85. *Φάσμα μάζας της διοξίμης (31) (FTMS-cESI).*

IV.2.a.1.5. Σύνθεση της ακετυλο-διόλης (32)

IV.2.a.1.5.1. Περιγραφή μεθόδου



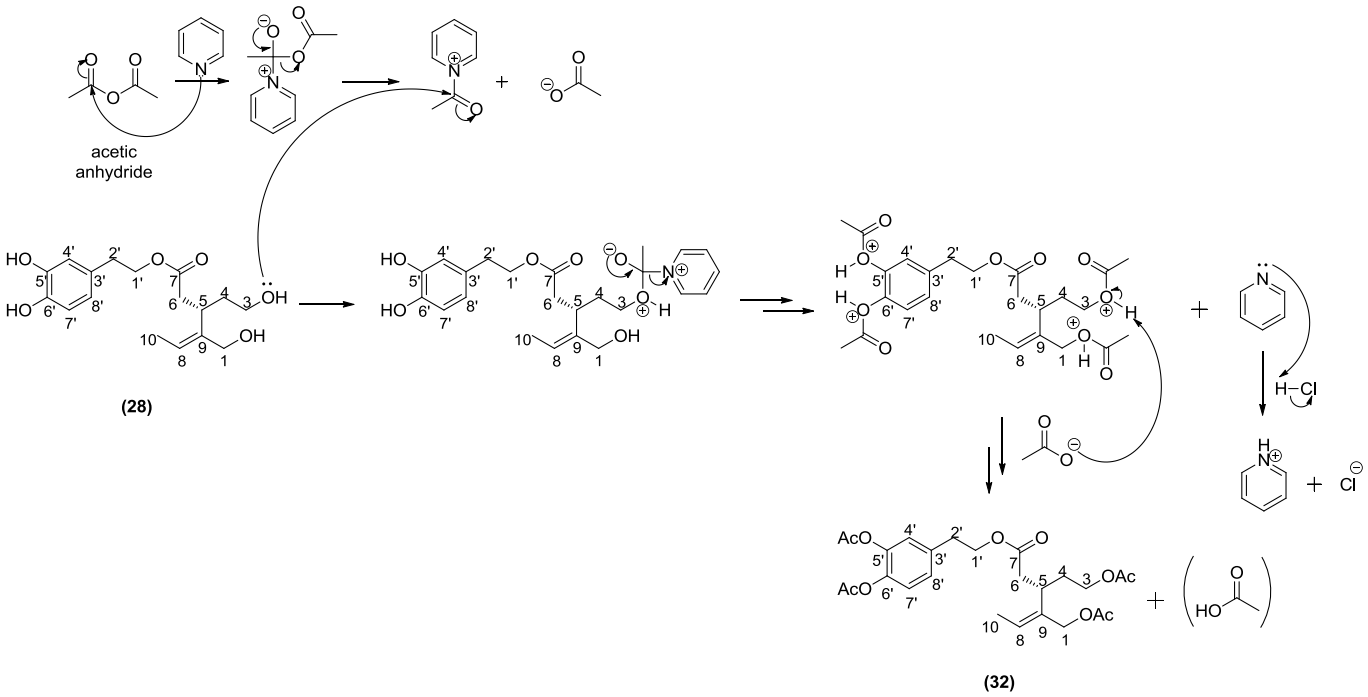
(28) **(32)**

Στην παρούσα διατριβή, στις περιπτώσεις όπου εργαστήκαμε με την ολεασίνη (2), ή κάποια από τα συνθετικά της ανάλογα, συχνά παρέστη η ανάγκη για προστασία των αλδεϋδικών ομάδων ή υδροξυλομάδων (εν προκειμένω στην περίπτωση της διόλης (28)), ώστε να αποφευχθεί η συμμετοχή των ομάδων αυτών σε μετέπειτα διεργασίες. Παράδειγμα τέτοιων διεργασιών, αποτελεί, όπως περιγράφηκε στην υποενότητα IV.2.a.1.3., η μετατροπή του οξέος της διόλης (29), στην κλειστή λακτονική μορφή (30).

Μία από τις προσπάθειες προστασίας των ομάδων υδροξυλίου της διόλης (28), λοιπόν, αποτελεί η αντίδραση ακετυλίωσης. Η πλήρως ακετυλιωμένη διόλη (32) ήταν το κύριο προϊόν αυτής της διεργασίας.

Σύμφωνα με τους Hanessian και συνεργάτες [261], η ακετυλίωση περιλαμβάνει τη χρήση οξικού ανυδρίτη και ενός καταλύτη, όπως οξικό νάτριο, χλωριούχο ψευδάργυρο, θειικό οξύ ή πυριδίνη. Επιπλέον, δεν είναι απαραίτητη η παροχή θερμότητας για την πραγματοποίηση της αντίδρασης.

Ο μηχανισμός της ακετυλίωσης της διόλης (28), δίνεται στο Σχήμα 43.



Σχήμα 43. *Προτεινόμενος μηχανισμός για την αντίδραση ακετυλίωσης της διόλης (28).*

Πρώτο βήμα της ακετυλίωσης, αποτελεί η προσθήκη στη διόλη (28), πυριδίνης, υπό ταυτόχρονη ψύξη στους 0^{o}C και υπό ατμόσφαιρα αργού, ώστε να εξασφαλιστεί αλκαλικό και άνυδρο περιβάλλον, πριν την ακόλουθη προσθήκη του οξικού ανυδρίτη. Η ταυτόχρονη ψύξη, έχει ως στόχο την αποφυγή απότομης αύξησης της θερμοκρασίας, καθώς η αντίδραση προσθήκης της πυριδίνης είναι εξώθερμη. Αντίστοιχα, οι άνυδρες συνθήκες εξασφαλίζονται ώστε να προστατευτεί η πυριδίνη από πιθανή πρωτονίωση, και να είναι ικανή να δράσει ως πυρηνόφιλο, κατά την προσθήκη, στο επόμενο βήμα, του οξικού ανυδρίτη. Η προσθήκη αυτή γίνεται και πάλι στους 0^{o}C και κατά σταγόνες. Η αλληλεπίδραση της πυριδίνης με τον οξικό ανυδρίτη, απεικονίζεται στο Σχήμα 44, όπως επίσης η ακόλουθη πυρηνόφιλη προσβολή του προκύπτοντος κατιόντος, από τα οξυγόνα των υδροξυλίων της διόλης (28).

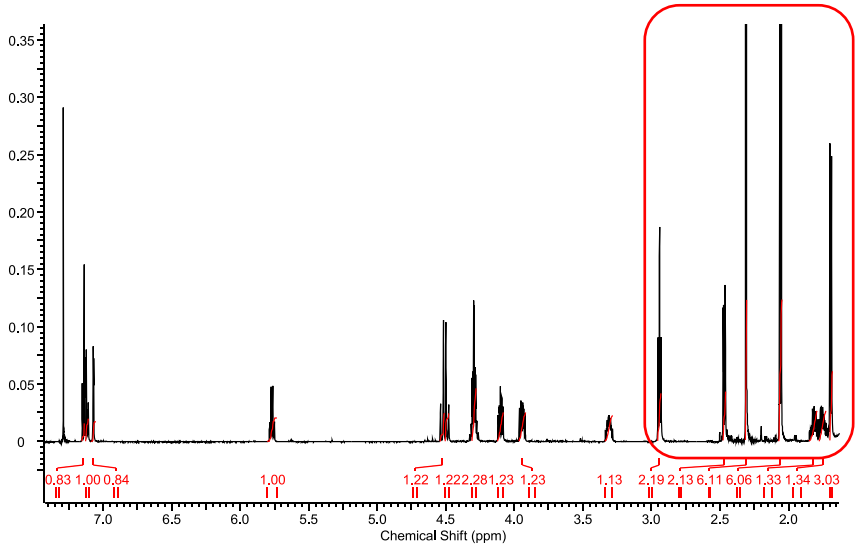
Κατόπιν μιας περίπου ώρας ανάδευσης, το αντιδρών διάλυμα κατεργάζεται με μίγμα υδατικού διαλύματος HCl 1M και πάγου, μέχρι το pH να φτάσει στο 5. Η προσθήκη του διαλύματος υδροχλωρίου έχει ως στόχο την πρωτονίωση της πυριδίνης, ώστε αυτή, κατόπιν εκχύλισης του μίγματος με διχλωρομεθάνιο (CH_2Cl_2), να αποβληθεί στην υδατική στιβάδα. Η προσεκτική προσθήκη του υδροχλωρίου, σ' αυτή τη φάση, έχει μεγάλη σημασία, καθώς το pH δεν πρέπει να γίνει μικρότερο του 5. Κατόπιν ξήρανσης της οργανικής φάσης με άνυδρο Na_2SO_4 και συμπύκνωσής της υπό κενό, παραλήφθηκε το επιθυμητό προϊόν (32), σε πολύ ικανοποιητική απόδοση, της τάξης του 90%.

IV.2.a.1.5.2. Μελέτη δομής

Η δομή του ακετυλιωμένου αναλόγου της διόλης (32), ταυτοποιείται με χρήση της φασματοσκοπίας NMR[39], και διαφοροποιείται από τη διόλη (28).

Συγκεκριμένα, η τετραοξική διόλη (32) (*Εικόνα 86*), ως προϊόν ακετυλίωσης της διόλης (32), εμφανίζει τις χαρακτηριστικές απλές κορυφές, στα 2.03 ppm (6H) και 2.28 ppm (6H), οι οποίες αντιστοιχούν στις μεθυλομάδες των ακετυλίων της ομάδας της διόλης (28) και των

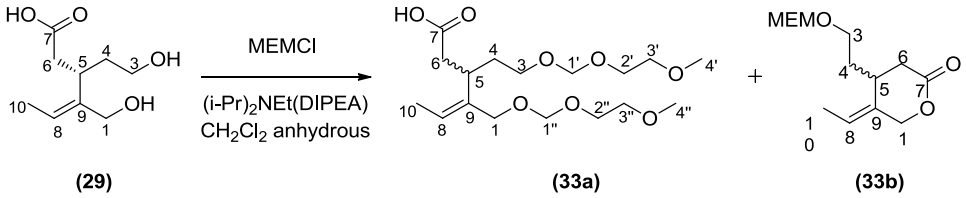
φαινολικών υδροξυλίων, αντίστοιχα. Οι κορυφές αυτές δεν υπάρχουν στο φάσμα της διόλης (28), που παρατέθηκε στην Εικόνα 81.



Εικόνα 86. *Φάσμα ^{1}H NMR (600MHz) της τετραοξικής διόλης (32), σε $CDCl_3$*

IV.2.a.1.6. Σύνθεση των MEM (μεθοξυαιθοξυμεθυλο) αναλόγων του οξέος (33α) και της λακτόνης του οξέος (33b)

IV.2.a.1.6.1. Περιγραφή μεθόδου



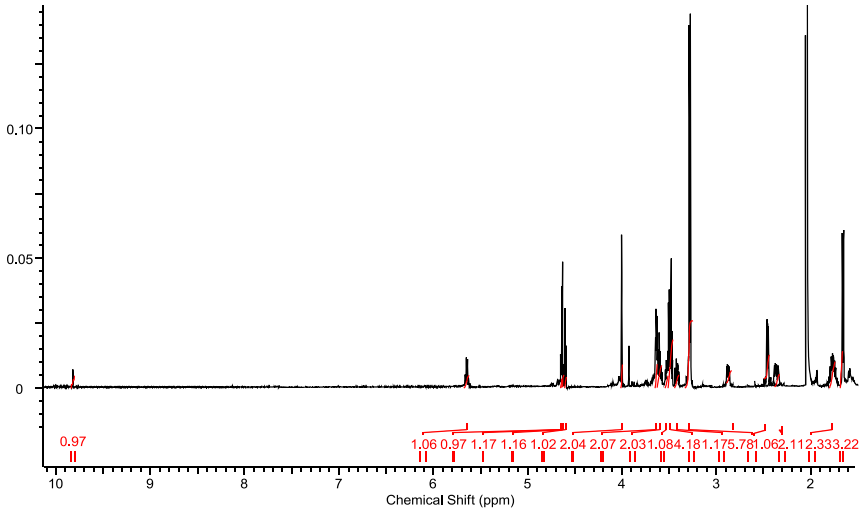
(29) **(33a)** **(33b)**

Όπως περιγράφηκε στην υποενότητα IV.2.a.1.3, το οξύ της διόλης (29), μετά από κάποιο χρονικό διάστημα αποθήκευσης, ακόμα και στους -4°C, μετατρέπεται στην λακτονική μορφή του (30). Με σκοπό την αποφυγή αυτής της μετατροπής, εκτός από την ακετυλίωση που περιγράφηκε στην προηγούμενη υποενότητα, μια άλλη μέθοδος που χρησιμοποιήθηκε είναι η προστασία των ελεύθερων υδροξυλίων του οξέος της διόλης (29), με χρήση του αντιδραστηρίου μεθοξυ-αιθοξυ-μεθυλο χλωριδίου (MEMCl), παρουσία της βάσης N,N-διϊσοπροπυλαιθυλαμίνη και διαλύτη άνυδρο διχλωρομεθάνιο.

Σε διάλυμα του οξέος (29) σε CH_2Cl_2 άνυδρο, προστίθεται, στους 0°C, η βάση N,N-διϊσοπροπυλαιθυλαμίνη και έπειτα, προστίθεται στάγδην το MEMCl, διαλυμένο σε μικρή ποσότητα άνυδρου διχλωρομεθανίου. Αμέσως μετά την προσθήκη, παρατηρείται θολότητα στο αντιδρών μίγμα και αυτό αφήνεται σε ανάδευση, σε θερμοκρασία δωματίου, για δύο ώρες, τουλάχιστον. Ακολουθεί προσθήκη H_2O και, κατόπιν ελέγχου του pH, το μίγμα οξινίζεται με HCl 1M, τόσο ώστε το μετρούμενο pH να μην είναι αλκαλικό. Στην περίπτωσή μας, το pH μετά το τέλος της αντίδρασης κυμάνθηκε στα 5-6, επομένως δεν χρειάστηκε οξίνιση του μίγματος με HCl 1M. Κατόπιν εκχύλισης, 3 φορές, με διαιθυλαιθέρα (Et_2O), ξήρανση της οργανικής φάσης με άνυδρο Na_2SO_4 και συμπύκνωση αυτής υπό κενό, παραλαμβάνεται το επιθυμητό προϊόν (33a), σε χαμηλή απόδοση, της τάξης του 10% [271], αλλά και το ανάλογο της λακτονικής μορφής του οξέος, με MEM, (33b), σε απόδοση της τάξης του 30%.

IV.2.a.1.6.2. Μελέτη δομής

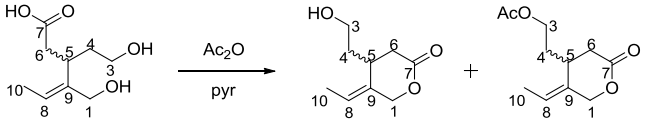
Η προστασία των ομάδων υδροξυλίου του οξέος (29) διαπιστώνεται μέσω της φασματοσκοπίας NMR[39] και συγκεκριμένα από το φάσμα ^{1}H NMR (*Εικόνα 87*) του προϊόντος της αντίδρασης προστασίας (33), που είναι σημαντικά πιο πολύπλοκο, στην αλειφατική και την οξυγονωμένη περιοχή του φάσματος, από το αντίστοιχο φάσμα του οξέος της διόλης (28).



Εικόνα 87. *Φάσμα ^{1}H NMR του προϊόντος προστασίας του οξέος με MEMCl (33), σε $(CD_3)_2CO$*

IV.2.a.1.7. Σύνθεση της ακετυλο λακτόνης του οξέος (34)

IV.2.a.1.7.1. Περιγραφή μεθόδου



Σύμφωνα με την μέθοδο ακετυλίωσης που περιγράφηκε στην υποενότητα IV.2.a.1.5.1., η απόπειρα προστασίας των υδροξυλίων του οξέος της διόλης (29), μέσω της μετατροπής τους σε ακετυλο εστέρες, έδωσε, αναπόφευκτα, ως προϊόντα, την λακτόνη (30) και την ακετυλιωμένη μορφή αυτής, (34) και όχι το επιθυμητό ανάλογο του οξέος, με ακετυλο ομάδες στη θέση των δύο ελεύθερων υδροξυλίων. Συμπεραίνεται, λοιπόν, ότι η λακτονική μορφή του οξέος (30), είναι σταθερότερη της ανοιχτής μορφής (29) και επομένως το ακετυλιωμένο παράγωγο της λακτονικής μορφής (34) σχηματίζεται αποκλειστικά.

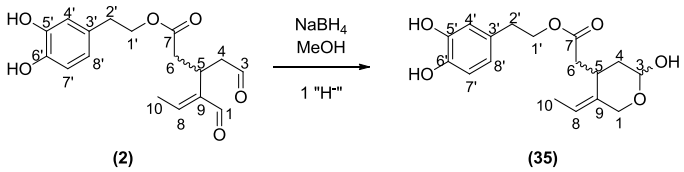
Το ακετυλιωμένο παράγωγο της λακτόνης (34), παραλήφθηκε, κατόπιν διαχωρισμού του, με χρωματογραφία στήλης, από το παραπροϊόν της λακτόνης (30), σε απόδοση της τάξης του 65%.

IV.2.a.1.7.2. Μελέτη δομής

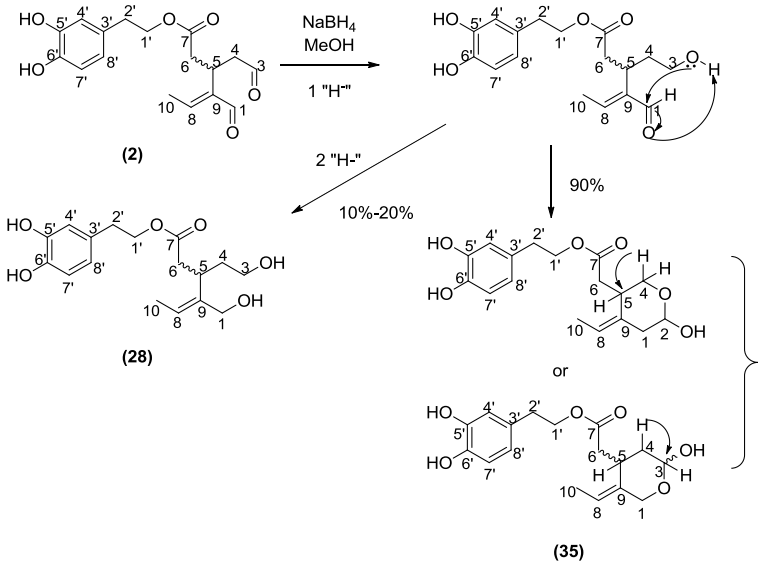
Η μελέτη της δομής του ακετυλιωμένου παραγώγου (34) της αντίδρασης ακετυλίωσης του οξέος (29), πραγματοποιήθηκε με φασματοσκοπία NMR[39]. Το φάσμα ^{1}H NMR του προϊόντος (34), μετά τον καθαρισμό του, αποδεικνύει την ύπαρξη δύο ισομερών, των (+) και (-), κάτι που επιβεβαιώθηκε κατόπιν μέτρησης της στροφικής ικανότητας του προϊόντος (67), η οποία μετρήθηκε 0, τιμή που αντιστοιχεί σε ρακεμικό μίγμα.

IV.2.a.1.8. Σύνθεση της λακτόλης (35)

IV.2.a.1.8.1. Περιγραφή μεθόδου



Κατά την αναγωγή της ολεασίνης (2), με τη μέθοδο που περιγράφηκε στην υποενότητα IV.2.a.1.1.1. [268], εκτός από τη διόλη (28), ως κύριο προϊόν, προκύπτει, ως παραπροϊόν, μία λακτόλη (35), που προκύπτει μέσω του μηχανισμού που περιγράφεται στο Σχήμα 44.

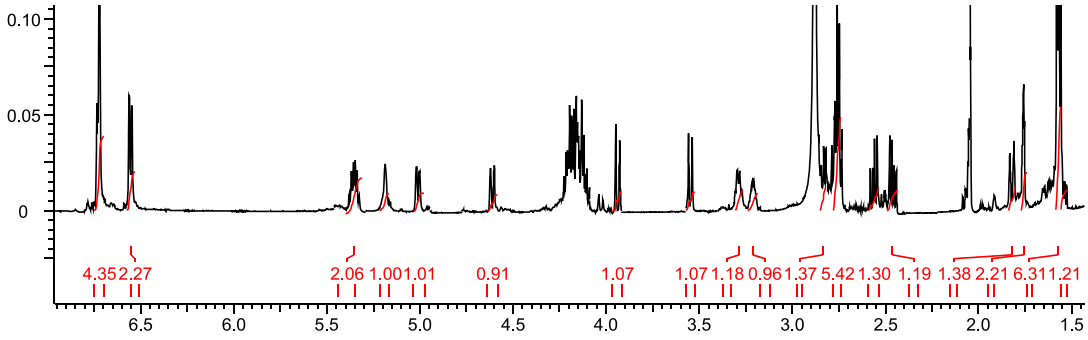


Σχήμα 44. *Προτεινόμενος μηχανισμός σχηματισμού λακτόλης (35).*

Από την αντίδραση αναγωγής με $NaBH_4$ της ολεασίνης (2), η απόδοση, ως προϊόντος, της λακτόλης (35), είναι της τάξης του 30%, ενώ υπερισχύει ως προϊόν η διόλη (28).

IV.2.a.1.8.2. Μελέτη δομής

Το προϊόν (35) μελετήθηκε φασματοσκοπικά και πολωσιμετρικά. Αφ' ενός από το φάσμα ^{1}H NMR του προϊόντος (35) (*Εικόνα 88*), προκύπτει ότι πρόκειται για δύο στερεοϊσομερή προϊόντα και όχι για ένα καθαρό προϊόν, αφ' ετέρου, η μέτρηση της στροφικής ικανότητάς του συμφωνεί και επιβεβαιώνει αυτή την υπόθεση, καθώς η μετρούμενη γωνία στροφής και ως εκ τούτου, η $[\alpha]_D$ του προϊόντος (35), μετρήθηκε μηδενική.

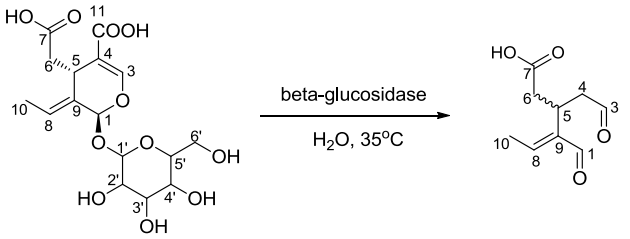


Εικόνα 88. *Φάσμα ^{1}H NMR της λακτόλης (35), σε $(CD_3)_2CO$*

IV.2.a.2. Σύνθεση αναλόγων με πρώτη ύλη την ελαιοευρωπεΐνη

IV.2.a.2.1. Σύνθεση του οξέος (36)

IV.2.a.2.1.1. Περιγραφή μεθόδου

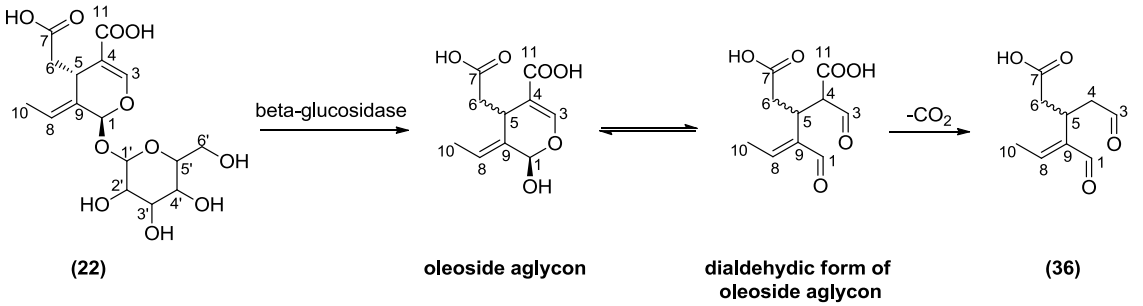


(22) **(36)**

Ένας από τους στόχους της παρούσας διατριβής ήταν η ημισύνθεση αναλόγων της ολεασίνης (2) και της ολεοκανθάλης (3). Στα πλαίσια αυτά, επιχειρήθηκε η παρασκευή, ως πρώτης ύλης, του οξέος της ολεασίνης (29). Μετά από πολυάριθμες απόπειρες σύνθεσης του οξέος (36), η μόνη μέθοδος που αποδείχθηκε κατάλληλη είναι αυτή της ενζυμικής αντίδρασης του ολεοσίδη (22), με το ένζυμο β-γλυκοσιδάση.

Η μέθοδος, που περιγράφηκε ήδη αναλυτικά στην υποενότητα III.3.d.1 [32], περιλαμβάνει τη συμμετοχή της β-γλυκοσιδάσης στη βιοχημική μετατροπή του ολεοσίδη (22) στο οξύ της ολεασίνης (36). Για την εν λόγω μετατροπή, χρησιμοποιήθηκε το ένζυμο β-γλυκοσιδάση, από αμύγδαλα, ενώ οι συνθήκες τις αντίδρασης περιλαμβάνουν, μικρή ποσότητα νερού στο αντιδρών μίγμα και επώαση με ανάδευση, σε επωαστήρα ελεγχόμενης θερμοκρασίας, στους 35°C. Η διάρκεια της αντίδρασης, ποικίλει, ανάλογα με την ποσότητα και τη φύση του αρχικού προϊόντος (22) και κυμαίνεται από 2-20 ώρες. Στην περίπτωση του οξέος της ολεασίνης (36), χρειάστηκαν 12 ώρες. Μετά την περάτωση της αντίδρασης, πραγματοποιείται SPE[38] εκχύλιση, προς απομάκρυνση του ενζύμου και διαχωρισμό του από το προϊόν της αντίδρασης και, κατόπιν εκχύλισης με EtOAc, το οξύ (36) παραλαμβάνεται στην οργανική φάση, με απόδοση της τάξης του 40%.

Ο μηχανισμός της αντίδρασης, σύμφωνα με τους Lo Scalzo και συνεργάτες [32], δίνεται στο Σχήμα 45.

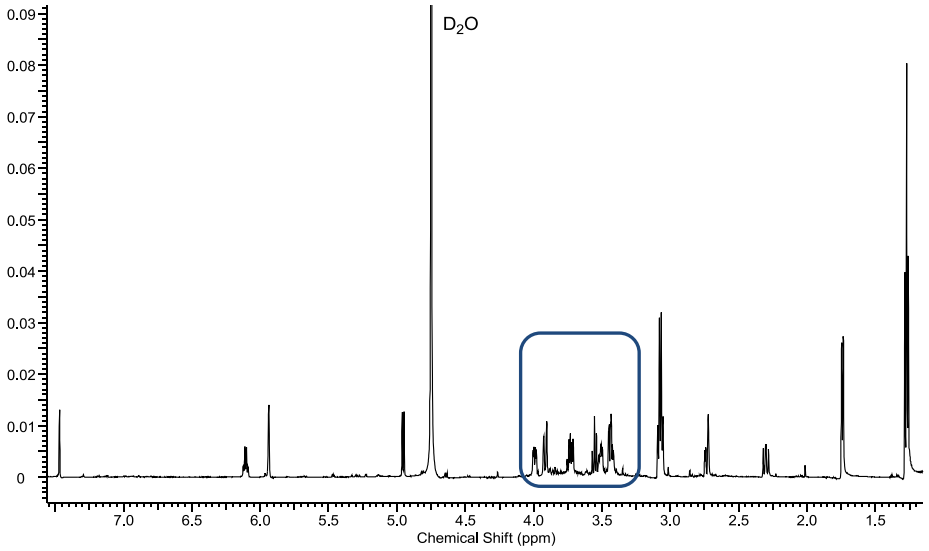


Σχήμα 45. *Μηχανισμός ενζυμικής υδρόλυσης του ολεοσίδη (22) με β-γλυκοσιδάση, προς σχηματισμό του οξέος της ολεασίνης (36)*

Στο πρώτο στάδιο του μηχανισμού, η β-γλυκοσιδάση καταλύει την υδρόλυση του σακχάρου, με αποτέλεσμα να σχηματίζεται το άγλυκο του ολεοσίδη, το οποίο βρίσκεται σε ισορροπία με την ανοιχτή διαλδεϋδική μορφή του, η οποία κατόπιν αυθόρμητης αποκαρβοξυλίωσης, δίνει την τελική μορφή του οξέος (36) [32].

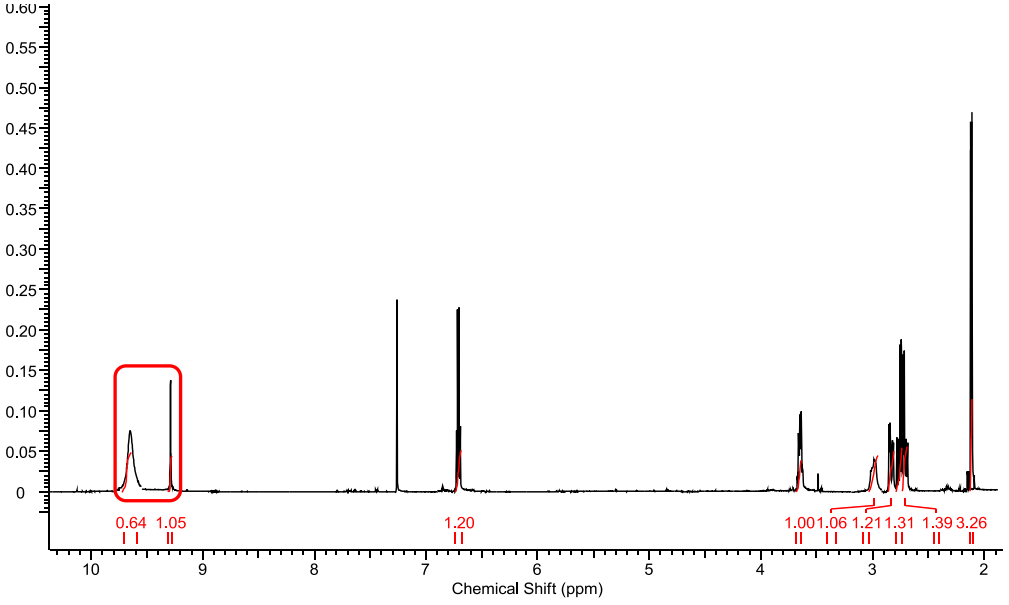
IV.2.a.2.1.2. Μελέτη δομής

Η δομή του οξέος της ολεασίνης (36), ταυτοποιείται με χρήση της φασματοσκοπίας NMR[39], και διαφοροποιείται από αυτή του ολεοσίδη (22) (*Εικόνα 89*), ο οποίος εμφανίζει τις χαρακτηριστικές κορυφές των Η του γλυκοσιδικού τμήματος, στην περιοχή από 3.40 – 4.05 ppm, καθώς επίσης και δύο απλές κορυφές, στα 5.95 ppm η μία και στα 7.45 ppm η άλλη, που αντιστοιχούν στα H_1 και H_3, αντιστοίχως.



Εικόνα 89. *Φάσμα ^1H NMR (600MHz) του ολεοσίδη (22), σε D_2O*

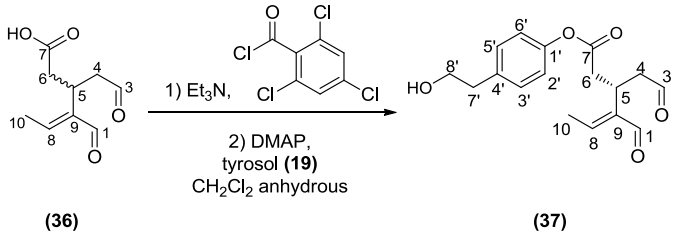
Σύμφωνα, λοιπόν, με το φάσμα του οξέος της ολεασίνης (36) (*Εικόνα 90*), υπάρχουν σημαντικές διαφορές με αυτό του ολεοσίδη (22), καθώς οι αντίστοιχες κορυφές των H_1 και H_3 είναι μετατοπισμένες σε τιμές 9.65 ppm και 9.30 ppm, αντιστοίχως, ενώ απουσιάζουν οι χαρακτηριστικές κορυφές των Η του σακχάρου, για τους λόγους που έχουν αναφερθεί, στο προηγούμενο Κεφάλαιο.



Εικόνα 90. *Φάσμα ^1H NMR (600MHz) του οξέος της ολεασίνης (36), σε $CDCl_3$*

IV.2.a.2.2. Σύνθεση της ισο-ολεοκανθάλης (37)

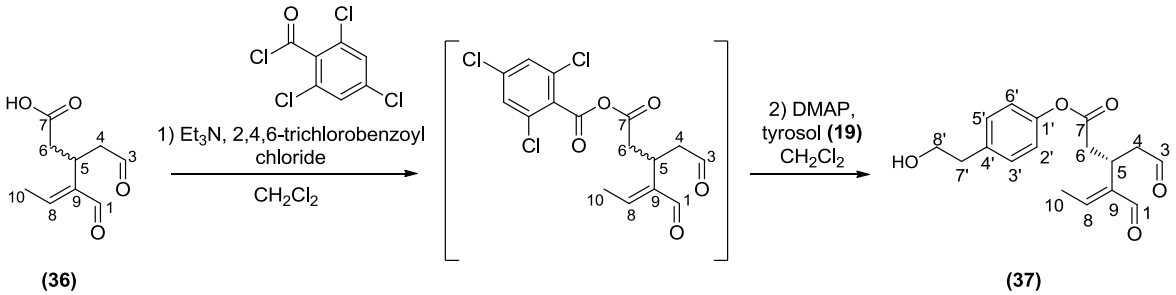
IV.2.a.2.2.1. Περιγραφή μεθόδου



Στην υποενότητα III.3.c.1. παρατέθηκε αναλυτικά η μέθοδος εστεροποίησης με αλκοόλες, η οποία ακολουθεί το πρωτόκολλο Yamaguchi, σύμφωνα με το οποίο χρησιμοποιούνται ήπιες, μη όξινες, συνθήκες αντίδρασης.

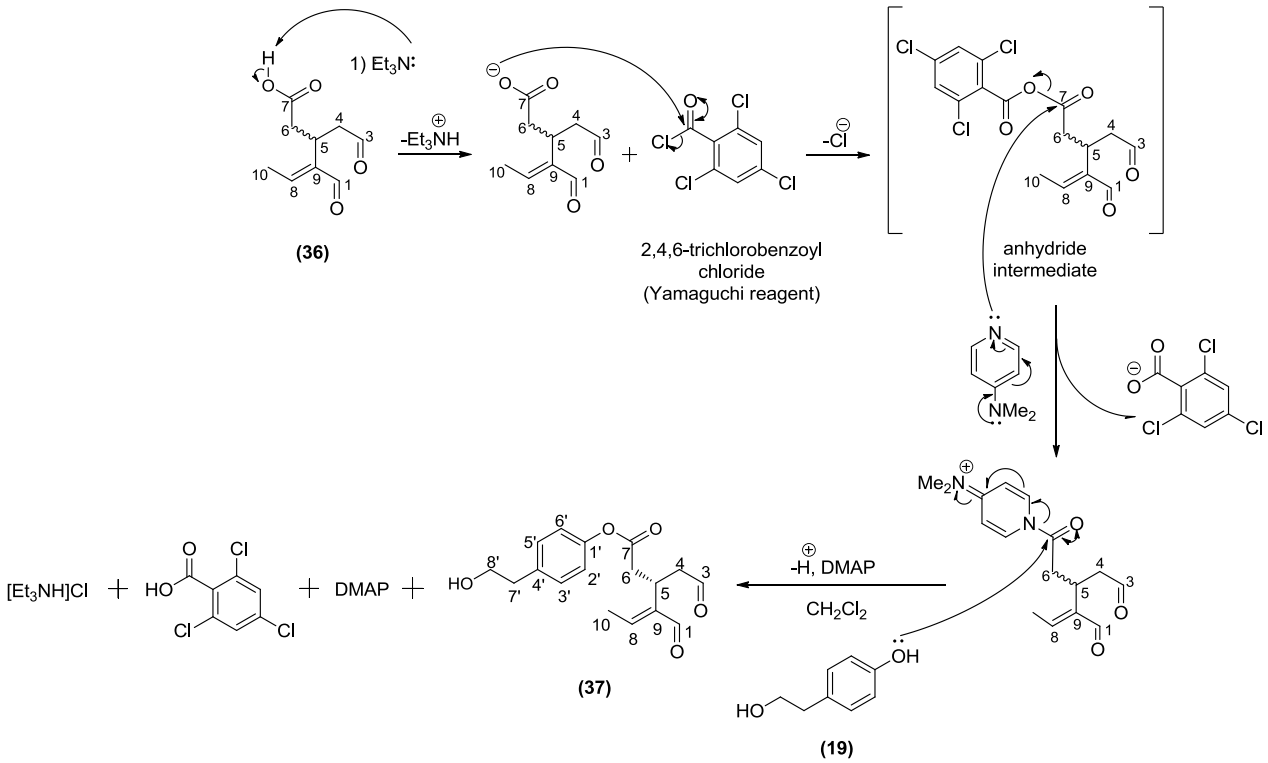
Με πρώτη ύλη, λοιπόν, το οξύ της ολεασίνης (36) – του οποίου η ημισύνθεση περιγράφηκε στην προηγούμενη υποενότητα – και με χρήση τριαιθυλαμίνης (Et_3N), 2,4,6- τριχλωροβενζόϋλο χλωριδίου (αντιδραστήριο Yamaguchi) και άνυδρο CH_2Cl_2, ως διαλύτη, προκύπτει, ως ενδιάμεσο προϊόν, ένας μικτός ανυδρίτης. Ο τελευταίος, αντιδρώντας περαιτέρω με τυροσόλη (19), ως πυρηνόφιλο, παρουσία στοιχειομετρικής ποσότητας 4-DMAP (4-διμεθυλαμινο-πυριδίνης), δίνει, κατόπιν εκχύλισης, ξήρανσης της οργανικής φάσης με Na_2SO_4 και συμπύκνωσης αυτής υπό κενό, ως κύριο προϊόν, τον επιθυμητό εστέρα, την ισο-ολεοκανθάλη (37) *(Σχήμα 46)*, σε απόδοση της τάξης του 45%. Η παρουσία της 4-DMAP, ουσιαστικά σε θέση καταλύτη της αντίδρασης, καθιστά δυνατή την ταχύτερη αλληλεπίδραση του, ενδιάμεσα σχηματιζόμενου, ανυδρίτη, με την τυροσόλη (19) [262]. Η ισο-ολεοκανθάλη παραλαμβάνεται σε απόδοση της τάξης του 45%.

Στην περίπτωση της ισο-ολεοκανθάλης (37), αντίθετα με αυτή της ολεοκανθάλης (3), δεν προηγείται, της εστεροποίησης του οξέος, η προστασία του φαινολικού ΟΗ της τυροσόλης (19). Αποτέλεσμα αυτής της παράλειψης είναι, η συμμετοχή του φαινολικού ΟΗ, στην αντίδραση εστεροποίησης, να ευνοείται, έναντι της συμμετοχής του αλειφατικού ΟΗ. Το φαινόμενο αυτό ερμηνεύεται, λαμβάνοντας υπ' όψη τις τιμές pKa των δύο ΟΗ· pKa ~ 10, για το φαινολικό ΟΗ και pKa ~ 16-18, για το αλειφατικό. Αυτό σημαίνει ότι το φαινολικό ΟΗ είναι αρκετά πιο όξινο από το αλειφατικό και επομένως, πιο ισχυρό πυρηνόφιλο.



Σχήμα 46. *Αντίδραση εστεροποίησης κατά Yamaguchi του οξέος της ολεασίνης (36) και σχηματισμός ενδιάμεσου προϊόντος*

Ο μηχανισμός της εστεροποίησης Yamaguchi στην περίπτωση της ημισύνθεσης της ισο-ολεοκανθάλης (37), δίνεται στο Σχήμα 47.

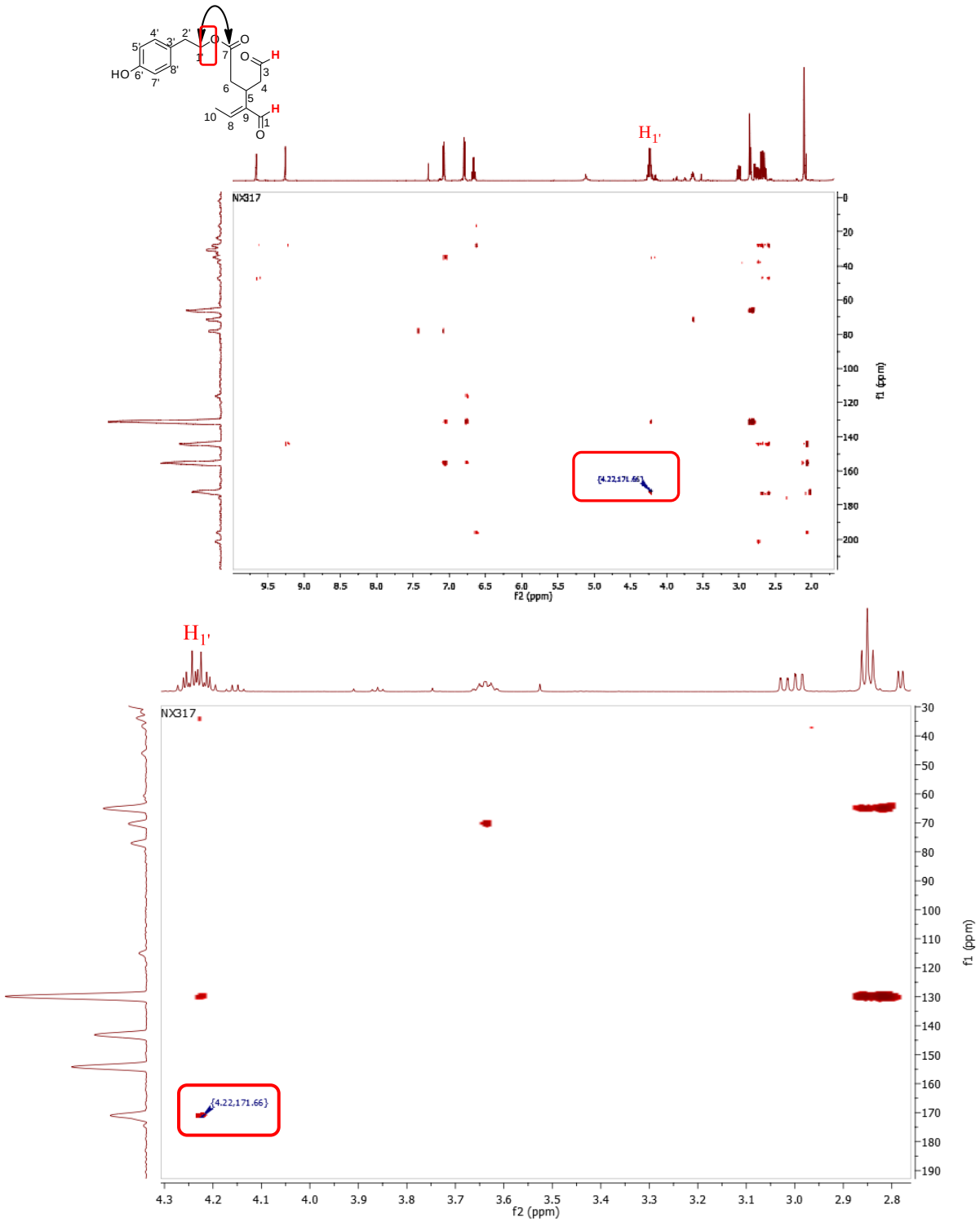


Σχήμα 47. *Μηχανισμός εστεροποίησης Yamaguchi, για την ημισύνθεση της ισο-ολεοκανθάλης (37).*

IV.2.a.2.2.2. Μελέτη δομής

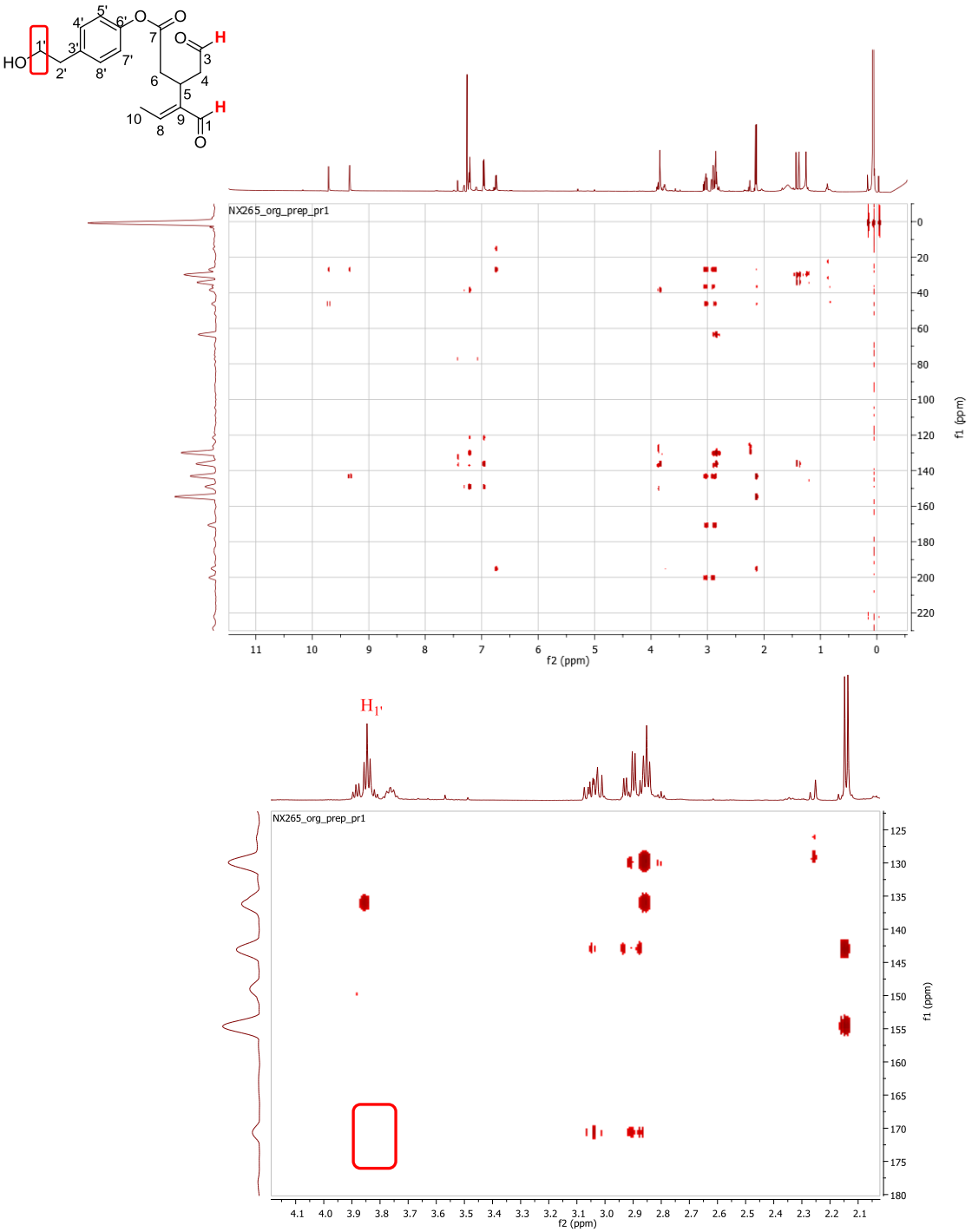
Η ταυτοποίηση της δομής της ισο-ολεοκανθάλης (37) και η διαφοροποίησή της από αυτή της ολεοκανθάλης (3), με χρήση της φασματοσκοπίας NMR[39], εκ πρώτης όψεως είναι δύσκολη. Τα φάσματα ^{1}H NMR των δύο ενώσεων είναι σχεδόν πανομοιότυπα και μόνο κατόπιν μελέτης των φασμάτων δύο διαστάσεων, HMBC[42], των δύο προϊόντων, μπορεί να γίνει εύκολα αντιληπτή η διαφορά τους στη δομή.

Στην Εικόνα 91 παρατίθεται το φάσμα HMBC[42] της ολεοκανθάλης (3), στο οποίο διακρίνεται η χαρακτηριστική αλληλεπίδραση (J_2) μεταξύ του καρβονυλικού άνθρακα (C_7) και του $H_{1'}$ της αιθυλομάδας της τυροσόλης (19), στο σημείο (4.22, 171.66 ppm).



Εικόνα 91. *Φάσμα HMBC[42] (600MHz) της ολεοκανθάλης (3), σε $CDCl_3$, σε πλήρη έκταση και σε μεγέθυνση στην περιοχή ενδιαφέροντος, για διευκρίνιση του τρόπου σύνδεσης της ομάδας της τυροσόλης (19) στο εστερικό οξυγόνο.*

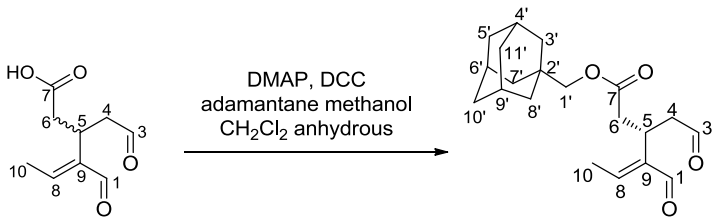
Αντίθετα, στο φάσμα HMBC[42] της ισο-ολεοκανθάλης (37) (*Εικόνα 92*), δε διακρίνεται τέτοια αλληλεπίδραση, κάτι που αποδεικνύει ότι στην περίπτωση αυτή, η ομάδα της τυροσόλης (19), συνδέεται στο εστερικό οξυγόνο, μέσω του φαινολικού υδροξυλίου και όχι του αλειφατικού.



Εικόνα 92. *Φάσμα HMBC*[42] *(600MHz) της ισο-ολεοκανθάλης (37), σε* $CDCl_3$*, σε πλήρη έκταση και σε μεγέθυνση στην περιοχή ενδιαφέροντος, για διευκρίνιση του τρόπου σύνδεσης της ομάδας της τυροσόλης (19) στο εστερικό οξυγόνο.*

IV.2.a.2.3. Σύνθεση του αδαμαντανο αναλόγου (38)

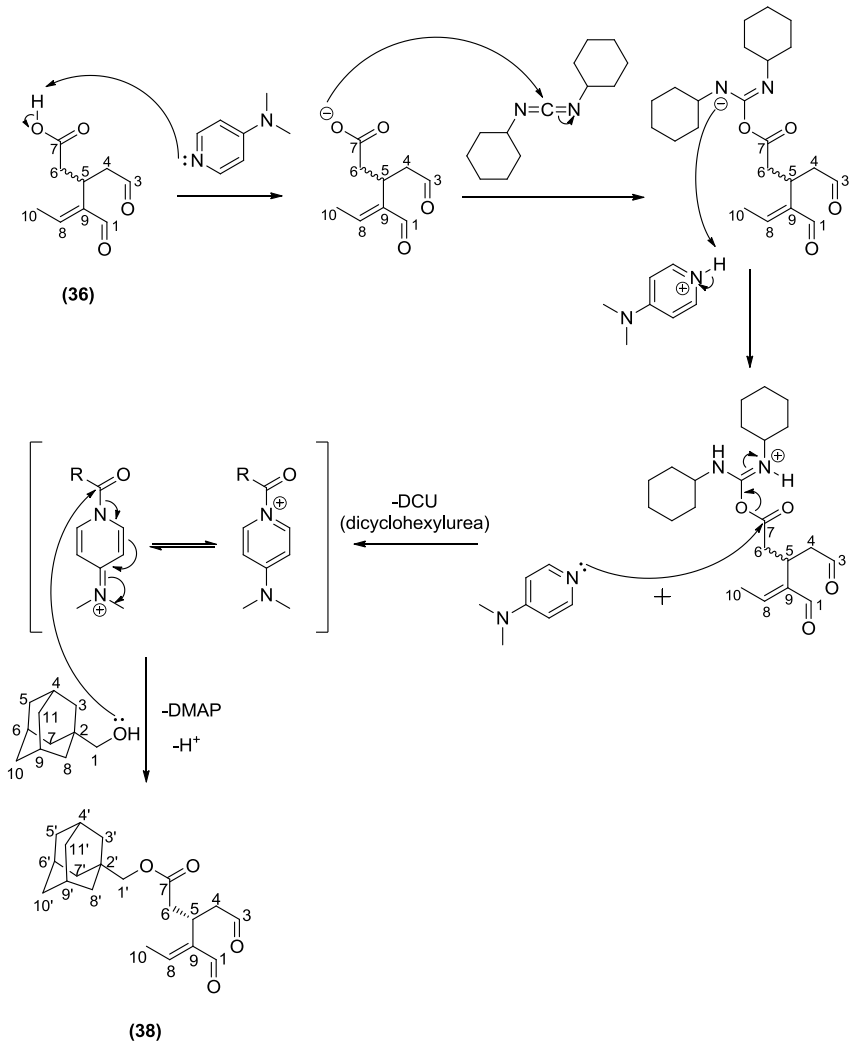
IV.2.a.2.3.1. Περιγραφή μεθόδου



(36) **(38)**

Ένα άλλο ανάλογο της ολεασίνης (2) που συντέθηκε με πρώτη ύλη το οξύ της ολεασίνης (36), είναι ο εστέρας του οξέος με χρήση ως αλκοόλης, της αδαμαντανο-μεθανόλης. Η μέθοδος εστεροποίησης που χρησιμοποιήθηκε στην περίπτωση αυτή, ήταν η εστεροποίηση Steglich [272], η οποία περιλαμβάνει χρήση του αντιδραστηρίου N,N'-δικυκλοεξυλοκαρβοδιϊμιδίου (DCC) και διμεθυλάμινο πυριδίνης (4-DMAP), ως καταλύτη. Η αντίδραση λαμβάνει χώρα σε θερμοκρασία περιβάλλοντος και ως διαλύτης, χρησιμοποιείται άνυδρο CH_2Cl_2.

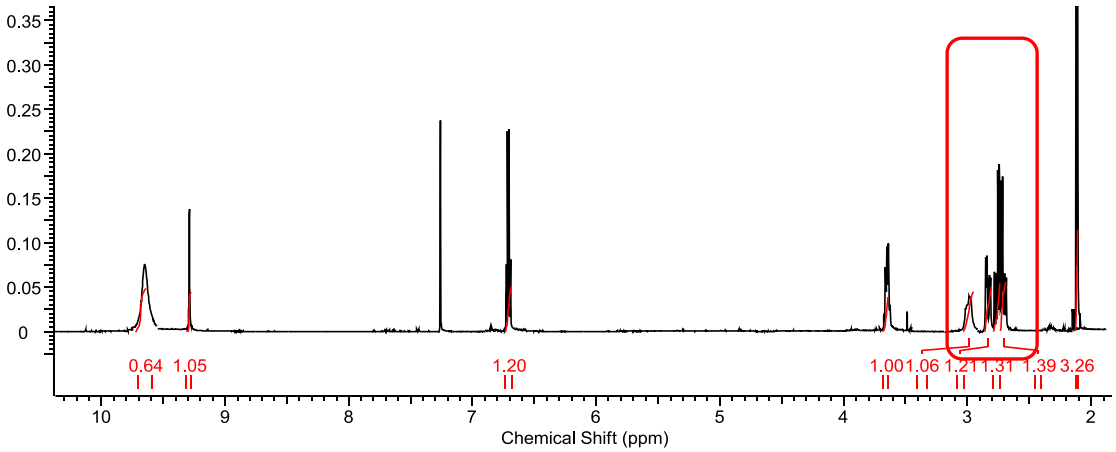
Σε διάλυμα του οξέος της ολεασίνης (36) με άνυδρο CH_2Cl_2, προστίθεται η αδαμαντανο-μεθανόλη, καθώς και καταλυτική ποσότητα 4-DMAP. Ακολουθεί προσθήκη ισομοριακής ποσότητας DCC και το αντιδρών μίγμα αναδεύεται για τρεις ώρες, σε θερμοκρασία περιβάλλοντος. Κατόπιν ελέγχου της προόδου της αντίδρασης με TLC[34] και διαπίστωση ότι η αντίδραση τελείωσε, το μίγμα διηθείται από ηθμό Hirsch και το διήθημα συμπυκνώνεται υπό κενό. Το προκύπτον υπόλειμμα κατεργάζεται με EtOAc και το στερεό αποβάλλεται, ως ίζημα, διηθείται εκ νέου από πτυχωτό ηθμό. Το διήθημα ακολούθως εκπλένεται με HCl 1M, νερό, κορεσμένο υδατικό διάλυμα $NaHCO_3$ και κορεσμένο υδατικό διάλυμα NaCl. Κατόπιν ξήρανσης της οργανικής φάσης με άνυδρο Na_2SO_4, συμπύκνωσης υπό κενό, καθαρισμού με χρωματογραφία στήλης και prep-TLC[34], παραλαμβάνεται το επιθυμητό προϊόν (38), σε απόδοση της τάξης του 15%. Ο μηχανισμός της αντίδρασης εστεροποίησης Steglich, με πρώτη ύλη το οξύ της ολεασίνης (36), δίνεται στο Σχήμα 48.



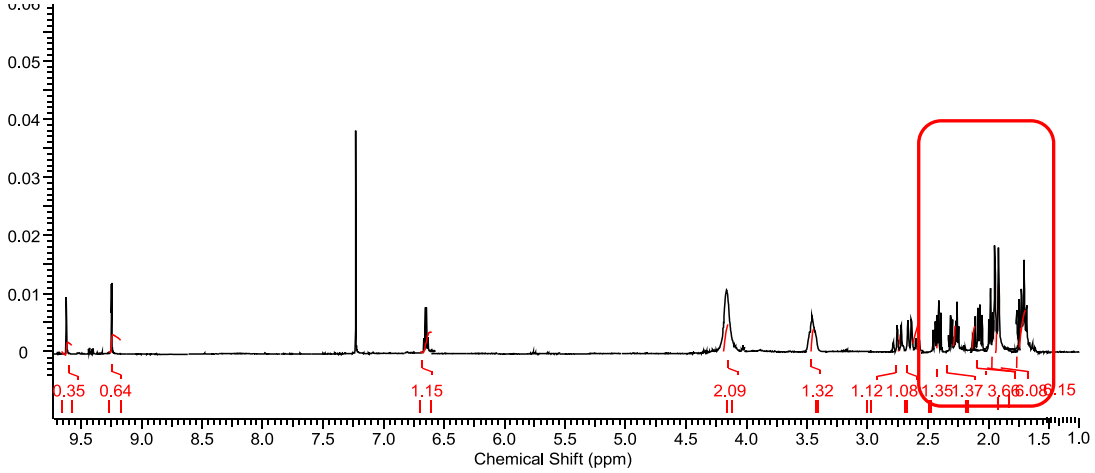
Σχήμα 48. *Μηχανισμός εστεροποίησης Steglich, για την ημισύνθεση του αναλόγου της ολεασίνης με αδαμαντάνιο (38).*

IV.2.a.2.3.2. Μελέτη δομής

Το φάσμα ^{1}H NMR του προϊόντος της εστεροποίησης Steglich (38) (*Εικόνα 94*), με πρώτη ύλη το οξύ της ολεασίνης (36), διαφοροποιείται από αυτό του οξέος (36) (*Εικόνα 93*), καθώς, διακρίνονται σε αυτό οι χαρακτηριστικές κορυφές της αδαμαντανο-μεθυλο-ομάδας, στην αλειφατική περιοχή του φάσματος.



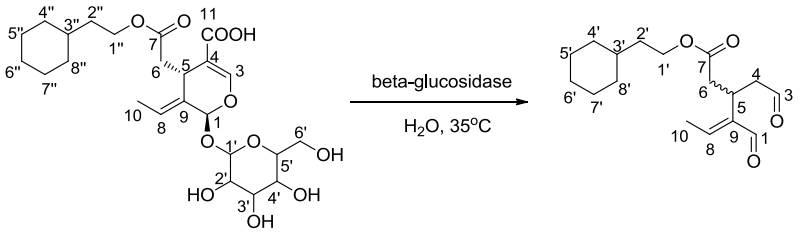
Εικόνα 93. *Φάσμα ^{1}H NMR (600MHz) του οξέος της ολεασίνης (36), σε $CDCl_3$*



Εικόνα 94. *Φάσμα ^{1}H NMR (600MHz) του αναλόγου της ολεασίνης με αδαμαντανιο (38), σε $CDCl_3$.*

IV.2.a.2.4. Σύνθεση του κυκλοεξυλ αιθυλο αναλόγου (39)

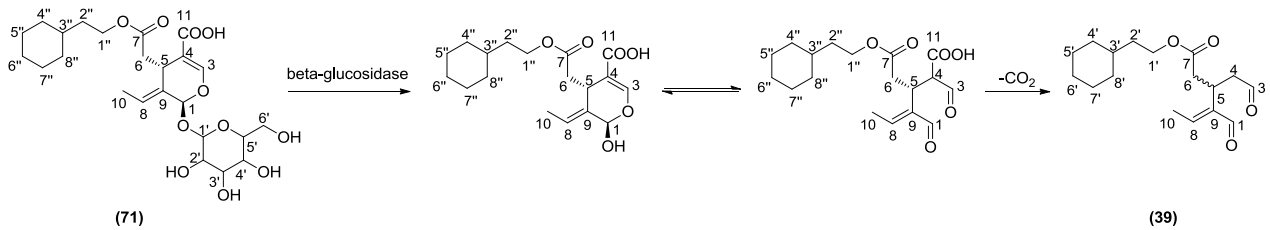
IV.2.a.2.4.1. Περιγραφή μεθόδου



(71) **(39)**

Στα πλαίσια της ημισύνθεσης αναλόγων ολεασίνης (2) και ολεοκανθάλης (3), ένα άλλο συνθετικό προϊόν που παρασκευάστηκε, ήταν το 7-(κυκλοεξυλ-αιθυλ) ανάλογο της ολεασίνης (39). Στην περίπτωση του (39), ποσότητα του (71) διαλύεται σε μικρή ποσότητα H_2O και στο διάλυμα προστίθεται β-γλυκοσιδάση. Το αντιδρών μίγμα αναδεύεται, σε επωαστή ελεγχόμενης θερμοκρασίας, στους 35^{o}C, για 12 ώρες. Η μέθοδος ημισύνθεσης των αναλόγων ολεασίνης (2) κατά την οποία προηγείται η αντίδραση εστεροποίησης, της ενζυμικής υδρόλυσης του σακχάρου, προς σχηματισμό της διαλδεϋδικής ομάδας, αποδείχθηκε περισσότερο ασφαλής, λόγω της ευαισθησίας που παρουσιάζει η διαλδεϋδική ομάδα του οξέος της ολεασίνης (36), στις συνθήκες κάτω από τις οποίες πραγματοποιείται η εστεροποίηση. Με τη παραπάνω μέθοδο, το επιθυμητό προϊόν (39), παραλήφθηκε με απόδοση της τάξης του 65%.

Ο μηχανισμός της ενζυμικής υδρόλυσης του 7-(κυκλοεξυλ-αιθυλ) εστέρα του ολεοσίδη (71), προς σχηματισμό του προϊόντος (39), είναι αντίστοιχος του μηχανισμού σχηματισμού του οξέος της ολεασίνης (36) (*Σχήμα 46*) και δίνεται στο Σχήμα 49.

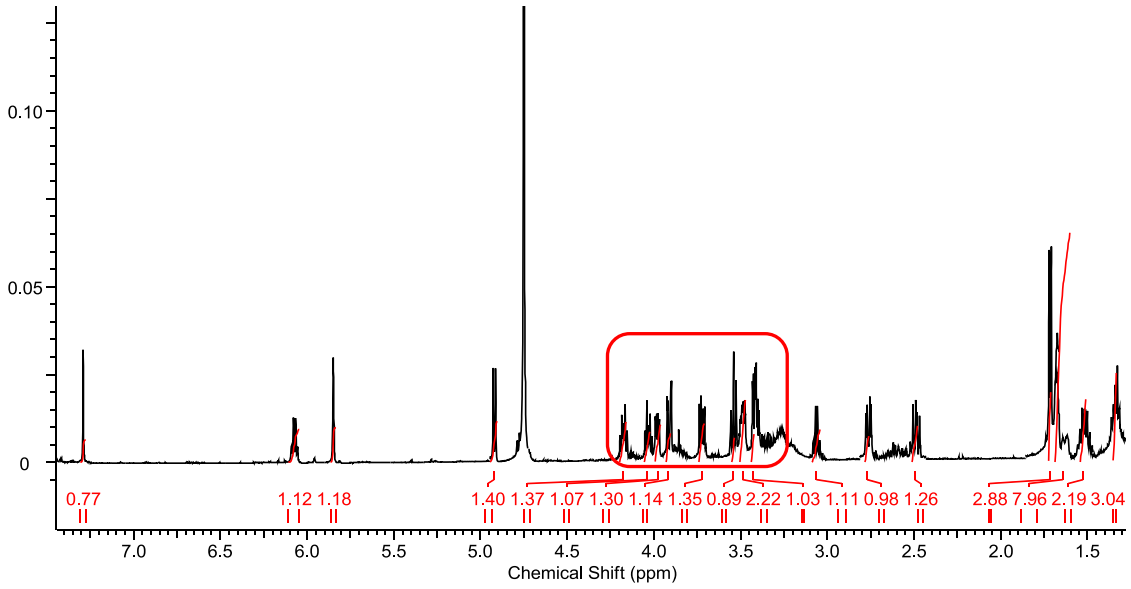


(71) **(39)**

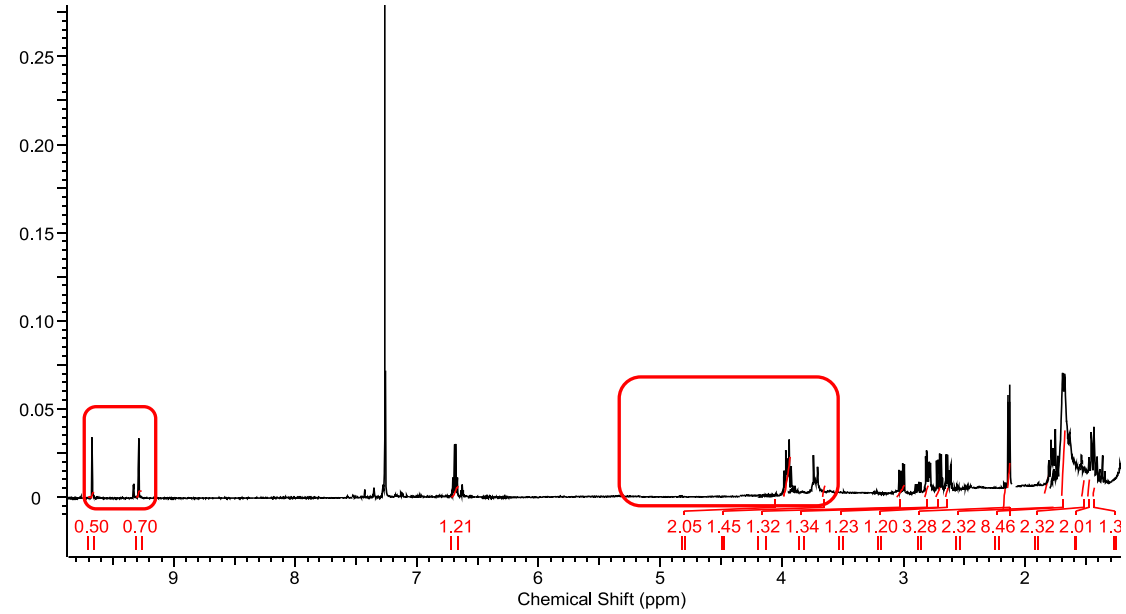
Σχήμα 49. *Μηχανισμός ενζυμικής υδρόλυσης του (71), με β-γλυκοσιδάση, προς σχηματισμό του (39)*

IV.2.a.2.4.2. Μελέτη δομής

Η μελέτη της δομής του 7-(κυκλοεξυλ-αιθυλ) αναλόγου της ολεασίνης (39) πραγματοποιείται, κατά τρόπο ανάλογο με αυτόν του οξέος της ολεασίνης (36). Σύμφωνα, λοιπόν, με το φάσμα του (39) (*Εικόνα 96*), υπάρχουν σημαντικές διαφορές με αυτό του 7-(κυκλοεξυλ-αιθυλ) εστέρα του ολεοσίδη (71), καθώς οι αντίστοιχες κορυφές των H_1 και H_3 είναι μετατοπισμένες σε τιμές 9.65 ppm και 9.30 ppm, αντιστοίχως, ενώ απουσιάζουν οι χαρακτηριστικές κορυφές των Η του σακχάρου (*Εικόνα 95*).

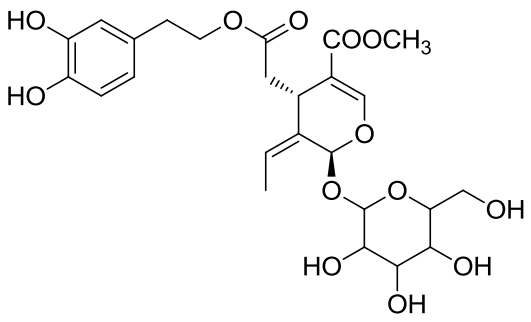


Εικόνα 95. *Φάσμα ^{1}H NMR (600MHz) του 7-(κυκλοεξυλ-αιθυλ) εστέρα του ολεοσίδη (71), σε D_2O*



Εικόνα 96. *Φάσμα ^{1}H NMR (600MHz) του 7-(κυκλοεξυλ-αιθυλ) αναλόγου της ολεασίνης (39), σε $CDCl_3$.*

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ


HO
HO
O
O
COOCH3
O
O
O
OH
HO
OH
OH

IV.3. Ημισύνθεση παραγώγων της Ελαιοευρωπεΐνης

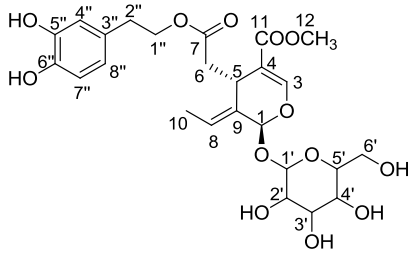
Στο τρίτο μέρος του τετάρτου κεφαλαίου της παρούσας διατριβής, θα παρατεθούν οι τέσσερεις βασικές αντιδράσεις που εκτελέστηκαν διαδοχικά, για την παρασκευή ενός εύρους ημισυνθετικών αναλόγων της ελαιοευρωπεΐνης (1):

- σαπωνοποίηση
- ακετυλίωση
- εστεροποίηση
- αποπροστασία

Οι μέθοδοι που ακολουθήθηκαν για τις τέσσερεις αυτές αντιδράσεις, περιγράφηκαν ήδη αναλυτικά στην υποενότητα ΙΙΙ.3. Με την αλληλουχία αυτή των αντιδράσεων και με πρώτη ύλη την ελαιοευρωπεΐνη, παρασκευάστηκαν συνολικά, συμπεριλαμβανομένων των ενδιαμέσων προϊόντων, 37 συνθετικά ανάλογα της ελαιοευρωπεΐνης (1).

Ακόμη, θα παρατεθούν τα φυσικοχημικά (Μοριακός Τύπος, Μοριακό Βάρος (MB), φυσική κατάσταση και χρώμα) και φασματοσκοπικά (^{1}H NMR, ^{13}C NMR, MS[43]) δεδομένα των παρασκευασθέντων ενώσεων, καθώς επίσης η στροφική τους ικανότητα, $[\alpha]_D^t$.

IV.3.a. *Ελαιοευρωπεΐνη, ως πρώτη ύλη*



Μοριακός τύπος: $C_{25}H_{32}O_{13}$
Μοριακό βάρος: 540.1843 g/mol
Μορφή: Στερεό
Χρώμα: Λευκό

Η ελαιοευρωπεΐνη (1) απομονώθηκε από την *Olea europaea*, όπως περιγράφηκε αναλυτικά στην υποενότητα ΙΙ.1. Καθαρισμός της (1) μας έδωσε λευκό κρυσταλλικό στερεό.

Τα φάσματα ^{1}H NMR και ^{13}C NMR είναι ταυτόσημα με αυτά που έχουν περιγραφεί στη βιβλιογραφία [273].

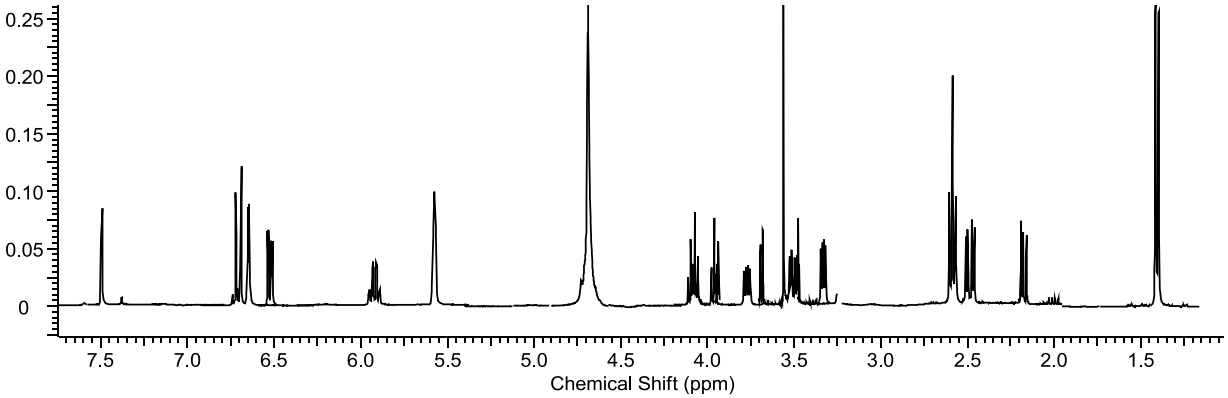
Το φάσμα ^{1}H NMR της ελαιοευρωπεΐνης (1) παρατέθηκε στην υποενότητα ΙΙΙ.3– *Εικόνα 66*.

^{1}H NMR (600 MHz, D_2O): δ 7.42 (s, 1H, H_3), 6.76 (d, $J_{7'',8''}$=8.0Hz, 1H, $H_{7''}$), 6.72 (d, $J_{4'',8''}$=1.5Hz, 1H, $H_{4''}$), 6.71 (dd, $J_{8'',7''}$=8.0Hz, $J_{8'',4''}$=1.5Hz, 1H, $H_{8''}$), 5.94 (q, $J_{8,10}$=7.0Hz, 1H, H_8), 5,66 (s, 1H, H_1), 4.79 (d, $J_{1',2'}$=8.0Hz, 1H, $H_{1'}$), 4.23 (m, 1H, $H_{1''a}$), 4.08 (m, 1H, $H_{1''b}$), 3.81 (dd, overlapping with H_5, 1H, $H_{6'b}$), 3.80 (dd, $J_{5,6a}$=8.5Hz, $J_{5,6b}$=5Hz, overlapping with $H_{6'b}$, 1H, H_5), 3.63 (dd, overlapping with OMe, 1H, $H_{6'a}$), 3.63 (s, 3H, H_{12}), 3.45 (t, $J_{4',3',5'}$=7.9Hz, 1H, $H_{4'}$), 3.42-3.88 (m, 1H, $H_{5'}$), 3.34 (t, $J_{3',2',4'}$=8.0Hz, 1H, $H_{3'}$), 3.33 (t, $J_{2',1',3'}$=8.0Hz, 1H, $H_{2'}$), 2.74 (m, 2H, $H_{2''}$), 2.58 (dd, $J_{6b,6a}$=14.0Hz, $J_{6b,5}$=5Hz, 1H, H_{6b}), 2.42 (dd, $J_{6a,6b}$=14.0Hz, $J_{6a,5}$=8.5Hz, 1H, H_{6a}), 1.48 (d, $J_{10,8}$=7.0Hz, also COSY[40] with H-1, 3H, H_{10})

^{13}C NMR (600 MHz, D_2O): δ 174.4 (CO, C_7), 169.30 (CO, C_{11}), 154.75 (CH, C_3), 144.06 (C, $C_{5''}$), 142.62 (C, $C_{6''}$), 131.37 (C, C_9), 128.41 (C, C_4), 125.27 (CH, C_8), 121.47 (CH, $C_{8''}$), 116.90 (CH, $C_{7''}$), 116.49 (CH, $C_{4''}$), 108.18 (C, $C_{3''}$), 99.71 (CH, $C_{1'}$), 95.03 (CH, C_1), 76.54 (CH, $C_{5'}$), 75.87 (CH, $C_{3'}$), 72.86 (CH, $C_{2'}$), 69.64 (CH, $C_{4'}$), 66.50 (CH_2, $C_{1''}$), 60.84 (CH_2, $C_{6'}$), 52.11 (CH_3, C_{12}), 40.06 (CH_2, C_6), 33.56 (CH_2, $C_{2''}$), 30.49 (CH, C_5), 12.75 (CH_3, C_{10})

$[\alpha]_D^{20}$= -147 (c 1.00, EtOH)

- **^{1}H NMR**



IV.3.b. *Γενική μέθοδος σαπωνοποίησης*

IV.3.b.1. Πειραματική διαδικασία

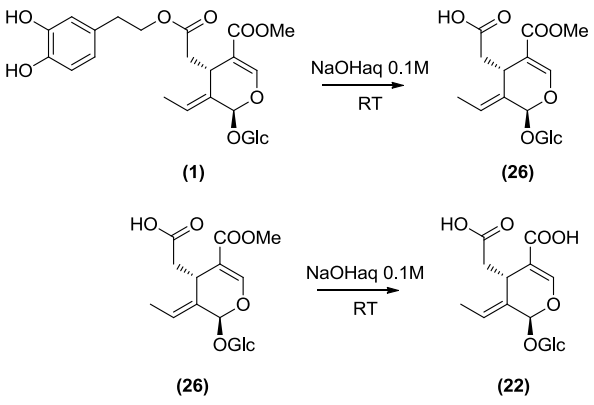
IV.3.b.1.1. Κλασική μέθοδος

1g του (1) και 50 mL υδατικού διαλύματος καυστικού νατρίου (NaOH) 0,1M αναδεύονται σε θερμοκρασία δωματίου (RT). Μετά από 4 ώρες ανάδευσης, με TLC[34], διαπιστώνεται ότι η αντίδραση έχει τελειώσει. Εξουδετέρωση του μίγματος με προσθήκη υδροχλωρικού οξέος (HCl) 1N, κατά σταγόνες, μέχρι pH= 4-5. Εξάτμιση του διαλύτη και ακολούθως, καθαρισμός του προϊόντος, σε μορφή «ξηρού ντεπώ» (silica 70-200 μm), με χρωματογραφία στήλης (silica flash (40-63μm)/ CH_2Cl_2/ MeOH: 95/5→50/50) δίνει, κατόπιν λυοφιλοποίησης, το επιθυμητό καρβοξυλικό οξύ [255], [266].

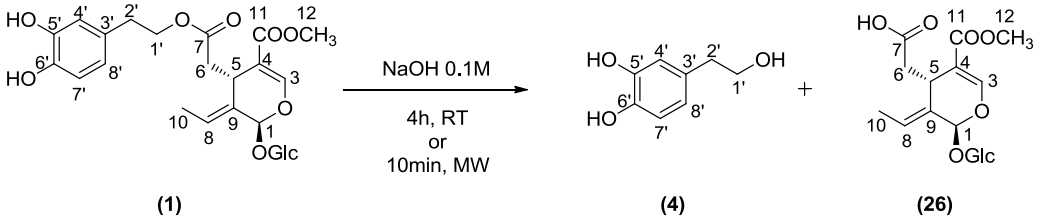
IV.3.b.1.2. Μέθοδος μικροκυμάτων (MW)

Ίδιες ποσότητες αντιδρώντων συστατικών χρησιμοποιούνται και για τη μέθοδο μικροκυμάτων, με τη διαφορά ότι η σαπωνοποίηση λαμβάνει χώρα μέσα στη συσκευή, ενώ ο απαιτούμενος χρόνος αντίδρασης στην περίπτωση αυτή είναι 6-9 λεπτά. Έλεγχος με TLC[34], υποδεικνύει το τέλος της αντίδρασης και ακολουθεί κατεργασία του αντιδρώντος μίγματος, όπως περιγράφηκε στην κλασική μέθοδο σαπωνοποίησης. Κατόπιν καθαρισμού, παραλαμβάνεται το επιθυμητό προϊόν.

Με τη μέθοδο της σαπωνοποίησης παρασκευάστηκαν δύο προϊόντα, ξεκινώντας από την ελαιοευρωπεΐνη (1)· 1) ο 11-μεθυλεστέρας του ολεοσίδη (26) και 2) ο ολεοσίδης (22).



IV.3.b.2. 11-μεθυλεστέρας του ολεοσίδη (26)



(1) (4) (26)

IV.3.b.2.1. Κλασική μέθοδος

Σύμφωνα με τη κλασσική μέθοδο σαπωνοποίησης, με πρώτη ύλη, 1 g της (1), παραλήφθηκαν 0.483 g (απόδοση 65%) του (26), με χρωματογραφία στήλης (silica flash (40-63μm)/ CH_2Cl_2/ MeOH: 95/5→50/50, $R_{f(CH2Cl2/MeOH: 8/2)}$= 0.22).

IV.3.b.2.2. Μέθοδος μικροκυμάτων

Η μέθοδος μικροκυμάτων έδωσε 0.365 g του (26) (απόδοση 48%) [176].

Λευκό στερεό προϊόν, M= 404.3659 g/ mol, $C_{17}H_{24}O_{11}$

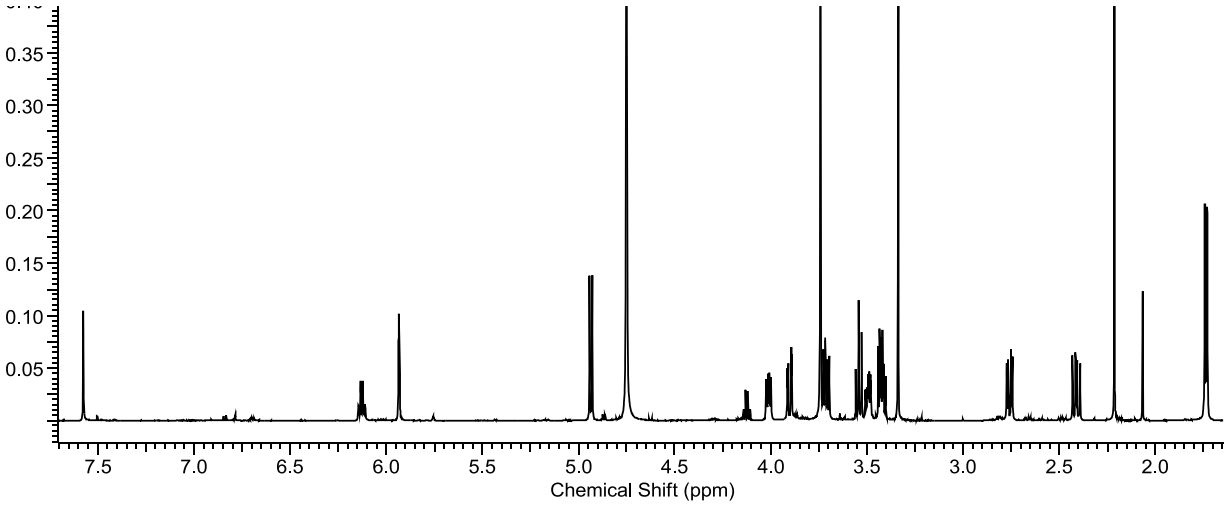
^{1}H NMR (600 MHz, D_2O): δ 7.50 (s, 1H, H_3), 6.08 (q, $J_{8,10}$=7.0Hz, 1H, H_8), 5.85 (s, 1H, H_1), 4.87 (d, $J_{1',2'}$=8.0Hz, 1H, $H_{1'}$), 3.92 (dd, $J_{5,6b}$=9.3Hz, $J_{5,6a}$=4.8Hz, 1H, H_5), 3.84 (dd, $J_{6'b,6'a}$=12.5Hz, $J_{6'b,5'}$=2.2Hz, 1H, $H_{6'b}$), 3.68 (s, 3H, H_{12}), 3.66 (dd, $J_{6'a,6'b}$=12.5Hz, $J_{6'a,5'}$=6.0Hz, 1H, $H_{6'a}$), 3.51 (t, $J_{3',2',4'}$=9.2Hz, 1H, $H_{3'}$), 3.44 (ddd, $J_{5',4'}$=9.8Hz, $J_{5',6'b}$=5.9Hz, $J_{5',6'a}$=2.1Hz, 1H, $H_{5'}$), 3.38 (t, $J_{2',3',1'}$=9.2Hz, 1H, $H_{2'}$), 3.37 (t, $J_{4',5',3'}$=9.7Hz, 1H, $H_{4'}$), 2.70 (dd, $J_{6b,6a}$=13.5Hz, $J_{6b,5}$=4.9Hz, 1H, H_{6b}), 2.32 (dd, $J_{6a,6b}$=13.5Hz, $J_{6a,5}$=9.4Hz, 1H, H_{6a}), 1.68 (d, $J_{10,8}$=7.1Hz, 3H, H_{10})

^{13}C NMR (600 MHz, D_2O): δ 177.77 (CO, C_7), 169.64 (CO, C_{11}), 154.63 (CH, C_3), 128.72 (C, C_4), 125.08 (C, C_9), 108.97 (CH, C_8), 99.91 (CH, $C_{1'}$), 95.20 (CH, C_1), 76.71 (CH, $C_{5'}$), 75.96 (CH, $C_{3'}$), 72.96 (CH, $C_{2'}$), 69.77 (CH, $C_{4'}$), 60.91 (CH_2, $C_{6'}$), 52.19 (CH_3, C_{12}), 41.63 (CH_2, C_6), 31.11 (CH, C_5), 13.15 (CH_3, C_{10})

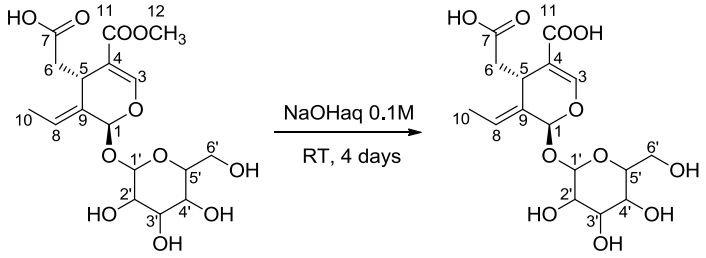
HRMS (ESI+), m/z calcd: 427.1216, found: 427.1204; ($M+Na^+$)

$[\alpha]_D^{20}$= -241 (c 0.03, MeOH)

- **^{1}H NMR**



IV.3.b.3. Ολεοσίδης (22)



(26) **(22)**

Σύμφωνα με την κλασική μέθοδο σαπωνοποίησης, 0.650 g του (22) (απόδοση 90%) παραλήφθηκαν από 0.750 g του (26) [176].

