



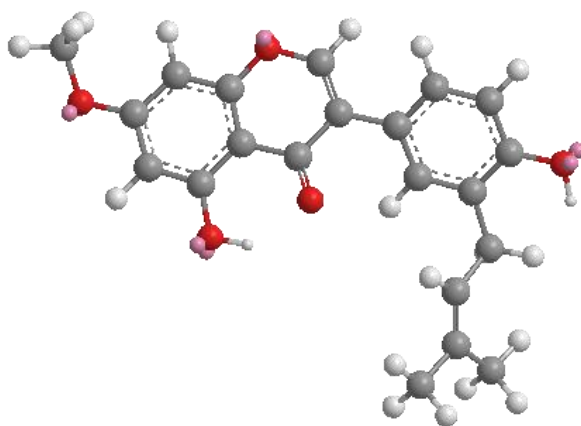
ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ

ΤΜΗΜΑ ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΗΣ

ΤΟΜΕΑΣ ΦΑΡΜΑΚΟΓΝΩΣΙΑΣ ΚΑΙ ΧΗΜΕΙΑΣ ΦΥΣΙΚΩΝ

ΠΡΟΙΟΝΤΩΝ

**ΣΧΕΔΙΑΣΜΟΣ ΚΑΙ ΣΥΝΘΕΣΗ ΑΝΑΛΟΓΩΝ
ΔΕΟΞΥΒΕΝΖΟΪΝΩΝ, ΔΙΪΔΡΟΣΤΙΛΒΕΝΙΩΝ ΚΑΙ
ΙΣΟΦΛΑΒΟΝΩΝ ΚΑΙ ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΤΗΣ
ΒΙΟΛΟΓΙΚΗΣ ΤΟΥΣ ΔΡΑΣΗΣ**



ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΔΙΠΛΩΜΑ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ

ΑΡΓΥΡΩ ΒΟΝΤΖΑΛΙΔΟΥ

Χημικός

Αθήνα 2011

ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΗΣ
ΤΟΜΕΑΣ ΦΑΡΜΑΚΟΓΝΩΣΙΑΣ ΚΑΙ ΧΗΜΕΙΑΣ ΦΥΣΙΚΩΝ ΠΡΟΙΟΝΤΩΝ
ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ-ΑΝΑΠΤΥΞΗ-ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΚΑΙ ΕΛΕΓΧΟΣ ΒΙΟΔΡΑΣΤΙΚΩΝ
ΦΥΣΙΚΩΝ ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ

ΤΙΤΛΟΣ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟΥ ΔΙΠΛΩΜΑΤΟΣ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ

**«ΣΧΕΔΙΑΣΜΟΣ ΚΑΙ ΣΥΝΘΕΣΗ ΑΝΑΛΟΓΩΝ ΔΕΟΞΥΒΕΝΖΟΪΝΩΝ,
ΔΙΪΔΡΟΣΤΙΛΒΕΝΙΩΝ ΚΑΙ ΙΣΟΦΛΑΒΟΝΩΝ ΚΑΙ ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΤΗΣ
ΒΙΟΛΟΓΙΚΗΣ ΤΟΥΣ ΔΡΑΣΗΣ»**

ΑΡΓΥΡΩ ΒΟΝΤΖΑΛΙΔΟΥ ΑΜ:2801-12

Χημικός

Επιβλέπον καθηγητής: Επίκουρος καθηγητής κ. Νεκτάριος Αληγιάννης

Τριμελής επιτροπή: Καθηγητής κ. Αλέξιος-Λέανδρος Σκαλτσούνης, Καθηγητής κ.
Βασίλειος Ρούσσης, και Επίκουρος Καθηγητής κ. Νεκτάριος Αληγιάννης

Αθήνα, 2011

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Θα ήθελα να ευχαριστήσω ιδιαίτερα :

- Τα μέλη της τριμελούς επιτροπής, τον καθηγητή κ. Αλέξιο-Λέανδρο Σκαλτσούνη, τον καθηγητή κ. Βασίλειο Ρούσση, και τον επίκουρο καθηγητή κ. Νεκτάριο Αληγιάννη, οι οποίοι δέχτηκαν να κρίνουν την παρούσα διπλωματική εργασία.
- Τον καθηγητή κ. Αλέξιο-Λέανδρο Σκαλτσούνη, για την ανάθεση του θέματος, τις συμβουλές του και το συνεχές ενδιαφέρον.
- Τον επιβλέποντα της παρούσας μεταπτυχιακής εργασίας επίκουρο καθηγητή κ. Νεκτάριο Αληγιάννη για τη συνεχή καθοδήγηση καθ' όλη τη διάρκεια της προσπάθειας αυτής, τις πολύτιμες συμβουλές του, την ευρεία παροχή γνώσεων, την ηθική υποστήριξη, κατανόηση και υπομονή του.
- Τον λέκτορα κ. Ζωΐδη Γρηγόρη, για την πολύτιμη βοήθεια, τις εύστοχες υποδείξεις, την άποψη συνεργασία και την ηθική υποστήριξη.
- Τον επίκουρο καθηγητή Τοπούζη Σταύρο, του τομέα Μοριακής Φαρμακολογίας του τμήματος Φαρμακευτικής του Πανεπιστημίου Πατρών, για την in vivo αξιολόγηση των ουσιών στα ενδοθηλιακά κύτταρα.
- Τον διδάκτορα κ. Λαμπρινίδη Γιώργο για τη θεωρητική μελέτη προσομοίωσης στον υποδοχέα οιστρογόνου.
- Την υποψήφια διδάκτορα κ. Μακροπούλου Μαρία και την υποψήφια διδάκτορα Χάιτα Ελίζα για την πραγματοποίηση των βιολογικών πειραμάτων αναστολής του ενζύμου τυροσινάσης και την επεξεργασία των αποτελεσμάτων.
- Τον διδάκτορα Κωστίδη Σαράντο, την διδάκτορα Αργυροπούλου Κατερίνα και την υποψήφια διδάκτορα Κουνάδη Τίνα για τη λήψη φασμάτων NMR.
- Την διδάκτορα Βουγογιανοπούλου Νάντια και τον διδάκτορα Nicolas Gaboriaud για τις συμβουλές τους και το ευχάριστο εργαστηριακό κλίμα.

- Τους συμφοιτητές και φίλους μου Σαπφώ, Βάνα, Κώστα, Αγγελική, τους μεταπτυχιακούς φοιτητές Νικητία και Αντιγόνη και όλους τους μεταπτυχιακούς και διδακτορικούς φοιτητές του εργαστηρίου για το ευχάριστο κλίμα, τη συμπαράσταση και το συνεχές ενδιαφέρον τους.

- Καθώς και την οικογένεια μου και τους φίλους μου για τη συνεχή στήριξη τους σε όλες τις επιλογές και αποφάσεις μου.