Λευκό στερεό προϊόν, κατόπιν καθαρισμού και λυοφιλοποίησης. M= 390.3393 g/ mol, $C_{16}H_{22}O_{11}$

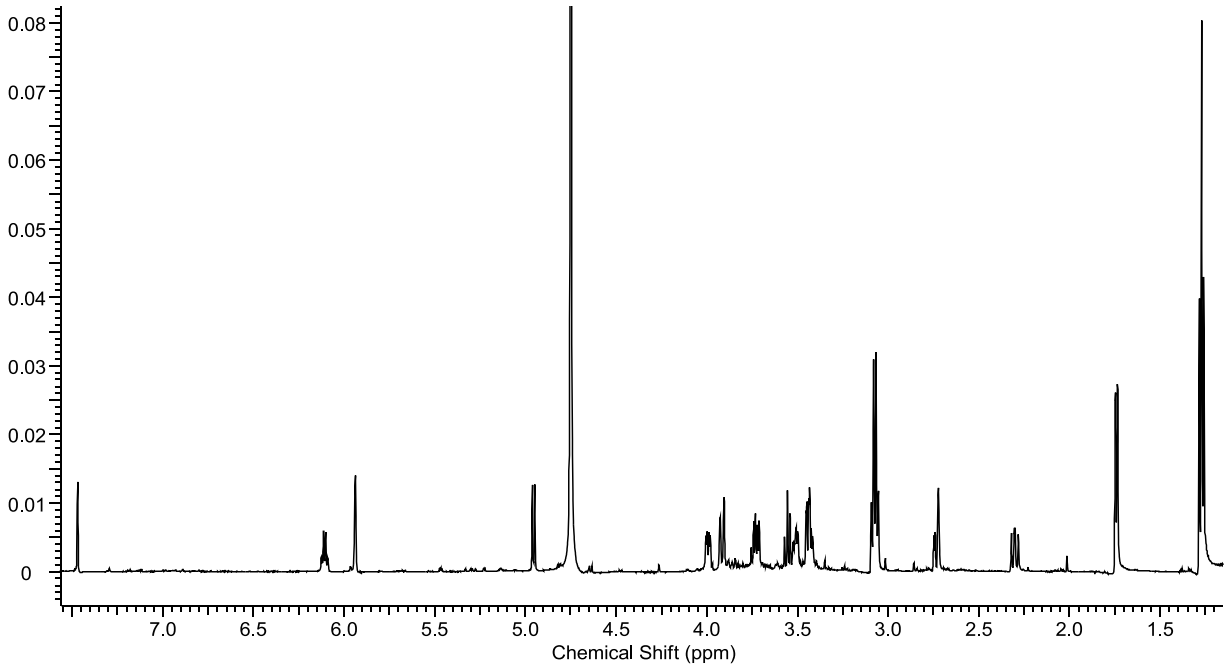
^{1}H NMR (600 MHz, D_2O): δ 7.17 (s, 1H, H_3), 6.01 (q, $J_{8,10}$= 7.0Hz, 1H, H_8), 5.85 (s, 1H, H_1), 4.89 (d, $J_{1',2'}$= 7.9Hz, 1H, $H_{1'}$), 3.93 (ddd, $J_{5',4'}$= 9.7Hz, $J_{5',6'a}$= 4.6Hz, $J_{5',6'b}$=1.9Hz, 1H, $H_{5'}$), 3.86 (dd, $J_{6'b,6'a}$= 12.4Hz, $J_{6'b,5'}$=1.9Hz, 1H, $H_{6b'}$), 3.67 (dd, $J_{6'a,6'b}$= 12.4Hz, $J_{6'a,5'}$=4.6Hz, 1H, $H_{6'a}$), 3.51 (t, $J_{2',1',3'}$= 9.4Hz, 1H, $H_{3'}$), 3.46 (dd, $J_{5,6b}$= 4.4Hz, $J_{5,6a}$= 8.8Hz, 1H, H_5), 3.38-3.40 (2xt, $J_{2',3',1'/4',5',3'}$= 9.4Hz, 2H, $H_{2',4'}$), 2.58 (dd, $J_{6b,6a}$= 14.6Hz, $J_{6b,5}$= 4.4Hz, 1H, H_{6b}), 2.06 (dd, $J_{6a,6b}$= 14.6Hz, $J_{6a,5}$= 8.8Hz, 1H, H_{6a}), 1.68 (d, $J_{10,8}$= 6.9Hz, 3H, H_{10})

^{13}C NMR (600 MHz, D_2O): δ 181.44 (CO, C_7), 169.54 (CO, C_{11}), 149.43 (CH, C_3), 129.96 (C, C_4), 123.39 (C, C_9), 115.39 (CH, C_8), 99.66 (CH, $C_{1'}$), 94.50 (CH, C_1), 76.43 (CH, $C_{5'}$), 75.71 (CH, $C_{3'}$), 72.76 (CH, $C_{2'}$), 69.55 (CH, $C_{4'}$), 60.65 (CH_2, $C_{6'}$), 43.65 (CH_2, C_6), 32.55 (CH, C_5), 12.98 (CH_3, C_{10})

HRMS (ESI+), m/z calcd: 413.1060, found: 413.1035; ($M+Na^+$)

$[\alpha]_D^{20}$ = -294 (c 0.017, MeOH)

- **^{1}H NMR**

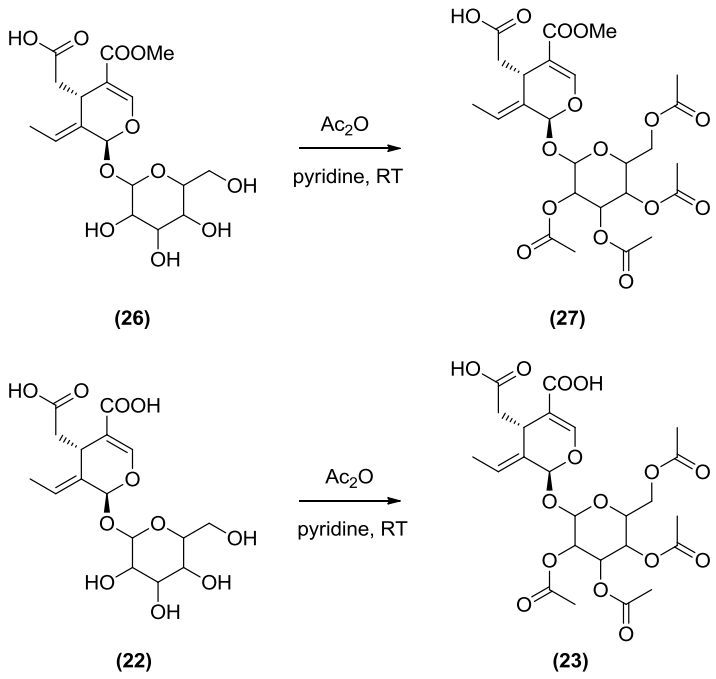


IV.3.c. *Γενική μέθοδος ακετυλίωσης*

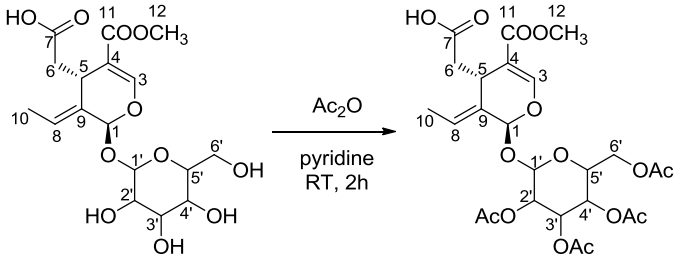
Σε 1eq του (26) ή του (22) προστίθεται πυριδίνη και το μίγμα αναδεύεται, υπό συνθήκες αργού. Στο διάλυμα προστίθενται 35eq οξικού ανυδρίτη, στους 0^oC. Μετά από ανάδευση 2 ωρών σε θερμοκρασία δωματίου, το μίγμα αραιώνεται με χλωροφόρμιο ($CHCl_3$), πλένεται με νερό στους 0^oC, και εξουδετερώνεται, με υδατικό διάλυμα HCl 1M, κατά σταγόνες, μέχρι pH= 5. Το διάλυμα εκχυλίζεται και οι δύο φάσεις, οργανική και υδατική, διαχωρίζονται. Η υδατική φάση εκχυλίζεται περαιτέρω με EtOAc. Οι οργανικές στιβάδες που συλλέγονται ξηραίνονται με άνυδρο θειϊκό νάτριο (Na_2SO_4) και συμπυκνώνονται, υπό μειωμένη πίεση. Ακολουθεί καθαρισμός του προϊόντος, με χρωματογραφία στήλης, (silica flash (40-63μm)/ CH_2Cl_2/MeOH: 99/1→9/1, $R_{f(CH2Cl2/MeOH:\ 9/1)}$= 0.56) που δίνει το επιθυμητό προϊόν, κατόπιν καθαρισμού και λυοφιλοποίησης, σε μορφή λευκού αφρού [255].

Με τη μέθοδο της ακετυλίωσης παρασκευάστηκαν δύο προϊόντα:

- ο τετραοξικός 11-μεθυλεστέρας του ολεοσίδη (27) και
- ο τετραοξικός ολεοσίδης (23)



IV.3.c.1. Τετραοξικός 11-μεθυλεστέρας του ολεοσίδη (27)



(26) **(27)**

Σύμφωνα με τη γενική μέθοδο ακετυλίωσης, 0.555 g του (27) (απόδοση 30%) παραλήφθηκαν, από 1.3 g (3.2 mmol) του (26).

Προϊόν σε μορφή λευκού αφρού. M= 572.5126 g/ mol, $C_{25}H_{32}O_{15}$

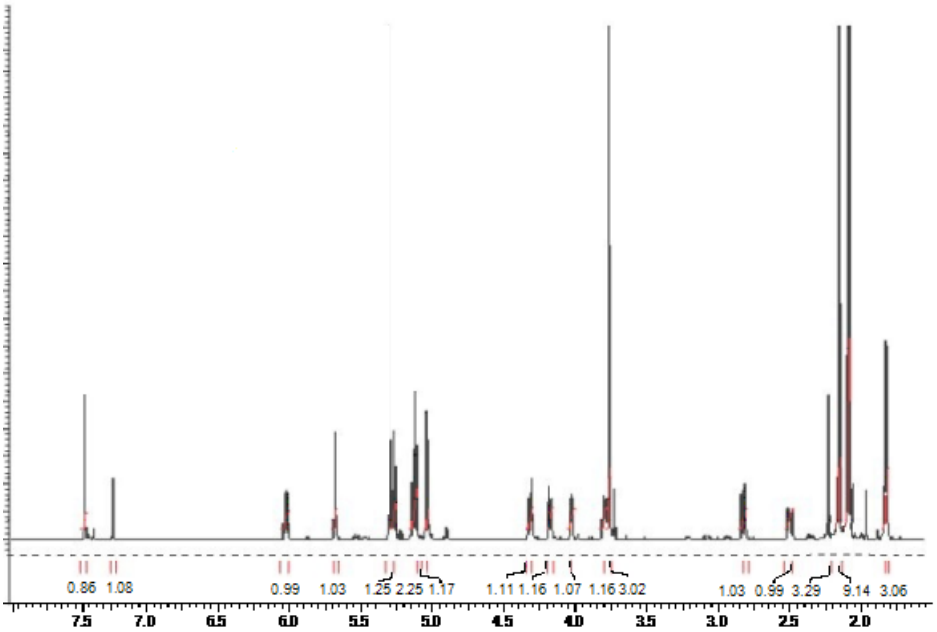
^{1}H NMR (600 MHz, $CDCl_3$): δ 7.43 (s, 1H, H_3), 6.05 (q, $J_{8,10}$=7.0Hz, 1H, H_8), 5.66 (s, 1H, H_1), 5.26 (t, $J_{2',1',3'}$=9.4Hz, 1H, $H_{2'}$), 5.08-5.14 (m, 2H, $H_{3',4'}$), 4.99 (d, $J_{1',2'}$=7.9Hz, 1H, $H_{1'}$), 4.28 (dd, $J_{6'a,6'b}$=12.4Hz, $J_{6'a,5'}$=4.6Hz, 1H, $H_{6'a}$), 4.13 (dd, $J_{6'b,6'a}$=12.4Hz, $J_{6'b,5'}$=1.9Hz, 1H, $H_{6'b}$), 3.99 (dd, $J_{5,6a}$=8.7Hz, $J_{5,6b}$=4.5Hz, 1H, H_5), 3.74-3.77 (m, 1H, $H_{5'}$), 3.72 (s, 3H, H_{12}), 2.77 (dd, $J_{6b,6a}$=14.6Hz, $J_{6b,5}$=4.4Hz, 1H, H_{6b}), 2.42 (dd, $J_{6a,6b}$=14.6Hz, $J_{6a,5}$=8.8Hz, 1H, H_{6a}), 2.08 (s, 3H, Ac), 2.01-2.03 (m, 9H, Ac), 1.74 (d, $J_{10,8}$=6.9Hz, 3H, H_{10})

^{13}C NMR (600 MHz, $CDCl_3$): δ 176.54 (CO, C_7), 171.35 (CO, C_{11}), 170.67 (CO, Ac), 169.86 (CO, Ac), 169.81 (CO, Ac), 167.25 (CO, Ac), 153.66 (CH, C_3), 128.24 (C, C_4), 125.55 (C, C_9), 108.96 (CH, C_8), 97.48 (CH, $C_{1'}$), 94.06 (CH, C_1), 72.92 (CH, $C_{5'}$), 72.66 (CH, $C_{3'}$), 71.11 (CH, $C_{2'}$), 68.62 (CH, $C_{4'}$), 62.08 (CH_2, $C_{6'}$), 51.96 (CH_3, C_{12}), 40.17 (CH_2, C_6), 30.63 (CH, C_5), 21.18 (CH_3, Ac), 21.11 (CH_3, Ac), 21.06 (CH_3, Ac), 21.03 (CH_3, Ac), 14.08 (CH_3, C_{10})

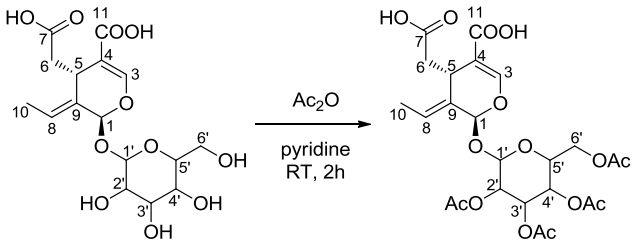
HRMS (ESI+), m/z calcd: 595.1639, found: 595.1620; ($M+Na^+$), calcd: 611.1378, found: 611.1360; ($M+K^+$)

$[\alpha]_D^{20}$= -800 (c 0.0125, MeOH)

- **^{1}H NMR**



IV.3.c.2. Τετραοξικός ολεοσίδης (23)



(22) **(23)**

Σύμφωνα με τη γενική μέθοδο ακετυλίωσης, 0.020 g του (23) (απόδοση 10%) παραλήφθηκαν, ξεκινώντας από 0.140 g (3 mmol) του (22).

Λευκό στερεό προϊόν. M= 558.4860 g/ mol, $C_{24}H_{30}O_{15}$

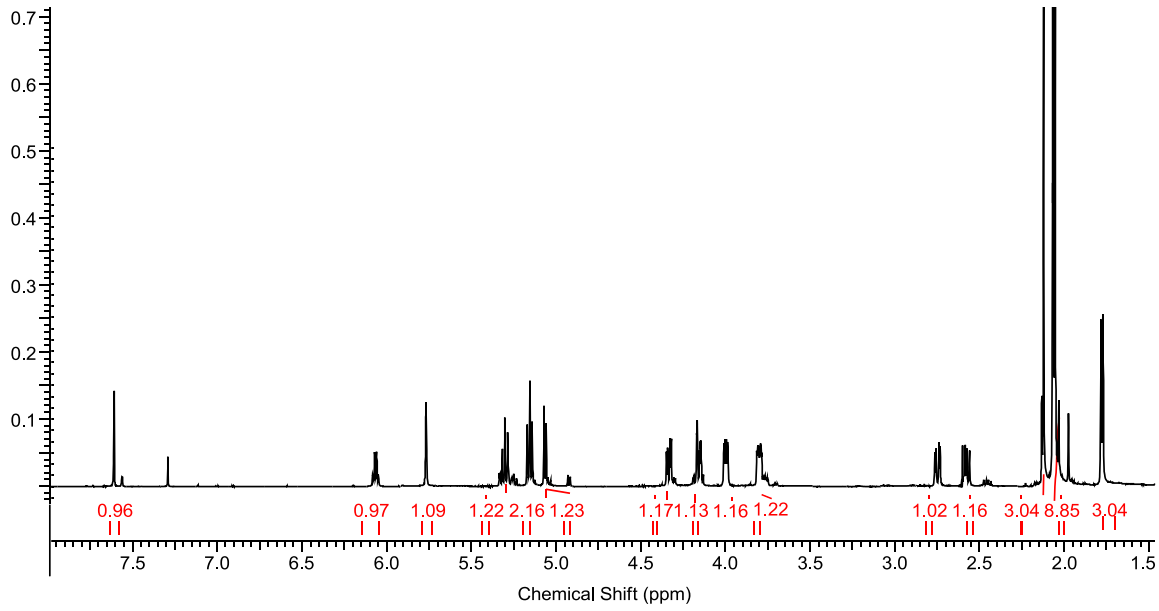
^{1}H NMR (600 MHz, $CDCl_3$): δ 7.60 (s, 1H, H_3), 6.09 (q, $J_{8,10}$=7.0Hz, 1H, H_8), 5.74 (s, 1H, H_1), 5.31 (t, $J_{3',4',2'}$=9.4Hz, 1H, $H_{3'}$), 5.15 (t, $J_{2',3',1'/4',5',3'}$=9.4Hz, 2H, $H_{2',4'}$), 5.06 (d, $J_{1',2'}$=7.9Hz, 1H, $H_{1'}$), 4.32 (dd, $J_{6'a,6'b}$=12.4Hz, $J_{6'a,5'}$=4.6Hz, 1H, $H_{6'a}$), 4.24 (dd, $J_{6'b,6'a}$=12.4Hz, $J_{6'b,5'}$=1.9Hz, 1H, $H_{6b'}$), 4.02 (ddd, $J_{5',4'}$=9.7Hz, $J_{5',6'a}$=4.6Hz, $J_{5',6'b}$=1.9Hz, 1H, $H_{5'}$), 3.78 (dd, $J_{5,6b}$=4.4Hz, $J_{5,6a}$=8.8Hz, 1H, H_5), 2.76 (dd, $J_{6b,6a}$=14.6Hz, $J_{6b,5}$=4.4Hz, 1H, H_{6b}), 2.52 (dd, $J_{6a,6b}$=14.6Hz, $J_{6a,5}$=8.8Hz, 1H, H_{6a}), 2.12 (s, 3H, Ac), 2.08 (2xs, 9H, Ac), 1.78 (d, $J_{10,8}$=6.9Hz, 3H, H_{10})

^{13}C NMR (600 MHz, $CDCl_3$): δ 173.91 (CO, C_7), 170.23 (CO, C_{11}), 170.11 (CO, Ac), 169.33 (CO, Ac), 169.29 (CO, Ac), 168.24 (CO, Ac), 154.33 (CH, C_3), 130.82 (C, C_4), 124.84 (C, C_9), 109.56 (CH, C_8), 107.51 (CH, $C_{1'}$), 104.42 (CH, C_1), 74.83 (CH, $C_{5'}$), 72.09 (CH, $C_{3'}$), 71.16 (CH, $C_{2'}$), 69.35 (CH, $C_{4'}$), 62.71 (CH_2, $C_{6'}$), 43.25 (CH_2, C_6), 25.44 (CH, C_5), 21.18 (CH_3, Ac), 21.11 (CH_3, Ac), 21.06 (CH_3, Ac), 20.75 (CH_3, Ac), 13.78 (CH_3, C_{10})

HRMS (ESI+), m/z calcd: 581.1482, found: 581.1605; ($M+Na^+$), calcd: 597.1222, found: 597.1350; ($M+K^+$)

$[\alpha]_D^{20}$ = -400 (c 0.01, MeOH)

- **^{1}H NMR**



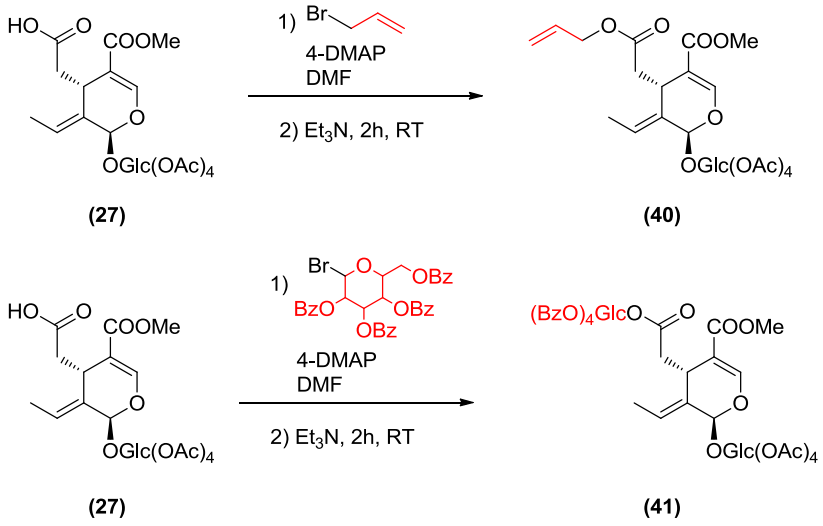
IV.3.d. *Γενικές μέθοδοι εστεροποίησης*

IV.3.d.1. Γενική μέθοδος εστεροποίησης με βρωμίδια

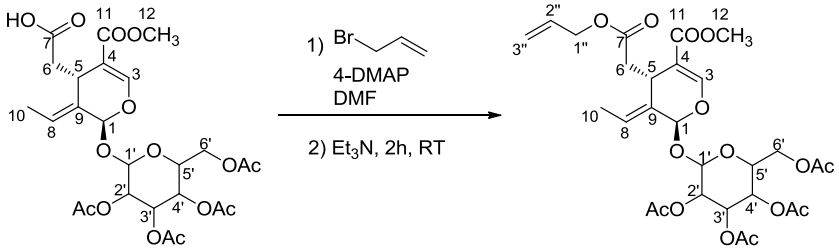
Σε 0.050 g (1 eq, 87 mmol) του (27) προστίθεται 1 eq του επιλεγμένου βρωμιδίου, μαζί με 0.08 eq της διμεθυλαμινο-πυριδίνης (DMAP) και 0.41 eq του διμεθυλο φορμαμιδίου (DMF), σε θερμοκρασία 0°C και το διάλυμα αναδεύεται. Κατόπιν, προστίθενται 1.4 eq τριαιθυλαμίνης (Et_3N), κατά σταγόνες και η ανάδευση συνεχίζεται, σε θερμοκρασία δωματίου, για 1h30min έως 2h30min. Με TLC[34], μετά το πέρας περίπου 2 ωρών, διαπιστώνεται ότι η αντίδραση έχει τελειώσει. Ακολουθεί εκχύλιση του αντιδρώντος μίγματος 2 φορές, με χλωριούχο αμμώνιο (NH_4Cl) και διχλωρομεθάνιο (CH_2Cl_2). Στην υδατική στιβάδα αποβάλλεται το DMF και η Et_3N, ενώ στην οργανική παραλαμβάνω, κατόπιν ξήρανσης με θειϊκό νάτριο (Na_2SO_4), διήθησης και εξάτμισης, το προϊόν της εστεροποίησης. Καθαρισμός του προϊόντος, με χρωματογραφία στήλης, (silica flash (40-63μm)/ c-Hex/ EtOAc: 70/30), δίνει το επιθυμητό προϊόν, σε μορφή λευκού στερεού και απαλλαγμένο από προσμίξεις [267].

Με τη μέθοδο της εστεροποίησης με βρωμίδια, παρασκευάστηκαν **2** προϊόντα:

- ο τετραοξικός 7-αλλυλεστέρας 11-μεθυλεστέρας του ολεοσίδη (40) και
- ο τετραοξικός 11-μεθυλεστέρας 7-(τετραβενζοϋλο γλυκοπυρανοζυλο) εστέρας του ολεοσίδη (41)



IV.3.d.1.1. Τετραοξικός 7-αλλυλεστέρας 11-μεθυλεστέρας του ολεοσίδη (40)



(27) **(40)**

Σύμφωνα με τη γενική μέθοδο εστεροποίησης με βρωμίδια, 0.022 g (απόδοση 42%) του (40) παραλήφθηκαν από 0.050 g του (27).

Λευκό στερεό προϊόν. M= 612.5764 g/ mol, $C_{28}H_{36}O_{15}$.

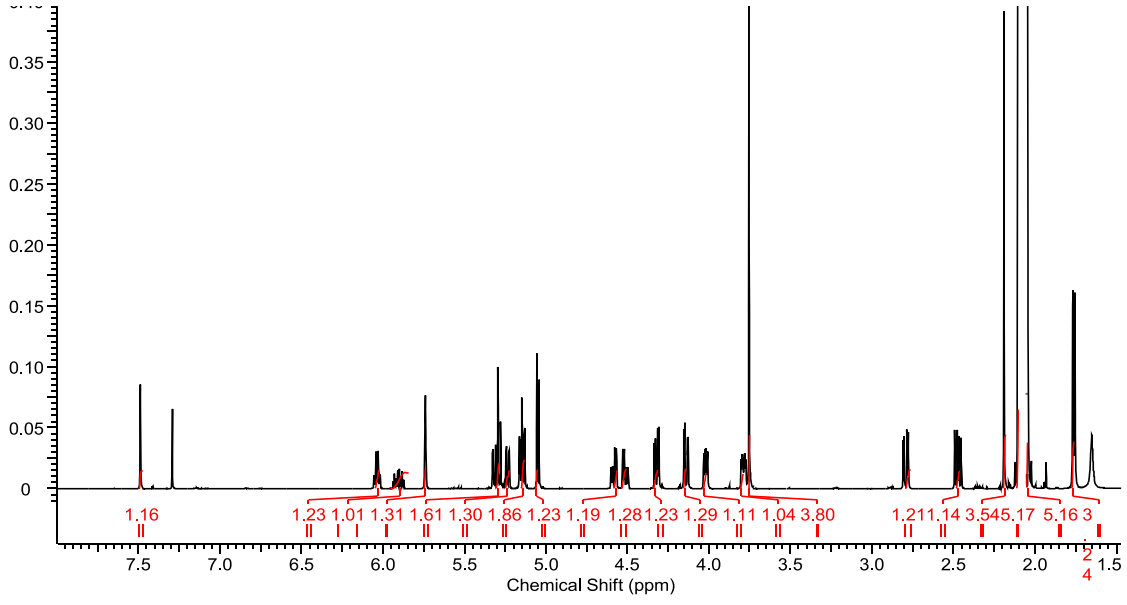
^{1}H NMR (600 MHz, $CDCl_3$): δ 7.49 (s, 1H, H_3), 6.03 (q, $J_{8,10}$=7.0Hz, 1H, H_8), 5.91 (m, 1H, $H_{2''}$), 5.74 (s, 1H, H_1), 5.29 (t, $J_{3',4',2'}$=9.4Hz, 1H, $H_{3'}$), 5.23 (dd, $J_{3''a,3''b}$= 1.2Hz, $J_{3''a,2''}$= 12.0Hz, 2H, $H_{3''}$), 5.15 (t, 2H, $H_{2',4'}$), 5.05 (d, $J_{1',2'}$=7.9Hz, 1H, $H_{1'}$), 4.58 (dd, 1H, $H_{1''a}$), 4.52 (dd, 1H, $H_{1''b}$), 4.33 (dd, $J_{6'a,6'b}$=12.3Hz, $J_{6'a,5'}$=4.7Hz, 1H, $H_{6'a}$), 4.13 (dd, $J_{6'b,6'a}$=12.4Hz, $J_{6'b,5'}$=2.4Hz, 1H, $H_{6'b}$), 4.03 (dd, $J_{5,6a}$=9.1Hz, $J_{5,6b}$=4.5Hz, 1H, H_5), 3.79 (ddd, 1H, $H_{5'}$), 3.75 (s, 3H, H_{12}), 2.79 (dd, $J_{6b,6a}$=14.4Hz, $J_{6b,5}$=4.5Hz, 1H, H_{6b}), 2.48 (dd, $J_{6a,6b}$=14.4Hz, $J_{6a,5}$=9.1Hz, 1H, H_{6a}), 2.19 (s, 3H, Ac), 2.11-2.05 (2xs, 9H, Ac), 1.77 (d, $J_{10,8}$=6.9Hz, 3H, H_{10})

^{13}C NMR (600 MHz, $CDCl_3$): δ 173.10 (CO, C_7), 170.23 (CO, C_{11}), 170.21 (CO, Ac), 170.17 (CO, Ac), 169.98 (CO, Ac), 168.55 (CO, Ac), 155.26 (CH, C_3), 132.17 (CH, $C_{2''}$), 130.72 (C, C_4), 128.01 (C, C_9), 124.83 (CH, C_8), 118.22 (CH_2, $C_{3''}$), 107.52 (CH, $C_{1'}$), 104.32 (CH, C_1), 74.85 (CH, $C_{5'}$), 72.11 (CH, $C_{3'}$), 71.17 (CH, $C_{2'}$), 69.35 (CH, $C_{4'}$), 65.90 (CH_2, $C_{1''}$), 62.71 (CH_2, $C_{6'}$), 52.35 (CH_3, C_{12}), 41.46 (CH_2, C_6), 26.05 (CH, C_5), 21.78 (CH_3, Ac), 21,67 (CH_3, Ac), 21.60 (CH_3, Ac), 21.32 (CH_3, Ac), 13.74 (CH_3, C_{10})

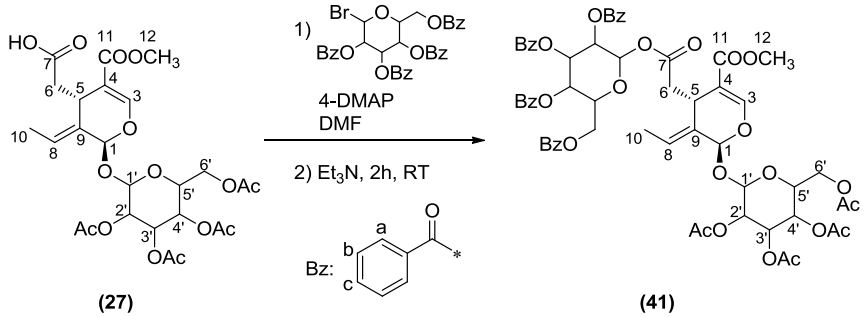
HRMS (ESI+), m/z calcd: 635.1952, found: 635.2088; ($M+Na^+$)

$[\alpha]_D^{20}$= -825 (c 0.04, MeOH)

- **^{1}H NMR**



IV.3.d.1.2. Τετραοξικός 11-μεθυλεστέρας 7-(τετραβενζοϋλο γλυκοπυρανόζυλο) εστέρας του ολεοσίδη (41)



Σύμφωνα με τη γενική μέθοδο εστεροποίησης με βρωμίδια, 0.008 g του (41) (απόδοση 8%) παραλήφθηκαν από 0.050 g του (27).

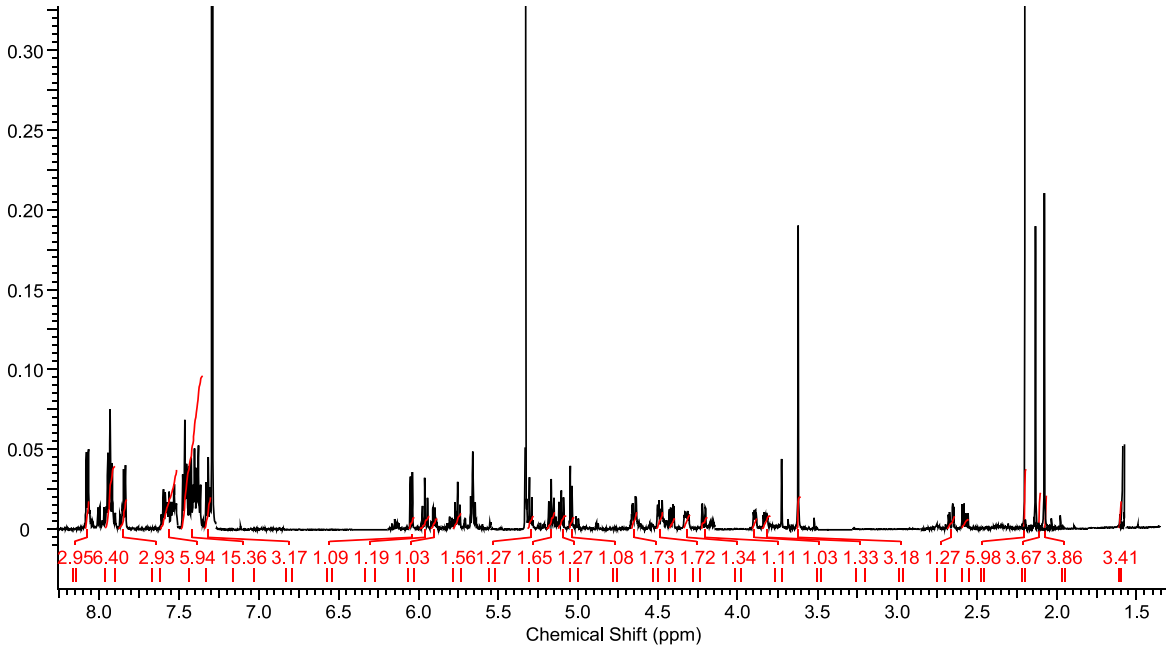
Λευκό στερεό προϊόν. M= 1150.0774 g/ mol, $C_{59}H_{58}O_{24}$.

^{1}H NMR (600 MHz, $CDCl_3$): δ 8.08 (d, 2H, H_a), 7.93 (t, 2H, H_b), 7.84 (d, 2H, H_a), 7.62-7.30 (2d, 3t, 4t, 9H, $H_{a,b,c}$), 7.47 (s, 1H, H_3), 6.05 (d, $J_{1'',2''}$= 7.7Hz, 1H, $H_{1''}$), 5.96 (t, 1H, $H_{3''}$), 5.90 (q, $J_{8,10}$=7.0Hz, 1H, H_8), 5.76 (t, 1H, $H_{2''}$), 5.66 (m, 2H, $H_{4'',1}$), 5.31 (t, $J_{3',4',2'}$=9.4Hz, 1H, $H_{3'}$), 5.17 (t, $J_{2',1',3'}$=7.9Hz, 1H, $H_{2'}$), 5.11 (t, $J_{4',3',5'}$=9.2Hz, 1H, $H_{4'}$), 5.04 (d, $J_{1',2'}$=7.9Hz, 1H, $H_{1'}$), 4.64 (dd, $J_{6''b,6''a}$= 12.3Hz, $J_{6''b,5''}$=2.4Hz, 1H, $H_{6''b}$), 4.48 (dd, $J_{6''a,6''b}$= 12.3Hz, $J_{6''a,5''}$=4.5Hz,1H, $H_{6''a}$), 4.40 (dd, $J_{6'a,6'b}$= 12.3Hz, $J_{6'a,5'}$=4.7Hz, 1H, $H_{6'a}$), 4.33 (ddd, $J_{5'',4''}$=7.7Hz, $J_{5'',6''a}$=4.5Hz, $J_{5'',6''b}$=2.4Hz, 1H, $H_{5''}$), 4.22 (dd, $J_{6'b,6'a}$=12.3Hz, $J_{6'b,5'}$=2.4Hz, 1H, $H_{6'b}$), 3.89 (ddd, $J_{5',4'}$=9.2Hz, $J_{5',6'b}$=4.4Hz, $J_{5',6'a}$=9.1Hz 1H, $H_{5'}$), 3.82 (dd, $J_{5,6a}$=9.1Hz, $J_{5,6b}$=4.4Hz, 1H, H_5), 3.62 (s, 3H, H_{12}), 2.68 (dd, $J_{6b,6a}$=12.3Hz, $J_{6b,5}$=2.5Hz,1H, H_{6b}), 2.58 (dd, $J_{6a,6b}$=12.4Hz, $J_{6a,5}$=5.0Hz, 1H, H_{6a}), 2.20-2.07 (3s, 12H, Ac), 1.89 (d, $J_{10,8}$=6.7Hz, 3H, H_{10})

HRMS (ESI+), m/z calcd: 1173.3216, found: 1173.3228; ($M+Na^+$), calcd: 1189.2955, found: 1189.2956; ($M+K^+$)

$[\alpha]_D^{20}$ = -366 (c 0.03, MeOH)

- **^{1}H NMR**

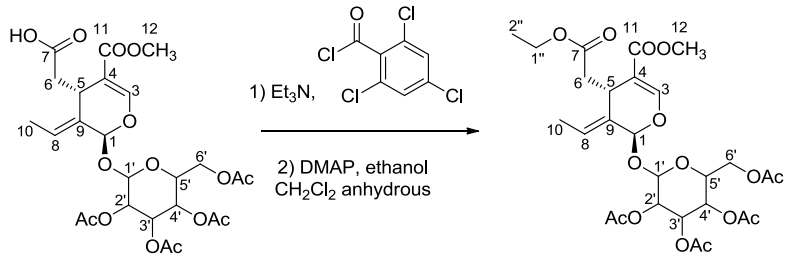


*IV.3.d.2. Προϊόντα εστεροποίησης με αλκοόλες - **Άλκυλο εστέρες** – προφίλ*

0.050 g (1eq) του (27) ή του (23) διαλύονται σε 3 mL CH_2Cl_2 υπό συνθήκες αργού. Έπειτα προστίθενται 1.2 eq του 2,4,6-τριχλωροβενζόϋλο χλωρίδιο και 1.4 eq της Et_3N, στους 0^oC, το μίγμα αναδεύεται για 2 ώρες σε συνθήκες περιβάλλοντος (RT) και το διάλυμα γίνεται πορτοκαλί. Μίγμα 1.5 eq της επιλεγμένης αλκοόλης με 1.4 eq της DMAP και το CH_2Cl_2 (3mL) προστίθεται κατά σταγόνες, στους 0^oC. Έπειτα από 2h30min ανάδευσης, στο μίγμα προστίθεται υδατικό διάλυμα χλωριούχου αμμωνίου (NH_4Cl), κατά σταγόνες, μέχρι pH= 5-6 και το μίγμα εκχυλίζεται 2 φορές με 30 mL CH_2Cl_2. Η υδατική στιβάδα εκχυλίζεται εκ νέου, 2 φορές με EtOAc, και οι οργανικές στιβάδες συλλέγονται και ξηραίνονται με Na_2SO_4. Ακολουθεί διήθηση υπό κενό, πλύση με CH_2Cl_2, εξάτμιση του διαλύτη και καθαρισμός του προϊόντος, με χρωματογραφία στήλης, (silica flash (40-63μm)/ c-Hex/ EtOAc: 8/2→ 7/3, για προϊόντα που προέκυψαν από το (27) και CH_2Cl_2/ MeOH: 98/2→ 90/10, για προϊόντα που προέκυψαν από το (23)), που δίνει τον επιθυμητό εστέρα, σε μορφή λευκού στερεού [255].

IV.3.d.2.1. Αλκυλο εστέρες τετραοξικού 11-μεθυλεστέρα του ολεοσίδη

IV.3.d.2.1.1 Τετραοξικός 7-αιθυλεστέρας 11-μεθυλεστέρας του ολεοσίδη (42)



(27) (42)

Σύμφωνα με τη γενική μέθοδο εστεροποίησης με αλκοόλες, 0.016 g (απόδοση 31%) του (42) παραλήφθηκαν από 0.050 g του (27).

Λευκό στερεό προϊόν. M= 600.5657 g/ mol, $C_{27}H_{36}O_{15}$.

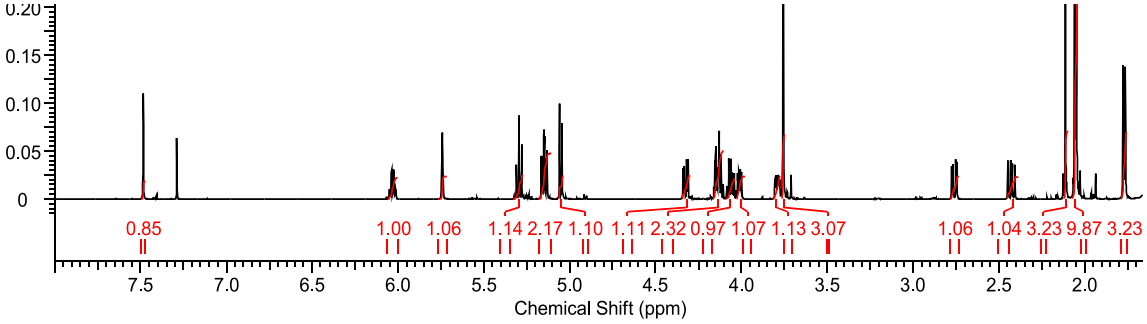
^{1}H NMR (600 MHz, $CDCl_3$): δ 7.48 (s, 1H, H_3), 6.03 (q, $J_{8,10}$=7.0Hz, 1H, H_8), 5.74 (s, 1H, H_1), 5.28 (t, $J_{3',2',4'}$=9.5Hz, 1H, $H_{3'}$), 5.08-5.14 (m, 2H, $H_{2',4'}$), 4.99 (d, $J_{1',2'}$=7.9Hz, 1H, $H_{1'}$), 4.32 (dd, $J_{6'a,6'b}$=12.4Hz, $J_{6'a,5'}$=4.8Hz, 1H, $H_{6'a}$), 4.14 (m, 2H, $H_{6'b,1''a}$), 4.06 (m, 1H, $H_{1''b}$), 3.99 (dd, $J_{5,6a}$=9.0Hz, $J_{5,6b}$=4.7Hz, 1H, H_5), 3.74-3.77 (m, 1H, $H_{5'}$), 3.72 (s, 3H, H_{12}), 2.76 (dd, $J_{6b,6a}$=14.4Hz, $J_{6b,5}$=4.50Hz, 1H, H_{6b}), 2.43 (dd, $J_{6a,6b}$=14.4Hz, $J_{6a,5}$=9.1Hz, 1H, H_{6a}), 2.08 (s, 3H, Ac), 2.01-2.03 (m, 9H, Ac), 1.74 (d, $J_{10,8}$=6.5Hz, 3H, H_{10}), 1.25 (t, 3H, $H_{2''}$)

^{13}C NMR (600 MHz, $CDCl_3$): δ 171.06 (CO, C_7), 170.54 (CO, C_{11}), 170.22 (CO, Ac), 170.17 (CO, Ac), 170.11 (CO, Ac), 169.29 (CO, Ac), 152.96 (CH, C_3), 129.01 (C, C_4), 128.02 (C, C_9), 108.73 (CH, C_8), 97.03 (CH, $C_{1'}$), 93.70 (CH, C_1), 72.45 (CH, $C_{5'}$), 72.12 (CH, $C_{3'}$), 70.65 (CH, $C_{2'}$), 68.18 (CH, $C_{4'}$), 61.72 (CH_2, $C_{6'}$), 60.46 (CH_2, $C_{1''}$), 51.38 (CH_3, C_{12}), 39.92 (CH_2, C_6), 30.17 (CH, C_5), 26.84 (CH_3, Ac), 20.88 (CH_3, Ac), 20.61 (CH_3, Ac), 20.52 (CH_3, Ac), 14.07 (CH_3, C_{10}), 13.50 (CH_3, $C_{2''}$)

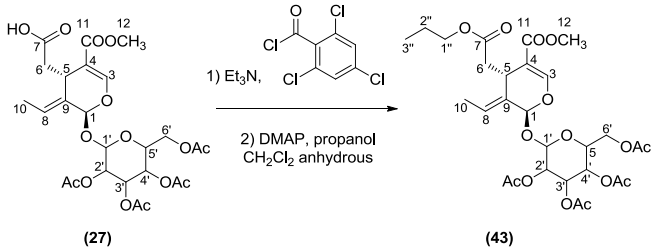
HRMS (ESI+), m/z calcd: 623.1952, found: 623.1964; ($M+Na^+$), calcd: 639.1691 found: 639.1703; ($M+K^+$)

$[\alpha]_D^{20}$ = -375 (c 0.04, MeOH)

- **^{1}H NMR**



IV.3.d.2.1.2 Τετραοξικός 11-μεθυλεστέρας 7-προπυλεστέρας του ολεοσίδη (43)



(27) (43)

Σύμφωνα με τη γενική μέθοδο εστεροποίησης με αλκοόλες, 0.018 g (απόδοση 34%) του (43) παραλήφθηκαν από 0.050 g του (27).

Λευκό στερεό προϊόν. M= 614.5923 g/ mol, $C_{28}H_{38}O_{15}$

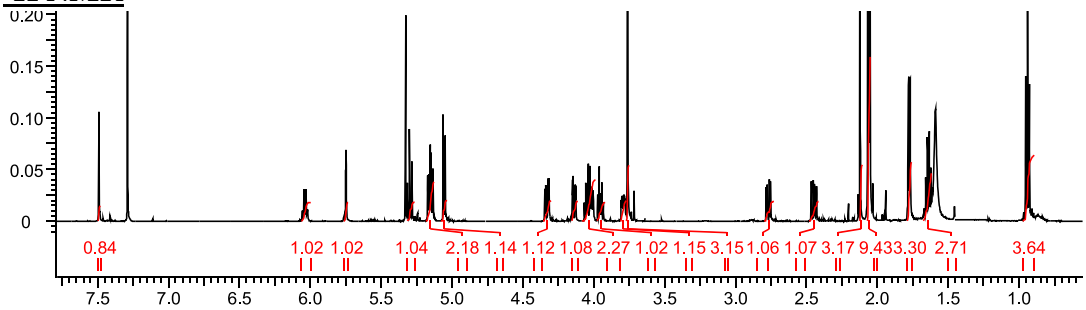
^{1}H NMR (600 MHz, $CDCl_3$): δ 7.48 (s, 1H, H_3), 6.03 (q, $J_{8,10}$=7.0 Hz, 1H, H_8), 5.74 (s, 1H, H_1), 5.30 (t, $J_{3',4',2'}$=9.4 Hz, 1H, $H_{3'}$), 5.08-5.14 (m, 2H, $H_{2',4'}$), 5.06 (d, $J_{1',2'}$=7.9 Hz, 1H, $H_{1'}$), 4.31 (dd, $J_{6'a,6'b}$=12.3 Hz, $J_{6'a,5'}$=4.7 Hz, 1H, $H_{6'a}$), 4.14 (dd, $J_{6'b,6'a}$= 12.4 Hz, $J_{6'b,5'}$=2.4 Hz, 1H, $H_{6'b}$), 4.05 (m, 1H, $H_{1''a}$), 4.01 (dd, $J_{5,6a}$=9.1 Hz, $J_{5,6b}$=4.5 Hz, 1H, H_5), 3.95 (m, 1H, $H_{1''b}$), 3.76 (ddd, 1H, $H_{5'}$), 3.72 (s, 3H, H_{12}), 2.77 (dd, $J_{6b,6a}$=14.4 Hz, $J_{6b,5}$=4.5 Hz, 1H, H_{6b}), 2.45 (dd, $J_{6a,6b}$= 14.4 Hz, $J_{6a,5}$=9.1 Hz, 1H, H_{6a}), 2.08 (s, 3H, Ac), 2.01-2.03 (m, 9H, Ac), 1.74 (d, $J_{10,8}$=6.5 Hz, 3H, H_{10}), 1.25 (m, 2H, $H_{2''}$), 0.94 (t, 3H, $H_{3''}$)

^{13}C NMR (600 MHz, $CDCl_3$): δ 173.16 (CO, C_7), 170.28 (CO, C_{11}), 170.23 (CO, Ac), 170.17 (CO, Ac), 169.91 (CO, Ac), 168.53 (CO, Ac), 155.27 (CH, C_3), 130.72 (C, C_4) 129.41 (C, C_9), 124.86 (CH, C_8), 107.40 (CH, C_1), 104.50 (CH, $C_{1'}$), 74.80 (CH, $C_{5'}$), 72.09 (CH, $C_{3'}$), 71.15 (CH, $C_{2'}$), 69.32 (CH, $C_{4'}$), 66.20 (CH_2, $C_{1''}$), 62.71 (CH_2, $C_{6'}$), 41.06 (CH_2, C_6), 52.37 (CH_3, C_{12}), 26.08 (CH, C_5), 21.93 (CH_2, $C_{2''}$), 21.19 (CH_3, Ac), 21.14 (CH_3, Ac), 21.09 (CH_3, Ac), 21.02 (CH_3, Ac), 13.76 (CH_3, C_{10}), 10.35 (CH_3, $C_{3''}$)

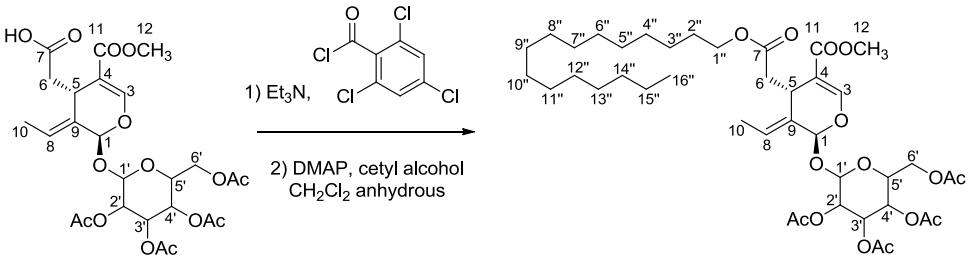
HRMS (ESI+), m/z calcd: 637.2108, found: 637.2120; ($M+Na^+$), calcd: 653.1848, found: 653.1859; ($M+K^+$)

$[\alpha]_D^{20}$= -633.3 (c 0.03, MeOH)

- **^{1}H NMR**



IV.3.d.2.1.3 Τετραοξικός 7-κετυλεστέρας 11-μεθυλεστέρας του ολεοσίδη (44)



(27) **(44)**

Σύμφωνα με τη γενική μέθοδο εστεροποίησης με αλκοόλες, 0.020 g (απόδοση 30%) του (44) παραλήφθηκαν από 0.050 g του (27).

Λευκό στερεό προϊόν. M= 796.9379 g/ mol, $C_{41}H_{64}O_{15}$.

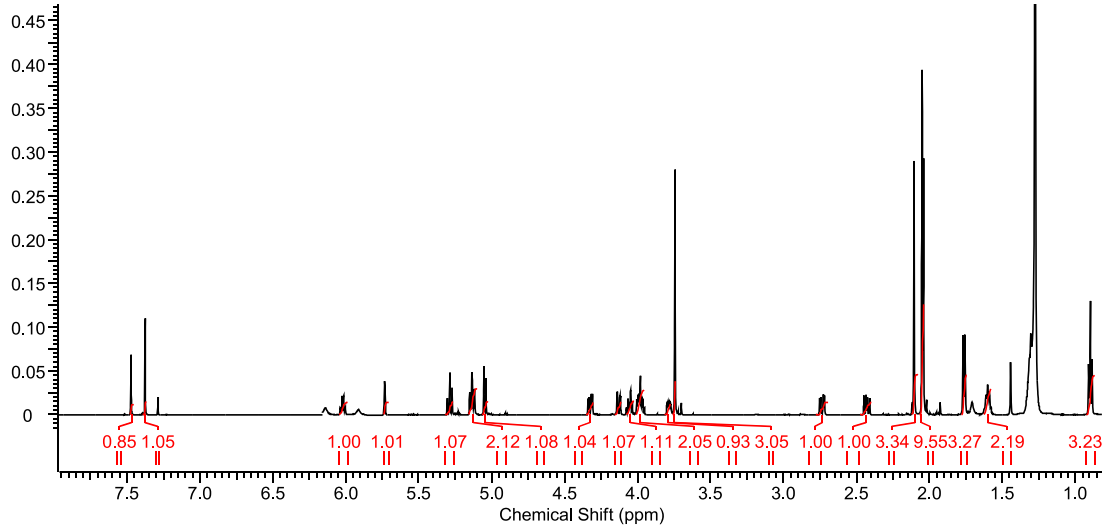
^{1}H NMR (600 MHz, $CDCl_3$): δ 7.47 (s, 1H, H_3), 6.02 (q, $J_{8,10}$=7.0Hz, 1H, H_8), 5.73 (s, 1H, H_1), 5.29 (t, $J_{3',4',2'}$= 9.4Hz, 1H, $H_{3'}$), 5.08-5.14 (m, 2H, $H_{2',4'}$), 5.05 (d, $J_{1',2'}$=7.9Hz, 1H, $H_{1'}$), 4.33 (dd, $J_{6'a,6'b}$= 12.3Hz, $J_{6'a,5'}$=4.7Hz, 1H, $H_{6'a}$), 4.13 (dd, $J_{6'b,6'a}$=12.4Hz, $J_{6'b,5'}$=2.4Hz, 1H, $H_{6b'}$), 4.05 (m, 2H, $H_{1''a,5}$), 3.98 (m, 1H, $H_{1''b}$), 3.74-3.77 (m, 1H, $H_{5'}$), 3.72 (s, 3H, H_{12}), 2.74 (dd, $J_{6b,6a}$= 14.4Hz, $J_{6b,5}$=4.5Hz, 1H, H_{6b}), 2.45 (dd, $J_{6a,6b}$=14.4Hz, $J_{6a,5}$=9.1Hz, 1H, H_{6a}), 2.08 (s, 3H, Ac), 2.01-2.03 (m, 9H, Ac), 1.76 (d, $J_{10,8}$=6.5Hz, 3H, H_{10}), 1.60 (quin, 2H, $H_{2''}$), 1.30 (s, 26H, $H_{3'',4''-15''}$), 0.90 (t, 3H, $H_{16''}$)

^{13}C NMR (600 MHz, $CDCl_3$): δ 171.17 (CO, C_7), 170.50 (CO, C_{11}), 170.10 (CO, Ac), 169.26 (CO, Ac), 169.25 (CO, Ac), 166.71 (CO, Ac), 152.94 (CH, C_3), 128.12 (C, C_4), 124.65 (C, C_9), 108.69 (CH, C_8), 97.01 (CH, C_1), 93.71 (CH, $C_{1'}$), 72.46 (CH, $C_{5'}$), 72.13 (CH, $C_{3'}$), 70.67 (CH, $C_{2'}$), 68.21 (CH, $C_{4'}$), 64.72 (CH_2, $C_{6'}$), 61.73 (CH_2, C_6), 51.34 (CH_3, C_{12}), 39.94 (CH_2, $C_{1''}$), 31.83 (CH_2, $C_{2''}$), 30.15 (CH, C_5), 29.60 (6xCH_2, Cetyl), 29.52 (CH_2, Cetyl), 29.46 (CH_2, Cetyl), 29.27 (CH_2, Cetyl), 29.19, (CH_2, Cetyl), 28.45 (CH_2, Cetyl), 26.83 (CH_2, Cetyl), 25.78 (CH_2, Cetyl), 22.60 (CH_3, Ac), 20.60 (CH_3, Ac), 20.57 (CH_3, Ac), 20.51 (CH_3, Ac), 14.02 (CH_3, C_{10}), 13.47 (CH_3, $C_{16''}$)

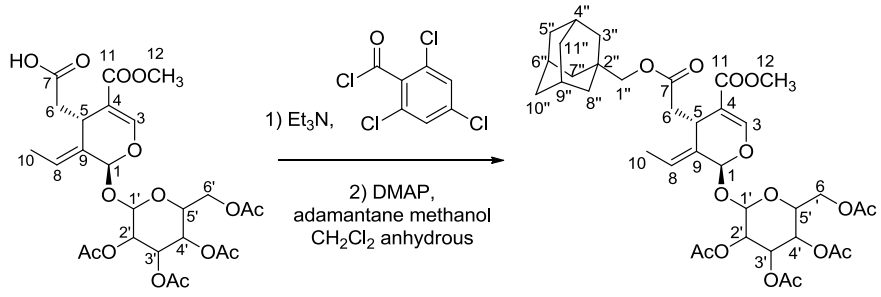
HRMS (ESI+), m/z calcd: 819.4143, found: 819.4131; ($M+Na^+$), calcd: 835.3882, found: 835.3865; ($M+K^+$)

$[\alpha]_D^{20}$ = -633.3 (c 0.03, MeOH)

- **^{1}H NMR**



IV.3.d.2.1.4 Τετραοξικός 7-(μεθυλ-αδαμαντανο) εστέρας 11-μεθυλεστέρας του ολεοσίδη (45)



(27) **(45)**

Σύμφωνα με τη γενική μέθοδο εστεροποίησης με αλκοόλες, 0.029 g (απόδοση 23%) του (45) παραλήφθηκαν από 0.100 g του (27).

Λευκό στερεό προϊόν. M= 720.7573 g/ mol, $C_{36}H_{48}O_{15}$.

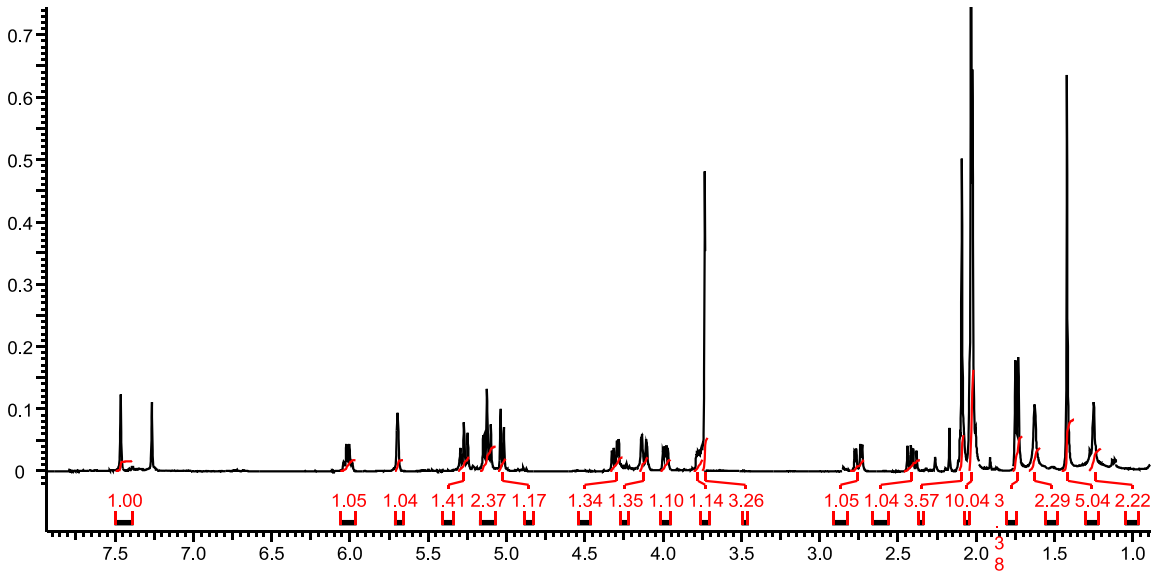
^{1}H NMR (600 MHz, $CDCl_3$): δ 7.46 (s, 1H, H_3), 6.01 (q, $J_{8,10}$=6.8Hz, 1H, H_8), 5.70 (s, 1H, H_1), 5.27 (t, $J_{3',4',2'}$=9.4Hz, 1H, $H_{3'}$), 5.12 (t, 2H, $H_{2',4'}$), 5.03 (d, $J_{1',2'}$=7.9Hz, 1H, $H_{1'}$), 4.29 (dd, $J_{6'a,6'b}$=12.3Hz, $J_{6'a,5'}$=4.8Hz, 1H, $H_{6'a}$), 4.12 (dd, $J_{6'b,6'a}$=12.3Hz, $J_{6'b,5'}$=2.4Hz, 1H, $H_{6'b}$), 3.99 (dd, $J_{5,6a}$=8.9Hz, $J_{5,6b}$=4.4Hz, 1H, H_5), 3.75-3.77 (m, 1H, $H_{5'}$), 3.75 (s, 3H, H_{12}), 3.63 (s, 2H, $H_{1''}$), 2.75 (dd, $J_{6b,6a}$=14.7Hz, $J_{6b,5}$=4.4Hz, 1H, H_{6b}), 2.41 (dd, $J_{6a,6b}$=14.7Hz, $J_{6a,5}$=9.0Hz, 1H, H_{6a}), 2.10 (m, 6H, $H_{5'',7'',10''}$), 2.02 (s, 12H, Ac), 1.74 (d, $J_{10,8}$=6.5Hz, 3H, H_{10}), 1.63 (br.s., 2H, $H_{11''}$), 1.42 (s, 5H, $H_{3'',8'',6''}$), 1.25 (m, 2H, $H_{4'',9''}$)

^{13}C NMR (600 MHz, $CDCl_3$): δ 173.10 (CO, C_7), 170.29 (CO, C_{11}), 170.25 (CO, Ac), 170.18 (CO, Ac), 170.04 (CO, Ac), 169.91 (CO, Ac), 155.26 (CH, C_3), 130.72 (C, C_4), 129.05 (C, C_9), 124.88 (CH, C_8), 107.49 (CH, C_1), 104.52 (CH, $C_{1'}$), 74.83 (CH, $C_{5'}$), 73.82 (CH_2, $C_{1''}$), 72.11 (CH, $C_{3'}$), 71.19 (CH, $C_{2'}$), 69.37 (CH, $C_{4'}$), 62.75 (CH_2, $C_{6'}$), 52.37 (CH_3, C_{12}), 41.09 (CH_2, C_6), 39.91 (3xCH_2, $C_{3'',8'',7''}$), 36.84 (3xCH_2, $C_{5'',10'',11''}$), 30.49 (CH, $C_{2''}$), 28.19 (3xCH, $C_{4'',6'',9''}$), 26.05 (CH, C_5), 21.87 (CH_3, Ac), 21.84 (CH_3, Ac), 21.60 (CH_3, Ac), 21.52 (CH_3, Ac), 13.76 (CH_3, C_{10})

HRMS (ESI+), m/z calcd: 743.2891, found: 743.2887; ($M+Na^+$)

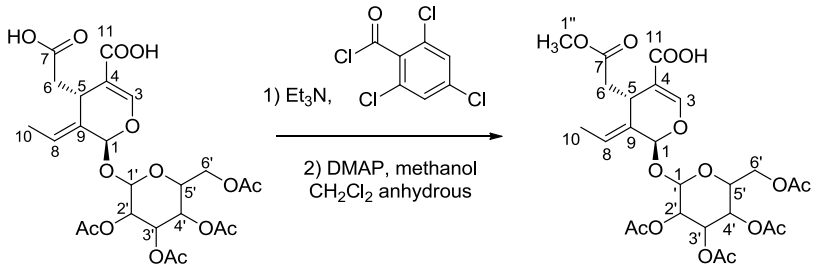
$[\alpha]_D^{20}$ = -833 (c 0.03, MeOH)

❖ **^{1}H NMR**



IV.3.d.2.2 Αλκυλο εστέρες του τετραοξικού ολεοσίδη

IV.3.d.2.2.1 Τετραοξικος 7-μεθυλεστέρας του ολεοσίδη (46)



(23) **(46)**

Σύμφωνα με τη γενική μέθοδο εστεροποίησης με αλκοόλες, παραλήφθηκαν 0.285 g (απόδοση 17%) του (46), από 1.11 g του (23).

Λευκό στερεό προϊόν. M= 572.5126 g/ mol, $C_{25}H_{32}O_{15}$.

Η δομή επιβεβαιώθηκε, επίσης, με φάσματα δύο διαστάσεων: HMBC[42] και COSY-LR[40].

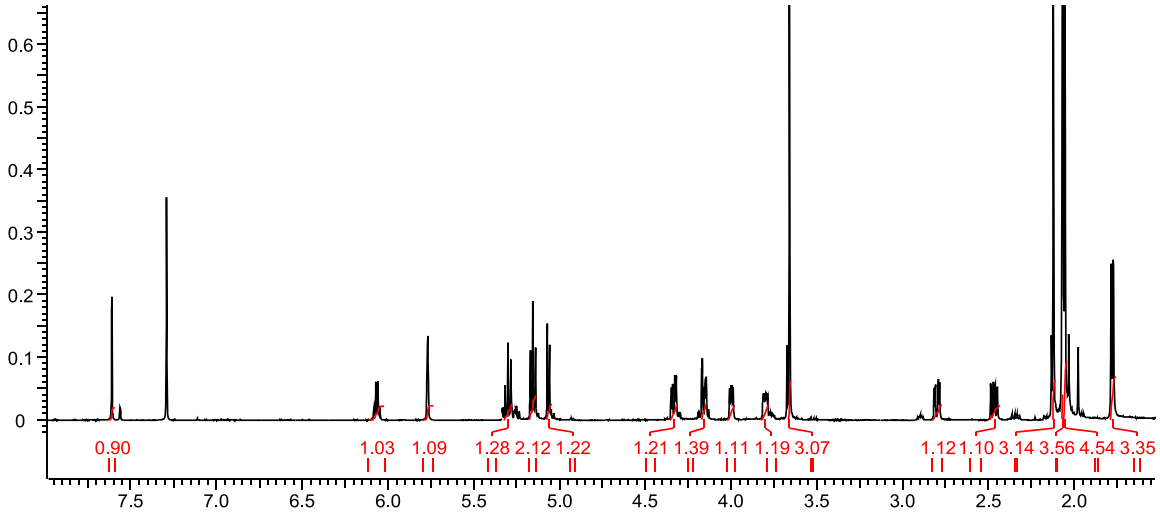
^{1}H NMR (600 MHz, $CDCl_3$): δ 7.60 (s, 1H, H_3), 6.06 (q, $J_{8,10}$=7.0Hz, 1H, H_8), 5.76 (s, 1H, H_1), 5.30 (t, $J_{2',3',1'}$=9.4Hz, 1H, $H_{2'}$), 5.15 (t, $J_{3',4',2'/4',5',3'}$=9.4Hz, 2H, $H_{3',4'}$), 5.06 (d, $J_{1',2'}$=7.9Hz, 1H, $H_{1'}$), 4.33 (dd, $J_{6'a,6'b}$=12.4Hz, $J_{6'a,5'}$=4.6Hz, 1H, $H_{6'a}$), 4.14 (dd, $J_{6'b,6'a}$=12.4Hz, $J_{6'b,5'}$=1.9Hz, 1H, $H_{6'b}$), 4.00 (ddd, $J_{5',4'}$=9.7Hz, $J_{5',6'a}$=4.6Hz, $J_{5',6'b}$=1.9Hz, 1H, $H_{5'}$), 3.78-3.81 (dd, $J_{5,6b}$=4.4Hz, $J_{5,6a}$=8.8Hz, 1H, H_5), 3.65 (s, 3H, $H_{1''}$), 2.80 (dd, $J_{6b,6a}$=14.6Hz, $J_{6b,5}$=4.4Hz, 1H, H_{6b}), 2.47 (dd, $J_{6a,6b}$=14.6Hz, $J_{6a,5}$=8.8Hz, 1H, H_{6a}), 2.13 (s, 3H, Ac), 1.97-2.06 (3xs, 9H, Ac), 1.78 (d, $J_{10,8}$=6.5Hz, 3H, H_{10})

^{13}C NMR (600 MHz, $CDCl_3$): δ 171.38 (CO, C_7), 170.21 (CO, C_{11}), 170.18 (CO, Ac), 170.14 (CO, Ac), 170.03 (CO, Ac), 169.29 (CO, Ac), 155.03 (CH, C_3), 130.80 (C, C_4), 125.16 (C, C_9), 119.55 (CH, C_8), 97.03 (CH, C_1), 93.83 (CH, $C_{1'}$), 77.26 (CH, $C_{5'}$), 72.44 (CH, $C_{3'}$), 72.18 (CH, $C_{2'}$), 70.65 (CH, $C_{4'}$), 61.72 (CH_2, $C_{6'}$), 51.55 (CH_3, $C_{1''}$), 40.78 (CH_2, C_6), 29.93 (CH, C_5), 21.12 (CH_3, Ac), 21.08 (CH_3, Ac), 20.59 (CH_3, Ac), 20.51 (CH_3, Ac), 13.45 (CH_3, C_{10})

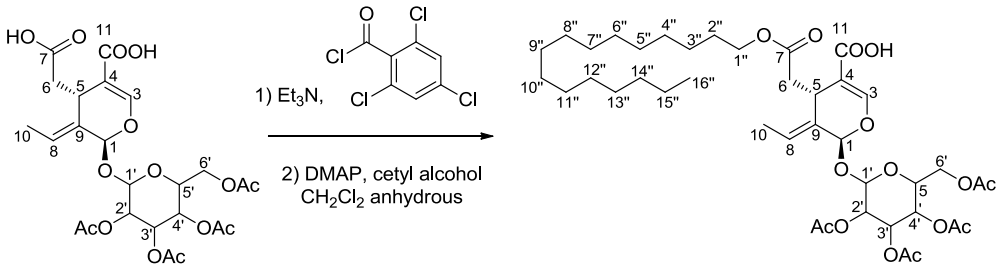
HRMS (ESI+), m/z calcd: 595.1639, found: 595.1620; ($M+Na^+$), calcd: 611.1378, found: 611.1360; ($M+K^+$)

$[\alpha]_D^{20}$= -850 (c 0.06, MeOH)

- **^{1}H NMR**



IV.3.d.2.2.2 Τετραοξικός 7-κετυλεστέρας του ολεοσίδη (47)



(23) **(47)**

Σύμφωνα με τη γενική μέθοδο εστεροποίησης με αλκοόλες, παραλήφθηκαν 0.006 g (απόδοση 30%) του (47), από 0.014 g του (23).

Λευκό στερεό προϊόν. M= 782.9113 g/ mol, $C_{40}H_{62}O_{15}$.

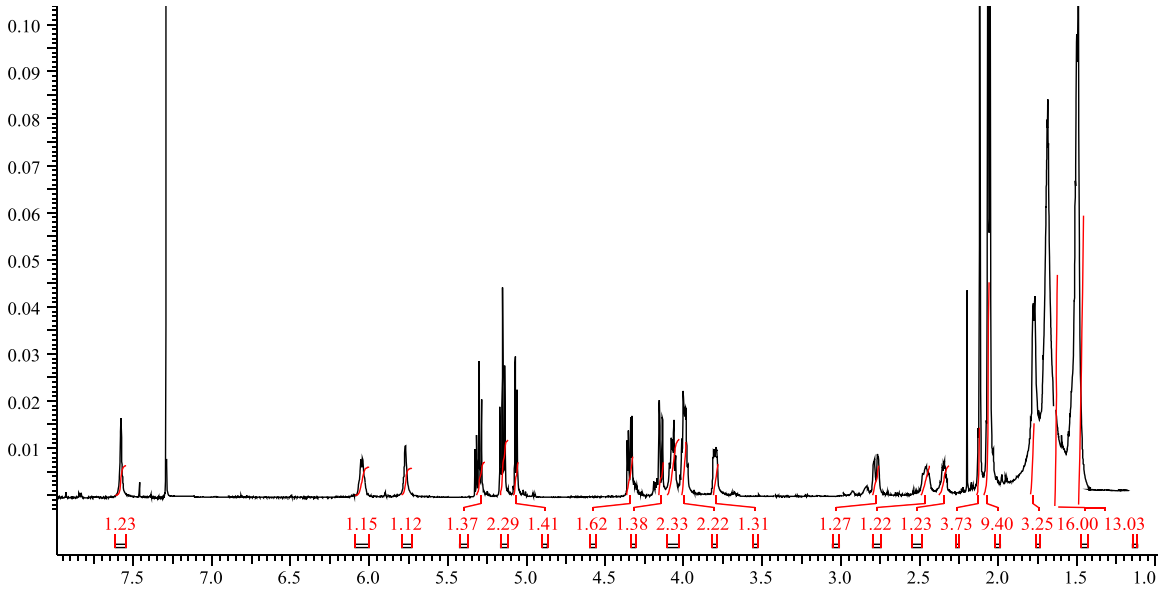
^{1}H NMR (600 MHz, $CDCl_3$): δ 7.57 (s, 1H, H_3), 6.05 (q, $J_{8,10}$=7.0Hz, 1H, H_8), 5.76 (s, 1H, H_1), 5.31 (t, $J_{3',4',2'}$=9.4Hz, 1H, $H_{3'}$), 5.16 (t, $J_{2',3',1'/4',5',3'}$=9.4Hz, 2H, $H_{2',4'}$), 5.06 (d, $J_{1',2'}$=7.9Hz, 1H, $H_{1'}$), 4.34 (dd, $J_{6'a,6'b}$=12.3Hz, $J_{6'a,5'}$=4.7Hz, 1H, $H_{6'a}$), 4.14 (dd, $J_{6'b,6'a}$=12.4Hz, $J_{6'b,5'}$=2.4Hz, 1H, $H_{6'b}$), 4.07 (m, 2H, $H_{1''a,5}$), 4.00 (m, 1H, $H_{1''b}$), 3.80 (m, 1H, $H_{5'}$), 2.77 (dd, $J_{6b,6a}$=14.4Hz, $J_{6b,5}$=4.5Hz, 1H, H_{6b}), 2.45 (dd, $J_{6a,6b}$=14.4Hz, $J_{6a,5}$=9.1Hz, 1H, H_{6a}), 2.07 (s, 3H, Ac), 2.06-1.97 (m, 9H, Ac), 1.76 (d, $J_{10,8}$=6.5Hz, 3H, H_{10}), 1.62 (quin, 2H, $H_{2''}$), 1.30 (s, 26H, $H_{3'',4''-15''}$), 0.88 (t, 3H, $H_{16''}$)

^{13}C NMR (600 MHz, $CDCl_3$): δ 173.17 (CO, C_7), 170.50 (CO, C_{11}), 170.20 (CO, Ac), 169.86 (CO, Ac), 169.25 (CO, Ac), 168.71 (CO, Ac), 153.94 (CH, C_3), 129.12 (C, C_4), 128.69 (C, C_9), 124.85 (CH, C_8), 104.51 (CH, C_1), 101.43 (CH, $C_{1'}$), 74.82 (CH, $C_{5'}$), 72.13 (CH, $C_{3'}$), 71.17 (CH, $C_{2'}$), 69.31 (CH, $C_{4'}$), 65.24 (CH_2, $C_{1''}$), 62.72 (CH_2, $C_{6'}$), 41.73 (CH_2, C_6), 37.85 (CH, C_5), 29.60 (8xCH_2, Cetyl), 29.37 (2xCH_2, $C_{4'',13''}$), 28.93 (CH_2, $C_{2''}$), 28.45 (CH_2, $C_{14''}$), 25.88 (CH_2, $C_{3''}$), 22.83 (CH_2, $C_{15''}$), 21.98 (CH_3, Ac), 21.64 (CH_3, Ac), 21.27 (CH_3, Ac), 20.71 (CH_3, Ac), 14.17 (CH_3, $C_{16''}$), 13.72 (CH_3, C_{10})

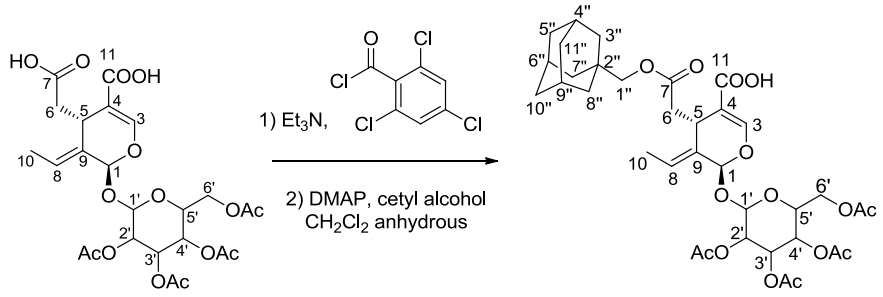
HRMS (ESI+), m/z calcd: 805.3986, found: 805.4159; ($M+Na^+$), calcd: 821.3726, found: 821.3892; ($M+K^+$)

$[\alpha]_D^{20}$ = -250 (c 0.06, MeOH)

❖ **^{1}H NMR**



IV.3.d.2.2.3 Τετραοξικός 7-(μεθυλ-αδαμαντανο) εστέρας του ολεοσίδη (48)



(23) **(48)**

Σύμφωνα με τη γενική μέθοδο εστεροποίησης με αλκοόλες, παραλήφθηκαν 0.005 g (απόδοση 26%) του (48) από 0.015 g του (23).

Λευκό στερό προϊόν. M= 706.7307 g/ mol, $C_{35}H_{46}O_{15}$.

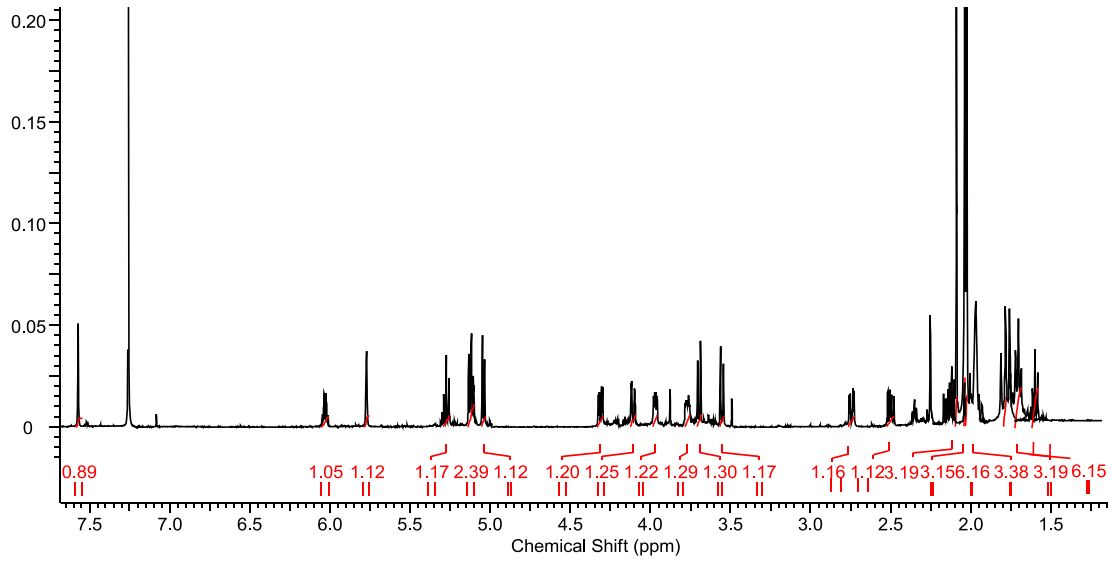
^{1}H NMR (600 MHz, $CDCl_3$): δ 7.57 (s, 1H, H_3), 6.03 (q, $J_{8,10}$=7.2 Hz, 1H, H_8), 5.77 (s, 1H, H_1), 5.27 (t, $J_{3',4',2'}$= 9.3 Hz, 1H, $H_{3'}$), 5.12 (2xt, $J_{2',3',1'/4',5',3'}$= 10.0 Hz, 2H, $H_{2',4'}$), 5.04 (d, $J_{1',2'}$= 7.9 Hz, 1H, $H_{1'}$), 4.31 (dd, $J_{6'a,6'b}$= 12.4 Hz, $J_{6'a,5'}$= 4.9 Hz, 1H, $H_{6'a}$), 4.11 (dd, $J_{6'b,6'a}$= 12.4 Hz, $J_{6'b,5'}$= 2.2 Hz, 1H, $H_{6'b}$), 3.97 (m, 1H, H_5), 3.77 (ddd, $J_{5',4'}$= 10.0 Hz, $J_{5',6'a}$= 4.7 Hz, $J_{5',6'b}$= 2.4 Hz, 1H, $H_{5'}$), 3.70 (d, $J_{1''a,1''b}$= 10.7 Hz, 1H, $H_{1''a}$), 3.55 (d, $J_{1''b,1''a}$= 10.2 Hz, 1H, $H_{1''b}$), 2.74 (dd, $J_{6b,6a}$= 14.6 Hz, $J_{6b,5}$= 4.3 Hz, 1H, H_{6b}), 2.50 (dd, $J_{6a,6b}$= 14.6 Hz, $J_{6a,5}$= 8.7 Hz, 1H, H_{6a}), 2.15 (m, 3H, $H_{4'',6'',8''}$), 2.09 (s, 3H, Ac), 2.04 (2xs, 6H, Ac), 2.03 (s, 3H, Ac), 1.76 (d, $J_{10,8}$= 7.1 Hz, 3H, H_{10}), 1.71 (m, 6H, $H_{3'',9'',10''}$), 1.64 (m, 6H, $H_{5'',7'',11''}$)

^{13}C NMR (600 MHz, $CDCl_3$): δ 171.41 (CO, C_7), 170.64 (CO, OAc), 170.17 (CO, Ac), 169.33 (2xCO, Ac), 168.94 (CO, C_{11}), 154.47 (CH, C_3), 128.03 (C, C_9), 125.14 (CH, C_8), 107.56 (C, C_4), 96.93 (CH, $C_{1'}$), 93.87 (CH, C_1), 72.40 (CH_2, $C_{1''}$), 71.93 (CH, $C_{3'}$), 71.71 (CH, $C_{5'}$), 70.09 (CH, $C_{4'}$), 67.75 (CH, $C_{2'}$), 61.84 (CH_2, $C_{6'}$), 40.02 (3xCH_2, $C_{3'',9'',10''}$), 39.71 (CH_2, C_6), 36.65 (3xCH_2, $C_{5'',7'',11''}$), 30.15 (C, $C_{2''}$), 29.97 (CH, C_5), 28.05 (3xCH, $C_{4'',6'',8''}$), 20.28 (4xCH_3, Ac), 13.03 (CH_3, C_{10})

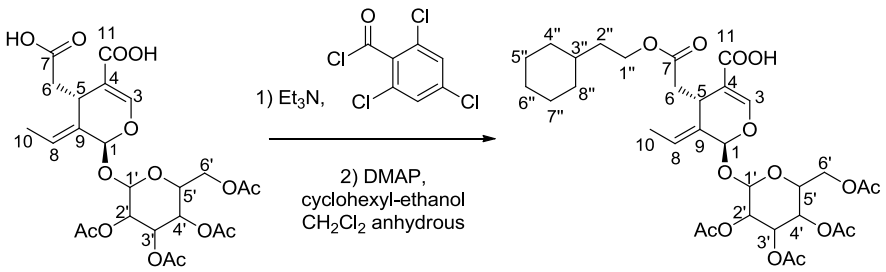
HRMS (ESI+), m/z calcd: 729.2734, found: 729.2714; ($M+Na^+$)

$[\alpha]_D^{20}$= -59.32 (c 0.118, $CHCl_3$)

- **^{1}H NMR**



IV.3.d.2.2.4 Τετραοξικός 7-(κυκλοεξυλ-αιθυλ) εστέρας του ολεοσίδη (49)



(23) **(49)**

Σύμφωνα με τη γενική μέθοδο εστεροποίησης με αλκοόλες, παραλήφθηκαν 0.025 g (απόδοση 60%) του (49) από 0.035 g του (23).

Λευκό στερεό προϊόν. M= 668.6828 g/ mol, $C_{32}H_{44}O_{15}$.

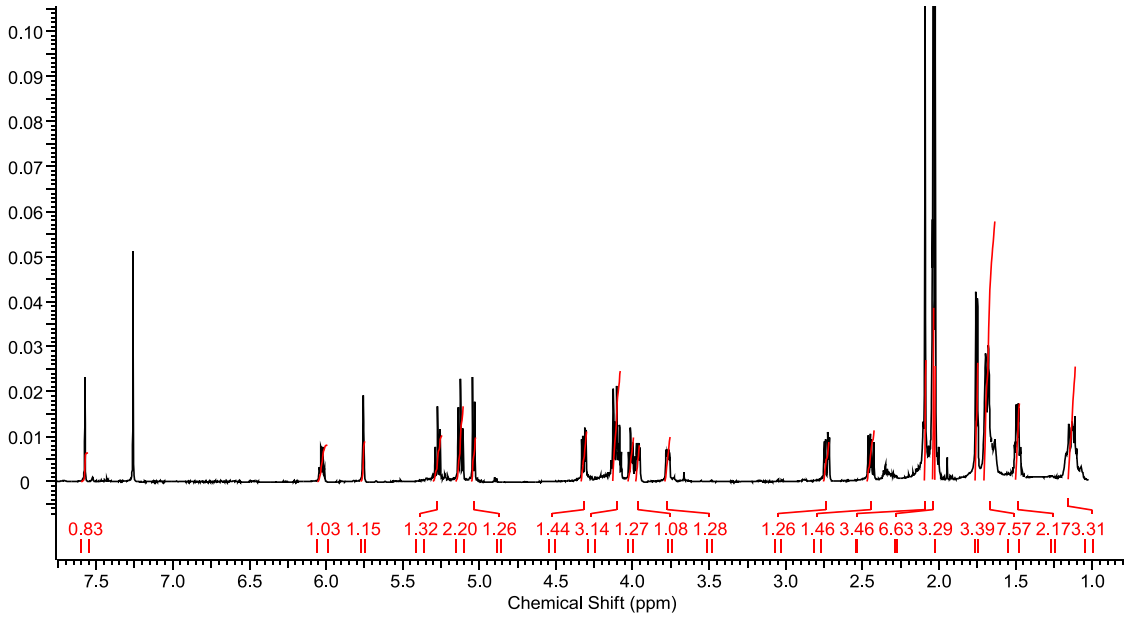
^{1}H NMR (600 MHz, $CDCl_3$): 7.57 (s, 1H, H_3), 6.03 (q, $J_{8,10}$= 7.0 Hz, 1H, H_8), 5.76 (s, 1H, H_1), 5.27 (t, $J_{3',2',4'}$= 9.2 Hz, 1H, $H_{3'}$), 5.12 (2xt, $J_{2',1',3'/4',3',5'}$= 8.6 Hz, 2H, $H_{2',4'}$), 5.04 (d, $J_{1',2'}$= 8.0 Hz, 1H, $H_{1'}$), 4.32 (dd, $J_{6'a,6'b}$= 12.3 Hz, $J_{6'a,5'}$= 4.8 Hz, 1H, $H_{6'a}$), 4.13-4.10 (m, 2H, $H_{1''}$), 4.09 (m, 1H, $H_{6'b}$), 4.01 (m, 1H, $H_{6'b}$), 3.96 (m, 1H, H_5), 3.77 (m, 1H, $H_{5'}$), 2.73 (dd, $J_{6b,6a}$= 14.4 Hz, $J_{6b,5}$= 4.3 Hz, 1H, H_{6b}), 2.44 (dd, $J_{6a,6b}$= 14.5 Hz, $J_{6a,5}$= 8.9 Hz, 1H, H_{6a}), 2.09 (s, 3H, Ac), 2.04 (2xs, 6H, Ac), 2.02 (s, 3H, Ac), 1.75 (d, $J_{10,8}$= 7.4 Hz, 3H, H_{10}), 1.70-1.63 (m, 7H, $H_{5''-7'',4''a}$), 1.49 (m, 2H, $H_{2''}$), 1.27 (m, 3H, $H_{8'',4''b}$)

^{13}C NMR (600 MHz, $CDCl_3$): δ 171.22 (CO, C_7), 170.76 (CO, C_{11}), 170.16 (CO, Ac), 169.41 (3xCO, Ac), 154.90 (CH, C_3), 127.91 (C, C_9), 125.10 (CH, C_8), 107.84 (C, C_4), 93.96 (CH, C_1), 97.09 (CH_2, $C_{1'}$), 72.27 (CH, $C_{5'}$), 72.59 (CH, $C_{3'}$), 70.67 (CH, $C_{2'}$), 68.27 (CH, $C_{4'}$), 62.98 (CH_2, $C_{1''}$), 61.82 (CH_2, $C_{6'}$), 39.97 (CH_2, C_6), 36.00 (CH_2, $C_{2''}$), 34.58 (C, $C_{3''}$), 33.09 (2xCH_2, $C_{4'',8''}$), 30.01 (CH, C_5), 26.52 (2xCH_2, $C_{5'',6''}$), 26.02 (CH_2, $C_{7''}$), 20.59 (4xCH_3, Ac), 13.49 (CH_3, C_{10})

HRMS (ESI-), m/z calcd: 667.2602, found: 667.2585; (M-H)

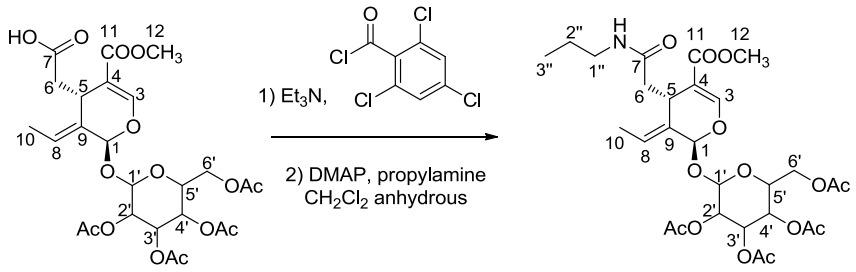
$[\alpha]_D^{20}$= -64.05 (c 0.281, $CHCl_3$)

❖ **^{1}H NMR**



*IV.3.d.3. Προϊόντα εστεροποίησης με αμίνες - **Αμίδιο** – προφίλ*

IV.3.d.3.1. Τετραοξικός 11-μεθυλεστέρας 7-προπυλαμίδιο του ολεοσίδη (50)



(27) **(50)**

Σύμφωνα με τη γενική μέθοδο εστεροποίησης με αμίνες, παραλήφθηκαν 0.045 g (απόδοση 90%) του (50), από 0.030 g του (27).

Κίτρινο στερεό προϊόν. M= 613.6076 g/ mol, $C_{28}H_{39}NO_{14}$.

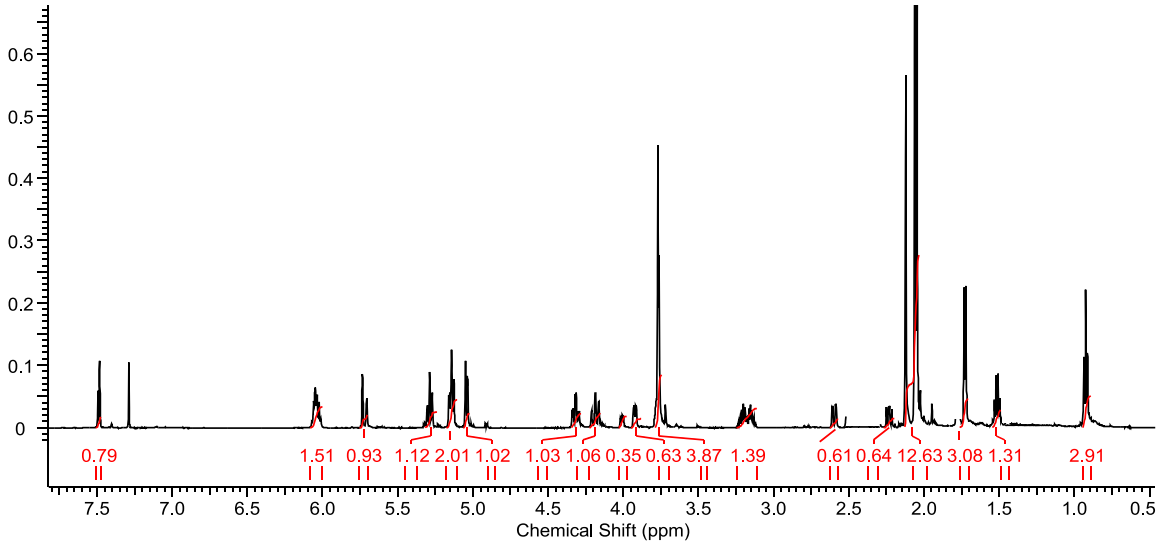
^{1}H NMR (600 MHz, $CDCl_3$): δ 7.49 (s, 1H, H_3), 6.05 (q, $J_{8,10}$=7.0Hz, 1H, H_8), 5.73 (s, 1H, H_1), 5.29 (t, $J_{3',4',2'}$=9.4Hz, 1H, $H_{3'}$), 5.14 (t, $J_{2',3',1'/4',5',3'}$=9.2Hz, 2H, $H_{2',4'}$), 5.04 (d, $J_{1',2'}$=7.9Hz, 1H, $H_{1'}$), 4.33 (dd, $J_{6'a,6'b}$=12.3Hz, $J_{6'a,5'}$=4.7Hz, 1H, $H_{6'a}$), 4.18 (dd, $J_{6'b,6'a}$=12.4Hz, $J_{6'b,5'}$=2.4Hz, 1H, $H_{6'b}$), 4.01 (ddd, $J_{5',4'}$=9.0Hz, $J_{5',6'a}$=4.7Hz, $J_{5',6'b}$=2.4Hz, 1H, $H_{5'}$), 3.92 (dd, $J_{5,6a}$=9.1Hz, $J_{5,6b}$=4.5Hz, 1H, H_5), 3.77 (s, 3H, H_{12}), 3.21 (m, 1H, $H_{1''a}$), 3.15 (m, 1H, $H_{1''b}$), 2.60 (dd, $J_{6b,6a}$=14.4Hz, $J_{6b,5}$=4.5Hz, 1H, H_{6b}), 2.23 (dd, $J_{6a,6b}$=14.4Hz, $J_{6a,5}$=9.1Hz, 1H, H_{6a}), 2.12 (s, 3H, Ac), 2.06-2.05 (2xs, 9H, Ac), 1.75 (d, $J_{10,8}$=6.5Hz, 3H, H_{10}), 1.51 (m, 2H, $H_{2''}$), 0.93 (t, 3H, $H_{3''}$)

^{13}C NMR (600 MHz, $CDCl_3$): δ 173.36 (CO, C_7), 170.31 (CO, C_{11}), 170.25 (CO, Ac), 170.19 (CO, Ac), 169.93 (CO, Ac), 168.53 (CO, Ac), 155.32 (CH, C_3), 130.82 (C, C_4), 124.87 (C, C_9), 109.42 (CH, C_8), 107.05 (CH, C_1), 104.55 (CH, $C_{1'}$), 74.91 (CH, $C_{5'}$), 72.11 (CH, $C_{3'}$), 71.19 (CH, $C_{2'}$), 69.41 (CH, $C_{4'}$), 62.74 (CH_2, $C_{6'}$), 52.37 (CH_3, C_{12}), 42.50 (CH_2, $C_{1''}$), 39.46 (CH_2, C_6), 26.68 (CH, C_5), 23.13 (CH_2, $C_{2''}$), 21.09 (CH_3, Ac), 21.04 (CH_3, Ac), 21.07 (CH_3, Ac), 20.75 (CH_3, Ac), 13.76 (CH_3, C_{10}), 11.25 (CH_3, $C_{3''}$)

HRMS (ESI+), m/z calcd: 636.2268, found: 636.2250; ($M+Na^+$), calcd: 652.2008, found: 653.2017; ($M+K^+$)

$[\alpha]_D^{20}$ = -630 (c 0.03, MeOH)

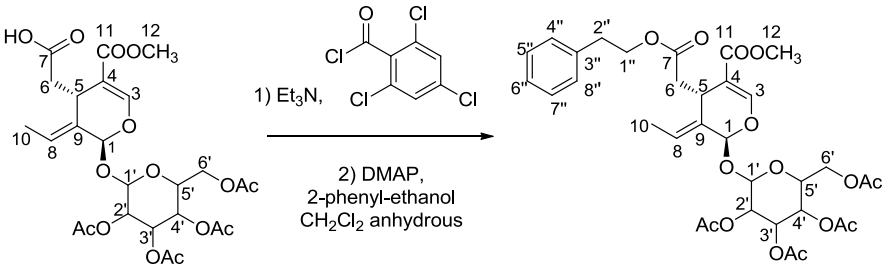
❖ **^{1}H NMR**



*IV.3.d.4. Προϊόντα εστεροποίησης με αλκοόλες - **Αρυλο εστέρες** – προφίλ*

*IV.3.d.4.1. **Αρυλο εστέρες** του 11-μεθυλεστέρα του ολεοσίδη*

IV.3.d.4.1.1. Τετραοξικός 11-μεθυλεστέρας 7-φαινυλαιθυλεστέρας του ολεοσίδη (51)



(27) **(51)**

Σύμφωνα με τη γενική μέθοδο εστεροποίησης με αλκοόλες, 0.041 g (απόδοση 50%) του (51) παραλήφθηκαν από 0.070 g του (27).

Λευκό στερεό προϊόν. M= 676.6617 g/ mol, $C_{33}H_{40}O_{15}$.

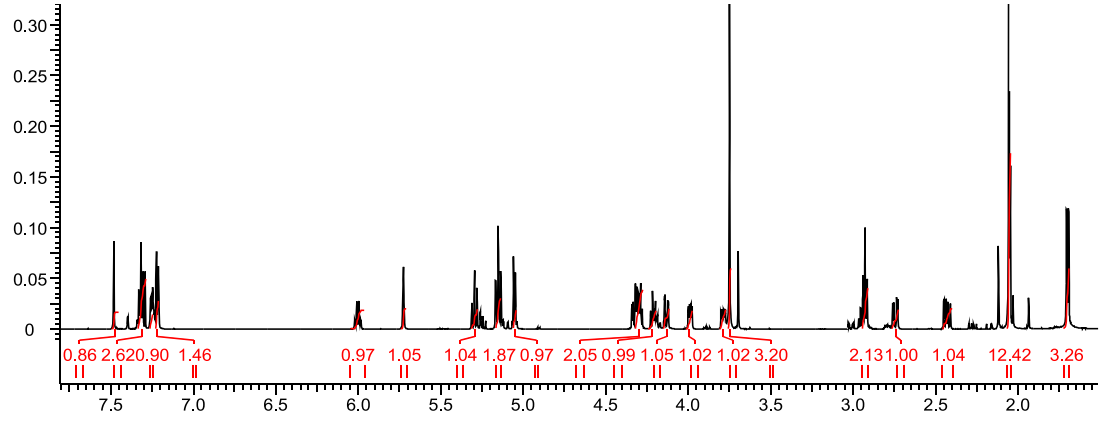
^{1}H NMR (600 MHz, $CDCl_3$): 7.48 (s, 1H, H_3), 7.31 (dd, $J_{4'',5''/8'',7''}$=8Hz, $J_{4'',6''/8'',6''}$= 1.5Hz, 2H, $H_{4'',8''}$), 7.26 (t, $J_{5'',4'',6''/7'',8'',6''}$= 8Hz, 2H, $H_{5'',7''}$), 7.23 (dd, $J_{6'',5''}$= 8Hz, $J_{6'',4''}$= 2Hz, 1H, $H_{6''}$), 6.00 (q, $J_{8,10}$=7.0Hz, 1H, H_8), 5.72 (s, 1H, H_1), 5.29 (t, $J_{3',4',2'}$=9.4Hz, 1H, $H_{2'}$), 5.16 (t, 2H, $H_{3',4'}$), 5.05 (d, $J_{1',2'}$=7.9Hz, 1H, $H_{1'}$), 4.27-4.34 (m, 1H, $H_{1''b}$), 4.22 (m, 2H, $H_{1''a,5'}$), 4.13 (dd, $J_{6'b,6'a}$=12.3Hz, $J_{6'b,5'}$=2.4Hz, 1H, $H_{6'b}$), 3.99 (dd, $J_{6'a,6'b}$=12.4Hz, $J_{6'a,5'}$=4.7Hz, 1H, $H_{6'a}$), 3.79 (dd, $J_{5,6b}$=3.8Hz, $J_{5,6a}$=9.1Hz, 1H, H_5), 3.78 (s, 3H, H_{12}), 2.93 (t, 2H, $H_{2''}$), 2.78 (dd, $J_{6b,6a}$=14.4Hz, $J_{6b,5}$=3.8Hz, 1H, H_{6b}), 2.42 (dd, $J_{6a,6b}$=14.4Hz, $J_{6a,5}$=9.1Hz, 1H, H_{6a}), 2.08 (s, 3H, Ac), 2.02-2.04 (2xs, 6H, Ac), 1.93 (s, 3H, Ac), 1.70 (d, $J_{10,8}$=6.5Hz, 3H, H_{10})

^{13}C NMR (600 MHz, $CDCl_3$): δ 170.97 (CO, C_7), 170.49 (CO, C_{11}), 170.08 (CO, Ac), 169.30 (CO, Ac), 169.25 (CO, Ac), 166.67 (CO, Ac), 152.96 (CH, C_3), 137.62 (C, $C_{3''}$), 128.80 (2C, $C_{4'',8''}$), 128.44 (2C, $C_{5'',7''}$), 127.98 (C, C_4), 126.50 (C, C_9), 124.78 (C, $C_{6''}$), 108.69 (CH, C_8), 97.00 (CH, C_1), 93.67 (CH, $C_{1'}$), 72.46 (CH, $C_{5'}$), 72.16 (CH, $C_{3'}$), 70.67 (CH, $C_{2'}$), 70.53 (CH, $C_{4'}$), 68.16 (CH_2, $C_{1''}$), 65.04 (CH_2, $C_{6'}$), 61.65 (CH_2, C_6), 51.35 (CH_3, C_{12}), 39.87 (CH_2, $C_{2''}$), 34.96 (CH, C_5), 30.14 (CH_3, Ac), 26.83 (CH_3, Ac), 20.56 (CH_3, Ac), 20.51 (CH_3, Ac), 13.40 (CH_3, C_{10})

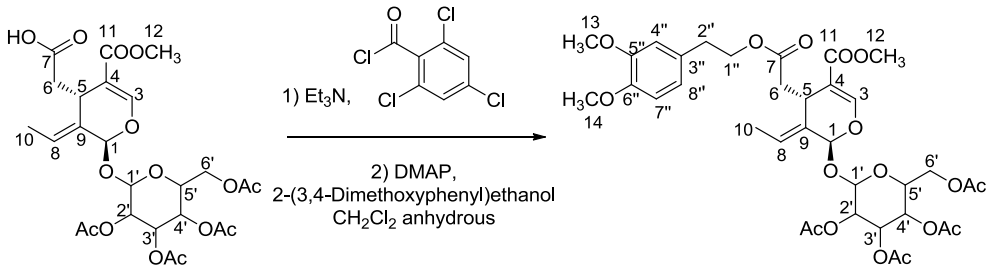
HRMS (ESI+), m/z calcd: 699.2265, found: 699.2226; ($M+Na^+$), calcd: 715.2004, found: 715.1957; ($M+K^+$)

$[\alpha]_D^{20}$ = -160 (c 0.05, MeOH)

❖ **^{1}H NMR**



IV.3.d.4.1.2. Τετραοξικός λουσιδουμοσίδης D (52)



(27) **(52)**

Σύμφωνα με τη γενική μέθοδο εστεροποίησης με αλκοόλες, 0.052 g (απόδοση 58%) του (52) παραλήφθηκαν από 0.070 g του (27).

Λευκοκίτρινο στερεό προϊόν. M= 736.7137 g/ mol, $C_{35}H_{44}O_{17}$.

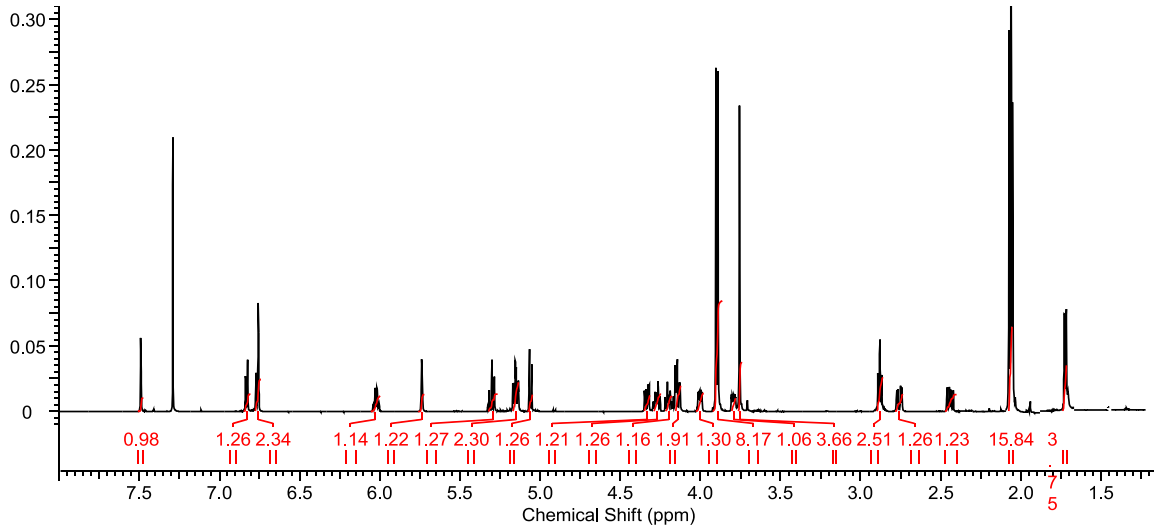
^{1}H NMR (600 MHz, $CDCl_3$): δ 7.48 (s, 1H, H_3), 6.83 (d, $J_{7'',8''}$=8Hz, 1H, $H_{7''}$), 6.77 (dd, $J_{8'',7''}$= 8Hz, $J_{8'',4''}$=1.7Hz, 1H, $H_{8''}$), 6.75 (d, $J_{4'',8''}$=1.7Hz, 1H, $H_{4''}$), 6.02 (q, $J_{8,10}$=7.0Hz, 1H, H_8), 5.73 (s, 1H, H_1), 5.30 (t, $J_{3',4',2'}$=9.4Hz, 1H, $H_{2'}$), 5.16 (2xt, 2H, $H_{3',4'}$), 5.13 (d, $J_{1',2'}$=7.9Hz, 1H, $H_{1'}$), 4.33 (dd, $J_{6'b,6'a}$= 12.3Hz, $J_{6'b,5'}$=2.4Hz, 1H, $H_{6'b}$), 4.27 (m, 1H, $H_{1''b}$), 4.19 (m, 1H, $H_{1''a}$), 4.15 (dd, $J_{6'a,6'b}$=12.4Hz, $J_{6'a,5'}$=4.7Hz, 1H, $H_{6'a}$), 4.01 (ddd, $J_{5',4'}$=9.7Hz, $J_{5',6'b}$=2.4Hz, $J_{5',6'a}$=4.7Hz, 1H, $H_{5'}$), 3.80 (dd, $J_{5,6b}$=4.4Hz, $J_{5,6a}$=9.1Hz 1H, H_5), 3.85 (2xs, 2x3H, $H_{13,14}$), 3.78 (s, 3H, C_{12}), 2.88 (t, 2H, $H_{2''}$), 2.78 (dd, $J_{6b,6a}$=14.4Hz, $J_{6b,5}$=4.4Hz, 1H, H_{6b}), 2.42 (dd, $J_{6a,6b}$=14.4Hz, $J_{6a,5}$=9.1Hz, 1H, H_{6a}), 2.05-2.07 (3xs, 9H, Ac), 1.71 (d, $J_{10,8}$=6.5Hz, 3H, H_{10}), 1.28 (s, 3H, Ac)

^{13}C NMR (600 MHz, $CDCl_3$): δ 206.80 (CO, C_7), 170.98 (CO, C_{11}) 170.49 (CO, Ac), 170.08 (CO, Ac), 169.25 (CO, Ac), 166.67 (CO, Ac), 152.96 (CH, C_3), 148.88 (C, $C_{5''}$), 147.73 (C, $C_{6''}$), 130.10 (C, $C_{3''}$), 128.05 (CH, $C_{4''}$), 124.74 (CH, $C_{8''}$), 120.80 (CH, $C_{7''}$), 112.12 (C, C_4), 111.30 (C, C_9), 108.68 (CH, C_8), 97.00 (CH, C_1), 93.66 (CH, $C_{1'}$), 72.45 (CH, $C_{5'}$), 72.15 (CH, $C_{3'}$), 70.67 (CH, $C_{2'}$), 70.53 (CH, $C_{4'}$), 68.18 (CH_2, $C_{1''}$), 65.21 (CH_2, $C_{6'}$), 61.66 (CH_3, C_{13}), 60.30 (CH_3, C_{14}), 55.80 (CH_2, C_6), 51.35 (CH_3, C_{12}), 39.92 (CH_2, $C_{2''}$), 34.57 (CH, C_5), 30.82 (CH_3, Ac), 30.15 (CH_3, Ac), 26.84 (CH_3, Ac), 20.51 (CH_3, Ac), 13.41 (CH_3, C_{10})

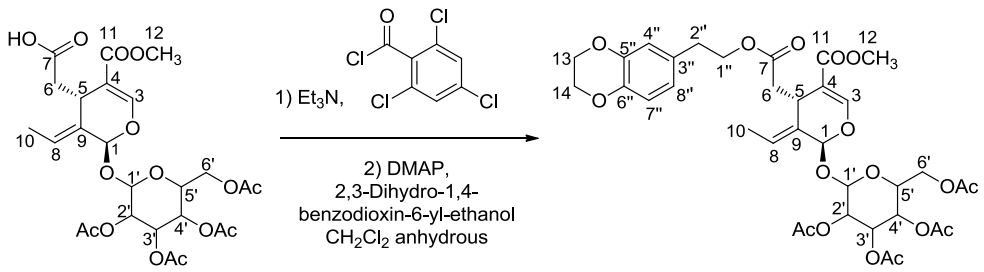
HRMS (ESI+), m/z calcd: 759.2476, found: 759.2435; ($M+Na^+$), calcd: 775.2216, found: 775.2170; ($M+K^+$)

$[\alpha]_D^{20}$= -60 (c 0.05, MeOH)

❖ **^{1}H NMR**



IV.3.d.4.1.3. Τετραοξικός 7-(1, 4-βενζοδιοξαν) αιθυλεστέρας 11-μεθυλεστέρας του ολεοσίδη (53)



(27) **(53)**

Σύμφωνα με τη γενική μέθοδο εστεροποίησης με αλκοόλες, 0.042 g (απόδοση 46%) του (53) παραλήφθηκαν από 0.070 g του (27).

Λευκό στερεό προϊόν. M= 734.6978 g/ mol, $C_{35}H_{42}O_{17}$.

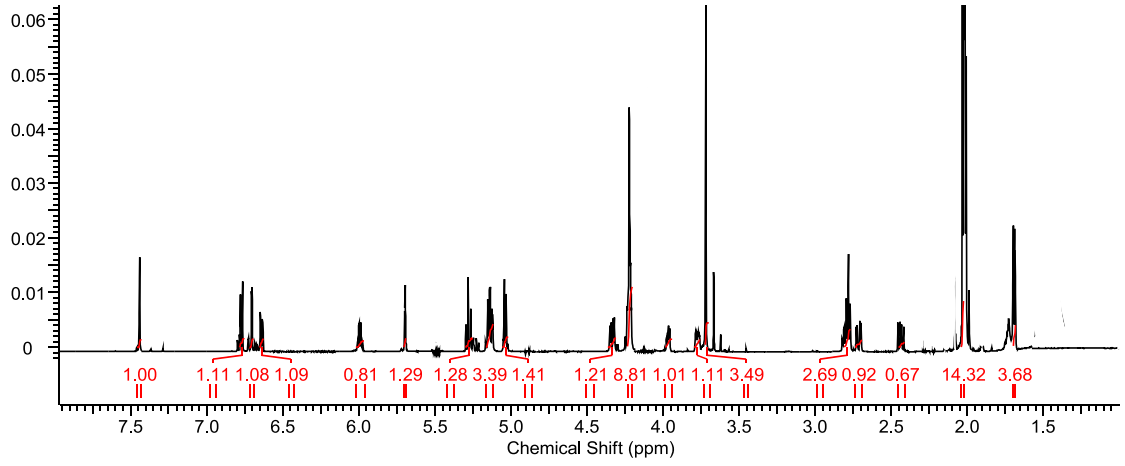
^{1}H NMR (600 MHz, $CDCl_3$): 7.44 (s, 1H, H_3), 6.77 (d, $J_{7'',8''}$=8Hz, 1H, $H_{7''}$), 6.70 (d, $J_{4'',8''}$=1.7Hz, 1H, $H_{4''}$), 6.64 (dd, $J_{8'',7''}$= 8Hz, $J_{8'',4''}$=1.7Hz, 1H, $H_{8''}$), 5.99 (q, $J_{8,10}$=7.0Hz, 1H, H_8), 5.69 (s, 1H, H_1), 5.28 (t, $J_{3',4',2'}$=9.4Hz, 1H, $H_{3'}$), 5.13 (2xt, 2H, $H_{2',4'}$), 5.04 (d, $J_{1',2'}$=7.9Hz, 1H, $H_{1'}$), 4.33 (dd, $J_{6'b,6'a}$= 12.3Hz, $J_{6'b,5'}$=2.4Hz, 1H, $H_{6'b}$), 4.12-4.10 (2t, 4H, $H_{13,14}$), 4.09 (t, 2H, $H_{1''}$), 3.99 (dd, $J_{6'a,6'b}$= 12.1Hz, $J_{6'a,5'}$=5.1Hz, 1H, $H_{6'a}$), 3.77 (ddd, $J_{5',4'}$=9.2Hz, $J_{5'6'a}$=5.1Hz, $J_{5',6'b}$=2.4Hz, 1H, $H_{5'}$), 3.72 (s, 3H, C_{12}), 3.70 (dd, $J_{5,6b}$=4.4Hz, $J_{5,6a}$=9.1Hz. 1H, H_5), 2.77 (t, 2H, $H_{2''}$), 2.71 (dd, $J_{6b,6a}$=14.4Hz, $J_{6b,5}$=4.5Hz, 1H, H_{6b}), 2.43 (dd, $J_{6a,6b}$=14.4Hz, $J_{6a,5}$=9.0Hz, 1H, H_{6a}), 2.03-2.01 (3xs, 9H, Ac), 1.90 (s, 3H, Ac), 1.69 (d, $J_{10,8}$=6.5Hz, 3H, H_{10})

^{13}C NMR (600 MHz, $CDCl_3$): 170.70 (CO, C_7) 170.25 (CO, C_{11}), 169.85 (CO, Ac), 169.09 (CO, Ac), 168.99 (CO, Ac), 166.51 (CO, Ac), 152.88 (CH, C_3), 143.30 (C, $C_{5''}$), 142.17 (C, $C_{6''}$), 130.79 (C, $C_{3''}$), 128.09 (CH, $C_{4''}$), 124.56 (CH, $C_{8''}$), 121.62 (CH, $C_{7''}$), 117.36 (C, C_4), 117.05 (C, C_9), 108.58 (CH, C_8), 97.04 (CH, C_1), 93.71 (CH, $C_{1'}$), 72.51 (CH, $C_{5'}$), 72.17 (CH, $C_{3'}$), 70.69 (CH, $C_{2'}$), 70.52 (CH, $C_{4'}$), 68.13 (CH_2, $C_{1''}$), 65.08 (CH_2, $C_{6'}$), 64.18 (CH_3, C_{12}), 61.53 (CH_2, C_{13}), 60.10 (CH_2, C_{14}), 51.04 (CH_2, C_6), 39.68 (CH_2, $C_{2''}$), 34.20 (CH, C_5), 30.19 (CH_3, Ac), 26.84 (2xCH_3, Ac), 20.56 (CH_3, Ac), 13.89 (CH_3, C_{10})

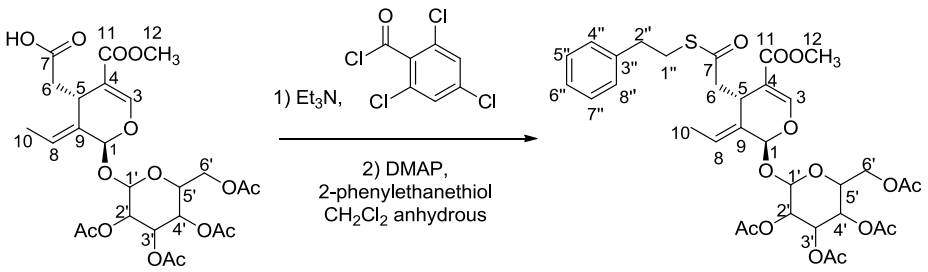
HRMS (ESI+), m/z calcd: 757.2320, found: 757.2271; ($M+Na^+$), calcd: 773.2059, found: 773.2078; ($M+K^+$)

$[\alpha]_D^{20}$= -140 (c 0.05, MeOH)

❖ **^{1}H NMR**



IV.3.d.4.1.4. Τετραοξικός 11-μεθυλεστέρας 7-φαιναιθυλο θειοεστέρας του ολεοσίδη (54)



(27) **(54)**

Σύμφωνα με τη γενική μέθοδο εστεροποίησης με θειόλες, 0.042 g (απόδοση 70%) του (54) παραλήφθηκαν από 0.050 g του (27).

Κίτρινο στερεό προϊόν. M= 692.7273 g/ mol, $C_{33}H_{40}O_{14}S$.

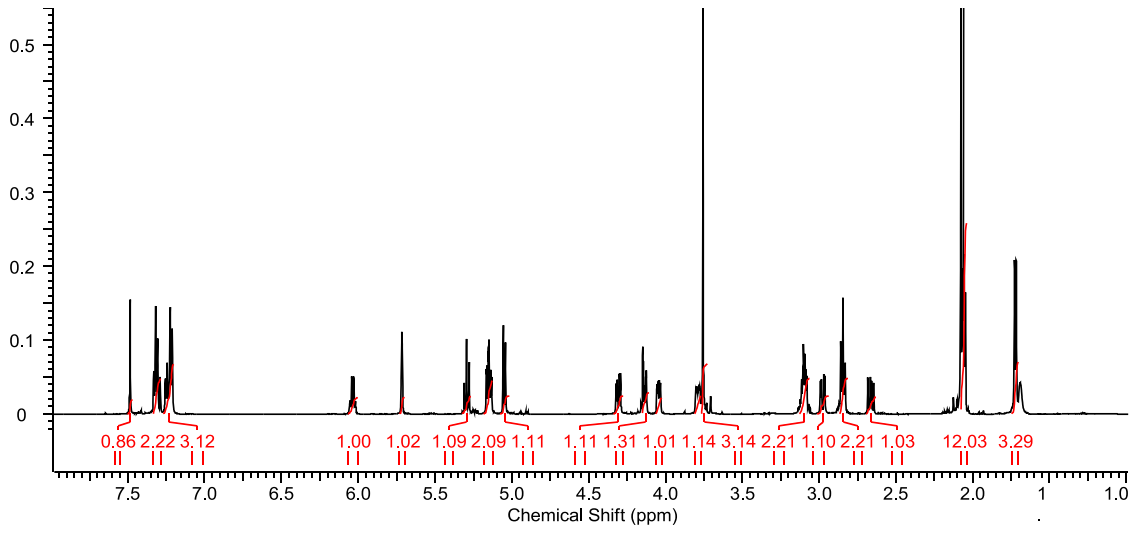
^{1}H NMR (600 MHz, $CDCl_3$): 7.49 (s, 1H, H_3), 7.32 (dd, $J_{4'',5''/8'',7''}$=8Hz, $J_{4'',6''/8'',6''}$= 1.5Hz, 2H, $H_{4'',8''}$), 7.24 (m, 3H, $H_{5'',6'',7''}$), 6.03 (q, $J_{8,10}$=7.0Hz, 1H, H_8), 5.72 (s, 1H, H_1), 5.29 (t, $J_{3',4',2'}$=9.4Hz, 1H, $H_{3'}$), 5.15 (t, 2H, $H_{2',4'}$), 5.05 (d, $J_{1',2'}$=7.9Hz, 1H, $H_{1'}$), 4.31 (dd, $J_{6'a,6'b}$=12.3Hz, $J_{6'a,5'}$=4.7Hz, 1H, $H_{6'a}$), 4.13 (dd, $J_{6'b,6'a}$=12.3Hz, $J_{6'b,5'}$=2.4Hz, 1H, $H_{6'b}$), 4.04 (dd, $J_{5,6a}$=9.1Hz, $J_{5,6b}$=3.8Hz, 1H, H_5), 3.79 (ddd, 1H, $H_{5'}$), 3.76 (s, 3H, H_{12}), 3.10 (td, 2H, $H_{2''}$), 2.98 (dd, $J_{6b,6a}$=14.4Hz, $J_{6b,5}$=3.8Hz, 1H, H_{6b}), 2.85 (m, 2H, $H_{1''}$), 2.66 (dd, $J_{6a,6b}$=14.4Hz, $J_{6a,5}$=9.1Hz, 1H, H_{6a}), 2.08 (s, 3H, Ac), 2.06-2.05 (3xs, 9H, Ac), 1.72 (d, $J_{10,8}$=6.5Hz, 3H, H_{10})

^{13}C NMR (600 MHz, $CDCl_3$): δ 196.37 (CO, C_7), 170.55 (CO, C_{11}), 170.15 (CO, Ac), 169.36 (CO, Ac), 169.30 (CO, Ac), 166.64 (CO, Ac), 153.11 (CH, C_3), 139.80 (C, $C_{3''}$), 128.49 (2xCH, $C_{5'',7''}$), 128.45 (2xCH, $C_{4'',8''}$), 127.40 (C, C_4), 126.48 (CH, $C_{6''}$), 125.08 (C, C_9), 108.53 (CH, C_8), 97.04 (CH, C_1), 93.74 (CH, $C_{1'}$), 72.44 (CH, $C_{5'}$), 72.12 (CH, $C_{3'}$), 70.62 (CH, $C_{2'}$), 68.19 (CH, $C_{4'}$), 61.77 (CH_2, $C_{6'}$), 51.45 (CH_3, C_{12}), 48.60 (CH_2, C_6), 35.78 (CH_2, $C_{2''}$), 35.66 (CH_2, $C_{1''}$), 30.88 (CH_3, Ac), 30.52 (CH_3, Ac), 26.84 (CH, C_5), 20.62 (CH_3, Ac), 20.57 (CH_3, Ac), 13.62 (CH_3, C_{10})

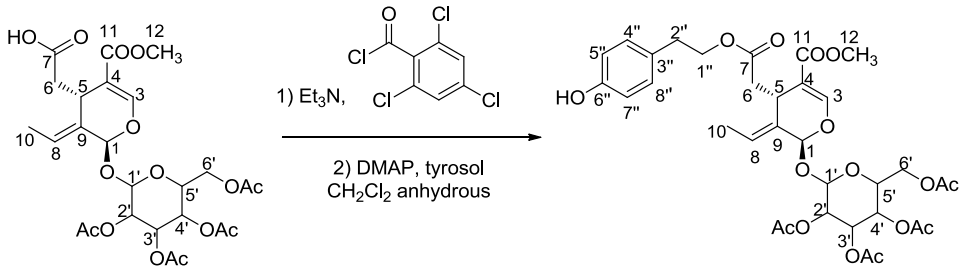
HRMS (ESI+), m/z calcd: 715.2036, found: 715.2036; ($M+Na^+$), calcd: 731.1776, found: 731.1772; ($M+K^+$)

$[\alpha]_D^{20}$= -116 (c 0.03, MeOH)

- **^{1}H NMR**



IV.3.d.4.1.5. Τετραοξικός λιγκστροσίδης (55)



(27) **(55)**

Σύμφωνα με τη γενική μέθοδο εστεροποίησης με αλκοόλες, 0.014 g (απόδοση 23%) του (55) παραλήφθηκαν από 0.050 g του (27).

Λευκό στερεό προϊόν. M= 692.6611 g/ mol, $C_{33}H_{40}O_{16}$.

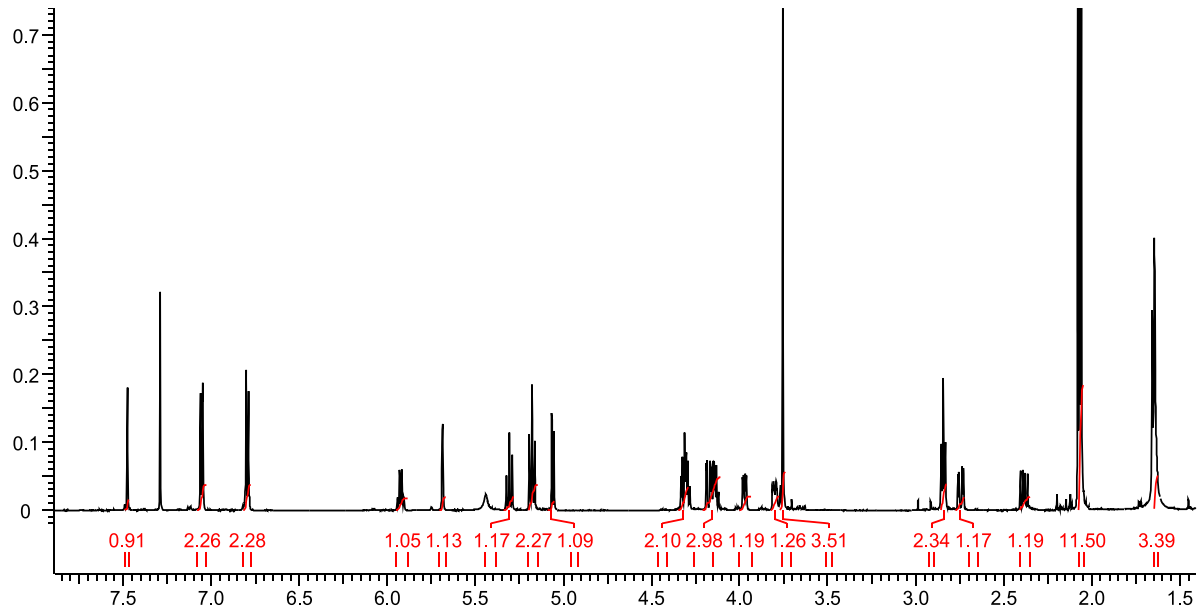
^{1}H NMR (600 MHz, $CDCl_3$): 7.47 (s, 1H, H_3), 7.05 (d, $J_{5'',4''/7'',8''}$= 8Hz, 2H, $H_{5'',7''}$), 6.80 (d, $J_{4'',5''/8'',7''}$= 8Hz, 2H, $H_{4'',8''}$), 5.93 (q, $J_{8,10}$= 7.0Hz, 1H, H_8), 5.69 (s, 1H, H_1), 5.31 (t, $J_{3',4',2'}$= 9.4Hz, 1H, $H_{3'}$), 5.18 (t, 2H, $H_{2',4'}$), 5.06 (d, $J_{1',2'}$= 7.9Hz, 1H, $H_{1'}$), 4.33-4.29 (m, 2H, $H_{1''a,6'b}$), 4.19-4.13 (m, 2H, $H_{1''b,6'a}$), 3.97 (ddd, $J_{5',4'}$= 9.2Hz, $J_{5',6'a}$= 4.7Hz, $J_{5',6'b}$= 2.4Hz, 1H, $H_{5'}$), 3.80 (dd, $J_{5,6a}$= 9.1Hz, $J_{5,6b}$= 4.4Hz, 1H, H_5), 3.76 (s, 3H, H_{12}), 2.84 (t, 2H, $H_{2''}$), 2.74 (dd, $J_{6b,6a}$=14.4Hz, $J_{6b,5}$=4.4Hz, 1H, H_{6b}), 2.39 (dd, $J_{6a,6b}$=14.4Hz, $J_{6a,5}$=9.1Hz, 1H, H_{6a}), 2.08 (s, 3H, Ac), 2.07 (2xs, 6H, Ac), 2.06 (s, 3H, Ac), 1.65 (d, $J_{10,8}$=6.9Hz, 3H, H_{10})

^{13}C NMR (600 MHz, $CDCl_3$): δ 171.08 (CO, C_7), 170.78 (CO, C_{11}), 170.20 (CO, Ac), 169.62 (CO, Ac), 169.43 (CO, Ac), 166.76 (CO, Ac), 154.46 (C, $C_{6''}$), 153.04 (CH, C_3), 130.01 (2xCH, $C_{5'',7''}$), 129.78 (C, $C_{3''}$), 127.69 (C, C_4), 124.99 (C, C_9), 115.43 (2xCH, $C_{4'',8''}$), 108.87 (CH, C_8), 96.84 (CH, C_1), 93.44 (CH, $C_{1'}$), 72.49 (CH, $C_{5'}$), 72.22 (CH, $C_{3'}$), 70.78 (CH, $C_{2'}$), 68.30 (CH, $C_{4'}$), 65.32 (CH_2, $C_{1''}$), 61.77 (CH_2, $C_{6'}$), 51.47 (CH_3, C_{12}), 39.84 (CH_2, C_6), 34.16 (CH_2, $C_{2''}$), 30.25 (CH, C_5), 20.70 (CH_3, Ac), 20.68 (2xCH_3, Ac), 20.61 (CH_3, Ac), 13.50 (CH_3, C_{10})

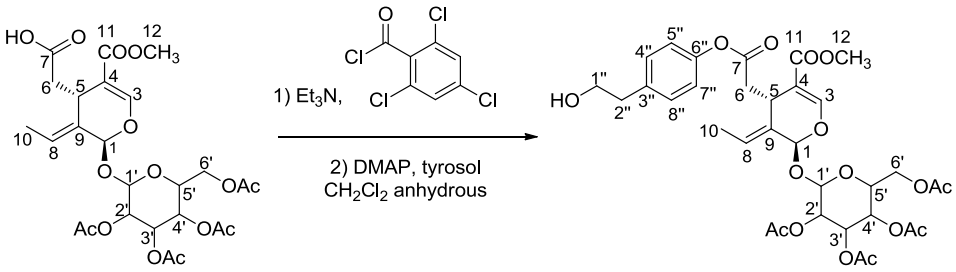
HRMS (ESI+), m/z calcd: 715.2214, found: 715.2370; ($M+Na^+$), calcd: 731.1953, found: 731.2109; ($M+K^+$)

$[\alpha]_D^{20}$= -450 (c 0.02, MeOH)

❖ **^{1}H NMR**



IV.3.d.4.1.6. Τετραοξικός φορμοσίδης (56)



(27) **(56)**

Σύμφωνα με τη γενική μέθοδο εστεροποίησης με αλκοόλες, 0.025 g (απόδοση 20%) του (56) παραλήφθηκαν από 0.050 g του (27).

Λευκό στερεό προϊόν. M= 692.6611 g/ mol, $C_{33}H_{40}O_{16}$.

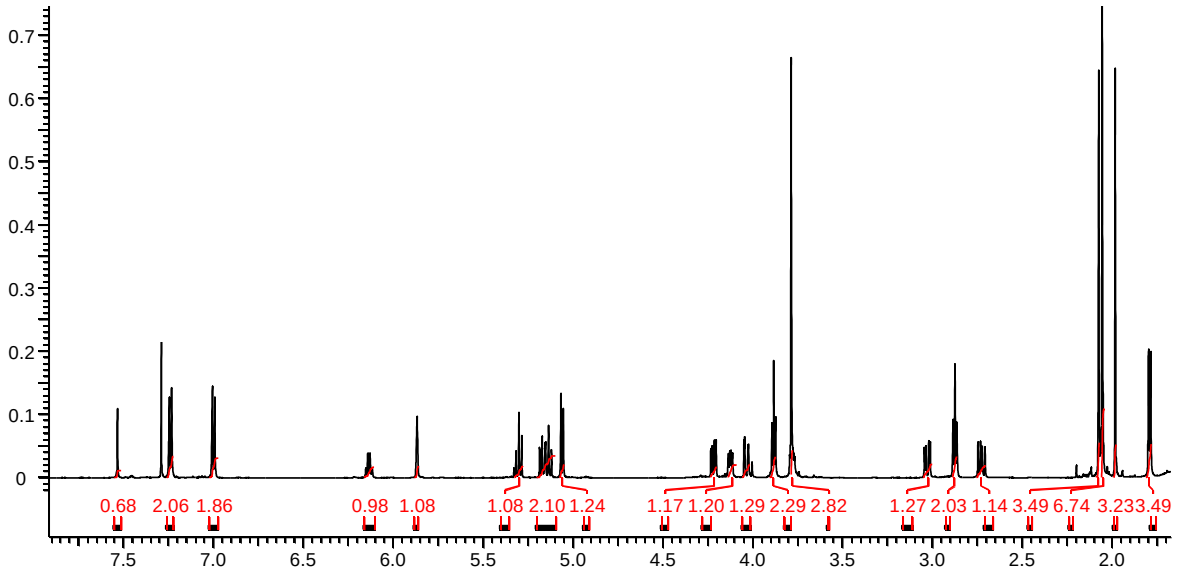
^{1}H NMR (600 MHz, $CDCl_3$): 7.53 (s, 1H, H_3), 7.24 (d, $J_{5'',4''/7'',8''}$= 8Hz, 2H, $H_{5'',7''}$), 7.00 (d, $J_{4'',5''/8'',7''}$= 8Hz, 2H, $H_{4'',8''}$), 6.13 (q, $J_{8,10}$= 7.0Hz, 1H, H_8), 5.86 (s, 1H, H_1), 5.31 (t, $J_{3',4',2'}$= 9.4Hz, 1H, $H_{3'}$), 5.18 (t, $J_{2',3',1'}$= 7.9Hz, 1H, $H_{2'}$), 5.14 (t, $J_{4',5',3'}$= 9.2Hz, 1H, $H_{4'}$), 5.06 (d, $J_{1',2'}$= 7.9Hz, 1H, $H_{1'}$), 4.22 (dd, $J_{6'a,6'b}$= 12.3Hz, $J_{6'a,5'}$= 4.7Hz, 1H, $H_{6'a}$), 4.12 (ddd, $J_{5',4'}$= 9.2Hz, $J_{5',6'b}$= 2.4Hz, $J_{5',6'a}$= 4.7Hz 1H, $H_{5'}$), 4.03 (dd, $J_{6'b,6'a}$= 12.3Hz, $J_{6'b,\,5'}$= 2.4Hz, 1H, $H_{6'b}$), 3.88 (t, 2H, $H_{1''}$), 3.79 (s, 3H, H_{12}), 3.77 (dd, $J_{5,6a}$= 9.1Hz, $J_{5,6b}$= 4.4Hz, 1H, H_5), 3.02 (dd, $J_{6b,6a}$=14.4Hz, $J_{6b,5}$=4.4Hz, 1H, H_{6b}), 2.87 (t, 2H, $H_{2''}$), 2.73 (dd, $J_{6a,6b}$=14.4Hz, $J_{6a,5}$=9.1Hz, 1H, H_{6a}), 2.07 (s, 3H, Ac), 2.06 (2xs, 6H, Ac), 2.05 (s, 3H, Ac), 1.79 (d, $J_{10,8}$=6.9Hz, 3H, H_{10})

^{13}C NMR (600 MHz, $CDCl_3$): δ 171.08 (CO, C_7), 170.70 (CO, C_{11}), 170.18 (CO, Ac), 169.37 (CO, Ac), 169.43 (CO, Ac), 166.77 (CO, Ac), 153.33 (C, $C_{6''}$), 149.11 (CH, C_3), 137.55 (C, C_4), 130.00 (2xCH, $C_{5'',7''}$), 127.69 (C, C_9), 125.30 (C, $C_{3''}$), 121.60 (2xCH, $C_{4'',8''}$), 108.87 (CH, C_8), 97.47 (CH, C_1), 94.26 (CH, $C_{1'}$), 72.52 (CH, $C_{5'}$), 72.16 (CH, $C_{3'}$), 70.74 (CH, $C_{2'}$), 68.33 (CH, $C_{4'}$), 63.46 (CH_2, $C_{1''}$), 62.01 (CH_2, $C_{6'}$), 51.52 (CH_3, C_{12}), 39.78 (CH_2, C_6), 38.61 (CH_2, $C_{2''}$), 30.25 (CH, C_5), 20.66 (CH_3, Ac), 20.60 (2xCH_3, Ac), 20.53 (CH_3, Ac), 13.69 (CH_3, C_{10})

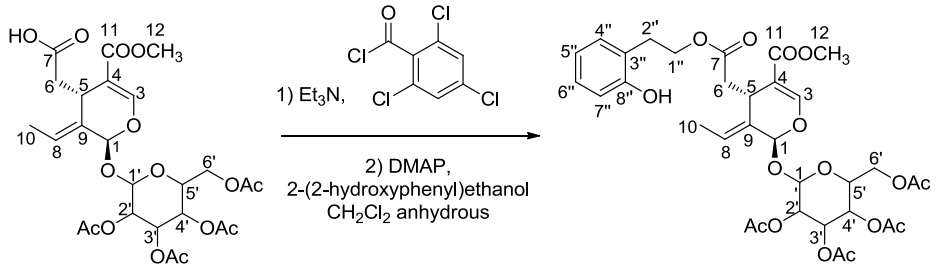
HRMS (ESI+), m/z calcd: 715.2214, found: 715.2373; ($M+Na^+$), calcd: 731.1953, found: 731.2111; ($M+K^+$)

$[\alpha]_D^{20}$= -600 (c 0.04, MeOH)

❖ **^{1}H NMR**



IV.3.d.4.1.7. Τετραοξικός 11-μεθυλεστέρας 7-[(2-υδροξυ)-φαινυλαιθυλ]εστέρας του ολεοσίδη (57)



(27) **(57)**

Σύμφωνα με τη γενική μέθοδο εστεροποίησης με αλκοόλες, 0.048 g (απόδοση 40%) του (57) παραλήφθηκαν από 0.100 g του (27).

Λευκό στερεό προϊόν. M= 692.6611 g/ mol, $C_{33}H_{40}O_{16}$.

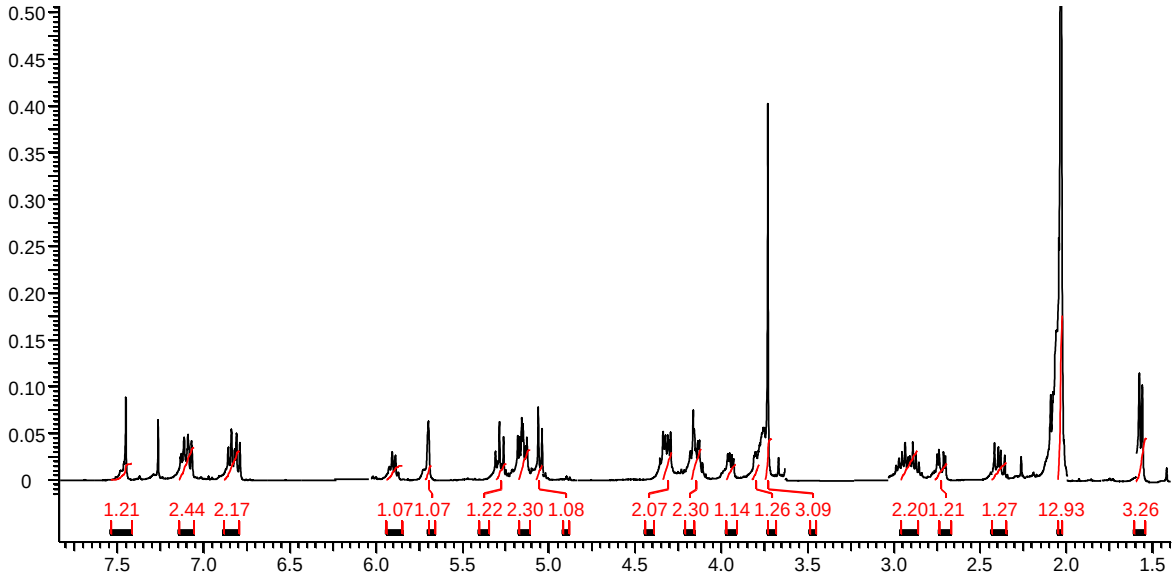
^{1}H NMR (600 MHz, $CDCl_3$): 7.45 (s, 1H, H_3), 7.10 (m, 2H, $H_{6'',4''}$), 6.82 (m, 2H, $H_{5'',7''}$), 5.91 (q, $J_{8,10}$= 7.0Hz, 1H, H_8), 5.70 (s, 1H, H_1), 5.29 (t, $J_{3',4',2'}$= 9.4Hz, 1H, $H_{3'}$), 5.15 (t, 2H, $H_{2',4'}$), 5.06 (d, $J_{1',2'}$= 7.9Hz, 1H, $H_{1'}$), 4.31 (m, 2H, $H_{1''a,6'b}$), 4.16 (m, 2H, $H_{1''b,6'a}$), 3.95 (dd, $J_{5,6a}$= 9.1Hz, $J_{5,6b}$= 4.4Hz, 1H, H_5), 3.78 (ddd, $J_{5',4'}$= 9.2Hz, $J_{5',6'a}$= 4.7Hz, $J_{5',6'b}$= 2.4Hz, 1H, $H_{5'}$), 3.73 (s, 3H, H_{12}), 2.92 (m, 2H, $H_{2''}$), 2.71 (dd, $J_{6b,6a}$=14.4Hz, $J_{6b,5}$=4.4Hz, 1H, H_{6b}), 2.39 (dd, $J_{6a,6b}$=14.4Hz, $J_{6a,5}$=9.1Hz, 1H, H_{6a}), 2.03 (s, 12H, Ac), 1.58 (d, $J_{10,8}$=6.9Hz, 3H, H_{10})

^{13}C NMR (600 MHz, $CDCl_3$): δ 173.08 (CO, C_7), 171.58 (CO, C_{11}), 170.20 (CO, Ac), 169.62 (CO, Ac), 169.43 (CO, Ac), 166.76 (CO, Ac), 155.24 (CH, C_3), 154.86 (C, $C_{8''}$), 130.85 (C, C_4), 130.61 (CH, $C_{4''}$), 127.76 (C, $C_{3''}$), 127.38 (CH, $C_{6''}$), 126.19 (C, C_9), 124.89 (CH, C_8), 121.23 (CH, $C_{5''}$), 115.82 (CH, $C_{7''}$), 104.54 (CH, C_1), 101.44 (CH, $C_{1'}$), 74.89 (CH, $C_{5'}$), 72.02 (CH, $C_{3'}$), 71.18 (CH, $C_{2'}$), 69.30 (CH, $C_{4'}$), 65.54 (CH_2, $C_{1''}$), 62.77 (CH_2, $C_{6'}$), 52.34 (CH_3, C_{12}), 41.06 (CH_2, C_6), 32.25 (CH, C_5), 28.39 (CH_2, $C_{2''}$), 21.70 (CH_3, Ac), 21.68 (CH_3, Ac), 21.01 (CH_3, Ac), 20.75 (CH_3, Ac), 13.70 (CH_3, C_{10})

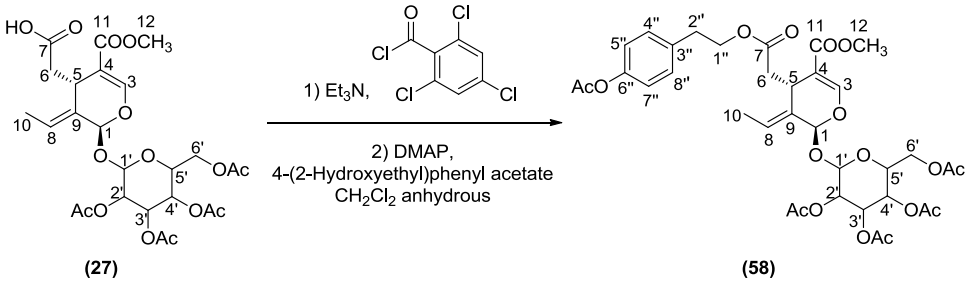
HRMS (ESI+), m/z calcd: 715.2214, found: 715.2212; ($M+Na^+$), calcd: 731.1953, found: 731.1816; ($M+K^+$)

$[\alpha]_D^{20}$ = -1000 (c 0.03, MeOH)

❖ **^{1}H NMR**



IV.3.d.4.1.8. Πενταοξικός λιγκστροσίδης (58)



(27) **(58)**

Σύμφωνα με τη γενική μέθοδο εστεροποίησης με αλκοόλες, 0.014 g (απόδοση 20%) του (58) παραλήφθηκαν από 0.054 g του (27).

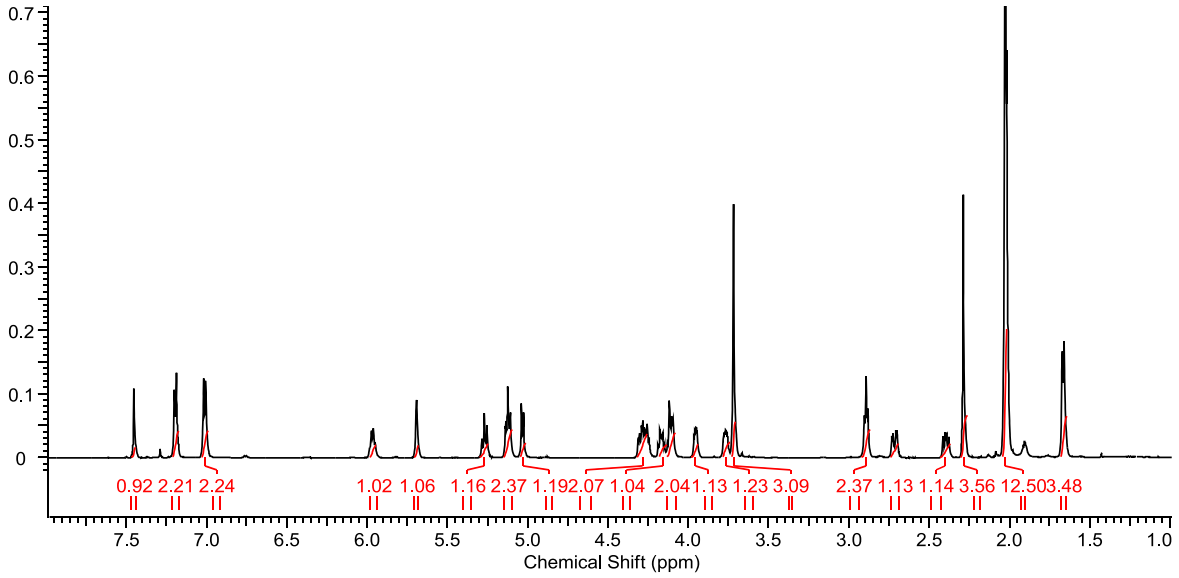
Άχρωμο ελαιώδες προϊόν. M= 734.6978 g/ mol, $C_{35}H_{42}O_{17}$.

^{1}H NMR (600 MHz, $CDCl_3$): 7.45 (s, 1H, H_3), 7.19 (d, $J_{5'',4''/7'',8''}$= 8Hz, 2H, $H_{5'',7''}$), 7.00 (d, $J_{4'',5''/8'',7''}$= 8Hz, 2H, $H_{4'',8''}$), 5.97 (q, $J_{8,10}$= 7.0Hz, 1H, H_8), 5.69 (s, 1H, H_1), 5.27 (t, $J_{3',4',2'}$= 9.4Hz, 1H, $H_{3'}$), 5.13 (2xt, 2H, $H_{2',4'}$), 5.03 (d, $J_{1',2'}$= 7.9Hz, 1H, $H_{1'}$), 4.31-4.24 (m, 2H, $H_{1''a,6'b}$), 4.17-4.15 (m, 1H, $H_{1''b}$), 4.11-4.09 ($J_{6'a,6'b}$= 12.4Hz, $J_{6'a,5'}$= 4.7Hz, 1H, $H_{6'a}$), 3.95 (ddd, $J_{5',4'}$= 9.2Hz, $J_{5',6'a}$= 4.7Hz, $J_{5',6'b}$= 2.4Hz, 1H, $H_{5'}$), 3.77 (dd, $J_{5,6a}$= 9.1Hz, $J_{5,6b}$= 4.4Hz, 1H, H_5), 3.71 (s, 3H, H_{12}), 2.89 (t, 2H, $H_{2''}$), 2.71 (dd, $J_{6b,6a}$=14.4Hz, $J_{6b,5}$=4.4Hz, 1H, H_{6b}), 2.39 (dd, $J_{6a,6b}$=14.4Hz, $J_{6a,5}$=9.1Hz, 1H, H_{6a}), 2.28 (s, 3H, Ac), 2.01 (3xs, 12H, Ac), 1.66 (d, $J_{10,8}$=6.9Hz, 3H, H_{10})

^{13}C NMR (600 MHz, $CDCl_3$): δ 170.93 (CO, C_7), 170.46 (CO, C_{11}), 170.03 (CO, Ac-Ar), 169.39 (CO, Ac), 169.28 (CO, Ac), 169.21 (CO, Ac), 166.62 (CO, Ac), 152.95 (C, $C_{6''}$), 149.28 (CH, C_3), 135.21 (2xCH, $C_{5'',7''}$), 129.72 (C, $C_{3''}$), 127.91 (C, C_4), 124.75 (C, C_9), 121.51 (2xCH, $C_{4'',8''}$), 108.63 (CH, C_8), 96.94 (CH, C_1), 93.59 (CH, $C_{1'}$), 72.44 (CH, $C_{5'}$), 72.11 (CH, $C_{3'}$), 70.64 (CH, $C_{2'}$), 68.14 (CH, $C_{4'}$), 64.82 (CH_2, $C_{1''}$), 61.61 (CH_2, $C_{6'}$), 51.33 (CH_3, C_{12}), 39.84 (CH_2, C_6), 34.27 (CH_2, $C_{2''}$), 30.16 (CH, C_5), 20.98 (CH_3, Ac-Ar), 20.91 (2xCH_3, Ac), 20.52 (CH_3, Ac), 20.48 (CH_3, Ac), 13.37 (CH_3, C_{10})

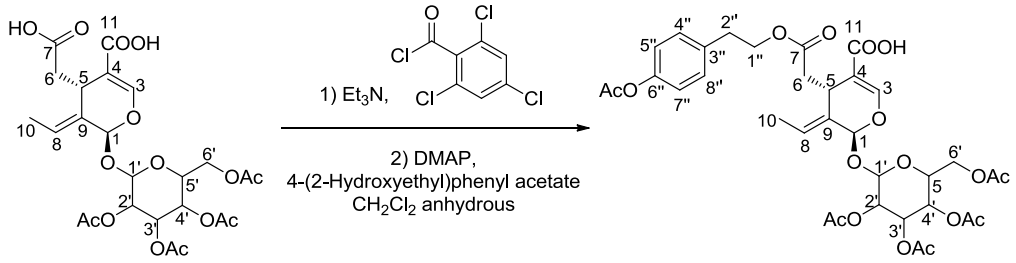
HRMS (ESI+), m/z calcd: 757.2320, found: 757.2295; ($M+Na^+$), calcd: 773.2059, found: 773.2029; ($M+K^+$)

❖ **^{1}H NMR**



IV.3.d.4.2. ***Αρυλο εστέρες*** *του τετραοξικού ολεοσίδη*

IV.3.d.4.2.1. Τετραοξικός 7-[2-(4-ακετοξυ-φαινυλ)αιθυλ] εστέρας του ολεοσίδη (59)



(23) **(59)**

Σύμφωνα με τη γενική μέθοδο εστεροποίησης με αλκοόλες, 0.014 g (απόδοση 14%) του (59) παραλήφθηκαν από 0.0216 g του (23).

Λευκό στερεό προϊόν. M= 720.6712 g/ mol, $C_{34}H_{40}O_{17}$.

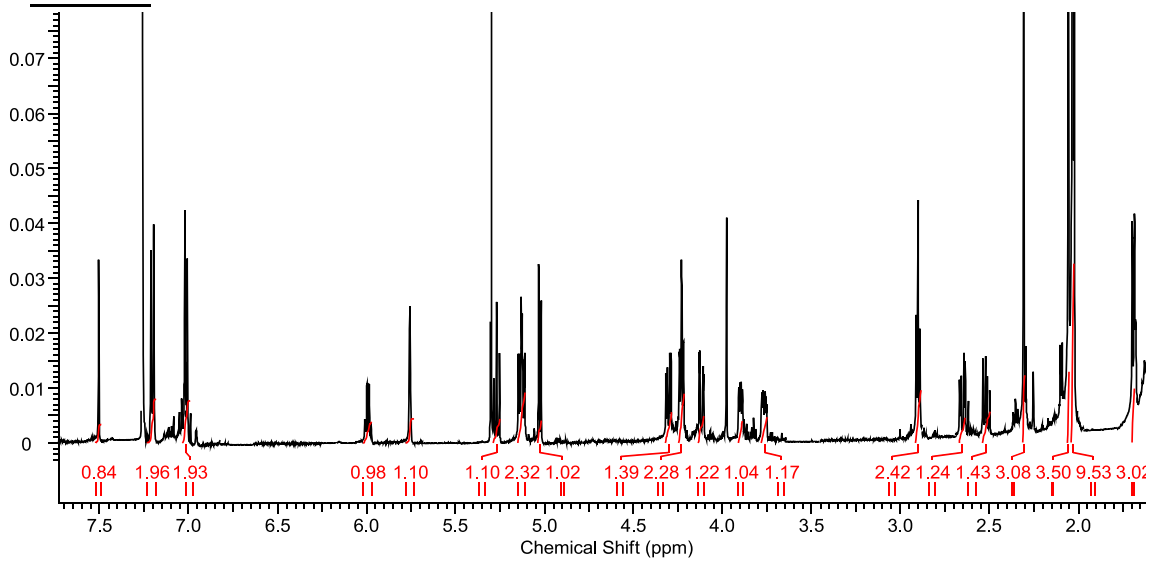
^{1}H NMR (600 MHz, $CDCl_3$): 7.50 (s, 1H, H_3), 7.20 (d, $J_{5'',4''/7'',8''}$= 8.4 Hz, 2H, $H_{5'',7''}$), 7.01 (d, $J_{4'',5''/8'',7''}$= 8.3 Hz, 2H, $H_{4'',8''}$), 5.99 (q, $J_{8,10}$= 6.6 Hz, 1H, H_8), 5.75 (s, 1H, H_1), 5.27 (t, $J_{3',4',2'}$= 9.4 Hz, 1H, $H_{3'}$), 5.13 (2xt, 2H, $H_{2',4'}$), 5.02 (d, $J_{1',2'}$= 8.0 Hz, 1H, $H_{1'}$), 4.30 (dd, $J_{6'a,6'b}$= 12.4 Hz, $J_{6'a,5'}$= 5.0 Hz, 1H, $H_{6'a}$), 4.23 (2xt, $J_{1'',2''}$= 6.8 Hz, 2H, $H_{1''}$), 4.12 (dd, $J_{6'b,6'a}$= 12.4 Hz, $J_{6'b,5'}$= 2.4 Hz, 1H, $H_{6'b}$), 3.90 (dd, $J_{5,6a}$= 8.2 Hz, $J_{5,6b}$= 4.0 Hz, 1H, H_5), 3.76 (ddd, $J_{5',4'}$= 10.1 Hz, $J_{5',6'a}$= 4.7 Hz, $J_{5',6'b}$= 2.4 Hz, 1H, $H_{5'}$), 2.90 (t, $J_{2'',1''}$= 6.8 Hz, 2H, $H_{2''}$), 2.65 (dd, $J_{6b,6a}$= 14.6 Hz, $J_{6b,5}$= 4.0 Hz, 1H, H_{6b}), 2.51 (dd, $J_{6a,6b}$= 14.4 Hz, $J_{6a,5}$= 8.2 Hz, 1H, H_{6a}), 2.31 (s, 3H, Ac($C_{6''}$), 2.05 (s, 3H, Ac), 2.03 (2xs, 6H, Ac), 2.02 (s, 3H, Ac), 1.69 (d, $J_{10,8}$= 7.1 Hz, 3H, H_{10})

^{13}C NMR (600 MHz, $CDCl_3$): δ 171.22 (CO, C_7), 170.28 (CO, OAc), 169.98 (CO, OAc), 169.55 (2xCO, OAc), 169.52 (CO, OAc), 169.02 (CO, C_{11}), 154.05 (CH, C_3), 129.68 (CH, $C_{5'',7''}$), 124.55 (CH, C_8), 121.12 (CH, $C_{4'',8''}$), 96.68 (CH, $C_{1'}$), 93.49 (CH, C_1), 72.13 (CH, $C_{3'}$), 71.87 (CH, $C_{5'}$), 70.27 (CH, $C_{2'}$), 67.82 (CH, $C_{4'}$), 64.32 (CH_2, $C_{1''}$), 61.36 (CH_2, $C_{6'}$), 53.04 (CH, $C_{3'}$), 39.33 (CH_2, C_6), 33.91 (CH_2, $C_{2''}$), 29.50 (CH, C_5), 20.63 (CH_3, OAc($C_{6'}$), 20.16 (4xCH_3, OAc), 13.11 (CH_3, C_{10})

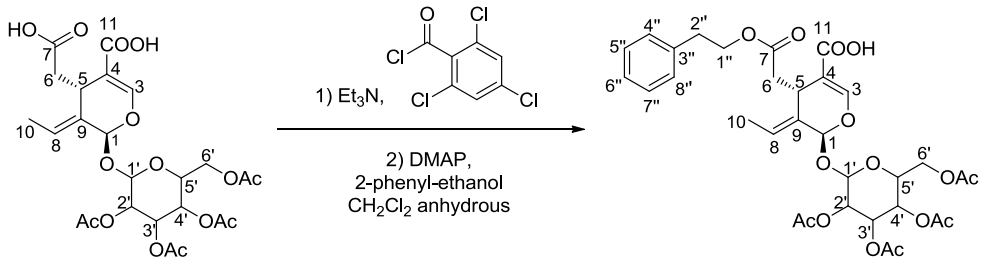
HRMS (ESI+), m/z calcd: 743.2163, found: 743.2153; ($M+Na^+$)

$[\alpha]_D^{20}$= -28.72 (c 0.181, $CHCl_3$)

❖ **^{1}H NMR**



IV.3.d.4.2.2. Τετραοξικός 7-φαινυλαιθυλο εστέρας του ολεοσίδη (60)



(23) **(60)**

Σύμφωνα με τη γενική μέθοδο εστεροποίησης με αλκοόλες, παραλήφθηκαν 0.003 g (απόδοση 7%) του (60) από 0.035 g του (23).

Λευκό στερεό προϊόν. M= 662.6351 g/ mol, $C_{32}H_{38}O_{15}$.

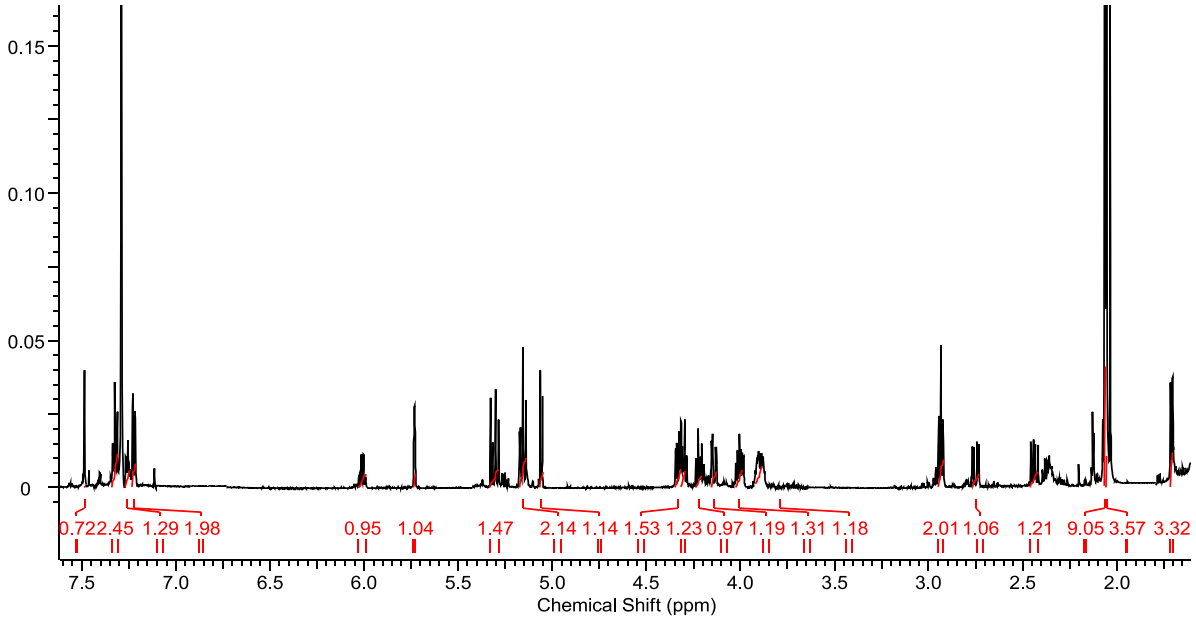
^{1}H NMR (600 MHz, $CDCl_3$): 7.48 (s, 1H, H_3), 7.32 (m, 2H, $H_{5'',7''}$), 7.26 (m, 1H, $H_{6''}$), 7.22 (m, 2H, $H_{4'',8''}$), 6.01 (q, $J_{8,10}$= 6.7 Hz, 1H, H_8), 5.73 (s, 1H, H_1), 5.31 (dd, $J_{2',1'}$= 9.6 Hz, 1H, $H_{2'}$), 5.16 (t, $J_{3',2',4'/4',3',5'}$= 9.6 Hz, 2H, $H_{3',4'}$), 5.06 (d, $J_{1',2'}$= 8.0 Hz, 1H, $H_{1'}$), 4.33 (dd, $J_{6'a,6'b}$= 12.2 Hz, $J_{6'a,5'}$= 4.7 Hz, 1H, $H_{6'a}$), 4.31 (m, 1H, $H_{1''a}$), 4.22 (m, 1H, $H_{1''b}$), 4.14 (dd, $J_{6'b,6'a}$ = 12.5 Hz, $J_{6'b,5'}$ = 2.4 Hz, 1H, $H_{6'b}$), 4.00 (m, 1H, $H_{5'}$), 3.79 (m, 1H, H_5), 2.93 (t, $J_{2'',1''}$= 7.0 Hz, 2H, $H_{2''}$), 2.75 (dd, $J_{6b,6a}$= 14.4 Hz, $J_{6b,5}$= 4.5 Hz, 1H, H_{6b}), 2.44 (dd, $J_{6a,6b}$= 14.5 Hz, $J_{6a,5}$= 8.8 Hz, 1H, H_{6a}), 2.06 (3xs, 9H, Ac), 2.03 (s, 3H, Ac), 1.71 (d, $J_{10,8}$= 7.1 Hz, 3H, H_{10})

^{13}C NMR (600 MHz, $CDCl_3$): δ 173.25 (CO, C_7), 170.38 (CO, C_{11}), 169.60 (CO, Ac), 169.42 (3xCO, Ac), 152.16 (CH, C_3), 129.47 (2xCH, $C_{5'',7''}$), 129.23 (C, C_9), 128.95 (CH, $C_{6''}$), 127.06 (2xCH, $C_{4'',8''}$), 125.57 (CH, C_8), 141.15 (C, $C_{3''}$), 108.77 (C, C_4), 108.28 (CH, C_1), 97.26 (CH_2, $C_{1'}$), 73.02 (CH, $C_{5'}$), 71.12 (CH, $C_{3'}$), 68.84 (2xCH, $C_{2',4'}$), 62.54 (CH_2, $C_{1''}$), 61.77 (CH_2, $C_{6'}$), 41.69 (CH_2, C_6), 34.98 (CH_2, $C_{2''}$), 28.89 (CH, C_5), 21.33 (4xCH_3, Ac), 13.61 (CH_3, C_{10})

HRMS (ESI+), m/z calcd: 685.2108, found: 685.2110; ($M+Na^+$)

$[\alpha]_D^{20}$= -3.58 (c 0.363, $CHCl_3$)

❖ **^{1}H NMR**

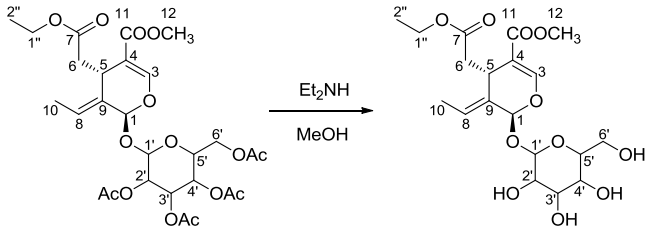


IV.3.e. *Γενική μέθοδος αποπροστασίας*

Ποσότητα του ακετυλιωμένου προϊόντος (1 eq) διαλύεται σε 4 mL MeOH και κατόπιν προστίθενται, κατά σταγόνες, 5-10 eq διαιθυλαμίνης (Et_2NH). Μετά από 6 ώρες ανάδευσης σε θερμοκρασία περιβάλλοντος, το μίγμα αραιώνεται με MeOH και προστίθεται μικρή ποσότητα silica (70-200μm), ώστε το pH να γίνει 5-6. Ακολουθεί εξάτμιση της MeOH και καθαρισμός του προϊόντος με χρωματογραφία στήλης (silica 20-40μm, CH_2Cl_2/ MeOH: 95/5). [255]

IV.3.e.1. Προϊόντα αποπροστασίας τετραοξικού 11-μεθυλεστέρα του ολεοσίδη

IV.3.e.1.1. 7-αιθυλεστέρας 11-μεθυλεστέρας του ολεοσίδη (61)



(42) **(61)**

Σύμφωνα με τη γενική μέθοδο αποπροστασίας, παραλήφθηκαν 0.004 g του (61) (απόδοση 45%), από 0.011 g του (42).