ΕΙΣΑΓΩΓΗ – ΣΚΟΠΟΣ **10**

1^ο ΚΕΦΑΛΑΙΟ – ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ **12****1.1 ΔΕΟΞΥΒΕΝΖΟΪΝΕΣ** **14**

1.1.1 ΦΥΣΙΚΑ ΑΝΑΛΟΓΑ ΔΕΟΞΥΒΕΝΖΟΪΝΩΝ 14

1.1.2 ΣΥΝΘΕΤΙΚΑ ΑΝΑΛΟΓΑ ΔΕΟΞΥΒΕΝΖΟΪΝΩΝ 16

1.1.2.Α ΣΥΝΘΕΤΙΚΕΣ ΠΑΡΑΣΚΕΥΕΣ ΔΕΟΞΥΒΕΝΖΟΪΝΩΝ 16

1.1.2.Β. ΒΙΟΛΟΓΙΚΕΣ ΔΡΑΣΕΙΣ 17

1.2 ΣΤΙΛΒΕΝΙΑ-ΔΙΪΔΡΟΣΤΙΛΒΕΝΙΑ **23**

1.2.1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ 23

1.2.2 ΔΡΑΣΕΙΣ-ΦΥΣΙΚΕΣ ΠΗΓΕΣ 24

1.2.3 ΣΥΝΘΕΤΙΚΕΣ ΠΑΡΑΣΚΕΥΕΣ ΣΤΙΛΒΕΝΙΩΝ-ΔΙΪΔΡΟΣΤΙΛΒΕΝΙΩΝ 35

1.2.3 ΣΥΝΘΕΤΙΚΕΣ ΠΑΡΑΣΚΕΥΕΣ ΣΤΙΛΒΕΝΙΩΝ-ΔΙΪΔΡΟΣΤΙΛΒΕΝΙΩΝ 35

1.2.3.Α ΣΥΝΘΕΤΙΚΕΣ ΠΑΡΑΣΚΕΥΕΣ ΣΤΙΛΒΕΝΙΩΝ 35

1.2.3.Β ΣΥΝΘΕΤΙΚΕΣ ΠΑΡΑΣΚΕΥΕΣ ΔΙΪΔΡΟΣΤΙΛΒΕΝΙΩΝ. 36

1.3 ΙΣΟΦΛΑΒΟΝΕΣ **38**

1.3.1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ 38

1.3.2. ΒΙΟΛΟΓΙΚΕΣ ΔΡΑΣΕΙΣ ΙΣΟΦΛΑΒΟΝΩΝ 40

1.3.3 ΣΥΝΘΕΤΙΚΕΣ ΠΑΡΑΣΚΕΥΕΣ ΙΣΟΦΛΑΒΟΝΩΝ 44

1.4. ΒΙΟΛΟΓΙΚΕΣ ΔΡΑΣΕΙΣ-ΣΤΟΧΟΙ **46**

1.4.1 ΟΙΣΤΡΟΓΟΝΙΚΟΤΗΤΑ 46

1.4.2 ΤΥΡΟΣΙΝΑΣΗ 49

1.4.3 ΑΓΓΕΙΟΓΕΝΕΣΗ 60

2^ο ΚΕΦΑΛΑΙΟ – ΠΡΟΣΩΠΙΚΑ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ **62****2.1 ΣΥΝΘΕΣΗ ΑΝΑΛΟΓΩΝ ΔΕΟΞΥΒΕΝΖΟΪΝΩΝ** **64**

2.1.1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ 64

2.1.2 ΣΥΝΘΕΣΗ ΔΕΟΞΥΒΕΝΖΟΪΝΩΝ 65

2.2 ΣΥΝΘΕΣΗ ΠΑΡΑΓΩΓΩΝ ΤΩΝ ΔΕΟΞΥΒΕΝΖΟΪΝΩΝ **67**

2.2.1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ 67

2.2.2 ΣΥΝΘΕΣΗ ΑΛΚΟΟΛΙΚΩΝ ΠΑΡΑΓΩΓΩΝ 68

2.2.3 ΣΥΝΘΕΣΗ ΔΙΪΔΡΟΣΤΙΛΒΕΝΙΩΝ 71

2.3 ΣΥΝΘΕΣΗ ΑΝΑΛΟΓΩΝ ΙΣΟΦΛΑΒΟΝΩΝ **74**

2.3.1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ 74

2.3.2 ΣΥΝΘΕΣΗ ΤΗΣ ΙΣΟΦΛΑΒΟΝΗΣ 75

2.4 ΒΙΟΛΟΓΙΚΕΣ ΔΡΑΣΕΙΣ **78**

2.4.1. ΜΕΛΕΤΗ ΠΡΟΣΔΕΣΗΣ ΑΝΑΛΟΓΩΝ ΜΕ ΥΠΟΔΟΧΕΑ ΟΙΣΤΡΟΓΟΝΩΝ 78

2.4.2 ΑΝΑΣΤΟΛΗ ΤΟΥ ΕΝΖΥΜΟΥ ΤΥΡΟΣΙΝΑΣΗΣ ΑΝΑΛΟΓΩΝ 81

2.4.2.Α ΜΕΛΕΤΗ ΠΡΟΣΔΕΣΗΣ ΜΕ ΤΟΝ ΥΠΟΔΟΧΕΑ ΤΥΡΟΣΙΝΑΣΗΣ. ΣΧΕΣΗ ΔΟΜΗΣ – ΔΡΑΣΗΣ 81

2.4.2.Β ΜΕΤΡΗΣΗ ΠΟΣΟΣΤΟΥ ΑΝΑΣΤΟΛΗΣ ΤΥΡΟΣΙΝΑΣΗΣ 86

2.4.3 ΑΓΓΕΙΟΓΕΝΕΣΗ	92
--------------------	----

3^ο ΚΕΦΑΛΑΙΟ – ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	96
---	-----------

3.1 ΓΕΝΙΚΑ (ΤΕΧΝΙΚΕΣ – ΟΡΓΑΝΟΛΟΓΙΑ)	98
--	-----------

3.2 ΣΥΝΘΕΣΗ ΤΩΝ ΔΕΟΞΥΒΕΝΖΟΪΝΩΝ	100
---------------------------------------	------------

3.2.1 ΣΥΝΘΕΣΗ ΤΗΣ 2,4,4'-ΤΡΙΪΔΡΟΞΥΔΕΟΞΥΒΕΝΖΟΪΝΗΣ, Η {1-(2,4-ΔΙΪΔΡΟΞΥΦΑΙΝΥΛ)-2-(4'-ΥΔΡΟΞΥΦΑΙΝΥΛ)-ΑΙΘΑΝΟΝΗΣ} (1)	100
--	-----

3.2.2 ΣΥΝΘΕΣΗ ΤΗΣ 4'-ΒΡΩΜΟ-2,4-ΔΙΪΔΡΟΞΥΔΕΟΞΥΒΕΝΖΟΪΝΗΣ Η {2(4-ΒΡΩΜΟΦΑΙΝΥΛΟ)-1-(2,4-ΔΙΪΔΡΟΞΥΦΑΙΝΥΛ)ΑΙΘΑΝΟΝΗΣ}. (2)	100
--	-----

3.2.3 ΣΥΝΘΕΣΗ ΤΗΣ 2,4-ΔΙΪΔΡΟΞΥ-4'-ΝΙΤΡΟΔΕΟΞΥΒΕΝΖΟΪΝΗΣ, Η {1-(2,4-ΔΙΪΔΡΟΞΥΦΑΙ-ΝΥΛΟ)- 2-(4-ΝΙΤΡΟΦΑΙΝΥΛ)--ΑΙΘΑΝΟΝΗΣ}(3)	101
--	-----

3.2.4 ΣΥΝΘΕΣΗ ΤΗΣ 2,4,4'-ΤΡΙΪΔΡΟΞΥ-5-ΧΛΩΡΟΔΕΟΞΥΒΕΝΖΟΪΝΗΣ, Η {1-(2,4-ΔΙΪΔΡΟΞΥ-5-ΧΛΩΡΟ-ΦΑΙΝΥΛ)-2-(4-ΥΔΡΟΞΥΦΑΙΝΥΛ)-ΑΙΘΑΝΟΝΗΣ}(4)	102
---	-----