Λευκό στερεό προϊόν. M= 432.4190 g/ mol, $C_{19}H_{28}O_{11}$

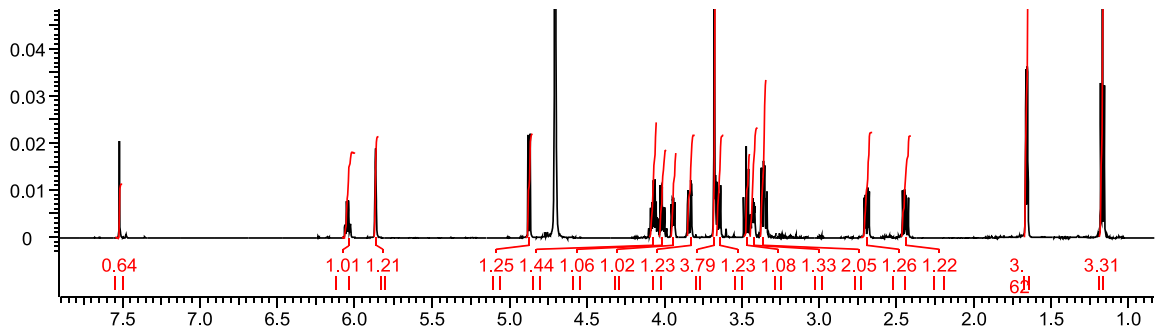
^{1}H NMR (600 MHz, D_2O): δ 7.52 (s, 1H, H_3), 6.04 (q, $J_{8,10}$=7.0Hz, 1H, H_8), 5.87 (s, 1H, H_1), 4.87 (d, $J_{1',2'}$=8.0Hz, 1H, $H_{1'}$), 4.07 (m, 1H, $H_{1''a}$), 4.02 (m, 1H, $H_{1''b}$), 3.94 (dd, $J_{5,6a}$=8.6Hz, $J_{5,6b}$=5.1Hz, 1H, H_5), 3.84 (dd, $J_{6'b,6'a}$=12.4Hz, $J_{6'b,5'}$=2.2Hz, 1H, $H_{6'b}$), 3.68 (s, 3H, H_{12}), 3.67 (dd, $J_{6'a,6'b}$=12.5Hz, $J_{6'a,5'}$=6.0Hz, 1H, $H_{6'a}$), 3.47 (t, $J_{3',4',2'}$=9.2Hz, 1H, $H_{3'}$), 3.43 (ddd, $J_{5',4'}$=9.8Hz, $J_{5',6'a}$=5.9Hz, $J_{5',6'b}$=2.1Hz, 1H, $H_{5'}$), 3.35 (dd, $J_{2',3'}$=9.2Hz, $J_{2',1'}$=8.0Hz, 1H, $H_{2'}$), 3.37 (dd, $J_{4',5'}$=9.7Hz, $J_{4',3'}$=9.2Hz, 1H, $H_{4'}$), 2.70 (dd, $J_{6b,6a}$=13.5, $J_{6b,5}$=4.9Hz, 1H, H_{6b}), 2.35 (dd, $J_{6a,6b}$=13.5, $J_{6a,5}$=9.4Hz, 1H, H_{6a}), 1.65 (d, $J_{10,8}$=7.1Hz, 3H, H_{10}), 1.17 (t, $J_{2'',1''}$=7.4Hz, 3H, $H_{2''}$)

^{13}C NMR (600 MHz, D_2O): δ 173.17 (CO, C_7), 168.54 (CO, C_{11}), 155.23 (CH, C_3), 130.82 (C, C_4), 124.88 (C, C_9), 109.45 (CH, C_8), 108.22 (CH, C_1), 107.70 (CH, $C_{1'}$), 81.51 (CH, $C_{5'}$), 76.86 (CH, $C_{3'}$), 74.26 (CH, $C_{2'}$), 71.57 (CH, $C_{4'}$), 62.21 (CH_2, $C_{6'}$), 61.35 (CH_2, $C_{1''}$), 52.37 (CH_3, C_{12}), 41.03 (CH_2, C_6), 26.01 (CH, C_5), 14.12 (CH_3, $C_{2''}$), 13.75 (CH_3, C_{10})

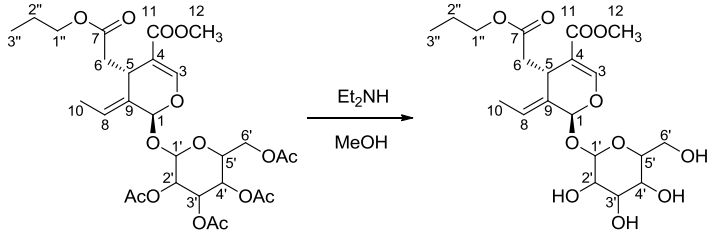
HRMS (ESI+), m/z calcd: 455.1529, found: 455.1504; ($M+Na^+$), calcd: 471.1269, found: 471.1243; ($M+K^+$)

$[\alpha]_D^{20}$ = -525 (c 0.04, MeOH)

❖ **^{1}H NMR**



IV.3.e.1.2. 11-μεθυλεστέρας 7-προπυλεστέρας του ολεοσίδη (62)



(43) **(62)**

Σύμφωνα με τη γενική μέθοδο αποπροστασίας, παραλήφθηκαν 0.009 g του (62) (απόδοση 85%), από 0.014 g του (43).

Λευκό στερεό προϊόν. M= 446.4456 g/ mol, $C_{20}H_{30}O_{11}$.

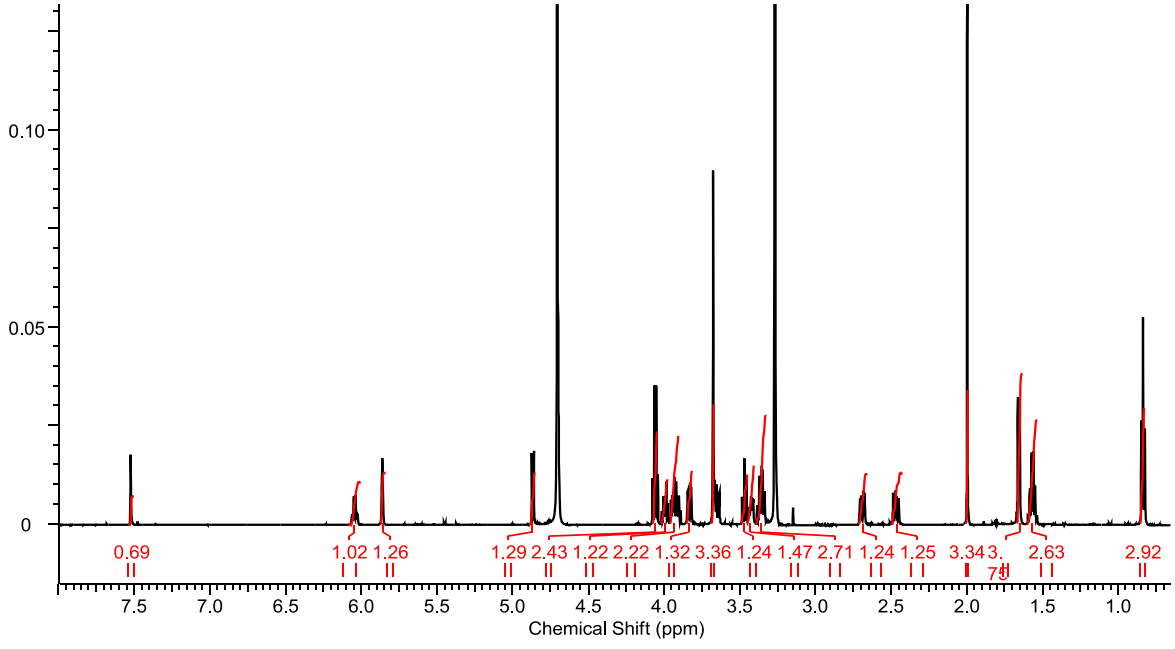
^{1}H NMR (600 MHz, D_2O): δ 7.53 (s, 1H, H_3), 6.04 (q, $J_{8,10}$=7.0Hz, 1H, H_8), 5.86 (s, 1H, H_1), 4.87 (d, $J_{1',2'}$=7.9Hz, 1H, $H_{1'}$), 4.06 (m, 1H, $H_{1''a}$), 3.98 (m, 1H, $H_{1''b}$), 3.92 (dd, $J_{5,6a}$=8.6Hz, $J_{5,6b}$=5.1Hz, 1H, H_5), 3.83 (dd, $J_{6'b,6'a}$=12.4Hz, $J_{6'b,5'}$=2.2Hz, 1H, $H_{6'b}$), 3.69 (s, 3H, H_{12}), 3.65 (dd, $J_{6'a,6'b}$=12.5Hz, $J_{6'a,5'}$=6.0Hz, 1H, $H_{6'a}$), 3.47 (t, $J_{3',4',2'}$=9.2Hz, 1H, $H_{3'}$), 3.43 (ddd, $J_{5',4'}$=9.7Hz, $J_{5',6'a}$=6.0Hz, $J_{5',6'b}$=2.2Hz, 1H, $H_{5'}$), 3.38 (t, $J_{2',3'}$=9.2Hz, $J_{2',1'}$=7.9Hz, 1H, $H_{2'}$), 3.37 (dd, $J_{4',5'}$=9.7Hz, $J_{4',3'}$=9.2Hz, 1H, $H_{4'}$), 2.69 (dd, $J_{6b,6a}$=13.5, $J_{6b,5}$=5.1Hz, 1H, H_{6b}), 2.47 (dd, $J_{6a,6b}$=13.5, $J_{6a,5}$=8.6Hz, 1H, H_{6a}), 1.66 (d, $J_{10,8}$=6.9Hz, 3H, H_{10}), 1.57 (sex, $J_{2'',3'',1''}$=7.1Hz, 2H, $H_{2''}$), 0.83 (t, $J_{3'',2''}$=7.4Hz, 3H, $H_{3''}$)

^{13}C NMR (600 MHz, D_2O): δ 173.16 (CO, C_7), 168.53 (CO, C_{11}), 155.28 (CH, C_3), 130.81 (C, C_4), 124.86 (C, C_9), 109.42 (CH, C_8), 108.22 (CH, C_1), 107.70 (CH, $C_{1'}$), 81.55 (CH, $C_{5'}$),-76.81 (CH, $C_{3'}$), 74.25 (CH, $C_{2'}$), 71.57 (CH, $C_{4'}$), 66.22 (CH_2, $C_{1''}$), 62.28 (CH_2, $C_{6'}$), 52.37 (CH_3, C_{12}), 41.46 (CH_2, C_6), 26.05 (CH, C_5), 21.92 (CH_3, $C_{2''}$), 13.76 (CH_3, C_{10}), 10.33 (CH_3, $C_{3''}$)

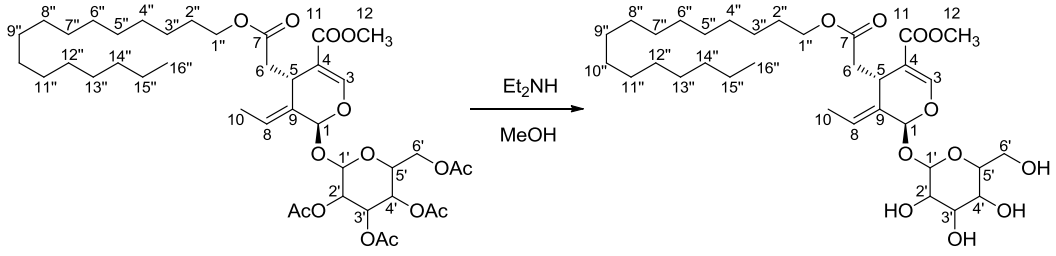
HRMS (ESI+), m/z calcd: 469.1686, found: 469.1665; ($M+Na^+$), calcd: 485.1425, found: 485.1411; ($M+K^+$)

$[\alpha]_D^{20}$ = -784 (c 0.065, MeOH)

❖ **^{1}H NMR**



IV.3.e.1.3. 7-κετυλεστέρας 11-μεθυλεστέρας του ολεοσίδη (63)



(44) **(63)**

Σύμφωνα με τη γενική μέθοδο αποπροστασίας, παραλήφθηκαν 0.004 g του (63) (απόδοση 28%), από 0.021 g του (44).

Λευκό στερεό προϊόν. M= 628.7911 g/ mol, $C_{33}H_{56}O_{11}$.

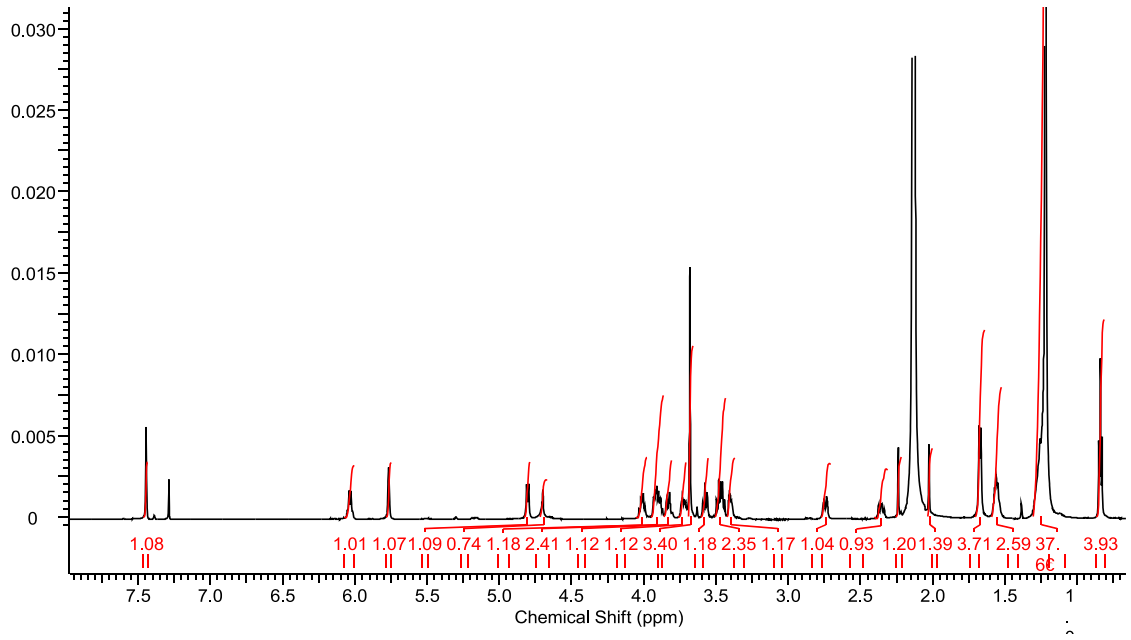
^{1}H NMR (600 MHz, D_2O): δ 7.45 (s, 1H, H_3), 6.03 (q, $J_{8,10}$=7.0Hz, 1H, H_8), 5.77 (s, 1H, H_1), 4.80 (d, $J_{1',2'}$=7.9Hz, 1H, $H_{1'}$), 4.01 (m, 1H, H_5), 3.91 (m, 2H, $H_{1''}$), 3.83 (dd, $J_{6'b,6'a}$=12.4Hz, $J_{6'b,5'}$=2.1Hz, 1H, $H_{6'b}$), 3.72 (dd, $J_{6'a,6'b}$=12.4Hz, $J_{6'a,5'}$=4.7Hz, 1H, $H_{6'a}$), 3.68 (s, 3H, H_{12}), 3.58 (t, $J_{3',4',2'}$=9.0Hz, 1H, $H_{3'}$), 3.05-3.44 (2xt, $J_{2',3',1'/4',5',3'}$=9.3Hz, 2H, $H_{2',4'}$), 3.40 (m, 1H, $H_{5'}$), 2.74 (dd, $J_{6b,6a}$=14.4Hz, $J_{6b,5}$=4.5Hz, 1H, H_{6b}), 2.36 (dd, $J_{6a,6b}$=14.4Hz, $J_{6a,5}$=9.1Hz, 1H, H_{6a}), 1.67 (d, $J_{10,8}$=6.9Hz, 3H, H_{10}), 1.56 (quin, 2H, $H_{2''}$), 1.25 (s, 26H, $H_{3'',4''-15''}$), 0.84 (t, $J_{16'',15''}$=6.8Hz, 3H, $H_{16''}$)

^{13}C NMR (600 MHz, D_2O): δ 173.18 (CO, C_7), 168.57 (CO, C_{11}), 155.24 (CH, C_3), 130.80 (C, C_4), 124.85 (C, C_9), 109.46 (CH, C_8), 108.27 (CH, C_1), 107.76 (CH, $C_{1'}$), 81.55 (CH, $C_{5'}$), 76.82 (CH, $C_{3'}$), 74.27 (CH, $C_{2'}$), 71.59 (CH, $C_{4'}$), 65.27 (CH_2, $C_{1''}$), 62.26 (CH_2, $C_{6'}$), 52.37 (CH_3, C_{12}), 41.03 (CH_2, C_6), 31.95 (CH_2, $C_{14''}$), 29.62 (8xCH_2, Cetyl), 29.33 (2xCH_2, $C_{4'',13''}$), 28.96 (CH_2, $C_{2''}$), 26.05 (CH, C_5), 25.88 (CH_2, $C_{3''}$), 22.74 (CH_2, $C_{15''}$), 14.16 (CH_3, $C_{16''}$), 13.75 (CH_3, C_{10})

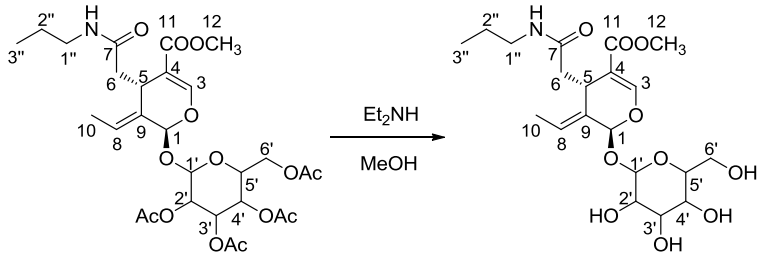
HRMS (ESI+), m/z calcd: 651.3720, found: 651.3693; ($M+Na^+$), calcd: 667.3460, found: 667.3430; ($M+K^+$)

$[\alpha]_D^{20}$ = -790 (c 0.04, MeOH)

❖ **^{1}H NMR**



IV.3.e.1.4. 11-μεθυλεστέρας 7-προπυλαμίδιο του ολεοσίδη (64)



(50) **(64)**

Σύμφωνα με τη γενική μέθοδο αποπροστασίας, παραλήφθηκαν 0.017 g του (64) (απόδοση 52%), από 0.045 g του (50).

Κίτρινο στερεό προϊόν. M= 445.4608 g/ mol, $C_{20}H_{31}NO_{10}$.

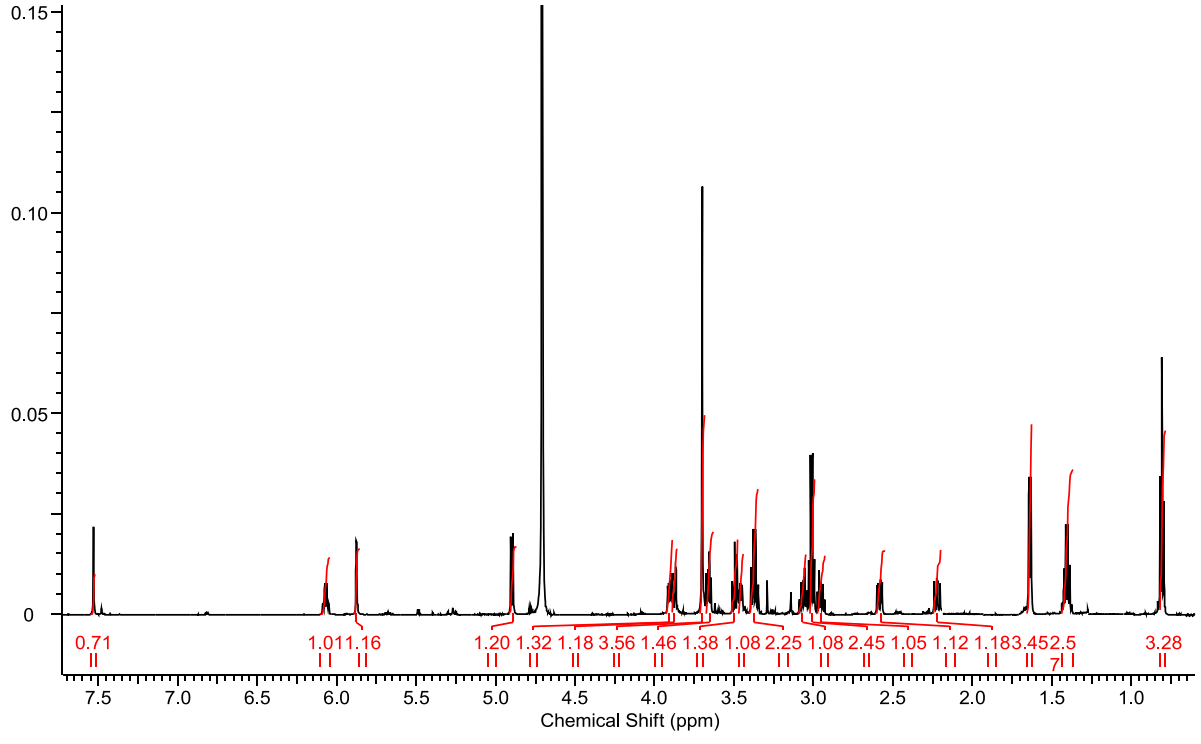
^{1}H NMR (600 MHz, D_2O): δ 7.53 (s, 1H, H_3), 6.07 (q, $J_{8,10}$=6.5Hz, 1H, H_8), 5.88 (s, 1H, H_1), 3.91 (ddd, $J_{5',4'}$=9.7Hz, $J_{5',6'a}$=6.0Hz, $J_{5',6'b}$=2.2Hz, 1H, $H_{5'}$), 3.88 (dd, $J_{6'b,6'a}$=12.4Hz, $J_{6'b,5'}$=2.2Hz, 1H, $H_{6'b}$), 3.70 (s, 3H, H_{12}), 3.66 (dd, $J_{6'a,6'b}$=12.5Hz, $J_{6'a,5'}$=6.0Hz, 1H, $H_{6'a}$), 3.49 (t, $J_{3',4',2'}$=9.2Hz, 1H, $H_{3'}$), 3.45 (dd, $J_{5,6a}$=6.0Hz, $J_{5,6b}$=2.2Hz, 1H, H_5), 3.38-3.36 (2xt, $J_{2',3',1'/4',5',3'}$=9.2Hz, 2H, $H_{2',4'}$), 3.07 (m, 2H, $H_{1''}$), 2.58 (dd, $J_{6b,6a}$=13.5, $J_{6b,5}$=2.2Hz, 1H, H_{6b}), 2.22 (dd, $J_{6a,6b}$=13.5, $J_{6a,5}$=6.0Hz, 1H, H_{6a}), 1.64 (d, $J_{10,8}$=6.5Hz, 3H, H_{10}), 1.40 (sex, $J_{2'',3'',1''}$=7.1Hz, 2H, $H_{2''}$), 0.81 (t, $J_{3'',2''}$=7.4Hz, 3H, $H_{3''}$)

^{13}C NMR (600 MHz, D_2O): δ 173.13 (CO, C_7), 169.11 (CO, C_{11}), 154.35 (CH, C_3), 127.88 (C, C_4), 124.97 (C, C_9), 108.43 (CH, C_8), 99.54 (CH, C_1), 94.63 (CH, $C_{1'}$), 76.41 (CH, $C_{5'}$), 75.57 (CH, $C_{3'}$), 72.58 (CH, $C_{2'}$), 69.43 (CH, $C_{4'}$), 60.69 (CH_2, $C_{6'}$), 51.86 (CH_3, C_{12}), 42.18 (CH_2, C_6), 41.33 (CH_2, $C_{1''}$), 30.88 (CH, C_5), 21.64 (CH_2, $C_{2''}$), 12.79 (CH_3, C_{10}), 10.45 (CH_3, $C_{3''}$)

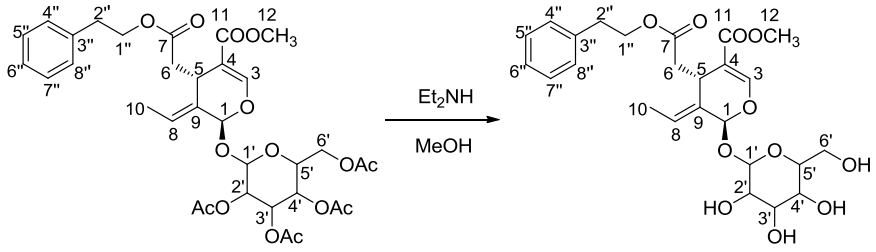
HRMS (ESI+), m/z calcd: 468.1846, found: 468.1827; ($M+Na^+$)

$[\alpha]_D^{20}$ = -784 (c 0.065, MeOH)

❖ **^{1}H NMR**



IV.3.e.1.5. 11-μεθυλεστέρας 7-φαινυλαιθυλεστέρας του ολεοσίδη (65)



(51) **(65)**

Σύμφωνα με τη γενική μέθοδο αποπροστασίας, παραλήφθηκαν 0.009 g του (65) (απόδοση 30%), από 0.040 g του (51).

Λευκό στερεό προϊόν. M= 508.5150 g/ mol, $C_{25}H_{32}O_{11}$.

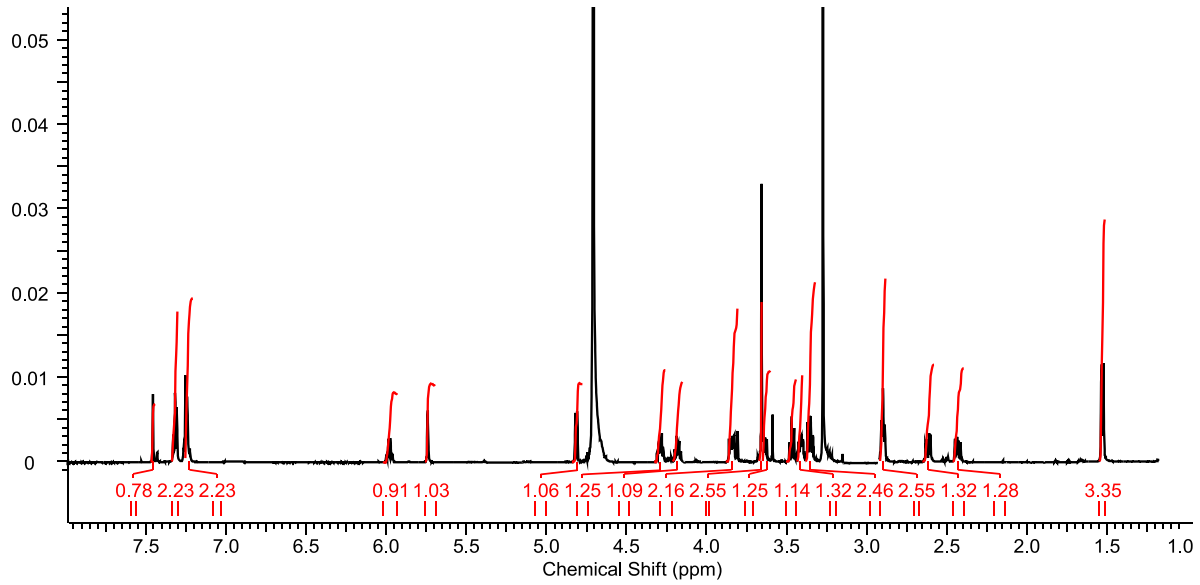
^{1}H NMR (600 MHz, D_2O): 7.45 (s, 1H, H_3), 7.31 (dd, $J_{4'',5''/8'',7''}$= 8Hz, $J_{4'',6''/8'',6''}$= 1.5Hz, 2H, $H_{4'',8''}$), 7.26 (t, $J_{5'',4'',6''/7'',8'',6''}$= 8Hz, 2H, $H_{5'',7''}$), 7.24 (dd, $J_{6'',5''}$= 8Hz, $J_{6'',4''}$= 2Hz, 1H, $H_{6''}$), 5.98 (q, $J_{8,10}$= 7.0Hz, 1H, H_8), 5.73 (s, 1H, H_1), 4.81 (d, $J_{1',2'}$= 7.9Hz, 1H, $H_{1'}$), 4.28 (ddd, $J_{5',4'}$= 9.5Hz, $J_{5',6'a}$= 4.7Hz, $J_{5',6'b}$= 2.4Hz, 1H, $H_{5'}$), 4.17 (dd, $J_{5,6a}$= 9.1Hz, $J_{5,6b}$= 4.4Hz, 1H, H_5), 3.85 (dd, $J_{6'b,6'a}$= 12.3Hz, $J_{6'b,5'}$= 2.4Hz, 1H, $H_{6'b}$), 3.64 (dd, $J_{6'a,6'b}$= 12.4Hz, $J_{6'a,5'}$= 4.7Hz, 1H, $H_{6'a}$), 3.47 (t, $J_{3',4',2'}$= 9.2Hz, 1H, $H_{3'}$), 3.41 (m, 2H, $H_{1''a,3'}$), 3.39 (m, 2H, $H_{1''b,4'}$), 3.23 (s, 3H, H_{12}), 2.89 (t, 2H, $H_{2''}$), 2.62 (dd, $J_{6b,6a}$= 14.4Hz, $J_{6b,5}$= 4.4Hz, 1H, H_{6b}), 2.43 (dd, $J_{6a,6b}$= 14.4Hz, $J_{6a,5}$= 9.1Hz, 1H, H_{6a}), 1.53 (d, $J_{10,8}$=6.9Hz, 3H, H_{10})

^{13}C NMR (600 MHz, D_2O): δ 173.17 (CO, C_7), 168.59 (CO, C_{11}), 155.26 (CH, C_3), 138.24 (C, $C_{3''}$), 127.75 (2xCH, $C_{4'',8''}$), 128.64 (2xCH, $C_{5'',7''}$), 130.84 (C, C_4), 125.98 (C, $C_{6''}$), 124.81 (C, C_9), 109.49 (CH, C_8), 108.26 (CH, C_1), 107.77 (CH, $C_{1'}$), 81.56 (CH, $C_{5'}$), 76.86 (CH, $C_{3'}$), 74.27 (CH, $C_{2'}$), 71.53 (CH, $C_{4'}$), 65.26 (CH_2, $C_{1''}$), 62.24 (CH_2, $C_{6'}$), 52.35 (CH_3, C_{12}), 41.05 (CH_2, C_6), 34.57 (CH_2, $C_{2''}$), 26.06 (CH, C_5), 13.70 (CH_3, C_{10})

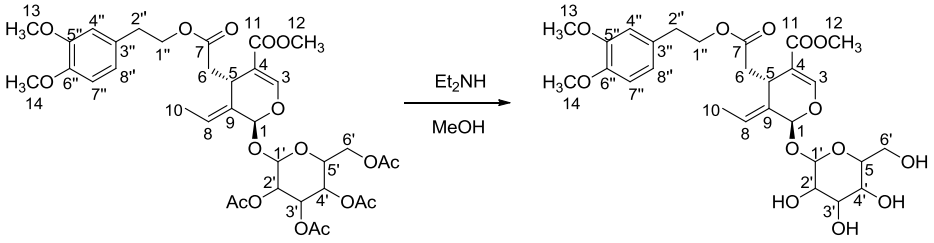
HRMS (ESI+), m/z calcd: 531.1842, found: 531.1838; ($M+Na^+$), calcd: 547.1582, found: 547.1776; ($M+K^+$)

$[\alpha]_D^{20}$ = -350 (c 0.06, MeOH)

❖ **^{1}H NMR**

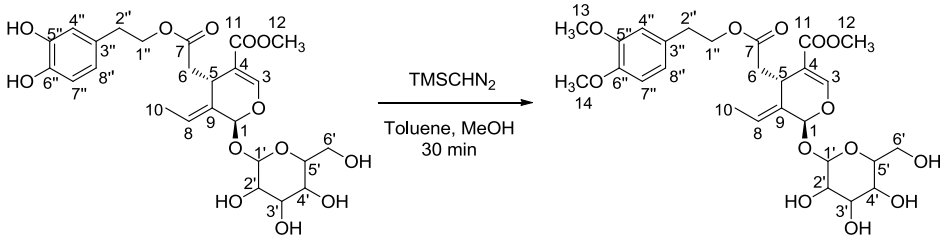


IV.3.e.1.6. Λουσιδουμοσίδης D (66)



(52) (66)

Μέθοδος Α: Σύμφωνα με τη γενική μέθοδο αποπροστασίας, παραλήφθηκαν 0.023 g του (66) (απόδοση 60%), από 0.050 g του (52).



(1) (66)

Μέθοδος Β: Μία άλλη μέθοδος παρασκευής του Λουσιδουμοσίδη D (66) χρησιμοποιεί σαν πρώτη ύλη την ελαιοευρωπεΐνη (1) και περιλαμβάνει την κατεργασία της, για 30 λεπτά, με τριμεθυλο σιλυλο διαζωμεθάνιο ($TMSCHN_2$) και μίγμα τολουολίου και MeOH, ως διαλύτη. 0.200 g καθαρής ελαιοευρωπεΐνης (1), λοιπόν, διαλύονται σε 6 mL τολουολίου και 4 mL MeOH. Έπειτα προστίθενται προσεκτικά, υπό ανάδευση και κατά σταγόνες, 2 mL $TMSCHN_2$ και το αντιδρών μίγμα αφήνεται προς ανάδευση για 30-50 λεπτά, σε θερμοκρασία δωματίου. Έπειτα από τον καθαρισμό του προιόντος με χρωματογραφία στήλης και σύστημα διαλυτών CH_2Cl_2/ MeOH 95:5 → CH_2Cl_2/ MeOH 90:10, παραλήφθηκαν 0.085 g του (66) (απόδοση 40%), από 0.200 g του (1).

Λευκό στερεό προϊόν. M= 568.5669 g/ mol, $C_{27}H_{36}O_{13}$.

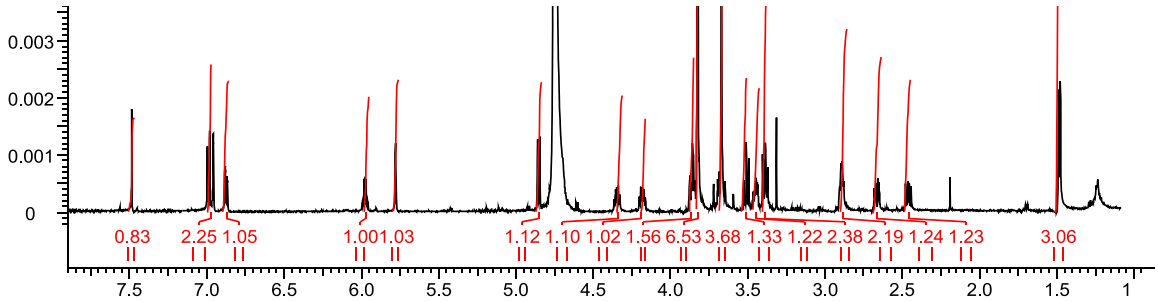
^{1}H NMR (600 MHz, D_2O): 7.49 (s, 1H, H_3), 6.83 (d, $J_{7'',8''}$= 8 Hz, 1H, $H_{7''}$), 6.78 (dd, $J_{8'',7''}$= 8 Hz, $J_{8'',4''}$= 1.7 Hz, 1H, $H_{8''}$), 6.77 (d, $J_{4'',8''}$= 1.7 Hz, 1H, $H_{4''}$), 6.08 (q, $J_{8,10}$= 7.0 Hz, 1H, H_8), 5.79 (s, 1H, H_1), 4.83 (d, $J_{1',2'}$= 7.9 Hz, 1H, $H_{1'}$), 4.30 (ddd, 1H, $H_{5'}$), 4.17 (t, 2H, $H_{1''}$), 4.00 (dd, $J_{5,6a}$= 9.1 Hz, $J_{5,6b}$= 4.4 Hz, 1H, H_5), 3.96 (dd, $J_{6'b,6'a}$= 12.3 Hz, $J_{6'b,5'}$= 2.4 Hz, 1H, $H_{6'b}$), 3.92 (s, 3H, H_{13}), 3.90 (s, 3H, H_{14}), 3.80 (dd, $J_{6'a,6'b}$=12.4Hz, $J_{6'a,5'}$= 4.7 Hz, 1H, $H_{6'a}$), 3.79 (s, 3H, H_{12}), 3.64 (t, $J_{3',4',2'}$= 9.1 Hz, 1H, $H_{3'}$), 3.59 (t, $J_{2',3',1'}$= 8.2 Hz 1H, $H_{2'}$), 2.88 (t, $J_{4',5',3'}$= 9.7 Hz, 1H, $H_{4'}$), 2.82 (dd, $J_{6b,6a}$= 14.4 Hz, $J_{6b,5}$= 4.4 Hz, 1H, H_{6b}), 2.48 (dd, $J_{6a,6b}$= 14.4 Hz, $J_{6a,5}$= 9.1 Hz, 1H, H_{6a}), 1.71 (d, $J_{10,8}$= 6.9 Hz, 3H, H_{10}), 1.28 (t, 2H, $H_{2''}$)

^{13}C NMR (600 MHz, D_2O): δ 173.10 (CO, C_7), 168.58 (CO, C_{11}), 155.26 (CH, C_3), 149.78 (C, $C_{5''}$), 147.03 (C, $C_{6''}$), 137.42 (C, $C_{3''}$), 122.14 (CH, $C_{8''}$), 112.85 (CH, $C_{4''}$), 112.33 (CH, $C_{7''}$), 130.82 (C, C_4), 124.88 (C, C_9), 108.20 (CH, C_1), 109.42 (CH, C_8), 107.76 (CH, $C_{1'}$), 81.54 (CH, $C_{5'}$), 76.85 (CH, $C_{3'}$), 74.27 (CH, $C_{2'}$), 71.53 (CH, $C_{4'}$), 65.28 (CH_2, $C_{1''}$), 62.21 (CH_2, $C_{6'}$), 56.11 (2xCH_3, $C_{13,14}$), 41.06 (CH_2, C_6), 52.35 (CH_3, C_{12}), 34.82 (CH_2, $C_{2''}$), 26.07 (CH, C_5), 13.71 (CH_3, C_{10})

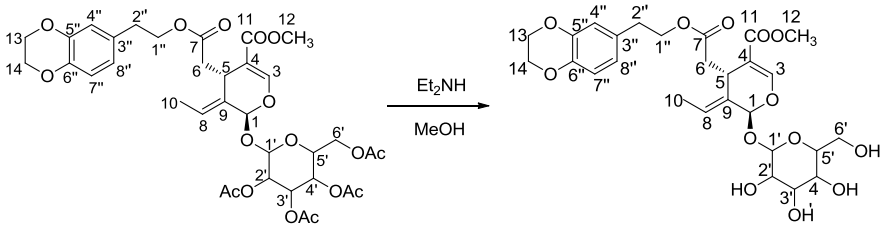
HRMS (ESI+), m/z calcd: 591.2054, found: 591.2044; ($M+Na^+$), calcd: 607.1793, found: 607.1804; ($M+K^+$)

$[\alpha]_D^{20}$= -80 (c 0.05, MeOH)

❖ **^{1}H NMR**



IV.3.e.1.7. 7-(1, 4-βενζοδιοξαν) αιθυλεστέρας 11-μεθυλεστέρας του ολεοσίδη (67)



(53) **(67)**

Σύμφωνα με τη γενική μέθοδο αποπροστασίας, παραλήφθηκαν 0.0196 g του (67) (απόδοση 68%), από 0.037 g του (53).

Λευκό στερεό προϊόν. M= 566.5511 g/ mol, $C_{27}H_{34}O_{13}$.

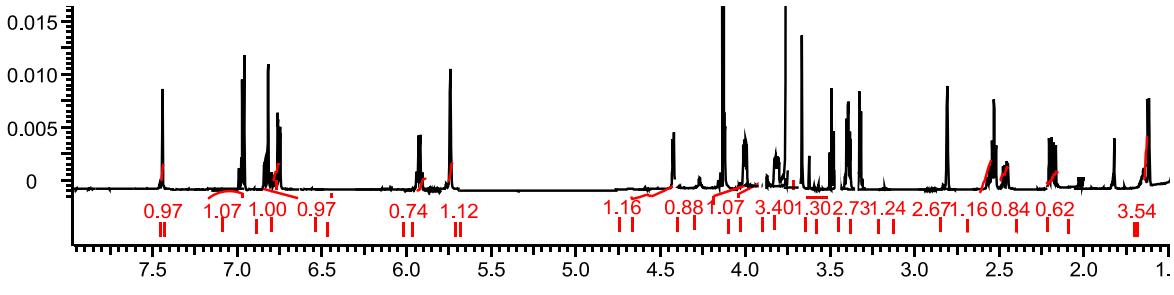
^{1}H NMR (600 MHz, D_2O): 7.42 (s, 1H, H_3), 6.88 (d, $J_{7'',8''}$=8Hz, 1H, $H_{7''}$), 6.79 (d, $J_{4'',8''}$=1.7Hz, 1H, $H_{4''}$), 6.74 (dd, $J_{8'',7''}$= 8Hz, $J_{8'',4''}$=1.7Hz, 1H, $H_{8''}$), 5.95 (q, $J_{8,10}$=7.0Hz, 1H, H_8), 5.74 (s, 1H, H_1), 4.15 (2t, 4H, $H_{13,14}$), 4.12 (t, 2H, $H_{1''}$), 4.02 (m, 1H, $H_{5'}$), 3.82 (m, 1H, H_5), 3.79 (dd, $J_{6'b,6'a}$= 12.3Hz, $J_{6'b,5'}$=2.4Hz, 1H, $H_{6'b}$), 3.65 (s, 3H, H_{12}), 3.54 (dd, $J_{6'a,6'b}$= 12.1Hz, $J_{6'a,5'}$=5.1Hz, 1H, $H_{6'a}$), 3.51 (d, $J_{1',2'}$=7.9Hz, 1H, $H_{1'}$), 3.42 (2xt, 2H, $H_{2',4'}$), 3.38 (t, $J_{3',4',2'}$=9.4Hz, 1H, $H_{3'}$), 2.82 (t, 2H, $H_{2''}$), 2.56 (dd, $J_{6b,6a}$=14.4Hz, $J_{6b,5}$=4.5Hz, 1H, H_{6b}), 2.22 (dd, $J_{6a,6b}$=14.4Hz, $J_{6a,5}$=9.0Hz, 1H, H_{6a}), 1.66 (d, $J_{10,8}$=6.9Hz, 3H, H_{10})

^{13}C NMR (600 MHz, D_2O): 173.11 (CO, C_7), 168.55 (CO, C_{11}), 155.28 (CH, C_3), 148.60 (C, $C_{5''}$), 147.97 (C, $C_{6''}$), 136.39 (C, $C_{3''}$), 130.86 (C, C_4), 124.86 (C, C_9), 121.05 (CH, $C_{8''}$), 114.64 (CH, $C_{7''}$), 112.58 (CH, $C_{4''}$), 109.42 (CH, C_8), 108.24 (CH, C_1), 107.71 (CH, $C_{1'}$), 81.51 (CH, $C_{5'}$), 76.89 (CH, $C_{3'}$), 74.22 (CH, $C_{2'}$), 71.53 (CH, $C_{4'}$), 65.28 (CH_2, $C_{1''}$), 64.23 (2xCH_2, $C_{13,14}$), 62.27 (CH_2, $C_{6'}$), 52.38 (CH_3, C_{12}), 41.04 (CH_2, C_6), 34.88 (CH_2, $C_{2''}$), 26.05 (CH, C_5), 13.79 (CH_3, C_{10})

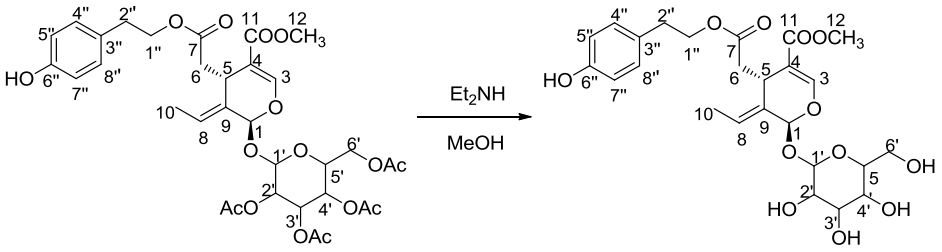
HRMS (ESI+), m/z calcd: 589.1897, found: 589.1896; ($M+Na^+$), calcd: 605.1636, found: 605.1655; ($M+K^+$)

$[\alpha]_D^{20}$= -866 (c 0.03, MeOH)

❖ **^{1}H NMR**



IV.3.e.1.8. Λιγκστροσίδης (68)



(55) **(68)**

Σύμφωνα με τη γενική μέθοδο αποπροστασίας, παραλήφθηκαν 0.045 g του (68) (απόδοση 71%), από 0.090 g του (55).

Λευκό στερεό προϊόν. M= 524.5144 g/ mol, $C_{25}H_{32}O_{12}$.

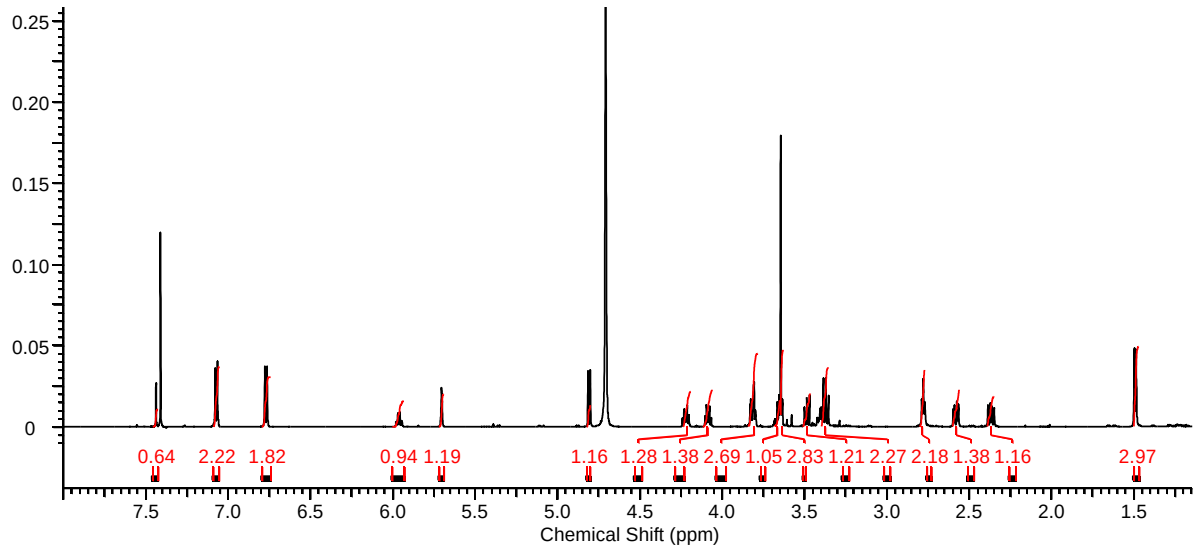
^{1}H NMR (600 MHz, D_2O): 7.46 (s, 1H, H_3), 7.10 (d, $J_{5'',4''/7'',8''}$= 8Hz, 2H, $H_{5'',7''}$), 6.79 (d, $J_{4'',5''/8'',7''}$= 8Hz, 2H, $H_{4'',8''}$), 5.98 (q, $J_{8,10}$= 7.0Hz, 1H, H_8), 5.72 (s, 1H, H_1), 4.82 (d, $J_{1',2'}$= 7.9Hz, 1H, $H_{1'}$), 4.24 (m, 2H, $H_{1''a,5'}$), 4.12 (m, 2H, $H_{1''b,5}$), 3.83 (dd, $J_{6'b,6'a}$= 12.4Hz, $J_{6'b,5'}$= 2.4Hz, 1H, $H_{6'b}$), 3.65 (s, 3H, H_{12}), 3.63 (dd, $J_{6'a,6'b}$= 12.4Hz, $J_{6'a,5'}$= 4.7Hz, 1H, $H_{6'a}$), 3.48 (t, $J_{3',4',2'}$= 9.4Hz, 1H, $H_{3'}$), 3.36-3.39 (2xt, $J_{4',5',3/2',3',1''}$= 9.4Hz, 2H, $H_{4',2'}$), 2.80 (t, 2H, $H_{2''}$), 2.60 (dd, $J_{6b,6a}$=14.4Hz, $J_{6b,5}$=4.4Hz, 1H, H_{6b}), 2.40 (dd, $J_{6a,6b}$=14.4Hz, $J_{6a,5}$=9.1Hz, 1H, H_{6a}), 1.51 (d, $J_{10,8}$=6.9Hz, 3H, H_{10})

^{13}C NMR (600 MHz, D_2O): δ 174.00 (CO, C_7), 168.94 (CO, C_{11}), 154.47 (C, $C_{6''}$), 154.11 (CH, C_3), 130.22 (2xCH, $C_{5'',7''}$), 130.09 (C, $C_{3''}$), 128.14 (C, C_4), 124.96 (C, C_9), 115.39 (2xCH, $C_{4'',8''}$), 107.97 (CH, C_8), 99.41 (CH, C_1), 94.68 (CH, $C_{1'}$), 75.61 (CH, $C_{5'}$), 72.61 (CH, $C_{3'}$), 69.39 (CH, $C_{2'}$), 69.26 (CH, $C_{4'}$), 66.26 (CH_2, $C_{1''}$), 60.61 (CH_2, $C_{6'}$), 51.83 (CH_3, C_{12}), 39.80 (CH_2, C_6), 33.16 (CH_2, $C_{2''}$), 30.21 (CH, C_5), 12.55 (CH_3, C_{10})

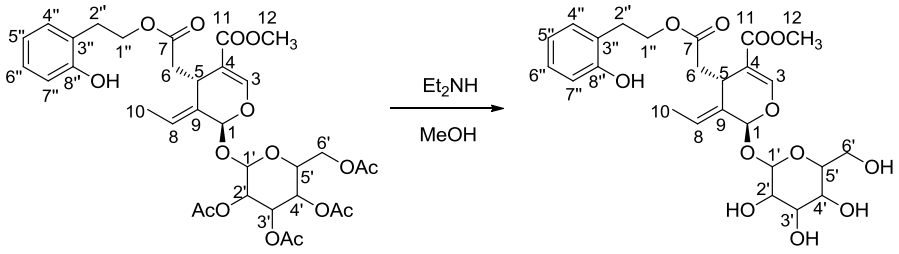
HRMS (ESI+), m/z calcd: 547.1791, found: 547.1813; ($M+Na^+$), calcd: 563.1531, found: 563.1447; ($M+K^+$)

$[\alpha]_D^{20}$= -162 (c 0.06, MeOH)

❖ **^{1}H NMR**



IV.3.e.1.9. 11-μεθυλεστέρας 7-[(2-υδροξυ)-φαινυλαιθυλεστέρας] του ολεοσίδη (69)



(57) **(69)**

Σύμφωνα με τη γενική μέθοδο αποπροστασίας, παραλήφθηκαν 0.020 g του (69) (απόδοση 75%), από 0.035 g του (57).

Λευκό στερεό προϊόν. M= 524.5144 g/ mol, $C_{25}H_{32}O_{12}$.

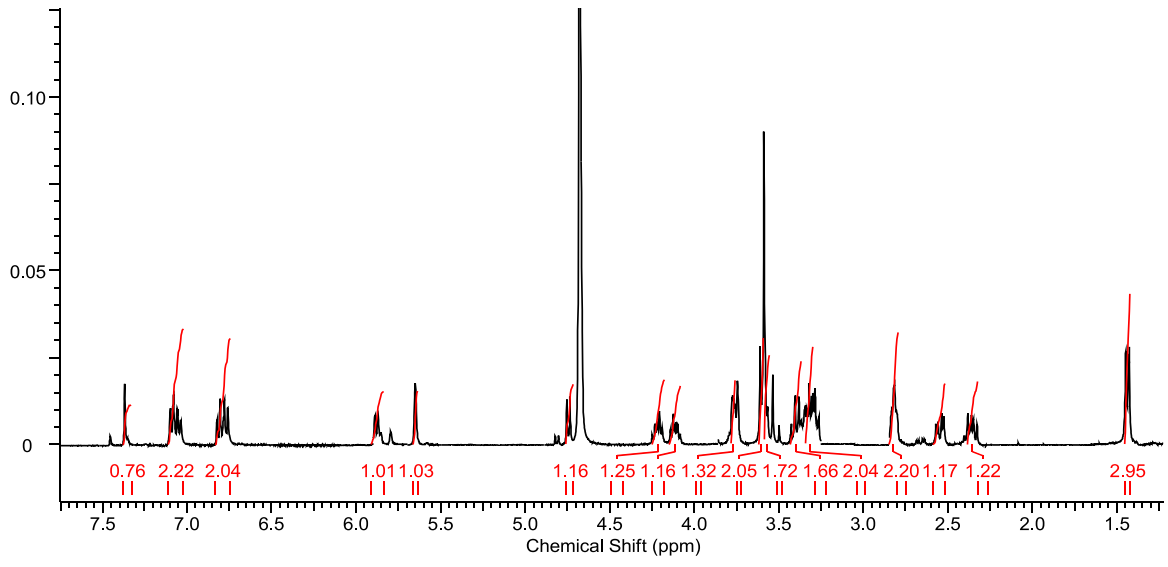
^{1}H NMR (600 MHz, D_2O): 7.37 (s, 1H, H_3), 7.08 (dd, $J_{4'',5''}$= 8 Hz, $J_{4'',6''}$= 1.5Hz, 1H, $H_{4''}$), 7.04 (td, $J_{6'',5'',7''}$= 8 Hz, $J_{6'',4''}$= 1.5 Hz, 1H, $H_{6''}$), 6.81 (td, $J_{5'',4'',6''}$= 8 Hz, $J_{5'',7''}$= 1.5 Hz, 1H, $H_{5''}$), 6.77 (dd, $J_{7'',6''}$= 8 Hz, $J_{7'',5''}$= 1.5 Hz, 1H, $H_{7''}$), 5.87 (q, $J_{8,10}$= 7.0 Hz, 1H, H_8), 5.65 (s, 1H, H_1), 4.73 (d, $J_{1',2'}$= 7.9 Hz, 1H, $H_{1'}$), 4.22 (ddd, $J_{1''a,1''b}$= 12.5 Hz, $J_{1''a,2''a}$= 9.4 Hz, $J_{1''a,2''b}$= 5.4 Hz, 1H, $H_{1''a}$), 4.12 (ddd, $J_{1''b,1''a}$= 12.5 Hz, $J_{1''b,2''a}$= 5.4 Hz, $J_{1''b,2''b}$= 2.4 Hz, 1H, $H_{1''b}$), 3.77 (m, 1H, $H_{5'}$), 3.61 (m, 2H, $H_{5,6'a}$), 3.59 (s, 3H, H_{12}), 3.56 (dd, $J_{6'b,6'a}$= 12.4 Hz, $J_{6'b,5'}$= 2.7 Hz, 1H, $H_{6'b}$), 3.40 (t, $J_{3',4',2'}$= 9.2 Hz, 1H, $H_{3'}$), 3.34 (t, $J_{4',5',3'}$= 9.2 Hz, 1H, $H_{4'}$), 3.29 (t, $J_{2',3',1'}$= 9.2 Hz, 1H, $H_{2'}$), 2.82 (t, 2H, $H_{2''}$), 2.54 (dd, $J_{6b,6a}$= 14.4 Hz, $J_{6b,5}$= 4.4 Hz, 1H, H_{6b}), 2.36 (dd, $J_{6a,6b}$= 14.4 Hz, $J_{6a,5}$= 9.1 Hz, 1H, H_{6a}), 1.44 (d, $J_{10,8}$=6.9 Hz, 3H, H_{10})

^{13}C NMR (600 MHz, D_2O): δ 173.17 (CO, C_7), 168.59 (CO, C_{11}), 155.26 (CH, C_3), 154.82 (C, $C_{8''}$), 130.80 (C, C_4), 130.64 (CH, $C_{4''}$), 127.38 (2xC, $C_{3'',6''}$), 124.82 (C, C_9), 121.28 (CH, $C_{5''}$), 115.82 (CH, $C_{7''}$), 109.49 (CH, C_8), 108.20 (CH, C_1), 107.77 (CH, $C_{1'}$), 81.56 (CH, $C_{5'}$), 76.86 (CH, $C_{3'}$),-74.27 (CH, $C_{2'}$), 71.53 (CH, $C_{4'}$), 65.56 (CH_2, $C_{1''}$), 62.24 (CH_2, $C_{6'}$), 41.05 (CH_2, C_6), 52.35 (CH_3, C_{12}), 28.37 (CH_2, $C_{2''}$), 26.06 (CH, C_5), 13.70 (CH_3, C_{10})

HRMS (ESI+), m/z calcd: 547.1791, found: 547.1813; ($M+Na^+$), calcd: 563.1531, found: 563.1447; ($M+K^+$)

$[\alpha]_D^{20}$= -360 (c 0.05, MeOH)

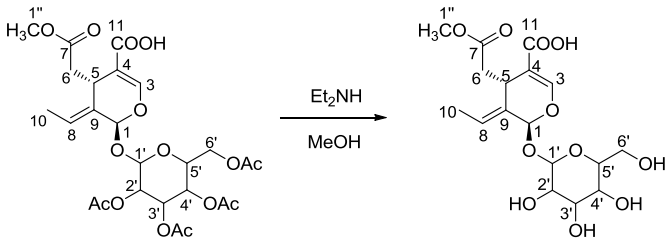
❖ **^{1}H NMR**



IV.3.e.2. Προϊόντα αποπροστασίας του τετραοξικού ολεοσίδη

*IV.3.e.2.1. **Άλκυλο** παράγωγα αποπροστασίας του τετραοξικού ολεοσίδη*

IV.3.e.2.1.1. 7-μεθυλεστέρας του ολεοσίδη (70)



(46) (70)

Σύμφωνα με τη γενική μέθοδο αποπροστασίας, παραλήφθηκαν 0.076 g του (70) (απόδοση 56%), από 0.193 g του (46).

Λευκό στερεό προϊόν. M= 404.3659 g/ mol, $C_{17}H_{24}O_{11}$.

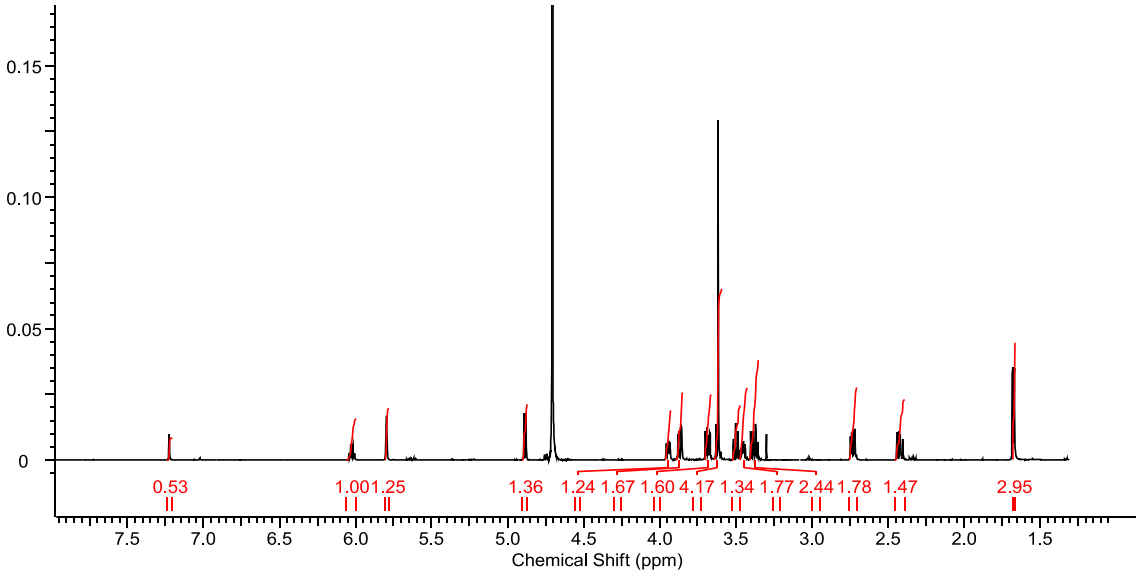
^{1}H NMR (600 MHz, D_2O): δ 7.23 (s, 1H, H_3), 6.02 (q, $J_{8,10}$=7.0 Hz, 1H, H_8), 5.80 (s, 1H, H_1), 4.88 (d, $J_{1',2'}$=7.9 Hz, 1H, $H_{1'}$), 3.94 (ddd, $J_{5',4'}$= 9.7 Hz, $J_{5',6'a}$=4.6Hz, $J_{5',6'b}$= 1.9 Hz, 1H, $H_{5'}$), 3.86 (dd, $J_{6'b,6'a}$= 12.4 Hz, $J_{6'b,5'}$=1.9 Hz, 1H, $H_{6'b}$), 3.72 (s, 3H, $H_{1''}$), 3.69 (dd, $J_{6'a,6'b}$= 12.4 Hz, $J_{6'a,5'}$=4.6 Hz, 1H, $H_{6'a}$), 3.62 (s, 3H, H_{11}), 3.61 (m, 1H, $H_{5'}$), 3.51 (t, $J_{3',4',2'}$=9.4 Hz, 1H, $H_{3'}$), 3.45 (dd, $J_{5,6b}$= 4.4 Hz, $J_{5,6a}$= 8.8 Hz, 1H, H_5), 3.35-3.41 (2xt, $J_{2',3',1'/4',5',3'}$= 9.4 Hz, 2H, $H_{2',4'}$), 2.78 (dd, $J_{6b,6a}$=14.6 Hz, $J_{6b,5}$= 4.4 Hz, 1H, H_{6b}), 2.47 (dd, $J_{6a,6b}$= 14.6 Hz, $J_{6a,5}$= 8.8 Hz, 1H, H_{6a}), 1.72 (d, $J_{10,8}$= 6.9 Hz, 3H, H_{10})

^{13}C NMR (600 MHz, D_2O): δ 174.92 (CO, C_7), 173.87 (CO, C_{11}), 150.20 (CH, C_3), 129.59 (C, C_4), 124.08 (C, C_9), 113.77 (CH, C_8), 99.58 (CH, C_1), 94.41 (CH, $C_{1'}$), 76.31 (CH, $C_{5'}$), 75.72 (CH, $C_{3'}$), 72.72 (CH, $C_{2'}$), 69.50 (CH, $C_{4'}$), 60.64 (CH_2, $C_{6'}$), 52.26 (CH_3, $C_{1''}$), 40.06 (CH_2, C_6), 31.46 (CH, C_5), 12.72 (CH_3, C_{10})

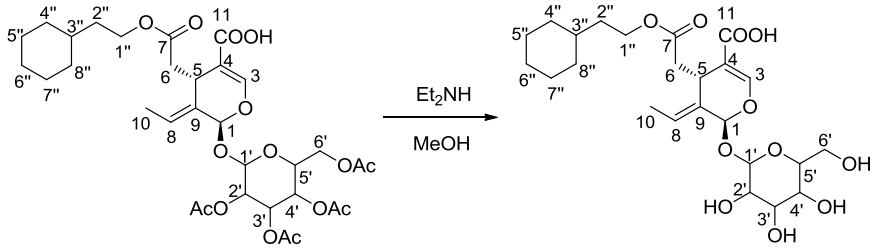
HRMS (ESI+), m/z calcd: 427.1216, found: 427.1302; ($M+Na^+$), calcd: 443.0956, found: 443.1047; ($M+K^+$)

$[\alpha]_D^{20}$= -700 (c 0.03, MeOH)

- **^{1}H NMR**



IV.3.e.2.1.2. 7-(κυκλοεξυλ-αιθυλ) εστέρας του ολεοσίδη (71)



(49) **(71)**

Σύμφωνα με τη γενική μέθοδο αποπροστασίας, παραλήφθηκαν 0.008 g (απόδοση 43%) του (71) από 0.025 g του (49).

Λευκό στερεό προϊόν. M= 500.5360 g/ mol, $C_{24}H_{36}O_{11}$.

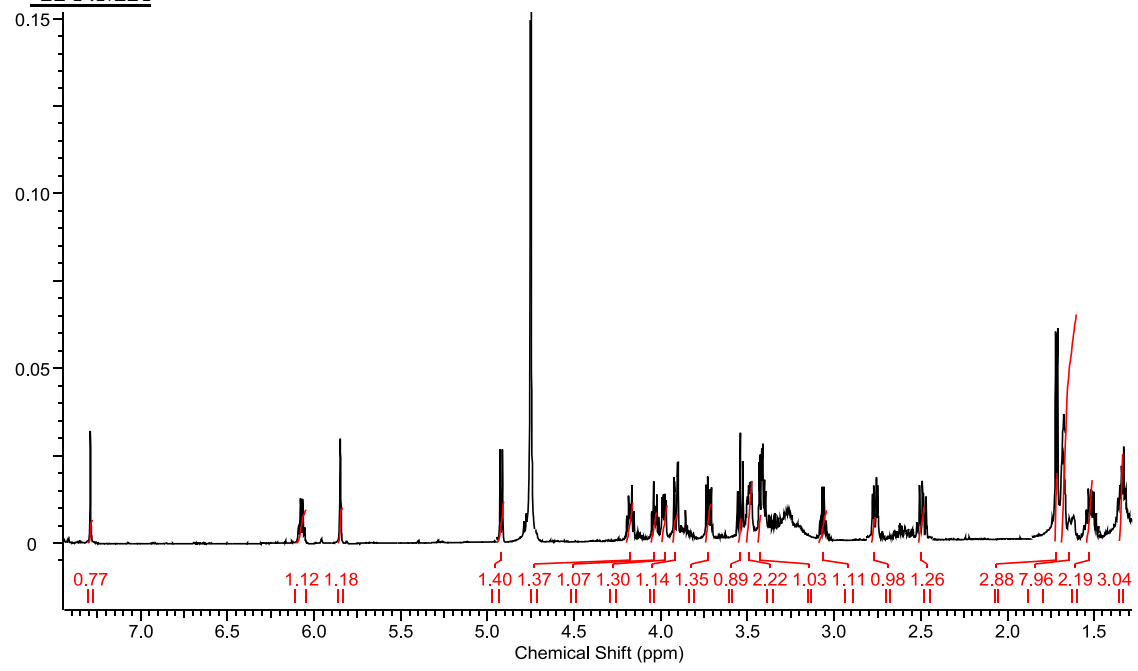
^{1}H NMR (600 MHz, D_2O): 7.29 (s, 1H, H_3), 6.07 (q, $J_{8,10}$= 6.9 Hz, 1H, H_8), 5.85 (s, 1H, H_1), 4.92 (d, $J_{1',2'=}$ 7.9 Hz, 1H, $H_{1'}$), 4.17 (m, 1H, $H_{1''a}$), 4.03 (m, 1H, $H_{1''b}$), 3.98 (m, 1H, H_5), 3.91 (dd, $J_{6'b,6'a}$= 12.4 Hz, $J_{6'b,5'}$= 2.3 Hz, 1H, $H_{6'b}$), 3.72 (dd, $J_{6'a,6'b}$= 12.4 Hz, $J_{6'a,5'}$= 6.1 Hz, 1H, $H_{6'a}$), 3.54 (t, $J_{2',1',3'}$= 9.2 Hz, 1H, $H_{2'}$), 3.52 (m, 1H, $H_{5'}$), 3.49 (m, 1H, $H_{4'}$), 3.42 (m, 1H, $H_{3'}$), 2.76 (dd, $J_{6b,6a}$= 13.5 Hz, $J_{6b,5}$= 4.6 Hz, 1H, H_{6b}), 2.49 (dd, $J_{6a,6b}$= 13.4 Hz, $J_{6a,5}$= 9.8 Hz, 1H, H_{6a}), 1.71 (d, $J_{10,8}$= 6.7 Hz, 3H, H_{10}), 1.69-1.60 (m, 8H, $H_{4'',5'',7'',8''}$), 1.51 (m, 2H, $H_{2''}$), 1.35 (m, 3H, $H_{3'',6''}$)

^{13}C NMR (600 MHz, D_2O): δ 174.64 (CO, C_7), 173.54 (CO, C_{11}), 150.42 (CH, C_3), 129.35 (C, C_9), 124.12 (CH, C_8), 113.26 (C, C_4), 99.06 (CH_2, $C_{1'}$), 93.92 (CH, C_1), 76.27 (CH, $C_{5'}$), 76.00 (CH, $C_{3'}$), 75.79 (CH, $C_{4'}$), 75.52 (CH, $C_{2'}$), 63.82 (CH_2, $C_{1''}$), 60.67 (CH_2, $C_{6'}$), 39.86 (CH_2, C_6), 35.06 (CH_2, $C_{2''}$), 32.52 (2xCH_2, $C_{4'',8''}$), 32.42 (CH, $C_{3''}$), 31.39 (CH, C_5), 25.86 (2xCH_2, $C_{5'',7''}$), 25.76 (CH_2, $C_{6''}$), 12.69 (CH_3, C_{10})

HRMS (ESI+), m/z calcd: 523.2155, found: 523.2161; ($M+Na^+$)

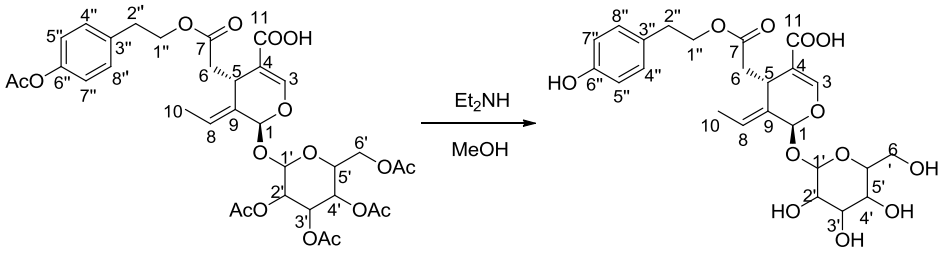
$[\alpha]_D^{20}$= -90.31 (c 0.227, H_2O)

❖ **^{1}H NMR**



IV.3.e.2.2. ***Άρυλο*** *παράγωγα αποπροστασίας του τετραοξικού ολεοσίδη*

IV.3.e.2.2.1. 7-[2-(4-υδροξυφαινυλ)-αιθυλ] εστέρας του ολεοσίδη (72)



(59) **(72)**

Σύμφωνα με τη γενική μέθοδο αποπροστασίας, παραλήφθηκαν 0.006 g (απόδοση 74%) του (72) από 0.017 g του (59).

Λευκό στερεό προϊόν. M= 510.4878 g/ mol, $C_{24}H_{30}O_{12}$.

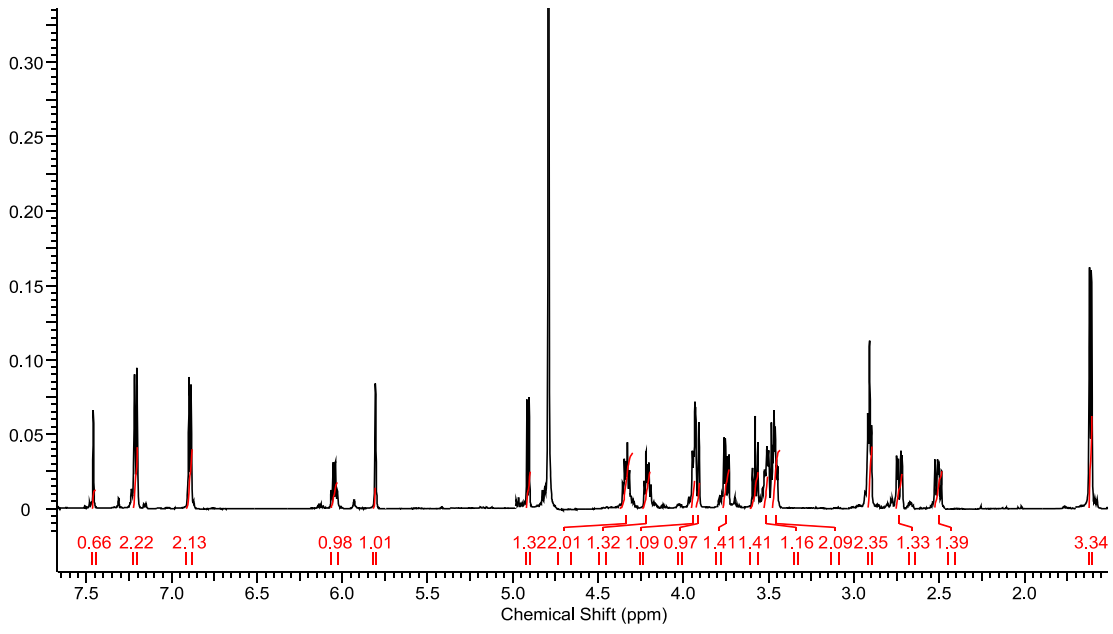
^{1}H NMR (600 MHz, D_2O): 7.46 (s, 1H, H_3), 7.21 (d, $J_{5'',4''/7'',8''}$= 8.5 Hz, 2H, $H_{5'',7''}$), 6.89 (d, $J_{4'',5''/8'',7''}$= 8.1 Hz, 2H, $H_{4'',8''}$), 6.05 (q, $J_{8,10}$= 6.7 Hz, 1H, H_8), 5.81 (s, 1H, H_1), 4.91 (d, $J_{1',2'}$= 8.1 Hz, 1H, $H_{1'}$), 4.34 (m, 1H, $H_{1''a}$), 4.21 (m, 1H, $H_{1''b}$), 3.94 (m, 1H, H_5), 3.93 (dd, $J_{6'a,6'b}$= 12.5 Hz, $J_{6'a,5'}$= 9.7 Hz, 1H, $H_{6'a}$), 3.75 (dd, $J_{6'b,6'a}$= 12.5 Hz, $J_{6'b,5'}$= 5.6 Hz, 1H, $H_{6'b}$), 3.58 (t, $J_{3',4',2'}$= 9.2 Hz, 1H, $H_{3'}$), 3.51 (m, 1H, $H_{5'}$), 3.48 (m, 1H, $H_{4'}$), 3.46 (m, 1H, $H_{2'}$), 2.90 (t, $J_{2'',1''}$= 6.2 Hz, 2H, $H_{2''}$), 2.73 (dd, $J_{6b,6a}$= 13.6 Hz, $J_{6b,5}$= 4.8 Hz, 1H, H_{6b}), 2.50 (dd, $J_{6a,6b}$= 13.6 Hz, $J_{6a,5}$= 9.0 Hz, 1H, H_{6a}), 1.61 (d, $J_{10,8}$= 7.1 Hz, 3H, H_{10})

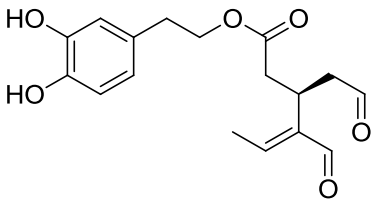
^{13}C NMR (600 MHz, D_2O): δ 174.33 (CO, C_7), 171.55 (CO, C_{11}), 153.94 (C, $C_{6''}$), 152.82 (CH, C_3), 130.29 (2xCH, $C_{5'',7''}$), 130.27 (C, $C_{3''}$), 128.63 (C, C_9), 124.64 (CH, C_8), 115.33 (2xCH, $C_{4'',8''}$), 110.28 (C, C_4), 99.41 (CH, $C_{1'}$), 94.51 (CH, C_1), 76.13 (CH, $C_{5'}$), 75.54 (CH, $C_{3'}$), 72.66 (CH, $C_{2'}$), 69.30 (CH, $C_{4'}$), 66.16 (CH_2, $C_{1''}$), 60.52 (CH_2, $C_{6'}$), 39.65 (CH_2, C_6), 33.11 (CH_2, $C_{2''}$), 30.57 (CH, C_5), 12.44 (CH_3, C_{10})

HRMS (ESI+), m/z calcd: 533.1635, found: 533.1616; ($M+Na^+$)

$[\alpha]_D^{20}$= -81.03 (c 0.290, H_2O)

- **^{1}H NMR**

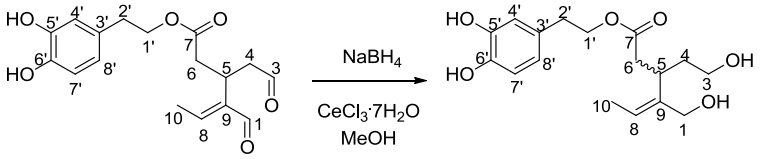



HO
HO
O
O
O
O

IV.4 Ημισύνθεση παραγώγων ολεασίνης

IV.4.a *Σύνθεση αναλόγων με πρώτη ύλη την ολεασίνη*

IV.4.a.1 Αναγωγή – Σύνθεση της διόλης (28)



(2) **(28)**

Σε σφαιρική φιάλη, διαλύονται 0.024 g (1eq) του (2), σε 2 mL MeOH και στο διάλυμα προστίθενται 0.031 g $CeCl_3 \cdot 7H_2O$. Το αντιδρών μίγμα αναδεύεται σε θερμοκρασία δωματίου, για 5 λεπτά, μέχρι διαλύσεως του $CeCl_3 \cdot 7H_2O$. Ακολουθεί ψύξη του μίγματος στους 10°C, με τη βοήθεια παγόλουτρου, και σταδιακή προσθήκη περίπου 0.003 g $NaBH_4$. Κατόπιν ανάδευσης για ακόμα 15 λεπτά και διαπίστωση του τέλους της αντίδρασης με TLC[34], το αντιδρών μίγμα εκχυλίζεται με κορεσμένο υδατικό διάλυμα NH_4Cl και, διαδοχικά, με CH_2Cl_2 και EtOAc. Έπειτα, οι οργανικές φάσεις συλλέγονται, εκχυλίζονται με H_2O και κορεσμένο υδατικό διάλυμα NaCl, ξηραίνονται με άνυδρο Na_2SO_4 και συμπυκνώνονται υπό κενό, για την παραλαβή 0.012 g του (28), σε απόδοση 50% [268].

Άχρωμο ελαιώδες προϊόν. M= 324.3689 g/ mol, $C_{17}H_{24}O_6$.

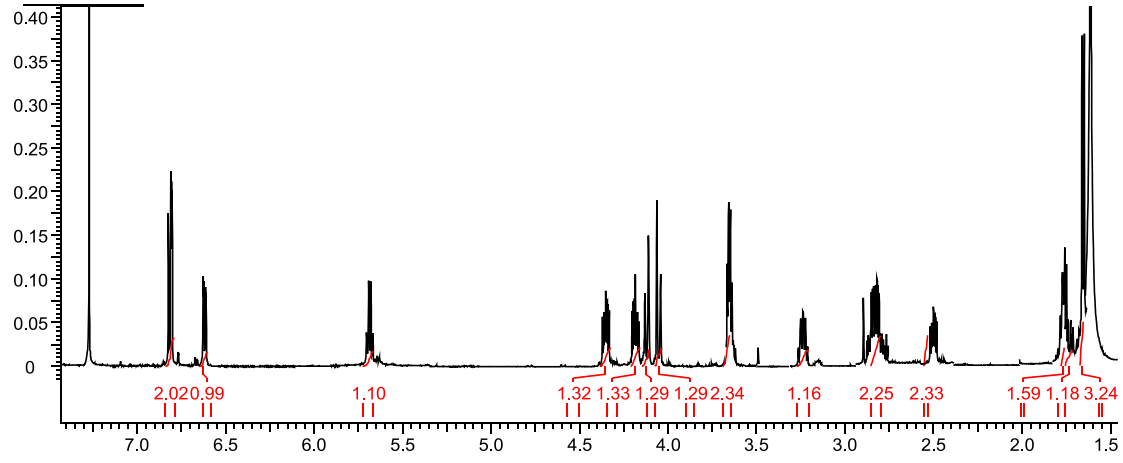
^{1}H NMR (600 MHz, $CDCl_3$): δ 6.81 (d, $J_{7',8'}$= 8.0 Hz, 1H, $H_{7'}$), 6.79 (d, $J_{4',8'}$= 1.9 Hz, 1H, $H_{4'}$), 6.61 (d, $J_{8',7'}$= 8.0 Hz, $J_{8',4'}$= 1.8 Hz, 1H, $H_{8'}$), 5.68 (q, $J_{8,10}$= 7.7 Hz, 1H, H_8), 4.34 (ddd, $J_{1'a,1'b}$= 10.9 Hz, $J_{1'a,2'b}$= 7.7 Hz, $J_{1'a,2'a}$= 4.5 Hz, 1H, $H_{1'a}$), 4.17 (ddd, $J_{1'b,\ 1'a}$= 11.2 Hz, $J_{1'b,\ 2'a}$= 6.8 Hz, $J_{1'b,2'b}$= 4.6 Hz, 1H, $H_{1'b}$), 4.11 (d, $J_{1a,\ 1b}$= 12.0 Hz, 1H, H_{1a}), 4.04 (d, $J_{1b,\ 1a}$= 12.1 Hz, 1H, H_{1b}), 3.65 (m, 2H, H_3), 3.23 (m, 1H, H_5), 2.81 (m, 2H, $H_{2'}$), 2.54 (d, $J_{6,5}$= 7.7Hz, 2H, H_6), 1.75 (m, 1H, H_{4a}), 1.77 (m, 1H, H_{4b}), 1.65 (d, $J_{10,8}$= 6.9 Hz, 3H, H_{10})

^{13}C NMR (600 MHz, $CDCl_3$): δ 172.64 (CO, C_7), 143.76 (C-OH, $C_{5'}$), 143.40 (C-OH, $C_{6'}$), 138.64 (C, C_9), 130.79 (C, $C_{3'}$), 126.17 (CH, C_8), 120.88 (CH, $C_{8'}$), 115.68 (CH, $C_{4'}$), 114.83 (CH, $C_{7'}$), 66.21 (CH_2, C_1), 65.16 (CH_2, $C_{1'}$), 60.27 (CH_2, C_3), 38.98 (CH_2, C_6), 34.98 (CH_2, C_4), 33.82 (CH_2, $C_{2'}$), 32.13 (CH, C_5), 13.10 (CH_3, C_{10})

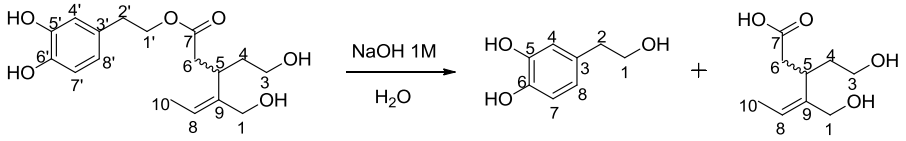
HRMS (ESI-), **m/z** calcd: 323.1495, found: 323.1492;

$[\alpha]_D^{20}$= 0 (c 0.166, $CHCl_3$)

❖ **^{1}H NMR**



IV.4.a.2 Σαπωνοποίηση – Σύνθεση του οξέος(29)



(28) **(4)** **(29)**

Σύμφωνα με τη γνωστή πλέον κλασική μέθοδο σαπωνοποίησης, σε σφαιρική φιάλη ζυγίζονται 0.150 g του (28) και διαλύονται σε 3 mL H_2O. Στη συνέχεια, προστίθεται 1 mL NaOH 1M και το αντιδρών μίγμα αλλάζει αμέσως χρώμα (κόκκινο-καφέ). Αμέσως μετά την προσθήκη του NaOH, η πρόοδος της αντίδρασης ελέγχεται με TLC[34] και το αντιδρών μίγμα αφήνεται σε ανάδευση, σε θερμοκρασία δωματίου, καθ' όλη τη διάρκεια της νύχτας και την επόμενη ημέρα, κατόπιν μικροεκχύλισης με EtOAc, η πρόοδος της αντίδρασης ελέγχεται εκ νέου με TLC[34]. Μετά το τέλος της αντίδρασης, ακολουθεί εξουδετέρωση του NaOH με HCl 1M, προσεκτικά και με ταυτόχρονο έλεγχο του pH, ώστε αυτό να κυμαίνεται περίπου στο 7. Ακολουθεί εκχύλιση με EtOAc, πλύση με κορεσμένο υδατικό διάλυμα NaCl, ξήρανση της οργανικής φάσης με άνυδρο Na_2SO_4 και συμπύκνωση υπό κενό, για παραλαβή, κατόπιν καθαρισμού, με χρωματογραφία στήλης, με σύστημα διαλυτών CH_2Cl_2/MeOH 95:5→90:10, 0.068 g (απόδοση 78%) του επιθυμητού προϊόντος (29) ($R_{f(CH2Cl2/MeOH:\ 85/15)}$= 0.35) [255], [266].

Άχρωμο ελαιώδες προϊόν. M= 188.2209 g/ mol, $C_9H_{16}O_4$.

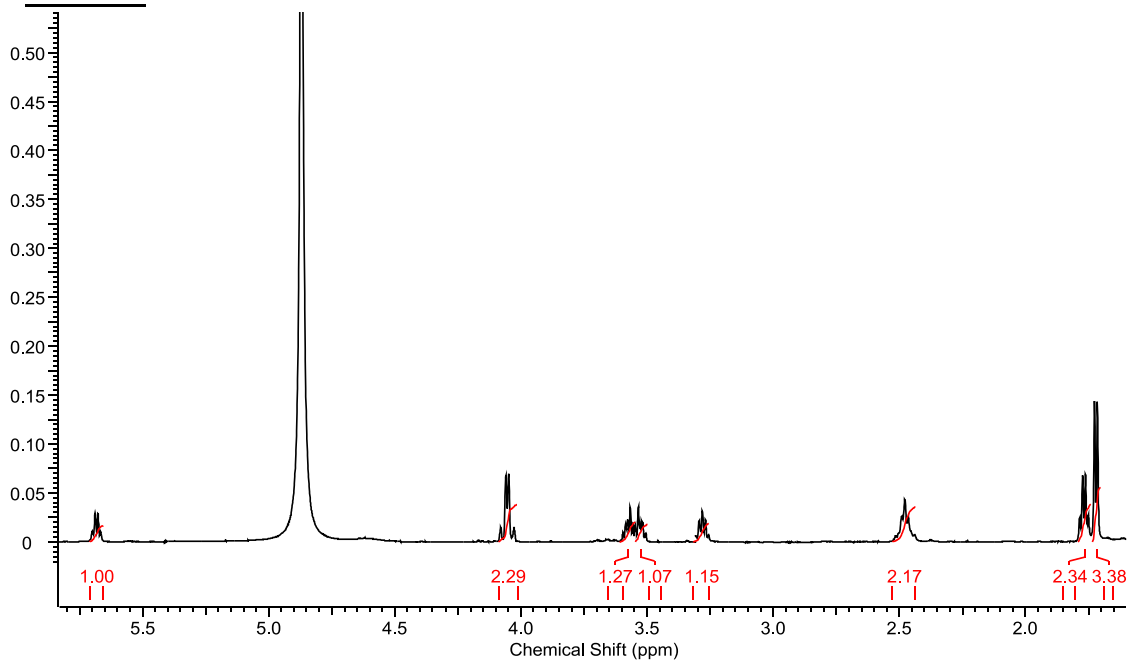
^{1}H NMR (600 MHz, MeOD): δ 5.68 (q, $J_{8,10}$= 6.7 Hz, 1H, H_8), 4.07 (d, $J_{1a,\ 1b}$= 12.8 Hz, 1H, H_{1a}), 4.04 (d, $J_{1b,\ 1a}$= 12.9 Hz, 1H, H_{1b}), 3.55 (m, 2H, H_3), 3.28 (quint, $J_{5,\ 6,\ 4}$= 7.4 Hz, 1H, H_5), 2.48 (m, 2H, H_6), 1.77 (m, 2H, H_4), 1.72 (d, $J_{10,8}$= 6.9 Hz, 3H, H_{10})

^{13}C NMR (600 MHz, MeOD): δ 166.99 (CO, C_7), 139.84 (C, C_9), 123.77 (CH, C_8), 63.27 (CH_2, C_1), 60.34 (CH_2, C_3), 39.15 (CH_2, C_6), 35.67 (CH_2, C_4), 32.32 (CH, C_5), 11.98 (CH_3, C_{10})

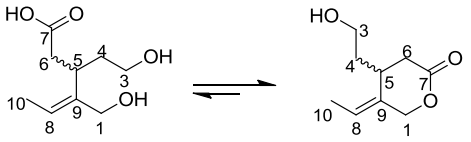
HRMS (ESI-), **m/z** calcd: 187.0970, found: 187.0979;

$[\alpha]_D^{20}$= 0 (c 0.08, MeOH)

❖ **^{1}H NMR**



IV.4.a.3 Κυκλοποίηση του οξέος (29) – Σύνθεση της λακτόνης (30)



(29) **(30)**

Κατά την αποθήκευση του οξέος (29) σε RT, αλλά ακόμα και στους -4°C, για περισσότερο από 30 ημέρες, παρατηρήθηκε μετατροπή μίας ποσότητας αυτού στην αντίστοιχη κλειστή, λακτονική μορφή (30), ενώ αποκαθιστάται η ισορροπία μεταξύ των δύο μορφών, σε συγκεκριμένη αναλογία.

Άχρωμο ελαιώδες προϊόν. M= 170.2057 g/ mol, $C_9H_{14}O_3$.

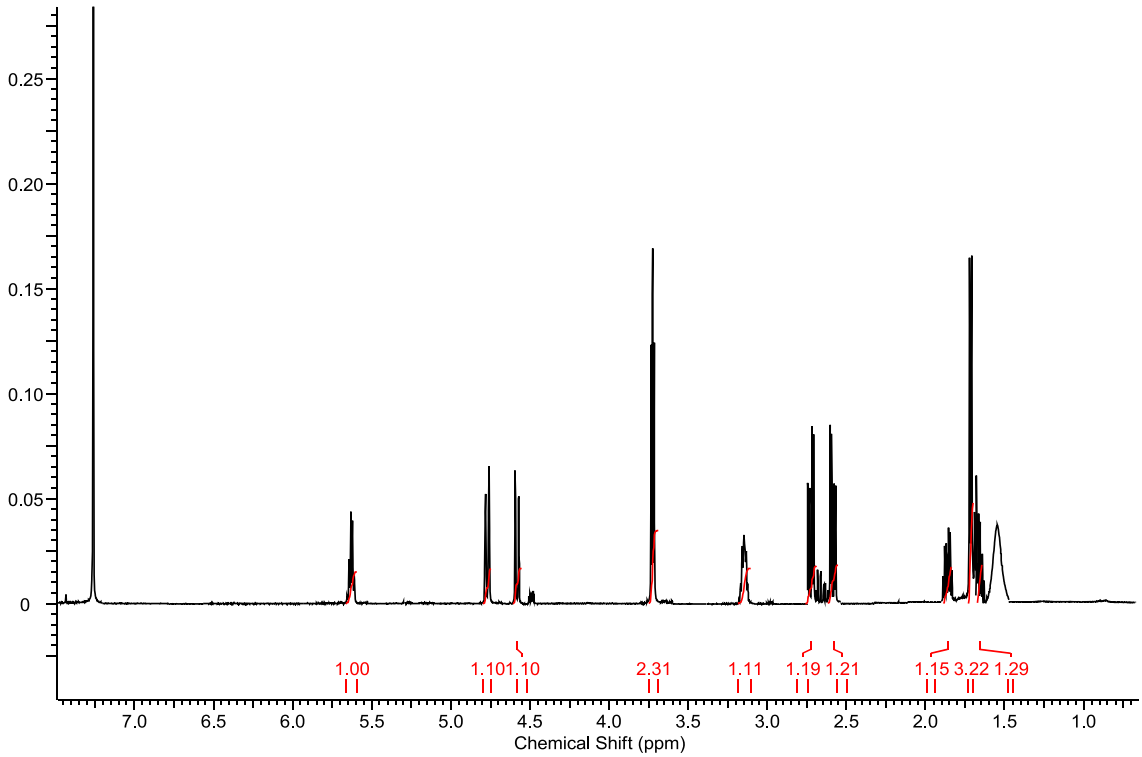
^{1}H NMR (600 MHz, $CDCl_3$): δ 5.63 (q, $J_{8,10}$= 6.9 Hz, 1H, H_8), 4.76 (d, $J_{1a,\ 1b}$= 12.9 Hz, 1H, H_{1a}), 4.58 (d, $J_{1b,\ 1a}$ = 12.9 Hz, 1H, H_{1b}), 3.72 (dd, $J_{3,\ 4a}$= 6.5 Hz, $J_{3,\ 4b}$= 6.0 Hz, 2H, H_3), 3.15 (m, 1H, H_5), 2.73 (dd, $J_{6a,\ 6b}$= 15.8 Hz, $J_{6a,\ 5}$= 6.5 Hz, 1H, H_{6a}), 2.58 (dd, $J_{6b,\ 6a}$= 15.7 Hz, $J_{6b,\ 5}$= 5.6 Hz, 1H, H_{6b}), 1.86 (dd, $J_{4a,\ 4b}$= 12.4 Hz, $J_{4a,\ 5}$= 6.7 Hz, 1H, H_{4a}), 1.71 (d, $J_{10,\ 8}$= 6.9 Hz, 3H, H_{10}), 1.66 (dd, $J_{4b,\ 4a}$= 12.4, $J_{4b,\ 5}$= 6.4 Hz, 1H, H_{4b})

^{13}C NMR (600 MHz, $CDCl_3$): δ 172.44 (CO, C_7), 133.25 (C, C_9), 124.27 (CH, C_8), 72.08 (CH_2, C_1), 60.29 (CH_2, C_3), 37.23 (CH_2, C_4), 35.60 (CH_2, C_6), 29.58 (CH, C_5), 13.91 (CH_3, C_{10})

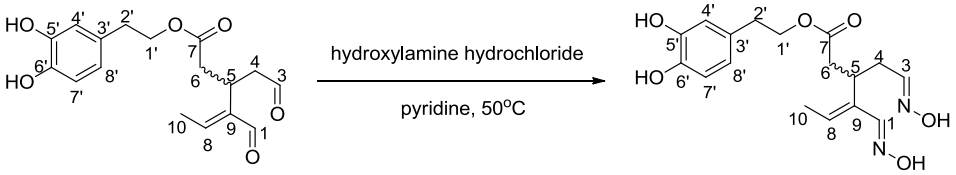
HRMS (ESI-), **m/z** calcd: 170.2057, found: 169.0868;

$[\alpha]_D^{20}$= 0 (c 0.127, $CHCl_3$)

❖ **^{1}H NMR**



IV.4.a.4 Σύνθεση της διοξίμης (31)



(2) **(31)**

0.050 g (1 eq) του (2), διαλύονται σε 1 mL πυριδίνης και κατόπιν προστίθενται στο διάλυμα 0.120 g (10 eq) υδροχλωρικής υδροξυλαμίνης ($NH_2OH{\cdot}HCl$). Το αντιδρών μίγμα αφήνεται σε ανάδευση, στους 50°C, κατά τη διάρκεια της νύχτας και την επόμενη μέρα, η πρόοδος της αντίδρασης ελέγχεται με TLC[34]. Μετά το τέλος της αντίδρασης, το μίγμα εκχυλίζεται με EtOAc και H_2O και ακολουθεί ξήρανση της οργανικής φάσης με άνυδρο Na_2SO_4. Κατόπιν συμπύκνωσης υπό κενό και χρωματογραφίας στήλης, παραλαμβάνονται 0.035 g (απόδοση 64%) του (31) [269].

Άχρωμο ελαιώδες προϊόν. M= 350.3664 g/ mol, $C_{17}H_{22}N_2O_6$.

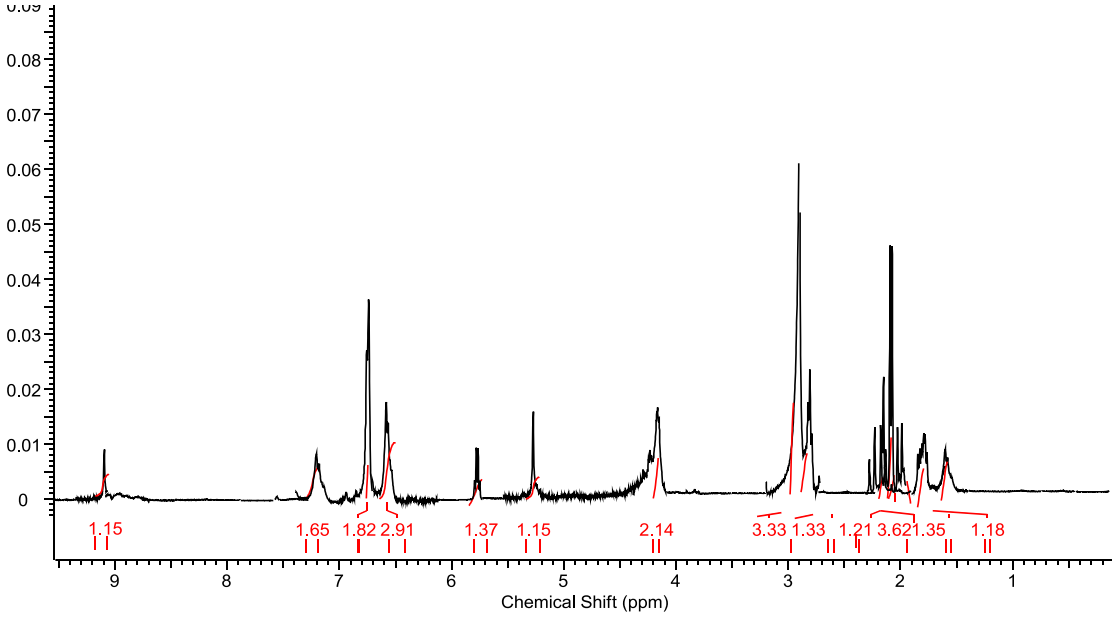
^{1}H NMR (600 MHz, $(CD_3)_2CO$): δ 9.09 (s, 2xN-OH), 7.24 (m, 1H, H_3), 6.75 (d, $J_{7',8'}$= 8.0 Hz, 1H, $H_{7'}$), 6.74 (d, $J_{4',8'}$= 1.9 Hz, 1H, $H_{4'}$), 6.57 (dd, $J_{8',7'}$= 8.0 Hz, $J_{8',4'}$= 1.8 Hz, 1H, $H_{8'}$), 5.86 (q, $J_{8,10}$= 7.0 Hz, 1H, H_8), 5.27 (s, 2xOH (ph)), 4.16 (m, 2H, $H_{1'}$), 2.87 (m, 2H, $H_{2'}$), 2.76 (m, 1H, H_5), 2.22 (dd, $J_{6a,6b}$=14.1 Hz, $J_{6a,5}$= 8.9 Hz, 1H, H_{6a}), 2.12 (d, $J_{10,8}$= 6.5 Hz, 3H, H_{10}), 2.05 (dd, $J_{6b,6a}$= 14.0 Hz, $J_{6b,5}$= 4.4Hz, 1H, H_{6b}), 1.81 (m, 1H, H_{4a}), 1.57 (m, 1H, H_{4b})

^{13}C NMR (600 MHz, $(CD_3)_2CO$): δ 171.60 (CO, C_7), 151.82 (CH, C_3), 150.33 (CH, C_1), 146.88 (C, $C_{5'}$), 145.21 (C, $C_{6'}$), 141.55, (C, C_9), 129.31 (CH, C_8), 120.14 (CH, $C_{8'}$), 115.10 (CH, $C_{7'}$), 115.51 (CH, $C_{4'}$), 131.12 (C, $C_{3'}$), 69.33 (CH_2, $C_{1'}$), 45.06 (CH_2, C_4), 40.12 (CH_2, C_6), 33.93 (CH_2, $C_{2'}$), 29.47 (CH, C_5), 13.30 (CH_3, C_{10})

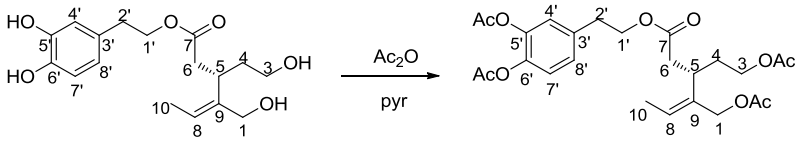
HRMS (ESI-), **m/z** calcd: 349.1400, found: 349.1403;

$[\alpha]_D^{20}$= -3.33 (c 0.150, $CHCl_3$)

- **^{1}H NMR**



IV.4.a.5 Ακετυλίωση – Σύνθεση της ακετυλο διόλης (32)



(28) **(32)**

Σύμφωνα με τη γενική μέθοδο ακετυλίωσης, σε 0.004 g (1eq) του (28) προστίθενται 60 μl πυριδίνης και το μίγμα αναδεύεται, υπό συνθήκες αργού. Κατόπιν, στο διάλυμα προστίθενται 800 μl (35 eq) οξικού ανυδρίτη, στους 0^{o}C και το αντιδρών μίγμα αναδεύεται, σε θερμοκρασία δωματίου, για 2 ώρες, οπότε και διαπιστώνεται, με TLC[34], το τέλος της αντίδρασης. Έπειτα, το μίγμα αραιώνεται με χλωροφόρμιο ($CHCl_3$), πλένεται με νερό στους 0^{o}C, και εξουδετερώνεται, με υδατικό διάλυμα HCl 1M, κατά σταγόνες, μέχρι pH= 5. Το διάλυμα εκχυλίζεται και οι δύο φάσεις, οργανική και υδατική, διαχωρίζονται. Η υδατική φάση εκχυλίζεται περαιτέρω με EtOAc. Οι οργανικές στιβάδες που συλλέγονται ξηραίνονται με άνυδρο θειϊκό νάτριο (Na_2SO_4), συμπυκνώνονται, υπό μειωμένη πίεση και το προκύπτον υπόλειμμα υποβάλλεται σε χρωματογραφία στήλης, απ' όπου παραλαμβάνονται 0.0055 g (απόδοση 92%) του επιθυμητού προϊόντος (32) [255].

Υποκίτρινο ελαιώδες προϊόν. M= 492.5156 g/ mol, $C_{25}H_{32}O_{10}$.

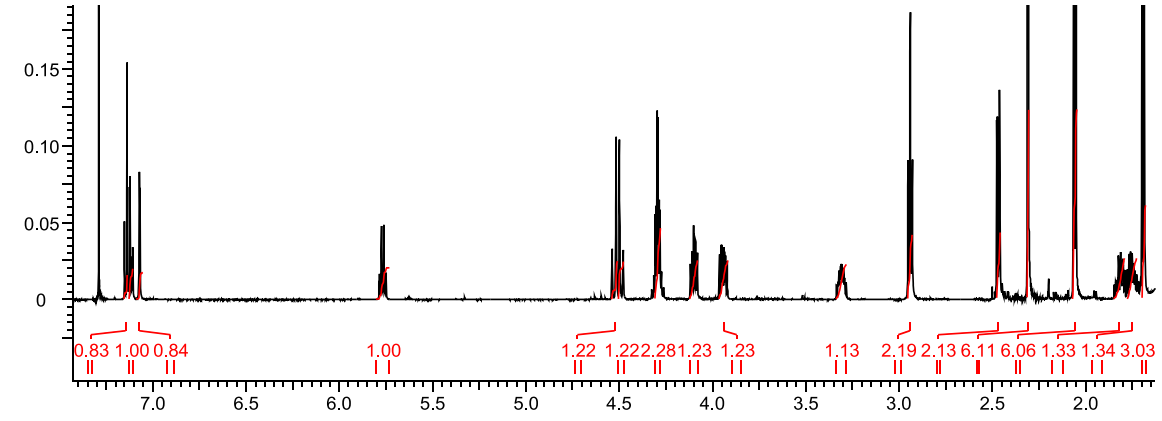
^{1}H NMR (600 MHz, $(CD_3)_2CO$): δ 7.12 (d, $J_{7',8'}$= 8.2 Hz, 1H, $H_{7'}$), 7.09 (dd, $J_{8',7'}$= 8.2 Hz, $J_{8',4'}$= 2.0 1H, $H_{8'}$), 7.04 (d, $J_{4',8'}$= 2.0 Hz, 1H, $H_{4'}$), 5.74 (q, $J_{8,10}$= 7.0 Hz, 1H, H_8), 4.50 (d, $J_{1a,1b}$= 12.4 Hz, 1H, H_{1a}), 4.46 (d, $J_{1b,1a}$= 12.4 Hz, 1H, H_{1b}), 4.27 (t, $J_{1'a,2'}$= 7.1 Hz, 1H, $H_{1'a}$), 4.26 (t, $J_{1'b,2'}$= 6.9 Hz, 1H, $H_{1'b}$), 4.07 (ddd, $J_{3a,3b}$= 11 Hz, $J_{3a,4b}$= 6.4 Hz, $J_{3a,4a}$= 5.1 Hz, 1H, H_{3a}), 3.91 (ddd, $J_{3b,3a}$= 10.9 Hz, $J_{3b,4a}$= 8.2 Hz, $J_{3a,4a}$= 6.2 Hz, 1H, H_{3b}), 3.28 (m, 1H, H_5), 2.91 (t, J= 7.0 Hz, 2H, $H_{2'}$), 2.44 (m, 2H, H_6), 2.28 (2xs, 6H, CH_3(OAc-$C_{5',6'}$)), 2.02-2.03 (2xs, 6H, CH_3(OAc-$C_{1,3}$)), 1.78 (m, 1H, H_{4a}), 1.72 (m, 1H, H_{4b}), 1.66 (d, $J_{10,8}$= 7.1 Hz, 3H, H_{10})

^{13}C NMR (600 MHz, $(CD_3)_2CO$): δ 171.89 (CO, C_7), 170.96 (CO, OAc(C_3)), 170.67 (CO, OAc(C_1)), 168.21 (2xCO, OAc-$C_{5',6'}$), 141.86 (C, $C_{5'}$), 141.28 (C, $C_{6'}$), 136.55 (C, $C_{3'}$), 133.51 (C, C_9), 129.83 (CH, C_8), 126.56 (CH, $C_{8'}$), 123.53 (CH, $C_{4'}$), 122.98 (CH, $C_{7'}$), 65.84 (CH_2, C_1), 64.39 (CH_2, $C_{1'}$), 62.42 (CH_2, C_3), 38.15 (CH_2, C_6), 34.25 (CH_2, $C_{2'}$), 31.73 (CH, C_5), 31.58 (CH_2, C_4), 20.49 (2xCH_3, OAc-$C_{1,3}$), 20.13 (2xCH_3, OAc-$C_{5',6'}$), 12.84 (CH_3, C_{10})

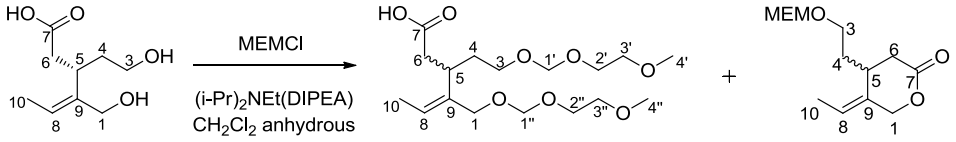
HRMS (ESI+), **m/z** calcd: 515.1893, found: 515.1884; ($M+Na^+$)

$[\alpha]_D^{20}$= -8.00 (c 0.5, $CHCl_3$)

❖ **^{1}H NMR**



IV.4.a.6 Σύνθεση των MEM (μεθοξυαιθοξυμεθυλο) αναλόγων του οξέος (33a) και της λακτόνης (33b)



(29) **(33a)** **(33b)**

Σε διάλυμα 0.008 g του (29) σε 2 mL άνυδρου CH_2Cl_2, προστίθενται, στους 0°C, σταδιακά, 13.6 μl της βάσης N,N-διϊσοπροπυλαιθυλαμίνη ($(i\text{-}Pr)_2Net$(DIPEA)) και ακολουθεί στάγδην προσθήκη 9 μl του MEMCl, διαλυμένων σε μικρή ποσότητα άνυδρου CH_2Cl_2. Αμέσως μετά την προσθήκη, παρατηρείται θολότητα στο αντιδρών μίγμα και αυτό αφήνεται σε ανάδευση, σε θερμοκρασία δωματίου, για δύο ώρες, τουλάχιστον. Ακολουθεί προσθήκη H_2O και, κατόπιν ελέγχου του pH, το μίγμα οξινίζεται με HCl 1M, τόσο ώστε το μετρούμενο pH να μην είναι αλκαλικό. Στην περίπτωσή μας, το pH μετά το τέλος της αντίδρασης ήταν περίπου 5, επομένως δεν χρειάστηκε οξίνιση του μίγματος. Κατόπιν εκχύλισης, 3 φορές, με διαιθυλαιθέρα (Et_2O), ξήρανση της οργανικής φάσης με άνυδρο Na_2SO_4 και συμπύκνωση αυτής υπό κενό, παραλαμβάνονται 0.0018 g (απόδοση 12%) του (33a) και 0.0035 g (απόδοση 32%) (33b) [271].

Λευκό στερεό προϊόν. M= 364.4312 g/ mol, $C_{17}H_{32}O_8$.

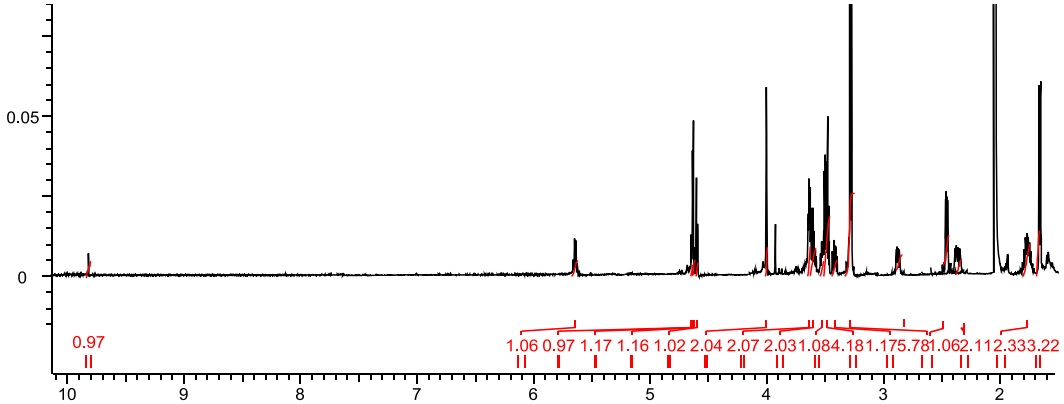
^{1}H NMR (600 MHz, $(CD_3)_2CO$): δ 9.83 (s, OH), 5.65 (q, $J_{8,10}$= 6.9 Hz, 1H, H_8), 4.65 (d, $J_{1'a, 1'b}$= 11.2 Hz, 1H, $H_{1'a}$), 4.64 (d, $J_{1''a, 1''b}$= 5,9 Hz, 1H, $H_{1''a}$), 4.63 (d, $J_{1'b, 1'a}$= 11.1 Hz, 1H, $H_{1'b}$), 4.61 (d, $J_{1''b, 1''a}$= 5,9 Hz, 1H, $H_{1''b}$), 4.01 (brs, 2H, H_1), 3.64 (m, 2H. $H_{2'}$), 3.61 (m, 2H, $H_{2''}$), 3.52 (m, 1H, $H_{3'a}$), 3.50 (m, 2H, $H_{3''}$), 3.48 (m, 2H, H_3), 3.42 (m, 1H, $H_{3'b}$), 3.31 (m, 1H, H_5), 3.30 (2xs, 6H, $H_{4', 4''}$), 2.46 (m, 2H, H_6), 1.78 (m, 2H, H_4), 1.68 (d, $J_{10,8}$= 6.9 Hz, 3H, H_{10})

^{13}C NMR (600 MHz, $(CD_3)_2CO$): δ 173.93 (CO, C_7), 138.08 (C, C_9), 126.53 (CH, C_8), 95.81 (CH_2, $C_{1''}$), 94.72 (CH_2, $C_{1'}$), 72.68 (CH_2, $C_{3''}$), 72.27 (CH_2, C_3), 69.40 (CH_2, C_1), 67.50 (CH_2, $C_{2'}$), 67.38 (CH_2, $C_{2''}$), 66.27 (CH_2, $C_{3'}$), 58.50 (2xCH_3, $C_{4', 4''}$), 38.95 (CH_2, C_6), 33.86 (CH_2, C_4), 32.83 (CH, C_5), 13.03 (CH_3, C_{10})

HRMS (ESI-), **m/z** calcd: 363.2019, found: 363.2022;

$[\alpha]_D^{20}$= 0 (c 0.07, $CHCl_3$)

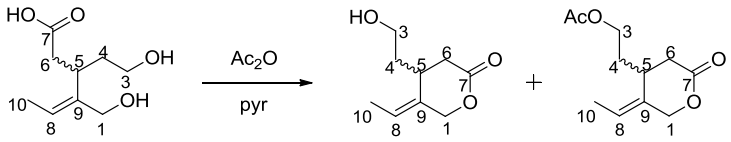
❖ **^{1}H NMR**



Όσον αφορά στο προϊόν (33b), χάριν συντομίας δεν παρατίθενται φασματοσκοπικά δεδομένα ^{1}H NMR, αλλά μόνο μάζας, MS[43].

HRMS (ESI+), **m/z** calcd: calcd: 281.1365, found: 281.1474; ($M+Na^+$)

IV.4.a.7 Ακετυλίωση – Σύνθεση της ακετυλο λακτόνης (34)



(29) **(30)** **(34)**

Σύμφωνα με τη γενική μέθοδο ακετυλίωσης, σε 0.005 g (1 eq) του (29) προστίθενται 150 μl πυριδίνης και το μίγμα αναδεύεται, υπό συνθήκες αργού. Κατόπιν, στο διάλυμα προστίθενται 40 μl (16 eq) οξικού ανυδρίτη, στους 0^oC και το αντιδρών μίγμα αναδεύεται, σε θερμοκρασία δωματίου, για 2 ώρες, οπότε και διαπιστώνεται, με TLC[34], το τέλος της αντίδρασης. Έπειτα, το μίγμα αραιώνεται με χλωροφόρμιο ($CHCl_3$), πλένεται με νερό στους 0^oC, και εξουδετερώνεται, με υδατικό διάλυμα HCl 1M, κατά σταγόνες, μέχρι pH= 5. Το διάλυμα εκχυλίζεται και οι δύο φάσεις, διαχωρίζονται. Η υδατική φάση εκχυλίζεται περαιτέρω με EtOAc. Οι οργανικές στιβάδες που συλλέγονται ξηραίνονται με άνυδρο Na_2SO_4, συμπυκνώνονται, υπό μειωμένη πίεση και το προκύπτον υπόλειμμα υποβάλλεται σε χρωματογραφία στήλης, απ' όπου παραλαμβάνονται 0.003 g (απόδοση 67%) του (34) [255].

Υποκίτρινο ελαιώδες προϊόν. M= 212.2423 g/ mol, $C_{11}H_{16}O_4$.

Από την φασματοσκοπία NMR[39] διαπιστώθηκε ότι πρόκειται για **ρακεμικό μίγμα δύο ισομερών ακετυλιωμένων προϊόντων**, όπως απεικονίζεται παρακάτω από τις χημικές μετατοπίσεις πρωτονίων και ανθράκων.

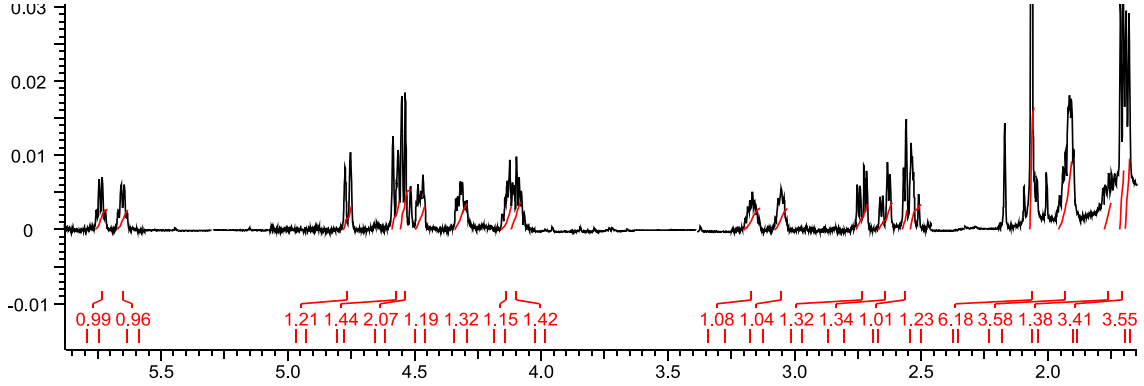
^{1}H NMR (600 MHz, $CDCl_3$): δ 5.73 (q, $J_{8,10}$= 7.3 Hz, 1H, H_8), 5.65 (q, $J_{8,10}$= 7.4 Hz, 1H, H_8), 4.76 (d, $J_{1a,\ 1b}$= 12.9 Hz, 1H, H_{1a}), 4.57 (d, $J_{1a,\ 1b}$= 13.0 Hz, 1H, H_{1a}), 4.56 (d, $J_{1b,\ 1a}$ = 12.0 Hz, 1H, H_{1b}), 4.52 (d, $J_{1b,\ 1a}$ = 12.5 Hz, 1H, H_{1b}), 4.48 (m, 1H, H_{3a}), 4.31 (m, 1H, H_{3b}), 4.11 (m, 2H, H_3), 3.17 (m, 1H, H_5), 3.05 (m, 1H, H_5), 2.73 (dd, $J_{6a,\ 6b}$= 15.6 Hz, $J_{6a,\ 5}$= 6.4 Hz, 1H, H_{6a}), 2.64 (dd, $J_{6a,\ 6b}$= 17.6 Hz, $J_{6a,\ 5}$= 6.3 Hz, 1H, H_{6a}), 2.55 (2xdd, $J_{6b,\ 6a}$= 15.7 Hz, $J_{6b,\ 5}$= 5.6 Hz, 1H, H_{6b}, H_{6b}), 2.06 (s, 6H, OAc, OAc), 1.94 (m, 1H, H_{4a}), 1.91 (m, 2H, H_4), 1.76 (m, 1H, H_{4b}), 1.71 (d, $J_{10,\ 8}$= 7.1 Hz, 3H, H_{10}), 1.69 (d, $J_{10,\ 8}$= 7.1 Hz, 3H, H_{10})

^{13}C NMR (600 MHz, $CDCl_3$): δ 171.88 (CO, C_7), 171.37 (CO, C_7), 170.74 (2xCO, OAc, OAc), 134.27 (C, C_9), 132.95 (C, C_9), 129.72 (CH, C_8), 125.14 (CH, C_8), 71.66 (CH_2, C_1), 68.17 (CH_2, C_3), 66.42 (CH_2, C_1), 61.37 (CH_2, C_3), 31.34 (CH, C_5), 29.79 (CH, C_5), 35.23 (CH_2, C_6), 34.62 (CH_2, C_6), 33.34 (CH_2, C_4), 27.24 (CH_2, C_4), 13.58 (2xCH_3, C_{10}, C_{10})

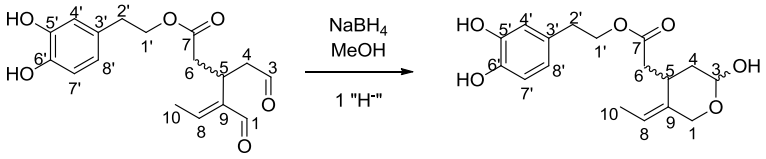
HRMS (ESI+), **m/z** calcd: 235.0946, found: 235.0941; ($M+Na^+$)

$[\alpha]_D^{20}$= 0 (c 0.117, $CHCl_3$)

❖ **^{1}H NMR**



IV.4.a.8 Αναγωγή – Σύνθεση της λακτόλης (35)



(2) (35)

Σύμφωνα με τη μέθοδο αναγωγής της ολεασίνης (2), αρχικά, 0.05 g (1 eq) του (2) διαλύονται σε 2 mL MeOH. Ακολουθεί η προσθήκη του $NaBH_4$, στους 0°C, σταδιακά και το αντιδρών μίγμα αναδεύεται, σε θερμοκρασία περιβάλλοντος, για 15 λεπτά. Μετά το τέλος της αντίδρασης, το αντιδρών μίγμα εκχυλίζεται με κορεσμένο υδατικό διάλυμα χλωριούχου αμμωνίου (NH_4Cl), διχλωρομεθάνιο και EtOAc και έπειτα, με H_2O και υδατικό διάλυμα NaCl. Ακολουθεί συλλογή των οργανικών φάσεων, ξήρανση με Na_2SO_4, συμπύκνωση υπό κενό, και καθαρισμός με χρωματογραφία στήλης και σύστημα διαλυτών CH_2Cl_2/MeOH 99:1→98:2, για την παραλαβή 0.015 g (απόδοση 30%) του (35) ($R_{f(CH2Cl2/MeOH: 95/5)}$= 0.27) [268].

Λευκό στερεό προϊόν. M= 322.3530 g/ mol, $C_{17}H_{22}O_6$.

Από τη φασματοσκοπία NMR[39], υποδεικνύεται ότι πρόκειται για μίγμα δύο στερεοϊσομερών προϊόντων.

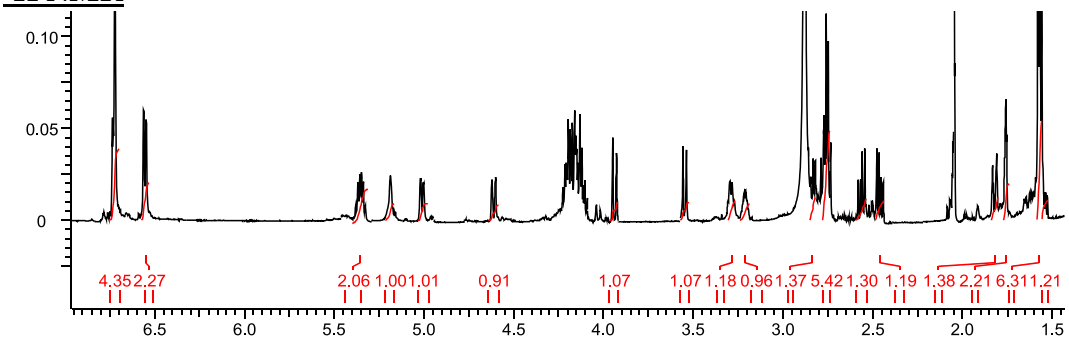
^{1}H NMR (600 MHz, $(CD_3)_2CO$): δ 6.73 (d, $J_{7',8'}$= 7.8 Hz, 2H, $H_{7'}$, $H_{7'}$), 6.72 (d, $J_{4',8'}$= 1.9 Hz, 2H, $H_{4'}$, $H_{4'}$), 6.55 (d, $J_{8',7'}$= 8.0 Hz, $J_{8',4'}$= 1.5 Hz, 2H, $H_{8'}$, $H_{8'}$), 5.35 (2xq, $J_{8,10}$= 6.3 Hz, 2H, H_8, H_8), 5.19 (brs, 1H, H_3), 5.01 (dd, $J_{3,\ 4b\ (trans)}$= 9.4 Hz, $J_{3,\ 4a\ (cis)}$= 2.1 Hz, 1H, H_3), 4.61 (d, $J_{1a,\ 1b}$= 12.1 Hz, 1H, H_{1a}), 3.55 (d, $J_{1b,\ 1a}$= 12.1 Hz, 1H, H_{1b}), 4.19-4.15 (m, 2H, $H_{1'}$), 4.11 (d, $J_{1a,\ 1b}$= 12.2 Hz, 1H, H_{1a}), 4.13-4.09 (m, 2H, $H_{1'}$), 3.94 (d, $J_{1b,\ 1a}$= 12.7 Hz, 1H, H_{1b}), 3.29 (m, 1H, H_5), 3.21 (m, 1H, H_5), 2.84 (dd, $J_{6a,6b=}$ 15.6 Hz, $J_{6a,5}$= 6.3 Hz, 1H, H_{6a}), 2.76 (dd, $J_{6b,6a=}$ 15.0 Hz, $J_{6b,5}$= 7.2 Hz, 1H, H_{6b}), 2.74-2.75 (m, 4H, $H_{2'}$, $H_{2'}$), 2.56 (dd, $J_{6a,6b=}$ 14.2 Hz, $J_{6a,5}$= 8.5 Hz, 1H, H_{6a}), 2.46 (dd, $J_{6b,6a=}$ 14.8 Hz, $J_{6b,5}$= 7.6 Hz, 1H, H_{6b}), 1.83 (m, 1H, H_{4a}), 1.76 (m, 2H, H_4), 1.54 (m, 1H, H_{4b}), 1.57-1.56 (2xd, $J_{10,8}$= 6.4 Hz, 6H, H_{10}, H_{10})

^{13}C NMR (600 MHz, $(CD_3)_2CO$): δ 173.22 (CO, C_7), 172.43 (CO, C_7), 146.20 (2xC-OH, $C_{5'}$, $C_{5'}$), 144.79 (C-OH, $C_{6'}$), 144.38 (C-OH, $C_{6'}$), 137.22 (2xC, C_9, C_9), 130.52 (2xC, $C_{3'}$, $C_{3'}$), 120.82 (2xCH, $C_{8'}$, $C_{8'}$), 120.43 (2xCH, C_8, C_8), 116.95 (2xCH, $C_{4'}$, $C_{4'}$), 114.44 (2xCH, $C_{7'}$, $C_{7'}$), 92.78 (CH, C_3), 92.04 (CH, C_3), 67.57 (CH_2, C_1), 65.57 (CH_2, $C_{1'}$), 65.16 (CH_2, $C_{1'}$), 62.11 (CH_2, C_1), 39.34 (CH_2, C_6), 37.92 (CH_2, C_6), 37.50 (CH_2, C_4), 35.57 (CH_2, C_4), 34.90 (2xCH_2, $C_{2'}$, $C_{2'}$), 30.98 (CH, C_5), 29.74 (CH, C_5), 12.34 (2xCH_3, C_{10}, C_{10})

HRMS (ESI-), **m/z** calcd: 321.1338, found: 321.1330;

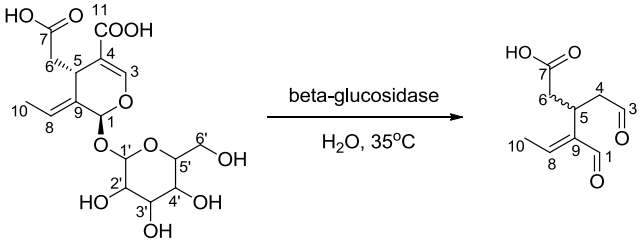
$[\alpha]_D^{20}$= -21.46 (c 0.354, $CHCl_3$)

❖ **^{1}H NMR**



IV.4.b *Σύνθεση αναλόγων με πρώτη ύλη την ελαιοευρωπεΐνη*

IV.4.b.1 Σύνθεση του οξέος (36)



(22) **(36)**

Σύμφωνα με τη μέθοδο ενζυμικής υδρόλυσης, 0.2 g (1 eq) του (22) διαλύονται σε 2 mL H_2O. Κατόπιν, προστίθενται 0.1 g (0.5 eq) β-γλυκοσιδάσης και το αντιδρών μίγμα αφήνεται σε ανάδευση, σε επωαστή ελεγχόμενης θερμοκρασίας, στους 35°C, για 12 ώρες. Μετά την περάτωση της αντίδρασης, πραγματοποιείται SPE[38] εκχύλιση, προς απομάκρυνση του ενζύμου και διαχωρισμό του από το προϊόν της αντίδρασης και, κατόπιν εκχύλισης με EtOAc και συμπύκνωσης της οργανικής φάσης, υπό κενό, παραλαμβάνονται 0.040 g (απόδοση 42%) του (36) ($R_{f(CH2Cl2/MeOH: 95/5)}$= 0.18) [32].

Άχρωμο ελαιώδες προϊόν. M= 184.1892 g/ mol, $C_9H_{12}O_4$.

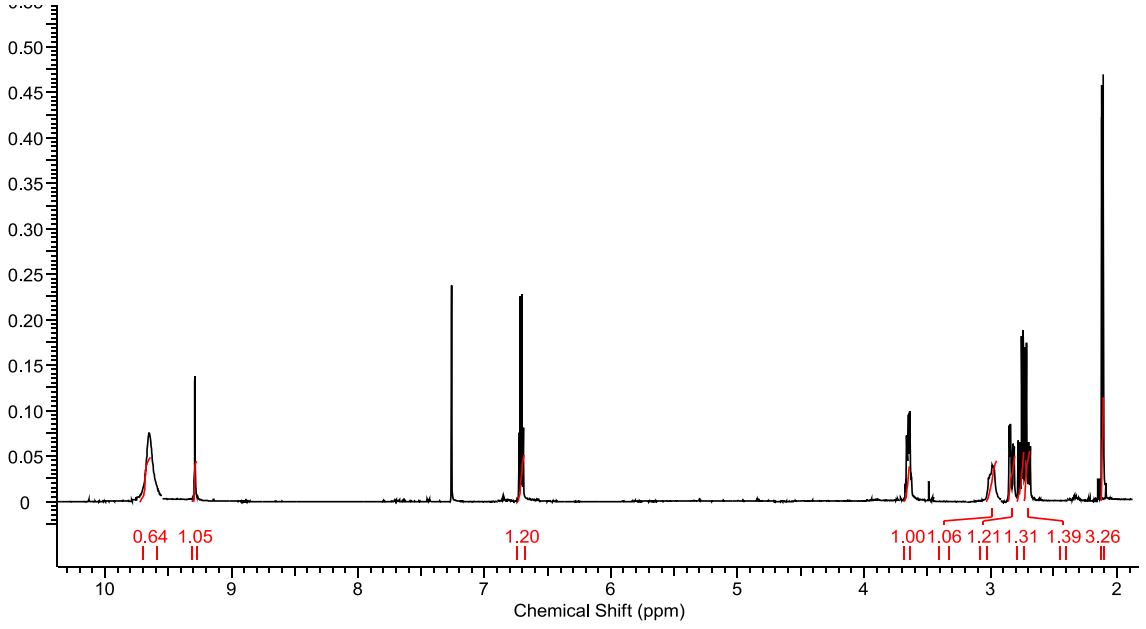
^{1}H NMR (600 MHz, $CDCl_3$): δ 9.68 (brs, 1H, H_1), 9.30 (d, J= 1.9 Hz, 1H, H_3), 6.72 (q, $J_{8,10}$= 7.0 Hz, 1H, H_8), 3.65 (m, 1H, H_5), 3.02 (dd, $J_{6a,6b}$= 18.5 Hz, $J_{6a,5}$= 8.3 Hz, 1H, H_{6a}), 2.85 (dd, $J_{6b,6a}$= 18.1 Hz, $J_{6b,5}$= 5.7 Hz, 1H, H_{6b}), 2.78 (dd, $J_{4a,4b}$= 16.8 Hz, $J_{4a,5}$= 8.9 Hz, 1H, H_{4a}), 2.71 (dd, $J_{4b,4a}$= 16.4 Hz, $J_{4b,5}$= 6.2 Hz, 1H, H_{4b}), 2.12 (d, $J_{10,8}$= 7.4 Hz, 3H, H_{10})

^{13}C NMR (600 MHz, $CDCl_3$): δ 200.29 (CH, C_1), 195.11 (CH, C_3), 176.87 (CO, C_7), 154.57 (CH, C_8), 143.17 (CH, C_9), 63.27 (CH_2, C_1), 45.68 (CH_2, C_6), 35.94 (CH_2, C_4), 26.51 (CH_2, C_5), 14.91 (CH_3, C_{10})

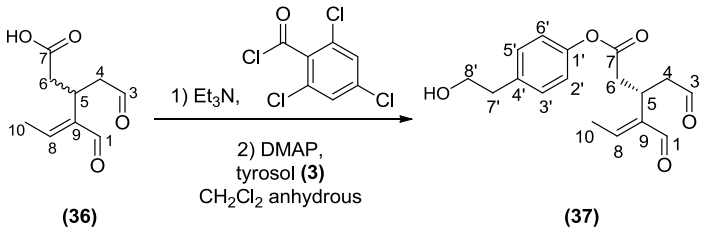
HRMS (ESI-), **m/z** calcd: 183.0657, found: 183.0652;

$[\alpha]_D^{20}$= 0 (c 0.409, $CHCl_3$)

❖ **^{1}H NMR**



IV.4.b.2 Σύνθεση της ισο-ολεοκανθάλης (37)



(36) **(37)**

Σύμφωνα με τη γενική μέθοδο εστεροποίησης, 0.0097 g (1eq) του (36) διαλύονται σε 3 mL CH_2Cl_2, υπό συνθήκες αργού. Έπειτα προστίθενται 19.6 μl (1.2x2 eq) του 2,4,6-τριχλωροβενζόϋλο χλωρίδιο και 20.6 μl (1.4x2 eq) της Et_3N, στους 0^oC, το μίγμα αναδεύεται για 2 ώρες σε συνθήκες περιβάλλοντος (RT) και το διάλυμα γίνεται πορτοκαλί. Μίγμα 0.0109 g (1.5 eq) τυροσόλης (19) με 0.009 g (1.4 eq) DMAP, διαλυμένα σε 1 mL CH_2Cl_2 προστίθεται κατόπιν, κατά σταγόνες, στο αντιδρών μίγμα, στους 0^oC. Έπειτα από 2h30min ανάδευσης, στο μίγμα προστίθεται υδατικό διάλυμα χλωριούχου αμμωνίου (NH_4Cl), κατά σταγόνες, μέχρι pH= 5-6 και το μίγμα εκχυλίζεται 2 φορές, με 30 mL CH_2Cl_2. Η υδατική στιβάδα εκχυλίζεται εκ νέου, 2 φορές με EtOAc, και οι οργανικές στιβάδες συλλέγονται και ξηραίνονται με Na_2SO_4. Ακολουθεί διήθηση υπό κενό, πλύση με CH_2Cl_2, εξάτμιση του διαλύτη και καθαρισμός του προϊόντος, με prep-TLC[34], για παραλαβή 0.0072 g (απόδοση 45%) του (37) ($R_{f(CH2Cl2/MeOH: 95/5)}$= 0.37) [255].

Λευκό στερεό προϊόν. M= 304.3377 g/ mol, $C_{17}H_{20}O_5$.

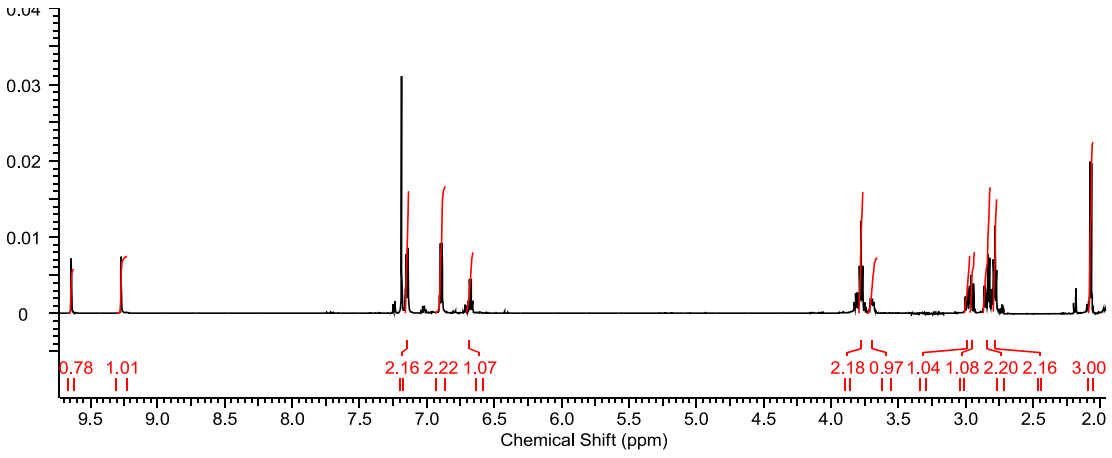
^{1}H NMR (600 MHz, $CDCl_3$): δ 9.71 (brs, 1H, H_1), 9.34 (d, $J_{3,4}$= 1.8 Hz, 1H, H_3), 7.22 (d, $J_{3',2'/5',6'}$= 7.8 Hz, 2H, $H_{3',5'}$), 6.96 (d, $J_{2',3'/6',5'}$= 7.8 Hz, 2H, $H_{2',6'}$), 6.75 (q, $J_{8,10}$= 7.0 Hz, 1H, H_8), 3.85 (t, $J_{8',7'}$= 6.5 Hz, 2H, $H_{8'}$), 3.76 (m, 1H, H_5), 3.06 (dd, $J_{6a,6b}$= 11.8 Hz, $J_{6a,5}$= 8.2 Hz, 1H, H_{6a}), 3.03 (m, 1H, H_{4a}), 2.92 (dd, $J_{6b,6a}$= 11.1 Hz, $J_{6b,5}$= 6.2 Hz, 1H, H_{4b}), 2.88 (m, 1H, H_{6b}), 2.85 (t, $J_{7',8'}$= 6.8 Hz, 2H, $H_{7'}$), 2.14 (d, $J_{10,8}$= 7.3 Hz, 3H, H_{10})

^{13}C NMR (600 MHz, $CDCl_3$): δ 200.20 (CH, C_1), 195.13 (CH, C_3), 170.63 (CO, C_7), 154.68 (CH, C_8), 143.23 (C, C_9), 149.07 (C, $C_{1'}$), 136.24 (C, $C_{4'}$), 129.94 (2xCH, $C_{3',5'}$), 121.54 (2xCH, $C_{2',6'}$), 63.35 (CH_2, $C_{8'}$), 46.13 (CH_2, C_4), 38.48 (CH_2, $C_{7'}$), 36.59 (CH_2, C_6), 26.95 (CH, C_5), 15.25 (CH_3, C_{10})

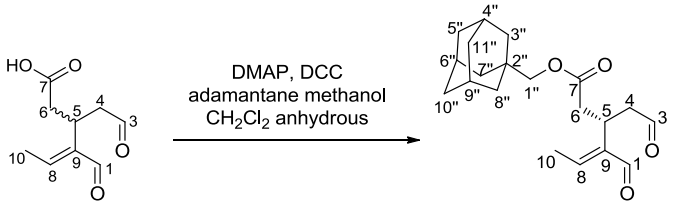
HRMS (ESI+), **m/z** calcd: 327.1208, found: 327.1248; ($M+Na^+$)

$[\alpha]_D^{20}$= -3.52 (c 0.227, $CHCl_3$)

❖ **^{1}H NMR**



IV.4.b.3 Σύνθεση του αδαμαντανο αναλόγου (38)



(36) **(38)**

Σύμφωνα με τη μέθοδο εστεροποίησης κατά Steglisch, 0.0175 g (1 eq) του (36) διαλύονται σε άνυδρο CH_2Cl_2. Έπειτα, προστίθενται 0.020 g (1.25 eq) της αδαμαντανο-μεθανόλης, καθώς και καταλυτική ποσότητα 0.0023 g (0.2 eq) 4-DMAP. Ακολουθεί προσθήκη ισομοριακής ποσότητας 0.0196 g (1 eq) DCC και το αντιδρών μίγμα αναδεύεται για τρεις ώρες, σε θερμοκρασία περιβάλλοντος. Κατόπιν διαπίστωσης του τέλους της αντίδρασης με TLC[34], το μίγμα διηθείται από ηθμό Hirsch και το διήθημα συμπυκνώνεται υπό κενό. Το προκύπτον υπόλειμμα κατεργάζεται με EtOAc, ενώ το στερεό αποβάλλεται, ως ίζημα και διηθείται εκ νέου από πτυχωτό ηθμό. Το διήθημα ακολούθως εκπλένεται με HCl 1M, H_2O, κορεσμένο υδατικό διάλυμα $NaHCO_3$ και κορεσμένο υδατικό διάλυμα NaCl. Κατόπιν ξήρανσης της οργανικής φάσης με άνυδρο Na_2SO_4, συμπύκνωσης υπό κενό, καθαρισμού με χρωματογραφία στήλης και prep-TLC[34], παραλαμβάνονται 0.004 g (απόδοση 13%) του (38) [272].

Λευκό στερεό προϊόν. M= 332.4339 g/ mol, $C_{20}H_{28}O_4$.

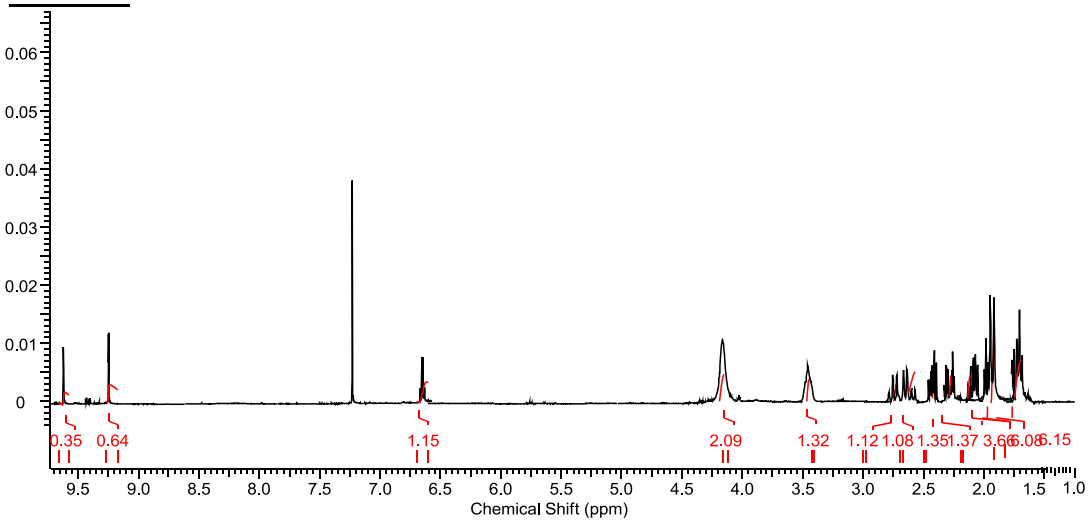
^{1}H NMR (600 MHz, $CDCl_3$): δ 9.65 (brs, 1H, H_1), 9.28 (d, $J_{3,4}$= 2.0 Hz, 1H, H_3), 6.68 (q, $J_{8,10}$= 7.3 Hz, 1H, H_8), 4.16 (2xbrs, 2H, $H_{1'}$), 3.45 (m, 1H, H_5), 2.75 (dd, $J_{6a,6b}$=14.7 Hz, $J_{6a,5}$=9.0 Hz, 1H, H_{6a}), 2.65 (dd, $J_{6b,6a}$= 14.7 Hz, $J_{6b,5}$= 4.4 Hz, 1H, H_{6b}), 2.43 (m, 1H, H_{4a}), 2.30 (m, H, H_{4b}), 2.10 (m, 2H, $H_{4',6'}$), 2.01 (m, 1H, $H_{8'}$), 1.95 (d, $J_{10,8}$= 7.1 Hz, 3H, H_{10}), 1.71 (m, 12H, $H_{3'\text{-}7',9'\text{-}11'}$)

^{13}C NMR (600 MHz, $CDCl_3$): δ 200.08 (CH, C_1), 196.22 (CH, C_3), 171.01 (CO, C_7), 154.25 (CH, C_8), 142.87 (C, C_9), 73.13 (CH_2, $C_{1'}$), 46.01 (CH_2, C_4), 39.12 (3xCH_2, $C_{3',9',10'}$), 36.89 (CH_2, C_6), 36.12 (3xCH_2, $C_{5',7',11'}$), 29.98 (C, $C_{2'}$), 27.90 (3xCH, $C_{4',6',8'}$), 26.95 (CH, C_5), 15.92 (CH_3, C_{10})

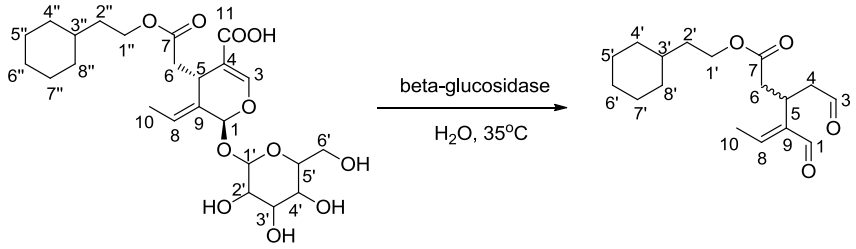
HRMS (ESI+), **m/z** calcd: 355.1885, found: 355.1883; ($M+Na^+$)

$[\alpha]_D^{20}$= 0 (c 0.072, $CHCl_3$)

❖ **^{1}H NMR**



IV.4.b.4 Σύνθεση του κυκλοεξυλαιθυλο αναλόγου (39)



(71) **(39)**

Σύμφωνα με τη μέθοδο ενζυμικής υδρόλυσης με β-γλυκοσιδάση, 0.008 g (1 eq) του (71) διαλύονται σε 2 mL H_2O. Κατόπιν, προστίθενται 0.004 g β-γλυκοσιδάσης και το αντιδρών μίγμα αφήνεται σε ανάδευση, σε επωαστήρα ελεγχόμενης θερμοκρασίας, στους 35°C, για 20 περίπου ώρες. Μετά την περάτωση της αντίδρασης, πραγματοποιείται SPE[38] εκχύλιση, προς απομάκρυνση του ενζύμου και διαχωρισμό του από το προϊόν της αντίδρασης και, κατόπιν εκχύλισης με EtOAc και συμπύκνωσης της οργανικής φάσης, υπό κενό, παραλαμβάνονται 0.003 g (απόδοση 64%) του (39) [32].

Λευκό στερεό προϊόν. M= 294.3859 g/ mol, $C_{17}H_{26}O_4$.

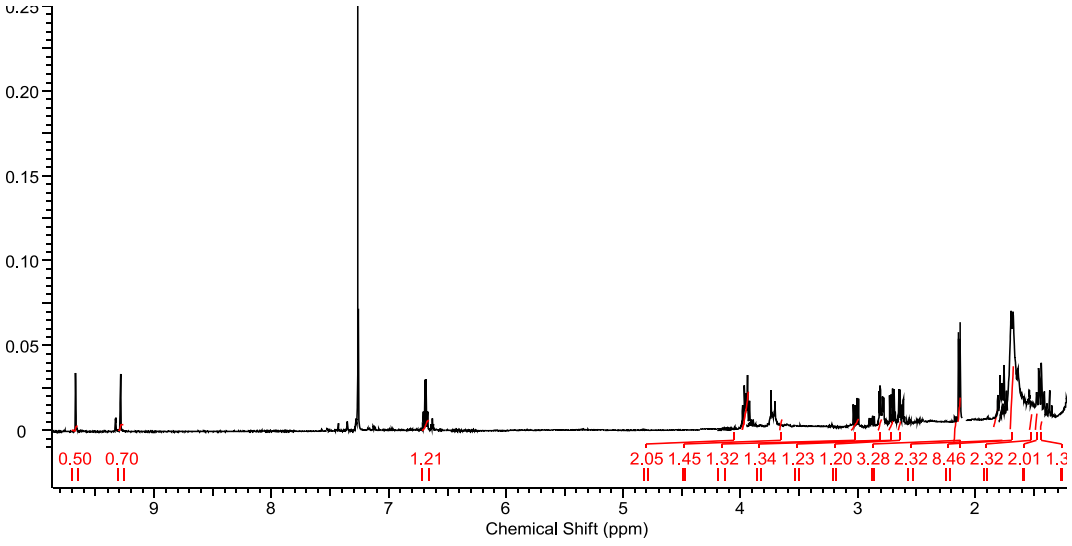
^{1}H NMR (600 MHz, D_2O): δ 9.67 (brs, 1H, H_1), 9.29 (d, $J_{3,4}$= 1.3 Hz, 1H, H_3), 6.68 (q, $J_{8,10}$= 7.1 Hz, 1H, H_8), 4.05 (m, 2H, $H_{1'}$), 3.64 (m, 1H, H_5), 3.01 (dd, $J_{4a,4b}$=18.2 Hz, $J_{4a,5}$= 8.7 Hz, $J_{4a,3}$= 1.2 Hz, 1H, H_{4a}), 2.80 (dd, $J_{4b,4a}$= 18.3 Hz, $J_{4b,5}$= 5.4 Hz, $J_{4b,3}$= 0.6 Hz, 1H, H_{4b}), 2.71 (dd, $J_{6a,6b}$= 15.9 Hz, $J_{6a,5}$= 8.5 Hz, 1H, H_{6a}), 2.63 (dd, $J_{6b,6a}$= 16.0 Hz, $J_{6b,5}$= 6.5 Hz, 1H, H_{6b}), 2.13 (d, $J_{10,8}$= 7.0 Hz, 3H, H_{10}), 1.69 (m, 8H, $H_{4',5',7',8'}$), 1.52 (m, 2H, $H_{2'}$), 1.47 (m, 2H, $H_{6'}$), 1.43 (m, 1H, $H_{3'}$)

^{13}C NMR (600 MHz, D_2O): δ 200.13 (CO, C_1), 194.77 (CO, C_3), 172.54 (CO, C_7), 153.84 (CH, C_8), 143.22 (C, C_9), 62.42 (CH_2, $C_{1'}$), 45.84 (CH_2, C_4), 36.44 (CH_2, C_6), 35.54 (CH_2, $C_{6'}$), 32.87 (CH_2, $C_{2'}$), 32.72 (CH_2, $C_{8'}$), 29.25 (CH, $C_{3'}$), 26.95 (CH, C_5), 25.96 (3xCH_2, $C_{4',5',7'}$), 14.97 (CH_3, C_{10})

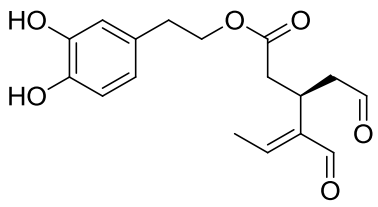
HRMS (ESI+), m/z calcd: 317.1729, found: 317.1777; ($M+Na^+$)

$[\alpha]_D^{20}$= 0 (c 0.327, $CHCl_3$)

- **^{1}H NMR**



ΠΡΟΣΩΠΙΚΑ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ


HO
HO
O
O
O
O

IV.5 Αντιδράσεις βιοκατάλυσης με ένζυμα

Με σκοπό τη μελέτη και την μίμηση των βιοχημικών διεργασιών που λαμβάνουν χώρα κατά την σύνθλιψη του ελαιόκαρπου και την εξαγωγή του ελαιολάδου, πραγματοποιήθηκαν αντιδράσεις καταλυόμενες από ένζυμα. Τα αποτελέσματα των αντιδράσεων αυτών, μελετήθηκαν με LC-MS[49] και HPLC[36].

IV.5.a *Περιγραφή μεθόδου*

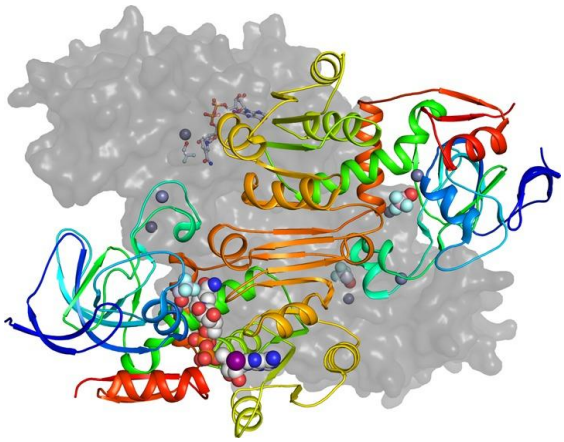
Η αξιοσημείωτη διαφοροποίηση μεταξύ του φαινολικού προφίλ του ελαιολάδου και του φαινολικού προφίλ των φύλλων και των ελαιόκαρπων, αποτελεί τη μεγαλύτερη απόδειξη ότι σε όλες τις διεργασίες που μεσολαβούν, συμμετέχουν ένζυμα και μικροοργανισμοί.

Με σκοπό την διαλεύκανση και τη μελέτη των διεργασιών αυτών, αλλά και στα πλαίσια της αυξημένης ανάγκης, για αναζήτηση «πράσινων» μεθόδων σύνθεσης, πραγματοποιήθηκαν βιομιμητικές αντιδράσεις, με πρώτη ύλη ελαιοευρωπεΐνη (1) και ολεασίνη (2) υψηλής καθαρότητας (απομονωμένων από το ελαιόλαδο, όπως περιγράφηκε στα Κεφάλαια II.1 και II.2), αλλά και τη διόλη της ολεασίνης (28) (που συντέθηκε όπως περιγράφηκε στην υποενότητα IV.2.a.1.1.1). Οι αντιδράσεις αυτές περιλαμβάνουν τη χρήση ενζύμων, όπως οι αλκοολικές αφυδρογονάσες [274], [275], [276], συνδυαστικά με επιλεγμένα συνένζυμα (FMN[54]-Rivoflavin-5΄-phosphate/ flavin mononucleotide και NAD+[55] - Nicotinamide adenine dinucleotide) και η λιπάση.

IV.5.a.1 Ενζυμικές αντιδράσεις με χρήση αλκοολικής αφυδρογονάσης

Οι αλκοολικές αφυδρογονάσες αποτελούν μία ομάδα ισοενζύμων, που υπάρχουν στους περισσότερους οργανισμούς και διευκολύνουν την οξείδωση πρωτοταγών και δευτεροταγών αλκοολών, σε αλδεΰδες ή κετόνες αντίστοιχα [277], με την ταυτόχρονη αναγωγή του συνενζύμου, νικοτιναμιδο αδενινο δινουκλεοτιδίου (NAD+[55] σε NADH). Τα ένζυμα αυτά μπορούν να καταλύσουν επίσης την αντίστροφη αντίδραση, η οποία, στα θηλαστικά, είναι μια αντίδραση οξειδοαναγωγής (αναγωγή/ οξείδωση) που περιλαμβάνει το συνένζυμο NAD+[55].

Οι αλκοολικές αφυδρογονάσες από ζύμες (YADH[56]-Yeast Alcohol Dehydrogenase) ή ήπαρ αλόγου (HLADH[57]-Horse Liver Alcohol Dehydrogenase), είναι δύο από τις μορφές του ενζύμου που χρησιμοποιούνται σε αντιδράσεις βιοκατάλυσης. Η YADH[56] είναι η πιο δραστική μορφή του ενζύμου και απομονώθηκε για πρώτη φορά, από ζύμη ζυθοποιΐας, το 1937, από τους Negelein και Wulff [278]. Η HLADH[57] απομονώθηκε και κρυσταλλώθηκε, για πρώτη φορά από ήπαρ αλόγου (βρίσκεται στο ήπαρ του είδους Equus Caballus) το 1948, από τους Bonnichsen και Wassen [279]. Είναι σημαντικό δε, ότι έχει διαπιστωθεί σημαντική διαφοροποίηση σε πολλές από τις ιδιότητες των δύο αυτών μορφών ADH. Μεταξύ άλλων, έχει διαπιστωθεί ότι η YADH[56] (*Εικόνα 97*) έχει διπλάσιο μοριακό βάρος από αυτό της HLADH[57] (*Εικόνα 98*) [280].



Εικόνα 97. *Yeast alcohol dehydrogenase – Αλκοολική αφυδρογονάση ζύμης (YADH[56])*



Εικόνα 98. *Horse liver alcohol dehydrogenase – Αλκοολική αφυδρογονάση από ήπαρ αλόγου (HLADH[57]).*

IV.5.a.1.1 Ενζυμικές αντιδράσεις της ολεασίνης, με αλκοολική αφυδρογονάση

Οι ενζυμικές αντιδράσεις με χρήση της YADH[56] και πρώτη ύλη την ολεασίνη (2), πραγματοποιήθηκαν σε θερμοκρασία δωματίου (25^{o}C) και σε επιλεγμένες συνθήκες pH, που εξασφαλίστηκαν με χρήση τεσσάρων διαφορετικών ρυθμιστικών διαλυμάτων:

1. Για pH 5.8-8.0: Παρασκευάστηκε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών, συγκέντρωσης 1M.
2. Για pH= 9: Παρασκευάστηκε ρυθμιστικό διάλυμα NaOH-γλυκίνης..
3. Παρασκευάστηκε υδατικό διάλυμα 10% w/v NaCl.
4. Για pH= 6: Χρησιμοποιήθηκε απεσταγμένο H_2O.

Σε όλες τις αντιδράσεις, όπως προαναφέρθηκε, χρησιμοποιήθηκαν, συμπληρωματικά με το ένζυμο YADH[56], ποσότητες των συνενζύμων FMN[54] και NAD+[55].

Η δραστικότητα του ενζύμου αλκοολική αφυδρογονάση, μετράται σε U (enzyme unit) ή IU (international unit) και ορίζεται ως η ποσότητα του ενζύμου που μετατρέπει 1 μmol EtOH σε ακεταλδεΰδη ή παράγει 1 μmol ακεταλδεΰδης, ανά λεπτό, σε pH 8.8 και στους 25^{o}C [281].

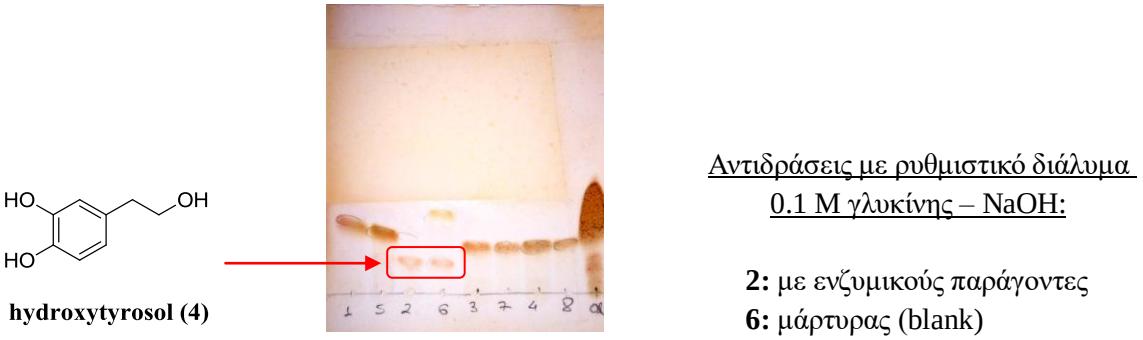
$$1U = 1\ \mu mol \cdot min^{-1}$$

Το ένζυμο που χρησιμοποιήθηκε, YADH[56] ήταν δραστικότητας ≥10,000 units/ mL.

Στην παρούσα βιομιμητική μελέτη, χρησιμοποιήθηκαν επίσης, αντιδράσεις – μάρτυρες (blanks), οι οποίες περιείχαν ολεασίνη (2), διαλυμένη στο εκάστοτε ρυθμιστικό διάλυμα, απουσία ενζυμικών παραγόντων.

Σε τέσσερις κωνικές φιάλες (*1,2,3,4*), λοιπόν, ζυγίζονται ίσες ποσότητες ολεασίνης (2), ενζύμου και συνενζύμων και προστίθεται ποσότητα του εκάστοτε ρυθμιστικού διαλύματος, στην κάθε φιάλη. Σε τέσσερις επιπλέον κωνικές φιάλες (*5,6,7,8*), τοποθετούνται οι ίδιες ποσότητες ολεασίνης (2) και ρυθμιστικών διαλυμάτων, χωρίς να προστεθούν ενζυμικοί παράγοντες, ώστε να παρατηρηθούν τυχόν χημικές μετατροπές, οφειλόμενες στις διαφορετικές συνθήκες pH και όχι σε ενζυμική παρουσία. Οι κωνικές φιάλες τοποθετούνται σε επωαστήρα ελεγχόμενης θερμοκρασίας, στους 25^{o}C και κατόπιν μίας ώρας ανάδευσης, η πρόοδος της αντίδρασης ελέγχεται με TLC[34] [274].

Μετά το πέρας μίας ώρας, δε παρατηρήθηκε καμία μεταβολή στις αντιδράσεις, εκτός από την περίπτωση της αντίδρασης, όπου χρησιμοποιήθηκε το ρυθμιστικό διάλυμα NaOH-γλυκίνης, καθώς, στις αλκαλικές αυτές συνθήκες, πραγματοποιείται υδρόλυση της ολεασίνης (2) και εμφάνιση της χαρακτηριστικής κηλίδας της υδροξυτυροσόλης (4), στην TLC[34] (*Εικόνα 99*). Επομένως, ακόμα και αυτή η χημική μετατροπή της ολεασίνης (2), δεν οφείλεται στην παρουσία ενζυμικών παραγόντων, αλλά αποκλειστικά στην ισχυρά αλκαλική φύση του ρυθμιστικού διαλύματος που χρησιμοποιήθηκε.



Εικόνα 99. *Ενζυμικές αντιδράσεις και blank αντιδράσεις, με πρώτη ύλη την ολεασίνη (2).*

Οι αντιδράσεις αφέθηκαν σε ανάδευση 24, 30, 40, 55 και 96 (4 μέρες) συνολικά ωρών, χωρίς όμως να παρατηρηθεί κάποια αξιοσημείωτη μεταβολή στην εικόνα της πρώτης TLC[34] (μετά το πέρας μίας μόλις ώρας από την έναρξη της αντίδρασης). Επίσης, εκτός από τους 25^{o}C, επιχειρήθηκε και μείωση ή αύξηση της θερμοκρασίας στους 20 ή 37^{o}C, αντιστοίχως, χωρίς όμως διαφοροποίηση του αποτελέσματος των αντιδράσεων. Για τον έλεγχο, κάθε φορά, της προόδου της αντίδρασης, προηγείται της TLC[34], η μικροεκχύλιση μιας μικρής ποσότητας των αντιδρώντων μιγμάτων, με EtOAc.

IV.5.a.1.2 Ενζυμική αντίδραση της διόλης της ολεασίνης, με αλκοολική αφυδρογονάση

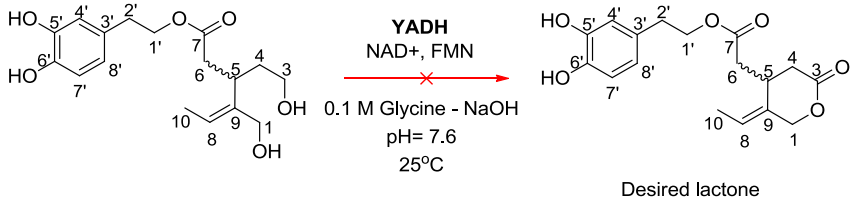
IV.5.a.1.2.1 Περιγραφή μεθόδου

Αλκοολική αφυδρογονάση (ADH) χρησιμοποιήθηκε επίσης σε ενζυμική αντίδραση, με πρώτη ύλη τη διόλη της ολεασίνης (28), με σκοπό την λακτονοποίηση αυτής, σε μία προσπάθεια κατανόησης των διεργασιών που οδηγούν στο σχηματισμό τέτοιου είδους λακτονών.

Για την ενζυμική κατεργασία της διόλης (28), με το ένζυμο αλκοολική αφυδρογονάση, ακολούθηθηκε η μεθοδολογία των Boratyński και συνεργατών [282]. Στη μελέτη τους

χρησιμοποίησαν το ένζυμο HLADH[57], ως βιοκαταλύτη για την εναντιο-εκλεκτική σύνθεση δ- και ε- λακτονών, από πρωτοταγείς-δευτεροταγείς, 1,5 και 1,6 διόλες, αντιστοίχως.

Στην δική μας μελέτη, λόγω του υψηλότερου κόστους της αλκοολικής αφυδρογονάσης από ήπαρ αλόγου, επιχειρήθηκε η βιοκατάλυση της διόλης (28), με χρήση της YADH[56].



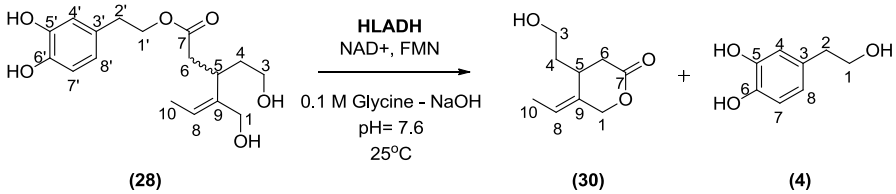
Σχήμα 50. *Επιθυμητή αλλά ανεπιτυχής έκβαση ενζυμικής αντίδρασης της διόλης (28), με αλκοολική αφυδρογονάση.*

Αρχικά παρασκευάζεται ρυθμιστικό διάλυμα 0.1 M γλυκίνης – NaOH, από διάλυμα 0.1 M γλυκίνης, στο οποίο η προσθήκη του υδατικού διαλύματος 0.1 M NaOH γίνεται σταδιακά, μέχρις ότου το pH να προσαρμοστεί στην τιμή 7.6.

Σε κωνική φιάλη (μάρτυρας – blank) ζυγίζεται μικρή ποσότητα της διόλης και προστίθεται σε αυτή, συγκεκριμένος όγκος του παραπάνω ρυθμιστικού διαλύματος. Ακολουθεί ανάδευση μέχρι διαλύσεως της διόλης και αν χρειαστεί, το pH επαναπροσαρμόζεται στην επιθυμητή τιμή, 7.6.

Σε δεύτερη κωνική φιάλη, ζυγίζεται η ίδια ποσότητα διόλης (28), η οποία αραιώνεται με τον ίδιο όγκο ρυθμιστικού διαλύματος, όπως προηγουμένως και προστίθενται στο διάλυμα τα, ζυγισμένα με ακρίβεια, συνένζυμα NAD+[55] και FMN[54]. Ακολουθεί ανάδευση στον incubator, στους 25°C και στις 100 rpm, για 15 λεπτά περίπου και κατόπιν, το pH επαναπροσαρμόζεται στην τιμή 7.6, με προσεκτική προσθήκη διαλύματος 0.1 M NaOH. Ακολουθεί εκ νέου ανάδευση για ακόμα 5 λεπτά και έπειτα, προστίθεται, σταδιακά και με ταυτόχρονη ανάδευση, το ένζυμο αλκοολική αφυδρογονάση, διαλυμένο σε μικρή ποσότητα ρυθμιστικού διαλύματος.

Ακολουθεί έλεγχος της πορείας των δύο αντιδράσεων, με TLC[34], σε σύστημα διαλυτών CH_2Cl_2/ MeOH 95:5. Μετά το τέλος της αντίδρασης, το οποίο γίνεται αντιληπτό με την απουσία της διόλης (28) από το αντιδρών μίγμα, ακολουθεί κατεργασία των αντιδρώντων μιγμάτων με υδατικό διάλυμα 0.1 M HCl, μέχρι το pH να πάρει την τιμή 3. Ακολουθεί πλύση με κορεσμένο υδατικό διάλυμα NaCl και εκχύλιση με $CHCl_3$. Στη συνέχεια, οι υδατικές φάσεις εκχυλίζονται εκ νέου με EtOAc, οι οργανικές φάσεις συννενώνονται και συμπυκνώνονται υπό κενό. Κατόπιν χρωματογραφίας στήλης, με σύστημα διαλυτών CH_2Cl_2/ MeOH 98:2→ 97:3, παραλαμβάνεται το κύριο προϊόν της αντίδρασης, που όμως διαφέρει από το επιθυμητό. Αντί της λακτόνης (10) λοιπόν, προκύπτει μία άλλη, απλή λακτόνη, που έχουμε ήδη συναντήσει σε προηγούμενο υποκεφάλαιο και δεν είναι άλλη από την λακτόνη (30) (βλ. υποενότητα IV.2.a.1.3).

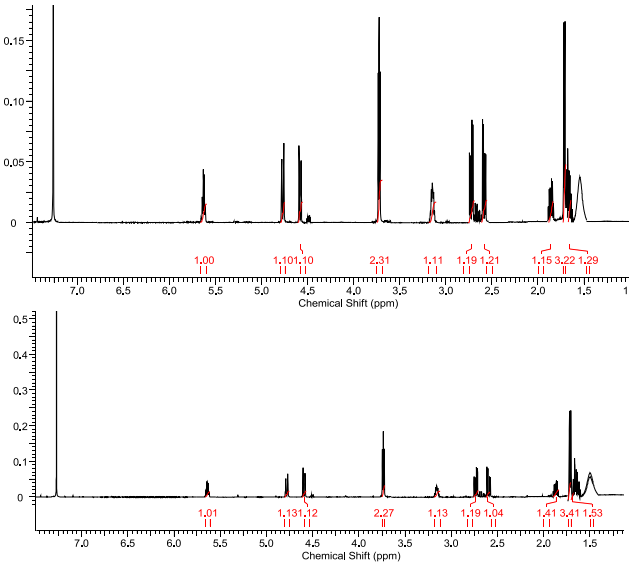


Ο σχηματισμός αυτής της λακτόνης (30), οφείλεται στην αλκαλική φύση του ρυθμιστικού διαλύματος γλυκίνης – NaOH, καθώς, όπως είναι ήδη γνωστό, παρουσία NaOH υδρολύεται ο

εστερικός δεσμός της διόλης (28) και προκύπτει το οξύ (29) και μία μονάδα υδροξυτυροσόλης (4). Όπως προαναφέρθηκε, το οξύ (29) αυθόρμητα μετατρέπεται στη λακτονική του μορφή (30).

IV.5.a.1.2.2 Μελέτη δομής

Η διαλεύκανση της δομής του προϊόντος της ενζυμικής αυτής αντίδρασης, επιτυγχάνεται μέσω φασματοσκοπίας NMR[39] και επιβεβαιώνεται, μέσω σύγκρισης των φασμάτων NMR[39] του προϊόντος της ανωτέρω ενζυμικής αντίδρασης, με τη λακτόνη που προέκυψε κατά την αντίδραση σαπωνοποίησης της διόλης (28). Ακόμη, συγχρωματογράφηση στην TLC[34], των δύο προϊόντων, επιβεβαιώνει την ταύτιση των R_f[50] τους ($R_{f(CH2Cl2/MeOH= 95:5)}$= 0.56).



Εικόνα 100. *α) Φάσμα ^{1}HNMR (600 MHz) της λακτόνης (30), σε $CDCl_3$, β) της λακτόνης, ως προϊόν της ενζυμικής αντίδρασης με αλκοολική αφυδρογονάση και πρώτη ύλη τη διόλη. Πρόκειται για το ίδιο προϊόν.*

Από την Εικόνα 100, αποδεικνύεται ότι πρόκειται για την ίδια λακτόνη, την (30) και ότι η παρουσία της L-γλυκίνης στο ρυθμιστικό διάλυμα, που χρησιμοποιήθηκε για την ενζυμική αντίδραση, δεν επηρέασε την έκβαση της αντίδρασης, η οποία καθορίστηκε αποκλειστικά από την παρουσία NaOH στο αντιδρών μίγμα.