3.2.5 ΣΥΝΘΕΣΗ ΤΗΣ 2,4-ΔΙΪΔΡΟΞΥ-5'-ΜΕΘΟΞΥΔΕΟΞΥΒΕΝΖΟΪΝΗΣ, Η {1-(2,4-ΔΙΪΔΡΟΞΥΦΑΙ-ΝΥΛΟ)-2-(4-ΜΕΘΟΞΥΦΑΙΝΥΛ)-ΑΙΘΑΝΟΝΗΣ}(5)	103
--	-----

3.2.6 ΣΥΝΘΕΣΗ ΤΗΣ 2,4,3',4'-ΤΕΤΡΑΪΔΡΟΞΥ-5-ΧΛΩΡΟΔΕΟΞΥΒΕΝΖΟΪΝΗΣ, Η {1-2,4-ΔΙΪΔΡΟΞΥ-5-ΧΛΩΡΟ-ΦΑΙΝΥΛ)-2-(3,4-ΥΔΡΟΞΥΦΑΙΝΥΛ)-ΑΙΘΑΝΟΝΗΣ(6)	104
--	-----

3.2.7 ΣΥΝΘΕΣΗ ΤΗΣ 2,4-ΔΙΪΔΡΟΞΥ-4'-ΦΘΟΡΟΔΕΟΞΥΒΕΝΖΟΪΝΗΣ Η 1-(2,4-ΥΔΡΟΞΥΦΑΙ-ΝΥΛΟ)- 2-(4-ΦΘΟΡΟΦΑΙΝΥΛ) -ΑΙΘΑΝΟΝΗΣ}. (7)	104
--	-----

3.2.8 ΣΥΝΘΕΣΗ ΤΗΣ 2,4-ΔΙΪΔΡΟΞΥ-2'-ΧΛΩΡΟΔΕΟΞΥΒΕΝΖΟΪΝΗΣ Η {1-(2,4-ΥΔΡΟΞΥΦΑΙΝΥΛΟ)- 2-2-ΧΛΩΡΟΦΑΙΝΥΛ)-ΑΙΘΑΝΟΝΗΣ}. (8)	105
--	-----

3.2.9 ΣΥΝΘΕΣΗ ΤΗΣ 2,4-ΔΙΪΔΡΟΞΥ-4'-ΧΛΩΡΟΔΕΟΞΥΒΕΝΖΟΪΝΗΣ Η {1-(2,4-ΥΔΡΟΞΥΦΑΙΝΥΛΟ)- 2-(4-ΧΛΩΡΟΦΑΙΝΥΛ)-ΑΙΘΑΝΟΝΗΣ}(9)	106
---	-----

3.2.10 ΣΥΝΘΕΣΗ ΤΗΣ 3'-ΒΡΩΜΟ-2,4-ΔΙΪΔΡΟΞΥΔΕΟΞΥΒΕΝΖΟΪΝΗΣ Η {2-(3-ΒΡΩΜΟΦΑΙΝΥΛ)-ΑΙΘΑΝΟΝΗΣ 1-(2,4-ΥΔΡΟΞΥΦΑΙΝΥΛ) ΑΙΘΑΝΟΝΗΣ}(10)	107
---	-----

3.2.11 ΣΥΝΘΕΣΗ ΤΗΣ 4,6,4'-ΤΡΙΜΕΘΟΞΥ-2-ΥΔΡΟΞΥΔΕΟΞΥΒΕΝΖΟΪΝΗΣ Η {1-(4,6-ΜΕΘΟΞΥ-2-ΥΔΡΟΞΥ ΦΑΙΝΥΛΟ)- 2-(4-ΜΕΘΟΞΥΦΑΙΝΥΛ)-ΑΙΘΑΝΟΝΗΣ}(11)	108
--	-----

3.3 ΣΥΝΘΕΣΗ ΔΙΪΔΡΟΣΤΙΛΒΕΝΙΩΝ	110
-------------------------------------	------------

3.3.1 ΣΥΝΘΕΣΗ ΤΟΥ 2,4,4'-ΤΡΙΪΔΡΟΞΥΔΙΪΔΡΟΣΤΙΛΒΕΝΙΟΥ Η {1-(2,4-ΔΙΪΔΡΟΞΥΦΑΙΝΥΛ)-2-(4-ΥΔΡΟΞΥΦΑΙΝΥΛ)-ΑΙΘΑΝΙΟΥ} (12)	110
--	-----

3.3.2 ΣΥΝΘΕΣΗ ΤΟΥ 2,4-ΔΙΪΔΡΟΞΥ-4'-ΜΕΘΟΞΥΔΙΪΔΡΟΣΤΙΛΒΕΝΙΟΥ {1-(2,4-ΔΙΪΔΡΟΞΥΦΑΙΝΥΛΟ)-2-(4-ΜΕΘΟΞΥΦΑΙΝΥΛ)-ΑΙΘΑΝΙΟΥ}. (13)	111
--	-----

3.3.3 ΣΥΝΘΕΣΗ ΤΟΥ 2,4-ΔΙΪΔΡΟΞΥ-4'ΦΘΟΡΟΔΙΪΔΡΟΣΤΙΛΒΕΝΙΟΥ Η {1-(2,4-ΥΔΡΟΞΥΦΑΙ-ΝΥΛ)- 2-(4-ΦΘΟΡΟΦΑΙΝΥΛ)-ΑΙΘΑΝΙΟΥ}. (14)	112
--	-----

3.3.4 ΣΥΝΘΕΣΗ ΤΟΥ 2,4-ΔΙΪΔΡΟΞΥ-2-ΧΛΩΡΟΔΙΪΔΡΟΣΤΙΛΒΕΝΙΟΥ Η {1-(2,4-ΥΔΡΟΞΥΦΑΙ-ΝΥΛΟ)- 2(2-ΧΛΩΡΟΦΑΙΝΥΛ)-ΑΙΘΑΝΙΟΥ}. (15)	112
--	-----

3.3.5 ΣΥΝΘΕΣΗ ΤΟΥ 4,6,4'-ΤΡΙΜΕΘΟΞΥ-2-ΥΔΡΟΞΥΔΙΪΔΡΟΣΤΙΛΒΕΝΙΟΥ Η {1-(2-ΥΔΡΟΞΥ-4,6-ΜΕΘΟΞΥΦΑΙΝΥΛΟ)- 2-(4-ΜΕΘΟΞΥΦΑΙΝΥΛ)-ΑΙΘΑΝΙΟΥ}. (16)	113
---	-----