IV.5.a.2 Ενζυμικές αντιδράσεις με χρήση λιπάσης

Ως λιπάση ορίζεται οποιοδήποτε ένζυμο καταλύει την υδρόλυση λιπών (λιπιδίων) [283]. Οι λιπάσες εκτελούν ουσιαστικούς ρόλους στην πέψη, στην μεταφορά και επεξεργασία των λιπιδίων διατροφής (π.χ. τριγλυκερίδια, λίπη, έλαια) στους περισσότερους, αν όχι σε όλους, ζωντανούς οργανισμούς. Οι λιπαρές ουσίες προέρχονται κατά κύριο λόγο από ζώα, αλλά μπορούν επίσης να είναι μικροβιακής προέλευσης.

Οι λιπάσες καταλύουν την υδρόλυση εστέρων, σε υδατικά διαλύματα και τη σύνθεση εστέρων, σε μη υδατικά, ενώ επιπλέον καταλύουν την υδρόλυση των τριακυλ-γλυκερολών σε γλυκερόλη και ελεύθερα λιπαρά οξέα. Παράγουν, επίσης, υδροξυλικές και καρβοξυλικές ομάδες, μέσω της υδρόλυσης εστερικών δεσμών σε πολυ(τερεφθαλικό αιθυλένιο).

Στην μελέτη μας, χρησιμοποιήθηκε παγκρεατική λιπάση τύπου *II* από χοίρο, δραστικότητας 30-90 units/ mg πρωτεΐνης (με χρήση τριακετίνης), ενώ 1 unit του ενζύμου, υδρολύει 1 meq λιπαρού οξέος από τριακετίνη, σε 1 ώρα, σε pH 7.4 και στους 37°C.

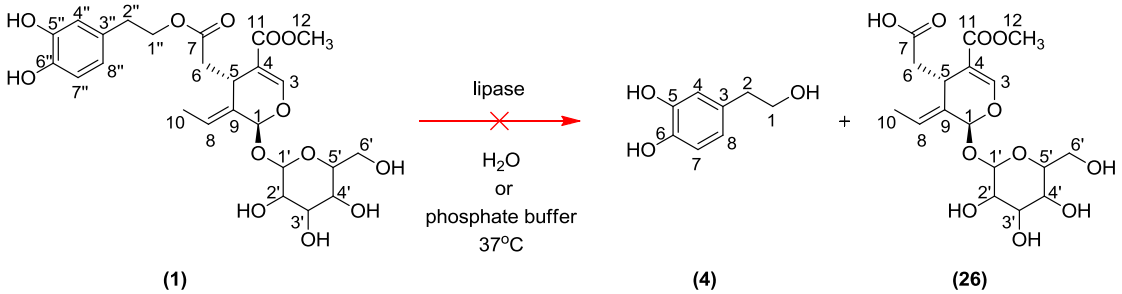
Η παγκρεατική λιπάση τύπου *II* από χοίρο, έχει βρει ποικίλες χρήσεις μέχρι σήμερα, μερικές εκ των οποίων είναι: η ανάλυση λιπαρού οξέος σε συγκεκριμένη θέση τριγλυκεριδίων [284], ο προσδιοριδμός του μη αφομοιώσιμου κλάσματος φυτικής προέλευσης, που είναι ανθεκτικό στη δράση των πεπτικών ενζύμων [285], καθώς και η χρήση της λιπάσης αυτής, βιομηχανικά, για την ανάλυση των χειρόμορφων ενώσεων και την παραγωγή, μέσω μετεστεροποίησης, του βιοντίζελ.

Στη μελέτη μας, επιχειρήθηκαν αντιδράσεις βιοκατάλυσης με λιπάση, και χρήση ως πρώτων υλών, δύο φυσικών προϊόντων, της ελαιοευρωπεΐνης (1) και της ολεασίνης (2).



Εικόνα 101. *Ένας τύπος παγκρεατικής λιπάσης από χοίρο, σε υπολογιστική απεικόνιση [Protein Data Bark].*

IV.5.a.2.1 Ενζυμική αντίδραση της ελαιοευρωπεΐνης (1), με λιπάση



Σχήμα 51. *Επιθυμητή αλλά ανεπιτυχής έκβαση ενζυμικής αντίδρασης της ελαιοευρωπεΐνης (1), με λιπάση.*

Αρχικά, με πρώτη ύλη την φυσική ελαιοευρωπεΐνη (1) που έχει απομονωθεί, όπως περιγράφηκε στο Κεφάλαιο ΙΙ.1, από την *Olea europaea*, επιχειρήθηκε αντίδραση βιοκατάλυσης, με παγκρεατική λιπάση από χοίρο και χρήση δύο διαφορετικών διαλυμάτων:

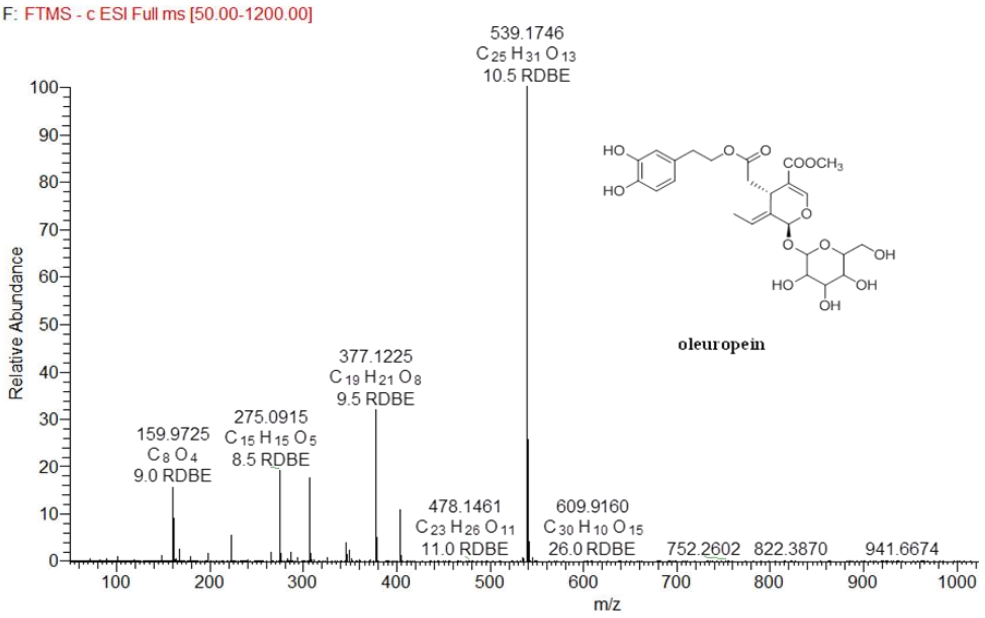
α. απεσταγμένο H_2O και

β. ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών, για προσαρμογή σε pH= 7

Σε δύο κωνικές φιάλες, ζυγίζονται ίσες ποσότητες ελαιοευρωπεΐνης (1) και ακολουθεί διαλυτοποίηση αυτής, σε ίσες ποσότητες H_2O και ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών, αντιστοίχως.

Κατόπιν, προστίθεται συγκεκριμένη ποσότητα του ενζύμου και η φιάλη τοποθετείται στον incubator, σε θερμοκρασία 37^{o}C και ανάδευση 170 rpm. Μετά το πέρας μίας ώρας, μικρή ποσότητα των αντιδρώντων μιγμάτων εκχυλίζεται με EtOAc και ελέγχεται η πρόοδος των αντιδράσεων, με TLC[34] και σύστημα διαλυτών CH_2Cl_2/ MeOH 90:10, οπότε διαπιστώνεται ότι δεν έχει επέλθει καμία μεταβολή στο προφίλη των αντιδρώντων μιγμάτων και αυτά αφήνονται σε ανάδευση για όλη τη διάρκεια της νύχτας.

Η TLC[34] για τις δύο αντιδράσεις, την επόμενη μέρα, αποδεικνύει ότι η λιπάση δεν έχει καταφέρει να επιφέρει μεταβολή στη δομή της ελαιοευρωπεΐνης (1) και να υδρολύσει τον εστερικό της δεσμό. Η αδυναμία της ελαιοευρωπεΐνης (1), λόγω μεγέθους, να εισέλθει στην κοιλότητα του ενζύμου, είναι η πιθανότερη αιτία της ανεπιτυχούς έκβασης της αντίδρασης, η οποία επιβεβαιώνεται μέσω LC-MS[49] (*Εικόνα 102*).



Εικόνα 102. *Η ελαιοευρωπεΐνη (1) παραμένει σχεδόν ανεπηρέαστη, μετά την αντίδραση βιοκατάλυσης με λιπάση.*

Η αντίδραση βιοκατάλυσης της ελαιοευρωπείνης έχει επιτευχθεί, ωστόσο, σε προηγούμενη μελέτη του εργαστηρίου μας, με χρήση άλλων ενζύμων και δημοσιευμένα αποτελέσματα [286].

IV.5.a.2.2 Ενζυμική αντίδραση της ολεασίνης, με λιπάση

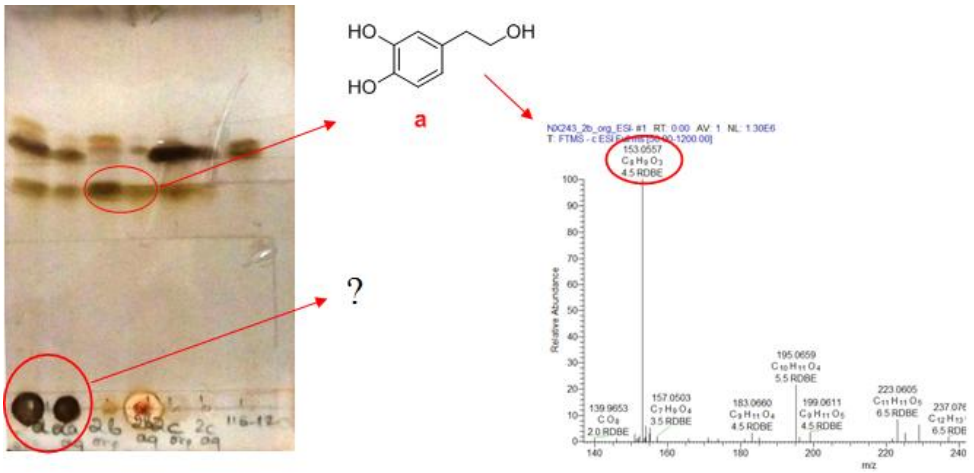
Η χρήση της λιπάσης στην αντίδραση βιοκατάλυσης με πρώτη ύλη ολεασίνη (2), ακολουθεί την ίδια μεθοδολογία με αυτή της αντίδρασης που περιγράφηκε στην προηγούμενη υποενότητα, καθώς χρησιμοποιήθηκαν και πάλι ως διαλύτες, το H_2O (*Εικόνα 103*-κωνική 1) και το ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών, για pH=7 (*Εικόνα 103*-κωνική 2). Στην περιπτωση, ωστόσο, της ολεασίνης (2), χρησιμοποιήθηκαν τρεις κωνικές φιάλες, καθώς παρασκευάστηκε επιπλέον, ένα διάλυμα της ολεασίνης (2) σε H_2O, χωρίς ενζυμικό παράγοντα, ως μάρτυρας (*Εικόνα 103*-κωνική 3).

Ποσότητα, λοιπόν, ολεασίνης (2), ζυγίζεται στις τρεις κωνικές φιάλες· στις δύο προστίθεται απεσταγμένο H_2O και στην τρίτη, ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών. Η αντίδραση – μάρτυρας τοποθετείται ήδη στον επωαστήρα ελεγχόμενης θερμοκρασίας (incubator), στους 37^{o}C, ενώ στις άλλες δύο κωνικές, κατόπιν διαλύσεως της ολεασίνης (2), προστίθεται ο προζυγισμένος

ενζυμικός παράγων, λιπάση. Ανάδευση στις 170 rpm και σε θερμοκρασία 37^{o}C, των τριών κωνικών, αρχικά για μία ώρα, μικροεκχύλιση με EtOAc και TLC[34], με σύστημα διαλυτών CH_2Cl_2/ MeOH 90:10, έδειξε ότι οι αντιδράσεις δεν έχουν προχωρήσει.

Προσθήκη επιπλέον ποσότητας ενζύμου στα δύο αντιδρώντα μίγματα, οδήγησε, μετά από 18 συνολικά ώρες ανάδευσης, στην πλήρη διάσπαση της ολεασίνης (2) και τον ταυτόχρονο σχηματισμό υδροξυτυροσόλης (4), κυρίως στην περίπτωση όπου χρησιμοποιήθηκε ως διαλύτης, ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών (*Εικόνα 103*). Τα αντιδρώντα μίγματα εκχυλίζονται με EtOAc και ελέγχονται χρωματογραφικά οι υδατικές και οι οργανικές φάσεις, κάθε περίπτωσης. Για την σα ειάζεται, του ενζύμου, πραγματοποιείται SPE[38] εκχύλιση των υδατικών φάσεων. Τέλος, οι φάσεις συμπυκνώνονται, για να παραληφθούν τα υπό καθαρισμό, με χρωματογραφία στήλης ή παρασκευαστική TLC[34], μίγματα προϊόντων.

Συμπεραίνεται, λοιπόν, ότι, αντίθετα με την περίπτωση της ογκώδους ελαιοευρωπεΐνης (1), η ολεασίνη (2), μπορεί και εισέρχεται στην κοιλότητα του ενζύμου, με αποτέλεσμα να μην παρεμποδίζεται η υδρολυτική του δράση, στον εστερικό δεσμό του μορίου. Ως εκ τούτου, ως προϊόν της υδρόλυσης αυτής, σχηματίζεται, κατά κύριο λόγο, υδροξυτυροσόλη (4), η οποία ανιχνεύτηκε στην οργανική φάση της αντίδρασης 2 (με ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών). Τέλος, και στις δύο φάσεις της αντίδρασης (1) (με H_2O, ως διαλύτη), παρατηρείται στην πλάκα TLC[34] μία κηλίδα, που αντιστοιχεί σε κάποιο αρκετά πολικό μόριο και ενδεχομένως σε κάποιο οξύ (*Εικόνα 103*).



Εικόνα 103. *Ενζυμικές αντιδράσεις με λιπάση και πρώτη ύλη ολεασίνη (2), μετά από 18 ώρες από την προσθήκη του ενζύμου.* ***2a****: αντίδραση με διαλύτη* H_2O, ***2b****: αντίδραση με ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών, pH= 7,* ***2c****: αντίδραση – μάρτυρας, χωρίς προσθήκη ενζύμου. Φάσμα MS[43] από LC-MS[49] ανάλυση, της αντίδρασης* ***2b****.*

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

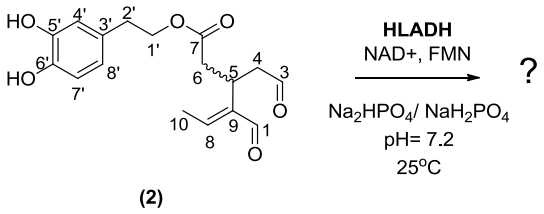
IV.6 Αντιδράσεις βιοκατάλυσης με ένζυμα

IV.6.a *Αντιδράσεις βιοκατάλυσης με αλκοολική αφυδρογονάση*

IV.6.a.1 Ενζυμική αντίδραση της ολεασίνης με αλκοολική αφυδρογονάση

Για κάθε μία από τις τέσσερεις διαφορετικές, ως προς το ρυθμιστικό διάλυμα, αντιδράσεις, 0.010 g (1 eq) του (2), καθαρότητας >90%, ζυγίστηκαν σε οκτώ κωνικές φιάλες· τέσσερεις, για τις αντιδράσεις παρουσία ενζυμικών παραγόντων και τέσσερεις αντιδράσεις – μάρτυρες [274].

IV.6.a.1.1 Ενζυμική αντίδραση με ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών 1M, pH 5.8-8.0



(2)

Στην κάθε κωνική φιάλη προστίθενται 5 mL του ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών 1M, το οποίο παρασκευάζεται ως εξής:

Για pH= 7.2 και παρασκευή 100 mL διαλύματος φωσφορικών 1M:

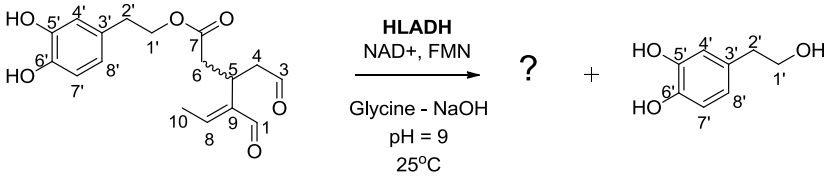
Αρχικά, παρασκευάζονται υδατικά διαλύματα 1M Na_2HPO_4 και 1M NaH_2PO_4:

- Για 100 mL 1M Na_2HPO_4: 14.2 g Na_2HPO_4 διαλύονται σε απεσταγμένο H_2O, μέχρι όγκου 100 mL.
- Για 100 mL 1M NaH_2PO_4: 12 g NaH_2PO_4 διαλύονται σε απεσταγμένο H_2O, μέχρι όγκου 100 mL.

Υπολογίζεται ότι, 1.58 mL του διαλύματος 1M NaH_2PO_4 αναδεύονται με 3.42 mL του διαλύματος 1M Na_2HPO_4, για τελικό όγκο 5 mL ρυθμιστικού διαλύματος και το pH επιβεβαιώνεται με χρήση πεχαμέτρου. Τα 5 mL του ρυθμιστικού διαλύματος τοποθετούνται σε δύο κωνικές φιάλες, εκ των οποίων η μία αποτελεί την αντίδραση – μάρτυρα για το ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών 1M. Ακολουθεί ανάδευση και των δύο κωνικών, μέχρι διαλύσεως του (2).

Στην δεύτερη κωνική φιάλη, προστίθενται 0.0023 g (0.1 eq) του συνενζύμου NAD+[55], 0.0264 g (0.1 eq) του συνενζύμου FMN[54] και 3.12 μL HLADH[57] και οι κωνικές φιάλες τοποθετούνται στον επωαστήρα – κλίβανο ελεγχόμενης θερμοκρασίας (incubator), στους 25°C, αρχικά για μία ώρα και μετά μέχρι και για 4 ημέρες, χωρίς όμως να παρατηρηθεί κάποια χημική μεταβολή στο μόριο του (2).

IV.6.a.1.2 Ενζυμική αντίδραση με ρυθμιστικό διάλυμα 0.1 M γλυκίνης – NaOH



(2) **(4)**

Στην κάθε κωνική φιάλη προστίθενται 5 mL του ρυθμιστικού διαλύματος 0.1 M γλυκίνης – NaOH, το οποίο παρασκευάζεται ως εξής:

Για pH= 9, 0.3753 g L-γλυκίνης, διαλύονται σε 50 mL απεσταγμένου H_2O και σ' αυτό το διάλυμα προστίθεται σταδιακά υδατικό διάλυμα NaOH 0.1 M, σε ποσότητα τόση όση απαιτείται για την προσαρμογή του pH στην τιμή 9.

Και πάλι, σε δύο κωνικές ζυγίζεται η ολεασίνη (2) και διαλυτοποιείται με 5 mL του ρυθμιστικού διαλύματος 0.1 M γλυκίνης – NaOH. Όπως και προηγουμένως, στη μία εκ των δύο κωνικών προστίθενται, επιπλέον, (ίδιες, με την προηγούμενη αντίδραση, ποσότητες συνενζύμων) 0.0023 g (0.1 eq) του συνενζύμου NAD+[55], 0.0264 g (0.1 eq) του συνενζύμου FMN[54] και 3.12 μL HLADH[57] και οι κωνικές φιάλες τοποθετούνται στον επωαστήρα – κλίβανο ελεγχόμενης θερμοκρασίας (incubator), στους 25°C, αρχικά για μία ώρα. Μετά την πάροδο μίας ώρας, πραγματοποιείται έλεγχος της προόδου της αντίδρασης, με TLC[34] και παρατηρείται πλήρης μετατροπή της ολεασίνης (2) σε υδροξυτυροσόλη (4) και ένα ακόμα προϊόν, με R_f[50] μεγαλύτερο αυτού της ολεασίνης (2). Η διάσπαση του μορίου της ολεασίνης (2), δεν οφείλεται, ωστόσο, στην ενζυμική παρουσία, αλλά στην ισχυρά αλκαλική, λόγω του NaOH, φύση του ρυθμιστικού διαλύματος, καθώς παρόμοια εικόνα παρατηρήθηκε και στην αντίδραση – μάρτυρα, απουσία ενζυμικών παραγόντων (*Εικόνα 99*).

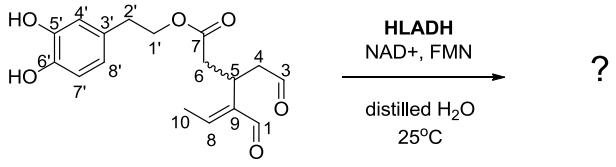
IV.6.a.1.3 Ενζυμική αντίδραση με υδατικό διάλυμα 10% NaCl

Όπως προηγουμένως, σε δύο κωνικές φιάλες που περιέχουν έκαστη 0.010 g (1 eq) του (2), προστίθεται υδατικό διάλυμα 10% w/v NaCl, το οποίο παρασκευάζεται, ως εξής:

Σε ογκομετρική φιάλη των 100 mL ζυγίζεται 1 g στερεού NaCl, το οποίο διαλύεται με μικρή ποσότητα απεσταγμένου H_2O και ακολουθεί αραίωση του διαλύματος, μέχρι τα 100 mL.

5 mL από το ανωτέρο διάλυμα τοποθετούνται στις δύο κωνικές φιάλες και ακολουθεί ανάδευση, μέχρι διαλύσεως της ολεασίνης (2). Κατόπιν, στη κωνική φιάλη που προορίζεται για την αντίδραση – μάρτυρα, δεν τοποθετούνται ενζυμικοί παράγοντες, ενώ στην άλλη, ζυγίζονται και πάλι 0.0023 g (0.1 eq) του συνενζύμου NAD+[55], 0.0264 g (0.1 eq) του συνενζύμου FMN[54] και 3.12 μL HLADH[57] και οι δύο κωνικές τοποθετούνται στον incubator, στους 25°C.

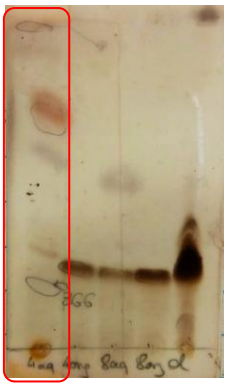
IV.6.a.1.4 Ενζυμική αντίδραση με χρήση απεσταγμένου H_2O



(2)

Ομοίως, πραγματοποιήθηκε η ενζυμική αντίδραση, με χρήση απεσταγμένου H_2O, ως διαλύτη, ενώ στις δύο κωνικές (αντίδραση–μάρτυρας και αντίδραση με ενζυμικούς παράγοντες) μετά από μία ημέρα ανάδευση, επαναπροσθέθηκαν 0.1 eq από κάθε συνένζυμο και επιπλέον 3.12 μL HLADH[57] και η ανάδευση, στους 25°C, εξακολούθησε για άλλες 3 ημέρες.

Μετά την πάροδο συνολικά 4 ημερών, στην αντίδραση που περιλαμβάνει ενζυμικούς παράγοντες, η (2) έχει διασπαστεί και έχει εμφανιστεί στην χρωματογραφία λεπτής στιβάδας, μία κύρια κηλίδα, σε $R_{f(CH2Cl2/MeOH= 95:5)}$= 0.75, αρκετά μεγαλύτερο από αυτό της ολεασίνης (2), $R_{f(CH2Cl2/MeOH= 95:5)}$= 0.24 (*Εικόνα 104)*.

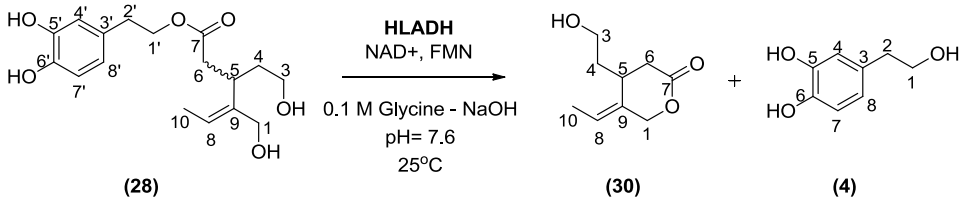


Αντιδράσεις με απεσταγμένο H_2O, ως διαλύτη:
4: με ενζυμικούς παράγοντες
8: μάρτυρας (blank)

Εικόνα 104. *TLC[34] χρωματογραφία της ενζυμικής αντίδρασης με χρήση, ως διαλύτη, απεσταγμένου H_2O.*

Οι ενζυμικές αντιδράσεις με πρώτη ύλη την ολεασίνη (2) και χρήση του ενζύμου αλκοολική αφυδρογονάση, δεν απέδωσαν κάποιο αξιοσημείωτο αποτέλεσμα. Για το λόγο αυτό, επιχειρήθηκε η ίδια ενζυμική αντίδραση, με πρώτη ύλη, αυτή τη φορά, την διόλη (28) (βλ. επόμενη υποενότητα), και ως στόχο την λακτονοποίηση αυτής, σε μία προσπάθεια ερμηνείας της, σε μεγάλο ποσοστό, παρουσίας λακτονών σε ελαιοκομικά παράγωγα, όπως για παράδειγμα τα ελαιουργικά απόβλητα των ελαιοτριβείων (OWW).

IV.6.a.2 Ενζυμική αντίδραση της διόλης της ολεασίνης, με αλκοολική αφυδρογονάση



(28) **(30)** **(4)**

Σε δύο κωνικές φιάλες (η μία ως μαρτυρας) των 50 mL ζυγίζονται 0.008 g (1 eq) του (28) και προστίθενται στην κάθε μία 6 mL από το ρυθμιστικό διάλυμα 0.1 M γλυκίνης – NaOH, το οποίο παρασκευάζεται ως εξής:

Για pH= 7.6: σε ογκομετρική φιάλη των 100 mL, ζυγίζονται 0.3753 g L-γλυκίνης, διαλύονται σε 50 mL απεσταγμένου H_2O και σ' αυτό το διάλυμα προστίθεται σταδιακά υδατικό διάλυμα NaOH 0.1 M, σε ποσότητα τόση, όση απαιτείται για την προσαρμογή του pH στην τιμή 7.6.

Μετά την προσθήκη ρυθμιστικού διαλύματος στις δύο κωνικές, ακολουθεί ανάδευση μέχρι διαλύσεως του (28) και αν χρειαστεί, το pH επαναπροσαρμόζεται στην επιθυμητή τιμή, 7.6.

Η κωνική – μάρτυρας τοποθετείται ήδη στον incubator, στους 25°C και στις 100 rpm, ενώ στη δεύτερη κωνική φιάλη, προστίθενται 0.0028 g (0.1 eq) NAD+[55] και 0.080 g (0.1 eq) FMN[54]. Ακολουθεί ανάδευση στον incubator, στους 25°C, για 15 λεπτά περίπου και κατόπιν το pH επαναπροσαρμόζεται στην τιμή 7.6, με προσεκτική προσθήκη διαλύματος 0.1 M NaOH. Ακολουθεί εκ νέου ανάδευση για ακόμα 5 λεπτά και έπειτα, προστίθενται, σταδιακά και με ταυτόχρονη ανάδευση, 0.008 g του ενζύμου HLADH[57], διαλυμένου σε 0.8 mL ρυθμιστικού διαλύματος.

Ακολουθεί έλεγχος της πορείας των δύο αντιδράσεων, με TLC[34], σε σύστημα διαλυτών CH_2Cl_2/ MeOH 95:5. Μετά το τέλος της αντίδρασης, ακολουθεί κατεργασία των αντιδρώντων μιγμάτων με υδατικό διάλυμα 0.1 M HCl, μέχρι pH= 3. Ακολουθεί πλύση με κορεσμένο υδατικό διάλυμα NaCl και εκχύλιση με $CHCl_3$. Έπειτα, οι υδατικές φάσεις εκχυλίζονται εκ νέου με

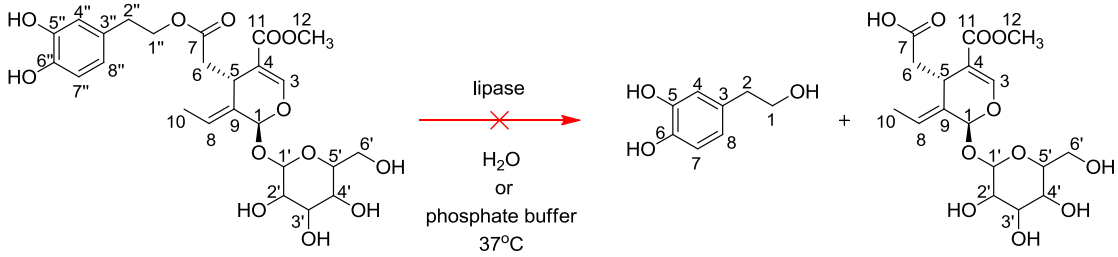
EtOAc και οι οργανικές φάσεις συνεννώνονται και συμπυκνώνονται υπό κενό. Κατόπιν χρωματογραφίας στήλης, με σύστημα διαλυτών CH_2Cl_2/MeOH 98:2 → 97:3, παραλαμβάνονται 0.0015 g (απόδοση 35.8%) του (30) [282].

Άχρωμο ελαιώδες προϊόν. M= 170.2057 g/ mol, $C_9H_{14}O_3$.

Το φάσμα ^{1}HNMR (600 MHz) παρατέθηκε στην υποενότητα IV.4.a.3.

IV.6.b *Αντιδράσεις βιοκατάλυσης με λιπάση*

IV.6.b.1 Ενζυμική αντίδραση ελαιοευρωπεΐνης με λιπάση



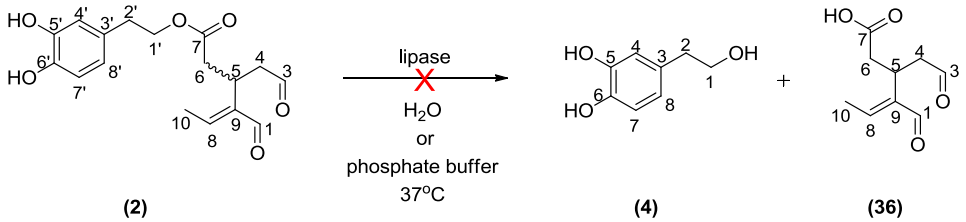
(1) (4) (26)

0.010 g (1 eq) της (1) ζυγίζονται σε δύο κωνικές φιάλες **I** και **II**, των 50 mL και προστίθενται στην **I,** 400 μl απεσταγμένου H_2O και στη **II**, 400 μl ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών, τιμής pH περίπου 7. Μετά τη διάλυση της (1), προστίθενται σε κάθε κωνική 0.002 g του ενζύμου παγκρεατική λιπάση, από χοίρο και οι κωνικές τοποθετούνται στον incubator, σε ανάδευση στις 170 rpm και θερμοκρασία στους 37°C.

Μετά το πέρας μίας ώρας και κατόπιν μικροεκχύλισης με EtOAc, πραγματοποιείται έλεγχος της προόδου των αντιδράσεων με TLC[34], οπότε διαπιστώνεται ότι αυτές δεν έχουν προχωρήσει. Μετά από προσθήκη επιπλέον 0.002 g του ενζύμου, σε καθεμία από τις δύο κωνικές, αυτές αφήνονται σε επιπλέον ανάδευση, στους 37°C, καθ' όλη τη διάρκεια της νύχτας.

Εκ νέου έλεγχος με TLC[34], της πορείας των δύο αντιδράσεων, μετά την πάροδο συνολικά 18 ωρών, από την αρχική προσθήκη του ενζύμου, αποδεικνύει την ανεπιτυχή τους έκβαση.

IV.6.b.2 Ενζυμική αντίδραση ολεασίνης με λιπάση



(2) (4) (36)

Στην περίπτωση όπου χρησιμοποιήθηκε ως πρώτη ύλη, της βιοκατάλυσης με λιπάση, η ολεασίνη (2), η έκβαση της αντίδρασης, ήταν διαφορετική από αυτή στην περίπτωση της ελαιοευρωπεΐνης (1).

Κατά τον ίδιο τρόπο με παραπάνω, 0.005 g (1 eq) του (2) ζυγίζονται σε δύο κωνικές φιάλες **I** και **II**, των 50 mL και προστίθενται στην **I**, 400 μl απεσταγμένου H_2O και στη **II**, 400 μl ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών, τιμής pH περίπου 7. Σε μία ακόμα κωνική, που χρησιμοποιείται ως μάρτυρας, ζυγίζονται 0.002 g του (2) και διαλύονται σε 200 μl απεσταγμένου H_2O. Κατόπιν διαλύσεως της ολεασίνης (2), προστίθενται σε κάθε κωνική 0.002

g της λιπάσης και οι κωνικές τοποθετούνται στον incubator, σε ανάδευση στις 170 rpm και θερμοκρασία 37^{o}C.

Μετά το πέρας μίας ώρας, κατόπιν μικροεκχύλισης με EtOAc και TLC[34], με σύστημα διαλυτών CH_2Cl_2/ MeOH 9:1, διαπιστώνεται ότι δεν έχει προχωρήσει η αντίδραση. Ως εκ τούτου, προστίθεται ακόμα 0.002 g ενζύμου στα αντιδρώντα μίγματα και αυτά αφήνονται σε ανάδευση, κατά τη διάρκεια της νύχτας.

Κατόπιν ελέγχου με TLC[34], την επόμενη μέρα, διαπιστώνεται ότι και στα δύο αντιδρώντα μίγματα, έχει σχηματιστεί υδροξυτυροσόλη (4). Μάλιστα, στην περίπτωση **II**, όπου χρησιμοποιείται ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών, δεν έχει απομείνει καθόλου ποσότητα ολεασίνης (2) στο μίγμα, ενώ κατόπιν παρασκευαστικής TLC[34] παραλαμβάνονται 0.002 g υδροξυτυροσόλης (4) (απόδοση 83%), ως υποκίτρινο στερεό προϊόν. Η ταυτοποίηση του προϊόντος γίνεται με φασματοσκοπία NMR[39], κατόπιν σύγκρισης με τη βιβλιογραφία και η δομή του προϊόντος επιβεβαιώνεται, μέσω συγχρωματογράφησης με πρότυπη υδροξυτυροσόλη (4), σε σύστημα διαλυτών CH_2Cl_2/ MeOH 90:10.

Επιπλέον, στην περίπτωση της αντίδρασης **I**, ήδη από την πρώτη ώρα αρχίζει να εμφανίζεται στην γραμμή βάσης της πλάκας, μία κηλίδα που αντιστοιχεί σε ιδιαίτερα πολικό προϊόν και ενδεχομένως σε κάποιο οξύ, που όμως, κατόπιν καθαρισμού και φασματοσκοπίας NMR[39], δεν φαίνεται να ταυτίζεται δομικά με το οξύ της ολεασίνης (36).

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

❖ Όσον αφορά στα ημισυνθετικά ανάλογα της ελαιοευρωπεΐνης:

Συνολικά, παρασκευάστηκαν 23 ακετυλιωμένα παράγωγα (υποενότητα IV.3.d), μεταξύ των οποίων 12 αλκυλο ακετυλιωμένα, 1 αμιδικό παράγωγο και 10 αρυλο ακετυλιωμένα παράγωγα.

Μεταξύ των αλκυλο ακετυλιωμένων αναλόγων, 7 αλκυλο ανάλογα και το αμιδικό ανάλογο παρασκευάστηκαν, με πρώτη ύλη τον τετραοξικό 11-μεθυλεστέρα του ολεοσίδη, ενώ τα υπόλοιπα 5 αλκυλο ανάλογα, παρασκευάστηκαν, με πρώτη ύλη τον τετραοξικό ολεοσίδη.

Αντιστοίχως, μεταξύ των αρυλο ακετυλιωμένων αναλόγων, 8 είναι ανάλογα του τετραοξικού 11-μεθυλεστέρα του ολεοσίδη και 2, του τετραοξικού ολεοσίδη.

Επιπλέον, με τη μέθοδο της αποπροστασίας, παρασκευάστηκαν συνολικά 14 αποπροστατευμένα ανάλογα (υποενότητα IV.3.e), εκ των οποίων τα 8, αλκυλο και τα 6, αρυλο παράγωγα.

Μεταξύ των αλκυλο αποπροστατευμένων αναλόγων, 5 παρασκευάστηκαν με πρώτη ύλη τον τετραοξικό 11-μεθυλεστέρα του ολεοσίδη και 3, με πρώτη ύλη τον τετραοξικό ολεοσίδη.

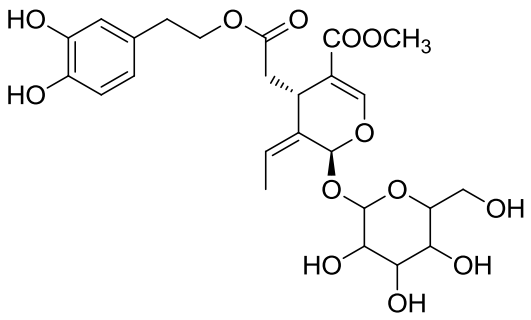
Αντιστοίχως, μεταξύ των αρυλο αποπροστατευμένων αναλόγων, 5 είναι ανάλογα του τετραοξικού 11-μεθυλεστέρα του ολεοσίδη και 1, του τετραοξικού ολεοσίδη.

❖ Όσον αφορά στα ημισυνθετικά ανάλογα της ολεασίνης:

Συνολικά, παρασκευάστηκαν 13 ανάλογα με πρώτη ύλη την ολεασίνη (υποενότητα IV.4) και μέσω χημικών διεργασιών που περιελάμβαναν, αναγωγή, σαπωνοποίηση, ακετυλίωση, εστεροποίηση, βιοκατάλυση με β-γλυκοσιδάση, αλλά και υποκατάσταση με μεθοξυ-αιθοξυ-μεθυλο χλωρίδιο (MEMCl), ως προστατευτική ομάδα υδροξυλίων.

Όλα τα ανάλογα που συντέθηκαν αξιολογήθηκαν για την βιολογική τους δραστικότητα, όπως παρατίθεται αναλυτικά στο Κεφάλαιο V.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΠΕΜΠΤΟ: V. ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΒΙΟΛΟΓΙΚΗΣ ΔΡΑΣΗΣ


HO
HO
O
O
COOCH3
O
O
O
OH
HO
OH
OH

V.1. Αξιολόγηση κυτταροτοξικής δράσης ημισυνθετικών αναλόγων της ελαιοευρωπεΐνης

Στο πρώτο στάδιο της μελέτης, αξιολογήσαμε την αντικαρκινική δράση ενός εκχυλίσματος φύλλων ελιάς, εμπλουτισμένου σε ελαιοευρωπεΐνη (1) [287], για το οποίο υπάρχουν ήδη αναφορές ότι κατέχει αντιπαρασιτικές, κατά της λεϊσμανίασης, ιδιότητες [288].

Τα ημισυνθετικά ανάλογα που παρασκευάστηκαν, με πρώτη ύλη ελαιοευρωπεΐνη (1) εξαγόμενη από το εν λόγω εκχύλισμα φύλλων, αξιολογήθηκαν βιολογικά, στο επόμενο στάδιο της μελέτης και σε συνεργασία με το Τμήμα Βιολογίας του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών. Συγκεκριμένα, το κυτταροτοξικό δυναμικό των αναλόγων αυτών, εξετάστηκε *in vitro*, έναντι διαφόρων καρκινικών κυτταρικών σειρών ανθρώπινης προέλευσης, ώστε να μελετηθεί η σχέση δομής – δραστικότητας τους. Στη συνέχεια, το ανάλογο με την πιο αξιόλογη αντικαρκινική δράση αξιολογήθηκε *in vivo*, έναντι του μελανώματος, σε μοντέλο ποντικιού [287].

V.1.a. Αξιολόγηση του εκχυλίσματος φύλλων ελιάς έναντι καρκινικών κυτταρικών σειρών

Αρχικά, το εμπλουτισμένο εκχύλισμα φύλλων ελιάς και η ελαιοευρωπεΐνη (1) που απομονώθηκε από αυτό, αξιολογήθηκαν για την κυτταροτοξική/ κυτταροστατική τους ισχύ, με χρήση της αναγωγικής δοκιμασίας χρώσης του MTT[58]. Χρησιμοποιήθηκε μία ομάδα πέντε ανθρώπινων καρκινικών κυτταρικών σειρών, μεταξύ των οποίων, οι FM3[59] (μελάνωμα), HCT-116[60] (κόλον), HeLa[61] (τράχηλος της μήτρας), MCF-7[62] (στήθος, υποδοχέας οιστρογόνων τύπου άλφα θετικός, (ERa^+)) και SKBR3[63] (στήθος, υποδοχέας οιστρογόνων τύπου άλφα αρνητικός (ERa-)). Οι σχετικές ημίσειες μέγιστες ανασταλτικές συγκεντρώσεις (IC_{50}[64]) υπολογίστηκαν, μετά από έκθεση των καρκινικών κυττάρων, για διάστημα 72 ωρών, στο εκχύλισμα ή την ελαιοευρωπεΐνη (1) (*Πίνακας* 7).

Ως IC_{50}[64], ορίζεται η ποσότητα της ουσίας, που απαιτείται για την αναστολή μιας συγκεκριμένης βιολογικής διεργασίας (ή ενζύμου, ή κυττάρου ή μικροοργανισμού κ.λ.π) κατά το ήμισυ και αποτελεί μέτρο της αποτελεσματικότητας ενός φαρμάκου. Σύμφωνα με την ετυμολογία της, η IC_{50}[64] μιας ουσίας, είναι το μισό (50%) της ελάχιστης ανασταλτικής συγκέντρωσης της ουσίας (50% IC, ή IC_{50}[64]).

Πίνακας 7. *Κυτταροτοξική αξιολόγηση ενός εκχυλίσματος φύλλων ελιάς, εμπλουτισμένου σε ελαιοευρωπεΐνη (1) και της ελαιοευρωπεΐνης (1), που απομονώθηκε από το ίδιο εκχύλισμα*

IC_{50} ± SD (in μg/mL)[a]					
Compounds	**FM3**	**HCT-116**	**HeLa**	**MCF-7**	**SKBR3**
Enriched olive leaf extract	240.00 ± 10.00	174.30 ± 8.15	165.00 ± 5.00	120.00 ± 5.00	104.30 ± 6.03
Oleuropein	148.30 ± 2.89 (274.53 μM)	100.00 ± 13.23 (185.12 μM)	143.30 ± 15.28 (265.28 μM)	91.67 ± 14.43 (169.70 μM)	86.67 ± 15.28 (160.44 μM)
Doxorubicin (μM)[b]	0.217 ± 0.002	0.100 ± 0.001	0.221 ± 0.004	0.220 ± 0.004	0.202 ± 0.007

[a] Οι τιμές IC_{50} είναι Μ.Ο. ± SD από 3 ανεξάρτητα πειράματα
[b] Η δοξορουβικίνη χρησιμοποιήθηκε ως θετικός έλεγχος

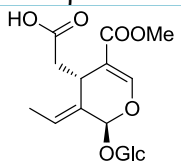
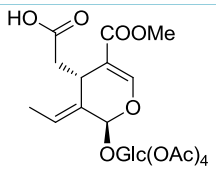
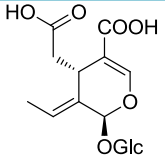
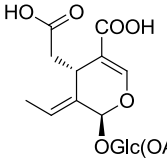
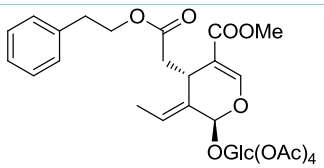
Όπως προκύπτει από τον παραπάνω πίνακα, το εκχύλισμα φύλλων ελιάς και η ελαιοευρωπεΐνη (1) κατέδειξαν παρόμοια κυτταροτοξικότητα, έναντι των κυττάρων HeLa[61], MCF-7[62] και SKBR3[63], με τις χαμηλότερες τιμές IC_{50}[64] να καταγράφονται για την καρκινική σειρά SKBR3[63]. Τα αποτελέσματα αυτά υποδηλώνουν ότι η ελαιοευρωπεΐνη (1) ενδεχομένως συμβάλλει στη συνολική κυτταροτοξική δράση του εκχυλίσματος. Ωστόσο, σε σύγκριση με τη χημειοθεραπευτική δοξορουβικίνη, η ελαιοευρωπεΐνη (1) καταδεικνύει συνολικά ασθενή κυτταροτοξικότητα.

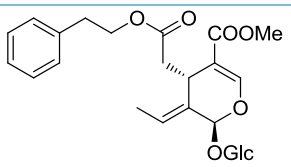
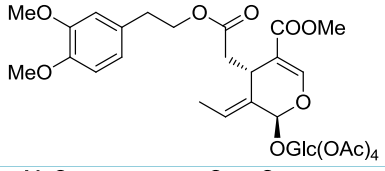
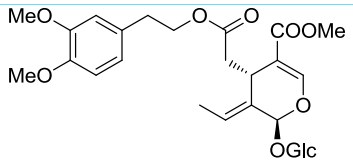
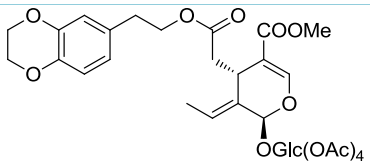
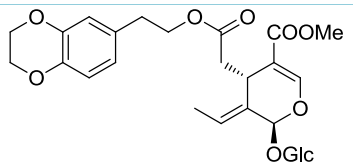
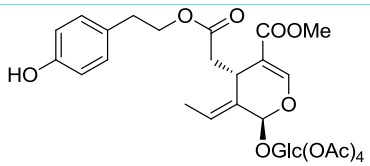
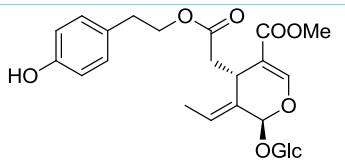
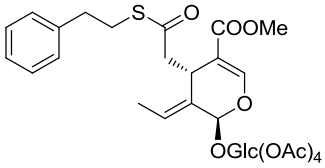
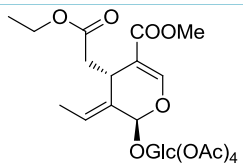
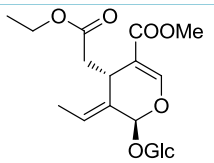
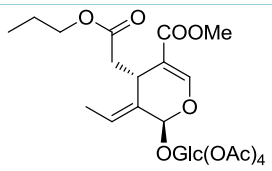
V.1.b. Αξιολόγηση ημι-συνθετικών αναλόγων ελαιοευρωπεΐνης, έναντι καρκινικών κυτταρικών σειρών

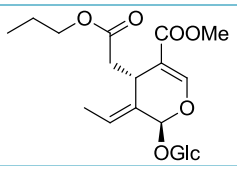
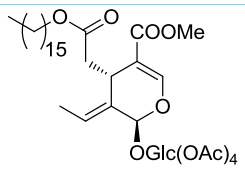
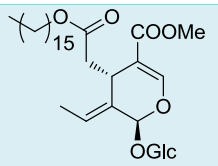
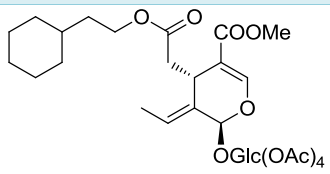
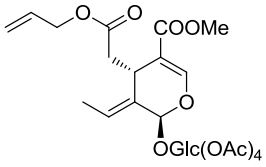
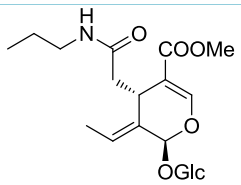
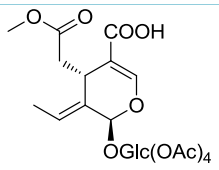
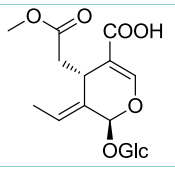
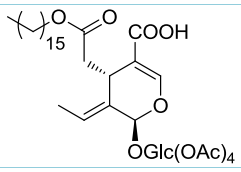
Στο επομενο στάδιο της μελέτης, όλα τα ανάλογα (ακετυλιωμένα και μη) μελετήθηκαν ως προς τη δράση τους στη μη ορμονοεξαρτώμενη κυτταρική σειρά SKBR3[63] αδενοκαρκινώματος μαστού, ανθρώπινης προέλευσης [287]. Η ικανότητα των παραγώγων να επάγουν τον κυτταρικό θάνατο (κυτταροτοξική δράση) προσδιορίστηκε, στη συνέχεια, με την αναγωγική δοκιμασία χρώσης του MTT[58] [3 - (4,5-διμεθυλ-2-θειαζυλο) -2,5-διφαινυλο-2H-βρωμιδίου τετραζολίου)].

Η εξέταση της κυτταροτοξικής δράσης των αναλόγων αφορά, μεταξύ άλλων, την εύρεση της IC_{50}[64], ενώ τα αποτελέσματα έδειξαν ότι όλα τα ανάλογα εμφανίζουν IC_{50}[64] χαμηλότερη της ελαιοευρωπεΐνης (1), με ορισμένα απ' αυτά να κατέχουν πολλά υποσχόμενες δράσεις *(Πίνακας 8)*.

Πίνακας 8. *In vitro κυτταροτοξικότητα παραγώγων της ελαιοευρωπεΐνης (1), σε καρκινικές σειρές SKBR3*[63]

N^o	Προϊόν	IC_{50} ± SD (μM)[a]
(26)		>15
(27)		>15
(22)		>50
(23)		>20
(51)		11.50 ± 1.06

(65)		11.02 ± 0.71
(52)		>15
(66)		>15
(53)		>15
(67)		>20
(55)		>15
(68)		>20
(54)		>15
(42)		>15
(61)		>15
(43)		**6.60 ± 0.57**

(62)		>15
(44)		**3.81 ± 0.56**
(63)		**1.60 ± 0.42**
(49)		>15
(40)		>20
(64)		>20
(46)		>20
(70)		>20
(47)		>20
(1)	**Oleuropein**	160.44 ± 1.50
(4)	**Hydroxytyrosol**	201.10 ± 9.18
	Doxorubicin[b]	**0.202 ± 0.001**

[a]Οι τιμές lC_{50} αποτελούν Μ.Ο. ± SD από 3 ανεξάρτητα πειράματα. [b]Η δοξορουβικίνη χρησιμοποιήθηκε ως θετικός έλεγχος.

Ενδιαφέροντα αποτελέσματα και πληροφορίες SAR[65] προέκυψαν από τον πρώτο αυτό έλεγχο. Συγκεκριμένα και σε συμφωνία με τα δεδομένα που παρουσιάζονται στον Πίνακα 8, η

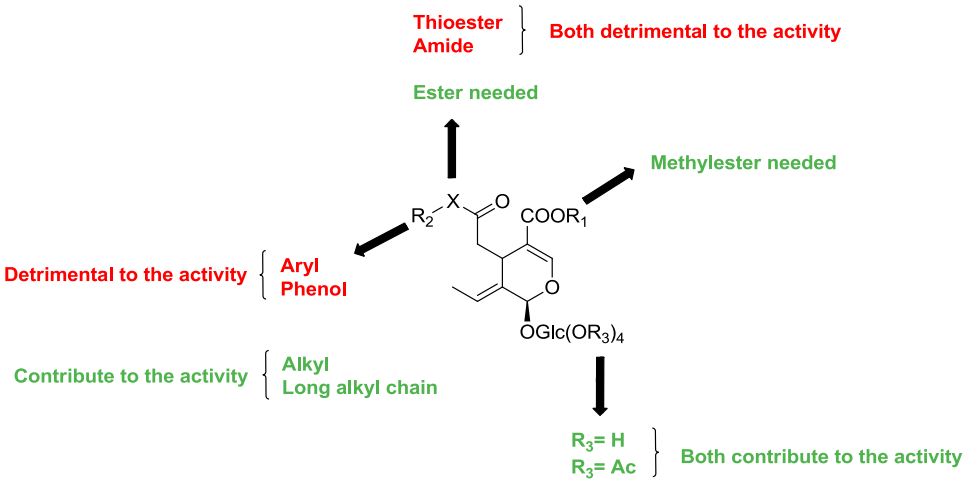
ελαιοευρωπεΐνη (1) και η υδροξυτυροσόλη (4) έδειξαν ασθενή κυτταροτοξικότητα, σε σύγκριση με τον θετικό έλεγχο, δοξορουβικίνη.

Ενώσεις που διαθέτουν μεθοξυ ομάδα (ενώσεις (52) και (66)), φαινόλη (ενώσεις (55) και (68)) και 1,4-διοξάνιο (ενώσεις (53) και (67)), ήταν λιγότερο δραστικές έναντι των κυττάρων SKBR3[63]. Όλοι οι αρυλο εστέρες ήταν επίσης λιγότερο δραστικοί, με εξαίρεση τις ενώσεις (65) και (51) (IC_{50} = 11.02 μM και 11.50 μM, αντιστοίχως), που στερούνται της χαρακτηριστικής ομάδας κατεχόλης, η οποία αντικαταστάθηκε από μία ομάδα φαινυλίου. Ως ανάλογο των (65) και (51) με θείο, ο θειοεστέρας (54) ήταν οριακά κυτταροτοξικός, υπογραμμίζοντας τη σημασία της φύσης του εστέρα στην εμφάνιση αντικαρκινικής δράσης.

Τα πιο δραστικά μόρια που εντοπίστηκαν, με δραστικότητες κάτω των 10 μM, ανήκαν σε αλκυλο εστέρες. Το μήκος της ανθρακικής αλυσίδας έπαιξε σημαντικό ρόλο στην παρατηρούμενη κυτταροτοξική ισχύ των ημι-συνθετικών αναλόγων. Ως εκ τούτου, ενώσεις με μεθυλομάδα (ενώσεις (46) και (70)), αιθυλομάδα (ενώσεις (42) και (61)), ή ακόρεστες αλυσίδες (ένωση (40)), ήταν λιγότερο δραστικές. Αντιθέτως, οι ενώσεις με προπυλο (ένωση (43)) και κέτυλο (ενώσεις (44) και (63)) ομάδα, εμφανίζουν ισχυρή κυτταροτοξικότητα, με τιμές IC_{50}[64], κυμαινόμενες μεταξύ 1.6 και 6.6 μM. Το αναλόγα της ένωσης (62), με άζωτο (ένωση (64)), ήταν λιγότερο δραστικό, επιβεβαιώνοντας την επικράτηση του εστέρα επί του αμιδίου, στην εμφάνιση κυτταροτοξικότητας.

Η υψηλότερη αντικαρκινική δραστικότητα (IC_{50} = 1.60 μM) καταγράφηκε για την ένωση (63), που έχει κετυλο ομάδα στη θέση 7 (δεκαέξι άτομα άνθρακα). Το αντίστοιχο ακετυλιωμένο παράγωγο (44), κατέδειξε επίσης σημαντική κυτταροτοξικότητα (IC_{50} = 3.81 μM). Είναι ενδιαφέρον ότι η παρουσία ενός ελεύθερου οξέος στη θέση 11 (ανάλογο (47)) καταργεί τη δραστικότητα των ενώσεων, υπογραμμίζοντας τη σημασία του μεθυλεστέρα στη θέση 11.

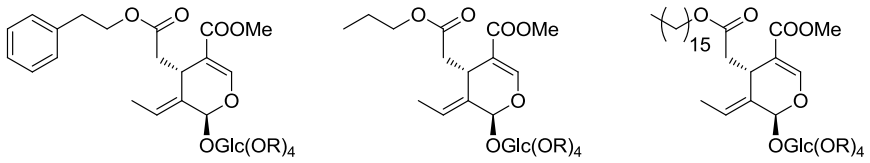
Συνολικά, τα δεδομένα SAR[65] που προκύπτουν, θα μπορούσαν να συνοψιστούν όπως απεικονίζεται στο Σχήμα 52.



Σχήμα 52. *Σύνοψη SAR δεδομένων, για τα ημι-συνθετικά ανάλογα της ελαιοευρωπεΐνης (1)*

Πέντε από το ανάλογα κατέδειξαν αξιόλογη κυτταροτοξική δράση (*Εικόνα 105*). Αυτά τα αποτελέσματα υποδηλώνουν ότι το τμήμα υδροξυτυροσόλης (4) της ελαιοευρωπεΐνης (1) δεν μπορεί να θεωρηθεί ως το δραστικό μέρος του μορίου. Πράγματι, οι ενώσεις (51) και (65) που έχουν μη υποκατεστημένες φαινυλομάδες εμφανίζουν καλύτερη κυτταροτοξικότητα σε σύγκριση με την ελαιοευρωπεΐνη (1). Επιπλέον, τα επτά δραστικά ημι-συνθετικά ανάλογα ήταν

ως επί το πλείστον λιπόφιλα και τα πιο δραστικά από αυτά, δεν περιείχαν αρυλο αλλά αλκυλο εστέρες, με μεγάλες αλυσίδες άνθρακα. Η αντικατάσταση του εστέρα στη θέση 7 με θειοεστέρα ή αμίδιο ήταν μάλλον επιζήμια για τη δραστικότητα. Το ίδιο αποτέλεσμα παρατηρήθηκε και με την αντικατάσταση του μεθυλεστέρα στη θέση 11 από το ελεύθερο οξύ. Πράγματι, ο 11 μεθυλεστέρας λειτουργεί σταθεροποιητικά για τη συνολική δομή, αντίθετα με το ελεύθερο οξύ. Είναι γνωστό ότι η απογλυκοσυλίωση, που ακολουθείται από 11-δεκαρβοξυμεθυλίωση (χημική ή ενζυμική) της ελαιοευρωπεΐνης (1), θα μπορούσε να προκαλέσει διάνοιξη της σεκοϊριδοειδούς δομής της ελαιοευρωπεΐνης (1), σε ολεασίνη (2) [188], [32]. Έτσι, παρόμοιες τροποποιήσεις των ημι-συνθετικών αναλόγων ελαιοευρωπεΐνης (1), ενδοκυτταρικά, θα μπορούσαν, ενδεχομένως, να οδηγήσουν σε αδρανείς, ανοικτής μορφής μεταβολίτες.



(65) R= H
(51) R= Ac

(43) R= Ac

(63) R= H
(44) R= Ac

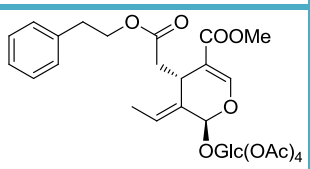
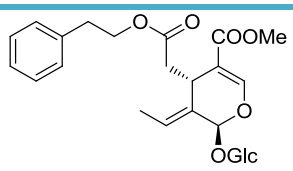
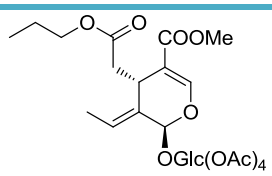
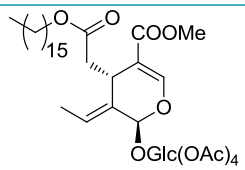
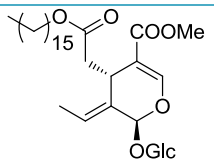
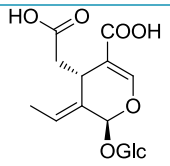
Εικόνα 105. *Δομές ημι-συνθετικών αναλόγων ελαιοευρωπεΐνης (1), με βελτιωμένη αντικαρκινική δράση, έναντι κυττάρων SKBR3*[63]

Απροσδόκητα, η εισαγωγή ενός εύκαμπτου αλειφατικού εστέρα στη θέση 7, ήταν ευεργετική για τη βελτίωση της αντικαρκινικής δράσης των ημι-συνθετικών αναλόγων. Σ' αυτά τα πλαίσια, το δραστικότερο μόριο (63) διαθέτει έναν κετυλο εστέρα, επισημαίνοντας την ανάγκη να αυξηθεί επίσης η λιποφιλικότητα του σεκοϊριδοειδούς σκελετού, προκειμένου να βελτιωθεί η κυτταροτοξικότητα. Αυτός ο ενισχυμένος λιπόφιλος χαρακτήρας της ένωσης (63), δύναται να οδηγήσει σε καλύτερη ισορροπία μεταξύ υδροφιλικότητας (γλυκόζης) και λιποφιλικότητας (κετυλο ομάδα), συγκριτικά με την ελαιοευρωπεΐνη (1), οδηγώντας, τελικά, σε αυξημένη ικανότητα διέλευσης μέσω της κυτταρικής μεμβράνης των καρκινικών κυττάρων. Ωστόσο, αυτή η υπόθεση χρήζει επιβεβαίωσης, μέσω περαιτέρω πειραμάτων και ταυτοποίησης του κυτταρικού στόχου.

Για την περαιτέρω αξιολόγηση της κυτταροτοξικής δράσης των πέντε δραστικότερων αναλόγων, η αξιολόγηση επεκτάθηκε στις τέσσερις, προερχόμενες από συμπαγείς όγκους, καρκινικές κυτταρικές σειρές ανθρώπινης προέλευσης, που αρχικά χρησιμοποιήθηκαν για να εκτιμηθεί η δραστικότητα του, εμπλουτισμένου σε ελαιοευρωπεΐνη (1), εκχυλίσματος (*Πίνακας 7*), καθώς και σε δύο επιπλέον λευχαιμικές κυτταρικές σειρές, την HL-60[31] (προμυελοκυτταρική λευχαιμία) και K562[65] (ερυθρολευχαιμία). Σ' αυτούς τους ελέγχους, η δοξορουβικίνη χρησιμοποιήθηκε και πάλι ως θετικός μάρτυρας, ενώ η ένωση (22), που προηγουμένως αναγνωρίστηκε ως αδρανής (*Πίνακας 8*), χρησιμοποιήθηκε ως αρνητικός μάρτυρας. Η επαγωγή του κυτταρικού θανάτου προσδιορίστηκε με την αναγωγική δοκιμασία χρώσης του MTT[58], μετά από 72 ώρες έκθεσης των καρκινικών κυττάρων στο κάθε ανάλογο και υπολογίσθηκαν οι τιμές IC_{50}[64] (*Πίνακας 9*) [287].

Πίνακας 9. *Η IC_{50}[64] (μm) σε κυτταρική σειρά SKBR3*[63] *αδενοκαρκινώματος μαστού ανθρώπινης προέλευσης*

		$IC_{50} \pm SD$ (μM)[a]						
Nº	**Προϊόν**	FM3	HCT-116	HeLa	MCF-7	SKBR3	HL-60	K562

αναφ.								
(51)		29.33 ± 1.53	26.00 ± 3.60	21.02 ± 1.85	18.67 ± 2.08	11.50 ± 1.06	10.00 ± 1.00	16.03 ± 1.25
(65)		28.00 ± 2.00	25.33 ± 2.89	18.51 ± 4.04	19.33 ± 4.04	11.02 ± 0.71	10.33 ± 0.76	20.04 ± 1.20
(43)		29.00 ± 1.00	25.67 ± 1.53	17.51 ± 2.41	15.00 ± 2.00	6.60 ± 0.57	10.67 ± 0.58	8.50 ± 0.78
(44)		27.00 ± 1.00	21.00 ± 1.00	17.00 ± 1.02	9.66 ± 0.58	3.81 ± 0.56	8.00 ± 1.00	7.00 ± 0.95
(63)		**8.83 ± 1.61**	**12.33 ± 2.52**	**2.70 ± 0.23**	**2.00 ± 0.00**	**1.60 ± 0.42**	**0.38 ± 0.04**	**0.70 ± 0.08**
(1)	**Oleuropein**	268.82 ± 3.51	181.86 ± 2.89	275.60 ± 2.41	161.57 ± 2.08	160.44 ± 1.50	54.26 ± 4.04	64.73 ± 3.02
(22)		>50	>50	>50	>50	>50	>50	>50
	Doxorubicin	0.217 ± 0.002	0.100 ± 0.001	0.221 ± 0.004	0.220 ± 0.004	0.202 ± 0.001	0.017 ± 0.0004	0.018 ± 0.0004

[a]Οι τιμές lC_{50} αποτελούν M.O. ± SD από 3 ανεξάρτητα πειράματα που πραγματοποιήθηκαν.

Όπως παρουσιάζεται στον Πίνακα 9, η πλέον υποσχόμενη ένωση είναι το ανάλογο (63) (IC_{50} = 0.38-12.33 μM), με μία κέτυλο ομάδα (δεκαέξι άνθρακες) στη θέση 7 και έναν μεθυλεστέρα στη θέση 11. Η αντικαρκινική δράση αυτού του αναλόγου ήταν πιο έντονη έναντι της προμυελοκυτταρικής λευχαιμικής κυτταρικής σειράς HL-60[31], παρουσιάζοντας τη χαμηλότερη καταγεγραμμένη τιμή IC_{50}[64] (0.38 μM). Με βάση αυτά τα αποτελέσματα, το ανάλογο (63) αξιολογήθηκε περαιτέρω *in vitro*, πριν από τη χορήγηση του σε ποντίκια [287].

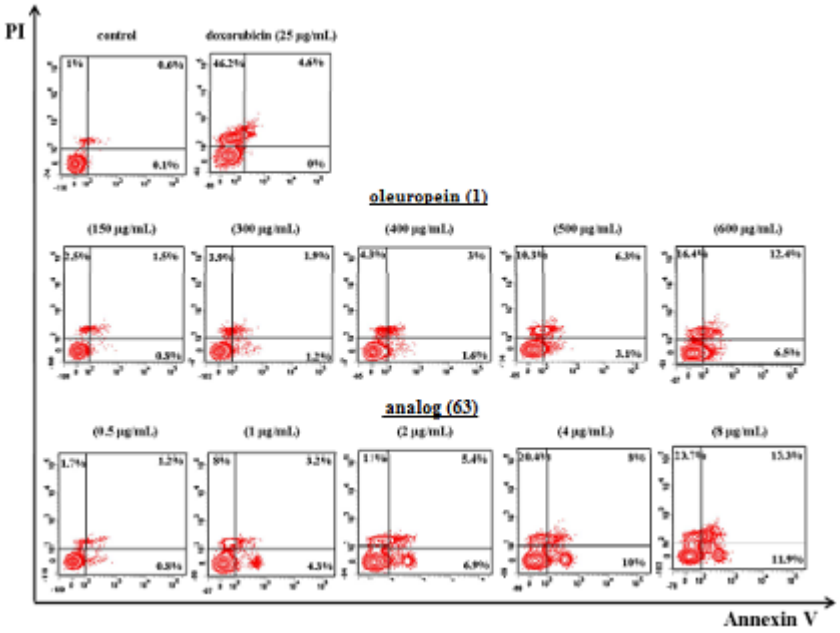
V.1.c. Αξιολόγηση της τοξικότητας του ημι-συνθετικού αναλόγου (63), σε φυσιολογικά κύτταρα

Η εκτίμηση της κυτταροτοξικότητας των εν δυνάμει φαρμάκων έναντι των καρκινικών κυτταρικών σειρών, είναι σημαντική όταν επιλέγουμε τα πιο ισχυρά αντικαρκινικά μόρια. Ωστόσο, τα συγκριτικά πειράματα τοξικότητας σε καρκινικά και φυσιολογικά κύτταρα, είναι πρωτεύουσας σημασίας, καθώς αυτά θα καθορίσουν το προφίλ τοξικότητας του εκάστοτε

μορίου. Θεωρητικά, τα φυσιολογικά κύτταρα, όπως τα μονοπύρηνα κύτταρα περιφερικού αίματος (PBMCs), είναι ανθεκτικά στην τοξικότητα και απαιτούνται υψηλότερες συγκεντρώσεις δραστικών ενώσεων για τη λύση τους [289]. Ωστόσο, στο δρόμο προς τον όγκο – στόχο, η πλειονότητα των αντικαρκινικών φαρμάκων που χρησιμοποιούνται, περνούν μέσω της συστηματικής κυκλοφορίας, στο σώμα, καθώς, κατά κανόνα, χορηγούνται ενδοφλεβίως.

Τα PBMCs είναι συνήθως τα πρώτα κύτταρα που αντιμετωπίζουν υψηλές συγκεντρώσεις του φαρμάκου και συνεπώς, αποτελούν ένα σημαντικό εργαλείο για την αξιολόγηση της τοξικότητας του φαρμάκου, τοξικότητα που μπορεί να προκαλέσει σοβαρά ανεπιθύμητα συμβάντα, όπως η λεμφοπενία, η ουδετεροπενία και η ευαισθησία σε λοιμώξεις [290]. Ως εκ τούτου, χρησιμοποιήθηκαν κύτταρα PBMCs, για τον προσδιορισμό των συγκεντρώσεων της ελαιοευρωπεΐνης (1) και του αναλόγου (63), που προκαλούν αποδεκτή τοξικότητα.

Τα φρέσκα απομονωθέντα, από υγιείς δότες αίματος, PBMCs, καλλιεργήθηκαν, για 24 ώρες, με ελαιοευρωπεΐνη (1) και με το ανάλογο (63) και αναλύθηκαν με κυτταρομετρία ροής, ακολουθώντας την σήμανση με ανεξίνη V και/ ή ιωδιούχο προπίδιο (PI). Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι τα PBMCs που επωάστηκαν σε απλό μέσο καλλιέργειας (αρνητικός έλεγχος) εμφάνισαν <2% θετική συσχέτιση ανεξίνης V και /ή PI, ενώ, όπως αναμενόταν, 25 μg / mL δοξορουβικίνης οδήγησαν >50% των PBMCs σε νέκρωση (*Εικόνα 106*).



Εικόνα 106. *Αξιολόγηση τοξικότητας της ελαιοευρωπεΐνης (1) και του αναλόγου (63), έναντι των μονοπύρηνων κυττάρων του περιφερικού αίματος (PBMCs). Μετά από έκθεση, σε αυξανόμενες συγκεντρώσεις των ενώσεων, για 24 ώρες, τα κύτταρα PBMCs σημάνθηκαν με ανεξίνη V (η οποία σηματοδοτεί αποπτωτικά κύτταρα) και ιωδιούχο προπίδιο (PI, το οποίο κηλιδώνει νεκρωτικά κύτταρα) και αναλύθηκε αμέσως με κυτταρομετρία ροής. Τα κύτταρα στα τεταρτημόρια χαρακτηρίστηκαν ως αποπτωτικά (ανεξίνη V+ PI-, κάτω δεξιά) και νεκρωτικά (PI+, άνω δεξιά και άνω αριστερά). Οι αριθμοί σε κάθε τεταρτημόριο δείχνουν το ποσοστό των συνολικών κυττάρων που προέκυψαν. Στην εικόνα παρατίθεται ένα αντιπροσωπευτικό πείραμα από τα πέντε, που εκτελέστηκαν με κύτταρα PBMC, από διαφορετικούς δότες. Ως έλεγχος, χρησιμοποιήθηκαν κύτταρα PBMCs, που επωάστηκαν σε μέσο καλλιέργειας.*

Η ελαιοευρωπεΐνη (1) προκάλεσε το θάνατο σε <10% των κυττάρων PBMC, σε συγκεντρώσεις μεταξύ 150 και 400 μg/ mL. Ωστόσο, όταν τα κύτταρα αυτά επωάστηκαν με υψηλότερες συγκεντρώσεις (500 και 600 μg/ mL), τα 3-6.5% των PBMC χαρακτηρίστηκαν φαινοτυπικά ως αποπτωτικά και περίπου 17-29%, απέκτησαν χαρακτηριστικά νεκρωτικών κυττάρων. Με βάση τα αποτελέσματα του Πίνακα 9, το ανάλογο (63) εξετάστηκε σε πολύ

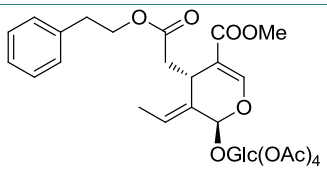
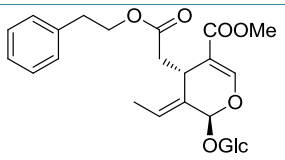
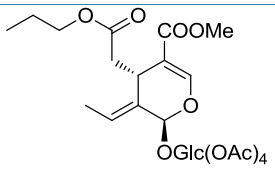
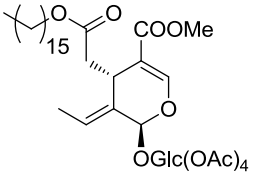
χαμηλότερες συγκεντρώσεις απ' ότι η ελαιοευρωπεΐνη (1), ήτοι από 0.5 έως 8 μg/ mL. Όπως φαίνεται, το (63) ήταν οριακά κυτταροτοξικό, σε συγκέντρωση 0.5 μg/ mL (0.8% αποπτωτικά, 2.9% νεκρωτικά κύτταρα), κατέδειξε χαμηλή τοξικότητα έναντι των PBMC κυττάρων, σε συγκεντρώσεις 1 και 2 μg/ mL (~16 και ~30%, αντίστοιχα), ενώ κατά τη διάρκεια έκθεσης των κυττάρων αυτών, για 24 ώρες, σε συγκεντρώσεις 4 και 8 μg/ mL του αναλόγου (63), 28% και 39%, αντίστοιχα, των κυττάρων οδηγήθηκαν σε νέκρωση και 10-12%, σε απόπτωση.

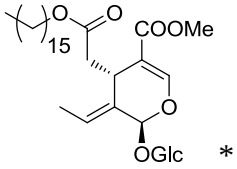
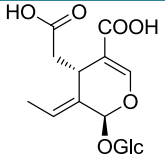
Παρόλο που το ανάλογο (63) ήταν πιο τοξικό από την ελαιοευρωπεΐνη (1), έναντι των κυττάρων PBMCs, τουλάχιστον το 50% των κυττάρων αυτών παρέμεινε βιώσιμο (*Εικόνα 106, κάτω αριστερό τεταρτημόριο*), ακόμα και στην υψηλότερη συγκέντρωση που δοκιμάστηκε. Μεγάλη σημασία έχει το γεγονός ότι, η ελαιοευρωπεΐνη (1) και το ανάλογο (63), σε συγκεντρώσεις κοντά στην IC_{50}[64] τους, έναντι καρκινικών κυττάρων (~200 και 3 μg/ mL αντίστοιχα, *Πίνακας 9*), προκάλεσαν χαμηλή τοξικότητα έναντι των κυττάρων PBMC, της τάξεως του 5-15% (*Εικόνα 106*).

V.1.d. In vivo αξιολόγηση της δράσης του αναλόγου (63), έναντι μελανώματος, σε ποντίκια

Στη συνέχεια των βιολογικών ελέγχων, τα πέντε δραστικότερα ημι-συνθετικά ανάλογα της ελαιοευρωπεΐνης (1), αξιολογήθηκαν, αρχικά, *in vitro*, έναντι της κυτταρικής σειράς μελανώματος ποντικιού B16.F1 (δοκιμασία MTT[58]) [287]. Όπως παρατίθεται στον Πίνακα 10, το ανάλογο (63) εξακολουθεί να είναι το πλέον κυτταροτοξικό ανάλογο και έναντι αυτής της κυτταρικής σειράς (IC_{50} = 1.50 μM), ενώ η ελαιοευρωπεΐνη (1) παρουσίασε παρόμοιο προφίλ δραστικότητας, όπως στην περίπτωση των καρκινικών κυττάρων FM3[59] (*Πίνακας 9*).

Πίνακας 10. *Τιμές IC_{50}[64] (σε μM) των πέντε δραστικότερων ημι-συνθετικών αναλόγων της ελαιοευρωπεΐνης (1), έναντι της κυτταρικής σειράς B16.F1 μελανώματος ποντικιού.*

N^{o} αναφ.	**Compound**	**B16.F1 IC_{50} (in μM)**
(51)		43.01 ± 1.12
(65)		41.00 ± 1.44
(43)		44.02 ± 1.48 [a]
(44)		34.05 ± 1.95

(63)	 *	1.50 ± 0.18
(22)		>50
(1)	**Oleuropein****	238.90 ± 1.82
	Doxorubicin***	0.230 ± 0.002

*ισούται με 0.94 μg/ mL, ** ισούται με 150,45 μg/ mL, *** ισούται με 0.130 μg/ mL

[a]Οι τιμές lC_{50} αποτελούν M.O. ± SD από 3 ανεξάρτητα πειράματα που πραγματοποιήθηκαν.

Ακολούθως, διεξήχθη μία *in vitro* κινητική μελέτη, συναρτήσει του χρόνου, ώστε να προσδιοριστεί η έναρξη της κυτταροτοξικότητας που προκαλείται από την ελαιοευρωπεΐνη (1) και από το ανάλογο (63), επί των κυττάρων B16.F1, σε διάστημα έως και 72 ώρες. Για το σκοπό αυτό, τα κύτταρα B16.F1 επωάστηκαν για 24, 48 και 72 ώρες με ελαιοευρωπεΐνη (1) και με το ανάλογο (63), συγκεντρώσεων ίσων με τις τιμές των IC_{50}[64] τους (283.90 μM και 1.50 μM, αντίστοιχα). Τα ποσοστά των κυττάρων μελανώματος που οδηγήθηκαν σε απόπτωση και νέκρωση καταγράφηκαν με κυτταρομετρία ροής, ενώ η δοξορουβικίνη χρησιμοποιήθηκε ως θετικός έλεγχος.

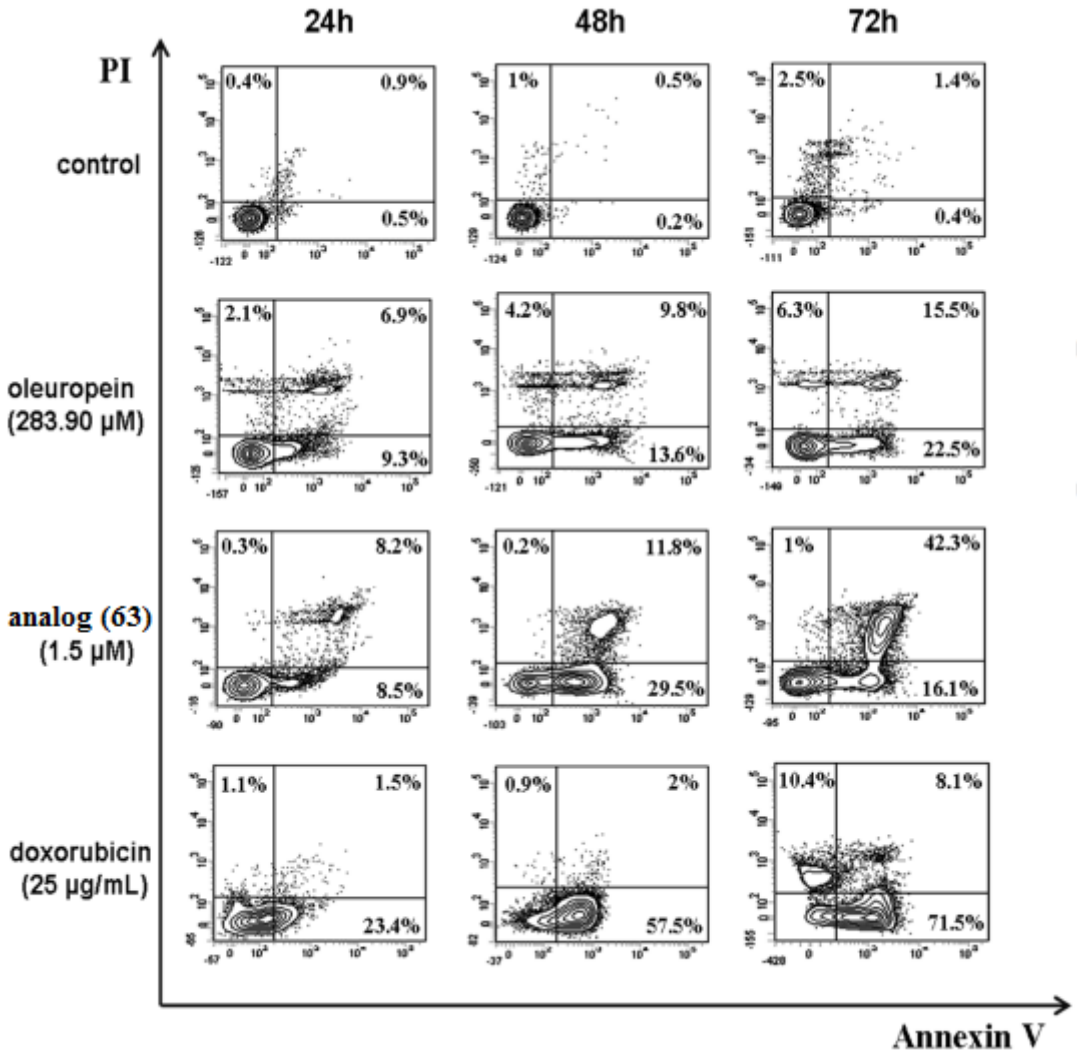
Όπως προκύπτει από την Εικόνα 107, τα κύτταρα B16.F1 που επωάστηκαν σε απλό μέσο καλλιέργειας (control) ήταν, ως επί το πλείστον, βιώσιμα (σε ποσοστό >95%) καθ' όλη τη διάρκεια της επώασης των 72 ωρών και τα αποπτωτικά/ νεκρωτικά κύτταρα αντιπροσώπευαν ποσοστό <5% των κυττάρων.

Τα κύτταρα B16.F1 που υποβλήθηκαν σε αγωγή με 25 μg/ mL δοξορουβικίνη, οδήγησαν σταδιακά σε απόπτωση/ νέκρωση (26% στις 24 ώρες, 60.4% στις 48 ώρες και 90% στις 72 ώρες) και πολύ χαμηλό ποσοστό (10%) παρέμεινε βιώσιμο, κατόπιν 72 ωρών επώασης.

Η ελαιοευρωπεΐνη (1) και το ανάλογο (63) παρουσίασαν διαφορετικό κινητικό προφίλ, σε σύγκριση με τη δοξορουβικίνη. Τα κύτταρα B16.F1 που εκτέθηκαν για 24, 48 και 72 ώρες σε ελαιοευρωπεΐνη (1), οδήγησαν σταδιακά σε απόπτωση (9.3%, 13.6% και 22.5%, αντιστοίχως) και νέκρωση (9%, 14% και 21.8%, αντιστοίχως), αλλά το συνολικό ποσοστό των νεκρωτικών ή νεκρών κυττάρων, ακόμη και στις 72 ώρες, αντιπροσώπευαν λιγότερο από το 50% των συνολικών κυττάρων. Αντίθετα, το ανάλογο (63), που χρησιμοποιήθηκε σε πολύ χαμηλότερη συγκέντρωση απ' ότι η ελαιοευρωπεΐνη (1), επήγαγε ταχεία απόπτωση των κυττάρων B16.F1, που καταγράφηκε ήδη από τις πρώτες 24 ώρες έκθεσης και εντάθηκε στις 48 και στις 72 ώρες, οπότε περίπου το 60% των κυττάρων B16.F1 κατέστησαν μη βιώσιμα (*Εικόνα 107*).

Η αντικαρκινική επίδραση της ελαιοευρωπεΐνης (1) και του αναλόγου (63), εξετάστηκε περαιτέρω σε ένα *in vivo* θεραπευτικό μοντέλο μελανώματος. Κύτταρα B16.F1 χορηγήθηκαν με υποδόριο (sc) εμβολιασμό, στο δεξί πλευρό ποντικιών C57BL/ 6. Μετά από 11 ημέρες, όταν οι όγκοι έγιναν ψηλαφητοί, τα ποντίκια υποβλήθηκαν σε αγωγή, ενδοπεριτοναϊκώς (IP), α) με φυσιολογικό ορό, ρυθμισμένο με φωσφορικά (PBS, control), β) με ελαιοευρωπεΐνη (1) (300 και 600 μg/ ποντίκι/ δόση, συνολικά 2.4 και 4.8 mg/ ποντίκι ή 100 και 200 mg/ Kg) ή γ) με το ανάλογο (63) (2, 4 και 6 μg/ ποντίκι, συνολικά 16, 32 και 48 μg/ ποντίκι). Κατόπιν, τα ποντίκια

παρακολουθήθηκαν για διάστημα 28 ημερών και υποβλήθηκαν σε ευθανασία την ημέρα 29. Επίσης, το DMSO χρησιμοποιήθηκε ως μάρτυρας που παράγει παρόμοια αποτελέσματα με PBS.



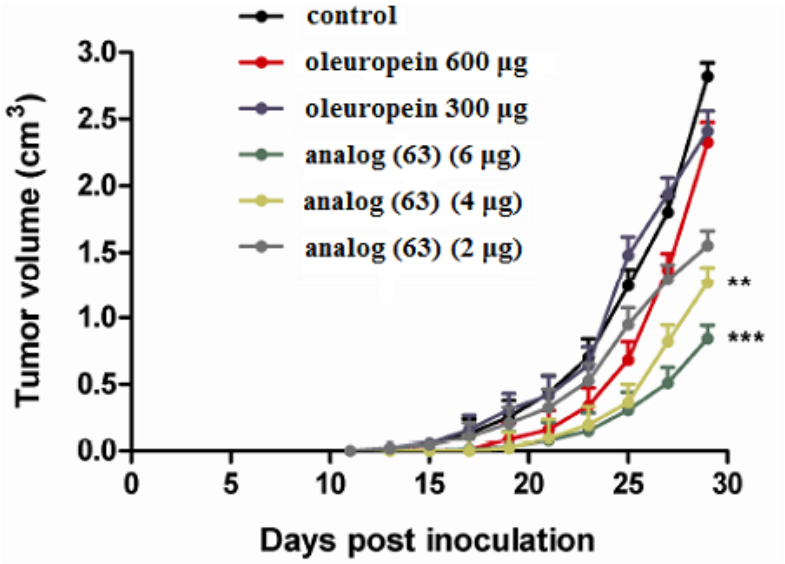
Εικόνα 107. *Ανάλυση κυτταρομετρίας ροής κυτταρικού θανάτου B16.F1 κυττάρων, μετά από έκθεση σε ελαιοευρωπεΐνη (1) και στο ανάλογο (63). Παρατίθεται ένα αντιπροσωπευτικό πείραμα από τα 3 που διεξήχθησαν, με παρόμοια αποτελέσματα.*

Η δόση της ελαιοευρωπεΐνης (1) που χορηγήθηκε βασίστηκε σε προηγούμενες αναφορές που έδειξαν ότι η ημερήσια χορήγησή της από το στόμα, μέχρι 200 mg/ kg, δεν προκαλεί τοξικότητα [143]. Εδώ, χορηγήθηκε η ίδια συνολική συγκέντρωση της ελαιοευρωπεΐνης (1), αλλά διαιρέθηκε σε 8 δόσεις και εγχύθηκε ενδοπεριτοναϊκώς, ώστε να χορηγηθεί η ίδια συγκέντρωση ελαιοευρωπεΐνης (1) ή αναλόγου (63), σε όλα τα ζώα.

Όπως παρατίθεται στην Εικόνα 108, στα ζώα ελέγχου (που εγχύθηκαν με PBS, control) καταδεικνύεται μία ταχεία αύξηση στις διαστάσεις του όγκου (μέσος όγκος του όγκου: 2.83 cm^3, την ημέρα 29). Η ανάπτυξη του όγκου μελανώματος σε ποντίκια που έλαβαν 300 μg/ ποντίκι / δόση ελαιοευρωπεΐνης (1), έδειξε παρόμοια αποτελέσματα με τα ποντίκια-μάρτυρες, αλλά καταγράφηκαν ελαφρώς μικρότερες μάζες όγκων την ημέρα της ευθανασίας (2.41 cm^3, την ημέρα 29). Τα ποντίκια που υποβλήθηκαν σε αγωγή με 600 μg/ ποντίκι/ δόση ελαιοευρωπεΐνης (1), εμφάνισαν βραδύτερο ρυθμό αύξησης του όγκου (2.33 cm^3, την ημέρα 29), σε σύγκριση με τα ποντίκια-μάρτυρες ή ποντίκια που έλαβαν 300 μg/ ποντίκι/ δόση ελαιοευρωπεΐνης (1).

Η θεραπευτική χορήγηση του αναλόγου (63), ελάττωσε τους ρυθμούς ανάπτυξης του μελανώματος και στις τρεις ομάδες (2, 4 και 6 μg/ ποντίκι/ δόση), σε σύγκριση με τα ποντίκια-μάρτυρες και τις ομάδες όπου χορηγήθηκε ελαιοευρωπεΐνη (1), αλλά η στατιστική σημασία ($p<0,05$) επιτεύχθηκε, μόνο για ζώα που έλαβαν θεραπεία με 4 και 6 μg του αναλόγου (63), έναντι του ποντικιού-μάρτυρα και έναντι της ομάδας 300 μg/ ποντίκι/ δόση ελαιοευρωπεΐνης (1).

Ο χαμηλότερος μέσος όγκος όγκου καταγράφηκε σε ποντίκια που έλαβαν το ανάλογο (63) σε 6 μg/ ποντίκι/ δόση (0.84 cm^3 την ημέρα 29), όγκος ο οποίος ήταν ~3.4 φορές μικρότερη σε σύγκριση με τους αντίστοιχους όγκους, στα ποντίκια-μάρτυρες. Αυτά τα δεδομένα υποδεικνύουν ότι α) η αναστολή της ανάπτυξης μελανώματος *in vivo* εξαρτάται από τη δόση τόσο της ελαιοευρωπεΐνης (1) όσο και του αναλόγου (63), β) η ελαιοευρωπεΐνη (1) είναι μη τοξική, έχει αδύναμη αντικαρκινική δραστικότητα *in vivo* και, ακόμη και όταν χορηγείται σε υψηλές συγκεντρώσεις *in vivo*, δεν έχει σημαντική επίδραση στην ανάπτυξη του όγκου και, κατά συνέπεια, στην επιβίωση των ζώων και γ) το ανάλογο (63), που χρησιμοποιήθηκε σε συγκέντρωση 100 φορές μικρότερη από την ελαιοευρωπεΐνη (1), έδειξε, αφ' ενός ισχυρό αντικαρκινικό αποτέλεσμα, αφ' ετέρου, ομοίως με την ελαιοευρωπεΐνη (1), δεν παρατηρήθηκαν εμφανή σημάδια τοξικότητας *in vivo*. Επιπλέον, η χορήγηση του αναλόγου (63) είχε ως αποτέλεσμα τη σημαντική επιβράδυνση της ανάπτυξης του όγκου μελανώματος [287]. Αυτή η επιβράδυνση, σύμφωνα με βιβλιογραφικές αναφορές, συνοδεύεται συνήθως από παρατεταμένη επιβίωση των ζώων [291].



Εικόνα 108. *Η ελαιοευρωπεΐνη (1) και το ανάλογο (63) επιβραδύνουν την ανάπτυξη του όγκου μελανώματος, in vivo. Τα ποντίκια C57B / 6 υποβλήθηκαν σε εμβολιασμό υποδορίως (sc) με συγγενικά κύτταρα B16.F1 και θεραπευτικά υποβλήθηκαν σε ενδοπεριτοναϊκή αγωγή, με 8 δόσεις ελαιοευρωπεΐνης (1) (300 και 600 μg/ δόση/ ποντίκι) ή του αναλόγου (63) (2-6 μg/ δόση/ ποντίκι), χορηγούμενα κάθε δεύτερη ημέρα. Τα ποντίκια-μαρτυρες (control) έλαβαν PBS. Η ανάπτυξη των όγκων παρακολουθήθηκε για 29 ημέρες.* Παρατίθενται συγκεντρωμένα δεδομένα από 5 ποντίκια/ ομάδα. ** $\rho < 0.01$; *** $p < 0.001$, συγκριτικά με τα ποντίκια-μάρτυρες (control) και την ομάδα 300 μg ελαιοευρωπεΐνης (1) / δόση/ ποντίκι.

Η ελαιοευρωπεΐνη (1) έχει ήδη χρησιμοποιηθεί σε *in vivo* μοντέλα όγκων, έχοντας παρουσιάσει πολύ ενθαρρυντικά αποτελέσματα. Συγκεκριμένα, όταν χορηγήθηκε από στόματος, σε ποντίκια που εμφάνισαν αυθόρμητους όγκους, η ελαιοευρωπεΐνη (1) κατέστρεψε εντελώς τους όγκους, εντός 9-12 ημερών [292]. Επιπλέον, η ελαιοευρωπεΐνη (1), εντασσόμενη στη διατροφή, ανέστειλε την ανάπτυξη του όγκου και την εξάπλωση των μεταστάσεων σε

ανοσοκατασταλμένα ποντίκια με ωοθηκεκτομή, στα οποία εγχύθηκαν ξενομοσχεύματα όγκου MCF-7[62] [293], ενώ διάλυμα ελαιοευρωπεΐνης (1) σε νερό, μείωσε τον όγκο και το βάρος του όγκου στα ποντίκια, μετά από ξενομόσχευση καρκίνου του μαστού [294].

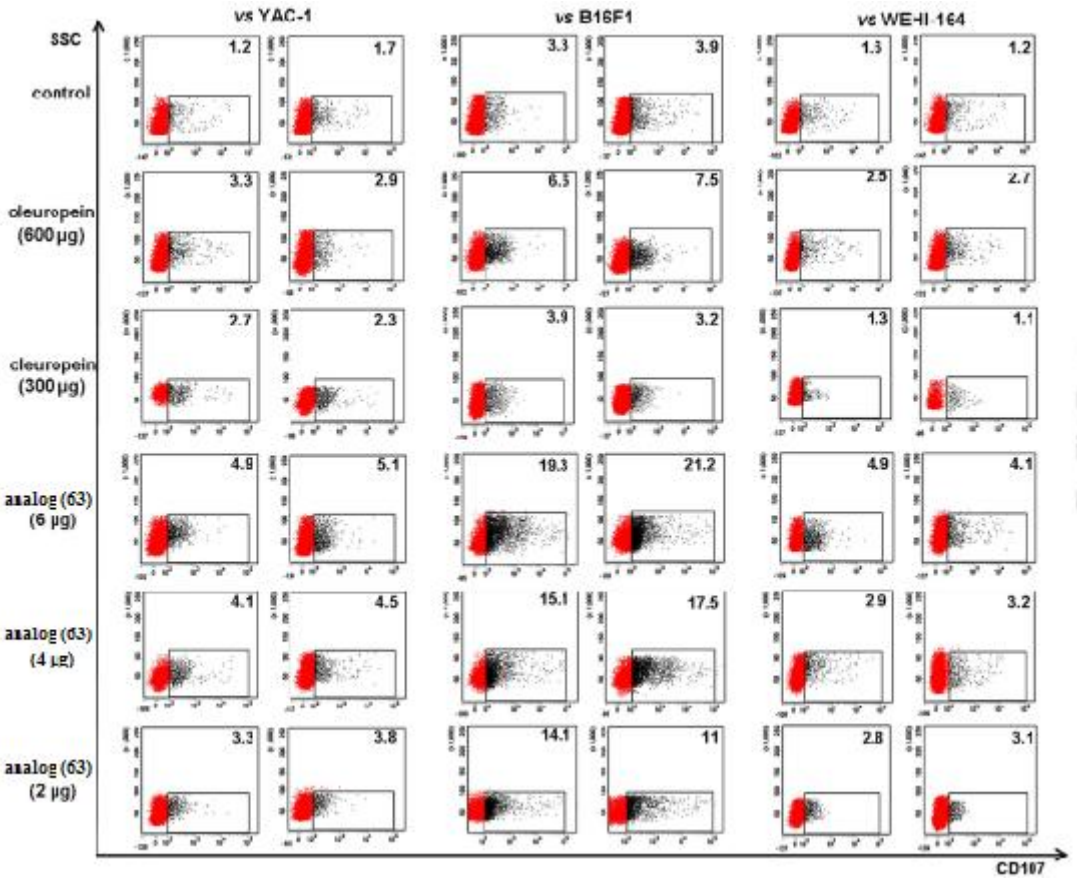
V.1.e. Το ανάλογο (63) επάγει την in vivo παραγωγή αντικαρκινικών «εκτελεστών»

Η *in vivo* μείωση της ανάπτυξης του όγκου που παρατηρήθηκε κατά τη θεραπεία με το ανάλογο (63), μας ώθησε να αξιολογήσουμε περαιτέρω εάν το ανάλογο (63) επάγει *in vívo* αντιδραστικές, έναντι των όγκων, ανοσοαποκρίσεις. Σπληνοκύτταρα που απομονώθηκαν από τα, υποβληθέντα στην αγωγή, ποντίκια, χωρίς επιπρόσθετη διέγερση *ex vívo*, χρησιμοποιήθηκαν για την «εξόντωση» των καρκινικών σειρών YAC-1, των συγγενικών B16.F1 και WEHI 164 κυττάρων, σε πειραματικό μοντέλο ποντικιού.

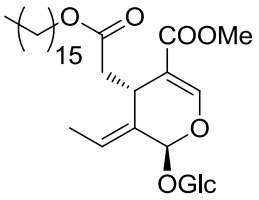
Η κυτταροτοξικότητα των κυττάρων αξιολογήθηκε με κυτταρομετρία ροής, βασισμένη στην επιφανειακή έκφραση του χαρακτηριστικού δείκτη αποκοκκώσεως, CD107, επί των κυττάρων-«εκτελεστών» [295]. Τα αποτελέσματα μας, έδειξαν ότι τα σπληνοκύτταρα από ποντίκια-μάρτυρες (control) και από ποντίκια που υποβλήθηκαν σε αγωγή με 300 μg/ δόση ελαιοευρωπεΐνης (1), δεν ήταν κυτταροτοξικά έναντι οποιουδήποτε στόχου, ενώ σπληνοκύτταρα από ποντίκια που έλαβαν 600 μg/ δόση ελαιοευρωπεΐνης (1), ήταν ελαφρώς, αλλά όχι στατιστικά σημαντικά, πιο δραστικά, ιδιαίτερα έναντι των συγγενικών κυττάρων B16.F1 (μέση ένταση φθορισμού (MFIs) 6.6/ 7.5 έναντι 3.3/ 3.9 του control).

Επιπλέον, παρατηρήθηκε περιθωριακή κυτταροτοξικότητα έναντι των κυττάρων YAO-1 και WEHI 164 (MFI <3). Σπληνοκύτταρα από ποντικούς που υποβλήθηκαν σε αγωγή με το ανάλογο (63) (6 μg), ήταν τα πλέον αποτελεσματικά για τη θανάτωση όλων των κυττάρων-στόχων και ειδικά των B16.F1 (MFI 19.3/ 21.2, *Εικόνα 109*). Τα ίδια σπληνοκύτταρα προκάλεσαν τη θανάτωση των κυτταρικών στόχων YAC-1 (MFIs 4.9/ 5.1) και WEHI 164 (MFI 4.9/ 4.1). Συνεπώς, σπληνοκύτταρα από ποντίκια που υποβλήθηκαν σε αγωγή με 2 και 4 μg του αναλόγου (63), κατέστρεψαν αποτελεσματικά κύτταρα-στόχους B16.F1 (MFIs 14.1/ 11.0 και 15.1/ 17.5, αντιστοίχως), YAC-1 και WEHI 164 (*Εικόνα 109*).

Αυτά τα αποτελέσματα υποδεικνύουν ότι το ανάλογο (63), ιδιαίτερα όταν χορηγείται στην υψηλότερη δόση που χρησιμοποιήθηκε (συνολικά 48 μg/ ποντίκι), μπορεί να προκαλέσει, κυρίως, την *in vívo* επέκταση των, αντιδραστικών στο μελάνωμα, Τ-λεμφοκυττάρων και, δευτερευόντως, να διεγείρει μη-ειδικές ανοσοαποκρίσεις, με τη μεσολάβηση NK και LAK κυττάρων.



Εικόνα 109. *Η ελαιοευρωπεΐνη και το ανάλογο (63) επάγουν την παραγωγή αντιδραστικών, έναντι των όγκων, ανοσοαποκρίσεων, in vivo. Τα σπληνοκύτταρα ποντικιού που απομονώθηκαν την 29η ημέρα, συνεπωάστηκαν με κύτταρα-στόχους B16-F1, YAO-1 (ευαίσθητα σε NK) και WEHI 164 (ευαίσθητα σε LAK) και η έκφραση CD107 (εκδηλώσεις με πύκνωση) αξιολογήθηκε με κυτταρομετρία ροής. Οι αριθμοί δείχνουν τη μέση ένταση φθορισμού (MFI) από κύτταρα σπλήνας δύο αντιπροσωπευτικών ποντικιών ανά ομάδα που εξετάστηκε ξεχωριστά.*



V.2. Αξιολόγηση της δράσης φυσικών και συνθετικών αναλόγων, έναντι της νόσου του Alzheimer

Για τη δράση τους έναντι της νευροεκφυλιστικής νόσου του Alzheimer, αξιολογήθηκαν φυσικά μόρια αλλά και συνθετικά ανάλογα, καθαρά, αλλά και μίγματα αυτών (εκχυλίσματα).

Στην συνέχεια, παρατίθεται το πρωτόκολλο που εφαρμόστηκε για την αξιολόγηση της δράσης όλων των μορίων και εκχυλισμάτων και τα αποτελέσματα που προέκυψαν, για το καθένα απ' αυτά. Η μελέτη πραγματοποιήθηκε στο Τμήμα Βασικών Φαρμακευτικών Επιστημών του Τμήματος Φαρμακευτικής του Πανεπιστημίου της Λουιζιάνα, Monroe, ΗΠΑ.

V.2.a. Πρωτόκολλο για την αξιολόγηση της δράσης έναντι της νόσου Alzheimer

Όλα τα δείγματα, πριν την ανάλυση, αποθηκεύτηκαν στους 4^{o}C. Έπειτα, όλες οι ενώσεις ελέγχθηκαν, αρχικά, με τη δοκιμασία HTS (προβολή υψηλής απόδοσης, high-throughput screening), ώστε να επιλεγούν οι ενώσεις που ενισχύουν το μοντέλο BBB (αιματο-εγκεφαλικός φραγμός, blood-brain barrier) *in vitro* [296].

Ο BBB διατηρεί την ομοιοστασία του εγκεφάλου και την προστατεύει από την ελεύθερη είσοδο χημικών ουσιών, τοξινών και φαρμάκων. Η λειτουργία φραγμού του BBB διατηρείται κυρίως από τριχοειδή ενδοθηλιακά κύτταρα, που διαχωρίζουν φυσικά τον εγκέφαλο από το αίμα. Αρκετές νευρολογικές ασθένειες, όπως η νόσος του Alzheimer (AD), είναι γνωστό ότι διαταράσσουν την ακεραιότητα του BBB.

Στην εν λόγω μελέτη, οι ενώσεις που διέσπασαν την ακεραιότητα του μοντέλου BBB αποκλείστηκαν, ενώ οι ενώσεις που βελτίωσαν τη στεγανότητα, μελετήθηκαν περαιτέρω. Αυτές οι επιλεγμένες ενώσεις εξετάστηκαν, στη συνέχεια, για την επίδρασή τους στην έκφραση πρωτεϊνών «στενών συνάψεων» (tight junctions) (κλοδίνη-5, οκλουδίνη και οκλουδίνη σε σύζευξη με Zo) και στους βασικούς μεταφορείς β-αμυλοειδών πρωτεϊνών (LRP1 και P-gp), στο BBB, χρησιμοποιώντας κηλίδωση Western.

Η κηλίδωση Western αποτελείται από τρία στάδια:

1) ηλεκτροφόρηση, στην οποία το μίγμα των φυσικών πρωτεϊνών (με δομή 3-D) ή μετουσιωμένων πρωτεϊνών (με το μήκος του πολυπεπτιδίου), διαχωρίζεται σε εντοπισμένες ζώνες, με βάση το μέγεθος και το φορτίο,

2) μεταφορά, κατά την οποία οι πρωτεΐνες μετακινούνται από πηκτή πολυμερούς (π.χ. αγαρόζης) επάνω σε μία μεμβράνη (τυπικά νιτροκυτταρίνη ή PVDF), όπου δεσμεύονται με γάλα (ή άλλους παράγοντες δέσμευσης) για την πρόληψη μη-ειδικής δέσμευσης αντισώματος και

3) ανάπτυξη, στην οποία τα συγκροτήματα των πρωτεϊνών ενδιαφέροντος, επισημαίνονται με αντισώματα ειδικά για την πρωτεΐνη-στόχο. Τέλος, η μεμβράνη χρωματίζεται με ένα δευτερεύον αντίσωμα, το οποίο αναγνωρίζει την πρώτη βαφή αντισώματος, ενώ η μεμβράνη μπορεί στη συνέχεια να χρησιμοποιηθεί για ανίχνευση και ανάλυση με μια ποικιλία μεθόδων [297], [298].

Η υπάρχουσα βιβλιογραφία και κάποιες πρόσφατες μελέτες [204], [299], υποδεικνύουν την ιδιότητα του εξαιρετικά παρθένου ελαιολάδου και του φαινολικού συστατικού του, ολεοκανθάλη (3), να ασκούν προστατευτική επίδραση στην υγεία και να μπορούν να μειώσουν τον κίνδυνο της νόσου του Alzheimer (AD). Σύμφωνα με τις μελέτες αυτές, η ολεοκανθάλη (3)

μπορεί να μειώσει τη συσσώρευση β-αμυλοειδών πρωτεϊνών, που εμπλέκονται στη νόσο του Alzheimer, μέσω της αύξησης των P-γλυκοπρωτεϊνών και της LRP1.

V.2.b. Αξιολόγηση δράσης εκχυλισμάτων και φυσικών καθαρών αναλόγων

Τα φυσικά απομονωμένα εκχυλίσματα που προέκυψαν α) **από κομμένα φύλλα και κλαδιά** της *Olea europaea* (υδατικό εκχύλισμα δοκιμής (6)- υποενότητα II.5.b) και β) **από ελαιόκαρπους** της *Olea europaea*, προχωρημένης ωρίμανσης και με προέλευση την Κέρκυρα, όπως περιγράφηκαν, αναλυτικά στις υποενότητες II.5.b.2 και II.5.c.2, αντίστοιχα, αξιολογήθηκαν για την αντι-νευροεκφυλιστική δράση τους, έναντι της νόσου του Alzheimer.

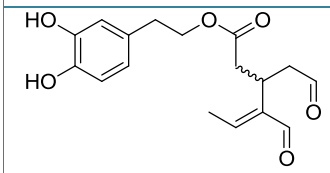
Ακόμη, η καθαρή **φυσική ολεασίνη** (2), που απομονώθηκε από πολυφαινολικό εκχύλισμα εξαιρετικά παρθένου ελαιολάδου (EVOO), με τον τρόπο που περιγράφηκε στην υποενότητα II.5.a, καθώς και πρότυπο δείγμα **φυσικής ολεοκανθάλης** (3), απομονωμένο επίσης από πολυφαινολικό εκχύλισμα EVOO, αξιολογήθηκαν επίσης για τη δράση τους, έναντι της νόσου του Alzheimer.

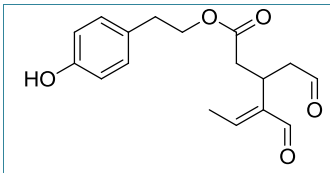
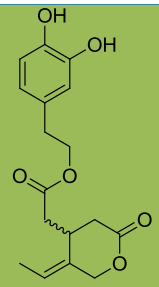
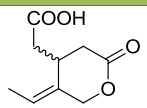
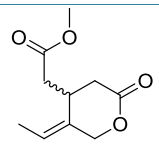
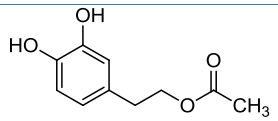
Επιπλέον, για τη δράση τους έναντι της νόσου του Alzheimer αξιολογήθηκαν επίσης το **ολικό εκχύλισμα του υγρού ελαιουργικού αποβλήτου** («*Κατσίγαρος*»), αλλά και οι απομονωμένες από αυτό, φυσικές ενώσεις, που περιγράφηκαν αναλυτικά στην ενότητα II.7 και παρατίθενται εκ νέου στον Πίνακα 11.

Όπως προαναφέρθηκε, όλα τα δείγματα φυσικής προέλευσης ελέγχθηκαν, αρχικά, με τη δοκιμασία HTS (προβολή υψηλής απόδοσης, high-throughput screening), ώστε να επιλεγούν οι ενώσεις που ενισχύουν το μοντέλο BBB (αιματοεγκεφαλικός φραγμός, blood-brain barrier) *in vitro*. Οι ενώσεις, που απέτυχαν στο πρώτο test και διέσπασαν την ακεραιότητα του μοντέλου, αποκλείστηκαν.

Τα αποτελέσματα της αξιολόγησης των εναπομείναντων φυσικών δειγμάτων, ως προς την την επίδρασή τους, στην έκφραση πρωτεϊνών «στενών συνάψεων» (tight junctions) (κλοδίνη-5, οκλουδίνη και οκλουδίνη σε σύζευξη με Zo) και στους βασικούς μεταφορείς βήτα αμυλοειδών (LRP1 και P-gp), παρατίθενται στον Πίνακα 11.

Πίνακας 11. *Αποτελέσματα αξιολόγησης της επίδρασης φυσικών εκχυλισμάτων και καθαρών φυσικών μορίων, στην έκφραση πρωτεϊνών «στενών συνάψεων» και στους βασικούς μεταφορείς β-αμυλοειδών*

Compound	**Improvement (%) compared to negative control (DMSO)**	**Tight Junction proteins**			**Transport Proteins**	
		Claudin-5	***Occludin***	***Zo-Occludin***	***LRP***	***P-gp***
 **(2)**	18%	No effect	No effect	Increased (20% but variable)	No effect	No effect

 (3)	7%	No effect	No effect	No effect	No effect	No effect
 (10)	5%	Increased (50%)	Increased (45%)	Increased (25%)	Increased (30%)	Increased (35%)
 (9)	11%	No effect	No effect	No effect	No effect	No effect
 (5)	18%	No effect	Increased (43%)	No effect	No effect	No effect
 (6)	16%	Increased (55%)	Increased (44%)	No effect	No effect	No effect
Katsigaros Total Extract	3%	Increased (44%)	Increased (36%)	No effect	Decreased (25%)	No effect (high variability)
Olive Leaves H_2O Extract	16%	Increased (11%)	Increased (29%)	No effect	Decreased (22%)	Increased (50%, but variable)
Olives H_2O Extract	20%	Increased (44%)	Increased (68%)	Increased (36%)	No effect	Increased (60%)

Από τον παραπάνω πίνακα, συμπεραίνεται ότι τα αποτελέσματα της αξιολόγησης του δείγματος της φυσικής ολεοκανθάλης (3), έρχονται σε σύγκρουση με τις προαναφερθείσες μελέτες, καθώς αυτή δεν κατέδειξε καμία επίδραση, στις πρωτεΐνες «στενών συνάψεων», αλλά ούτε στις LRP1 και P-gp. Το αποτέλεσμα αυτό, πιθανολογείται να οφείλεται στην μειωμένη σταθερότητα του μορίου, στο διαλύτη DMSO, στον οποίο διαλυτοποιήθηκαν τα δείγματα, για την ανάλυση.

Από τις υπόλοιπες εξεταζόμενες ενώσεις, καμία, με εξαίρεση τη φυσική λακτόνη (10) δεν αύξησε, τόσο την LRP1, όσο και την P-gp. Επιπλέον, σε συμφωνία με προηγούμενες αδημοσίευτες μελέτες, σε αυτή τη μελέτη, η ολεασίνη (2) δεν εμφανίζει καμία επίδραση στους προαναφερθέντες μεταφορείς, LRP1 και P-gp και σχεδόν καμία επίδραση στις πρωτεΐνες «στενών συνάψεων».

Τέλος, από τα δεδομένα του Πίνακα 11, συμπεραίνεται ότι μεταξύ των αξιολογούμενων δειγμάτων, το υδατικό εκχύλισμα των ελαιόκαρπων αποδεικνύεται το πιο πολλά υποσχόμενο δείγμα, καθώς, αφ' ενός επάγει την δράση των πρωτεϊνών «στενών συνάψεων» (tight junction proteins), αφ' ετέρου ενισχύει την δράση του βασικού μεταφορέα P-gp, σε πολύ αξιόλογο ποσοστό, της τάξης του 60%.

V.2.c. Αξιολόγηση δράσης συνθετικών αναλόγων

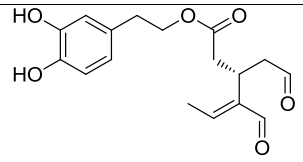
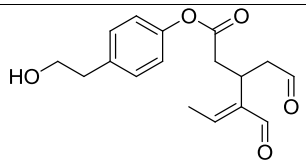
Η ολεασίνη (2), ως ημισυνθετικό ανάλογο της ελαιοευρωπεΐνης (1), που προέκυψε όπως περιγράφηκε αναλυτικά στην υποενότητα III.2, αξιολογήθηκε για τη δράση της έναντι της νόσου Alzheimer. Η μελέτη της δραστικότητας του συνθετικού μορίου, συγκριτικά με αυτήν του αντίστοιχου, φυσικά απομονωμένου, βασίζεται στην προηγούμενα διαπιστωμένη (υποενότητες III.2.c και II.2.d, αντιστοίχως) διαφοροποίηση μεταξύ των τιμών της μετρούμενης στροφικής ικανότητας των δύο μορίων. Συγκεκριμένα, η σχεδόν μηδενική τιμή της στροφικής ικανότητας του φυσικά απομονωμένου μορίου της ολεασίνης (2) (βλ. II.2.d) και η αντίστοιχη τιμή στην περίπτωση της ημισυνθετικής ολεασίνης (2) (βλ. III.2.c), αποδεικνύεται ότι πιθανότατα επηρεάζει το αποτέλεσμα της εν λόγω μελέτης, ως προς τα δύο δείγματα.

Ακόμη, επιλεγμένα ανάλογα της ολεασίνης (2), που συντέθηκαν όπως περιγράφηκε αναλυτικά στο Κεφάλαιο VI.4 και παρατίθενται εκ νέου στον Πίνακα 12, αξιολογήθηκαν επίσης για τη δράση τους.

Και στην περίπτωση των συνθετικών αναλόγων, όλα τα δείγματα ελέγχθηκαν, αρχικά, με τη δοκιμασία HTS, επιλέχθηκαν οι ενώσεις που ενισχύουν το μοντέλο BBB σε *in vitro* μοντέλο και οι ενώσεις που απέτυχαν, στο πρώτο αυτό test, αποκλείστηκαν.

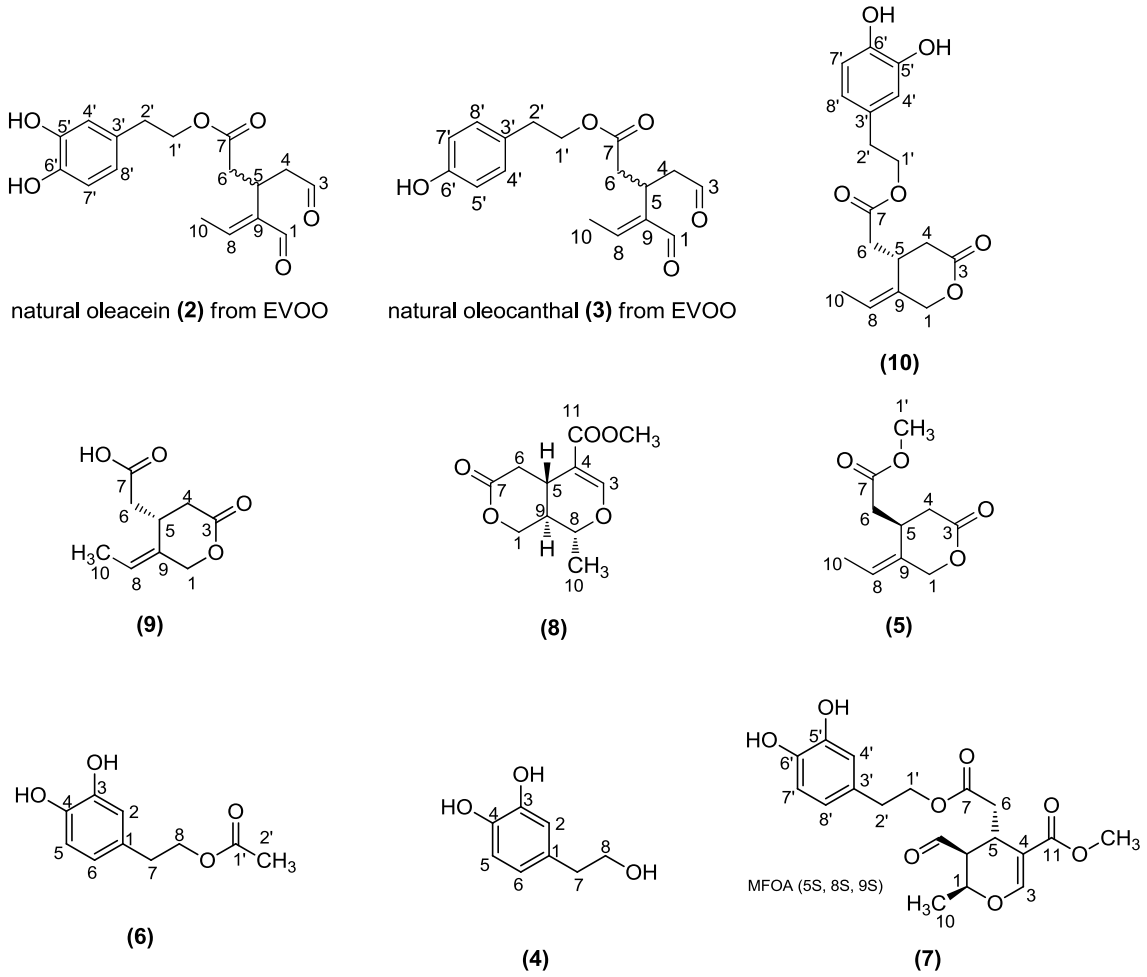
Τα αποτελέσματα της αξιολόγησης της επίδρασης των επιλεγμένων, με βάση το ανωτέρω προκαταρκτικό test, καθαρών συνθετικών μορίων, στην έκφραση πρωτεϊνών «στενών συνάψεων» (tight junctions) (κλοδίνη-5, οκλουδίνη και οκλουδίνη σε σύζευξη με Zo) και στους βασικούς μεταφορείς βήτα αμυλοειδών (LRP1 και P-gp), παρατίθενται στον Πίνακα 12.

Πίνακας 12. *Αποτελέσματα αξιολόγησης της επίδρασης καθαρών συνθετικών αναλόγων, στην έκφραση πρωτεϊνών «στενών συνάψεων» και στους βασικούς μεταφορείς β-αμυλοειδών*

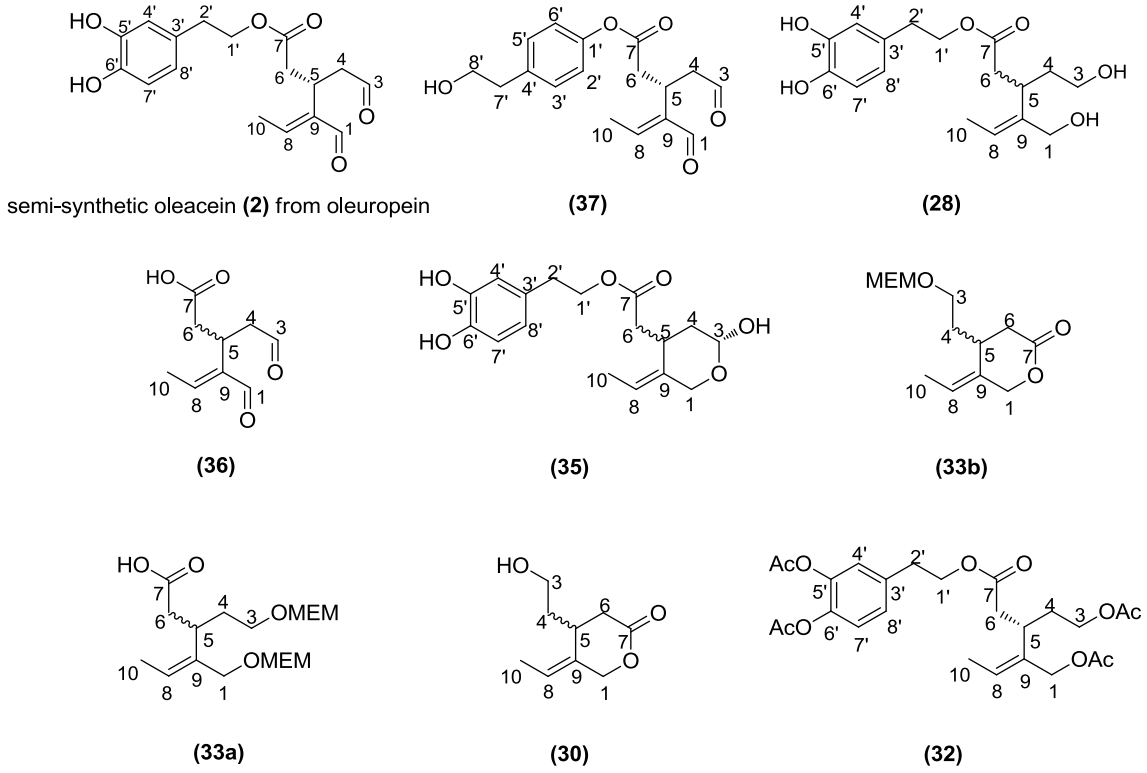
Compound	**Improvement (%) compared to negative control (DMSO)**	**Tight Junction proteins**			**Transport Proteins**	
		Claudin-5	***Occludin***	***Zo-Occludin***	***LRP***	***P-gp***
 **(2)**	0%	No effect	No effect	No effect	No effect	No effect
 **(37)**	8%	Increased (50%)	Increased (50%)	No effect	No effect	No effect

Στο δεύτερο στάδιο της αξιολόγησης, μεταξύ των δύο συνθετικών μορίων που ελέγχθηκαν, μόνο η ίσο-ολεοκανθάλη (37) έδειξε μία στοιχειώδη επίδραση, στις πρωτεΐνες «στενών συνάψεων», χωρίς, ωστόσο, να παρουσιάσει κάποια επίδραση στους βασικούς μεταφορείς β-αμυλοειδών.

Συνολικά, συμπεριλαμβανομένων και των αποκλεισμένων, από την πρώτη δοκιμασία (HTS), δειγμάτων, τα φυσικά μόρια και τα συνθετικά ανάλογα, που αξιολογήθηκαν για τη δράση τους, έναντι της νόσου του Alzheimer, παρατίθενται στις Εικόνες 110 και 111, αντίστοιχα.



Εικόνα 110*. Φυσικά μόρια, που αξιολογήθηκαν για τη δράση τους έναντι της νόσου του Alzheimer*



Εικόνα 111. *Συνθετικά ανάλογα, που αξιολογήθηκαν για τη δράση τους έναντι της νόσου του Alzheimer*



V.3. Αξιολόγηση φυσικών προϊόντων και συνθετικών αναλόγων της ολεασίνης, ως αναστολέων της δράσης της κυκλοοξυγενάσης (COX)

Τα περισσότερα εκ των προϊόντων που μελετήθηκαν για την αντι-νευροεκφυλιστική τους δράση έναντι της νόσου του Alzheimer, αξιολογήθηκαν και ως αναστολείς της δράσης του ενζύμου κυκλοοξυγενάση (COX). Οι μελέτες για την αναστολή της COX πραγματοποιήθηκαν στο Ινστιτούτο Φαρμακευτικών Επιστημών του Τμήματος Φαρμακογνωσίας, του Karl Franzens-Universität, στο Graz της Αυστρίας.

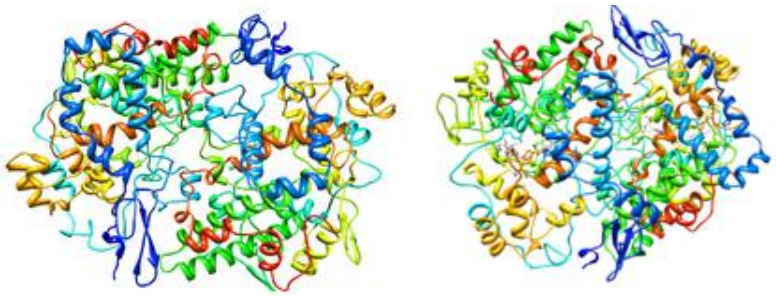
Η κυκλοοξυγενάση (COX) είναι ένα ένζυμο (συγκεκριμένα μια οικογένεια ισοενζύμων), που οξειδώνει το αραχιδονικό οξύ, προς παραγωγή προσταγλανδινών (PGs, Prostaglandins), συμπεριλαμβανομένων της θρομβοξάνης και προσταγλανδινών, όπως η προστακυκλίνη. Ταυτόχρονα, ανάγει την PG_2 σε PGH_2 (Prostaglandin Endoperoxide H_2, ενδοπεροξείδιο H_2 προσταγλανδίνης) και για το λόγο αυτό, είναι επίσημα γνωστή ως συνθάση του ενδοπεροξειδίου προσταγλανδίνης (PTGS). Επίσης, το ένζυμο κυκλοοξυγενάση υφίσταται, κυρίως, σε 2 μορφές, COX-1 και COX-2.

Η φαρμακευτική αναστολή της COX μπορεί να προσφέρει ανακούφιση από τα συμπτώματα της φλεγμονής και του πόνου, ενώ μη στεροειδή αντιφλεγμονώδη φάρμακα (NSAIDs), όπως η ασπιρίνη και η ιβουπροφαίνη, ασκούν τα αποτελέσματά τους, μέσω αναστολής της COX.

Η COX-1 απαντάται στην πλειονότητα των ιστών και εμπλέκεται στη φυσιολογία παραγωγής των προσταγλανδινών, που είναι απαραίτητες για τη διατήρηση της φυσιολογικής ομοιόστασης, ενώ η COX-2 επάγεται από κυτταροκίνες, μιτογόνα και αυξητικούς παράγοντες.

Όσον αφορά στη μοριακή τους βιολογία, οι COX-1 και COX-2, είναι παρόμοιου μοριακού βάρους, περίπου 70 και 72kDa, αντίστοιχα, έχουν 65% ομολογία στην αλληλουχία των αμινοξέων τους και σχεδόν ταυτόσημα καταλυτικά κέντρα. Η πιο σημαντική διαφορά μεταξύ των ισοενζύμων αυτών, η οποία επιτρέπει και την εκλεκτική αναστολή τους, είναι η υποκατάσταση της ισολευκίνης, στη θέση 523 της COX-1, με βαλίνη, στην COX-2.

Οι κρυσταλλογραφικές δομές των COX-1 και COX-2, σε σύμπλεγμα με τους εκλεκτικούς αναστολείς τους, παρατίθενται στην Εικόνα 112.



Εικόνα 112. *Κρυσταλλογραφικές δομές των: COX-1, σε σύμπλεγμα με τον αναστολέα της, φλουρμπιπροφαίνη (αριστερά) και COX-2, σε σύμπλεγμα με έναν εκλεκτικό αναστολέα της (δεξιά)*

Οι κύριοι αναστολείς της COX είναι τα μη στεροειδή αντιφλεγμονώδη φάρμακα (NSAIDs). Οι κλασσικοί αναστολείς COX δεν είναι εκλεκτικοί και αναστέλλουν όλους τους τύπους COX. Η προκύπτουσα αναστολή της σύνθεσης προσταγλανδίνης και θρομβοξάνης, έχει ως αποτέλεσμα μειωμένη φλεγμονή, καθώς και αντιπυρετικά, αντιθρομβωτικά και αναλγητικά αποτελέσματα. Η πιο συχνή ανεπιθύμητη ενέργεια των NSAIDs είναι ο ερεθισμός του

γαστρικού βλεννογόνου, καθώς οι προσταγλανδίνες, σε φυσιολογικές συνθήκες, ασκούν προστατευτικό ρόλο στη γαστρεντερική οδό. Επίσης, ορισμένα NSAIDs είναι όξινα, γεγονός που μπορεί να προκαλέσει πρόσθετη βλάβη στο γαστρεντερικό σωλήνα.

Η εκλεκτικότητα για την COX-2 είναι το κύριο χαρακτηριστικό της σελεκοξίμπης, της ετορικοξίμπης και άλλων φαρμάκων αυτής της κατηγορίας. Επειδή η COX-2 εξειδικεύεται συνήθως στο φλεγμονώδη ιστό, υπάρχει πολύ λιγότερος γαστρικός ερεθισμός, που σχετίζεται με αναστολή της COX-2, με μειωμένο κίνδυνο πεπτικού έλκους. Η εκλεκτικότητα της COX-2 δεν φαίνεται να αναιρεί άλλες παρενέργειες των NSAIDs και κυρίως τον αυξημένο κίνδυνο νεφρικής ανεπάρκειας, ενώ υπάρχουν στοιχεία που δείχνουν αύξηση του κινδύνου καρδιακής προσβολής, θρόμβωσης και εγκεφαλικού επεισοδίου, μέσω αύξησης των επιπέδων μη ισορροπημένης, από την προστακυκλίνη, θρομβοξάνης (τα οποία μειώνονται από την ανασταλτική επίδραση της COX-2).

Σύμφωνα με μία πρόσφατη μελέτη που διεξήχθη από επιστήμονες στο Κέντρο Monell της Philadelphia (USA), διαπίστωθηκε ότι η ολεοκανθάλη (3), ένας φυσικός πολυφαινολικός αντιφλεγμονώδης παράγοντας που υπάρχει κατ' αποκλειστικότητα στο εξαιρετικά παρθένο ελαιόλαδο, λειτουργεί με τον ίδιο τρόπο όπως η ιβουπροφαίνη, ένα μη στεροειδές αντιφλεγμονώδες φάρμακο (NSAID) [300].

Στην παρούσα διδακτορική διατριβή, πραγματοποιήθηκε η αξιολόγηση της ανασταλτικής δράσης, φυσικών (εκχυλισμάτων και καθαρών μορίων), καθώς και συνθετικών αναλόγων, κατά των COX-1 και COX-2.

Όσον αφορά στα συνθετικά ανάλογα, προηγήθηκε, της συνθετικής διαδικασίας, μία υπολογιστική μελέτη – Docking, με βάση την ολεασίνη (2) και την ολεοκανθάλη (3). Αντικείμενο της μελέτης, αποτέλεσε η κατά δύναμειν προσέγγιση των δομικών μετασχηματισμών που πρέπει να λάβουν χώρα, με πρώτη ύλη την ολεασίνη (2), ή την ολεοκανθάλη (3), ώστε να ληφθούν εν δυνάμει βιολογικά ισχυρά δραστικά, ως αναστολείς των COX-1/2, μόρια, ως τελικά προϊόντα.

Κατευθυνόμενοι από τα αποτελέσματα της ανωτέρω μελέτης, προχωρήσαμε στην παρασκευή των, εν δυνάμει δραστικών αναστολέων της COX, συνθετικών αναλόγων. Στη συνέχεια τα ανάλογα αυτά μεταφέρθηκαν στο Εργαστήριο διεξαγωγής των βιολογικών ελέγχων, στο Graz της Αυστρίας, ώστε να υποβληθούν, μαζί με επιλεγμένα, φυσικά απομονωμένα δείγματα, σε αξιολόγηση της δράσης τους, έναντι των COX-1/2.

V.3.α. Πρωτόκολλο για την αξιολόγηση της ανασταλτικής, των COX-1 και COX-2, δράσης

Σύμφωνα με μελέτες των Bauer και συνεργατών [301], Οι μελέτες σχέσεων δομής-δράσης, έχουν δείξει ότι η πολικότητα των αξιολογούμενων συστατικών διαδραματίζει έναν κρίσιμο ρόλο στη δραστικότητά τους, ως προς το ένζυμο κυκλοοξυγενάση (ιδίως της COX-1), με τα πιο λιπόφιλα συστατικά να εμφανίζουν σαφώς μειωμένη δραστικότητα.

Οι αναλύσεις αναστολής των COX-1/2, διεξήχθησαν σε πλάκα 96 κυψελίδων, που περιείχε καθαρισμένη συνθάση προσταγλανδίνης Η (PGHS-1), από σπερματοδόχους κύστες, για την COX-1 και καθαρισμένη PGHS-2, από κοτυληδόνες πλακούντα προβάτου, για την COX-2 [302, 303]. Η συγκέντρωση του PGE_2, κύριου μεταβολίτη του αραχιδονικού οξέος, προσδιορίστηκε με ανταγωνιστικό kit PGE_2 EIA (Assay Designs Inc., Ann Arbor, MI, ΗΠΑ).

Όσον αφορά στα φυσικά εκχυλίσματα (φύλλων ελιάς, ελαιόκαρπων και υγρού ελαιουργικού αποβλήτου) που αξιολογήθηκαν για την ανασταλτική τους δράση, έναντι της κυκλοοξυγενάσης COX-1/2, χρησιμοποιήθηκε συγκέντρωση 50 μg/ mL. Αντίστοιχα, για την αξιολόγηση όλων των καθαρών μορίων, φυσικών και συνθετικών, που αξιολογήθηκαν, χρησιμοποιήθηκε συγκέντρωση 20 μg/ mL. Ως εκ τούτου, στη χαμηλή αυτή συγκέντρωση, θα μπορούσε να αποκλειστεί τυχόν πρόβλημα διαλυτότητας, κατά την ανάλυση.

Τα δείγματα αξιολογήθηκαν σε 4 ανεξάρτητα πειράματα, όπου μετρήθηκαν τα ποσοστά δραστικότητας και αναστολής. Ως θετικός έλεγχος χρησιμοποιήθηκε ινδομεθακίνη (ICN, Aurora, USA, IC_{50}[64] COX-1 0.9 μM), διπλός αναστολέας των COX-1 και COX-2, ένα μη στεροειδές αντιφλεγμονώδες φάρμακο, παράγωγο του ινδολίου, με αναλγητικές και αντιπυρετικές ιδιότητες, ενώ ως διαλύτης, χρησιμοποιήθηκε DMSO. Επιπλέον, για τα πειράματα αναστολής της COX-2, χρησιμοποιήθηκε ο NS-398, ένας επιλεκτικός αναστολέας της COX-2 (Cayman Chemical Company, IC_{50} COX-2 2.6 μM). Η συγκέντρωση της ινδομεθακίνης που χρησιμοποιήθηκε ήταν 1.25 μM, ενώ του NS-398, 5 μM.

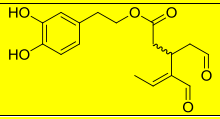
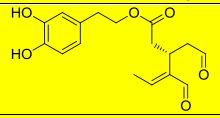
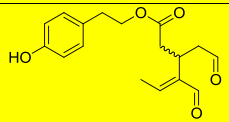
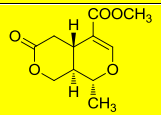
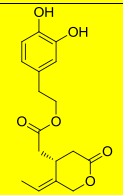
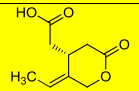
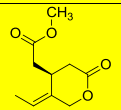
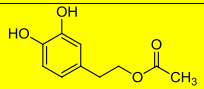
Όλα τα δείγματα ζυγίστηκαν με χρήση ζυγού ακριβείας και σε ξηρή μορφή, και τοποθετήθηκαν σε προζυγισμένα eppendorfs, τα οποία κλείστηκαν αεροστεγώς, ώστε να μεταφερθούν ασφαλώς και, κατά το δυνατό, σε αδρανείς συνθήκες.

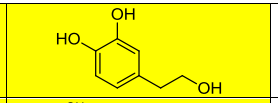
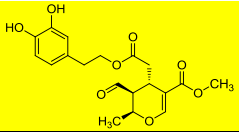
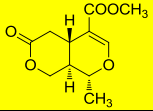
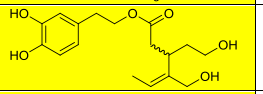
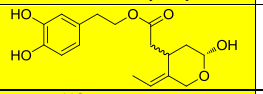
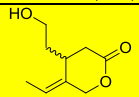
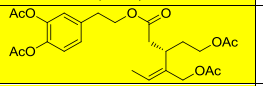
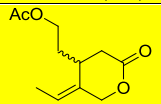
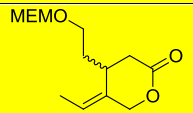
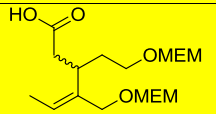
Τέλος, το ένζυμα COX-1 (από πρόβατο) και COX-2 (ανασυνδυασμένη, ανθρώπινης προέλευσης) που χρησιμοποιήθηκαν, για την μελέτη των δειγμάτων, ως προς την εν δυνάμει ανασταλτική τους επίδραση, είναι της εταιρείας Cayman Chemical Company, Ann Arbor, USA. Σύμφωνα με τα χαρακτηριστικά των εν λόγω προϊόντων, μία μονάδα ενζύμου καταναλώνει ένα νανομόριο οξυγόνου ανά λεπτό, στους 37°C, σε ρυθμιστικό διάλυμα 0.1 M Tris HCI, pH= 8, που περιέχει 100 μM αραχιδονικού οξέος, 5 mM EDTA, 2 mM φαινόλη και 1 μM αιματίνη.

V.3.b. Αξιολόγηση της δράσης φυσικών μορίων και εκχυλισμάτων, καθώς και και συνθετικών αναλόγων, έναντι των COX-1 και COX-2

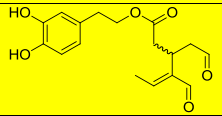
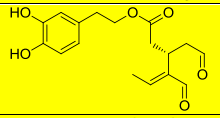
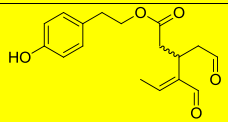
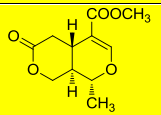
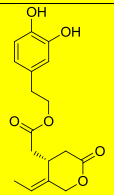
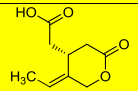
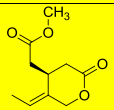
Τα αποτελέσματα της αξιολόγησης των φυσικών εκχυλισμάτων, των καθαρών απομονωμένων μορίων, καθώς επίσης και των συνθετικών αναλόγων, δίνονται στους Πίνακες 13 και 14. Και στις δύο περιπτώσεις, COX-1 και COX-2, από τις τέσσερις ανεξάρτητες μετρήσεις-πειράματα, σε τέσσερις διαφορετικές συγκεντρώσεις (σε pg/ mL), προέκυψαν οι Μέσες Τιμές και οι τιμές των Τυπικών αποκλίσεων που παρατίθενται, επίσης, στους παρακάτω Πίνακες. Ακόμη, μετρήθηκαν για την εκάστοτε, εκ των τεσσάρων, συγκέντρωση, οι αντίστοιχες Τιμές Απορροφήσεων, μετρημένες σε mAUC.

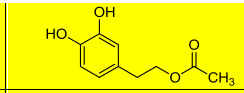
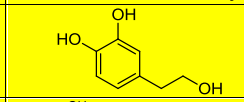
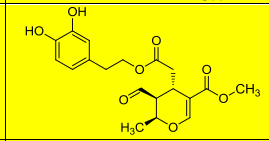
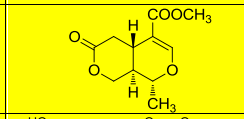
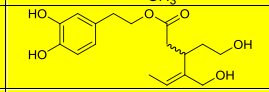
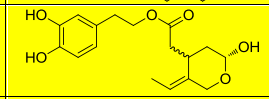
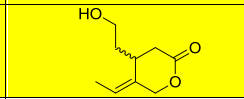
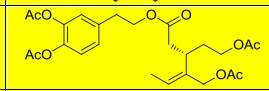
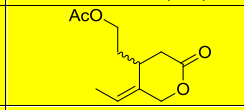
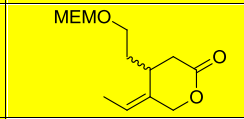
Πίνακας 13. *Αποτελέσματα αξιολόγησης φυσικών και συνθετικών δειγμάτων, ως προς τη δράση τους, έναντι της COX-1.*

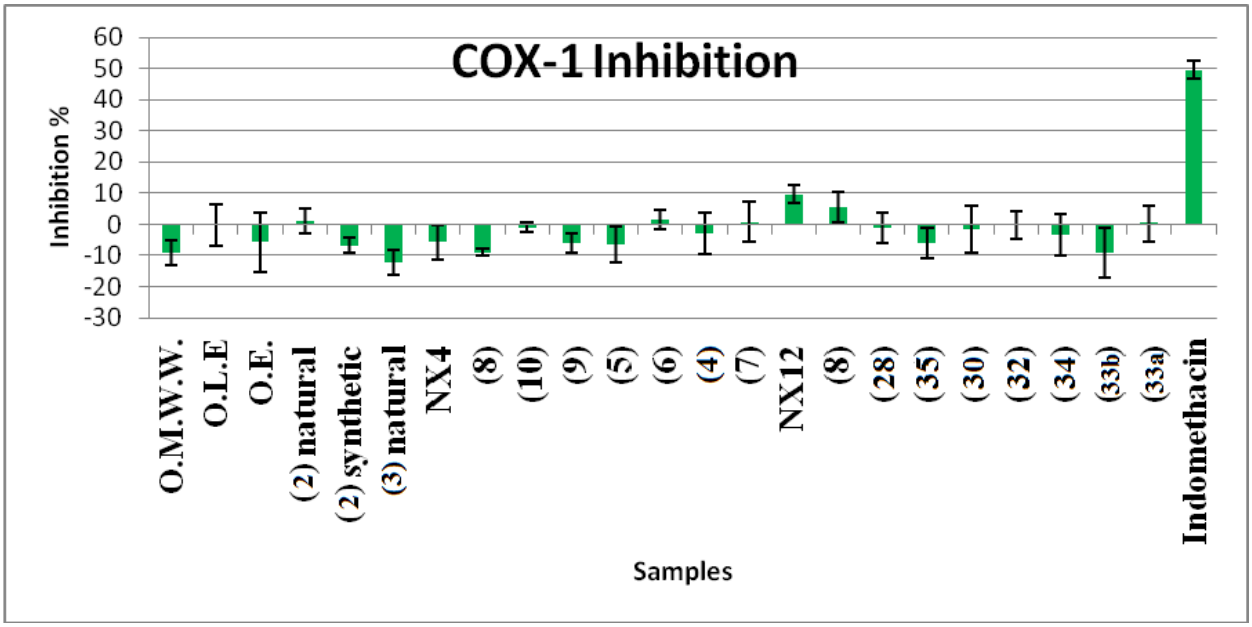
Sample	Sample	% Activity				% Inhibition				Mean value	Standard deviation	Absorption [mAUC]				Concentration (pg/ml)			
Ext_1	O.M.W.W.	112.572	103.627	111.580	108.771	-12.572	-3.627	-11.580	-8.771	-9.138	4.011	0.294	0.305	0.288	0.291	1057.582	973.543	966.816	942.476
Ext_2	O.L.E.	109.976	94.318	98.944	97.734	-9.976	5.682	1.056	2.266	-0.243	6.778	0.297	0.317	0.305	0.306	1033.193	886.086	857.324	846.843
Ext_3	O.E.	106.277	97.332	118.717	100.721	-6.277	2.668	-18.717	-0.721	-5.762	9.391	0.301	0.313	0.279	0.302	998.439	914.408	1028.649	872.725
(2)		103.391	93.791	97.969	100.390	-3.391	6.209	2.031	-0.390	1.115	4.056	0.305	0.318	0.306	0.303	971.329	881.141	848.872	869.852
(2)		105.190	104.334	108.158	109.345	-5.190	-4.334	-8.158	-9.345	-6.757	2.380	0.303	0.304	0.292	0.291	988.231	980.186	937.158	947.450
(3)		115.443	112.674	114.011	106.459	-15.443	-12.674	-14.011	-6.459	-12.147	3.957	0.291	0.294	0.285	0.294	1084.546	1058.538	987.878	922.436
(8)		108.843	107.827	108.808	110.503	-8.843	-7.827	-8.808	-10.503	-8.995	1.110	0.298	0.299	0.291	0.289	1022.543	1013.000	942.797	957.477
(10)		103.139	100.794	99.404	100.639	-3.139	-0.794	0.596	-0.639	-0.994	1.560	0.305	0.308	0.304	0.302	968.961	946.932	861.306	872.010
(9)		106.803	104.697	109.787	102.298	-6.803	-4.697	-9.787	-2.298	-5.896	3.180	0.301	0.303	0.290	0.300	1003.383	983.595	951.278	886.390
(5)		97.834	109.029	110.333	108.887	2.166	-9.029	-10.333	-8.887	-6.521	5.828	0.312	0.298	0.289	0.291	919.117	1024.296	956.003	943.478
(6)		99.578	94.575	102.245	120.852	0.422	5.425	-2.245	2.586	1.547	3.254	0.310	0.316	0.300	0.277	935.500	888.499	885.923	1047.148

(4)		108.249	109.090	97.491	96.823	-8.249	-9.090	2.509	3.177	-2.913	6.661	0.299	0.298	0.307	0.308	1016.969	1024.865	844.735	838.948
(7)		107.394	91.739	98.199	99.528	-7.394	8.261	1.801	0.472	0.785	6.427	0.300	0.320	0.306	0.304	1008.936	861.860	850.867	862.388
(8)		99.335	97.907	89.741	90.624	0.665	2.093	10.259	9.376	5.598	4.920	0.310	0.312	0.318	0.317	933.221	919.804	777.582	785.233
(28)		157.668	102.979	97.152	101.222	-7.280	-2.979	2.848	3.050	-1.090	4.984	0.250	0.305	0.307	0.301	1481.238	967.453	841.800	877.062
(35)		102.567	107.944	111.697	101.588	-2.567	-7.944	-11.697	-1.588	-5.949	4.743	0.306	0.299	0.288	0.301	963.589	1014.104	967.827	880.236
(30)		104.546	109.277	91.456	100.516	-4.546	-9.277	8.544	-0.516	-1.449	7.563	0.303	0.298	0.315	0.302	982.176	1026.620	792.446	870.944
(32)		104.817	98.017	102.682	95.465	-4.817	1.983	-2.682	4.535	-0.245	4.268	0.303	0.312	0.299	0.310	984.721	920.836	889.716	827.178
(34)		102.169	110.098	94.612	106.247	-2.169	-10.098	5.388	-6.247	-3.281	6.625	0.306	0.297	0.311	0.295	959.844	1034.337	819.786	920.602
(33b)		112.809	112.841	113.433	96.913	-12.809	-12.841	-13.433	3.087	-8.999	8.063	0.294	0.294	0.286	0.307	1059.806	1060.106	982.866	839.722
(33a)		96.251	107.207	101.531	94.245	3.749	-7.207	-1.531	5.755	0.192	5.811	0.314	0.300	0.301	0.311	904.249	1007.177	879.738	816.610
	Indomethacin	52.944	48.275	47.371	52.970	47.056	51.725	52.629	47.030	49.610	2.987	0.464	0.476	0.432	0.416	284.278	259.212	344.135	384.810

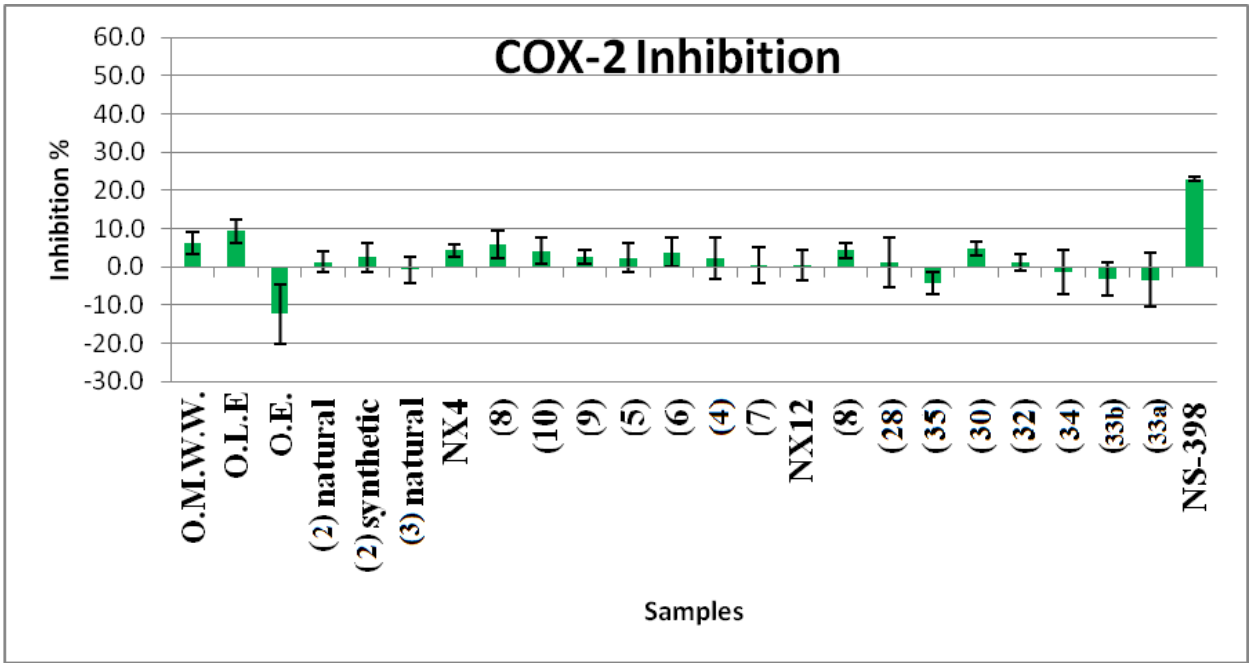
Πίνακας 14. *Αποτελέσματα αξιολόγησης φυσικών και συνθετικών δειγμάτων, ως προς τη δράση τους, έναντι της COX-2.*

Sample	Sample Structure	% Activity				% Inhibition				Mean value	Standard deviation	Absorption [mAUC]				Concentration (pg/ml)			
Ext_1	O.M.W.W.	91.52	91.10	95.22	96.94	8.48	8.90	4.78	3.06	6.30	2.84	0.31	0.31	0.24	0.24	4826.19	4804.02	4425.22	4504.79
Ext_2	O.L.E.	88.62	87.40	92.78	93.95	11.38	12.60	7.22	6.05	9.31	3.17	0.29	0.29	0.22	0.23	4673.09	4608.98	4311.70	4366.07
Ext_3	O.E.	107.04	104.36	117.95	119.87	-7.04	-4.36	-17.95	-19.87	-12.30	7.75	0.38	0.36	0.33	0.34	5644.23	5503.06	5481.29	5570.62
(2)		98.07	95.18	100.64	100.96	1.93	4.82	-0.64	-0.96	1.29	2.69	0.34	0.32	0.26	0.26	5171.36	5018.85	4677.08	4691.95
(2)		94.96	93.66	99.22	101.97	5.04	6.34	0.78	-1.97	2.55	3.84	0.32	0.32	0.25	0.27	5007.31	4938.61	4610.79	4738.59
(3)		96.50	100.59	101.39	104.67	3.50	-0.59	-1.39	-4.67	-0.79	3.36	0.33	0.35	0.26	0.28	5088.67	5304.01	4711.62	4864.15
(8)		90.27	92.58	95.69	98.54	9.73	7.42	4.31	1.46	5.73	3.61	0.30	0.31	0.24	0.25	4759.97	4882.08	4446.84	4579.27
(10)		94.52	91.73	98.68	98.30	5.48	8.27	1.32	1.70	4.19	3.30	0.32	0.31	0.25	0.25	4984.30	4837.32	4585.74	4567.95
(9)		94.96	98.52	97.63	98.45	5.04	1.48	2.37	1.55	2.61	1.67	0.32	0.34	0.25	0.25	5007.31	5195.23	4537.20	4574.93
(5)		95.62	93.44	102.18	99.31	4.38	6.56	-2.18	0.69	2.36	3.88	0.33	0.32	0.27	0.25	5042.02	4927.25	4748.53	4615.22

(6)		94.96	91.52	98.29	99.79	5.04	8.48	1.71	0.21	3.86	3.68	0.32	0.31	0.25	0.26	5007.31	4826.19	4567.69	4637.23
(4)		90.06	97.84	102.49	100.07	9.94	2.16	-2.49	-0.07	2.38	5.38	0.30	0.34	0.27	0.26	4749.03	5159.46	4762.78	4650.64
(7)		96.95	94.96	105.79	100.75	3.05	5.04	-5.79	-0.75	0.39	4.77	0.33	0.32	0.28	0.26	5112.16	5007.31	4916.11	4682.24
(8)		93.66	95.18	98.53	95.48	6.34	4.82	1.47	4.52	4.29	2.04	0.32	0.32	0.25	0.24	4938.61	5018.85	4578.94	4437.24
(28)		94.96	96.72	108.41	95.05	5.04	3.28	-8.41	4.95	1.21	6.47	0.32	0.33	0.29	0.24	5007.31	5100.40	5038.18	4417.24
(35)		104.12	108.53	102.72	101.83	-4.12	-8.53	-2.72	-1.83	-4.30	2.97	0.36	0.38	0.27	0.27	5490.41	5722.75	4773.58	4732.26
(30)		94.52	98.07	94.76	94.13	5.48	1.93	5.24	5.87	4.63	1.82	0.32	0.34	0.23	0.23	4984.30	5171.36	4403.81	4374.20
(32)		95.62	99.21	99.85	100.50	4.38	0.79	0.15	-0.50	1.21	2.18	0.33	0.34	0.26	0.26	5042.02	5231.24	4640.30	4670.55
(34)		95.62	97.84	103.09	108.54	4.38	2.16	-3.09	-8.54	-1.27	5.77	0.33	0.34	0.27	0.29	5042.02	5159.46	4790.83	5043.85
(33b)		100.35	105.04	108.21	99.12	-0.35	-5.04	-8.21	0.88	-3.18	4.21	0.35	0.37	0.29	0.25	5291.81	5538.66	5028.72	4606.52
(33a)		102.93	94.52	111.95	104.30	-2.93	5.48	-11.95	-4.30	-3.43	7.14	0.36	0.32	0.31	0.28	5427.56	4984.30	5202.52	4847.11
	NS-398	77.30	75.19	79.84	75.64	22.70	24.81	20.16	24.36	23.01	0.70	0.23	0.21	0.28	0.25	3995.81	3886.91	4869.48	4613.31



Εικόνα 113. *Συγκεντρωτικό διάγραμμα της % ανασταλτικής δράσης φυσικών δειγμάτων και συνθετικών αναλόγων, έναντι της COX-1.*



Εικόνα 114. *Συγκεντρωτικό διάγραμμα της % ανασταλτικής δράσης φυσικών δειγμάτων και συνθετικών αναλόγων, έναντι της COX-2.*

Από τα δεδομένα των Πινάκων 13 και 14 συμπεραίνεται ότι, τα λαμβανόμενα αποτελέσματα δεν ήταν ιδιαίτερα αξιόλογα, ούτε καν στην περίπτωση της ολεοκανθάλης (3), που, όπως προαναφέρθηκε, αποτελεί φυσικό πολυφαινολικό αντιφλεγμονώδη παράγοντα. Πιθανή αιτία των μη ικανοποιητικών αυτών αποτελεσμάτων, είναι ενδεχομένως, οι χαμηλές συγκεντρώσεις των μελετούμενων δειγμάτων.

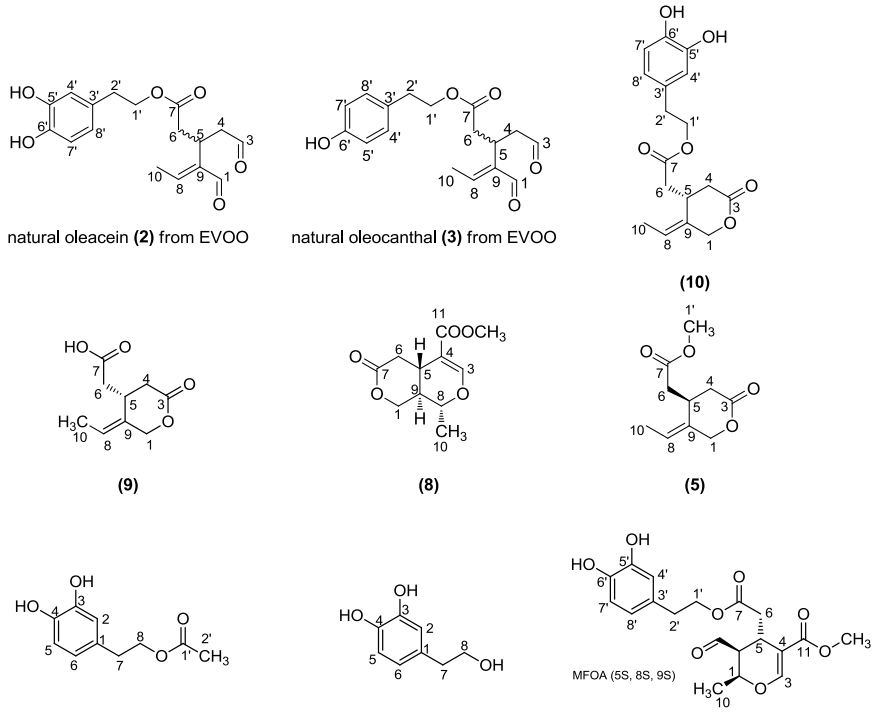
Ωστόσο, τα αναλυόμενα δείγματα, φυσικά και συνθετικά, εμφανίζουν, σε γενικές γραμμές, ικανοποιητικότερη ανασταλτική δράση, έναντι της COX-2, απ' ότι της COX-1.

Πιο συγκεκριμένα, στην περίπτωση της COX-1, μόνο 6 από τα αναλυόμενα δείγματα, καταδεικνύουν θετική αναστολή (μόνο 2 εκ των οποίων εμφανίζουν αναστολή της τάξης του 5-

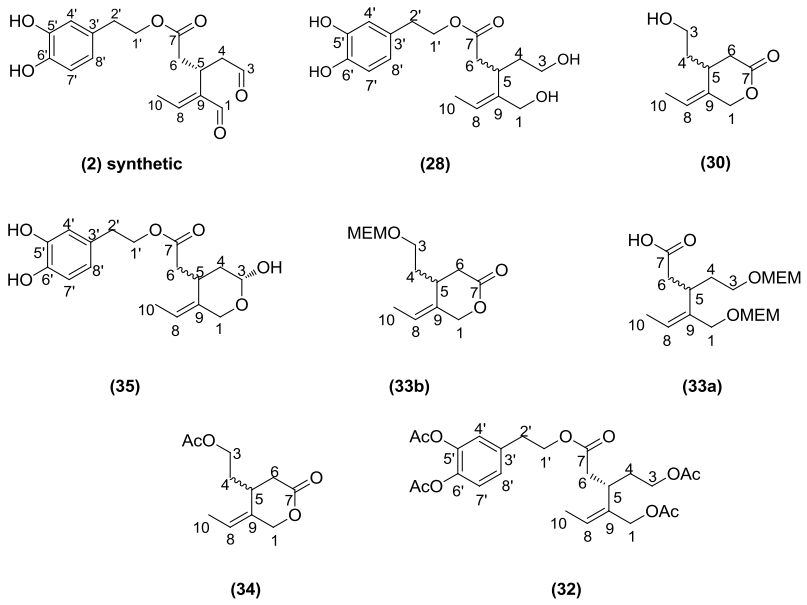
10% και τα υπόλοιπα οριακά άνω του μηδενός), ενώ τα υπόλοιπα 17 επάγουν την COX-1 αντί να την αναστέλλουν.

Στην περίπτωση, αντιθέτως, της COX-2, 17 από τα δείγματα καταδεικνύουν θετική αναστολή έναντι του ενζύμου, 3 εκ των οποίων εμφανίζουν ανασταλτική δράση πάνω από 5% (ανασταλτική δράση θετικού προτύπου NS-398 περίπου 23%. Τα υπόλοιπα 6 δρουν ευνοϊκά, υπέρ της COX-2, με το εκχύλισμα των ελαιόκαρπων, να εμφανίζει τη μέγιστη (σε απόλυτη τιμή) αρνητική αναστολή, της τάξης του 12%.

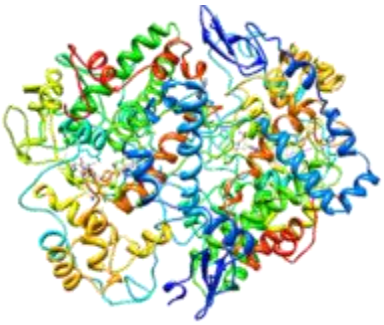
Συγκεντρωτικά, οι δομές των φυσικών και συνθετικών μορίων που αξιολογήθηκαν, για την ανασταλτική τους δράση έναντι των COX-1 και COX-2, παρατίθενται αντίστοιχα στις Εικόνες 115 και 116.

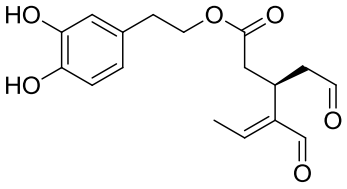


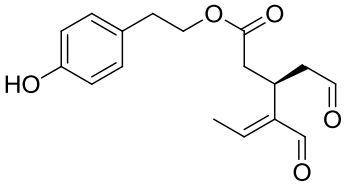
Εικόνα 115*. Φυσικά μόρια, που αξιολογήθηκαν για τη δράση τους έναντι των ενζύμων COX-1 και COX-2*



Εικόνα 116. *Συνθετικά ανάλογα, που αξιολογήθηκαν για τη δράση τους έναντι των ενζύμων COX-1 και COX-2.*




HO
HO
O
O
O
O


HO
O
O
O
O



ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ – ΠΡΟΟΠΤΙΚΕΣ

Όπως προαναφέρθηκε, οι ενώσεις (43), (44) και (63), είναι εκείνες που έδειξαν, στο πρώτο στάδιο της μελέτης (έναντι της κυτταρικής σειράς SKBR3[63] του αδενοκαρκινώματος του ανθρώπινου μαστού), την ικανοποιητικότερη κυτταροτοξική δράση *(Πίνακας 8)*, παρουσίαζοντας τις χαμηλότερες τιμές IC_{50}[64].

Σε όλες τις κυτταρικές σειρές, η πιο πολλά υποσχόμενη από τις ελεγχθείσες ενώσεις, είναι το παράγωγο (63), έχοντας μια κετυλο ομάδα (δεκαέξι άνθρακες) στη θέση 7. Επιπλέον, η δράση του παραγώγου αυτού ήταν πιο έντονη στη λευχαιμική κυτταρική σειρά HL-60[31] *(Πίνακας 9)*.

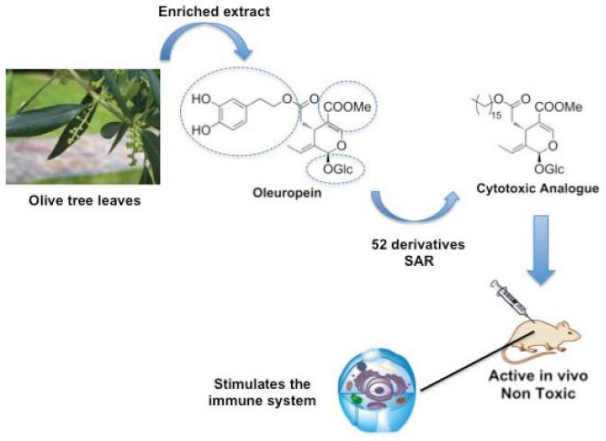
Από τα βιολογικά αυτά αποτελέσματα, συμπεραίνεται ότι:

- Η εισαγωγή μίας αλκυλο ομάδας στη θέση της υδροξυτυροσόλης (4), προκαλεί μία σημαντική μείωση της IC_{50}[64].
- Η ανασταλτική δράση εξαρτάται, σε μεγάλο βαθμό, από την ομάδα που βρίσκεται στη θέση 4. Πράγματι, η καρβοξυλική ομάδα στο παράγωγο (47) προκάλεσε απώλεια της δραστικότητας, ενώ ο μεθυλεστέρας στο παράγωγο (44) οδήγησε σε μια πολύ δραστική ένωση.
- Το ιδανικότερο φαρμακοφόρο για μια καλή ανασταλτική δράση, θα πρέπει να διαθέτει μια αρκετά μακριά αλυσίδα αλκυλίου, στη θέση 7. Η παρουσία μίας τέτοιας ομάδας στη δομή, καθιστά την ένωση λιποφιλη και άρα πιο ευέλικτη, κατά τη διέλευσή της μέσω της κυτταρικής μεμβράνης (π.χ. των καρκινικών κυττάρων).
- Τέλος, η παρουσία ελεύθερων υδροξυλικών ομάδων στο τμήμα της γλυκόζης, καθιστά υδρόφιλο (πολικότερο) το μόριο και επομένως, καλύτερα προσαρμόσιμο στο ενδοκυτταρικό περιβάλλον. Αυτό εξηγεί και την ισχυρότερη αντικαρκινική δράση που έδειξε *in vitro* το παράγωγο (63) σε σχέση με το (44), στο οποίο τα υδροξύλια της γλυκόζης είναι ακετυλιωμένα.

Πριν την *in vivo* αξιολόγηση του αναλόγου με την ισχυρότερη κυτταροτοξική δράση, πραγματοποιήθηκαν μελέτες τοξικότητας, σε φυσιολογικά κύτταρα.

Τέλος, πραγματοποιήθηκε, με εντυπωσιακά αποτελέσματα, η *in vivo* αξιολόγηση του δραστικότερου αναλόγου (63), έναντι του μυελώματος, σε μοντέλα ποντικιών, συνδυαστικά με ελέγχους τοξικότητας, σε φυσιολογικά λεμφοκύτταρα περιφερικού αίματος (PBMCs).

Με δεδομένο το μικρό αριθμό μελετών πάνω στις σχέσεις δομής-δράσης, όσον αφορά στην ελαιοευρωπεΐνη (1), τα ενθαρρυντικά αυτά αποτελέσματα αποτελούν ένα καλό εναρκτήριο σημείο, για την ανάπτυξη ενός ικανού αντικαρκινικού παράγοντα, με βασική δομή την (1).

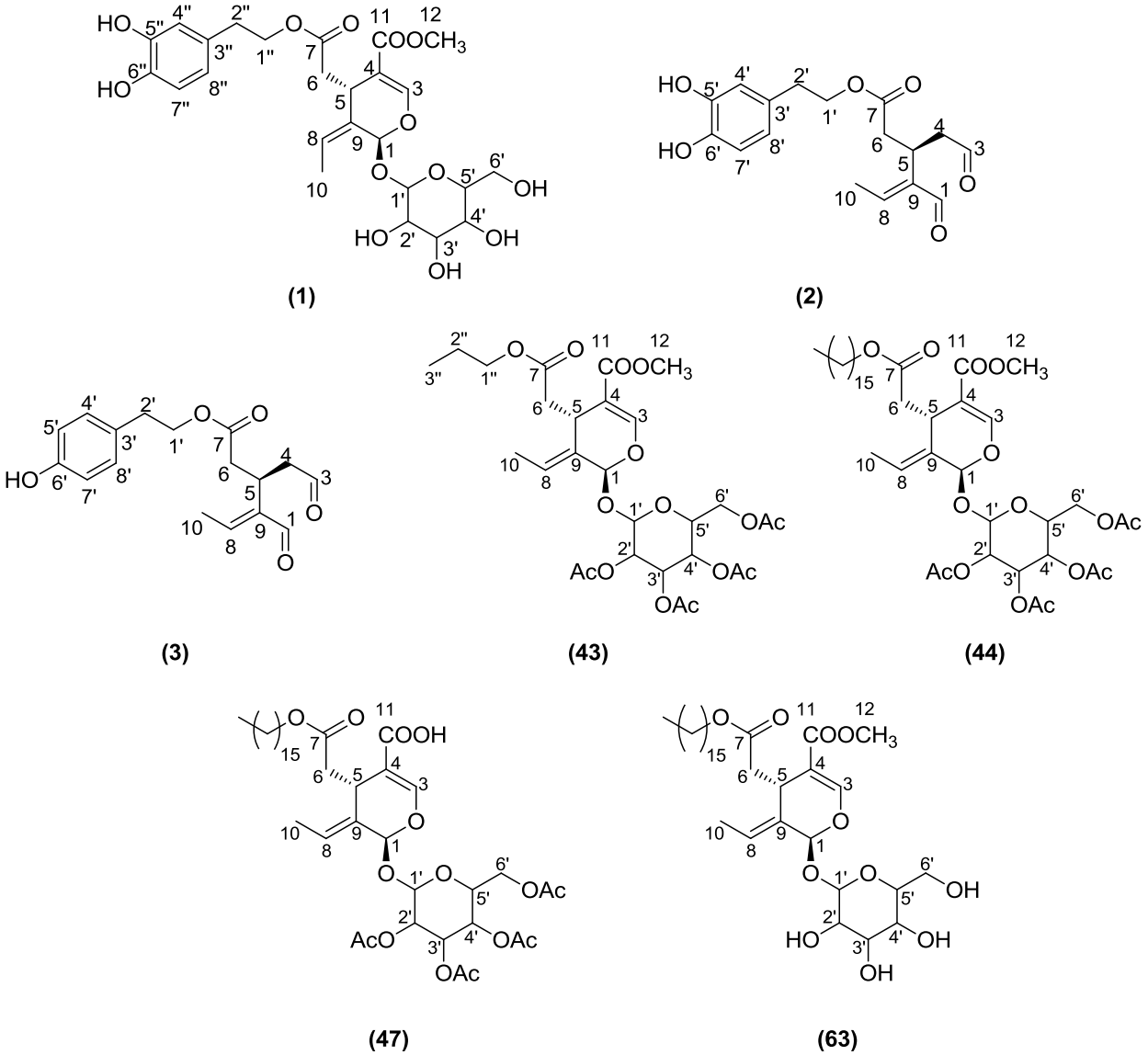


Εικόνα 117. *Σύνοψη πρωτοκόλλου αξιολόγησης κυτταροτοξικής δράσης της ελαιοευρωπεΐνης (1) και των ημισυνθετικών της αναλόγων, in vitro και του δραστικότερου αυτών, in vivo, εναντίον του μυελώματος, σε μοντέλο ποντικιών*

Η παρούσα διατριβή, στα πλαίσια της αξιοποίησης της *Olea europaea* και των δευτερογενών μεταβολιτών της, όπως η ελαιοευρωπεΐνη (1), η ολεασίνη (2) και η ολεοκανθάλη (3), για την ημισύνθεση βιοδραστικών αναλόγων, αποτελεί μία μελέτη που ξεκίνησε πριν πέντε περίπου χρόνια και συνεχίζεται, καθώς νέα ανάλογα της ολεασίνης (2) και της ολεοκανθάλης (3) συντίθενται από την εργαστηριακή μας ομάδα, με χρήση ποικίλων ημισυνθετικών αντιδράσεων.