3.3.6 ΣΥΝΘΕΣΗ ΤΟΥ 2,4-ΔΙΪΔΡΟΞΥΔΙΪΔΡΟΣΤΙΛΒΕΝΙΟΥ Η {1-(2-4-ΥΔΡΟΞΥΦΑΙΝΥΛΟ)- 2-(ΦΑΙΝΥΛ)-ΑΙΘΑΝΙΟΥ (17)	114
---	-----

3.4 ΣΥΝΘΕΣΗ ΙΣΟΦΛΑΒΟΝΗΣ	115
--------------------------------	------------

3.4.1 ΣΥΝΘΕΣΗ ΤΗΣ {5,7,4'-ΤΡΙΜΕΘΟΞΥΙΣΟΦΛΑΒΟΝΗΣ} (18)	115
--	-----

3.4.2 ΣΥΝΘΕΣΗ ΤΗΣ 5,4'-ΔΙΪΔΡΟΞΥ-7-ΜΕΘΟΞΥΙΣΟΦΛΑΒΟΝΗΣ (19)	115
--	-----

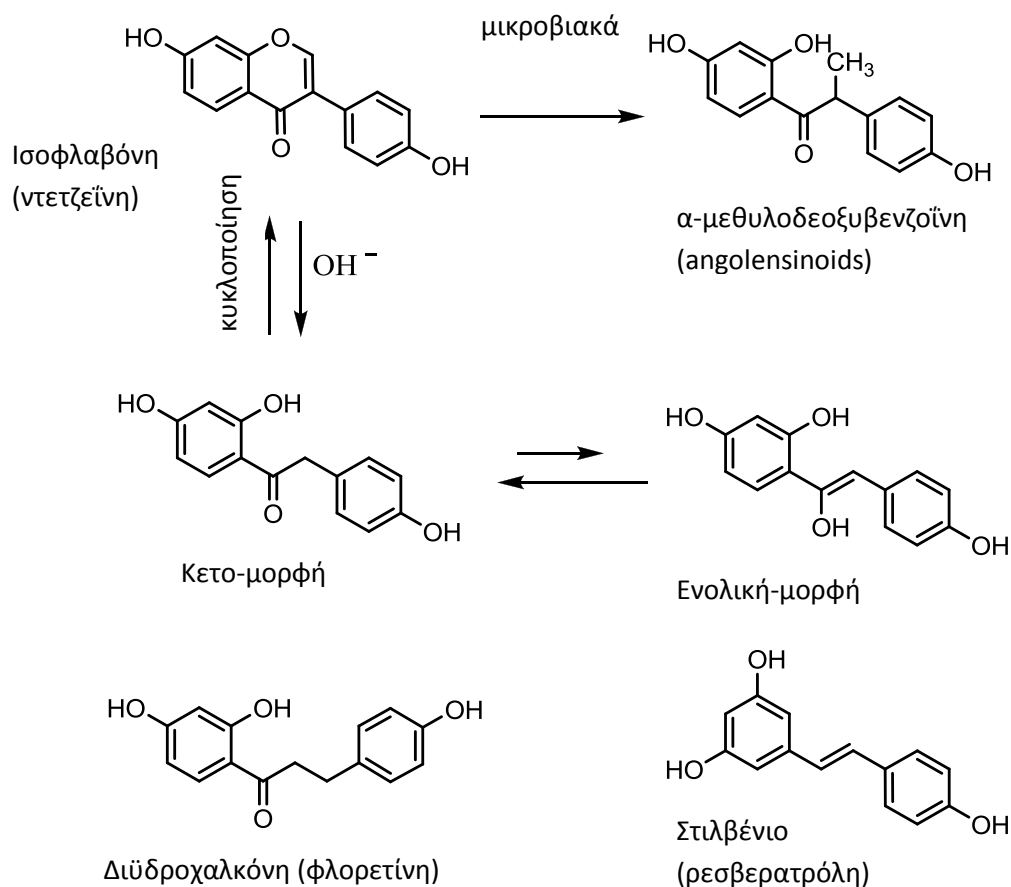
3.4.3 ΣΥΝΘΕΣΗ ΤΗΣ 7,5,4'-ΤΡΙΪΔΡΟΞΥΙΣΟΦΛΑΒΟΝΗΣ (20)	116
3.4.4 ΣΥΝΘΕΣΗ ΤΗΣ 5,7-ΔΙΜΕΘΟΞΥ-4'-ΥΔΡΟΞΥΙΣΟΦΛΑΒΟΝΗΣ (21)	117
3.4.5 ΣΥΝΘΕΣΗ ΤΟΥ 7-ΜΕΘΟΞΥ-5-ΥΔΡΟΞΥ-4'-ΙΣΟΦΛΑΒΟΝΥΛΟΠΡΕΝΥΛΑΙΘΕΡΑ (22)	117
3.4.6 ΣΥΝΘΕΣΗ ΤΟΥ 7-ΜΕΘΟΞΥ-5, 4'-ΙΣΟΦΛΑΒΟΝΥΛΟΔΙΠΡΕΝΥΛΑΙΘΕΡΑ (23)	118
3.4.7 ΣΥΝΘΕΣΗ ΤΟΥ 7-ΜΕΘΟΞΥ-5-ΥΔΡΟΞΥ-6-ΠΡΕΝΥΛΟ- 4' ΠΡΕΝΥΛΑΙΘΕΡΑ ΤΗΣ ΙΣΟΦΛΑΒΟΝΗΣ (24)	119
3.4.8 ΣΥΝΘΕΣΗ ΤΟΥ 7-ΜΕΘΟΞΥ-5-ΥΔΡΟΞΥ- 8-ΠΡΕΝΥΛΟ- 4' ΠΡΕΝΥΛΑΙΘΕΡΑ ΤΗΣ ΙΣΟΦΛΑΒΟΝΗΣ (25)	120
3.4.9 ΣΥΝΘΕΣΗ ΤΟΥ 7-ΜΕΘΟΞΥ-4'-ΥΔΡΟΞΥ- 5-ΠΡΕΝΥΛΑΙΘΕΡΑ ΤΗΣ ΙΣΟΦΛΑΒΟΝΗΣ (26)	120
3.4.10 ΣΥΝΘΕΣΗ ΤΗΣ 7-ΜΕΘΟΞΥ-5-ΥΔΡΟΞΥ-3'-(3-ΜΕΘΥΛΟΒΟΥΤ-3-ΕΝ-2-ΥΛ)ΙΣΟΦΛΑΒΟΝΗΣ (27)	121
3.4.11. ΣΥΝΘΕΣΗ ΤΗΣ 5,4'-ΔΙΪΔΡΟΞΥ-7-ΜΕΘΟΞΥ-3'-(3-ΜΕΘΥΛΟΒΟΥΤΕΝ-2-ΥΛ) ΙΣΟΦΛΑΒΟΝΗΣ (28).	122

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ-ΠΡΟΟΠΤΙΚΕΣ	124
--------------------------------	------------

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	126
---------------------	------------

ΕΙΣΑΓΩΓΗ – ΣΚΟΠΟΣ

Οι δεοξυβενζοΐνες, απαντώνται σε πλήθος χερσαίων φυτικών οργανισμών και παρουσιάζουν ιδιαίτερος ευρύ φάσμα βιολογικών δράσεων. Από χημικής πλευράς αποτελούν τα πρόδρομα μόρια σύνθεσης των ισοφλαβονών (Soidinsalo, 2007, Balasubramanian and, 2000, Balasubramanian et al., 2000) από τις οποίες αντίστοιχα μπορούν να παραχθούν μέσω μιας αλκαλικής υδρόλυσης, ενώ με βάση τη δομή τους, οι δεοξυβενζοΐνες θεωρούνται ανάλογα των διϋδροχαλκονών και των στυλβενίων (Ng et al., 2009). Σπανίως, συναντώνται κάποια φυσικά δεοξυβενζοϊνικά παράγωγα που θα μπορούσαν να προέρχονται από οξείδωση στυλβενίων και/ή από διάνοιξη του αρωματικού δακτυλίου σε συνδυασμό με μια αντίδραση αποκαρβοξυλίωσης των 3-φαινυλ-4-υδροξυ-κουμαρινικών παραγώγων (Ng et al., 2009, Monthakantirat et al., 2005, Magalhaes et al., 2006). Επίσης, οι δεοξυβενζοΐνες συνδέονται άμεσα με τις α-μεθυλοδεοξυβενζοΐνες (angolensinoids), οι οποίες είναι ένα από τα μεταβολικά παράγωγα των ισοφλαβονών που δημιουργούνται μέσω της μικροχλωρίδας του εντέρου (Ng et al., 2009, Yuan et al., 2007, Maarit).



Οι ισοφλαβόνες και τα στυλβένια (ρεσβερατρόλη) (Saiko et al., 2008, Goswami and Das, 2009) ανήκουν στην ευρύτερη ομάδα των φυτοοιστρογόνων, ενώ έχει αναφερθεί ότι παρουσιάζουν σημαντική αντιοξειδωτική, χημειοπροστατευτική και καρδιαγγειοπροστατευτική δράση. Οι διϋδροχαλκόνες (φλορετίνη) (Nakamura et al., 2003, Figtree et al., 2000) αλλά και οι χαλκόνες έχει επίσης αποδειχτεί πως αποτελούν πολύ ισχυρούς αντιοξειδωτικούς και αντιφλεγμονώδεις παράγοντες. Η ομοιότητα του σκελετού των δεοξυβενζοϊνών με τις προαναφερόμενες κατηγορίες ουσιών, οδήγησε στην εκτεταμένη μελέτη τους, από την οποία φάνηκε ότι οι δεοξυβενζοϊνες κατέχουν ιδιότητες παρόμοιες με τις ισοφλαβόνες, τις χαλκόνες και τα στυλβένια.

Κατά το παρελθόν η ερευνητική μας ομάδα έχει ασχοληθεί τόσο με τη σύνθεση αναλόγων δεοξυβενζοϊνών και την αξιολόγηση πιθανής οιστρογονικής τους δράσης (Fokialakis et al., 2004, Papoutsi et al., 2007) όσο και με την απομόνωση μεγάλου αριθμού παραγώγων διϋδροστυλβενίων και ισοφλαβονών από διάφορους φυτικούς οργανισμούς που έχουν μελετηθεί κατά διαστήματα. Η προϋπάρχουσα ερευνητική εμπειρία, το ιδιαίτερο χημικό ενδιαφέρον που παρουσιάζουν λόγω της δομικής τους αναλογίας και το έντονο βιολογικό τους προφίλ, αποτέλεσαν το έναυσμα για την πραγματοποίηση της παρούσας μεταπτυχιακής εργασίας. Σκοπός μας λοιπόν ήταν, η σύνθεση αναλόγων δεοξυβενζοϊνών, διϋδροστυλβενίων και ισοφλαβονών και η μελέτη της βιολογικής τους δράσης σε στόχους οι οιστρογονικοί υποδοχείς, το ένζυμο τυροσινάσης και ο μηχανισμός αγγειογένεση.

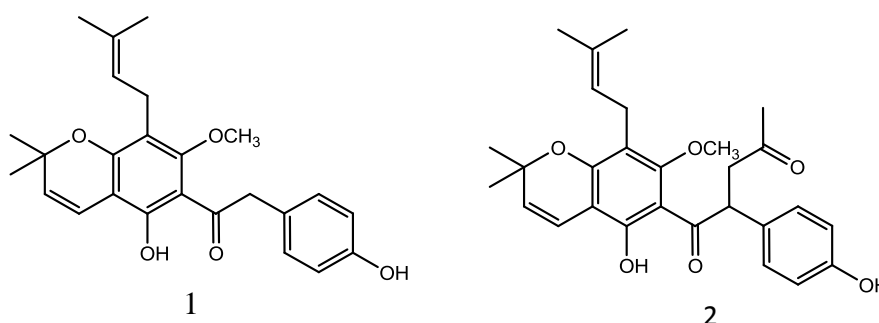
1^ο ΚΕΦΑΛΑΙΟ – ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1.1 ΔΕΟΞΥΒΕΝΖΟΪΝΕΣ

1.1.1 ΦΥΣΙΚΑ ΑΝΑΛΟΓΑ ΔΕΟΞΥΒΕΝΖΟΪΝΩΝ

Όπως αναφέρεται και στην εισαγωγή οι δεοξυβενζοΐνες αποτελούν μια πολύ ενδιαφέρουσα κατηγορία μορίων από χημικής και βιολογικής πλευράς. Στη φύση συναντώνται σε διάφορους φυτικούς οργανισμούς.

Από το φυτό *Deduelia hatschbachii* (της οικογένειας Leguminosae) απομονώθηκαν τα δεοξυβενζοϊνικά παράγωγα 1,2 (Magalhaes et al., 2001 and 2006)



από τα *Glycyrrhiza* sp. (Kiuchi et al., 1990), το *Trifolium subterraneum* (Beck et al., 1966), και το *Ononis spinosa*, έχουν



Glycyrrhiza glabra

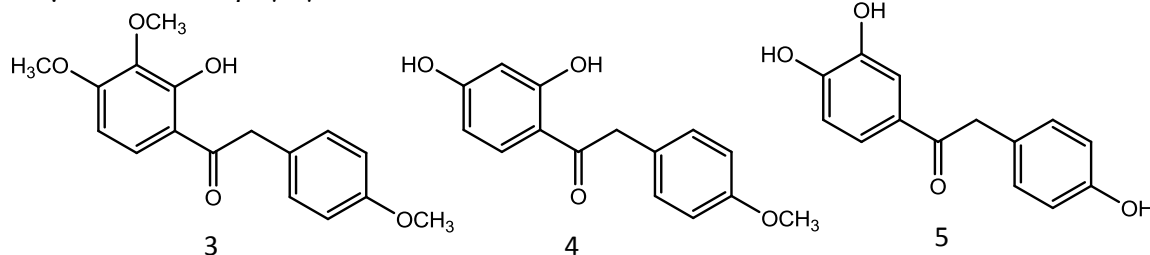


Trifolium subterraneum

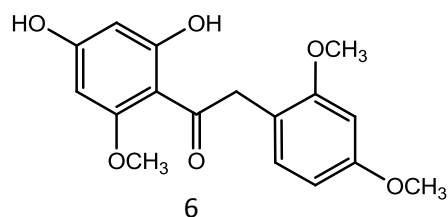


Ononis spinosa

απομονωθεί τα παράγωγα 3-5



Ενώ από το θαλάσσιο μαλάκιο *Nerita albicilla* η αλβιζοΐνη, 6 (Sanduja et al., 1985)



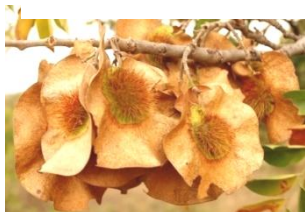
Nerita Albicilla



Pterocarpus angolensis

Από το φυτό *Pterocarpus angolensis* και το *P. Marsurium* (Barend et al., 1986) έχουν απομονωθεί α-μεθυλοδεοξυβενζοΐνες, μαζί με ισοφλανοειδή και διϋδροχαλκόνες, γεγονός που ενισχύει τη βιοσυνθετική συσχέτιση αυτών των φυσικών προϊόντων.

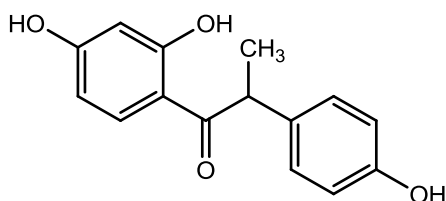
Αξίζει να σημειωθεί ότι σε ούρα ανθρώπων που καταλάωναν τροφές πλούσιες σε ισοφλαβονοειδή, όπως η



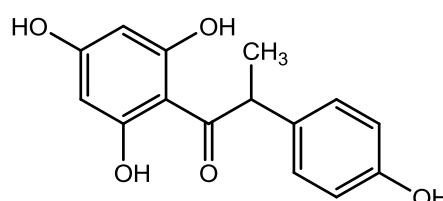
Pterocarpus marsurium

σόγια, έχουν ετνοπισθεί οι α-μεθυλοδεοξυβενζοΐνες (Yuan et al., 2007) η α-μεθυλο-2,4,4'-τριϋδροξυδεοξυβενζοΐνη (μεταβολικό προϊόν της ντετζεΐνης) και η α-μεθυλο-2,4,6,4'-

τετραυδροξυδεοξυβενζοΐνη, (μεταβολικό προϊόν της γενιστεΐνης).