Επιπλέον, τα ημισυνθετικά ανάλογα ολεασίνης (2) και ολεοκανθάλης (3), καθώς και απομονωμένοι από την *Olea europaea* δευτερογενείς μεταβολίτες, αξιολογήθηκαν για την αντιφλεγμονώδη δράση τους έναντι της νόσου Alzheimer, καθώς και έναντι των ενζύμων κυκλοοξυγενάσης, COX-1 και COX-2, χωρίς, ωστόσο, αξιόλογα αποτελέσματα.

Τέλος, η σύνθεση νέων αναλόγων με σκοπό την αξιολόγηση της βιολογικής τους δράσης έναντι ποικίλων βιολογικών στόχων και την αξιολόγηση των αποτελεσμάτων, αποτελεί άμεση προοπτική της παρούσας μελέτης.



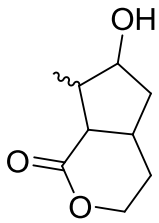
Εικόνα 118. *Εκ νέου παρατιθέμενες δομές, χάριν διευκόλυνσης του αναγνώστη.*

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Ι

Όπως προαναφέρθηκε στο Κεφάλαιο ΙΙ.6, από το ελαιουργικό απόβλητο «Κατσίγαρος» απομονώθηκαν 8 συνολικά δευτερογενείς μεταβολίτες, εκ των οποίων οι 7 έχουν απομονωθεί και ταυτοποιηθεί σε προηγούμενη μελέτη της ομάδας μας, [225].

Για το όγδοο προϊόν, του οποίου η δομή δεν έχει αποσαφηνιστεί πλήρως και για το λόγο αυτό δεν συμπεριλάβαμε στο Κεφάλαιο ΙΙ.6, έγιναν σημαντικές προσπάθειες ταυτοποίησης, μέσω φασματοσκοπικών δεδομένων που προέκυψαν από τη φασματοσκοπία NMR[39] (1D και 2D) και τη φασματομετρία MS[43], μέσω μέτρησης της στροφικής ικανότητας, a[D], καθώς και μέσω ψεκασμού της πλάκας TLC[34], με χρήση του αντιδραστηρίου Dragendorff, με σκοπό τη διαπίστωση παρουσίας ή όχι ατόμων αζώτου στο μόριο.

Στην Εικόνα 119 παρατίθεται κομμάτι της δομής, το οποίο έχουμε καταφέρει να ταυτοποιήσουμε με βεβαιότητα, ενώ πιστεύεται επίσης, ότι το άγνωστης δομής αυτό μόριο είναι δικυκλικό.



Εικόνα 119. *Τμήμα της δομής του νέου, απομονωμένου δευτερογενή μεταβολίτη από το ελαιουργικό απόβλητο.*

Παρά το γεγονός ότι η συνολική δομή του μορίου μας είναι άγνωστη, το ανάλογο αυτό αξιολογήθηκε βιολογικά, έναντι της νόσου του Alzheimer και των ενζύμων COX-1 και COX-2.

Συγκεκριμένα, κατά την αξιολόγηση του εν λόγω αναλόγου έναντι της νόσου του Alzheimer, έδειξε αξιοσημείωτη δράση, επάγοντας, σε συγκρίσιμο βαθμό με το ολικό εκχύλισμα, τη δράση των πρωτεϊνών «στενών συνάψεων» (tight junction proteins), σε μέτρια ωστόσο ποσοστά, ενώ δεν επέδειξε καμία επίδραση στους βασικούς μεταφορείς β-αμυλοειδών (*Πίνακας 15*).

Πίνακας 15. *Δράση του αγνώστου μορίου, συγκριτικά με το ολικό εκχύλισμα του «Κατσίγαρου», έναντι της νόσου του Alzheimer.*

Compound	**Improvement (%) compared to negative control (DMSO)**	**Tight Junction proteins**			**Transport Proteins**	
		Claudin-5	***Occludin***	***Zo-Occludin***	***LRP***	***P-gp***
UNKNOWN MOLECULE	6%	Increased (40%)	Increased (33%)	Increased (25%)	No effect	No effect
Katsigaros Total Extract	3%	Increased (44%)	Increased (36%)	No effect	Decreased (25%)	No effect (high variability)

Αναφορικά με την αξιολόγηση του αναλόγου, έναντι των ενζύμων κυκλοοξυγενάσης, COX-1 και COX-2, κατέδειξε αρνητική αναστολή της COX-1 και θετική αναστολή της COX-2, της τάξεως του 5%, χωρίς αξιόλογα αποτελέσματα (*Πίνακας 16*).

Πίνακας 16. *Δράση του αγνώστου μορίου, έναντι των ενζύμων κυκλοοξυγενάσης, COX-1 και COX-2.*

	Sample Structure	% Activity				% Inhibition				Mean value	Standard deviation	Absorption [mAUC]				Concentration (pg/ml)			
COX-1	**UNKNOWN**	98.036	107.905	110.416	106.649	1.964	-7.905	-10.416	-6.649	-5.752	5.377	0.312	0.299	0.289	0.294	921.019	1013.736	956.725	924.089
COX-2	**UNKNOWN**	93.87	95.40	96.15	97.55	6.13	4.60	3.85	2.45	4.26	1.53	0.32	0.33	0.24	0.25	4949.99	5030.42	4468.24	4533.17

Οι προσπάθειες για την πλήρη ταυτοποίηση της δομής του μορίου συνεχίζονται και στην επιτυχή έκβαση αυτού του εγχειρήματος, μέθοδοι όπως η κρυστάλλωση και η ανάλυση με ακτίνες Χ, πρόκειται να χρησιμοποιηθούν.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Kok, F.J., and Kromhout, D., *Atherosclerosis.* European Journal of Nutrition, 2004. **43**(1): p. i2-i5.
2. Fistonic, I., Situm, M., Bulat, V., Harapin, M., Fistonic, N. and Verbanac, D., *Olive oil biophenols and women's health.* Medicinski glasnik (Zenica), 2012. **9**(1): p. 1-9.
3. Waterman, E.a.L., B., *Active components and clinical applications of olive oil.* Alternative Medicine Review, 2007. **12**(4): p. 331-42.
4. *Oleaceae family.*
5. Laboratory., N.G.R., *Taxonomy for Plants.*
6. *Ελιά. Αναπόσπαστο Κομμάτι της Ελληνικής Γης.* 2011.
7. Khan, M.Y., Panchal, S., Vyas, N., Butani, A. and Kumar, V., *Olea europaea: A phyto-pharmacological review.* Pharmacognosy Reviews, 2007. **1**(1): p. 114-118.
8. Aimen I., A.M., Ksibi H. and Ksibi M., *Composition of the olive tree bark: Richness in oleuropein.* Trends in Chemical Engineering, 2012. **14**: p. 65 - 69.
9. Hashmi, M.A., Khan, A., Hanif, M., Farooq, U. and Perveen, S., *Traditional Uses, Phytochemistry, and Pharmacology of Olea europaea (Olive).* Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine, 2015. **2015**: p. 29.
10. Detopoulou P., D.C., Karantonis HC, and Andonopoulou S., *Meditteranean Diet and Its Protective Mechanisms against Cardiovascular Disease: an Insight into Platelet Activating Factor (PAF) and Diet Interplay.* Annals of Nutritional Disorders & Therapy, 2015. **1**(2): p. Ann Nutr Disord & Ther. .
11. Bulotta, S., Celano, M., Lepore, S. M., Montalcini, T., Pujia, A. and Russo, D., *Beneficial effects of the olive oil phenolic components oleuropein and hydroxytyrosol: focus on protection against cardiovascular and metabolic diseases.* Journal of Translational Medicine, 2014. **12**: p. 219-219.
12. Bockova, H., Holubek, J. and Cekan, Z., *Constituents of olive tree (Olea europaea L.).* Collect Czech Chem Commun, 1964. **29**(6): p. 1484-1491.
13. Maestro D. R. and Roncero, V., *Colorantes antocianicos de las aceitunas manzanillas maduras.* Grasas y Aceites, 1976. **27**.
14. Obied, H., *Biography of biophenols: past, present and future.* Functional Foods in Health and Disease, 2013. **3**(6): p. 230-241.
15. Catalina, L., Sarmiento, R., González-García, F. and Valpuesta, V, *El metabolismo nitrogenado en árboles de Olea europaea var. Manzanillo, en relación con la floración (II).* Anales de Edaf. Agrob, 1978. **37**(3-4): p. 249-257.
16. Sarmiento, R., Valpuesta, V., Catalina, L. and González-García, F., *Variación de los contenidos de almidón y carbohidratos solubles en hojas y yemas de árboles de Olea europea var. Manzanillo en relación con los procesos vegetativo y productivo.* Anales de Edaf. Agrob, 1976. **35**(7-8): p. 687-695.
17. Jerman, T., Trebše, P. and Mozetič Vodopivec, B., *Ultrasound-assisted solid liquid extraction (USLE) of olive fruit (Olea europaea) phenolic compounds.* Food Chemistry, 2010. **123**(1): p. 175-182.
18. Kanakis, P., Termentzi, A., Michel, T., Gikas, E., Halabalaki, M. and Skaltsounis, A. L., *From Olive Drupes to Olive Oil. An HPLC-Orbitrap-based Qualitative and Quantitative Exploration of Olive Key Metabolites.* Planta Medica, 2013. **79**(16): p. 1576-1587.
19. Kiritsakis, K., Kontominas, M. G., Kontogiorgis, C., Hadjipavlou-Litina, D., Moustakas, A. and Kiritsakis, A., *Composition and Antioxidant Activity of Olive Leaf Extracts from Greek Olive Cultivars.* Journal of the American Oil Chemists' Society, 2010. **87**(4): p. 369-376.
20. Tsukamoto, H., Hisada, S. and Nishibe, S., *Lignans from bark of the Olea plants. I.* Chemical and Pharmaceutical Bulletin (Tokyo), 1984. **32**(7): p. 2730-5.
21. Tsukamoto, H., Hisada, S., and Nishibe, S., *Coumarin and Secoiridoid Glucosides from Bark of Olea africana and Olea capensis.* Chemical and Pharmaceutical Bulletin, 1985. **33**(1): p. 396-399.

22. Bianco, A., Scalzo, R. L., and Scarpati, M. L., *Isolation of cornoside from Olea europaea and its transformation into halleridone.* Phytochemistry, 1993. **32**(2): p. 455-457.
23. Owen, R.W., Haubner, R., Mier, W., Giacosa, A., Hull, W. E., Spiegelhalder, B. and Bartsch, H., *Isolation, structure elucidation and antioxidant potential of the major phenolic and flavonoid compounds in brined olive drupes.* Food and Chemical Toxicology, 2003. **41**(5): p. 703-17.
24. Peralbo-Molina, A., Priego-Capote, F. and Luque de Castro, M. D., *Tentative identification of phenolic compounds in olive pomace extracts using liquid chromatography-tandem mass spectrometry with a quadrupole-quadrupole-time-of-flight mass detector.* Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2012. **60**(46): p. 11542-50.
25. Savarese, M., De Marco, E. and Sacchi, R., *Characterization of phenolic extracts from olives (Olea europaea cv. Pisciottana) by electrospray ionization mass spectrometry.* Food Chemistry, 2007. **105**(2): p. 761-770.
26. Bianco, A., Chiacchio, M. A., Grassi, G., Iannazzo, D., Piperno, A. and Romeo, R., *Phenolic components of Olea europea: Isolation of new tyrosol and hydroxytyrosol derivatives.* Food Chemistry, 2006. **95**(4): p. 562-565.
27. Bianco A. and Uccella, N., *Biophenolic components of olives.* Food Research International, 2000. **33**(6): p. 475-485.
28. Bianchi, G.a.P., N., *3,4-dihydroxyphenylglycol, a major C6-C2 phenolic in Olea europaea fruits.* Phytochemistry, 1994. **35**(5): p. 1335-1337.
29. Rodríguez, G., Lama, A., Jaramillo, S., Fuentes-Alventosa, J. M., Guillén, R., Jiménez-Araujo, A., Rodríguez-Arcos, R. and Fernández-Bolaños, J., *3,4-Dihydroxyphenylglycol (DHPG): An Important Phenolic Compound Present in Natural Table Olives.* Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2009. **57**(14): p. 6298-6304.
30. Vlahov, G., Schiavone, C. and Simone, N., *Triacylglycerols of the olive fruit (Olea europaea L.): characterization of mesocarp and seed triacylglycerols in different cultivars by liquid chromatography and 13C NMR spectroscopy.* Lipid / Fett, 1999. **101**(4): p. 146-150.
31. Bianco, A., Mazzei, R. A., Melchioni, C., Scarpati, M. L., Romeo, G. and Uccella, N., *Microcomponents of olive oil. Part II: Digalactosyldiacylglycerols from Olea europaea.* Food Chemistry, 1998. **62**(3): p. 343-346.
32. Lo Scalzo, R., and Scarpati, M.L., *A New Secoiridoid from Olive Wastewaters.* Journal of Natural Products, 1993. **56**(4): p. 621-623.
33. Servili, M., Baldioli, M., Selvaggini, R., Macchioni, A. and Montedoro, G., *Phenolic compounds of olive fruit: one- and two-dimensional nuclear magnetic resonance characterization of Nuzhenide and its distribution in the constitutive parts of fruit.* Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1999. **47**(1): p. 12-8.
34. Gentile, L., and Uccella, N. A., *Selected bioactives from callus cultures of olives (Olea europaea L. Var. Coratina) by LC-MS.* Food Research International, 2014. **55**: p. 128-136.
35. Psomiadou, E.a.T., M., *Simultaneous HPLC Determination of Tocopherols, Carotenoids, and Chlorophylls for Monitoring Their Effect on Virgin Olive Oil Oxidation.* Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1998. **46**(12): p. 5132-5138.
36. Boskou, D., *Olive oil - constituents, Quality, Health Properties and Bioconversions.* 2012.
37. Harborne, J.B., and Green, P.S., *A chemotaxonomic survey of flavonoids in leaves of the Oleaceae.* Botanical Journal of the Linnean Society, 1980. **81**(2): p. 155-167.
38. Bouaziz, M., Grayer, R. J., Simmonds, M. S., Damak, M. and Sayadi, S., *Identification and antioxidant potential of flavonoids and low molecular weight phenols in olive cultivar chemlali growing in Tunisia.* Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2005. **53**(2): p. 236-41.
39. Sakouhi, F., Absalon, C., Sebei, K., Fouquet, E., Boukhchina, S. and Kallel, H., *Gas chromatographic–mass spectrometric characterisation of triterpene alcohols and monomethylsterols in developing Olea europaea L. fruits.* Food Chemistry, 2009. **116**(1): p. 345-350.
40. Bianchi, G., Murelli, C. and Vlahov, G., *Surface waxes from olive fruits.* Phytochemistry, 1992. **31**(10): p. 3503-3506.

41. Guinda, A., Rada, M., Delgado, T., Gutierrez-Adanez, P. and Castellano, J. M., *Pentacyclic triterpenoids from olive fruit and leaf.* Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2010. **58**(17): p. 9685-91.
42. Gomez-Gonzalez, S., Ruiz-Jimenez, J., Priego-Capote, F. and Luque de Castro, M. D., *Qualitative and quantitative sugar profiling in olive fruits, leaves, and stems by gas chromatography-tandem mass spectrometry (GC-MS/MS) after ultrasound-assisted leaching.* Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2010. **58**(23): p. 12292-9.
43. Ryan, D., Robards, K., Prenzler, P., Jardine, D., Herlt, T. and Antolovich, M., *Liquid chromatography with electrospray ionisation mass spectrometric detection of phenolic compounds from Olea europaea.* Journal of Chromatography A, 1999. **855**(2): p. 529-37.
44. Nishibe, S., Tsukamoto, H., Agata, I., Hisada, S., Shima, K. and Takemoto, T., *Isolation of phenolic compounds from stems of Olea europaea.* Shoyakugaku Zasshi, 1981. **35**(3): p. 251-254.
45. De Marino, S., Festa, C., Zollo, F., Nini, A., Antenucci, L., Raimo, G. and Iorizzi, M., *Antioxidant activity and chemical components as potential anticancer agents in the olive leaf (Olea europaea L. cv Leccino.) decoction.* Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry, 2014. **14**(10): p. 1376-85.
46. Schneider, G.a.K., W, *Cinchonine alkaloids in leaves of the olive tree.* Naturwissenschaften, 1971. **58**: p. 524A.
47. Mussini, P., Orsini, F. and Pelizzoni, F., *Triterpenes in leaves of Olea europaea.* Phytochemistry, 1975. **14**.
48. Somova, L.I., Shode, F. O., Ramnanan, P. and Nadar, A., *Antihypertensive, antiatherosclerotic and antioxidant activity of triterpenoids isolated from Olea europaea, subspecies africana leaves.* Journal of Ethnopharmacology, 2003. **84**(2-3): p. 299-305.
49. Vulcano, I., Halabalaki, M., Skaltsounis, L. and Ganzera, M., *Quantitative analysis of pungent and anti-inflammatory phenolic compounds in olive oil by capillary electrophoresis.* Food Chemistry, 2015. **169**: p. 381-386.
50. Visioli, F., Bellomo, G., and Galli, C., *Free radical-scavenging properties of olive oil polyphenols.* Biochemical and Biophysical Research Communications, 1998. **247**(1): p. 60-4.
51. Dermeche, S., Nadour, M., Larroche, C., Moulti-Mati, F. and Michaud, P., *Olive mill wastes: Biochemical characterizations and valorization strategies.* Process Biochemistry, 2013. **48**(10): p. 1532-1552.
52. Ibrahim, A.G.E., *Phenolic Composition, Antiradical Activity and Effect on Hexanal of Olive Mill Wastewater.* World Applied Sciences Journal, 2014. **32**(11): p. 2178-2185.
53. Galanakis, C.M., *Olive Mill Waste: Recent Advances for the Sustainable Management*. 1st ed. 2017: Elsevier - Academic Press.
54. Kranz, P., et al., *Sensory quality of functional beverages: bitterness perception and bitter masking of olive leaf extract fortified fruit smoothies.* J Food Sci. **75**(6): p. S308-11.
55. Bayram, B., et al., *Comprehensive Analysis of Polyphenols in 55 Extra Virgin Olive Oils by HPLC-ECD and Their Correlation with Antioxidant Activities.* Plant Foods Hum Nutr.
56. Damtoft, S., Franzyk, H., and Jensen, S.R., *Biosynthesis of secoiridoid glucosides in oleaceae.* Phytochemistry, 1993. **34**(5): p. 1291-1299.
57. Bourquelot, E., and Vintilesco, J., *Untersuchungen über die Glykoside einiger Pflanzen aus der Familie der Oleaceen.* Archiv der Pharmazie, 1907. **245**(1): p. 180-199.
58. Shasha, B. and J. Leibowitz, *On the Oleuropein, the Bitter Principle of Olives1.* The Journal of Organic Chemistry, 1961. **26**(6): p. 1948-1954.
59. Omar, S.H., *Oleuropein in olive and its pharmacological effects.* Scientia Pharmaceutica, 2010. **78**(2): p. 133-54.
60. Hilts, R.W.a.H., R. S., *A chemical study of the ripening and pickling of California olives.* Journal of the Franklin Institute, 1920. **189**(3): p. 396.
61. Cruess, W.V.a.A., C. L., *The Bitter Glucoside of the Olive.* Journal of the American Chemical Society, 1934. **56**(10): p. 2115-2117.
62. Panizzi, L., Scarpati, M.L. and Oriente, G., *Costituzione della oleuropeina, glucoside amaro e ad azione ipotensiva dell'olivo. Nota II.* Gazzetta Chimica Italiana, 1960. **90**: p. 1449-1485.

63. C., V.W.L., *Biologically active compounds and process of preparing same.* United States Patent Office, 1962.
64. Fleming, H.P., Walter, W. M. and Etchells, J. L., *Antimicrobial Properties of Oleuropein and Products of Its Hydrolysis from Green Olives.* Applied Microbiology, 1973. **26**(5): p. 777-782.
65. Ryan, D., Lawrence, H., Prenzler, P. D., Antolovich, M. and Robards, K., *Recovery of phenolic compounds from Olea europaea.* Analytica Chimica Acta, 2001. **445**(1): p. 67-77.
66. Soler-Rivas, C., Espín, J.C., and Wichers, H.J., *Oleuropein and related compounds.* Journal of the Science of Food and Agriculture, 2000. **80**(7): p. 1013-1023.
67. Çaliş, I., Hosny, M., Khalifa, T. and Nishibe, S., *Secoiridoids from Fraxinus angustifolia.* Phytochemistry, 1993. **33**(6): p. 1453-1456.
68. Kuwajima, H., Morita, M.,Takaishi, K., Inoue, K., Fujita, T., Zheng-Dan, H. and Chong-Ren, Y., *Secoiridoid, coumarin and secoiridoid-coumarin glucosides from Fraxinus chinensis.* Phytochemistry, 1992. **31**(4): p. 1277-1280.
69. Terazawa, M., *Phenolic Compounds in Living Tissues of Woods. VI.: Ligustroside and oleuropein in Fraxinus mandshurica RUPR. var. japonica MAXIM. and Syringa vulgaris L. and their seasonal variation in them.* Research bulletins of the college experiment forests Hokkaido University, 1986. **43**(1): p. 109-126.
70. Babu, G., Anju, P., Biju, C.R. and Rajapandi, R., *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research, 2012, 4 (7): 3396-3399.* Journal of Chemical and Pharmaceutical Research, 2012. **4**(7): p. 3396-3399.
71. Park H.-J., L.M.-S., Lee K.-T., Sohn I.-C., Han Y.-N. and Miyamoto K.-I., *Studies on constituents with cytotoxic activity from the stem bark of Syringa velutina.* Chemical and Pharmaceutical Bulletin, 1999. **47**: p. 1029-1031.
72. Festus, T., Geoffrey, RM., John, OM., Quang, N., Hashimoto, K. and Asakawa, Y, *The antiviral activity of compounds isolated from Kenyan Carissa edulis (Forssk.) Vahl.* The Internet Journal of Alternative Medicine, 2009. **8**(1).
73. Yang, X., Ding, Y. and Zhang, D-M, *Isolation and identification of iridoid glycosides from Ilex pubescens.* Chinese Journal of Medicinal Chemistry, 2007. **17**(3): p. 173.
74. Sugiyama, M., Machida, K., Matsuda, N. and Kikuchi, M., *A secoiridoid glycoside from Osmanthus asiaticus.* Phytochemistry, 1993. **34**(4): p. 1169-1170.
75. Ranalli, A., Contento, S., Lucera, L., Di Febo, M., Marchegiani, D. and Di Fonzo, V., *Factors Affecting the Contents of Iridoid Oleuropein in Olive Leaves (Olea europaea L.).* Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2005. **54**(2): p. 434-440.
76. Morello, J.R., Romero, M. P. and Motilva, M. J., *Effect of the maturation process of the olive fruit on the phenolic fraction of drupes and oils from Arbequina, Farga, and Morrut cultivars.* Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2004. **52**(19): p. 6002 - 6009.
77. Ortega-Garcia, F., Blanco, S., Peinado, M. A. and Peragon, J., *Polyphenol oxidase and its relationship with oleuropein concentration in fruits and leaves of olive (Olea europaea) cv. 'Picual' trees during fruit ripening.* Tree Physiology, 2008. **28**(1): p. 45-54.
78. Amiot, M.J., Fleuriet, A. and Macheix, J.J., *Importance and evolution of phenolic compounds in olive during growth and maturation.* Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1986. **34**(5): p. 823-826.
79. Le Tutour, B.a.G., D., *Antioxidative activities of Olea europaea leaves and related phenolic compounds.* Phytochemistry, 1992. **31**(4): p. 1173-1178.
80. Servili, M., Esposto, S., Fabiani, R., Urbani, S., Taticchi, A., Mariucci, F., Selvaggini, R., and Montedoro, G. F., *Phenolic compounds in olive oil: antioxidant, health and organoleptic activities according to their chemical structure.* Inflammopharmacology, 2009. **17**(2): p. 76-84.
81. Visioli, F., and Galli, C., *Biological properties of olive oil phytochemicals.* Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 2002. **42**(3): p. 209-21.
82. Morello, J.R., Vuorela, S., Romero, M. P., Motilva, M. J., and Heinonen, M., *Antioxidant activity of olive pulp and olive oil phenolic compounds of the arbequina cultivar.* Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2005. **53**(6): p. 2002-8.

83. Tuck, K.L., and Hayball, P. J., *Major phenolic compounds in olive oil: metabolism and health effects.* The Journal of Nutritional Biochemistry, 2002. **13**(11): p. 636-644.
84. Andrikopoulos, N.K., Dedoussis, G. V., Falirea, A., Kalogeropoulos, N. and Hatzinikola, H. S., *Deterioration of natural antioxidant species of vegetable edible oils during the domestic deep-frying and pan-frying of potatoes.* International Journal of Food Sciences and Nutrition, 2002. **53**(4): p. 351-63.
85. Visioli, F., Bellomo, G., Montedoro, GF., Galli, C., *Low density lipoprotein oxidation is inhibited in vitro by olive oil constituents.* Atherosclerosis, 1995. **117**(1): p. 25-32.
86. Visioli, F., and Galli, C., *Oleuropein protects low density lipoprotein from oxidation.* Life Sciences, 1994. **55**(24): p. 1965-71.
87. Coni, E., Di Benedetto, R., Di Pasquale, M., Masella, R., Modesti, D., Mattei, R. and Carlini, E. A., *Protective effect of oleuropein, an olive oil biophenol, on low density lipoprotein oxidizability in rabbits.* Lipids, 2000. **35**(1): p. 45-54.
88. Manna, C., Migliardi, V., Golino, P., Scognamiglio, A., Galletti, P., Chiariello, M. and Zappia, V., *Oleuropein prevents oxidative myocardial injury induced by ischemia and reperfusion.* The Journal of Nutritional Biochemistry, 2004. **15**(8): p. 461-6.
89. Visioli, F.a.G., C., *Antiatherogenic components of olive oil.* Current Atherosclerosis Reports, 2001. **3**(1): p. 64-7.
90. Dell'Agli, M., Fagnani, R., Mitro, N., Scurati, S., Masciadri, M., Mussoni, L., Galli, G. V., Bosisio, E., Crestani, M., De Fabiani, E., Tremoli, E., and Caruso, D., *Minor components of olive oil modulate proatherogenic adhesion molecules involved in endothelial activation.* Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2006. **54**(9): p. 3259-64.
91. Martinínez-Domínguez, E., de la Puerta, R. and Ruiz-Gutiérrez, V., *Protective effects upon experimental inflammation models of a polyphenol-supplemented virgin olive oil diet.* Inflammation Research, 2001. **50**(2): p. 102-106.
92. de la Puerta, R., Martinez Dominguez, M. E., Ruiz-Gutierrez, V., Flavill, J. A., and Hoult, J. R., *Effects of virgin olive oil phenolics on scavenging of reactive nitrogen species and upon nitrergic neurotransmission.* Life Sciences, 2001. **69**(10): p. 1213-22.
93. Papoti, V.T.a.T., M. Z., *Impact of sampling parameters on the radical scavenging potential of olive (Olea europaea L.) leaves.* Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2009. **57**(9): p. 3470-7.
94. Katsiki, M., Chondrogianni, N., Chinou, I., Rivett, A. J. and Gonos, E. S., *The olive constituent oleuropein exhibits proteasome stimulatory properties in vitro and confers life span extension of human embryonic fibroblasts.* Rejuvenation Research, 2007. **10**(2): p. 157-72.
95. Huang, L.a.C., C. H., *Proteasome regulators: activators and inhibitors.* Current Medicinal Chemistry, 2009. **16**(8): p. 931-9.
96. Sumiyoshi, M.a.K., Y., *Effects of olive leaf extract and its main component oleuroepin on acute ultraviolet B irradiation-induced skin changes in C57BL/6J mice.* Phytotherapy Research. **24**(7): p. 995-1003.
97. Perugini, P., Vettor, M., Rona, C., Troisi, L., Villanova, L., Genta, I., Conti, B. and Pavanetto, F., *Efficacy of oleuropein against UVB irradiation: preliminary evaluation.* International Journal of Cosmetic Science, 2008. **30**(2): p. 113-20.
98. Kimura, Y.a.S., M., *Olive leaf extract and its main component oleuropein prevent chronic ultraviolet B radiation-induced skin damage and carcinogenesis in hairless mice.* Journal of Nutrition, 2009. **139**(11): p. 2079-86.
99. Burt, S., *Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods—a review.* International Journal of Food Microbiology, 2004. **94**(3): p. 223-253.
100. Draughon, F., *Use of Botanicals as Biopreservatives in Foods*. Vol. **58**. 2004, Food Technology. 20-28.
101. Nychas, G.J.E.a.B., R. G., *Entertoxin B production and physicochemical changes in extracts from different turkey muscles during the growth of Staphylococcus aureus S-6.* Food microbiology, 1991. **8**(2): p. 105-117.

102. Tan, H.W., Tuck, K. L., Stupans, I., and Hayball, P. J., *Simultaneous determination of oleuropein and hydroxytyrosol in rat plasma using liquid chromatography with fluorescence detection.* Journal of Chromatography. B, Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences, 2003. **785**(1): p. 187-91.
103. Jiang, J., Jin, CM, Kim, YC, Kim, HS, Park, WC, and Park, H., *Anti-toxoplasmosis Effects of Oleuropein Isolated from Fraxinus rhychophylla.* Biological and Pharmaceutical Bulletin, 2008. **31**(12): p. 2273-2276.
104. de la Puerta, R., Gutierrez, VR and Hoult, J.R.S., *Inhibition of leukocyte 5-lipoxygenase by phenolics from virgin olive oil.* Biochemical Pharmacology, 1999. **57**(4): p. 445-449.
105. Giamarellos-Bourboulis, E.J., Geladopoulos, T., Chrisofos, M., Koutoukas, P., Vassiliadis, J., Alexandrou, I., Tsaganos, T., Sabracos, L., Karagianni, V., Pelekanou, E., Tzepi, I., Kranidioti, H., Koussoulas, V. and Giamarellou, H., *Oleuropein: a novel immunomodulator conferring prolonged survival in experimental sepsis by Pseudomonas aeruginosa.* Shock, 2006. **26**(4): p. 410-6.
106. Impellizzeri, D., Esposito, E., Mazzon, E., Paterniti, I., Di Paola, R., Bramanti, P., Morittu, V. M., Procopio, A., Perri, E., Britti, D. and Cuzzocrea, S., *The effects of a polyphenol present in olive oil, oleuropein aglycone, in an experimental model of spinal cord injury in mice.* Biochemical Pharmacology. **83**(10): p. 1413-26.
107. Puel, C., Mathey, J., Agalias, A., Kati-coulibaly, S.,, Mardon, J., Obled, C., Davicco, M.J., Lebecque, P., Horcajada, M.N., Skaltsounis, A.L. and Coxam, V., *Dose-response study of effect of oleuropein, an olive oil polyphenol, in an ovariectomy/inflammation experimental model of bone loss in the rat.* Clinical nutrition (Edinburgh, Scotland), 2006. **25**(5): p. 859-868.
108. Khalatbary, A.R.a.Z., G. R., *Anti-inflammatory effect of oleuropein in experimental rat spinal cord trauma.* Iranian Red Crescent Medical Journal. **14**(4): p. 229-34.
109. Alirezaei, M., Dezfoulian, O., Neamati, S., Rashidipour, M., Tanideh, N. and Kheradmand, A., *Oleuropein prevents ethanol-induced gastric ulcers via elevation of antioxidant enzyme activities in rats.* Journal of Physiology and Biochemistry. **68**(4): p. 583-92.
110. Darlington, L.G.a.S., T. W., *Antioxidants and fatty acids in the amelioration of rheumatoid arthritis and related disorders.* British Journal of Nutrition, 2001. **85**(3): p. 251-69.
111. Kremer, J.M., Lawrence, D.A., Jubiz, W., Digiacomo, R., Rynes, R, Bartholomew, L.E. and Sherman, M., *Dietary fish oil and olive oil supplementation in patients with Rheumatoid Arthritis clinical and immunologic effects.* Arthritis & Rheumatism, 1990. **33**(6): p. 810-820.
112. Linos, A., Kaklamani, VG, Kaklamani, E., Koumantaki, Y., Giziaki, E., Papazoglou, S., and Mantzoros, CS, *Dietary factors in relation to rheumatoid arthritis: a role for olive oil and cooked vegetables?* The American Journal of Clinical Nutrition, 1999. **70**(6): p. 1077-1082.
113. Koca, U., Suntar, I., Akkol, E. K., Yilmazer, D. and Alper, M., *Wound repair potential of Olea europaea L. leaf extracts revealed by in vivo experimental models and comparative evaluation of the extracts' antioxidant activity.* Journal of Medicinal Food, 2011. **14**(1-2): p. 140-6.
114. Ma, S., He, ZD, Deng, XL, But, P.PH, Ooi, V.EC, Xu, HX, Lee, S.HS and Lee, SF, *In Vitro Evaluation of Secoiridoid Glucosides from the Fruits of Ligustrum lucidum as Antiviral Agents.* Chemical and Pharmaceutical Bulletin, 2001. **49**(11): p. 1471-1473.
115. Fredrickson, W., F and S Group, Inc., *Method and Composition for Antiviral Therapy with Olive Leaves.* U.S. Patent, 2000. **6**(117): p. 884.
116. Micol, V., Caturla, N., Pérez-Fons, L., Más V, Pérez L and Estepa A., *The olive leaf extract exhibits antiviral activity against viral haemorrhagic septicaemia rhabdovirus (VHSV).* Antiviral Research, 2005. **66**(2β€“3): p. 129-136.
117. Lee-Huang, S., Zhang, L., Lin Huang, P., Chang, YT and Huang, PL, *Anti-HIV activity of olive leaf extract (OLE) and modulation of host cell gene expression by HIV-1 infection and OLE treatment.* Biochemical and Biophysical Research Communications, 2003. **307**(4): p. 1029-1037.
118. Binukumar, B.a.M., A., *Dietary fat and risk of breast cancer.* World Journal of Surgical Oncology, 2005. **3**(1): p. 45.

119. Trichopoulou, A., Katsouyanni, K., Stuver, S., Tzala, L., Gnardellis, C., Rimm, E. and Trichopoulos, D., *Consumption of Olive Oil and Specific Food Groups in Relation to Breast Cancer Risk in Greece.* Journal of the National Cancer Institute, 1995. **87**(2): p. 110-116.
120. Vecchia, C., Negri, E., Franceschi, S., Decarli, A., Giacosa, A. and Lipworth, L., *Olive oil, other dietary fats, and the risk of breast cancer (Italy).* Cancer Causes & Control, 1995. **6**(6): p. 545-550.
121. Hodge, A.M., English, D.R, McCredie, M.RE, Severi, G, Boyle, P, Hopper, J.L and Giles, G.G, *Foods, nutrients and prostate cancer.* Cancer Causes & Control, 2004. **15**(1): p. 11-20.
122. Fortes, C., Forastiere, F., Farchi, S., Mallone, S., Trequattrinni, T., Anatra, F., Schmid, G. and Perucci, C.A, *The Protective Effect of the Mediterranean Diet on Lung Cancer.* Nutrition and Cancer, 2003. **46**(1): p. 30-37.
123. Bosetti, C., Negri, E., Franceschi, S., Talamini, R., Montella, M., Conti, E., Lagiou, P., Parazzini, F., and La Vecchia, C., *Olive oil, seed oils and other added fats in relation to ovarian cancer (Italy).* Cancer Causes & Control, 2002. **13**(5): p. 465-470.
124. Stoneham, M., Goldacre, M., Seagroatt, V. and Gill, L., *Olive oil, diet and colorectal cancer: an ecological study and a hypothesis.* Journal of Epidemiology and Community Health, 2000. **54**(10): p. 756-760.
125. Han, J., Talorete, T.PN, Yamada, P. and Isoda, H., *Anti-proliferative and apoptotic effects of oleuropein and hydroxytyrosol on human breast cancer MCF-7 cells.* Cytotechnology, 2009. **59**(1): p. 45-53.
126. Menendez, J.A., Vazquez-Martin, A., Garcia-Villalba, R., Carrasco-Pancorbo, A., Oliveras-Ferraros, C., Fernandez-Gutierrez, A. and Segura-Carretero, A., *tabAnti-HER2 (erbB-2) oncogene effects of phenolic compounds directly isolated from commercial Extra-Virgin Olive Oil (EVOO).* BMC Cancer, 2008. **8**: p. 377.
127. Hamdi, H.K. and R. Castellon, *Oleuropein, a non-toxic olive iridoid, is an anti-tumor agent and cytoskeleton disruptor.* Biochemical and biophysical research communications, 2005. **334**(3): p. 769-778.
128. Bastida, S.a.S.-M., F.J., *Thermal Oxidation of Olive Oil, Sunflower Oil and a Mix of Both Oils during Forty Discontinuous Domestic Fryings of Different Foods.* Food Science and Technology International, 2001. **7**(1): p. 15-21.
129. Corona, G., Deiana, M., Incani, A., Vauzour, D., Dessi, M. A. and Spencer, J. P., *Inhibition of p38/CREB phosphorylation and COX-2 expression by olive oil polyphenols underlies their anti-proliferative effects.* Biochemical and Biophysical Research Communications, 2007. **362**(3): p. 606-11.
130. Sieri, S., Krogh, V., Pala, V., Muti, P., Micheli, A., Evangelista, A., Tagliabue, G. and Berrino, F., *Dietary Patterns and Risk of Breast Cancer in the ORDET Cohort.* Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention, 2004. **13**(4): p. 567-572.
131. Masala, G., Ambrogetti, D., Assedi, M., Giorgi, D., Del T., Marco R. and Palli, D., *Dietary and lifestyle determinants of mammographic breast density. A longitudinal study in a Mediterranean population.* International Journal of Cancer, 2006. **118**(7): p. 1782-1789.
132. Hassan, Z.K., Elamin, M. H., Daghestani, M. H., Omer, S. A., Al-Olayan, E. M., Elobeid, M. A., Virk, P. and Mohammed, O. B., *Oleuropein induces anti-metastatic effects in breast cancer.* Asian Pacific Journal of Cancer Prevention, 2012. **13**(9): p. 4555-9.
133. Acquaviva, R., Di Giacomo, C., Sorrenti, V., Galvano, F., Santangelo, R., Cardile, V., Gangia, S., D'Orazio, N., Abraham, N. G. and Vanella, L., *Antiproliferative effect of oleuropein in prostate cell lines.* International Journal of Oncology. **41**(1): p. 31-8.
134. Babich, H.a.V., F., *In vitro cytotoxicity to human cells in culture of some phenolics from olive oil.* Farmaco, 2003. **58**(5): p. 403-7.
135. Zbidi, H., Salido, S., Altarejos, J., Perez-Bonilla, M., Bartegi, A., Rosado, J. A. and Salido, G. M., *Olive tree wood phenolic compounds with human platelet antiaggregant properties.* Blood Cells, Molecules and Diseases, 2009. **42**(3): p. 279-85.

136. Gilani, A.H., Khan, A. U., Shah, A. J., Connor, J. and Jabeen, Q., *Blood pressure lowering effect of olive is mediated through calcium channel blockade.* International Journal of Food Sciences and Nutrition, 2005. **56**(8): p. 613-20.
137. Ruiz-Gutierrez, V., Muriana, F. J. G., Guerrero, A., Cert, A. M. and Villar, J., *Role of dietary oleic acid from two different sources on fatty acid composition of erythrocyte membrane and blood pressure in healthy subjects.* The Journal of nutritional biochemistry, 1997. **8**(12): p. 689-695.
138. Keys A, M.A., Karvonen MJ, Aravanis C, Blackburn H, Buzina R, Djordjevic BS, Dontas AS, Fidanza F, Keys MH, Kromhout, D., Nedeljkovic, S., Punsar, S., Seccareccia, F. and Toshima, H., *The diet and 15-year death rate in the seven countries study.* American Journal of Epidemiology, 1986. **124**(6): p. 903-915.
139. Keys, A., Menotti, A., Karvonen, M. J., Aravanis, C., Blackburn, H., Buzina, R., Djordjevic, B.S., Dontas, A. S., Fidanza, F. and Keys, M.H., *The diet and 15-year death rate in the seven countries study.* American Journal of Epidemiology, 1986. **124**(6): p. 903-15.
140. Alonso, A., Ruiz-Gutierrez, V. and Martinez-Gonzalez, M. A., *Monounsaturated fatty acids, olive oil and blood pressure: epidemiological, clinical and experimental evidence.* Public Health Nutrition, 2006. **9**(2): p. 251-7.
141. Ferrara, L.A., Raimondi, A. S., d'Episcopo, L., Guida, L., Dello Russo, A. and Marotta, T., *Olive oil and reduced need for antihypertensive medications.* Archives of Internal Medicine, 2000. **160**(6): p. 837-42.
142. Andreadou, I., Iliodromitis, E. K., Mikros, E., Constantinou, M., Agalias, A., Magiatis, P., Skaltsounis, A. L., Kamber, E., Tsantili-Kakoulidou, A. and Kremastinos, D. T., *The olive constituent oleuropein exhibits anti-ischemic, antioxidative, and hypolipidemic effects in anesthetized rabbits.* Journal of Nutrition, 2006. **136**(8): p. 2213-9.
143. Andreadou, I., Sigala, F., Iliodromitis, E. K., Papaefthimiou, M., Sigalas, C., Aligiannis, N., Savvari, P., Gorgoulis, V., Papalabros, E. and Kremastinos, D.T., *Acute doxorubicin cardiotoxicity is successfully treated with the phytochemical oleuropein through suppression of oxidative and nitrosative stress.* Journal of Molecular and Cellular Cardiology, 2007. **42**(3): p. 549-58.
144. Togo, P., Osler, M., Sorensen, T. I. and Heitmann, B. L., *Food intake patterns and body mass index in observational studies.* International journal of obesity and related metabolic disorders, 2001. **25**(12): p. 1741-51.
145. Heidemann, C., Hoffmann, K., Spranger, J., Klipstein-Grobusch, K., Mohlig, M., Pfeiffer, A. F. and Boeing, H., *A dietary pattern protective against type 2 diabetes in the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC)--Potsdam Study cohort.* Diabetologia, 2005. **48**(6): p. 1126-34.
146. Montonen, J., Knekt, P., Härkänen, T., Järvinen, R., Heliövaara, M., Aromaa, A. and Reunanen, A., *Dietary Patterns and the Incidence of Type 2 Diabetes.* American Journal of Epidemiology, 2005. **161**(3): p. 219-227.
147. van Dam, R.M., Rimm, E. B., Willett, W. C., Stampfer, M. J. and Hu, F. B., *Dietary patterns and risk for type 2 diabetes mellitus in U.S. men.* Annals of Internal Medicine, 2002. **136**(3): p. 201-9.
148. Moosmann, B.a.B., C., *The antioxidant neuroprotective effects of estrogens and phenolic compounds are independent from their estrogenic properties.* Proceedings of the National Academy of Sciences, 1999. **96**(16): p. 8867-72.
149. Bazoti, F.N., Bergquist, J., Markides, K. E. and Tsarbopoulos, A., *Noncovalent interaction between amyloid-beta-peptide (1-40) and oleuropein studied by electrospray ionization mass spectrometry.* Journal of the American Society for Mass Spectrometry, 2006. **17**(4): p. 568-75.
150. Palmieri, D., Aliakbarian, B., Casazza, A. A., Ferrari, N., Spinella, G., Pane, B., Cafueri, G., Perego, P. and Palombo, D., *Effects of polyphenol extract from olive pomace on anoxia-induced endothelial dysfunction.* Microvascular Research. **83**(3): p. 281-9.
151. Gonzalez, M., Zarzuelo, A., Gamez, M. J., Utrilla, M. P., Jimenez, J. and Osuna, I., *Hypoglycemic activity of olive leaf.* Planta Medica, 1992. **58**(6): p. 513-5.
152. Al-Azzawie, H., Alhamdani and Mohamed, SS, *Hypoglycemic and antioxidant effect of oleuropein in alloxan-diabetic rabbits.* Life Sciences, 2006. **78**(12): p. 1371-1377.

153. Jemai, H., Bouaziz, M., Fki, I., El Feki, A. and Sayadi, S., *Hypolipidimic and antioxidant activities of oleuropein and its hydrolysis derivative-rich extracts from Chemlali olive leaves.* Chemico-Biological Interactions, 2008. **176**(2-3): p. 88-98.
154. Hagiwara, K., Goto, T., Araki, M., Miyazaki, H. and Hagiwara, H., *Olive polyphenol hydroxytyrosol prevents bone loss.* European Journal of Pharmacology. **662**(1-3): p. 78-84.
155. Santiago-Mora R., C.-D.A., De Castro MD, Quesada-Gómez JM., *Oleuropein enhances osteoblastogenesis and inhibits adipogenesis: the effect on differentiation in stem cells derived from bone marrow.* Osteoporosis International, 2011. **22**(2): p. 675-684.
156. Stupans, I., Stretch, G. and Hayball, P., *Olive oil phenols inhibit human hepatic microsomal activity.* Journal of Nutrition, 2000. **130**(9): p. 2367-70.
157. Ciafardini, G., Zullo, B. A. and Iride, A., *Lipase production by yeasts from extra virgin olive oil.* Food Microbiology, 2006. **23**(1): p. 60-7.
158. Rocha, B.S., Gago, B., Barbosa, R. M. and Laranjinha, J., *Dietary polyphenols generate nitric oxide from nitrite in the stomach and induce smooth muscle relaxation.* Toxicology, 2009. **265**(1-2): p. 41-8.
159. Ebaid, G.M., Seiva, F. R., Rocha, K. K., Souza, G. A. and Novelli, E. L., *Effects of olive oil and its minor phenolic constituents on obesity-induced cardiac metabolic changes.* Nutrition Journal, 2010. **9**: p. 46.
160. Sumbul, S., Ahmad, M. A. and Mohd, A., *Role of phenolic compounds in peptic ulcer: An overview.* Journal of Pharmacy And Bioallied Sciences. **3**(3): p. 361-7.
161. Kadowaki, E., Yoshida, Y., Baba, N. and Nakajima, S., *Feeding stimulative activity of steroidal and secoiridoid glucosides and their hydrolysed derivatives toward the olive weevil (Dyscerus perforatus).* Zeitschrift für Naturforschung C, 2003. **58**(5-6): p. 441-5.
162. Baidez, A.G., Gomez, P., Del Rio, J. A. and Ortuno, A., *Dysfunctionality of the xylem in Olea europaea L. Plants associated with the infection process by Verticillium dahliae Kleb. Role of phenolic compounds in plant defense mechanism.* Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2007. **55**(9): p. 3373-7.
163. Demopoulos, V., Karkoula, E., Magiatis, P., Melliou, E., Kotsiras, A. and Mouroutoglou, C. *Correlation of oleocanthal and oleacein concentration with pungency and bitterness in "Koroneiki" virgin olive oil.* in *II International Symposium on Horticulture in Europe 1099*. 2012.
164. Servili, M., Selvaggini, R., Esposto, S., Taticchi, A., Montedoro, G., and Morozzi, G., *Health and sensory properties of virgin olive oil hydrophilic phenols: agronomic and technological aspects of production that affect their occurrence in the oil.* Journal of Chromatography A, 2004. **1054**(1-2): p. 113-27.
165. Garcia, J.M., Yousfi, K., Mateos, R., Olmo, M. and Cert, A., *Reduction of oil bitterness by heating of olive (Olea europaea) fruits.* Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2001. **49**(9): p. 4231-5.
166. Kiritsakis, A.K., *Flavor components of olive oil—A review.* Journal of the American Oil Chemists' Society, 1998. **75**(6): p. 673-681.
167. Bendini, A., Valli, E., Barbieri, S., and Toschi, T.G., *Sensory analysis of virgin olive oil.* Intechopen, 2012: p. 109-130.
168. Selvaggini, R., Servili, M., Urbani, S., Esposto, S., Taticchi, A. and Montedoro, G., *Evaluation of phenolic compounds in virgin olive oil by direct injection in high-performance liquid chromatography with fluorometric detection.* Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2006. **54**(8): p. 2832-8.
169. Tovar, M.J., Motilva, M.J., and Romero, M.P., *Changes in the Phenolic Composition of Virgin Olive Oil from Young Trees (Olea europaea L. cv. Arbequina) Grown under Linear Irrigation Strategies.* Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2001. **49**(11): p. 5502-5508.
170. Gomez-Rico, A., Inarejos-Garcia, A.M., Salvador, M.D. and Fregapane, G., *Effect of malaxation conditions on phenol and volatile profiles in olive paste and the corresponding virgin olive oils (Olea europaea L. Cv. Cornicabra).* Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2009. **57**(9): p. 3587-95.

171. Vierhuis, E., Servili, M., Baldioli, M., Schols, H. A., Voragen, A. G. J. and Montedoro, G.F., *Effect of Enzyme Treatment during Mechanical Extraction of Olive Oil on Phenolic Compounds and Polysaccharides.* Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2001. **49**(3): p. 1218-1223.
172. Michel, T., Termentzi, A., Gikas, E., Halabalaki, M., Smith, A.B. and Skaltsounis, A.L., *Oleacin and oleocanthal: Two olive oil bioactives in multiple chemical forms.* Planta Medica, 2012. **78**(11): p. PJ43.
173. Montedoro, G., Servili, M., Baldioli, M., Selvaggini, R., Miniati, E. and Macchioni, A., *Simple and hydrolyzable compounds in virgin olive oil. 3. Spectroscopic characterizations of the secoiridoid derivatives.* Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1993. **41**(11): p. 2228-2234.
174. Paiva-Martins, F., and Pinto, M., *Isolation and characterization of a new hydroxytyrosol derivative from olive (Olea europaea) leaves.* Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2008. **56**(14): p. 5582-8.
175. Somanadhan, B., Smitt, U.W., George, V., Pushpangadan, P., Rajasekharan, S., Duus, J.O., Nyman, U., Olsen, C. E., and Jaroszewski, J. W., *Angiotensin converting enzyme (ACE) inhibitors from Jasminum azoricum and Jasminum grandiflorum.* Planta Medica, 1998. **64**(3): p. 246-50.
176. Capozzi, F., Piperno, A. and Uccella, N., *Oleuropein Site Selective Hydrolysis by Technomimetic Nuclear Magnetic Resonance Experiments.* Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2000. **48**(5): p. 1623-1629.
177. Romero-Segura, C., García-Rodríguez, R., Sánchez-Ortiz, A., Sanz, C. and Pérez, A. G., *The role of olive β-glucosidase in shaping the phenolic profile of virgin olive oil.* Food Research International, 2012. **45**(1): p. 191-196.
178. Amiot, M., Fleuriet, A. and Macheix, JJ, *Accumulation of oleuropein derivatives during olive maturation.* Phytochemistry, 1989. **28**(1): p. 67-69.
179. da Silva, M.D.G., Freitas, A.MC., Cabrita, M. JB. and Garcia, R., *Olive Oil Composition: Volatile Compounds.* Intechopen.
180. Perrinjaquet-Moccetti, T., Busjahn, A., Schmidlin, C., Schmidt, A., Bradl, B., and Aydogan, C., *Food supplementation with an olive (Olea europaea L.) leaf extract reduces blood pressure in borderline hypertensive monozygotic twins.* Phytotherapy Research, 2008. **22**(9): p. 1239-42.
181. Hansen, K., Adsersen, A., Christensen, S. B., Jensen, S. R., Nyman, U. and Smitt, U. W., *Isolation of an angiotensin converting enzyme (ACE) inhibitor from Olea europaea and Olea lancea.* Phytomedicine, 1996. **2**(4): p. 319-25.
182. Paiva-Martins, F., Gordon, MH., and Gameiro, P., *Activity and location of olive oil phenolic antioxidants in liposomes.* Chemistry and Physics of Lipids, 2003. **124**(1): p. 23-36.
183. Fu, S., Arraez-Roman, D., Segura-Carretero, A., Menendez, J. A., Menendez-Gutierrez, M. P., Micol, V. and Fernandez-Gutierrez, A., *Qualitative screening of phenolic compounds in olive leaf extracts by hyphenated liquid chromatography and preliminary evaluation of cytotoxic activity against human breast cancer cells.* Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2010. **397**(2): p. 643-54.
184. Fogliano, V., Ritieni, A., Monti, S. M., Gallo, M., Della Medaglia, D., Ambrosino, M. L. and Sacchi, R., *Antioxidant activity of virgin olive oil phenolic compounds in a micellar system†.* Journal of the Science of Food and Agriculture, 1999. **79**(13): p. 1803-1808.
185. Paiva-Martins, F., Fernandes, J., Rocha, S., Nascimento, H., Vitorino, R., Amado, F., Borges, F., Belo, L. and Santos-Silva, A., *Effects of olive oil polyphenols on erythrocyte oxidative damage.* Molecular Nutrition & Food Research, 2009. **53**(5): p. 609-16.
186. Paiva-Martins, F., and Gordon, M. H., *Interactions of ferric ions with olive oil phenolic compounds.* Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2005. **53**(7): p. 2704-9.
187. Fabiani, R., De Bartolomeo, A., Rosignoli, P., Servili, M., Selvaggini, R., Montedoro, G. F., Di Saverio, C., and Morozzi, G., *Virgin olive oil phenols inhibit proliferation of human promyelocytic leukemia cells (HL60) by inducing apoptosis and differentiation.* Journal of Nutrition, 2006. **136**(3): p. 614-9.

188. Vougogiannopoulou, K., Lemus, C., Halabalaki, M., Pergola, C., Werz, O., Smith, A. B., 3rd, Michel, S., Skaltsounis, L. and Deguin, B., *One-step semisynthesis of oleacein and the determination as a 5-lipoxygenase inhibitor.* Journal of Natural Products, 2014. **77**(3): p. 441-5.
189. Rosignoli, P., Fuccelli, R., Fabiani, R., Servili, M. and Morozzi, G., *Effect of olive oil phenols on the production of inflammatory mediators in freshly isolated human monocytes.* The Journal of Nutritional Biochemistry, 2013. **24**(8): p. 1513-9.
190. Medina, E., de Castro, A., Romero, C. and Brenes, Manuel, *Comparison of the concentrations of phenolic compounds in olive oils and other plant oils: correlation with antimicrobial activity.* Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2006. **54**(14): p. 4954-4961.
191. Naruszewicz, M., Czerwinska, M.E. and Kiss, A.K., *Oleacein. translation from Mediterranean diet to potential antiatherosclerotic drug.* Current Pharmaceutical Design, 2015. **21**(9): p. 1205-12.
192. Menendez, J.A., Vazquez-Martin, A., Garcia-Villalba, R., Carrasco-Pancorbo, A., Oliveras-Ferraros, C., Fernandez-Gutierrez, A. and Segura-Carretero, A., *tabAnti-HER2 (erbB-2) oncogene effects of phenolic compounds directly isolated from commercial Extra-Virgin Olive Oil (EVOO).* BMC Cancer, 2008. **8**(1): p. 377.
193. Artajo, L.-S., Romero, M.-P., Tovar, M.-J. and Motilva, M.-J., *Effect of irrigation applied to olive trees (Olea europaea L.) on phenolic compound transfer during olive oil extraction.* European Journal of Lipid Science and Technology, 2006. **108**(1): p. 19-27.
194. Cicerale, S., Lucas, LJ and Keast, RSJ, *Oleocanthal: A naturally occurring anti-inflammatory agent in virgin olive oil*. 2012: INTECH Open Access Publisher.
195. Parkinson, L.a.K., R., *Oleocanthal, a Phenolic Derived from Virgin Olive Oil: A Review of the Beneficial Effects on Inflammatory Disease.* International Journal of Molecular Sciences, 2014. **15**(7): p. 12323-12334.
196. Andrewes, P., Busch, J.L.H.C., de Joode, T., Groenewegen, A., and Alexandre, H., *Sensory Properties of Virgin Olive Oil Polyphenols: Identification of Deacetoxy-ligstroside Aglycon as a Key Contributor to Pungency.* Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2003. **51**(5): p. 1415-1420.
197. Beauchamp, G.K., Keast, R.S.J., Morel, D., Lin, J.,Pika, J., Han, Q., Lee, C.-H., Smith, A.B. and Breslin, P.A.S., *Phytochemistry: Ibuprofen-like activity in extra-virgin olive oil.* Nature, 2005. **437**(7055): p. 45-46.
198. Caramia, G., Gori, A., Valli, E. and Cerretani, L., *Virgin olive oil in preventive medicine: From legend to epigenetics.* European Journal of Lipid Science and Technology, 2012. **114**(4): p. 375-388.
199. Cicerale, S., Breslin, P. A., Beauchamp, G. K., and Keast, R. S., *Sensory characterization of the irritant properties of oleocanthal, a natural anti-inflammatory agent in extra virgin olive oils.* Chemical Senses, 2009. **34**(4): p. 333-9.
200. Peyrot des Gachons, C., Uchida, K., Bryant, B., Shima, A., Sperry, J. B., Dankulich-Nagrudny, L., Tominaga, M., Smith, A. B., 3rd, Beauchamp, G. K., and Breslin, P. A., *Unusual pungency from extra-virgin olive oil is attributable to restricted spatial expression of the receptor of oleocanthal.* Journal of Neuroscience, 2011. **31**(3): p. 999-1009.
201. Karkoula, E., Skantzari, A., Melliou, E. and Magiatis, Prokopios, *Direct measurement of oleocanthal and oleacein levels in olive oil by quantitative 1H NMR. Establishment of a new index for the characterization of extra virgin olive oils.* Journal of agricultural and food chemistry, 2012. **60**(47): p. 11696-11703.
202. Iacono, A., Gómez, R., Sperry, J., Conde, J., Bianco, G., Meli, R., Gómez-Reino, J. J., Smith, A.B. and Gualillo, O., *Effect of oleocanthal and its derivatives on inflammatory response induced by lipopolysaccharide in a murine chondrocyte cell line.* Arthritis & Rheumatism, 2010. **62**(6): p. 1675-1682.
203. Pitt, J., Roth, W., Lacor, P., Blankenship, M., Velasco, P., De Felice, F., Breslin, P. and Klein, W. L., *Alzheimer's-associated Aβ oligomers show altered structure, immunoreactivity and synaptotoxicity with low doses of oleocanthal.* Toxicology and applied pharmacology, 2009. **240**(2): p. 189-197.

204. Li, W., Sperry, J.B., Crowe, A.,Trojanowski, J.Q., Smith Iii, A.B. and Lee, V.M.Y., *Inhibition of tau fibrillization by oleocanthal via reaction with the amino groups of tau.* Journal of Neurochemistry, 2009. **110**(4): p. 1339-1351.
205. Romero, C., Medina, E., Vargas, J., Brenes, M. and De Castro, A., *In Vitro Activity of Olive Oil Polyphenols against Helicobacter pylori.* Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2007. **55**(3): p. 680-686.
206. Estanove C., P.F., Allart J. C., and Saldmann F. , *Utilisation de l' oleocanthal dans le traitement de l' inflammation cutanee.* United States Patent Application, 2007.
207. Sauniere, J., *Compounds and derivatives for the treatment of medical conditions by modulating hormone-sensitive lipase activity.* United States Patent Application, 2007.
208. Lathe, G.H.a.R., C. R. J., *The separation of substances and estimation of their relative molecular sizes by the use of columns of starch in water.* Biochemical Journal, 1956. **62**(4): p. 665-674.
209. Lathe, G.H.a.R., C. R., *The separation of substances on the basis of their molecular weights, using columns of starch and water.* Biochemical Journal, 1955. **60**(4): p. xxxiv.
210. Moore, J.C., *Gel permeation chromatography. I. A new method for molecular weight distribution of high polymers.* Journal of Polymer Science Part A: General Papers, 1964. **2**(2): p. 835-843.
211. Gopaliya P. , K.R.P., Kamble R., Chauhan C.S., *A Review Article on Supercritical Fluid Chromatography.* International Journal of Pharma Research & Review, 2014. **3**(5): p. 59-66.
212. White, C.a.B., J., *Integration of supercritical fluid chromatography into drug discovery as a routine support tool. II. investigation and evaluation of supercritical fluid chromatography for achiral batch purification.* Journal of Chromatography A, 2005. **1074**(1-2): p. 175-85.
213. Kromaton, *Fast Centrifugal Partition Chromatography.* 2017.
214. REACH Devices, L., *How to set-up a flash chromatography silica column and actually succeed at separation.* 2010.
215. Terreaux, K.H.a.C., *Medium-pressure liquid chromatography.* 2000.
216. Boka, V.I., Argyropoulou, A., Gikas, E., Angelis, A., Aligiannis, N. and Skaltsounis, A.L., *Employment of High-Performance Thin-Layer Chromatography for the Quantification of Oleuropein in Olive Leaves and the Selection of a Suitable Solvent System for Its Isolation with Centrifugal Partition Chromatography.* Planta Medica, 2015. **81**(17): p. 1628-1635.
217. Kranz, P., Braun, N., Schulze, N., and Kunz, B., *Sensory quality of functional beverages: bitterness perception and bitter masking of olive leaf extract fortified fruit smoothies.* Journal of Food Science. **75**(6): p. S308-11.
218. Bazoti, F.N., Gikas, E. and Tsarbopoulos, A., *Simultaneous quantification of oleuropein and its metabolites in rat plasma by liquid chromatography electrospray ionization tandem mass spectrometry.* Biomedical Chromatography. **24**(5): p. 506-15.
219. Paiva-Martins, F.a.G., M.H., *Isolation and characterization of the antioxidant component 3,4-dihydroxyphenylethyl 4-formyl-3-formylmethyl-4-hexenoate from olive (Olea europaea) leaves.* Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2001. **49**(9): p. 4214-9.
220. Smith Iii, A.B., Sperry, J. B. and Han, Q., *Syntheses of (-)-oleocanthal, a natural NSAID found in extra virgin olive oil, the (-)-deacetoxy-oleuropein aglycone, and related analogues.* Journal of Organic Chemistry, 2007. **72**(18): p. 6891-6900.
221. Ramírez, E., Medina, E., Brenes, M., and Romero, C., *Endogenous Enzymes Involved in the Transformation of Oleuropein in Spanish Table Olive Varieties.* Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2014. **62**(39): p. 9569-9575.
222. A.A. Sobhy ES, H.M.E., M. Taha R. and A.M. Mohamed Z., *Effect of Harvesting in Different Ripening Stages on Olive (Olea europea) Oil Quality.* American Journal of Food Technology, 2016. **11**: p. 1-11.
223. Charoenprasert, S.a.M., A., *Factors Influencing Phenolic Compounds in Table Olives (Olea europaea).* Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2012. **60**(29): p. 7081-7095.
224. Kalua, C.M., Allen, M. S., Bedgood, D. R., Jr., Bishop, A. G. and Prenzler, P. D., *Discrimination of olive oils and fruits into cultivars and maturity stages based on phenolic and volatile compounds.* Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2005. **53**(20): p. 8054-62.

225. Vougogiannopoulou, K., Angelopoulou, M. T., Pratsinis, H., Grougnet, R., Halabalaki, M., Kletsas, D., Deguin, B. and Skaltsounis, L. A., *Chemical and Biological Investigation of Olive Mill Waste Water - OMWW Secoiridoid Lactones.* Planta Medica, 2015. **81**(12-13): p. 1205-12.
226. Di Giovacchino, L., Costantini, N., Serraiocco, A., Surricchio, G. and Basti, C., *Natural antioxidants and volatile compounds of virgin olive oils obtained by two or three-phases centrifugal decanters.* European Journal of Lipid Science and Technology, 2001. **103**(5): p. 279-285.
227. ElMekawy, A., Diels, L., Bertin, L., De Wever, H. and Pant, D., *Potential biovalorization techniques for olive mill biorefinery wastewater.* Biofuels, Bioproducts and Biorefining, 2014. **8**(2): p. 283-293.
228. Ganzenko, O., Huguenot, D., van Hullebusch, E. D., Esposito, G. and Oturan, M. A., *Electrochemical advanced oxidation and biological processes for wastewater treatment: a review of the combined approaches.* Environmental Science and Pollution Research, 2014. **21**(14): p. 8493-524.
229. Appels, L.a.D., R., *Biomass valorization to energy and value added chemicals: The future of chemical industry.* Resources, Conservation and Recycling, 2012. **59**: p. 1-3.
230. Inouye, H., and Nishioka, T., *U ber die monoterpenglucoside und verwandte naturstoffe - XIX.* Tetrahedron, 1972. **28**: p. 4231-4237.
231. LaLonde, R., Wong, C., and Tsai, A.IM, *Polygluosidic metabolites of Oleaceae. The chain sequence of oleoside aglucon, tyrosol, and glucose units in three metabolites from Fraxinus americana.* Journal of the American Chemical Society, 1976. **98**(10): p. 3007-3013.
232. Di Donna, L., Mazzotti, F., Napoli, A., Salerno, R., Sajjad, A. and Sindona, G., *Secondary metabolism of olive secoiridoids. New microcomponents detected in drupes by electrospray ionization and high-resolution tandem mass spectrometry.* Rapid Communications in Mass Spectrometry, 2007. **21**(3): p. 273-8.
233. Silva, S., Gomes, L., Leitão, F., Bronze, M., Coelho, A.V. and Boas, LV, *Secoiridoids in olive seed: characterization of nüzhenide and 11-methyl oleosides by liquid chromatography with diode array and mass spectrometry.* Grasas y Aceites, 2010. **61**(2): p. 8.
234. Bai, N., He, K., Ibarra, A., Bily, A., Roller, M., Chen, X., and Ruhl, R., *Iridoids from Fraxinus excelsior with adipocyte differentiation-inhibitory and PPARalpha activation activity.* Journal of Natural Products, 2010. **73**(1): p. 2-6.
235. Garcia-Villalba, R., Tomas-Barberan, F. A., Fanca-Berthon, P., Roller, M., Zafrilla, P., Issaly, N. and Garcia-Conesa, M. T., *Targeted and Untargeted Metabolomics to Explore the Bioavailability of the Secoiridoids from a Seed/Fruit Extract (Fraxinus angustifolia Vahl) in Human Healthy Volunteers: A Preliminary Study.* Molecules, 2015. **20**(12): p. 22202-19.
236. Ibarra, A., Bai, N., He, K., Bily, A., Cases, J., Roller, M. and Sang, S., *Fraxinus excelsior seed extract FraxiPure limits weight gains and hyperglycemia in high-fat diet-induced obese mice.* Phytomedicine, 2011. **18**(6): p. 479-85.
237. Visen, P., Saraswat, B., Visen, A., Roller, M., Bily, A., Mermet, C., He, K., Bai, N., Lemaire, B., Lafay, S. and Ibarra, A., *Acute effects of Fraxinus excelsior L. seed extract on postprandial glycemia and insulin secretion on healthy volunteers.* Journal of Ethnopharmacology, 2009. **126**(2): p. 226-32.
238. Góis Diogo, J.S., *Valorization of wild olives (Olea europaea var. sylvestris) as potential source of functional ingredients*. 2013: Faculdade de Ciências (FC), Dissertações de Mestrado.
239. Boskou, D. *Olive oil minor constitutents and health*. http://www.crcnetbase.com/isbn/9781420059946 2009; Available from.
240. Kochetkov, N.K., *Tetrahedron report number 218.* Tetrahedron, 1987. **43**(11): p. 2389-2436.
241. Kasuya, M., Sugita, H., Okuyama, K., Katsuraya, K., Hashimoto, K. and Hatanaka, K., *Facile Synthesis of beta (1→ 6)-Linked Gluco-Oligosaccharide Derivative.* Polymer Journal, 2002. **34**(8): p. 618-620.
242. Yu, H., and Chen, X., *Aldolase-Catalyzed Synthesis of β-d-Galp-(1→9)-d-KDN: A Novel Acceptor for Sialyltransferases.* Organic Letters, 2006. **8**(11): p. 2393-2396.
243. López, S.a.S., J., *Trifluoroacetic acid: Uses and recent applications in organic synthesis.* Journal of Fluorine Chemistry, 2013. **156**: p. 73-100.

244. Gagnaire, D.a.V., P. J.A., *Synthèse d'oligosaccharides sur polymère support.* Carbohydrate Research, 1973. **28**(1): p. 165-170.
245. Shi, T., Chen, H., Jing, L., Liu, X., Sun, X. and Jiang, R., *Development of a kilogram-scale synthesis of salidroside and its analogs.* Synthetic Communications, 2011. **41**(17): p. 2594-2600.
246. Srivastava, V., Tandon, A. and Ray, S., *Convenient and Selective Acetylations of Phenols, Amines and Alcohols.* Synthetic Communications, 1992. **22**(18): p. 2703-2710.
247. Koenigs, W.a.K., E., *Ueber einige Derivate des Traubenzuckers und der Galactose.* Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft, 1901. **34**(1): p. 957-981.
248. Wang, Z., *Helferich Glycosylation*, in *Comprehensive Organic Name Reactions and Reagents*. 2010, John Wiley & Sons, Inc.
249. Paul Krapcho, A. and E. Ciganek, *The Krapcho Dealkoxycarbonylation Reaction of Esters with α-Electron-Withdrawing Substituents*, in *Organic Reactions*. 2004, John Wiley & Sons, Inc.
250. Krapcho, A.P., Weimaster, J.F., Eldridge, J.M., Jahngen, E.G.E., Lovey, A.J. and Stephens, W.P., *Synthetic applications and mechanism studies of the decarbalkoxylations of geminal diesters and related systems effected in dimethyl sulfoxide by water and/or by water with added salts.* The Journal of Organic Chemistry, 1978. **43**(1): p. 138-147.
251. Smith, A.B., Sperry, J.B. and Han, Q., *Syntheses of (−)-Oleocanthal, a Natural NSAID Found in Extra Virgin Olive Oil, the (−)-Deacetoxy-Oleuropein Aglycone, and Related Analogues.* The Journal of Organic Chemistry, 2007. **72**(18): p. 6891-6900.
252. English, B.J.a.W., R.M., *Synthesis of (+/-)-Oleocanthal via a Tandem Intramolecular Michael Cyclization-HWE Olefination.* Tetrahedron letters, 2009. **50**(23): p. 2713-2713.
253. Takahashi, K., Morita, H. and Honda, T., *Formal synthesis of (−)-oleocanthal by means of a SmI2-promoted intramolecular coupling of bromoalkyne with α,β-unsaturated ester.* Tetrahedron Letters, 2012. **53**(26): p. 3342-3345.
254. Valli, M., Peviani, EG., Porta, A., D'Alfonso, A., Zanoni, G. and Vidari, G., *A concise and efficient total synthesis of oleocanthal.* European Journal of Organic Chemistry, 2013(20): p. 4332-4336.
255. Hanessian, S., Mainetti, E., and Lecomte, F., *Synthesis and Stereochemical Confirmation of the Secoiridoid Glucosides Nudiflosides D and A.* Organic Letters, 2006. **8**(18): p. 4047-4049.
256. Agalias, A., Magiatis, P., Skaltsounis, A. L., Mikros, E., Tsarbopoulos, A., Gikas, E., Spanos, I. and Manios, T., *A new process for the management of olive oil mill waste water and recovery of natural antioxidants.* Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2007. **55**(7): p. 2671-6.
257. Anastasiadi, M., Pratsinis, H., Kletsas, D., Skaltsounis, AL and Haroutounian, SA, *Bioactive non-coloured polyphenols content of grapes, wines and vinification by-products: Evaluation of the antioxidant activities of their extracts.* Food Research International, 2010. **43**(3): p. 805-813.
258. McMurry, J., *Οργανική Χημεία.* Cornell University, 2006. **II**: p. 1006-1007.
259. Nicholas, S.a.S., F., *Acetylation of Sugars.* Nature, 1948. **161**: p. 349-349.
260. Shen, Y.-C., S.-L. Lin, and C.-C. Chein, *Jaspolyside, a secoiridoid glycoside from Jasminum polyanthum.* Phytochemistry, 1996. **42**(6): p. 1629-1631.
261. Hanessian, S., E. Mainetti, and F. Lecomte, *Synthesis and Stereochemical Confirmation of the Secoiridoid Glucosides Nudiflosides D and A.* Organic Letters, 2006. **8**(18): p. 4047-4049.
262. Inanaga, J., Hirata, K., Saeki, H., Katsuki, T. and Yamaguchi, M., *A Rapid Esterification by Means of Mixed Anhydride and Its Application to Large-ring Lactonization.* Bulletin of the Chemical Society of Japan, 1979. **52**(7): p. 1989-1993.
263. Servili, M., Selvaggini, R., Esposto, S., Taticchi, A., Montedoro, G. and Morozzi, G., *Health and sensory properties of virgin olive oil hydrophilic phenols: agronomic and technological aspects of production that affect their occurrence in the oil.* Journal of Chromatography A, 2004. **1054**(1–2): p. 113-127.
264. Sivakumar, G., Briccoli Bati, C. and Uccella, N., *Demethyloleuropein and beta-glucosidase activity in olive fruits.* Biotechnology Journal, 2007. **2**(3): p. 381-5.
265. Romero-Segura, C., Sanz, C. and Perez, AG., *Purification and Characterization of an Olive Fruit β-Glucosidase Involved in the Biosynthesis of Virgin Olive Oil Phenolics.* Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2009. **57**(17): p. 7983-7988.

266. Medina, E., Brenes, M., Romero, C., García, A. and de Castro, A., *Main Antimicrobial Compounds in Table Olives.* Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2007. **55**(24): p. 9817-9823.
267. Chen, H., Huang, S-Q and Xie, J-Y, *A simple and efficient method for synthesis of fluorine-containing saccharide esters and antiviral activity.* Journal of Fluorine Chemistry, 2006. **127**(8): p. 1130-1136.
268. Paquette, L., Meister, PG, Friedrich, D. and Sauer, DR, *Enantioselective total synthesis of (-)-subergorgic acid.* Journal of the American Chemical Society, 1993. **115**(1): p. 49-56.
269. Saikia, L., Baruah, J.M. and Thakur, A.J., *A rapid, convenient, solventless green approach for the synthesis of oximes using grindstone chemistry.* Organic and Medicinal Chemistry Letters, 2011. **1**(1): p. 12.
270. Malpica, A., Calzadilla, M., Baumrucker, J., Jimenez, J., Lopez, L., Escobar, G. and Montes, C., *Kinetics and Mechanism for Oxime Formation from Pyridine-2-, -3-, and -4-carboxaldehydes.* The Journal of Organic Chemistry, 1994. **59**(12): p. 3398-3401.
271. Lin, J., Liao, S. and Hruby, V. J., *Syntheses of optically pure, conformationally constrained, and highly hydrophobic unusual amino acids: 2-amino-3, 3-diarylpropionic acids*.* The Journal of Peptide Research, 2005. **65**(1): p. 105-112.
272. Neises, B.a.S., W., *Simple Method for the Esterification of Carboxylic Acids.* Angewandte Chemie International Edition in English, 1978. **17**(7): p. 522-524.
273. Mourtzinos, I., et al., *Encapsulation of Olive Leaf Extract in β-Cyclodextrin.* Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2007. **55**(20): p. 8088-8094.
274. Boratyński, F., Kiełbowicz, G. and Wawrzeńczyk, C., *Lactones 34 [1]. Application of alcohol dehydrogenase from horse liver (HLADH) in enantioselective synthesis of δ- and ε-lactones.* Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 2010. **65**(1–4): p. 30-36.
275. Kara, S., Spickermann, D., Schrittwieser, JH, Weckbecker, A., Leggewie, C., Arends, I.W.C.E. and Hollmann, F., *Access to Lactone Building Blocks via Horse Liver Alcohol Dehydrogenase-Catalyzed Oxidative Lactonization.* ACS Catalysis, 2013. **3**(11): p. 2436-2439.
276. Lok, K.P., Jakovac, I.J. and Jones, J.B., *Enzymes in organic synthesis. 34. Preparations of enantiomerically pure exo- and endo-bridged bicyclic [2.2.1] and [2.2.2] chiral lactones via stereospecific horse liver alcohol dehydrogenase catalyzed oxidations of meso diols.* Journal of the American Chemical Society, 1985. **107**(8): p. 2521-2526.
277. Sofer, W.a.M., P.F., *Analysis of alcohol dehydrogenase gene expression in Drosophila.* Annual Review of Genetics, 1987. **21**: p. 203-25.
278. Negelein, E., Wulff, H.J. and Kaiser-Wilhelm-Institut für, Zellphysiologie, *Diphosphopyridinproteid, Alkohol, Acetaldehyd : Mit 12 Abb. im Text*. 1937, Berlin: Springer.
279. Bonnichsen, R.K.a.W., A.M., *Crystalline alcohol dehydrogenase from horse liver.* Archives of Biochemistry, 1948. **18**(2): p. 361-3.
280. Hayes, J.a.V., SF, *Yeast alcohol dehydrogenase: molecular weight, coenzyme binding, and reaction equilibria.* Journal of Biological Chemistry, 1954. **207**(1): p. 225-244.
281. Sigma, A., *Enzymatic Assay of Alcohol Dehydrogenase (EC 1.1.1.1).*
282. Boratynski, F., Smuga, M. and Wawrzenczyk, C., *Lactones 42. Stereoselective enzymatic/microbial synthesis of optically active isomers of whisky lactone.* Food Chemistry, 2013. **141**(1): p. 419-27.
283. Svendsen, A., *Lipase protein engineering.* Biochimica et Biophysica Acta, 2000. **1543**(2): p. 223-238.
284. Forssell, P., Parovuori, P., Linko, P. and Poutanen, K., *Enzymatic transesterification of rapeseed oil and lauric acid in a continuous reactor.* Journal of the American Oil Chemists Society, 1993. **70**(11): p. 1105-1109.
285. Hervert-Hernández, D., García, OP, Rosado, JL and Goñi, I., *The contribution of fruits and vegetables to dietary intake of polyphenols and antioxidant capacity in a Mexican rural diet: Importance of fruit and vegetable variety.* Food Research International, 2011. **44**(5): p. 1182-1189.

286. Nikolaivits, E., Termentzi, A., Skaltsounis, A.-L., Fokialakis, N., Topakas, E., *Enzymatic tailoring of oleuropein from Olea europaea leaves and product identification by HRMS/MS spectrometry.* Journal of Biotechnology, 2017. **253**: p. 48-54.
287. Samara, P., Christoforidou, N., Lemus, C., Argyropoulou, A., Ioannou, K., Vougogiannopoulou, K., Aligiannis, N., Paronis, E., Gaboriaud-Kolar, N.,Tsitsilonis, O. and Skaltsounis, AL, *New semi-synthetic analogs of oleuropein show improved anticancer activity in vitro and in vivo.* European Journal of Medicinal Chemistry, 2017. **137**(Supplement C): p. 11-29.
288. Kyriazis, I., Koutsoni, OS, Aligiannis, N., Karampetsou, K, Skaltsounis, AL and Dotsika, E., *The leishmanicidal activity of oleuropein is selectively regulated through inflammation- and oxidative stress-related genes.* Parasites & Vectors, 2016. **9**: p. 441.
289. Suman, G.a.J., K., *Application of human lymphocytes for evaluating toxicity of anti-cancer drugs.* International Journal of Pharmacology, 2006. **2**(4): p. 374-381.
290. Pourahmad, J.a.S., A., *Isolated Human Peripheral Blood Mononuclear Cell (PBMC), a Cost Effective Tool for Predicting Immunosuppressive Effects of Drugs and Xenobiotics.* Iranian Journal of Pharmaceutical Research : IJPR, 2015. **14**(4): p. 979-979.
291. Ioanou, K., Cheng, Kai F., Crich Low, GV., Birmpilis, AI, Lo Lis, EJ, Tsitsilonis, OE, Al-Abed, Y., *ISO-66, a novel inhibitor of macrophage migration inhibitory factor, shows efficacy in melanoma and colon cancer models.* International Journal of Oncology, 2014. **45**(4): p. 1457-1468.
292. Hamdi, H.K.a.C., R., *Oleuropein, a non-toxic olive iridoid, is an anti-tumor agent and cytoskeleton disruptor.* Biochemical and Biophysical Research Communications, 2005. **334**(3): p. 769-78.
293. Sepporta, M., Fuccelli, R., Rosignoli, P., Ricci, G., Servili, M., Morozzi, G. and Fabiani, R., *Oleuropein inhibits tumour growth and metastases dissemination in ovariectomised nude mice with MCF-7 human breast tumour xenografts.* Journal of Functional Foods, 2014. **8**: p. 269-273.
294. Boss, A., Bishop, K.S., Marlow, G., Barnett, M.P. and Ferguson, L.R., *Evidence to Support the Anti-Cancer Effect of Olive Leaf Extract and Future Directions.* Nutrients, 2016. **8**(8).
295. Betts, M.R., Brenchley, J.M., Price, D.A., De Rosa, S.C., Douek, D.C., Roederer, M. and Koup, R.A., *Sensitive and viable identification of antigen-specific CD8+ T cells by a flow cytometric assay for degranulation.* Journal of Immunological Methods, 2003. **281**(1-2): p. 65-78.
296. Qosa, H., Mohamed, L.A., Al Rihani, S.B., Batarseh, Y.S., Duong, Q.V., Keller, J.N. and Kaddoumi, A., *High-Throughput Screening for Identification of Blood-Brain Barrier Integrity Enhancers: A Drug Repurposing Opportunity to Rectify Vascular Amyloid Toxicity.* Journal of Alzheimer's Disease, 2016. **53**(4): p. 1499-516.
297. Towbin, H., Staehelin, T. and Gordon, J., *Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications.* Proceedings of the National Academy of Sciences, 1979. **76**(9): p. 4350-4.
298. Renart, J., Reiser, J. and Stark, G.R., *Transfer of proteins from gels to diazobenzyloxymethyl-paper and detection with antisera: a method for studying antibody specificity and antigen structure.* Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1979. **76**(7): p. 3116-3120.
299. Abuznait, A., Qosa, H., Mohamed, LA, Batarseh, YS and Kaddoumi, A., *Neuroprotective Effects of Extra-Virgin Olive Oil and its Components in Alzheimer's Disease*, in *Neuroprotective Effects of Phytochemicals in Neurological Disorders*. 2017, John Wiley & Sons, Inc. p. 299-315.
300. Center, M.C.S., *NSAID receptor responsible for olive oil's 'cough' and more.* Science Daily, 2011.
301. Schuhly, W., Hufner, A., Pferschy-Wenzig, E.M., Prettner, E., Adams, M., Bodensieck, A., Kunert, O., Oluwemimo, A., Haslinger, E. and Bauer, R., *Design and synthesis of ten biphenyl-neolignan derivatives and their in vitro inhibitory potency against cyclooxygenase-1/2 activity and 5-lipoxygenase-mediated LTB4-formation.* Bioorganic & Medicinal Chemistry, 2009. **17**(13): p. 4459-65.
302. Fiebich, B.L., Grozdeva, M., Hess, S., Hull, M., Danesch, U., Bodensieck, A. and Bauer, R., *Petasites hybridus extracts in vitro inhibit COX-2 and PGE2 release by direct interaction with the enzyme and by preventing p42/44 MAP kinase activation in rat primary microglial cells.* Planta Medica, 2005. **71**(1): p. 12-9.

303. Landa, P., Malik, J., Kokoska, L., Marsik, P. and Vanek, T., *In vitro inhibition of cyclooxygenase-2 catalyzed prostaglandin E2 production by plant-derived quinone compounds.* Planta Medica, 2009. **75**(09): p. PJ117.