7. α-μεθυλο-2,4,4'-τριϋδροξυδεοξυβενζοΐνη



8. α-μεθυλο-2,4,6,4'-τετραυδροξυδεοξυβενζοΐνη

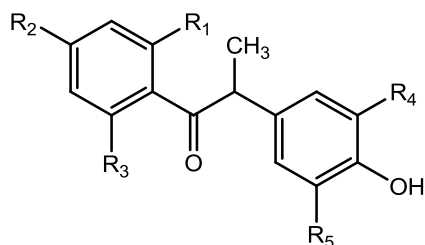
Επίσης, έχουν απομονωθεί και τα παρακάτω δεοξυβενζοΐνικά παράγωγα από ούρα ανθρώπων που καταλάωναν και σόγια και *red clover* (Maarit).



red clover



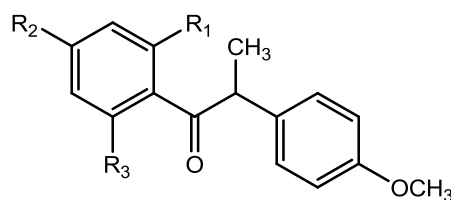
Soyabean plant



9. $R_1=R_2=R_4=OH, R_3=R_5=H$

10. $R_1=R_2=R_3=OH, R_4=R_5=H$

11. $R_1=R_2, R_3=R_4=H, R_5=OCH_3$



12. $R_1=R_2=OH, R_3=H$

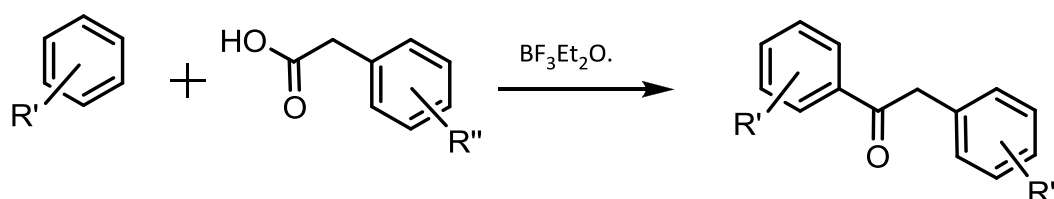
13. $R_1=R_2=R_3=OH$

1.1.2 ΣΥΝΘΕΤΙΚΑ ΑΝΑΛΟΓΑ ΔΕΟΞΥΒΕΝΖΟΪΝΩΝ

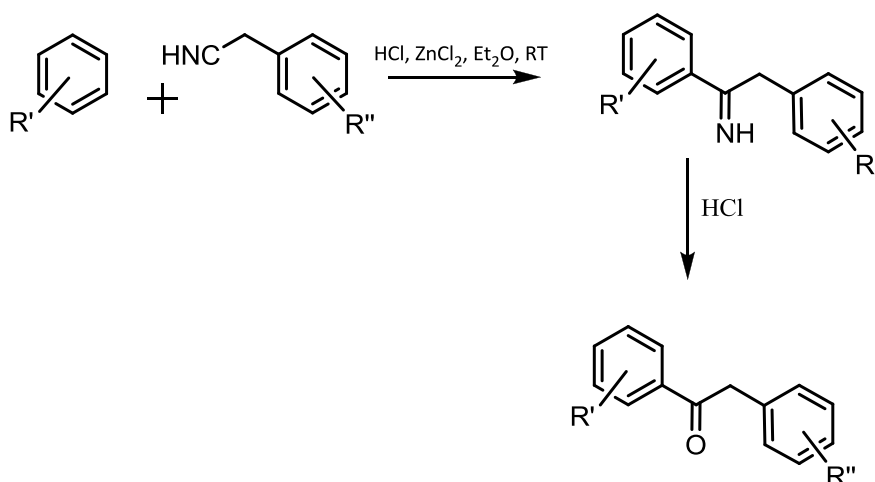
1.1.2.A ΣΥΝΘΕΤΙΚΕΣ ΠΑΡΑΣΚΕΥΕΣ ΔΕΟΞΥΒΕΝΖΟΪΝΩΝ

Η συνθετική παρασκευή των δεοξυβενζοϊνών στηρίζεται σε μια κλασική αντίδραση ηλεκτρονιόφιλης υποκατάστασης ανάμεσα σε

I. μια φαινόλη και ένα φαινυλοξικό οξύ (ακυλίωση Friedel-Crafts) ή



II. μια φαινόλη και ένα φαινυλονιτρίλιο (Houben-Hoesch reaction).



Για τη σύνθεση των δεοξυβενζοϊνικών παραγώγων που περιγράφονται στην παρούσα εργασία, χρησιμοποιήθηκε η αντίδραση ακυλίωσης Friedel-Crafts (Ng et al., 2009, Wahala and Hase 1991, Goto et al., 2009, Fokialakis et al., 2004) όπου το οξύ κατά Lewis BF₃-Et₂O αποτέλεσε και το διαλύτη της αντίδρασης. Η Friedel-Crafts συναντάται συχνότερα στη βιβλιογραφία σαν παρασκευαστική μέθοδος των δεοξυβενζοϊνών και φαίνεται να παρουσιάζει μεγαλύτερη ευκολία σε σχέση με την Houben-Hoesch. Ωστόσο σε περιπτώσεις που η απόδοση της αντίδρασης δεν είναι

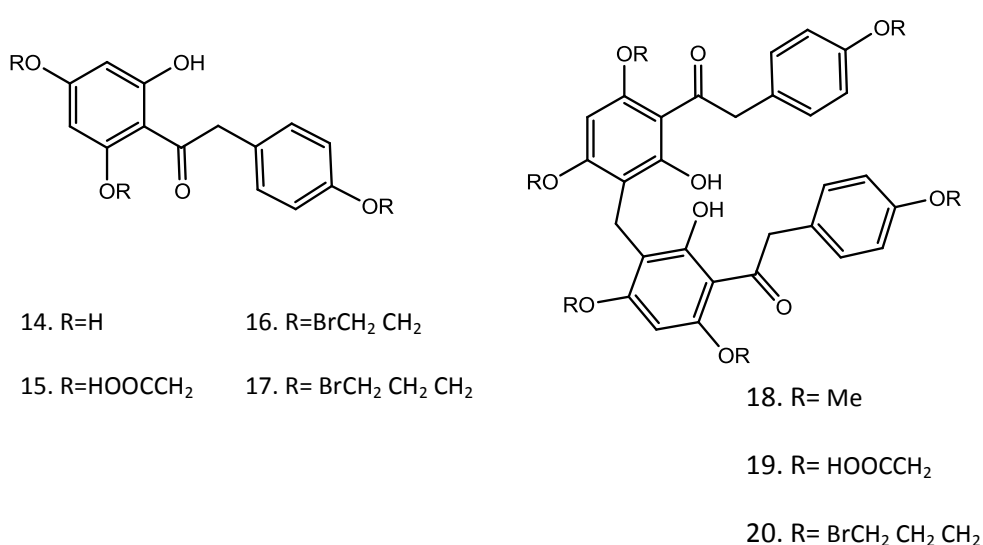
ιδιαίτερος υψηλή, ή η αντίδραση ακυλίωσης δεν οδηγεί στο σχηματισμό του επιθυμητού προϊόντος, συνήθως λόγω ύπαρξης πολλών υδροξυλομάδων ως υποκαταστάτες, εφαρμόζεται η αντίδραση Houben-Hoesch με αρκετά ικανοποιητικά αποτελέσματα (Balasubramanian et al., 2000, Ng et al., 2009).

1.1.2.B. ΒΙΟΛΟΓΙΚΕΣ ΔΡΑΣΕΙΣ

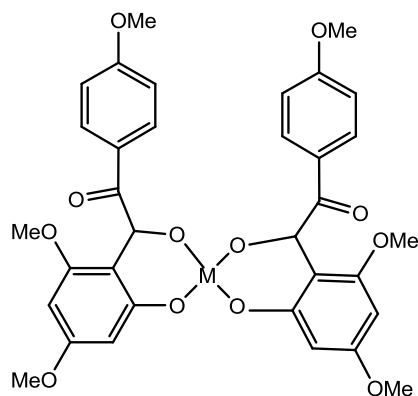
Οι βιολογικές δράσεις των δεοξυβενζοϊνών έχουν μελετηθεί κατά κύριο λόγο στα συνθετικά τους ανάλογα, λόγω της έλλειψης επαρκούς ποσότητας των φυσικών παραγώγων και της δυνατοτητας παρασκευής μεγάλου αριθμού αναλόγων με ποικίλους υποκαταστάτες.

Αντιβακτηριδιακή δράση

Η ανάγκη ανεύρεσης νέων αντιβακτηριδιακών παραγόντων και η γνωστή αντιβακτηριδιακή δράση των ισοφλαβονών και των στιλβενίων (δομικών αναλόγων των δεοξυβενζοϊνών) οδήγησε στη μελέτη της αντιβακτηριδιακής δράσης των δεοξυβενζοϊνών. Οι συνθετικές δεοξυβενζοΐνες (14-20) έδειξαν αντιμικροβιακή δράση στο *B. subtilis* και στην *E. Coli*, ενώ η δεοξυβενζοΐνη 20 εμφάνισε δράση ενάντια στο *B. subtilis* συγκρίσιμη με αυτή της πενικιλίνης η οποία χρησιμοποιείται ως ουσία αναφοράς. Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζουν τα διμερή (18-20) που εμφάνισαν καλύτερη δραστηριότητα από τις δεοξυβενζοΐνες καθιστώντας τα πολύ ελπιδοφόρους αντιβιοτικούς παράγοντες.



Αξίζει να σημειωθεί πως μελετήθηκαν και σύμπλοκα δεοξυβενζοϊνών με διάφορα στοιχεία μετάλλων (21-25) τα οποία έδειξαν αντιμικροβιακή δράση έναντι του *S. aureus* αλλά καθόλου δραστηριότητα έναντι στο *B. subtilis* και της *E. Coli* (Li et al., 2007).



21. M=Cu

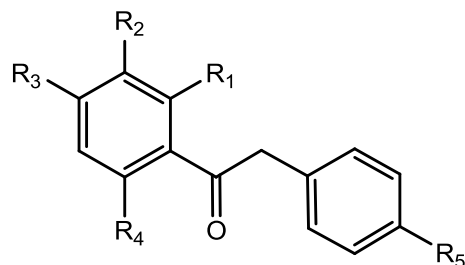
22. M=Ni

23. M=Co

24. M=Zn

25. M=Mn

Οι δεοξυβενζοϊνες που απεικονίζονται παρακάτω εμφάνισαν ικανοποιητική δράση κατά του βακτηρίου *Helicobacter pylori* (Χiao et al., 2007) αναστέλλοντας τη δράση του ενζύμου ουρεάση.



26. R₁=R₂=R₃=OH, R₄= R₅=H

27. R₂= R₃ =R₅=OH, R₁ =R₄=H,

28. R₂=R₃= OH, R₁=R₄ =R₅=H

29. R₁=R₂=R₃= R₅=OH, R₄=H

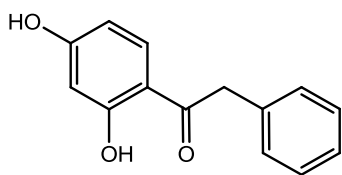
30. R₁=R₂=R₃=OH, R₄ =H, R₅=OCH₃

Αντιοξειδωτική δράση – Καρδιαγγειακή προστασία

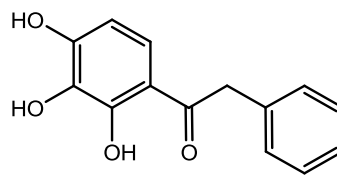
Τα φυσικά αντιοξειδωτικά θεωρείται πως προάγουν την υγεία καθώς προλαμβάνουν το οξειδωτικό στρες, και συνεισφέρουν στην αντιμετώπιση σοβαρών ασθενειών όπως οι βλάβες του νευρικού συστήματος, το άσθμα, οι καρδιαγγειακές ασθένειες ακόμη και περιπτώσεις καρκίνων.

Οι δεοξυβενζοϊνες, βάση μελετών, αποτελούν πολύ ισχυρά αντιοξειδωτικά (Goto et al., 2009). Για την ακρίβεια η αναγωγική ικανότητα της 2,3,4'-τριϋδροξυ-3-μεθοξυ-δεοξυβενζοϊνης είναι περίπου τριπλάσια αυτής του ασκορβικού οξέος (Lu et al., 2010).

Έχει παρατηρηθεί πως τα αντιοξειδωτικά είναι ικανά να προκαλούν χαλάρωση του λείου αγγειακού μυ του ενδοθηλίου, προκαλώντας την απελευθέρωση NO, γεγονός που συμβαίνει και μέσω της κατανάλωσης τροφών πλούσιων σε πολυφαινόλες. Επιπλέον, η ρεσβερατρόλη και κάποιες διϋδροχαλκόνες (πολύ γνωστά φυσικά αντιοξειδωτικά) έχει βρεθεί πως προάγουν την αγγειακή χαλάρωση μέσω του ενδοθηλίου. Έτσι, η δομική ομοιότητα των δεοξυβενζοϊνών με τα μόρια αυτά και η αποδεδειγμένη αντιοξειδωτική τους δράση, οδήγησε στη μελέτη ενός αριθμού συνθετικών δεοξυβενζοϊνών ως πιθανούς καρδιοαγγειοπροστατευτικούς παράγοντες. Τα αποτελέσματα έδειξαν πως οι δεοξυβενζοϊνες αποτελούν πολύ ισχυρούς αναστολείς της αγγειακής συστολής, που προκαλείται από KCl, από πειράματα σε στεφανιαίες αρτηρίες χοίρων. Πιο συγκεκριμένα, οι 2,4-διϋδροξυδεοξυβενζοϊνη και η 2,3,4-τριϋδροξυδεοβενζοϊνη έδειξαν την καλύτερη δράση ως προς την επαγωγή αρτηριακής χαλάρωσης, καλύτερη και από τη ρεσβερατρόλη (Lu et al., 2010).



31. 2,4-διϋδροξυδεοξυβενζοϊνη



32. 2,3,4-τριϋδροξυδεοβενζοϊνη

Από τη μελέτη των σχέσεων δομής-δράσης των δεοξυβενζοϊνών στην αγγειοδιασταλτική δράση παρατηρήθηκε πως για την εκδήλωση της δραστηριότητας είναι απαραίτητη η υδροξυ- υποκατάσταση στον Α δακτύλιο (απαραιτήτως στην-4-θέση) και μάλιστα με σειρά:

2,4-διϋδροξυ- υποκατάσταση > 2,4,5-τριϋδροξυ- υποκατάσταση > 2,3,4-τριϋδροξυ- υποκατάσταση > 3,4-διϋδροξυ- υποκατάσταση > 2,4,6-τριϋδροξυ- υποκατάσταση

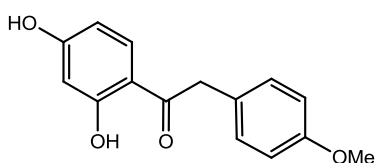
ενώ η υποκατάσταση του Β δακτυλίου δεν έδειξε κάποια ιδιαίτερη ενίσχυση δραστηριότητας. Η μόνη παρατήρηση είναι πως οι δεοξυβενζοϊνες με μεθόξυ υποκατάσταση στο Β δακτύλιο παρουσίασαν ελαφρώς καλύτερη δράση από αυτές με υδροξυ-υποκατάσταση. Επομένως η σειρά δραστηριότητας υποκαταστατών για το Β δακτύλιο είναι:

H > p-OMe > p-OH > o-OMe > m,p-diOMe > = m-OMe

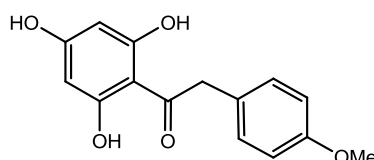
Αναστολείς της τυροσινάσης

Η δομική αναλογία των δεοξυβενζοϊνών με τη ρεσβερατρόλη, που είναι ένας πολύ αποτελεσματικός αναστολέας της τυροσινάσης, οδήγησε στη μελέτη των παραπάνω ως προς την ικανότητά τους να αναστέλλουν τη δράση του ενζύμου. Με σκοπό τη διεξαγωγή της μελέτης συντέθηκε ένα σύνολο δεοξυβενζοϊνών με διαφορετικές υποκαταστάσεις.

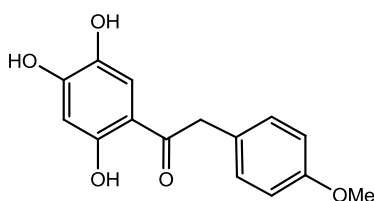
Ανασταλτική δράση έδειξαν οι δεοξυβενζοΐνες που στον Α δακτύλιο είχαν 2,4-διϋδροξυ υποκατάσταση (Ng et al., 2009). Το συμπέρασμα αυτό ταυτίζεται με την παραδοχή βάση της οποίας η ύπαρξη 2,4-διϋδροξυ- υποκατάστασης αποτελεί κριτήριο για την εκδήλωση ανασταλτικής δράσης της τυροσινάσης. (υποκεφάλαιο 1.4.2)



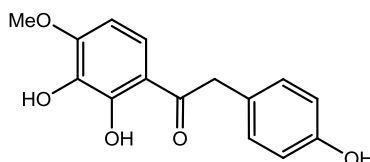
33. 2,4 διϋδροξυ-4'-μεθοξυδεοξυβενζοΐνη



34. 2,4,6-τριϋδροξυ-4'-μεθοξυδεοξυβενζοΐνη

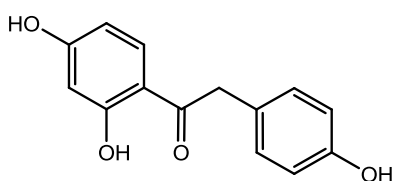


35. 2,4,5-τριϋδροξυ,4'-μεθοξυδεοξυβενζοΐνη

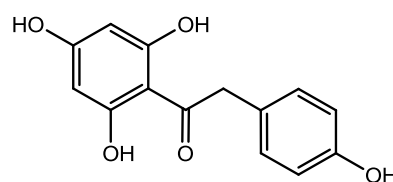


36. 2,3,4'-τριϋδροξυ-3-μεθοξυδεοξυβενζοΐνη

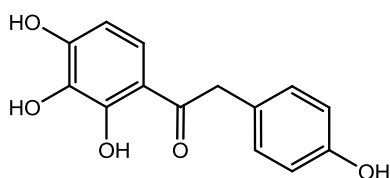
Αξίζει να σημειωθεί πως την ισχυρότερη δράση επέδειξε η 2,3,4'-τριϋδροξυ-3-μεθοξυδεοξυβενζοΐνη. Παρ'όλο που στην περίπτωση αυτή παρατηρούμε πως στο Β δακτύλιο υπάρχει 4'-υδροξυ υποκατάσταση, που παραπέμπει στη δομή της L-tyrosine, του υποστρώματος της τυροσινάσης, και λογικά θα αποδίδαμε την εκδήλωση δραστηριότητας σε αυτό το χαρακτηριστικό, παρόμοια συμπεριφορά δεν παρουσιάζουν τα μόρια: 2,4,4'-τριϋδροξυδεοξυβενζοΐνη, 2,4,6,4'-τετραϋδροξυδεοξυβενζοΐνη, 2,3,4,4'-τετραϋδροξυδεοξυβενζοΐνη.



37. 2,4,4'-τριϋδροξυ-δεόξυβενζοΐνη



38. 2,4,6,4'-τετραϋδροξυ-δεοξυβενζοΐνη



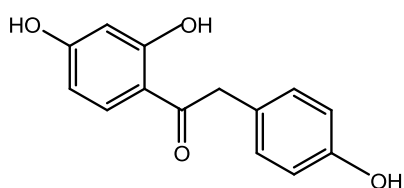
39. 2,3,4,4'-τετραυδροξυδεοξυβενζοΐνη

Ο μηχανισμός αναστολής της τυροσινάσης και οι παράγοντες που την προκαλούν αναφέρονται αναλυτικότερα στο κεφάλαιο 1.4.2.

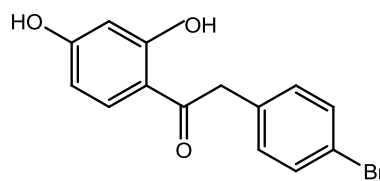
Οιστρογονικότητα

Τα φυτοοιστρογόνα είναι μόρια φυσικής προέλευσης, τα οποία έχουν την ιδιότητα να προσδένονται με τον οιστρογονικό υποδοχέα και να επηρεάζουν τη φυσιολογία πολλών οργανικών συστημάτων. Τα φυτοοιστρογόνα βάση μελετών ασκούν οιστρογονική δράση στο σκελετό, επηρεάζουν θετικά την καρδιαγγειακή λειτουργία, τα μετεμμηνοπαυσιακά συμπτώματα, δρουν βοηθητικά στην αντιμετώπιση της κατάθλιψης ενώ εμφανίζουν αντιοιστρογονική δράση στους ιστούς του μαστού και του προστάτη. Αυτό οδήγησε στην υπόθεση πως τα μόρια αυτά μπορούν να δράσουν σαν επιλεκτικοί τροποποιητές υποδοχέων οιστρογόνων και να χρησιμοποιηθούν θεραπευτικά για την πρόληψη διαφόρων ασθενειών, όπως ο καρκίνος του προστάτη και μαστού, την αντιμετώπιση των μετεμμηνοπαυσιακών συμπτωμάτων, και καρδιαγγειακών νοσημάτων.

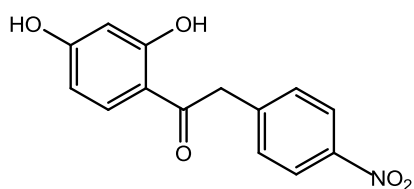
Η γνωστή φυτοοιστρογονική δράση των ισοφλαβονών και το γεγονός ότι οι δεοξυβενζοΐνες αποτελούν το ενδιάμεσο στάδιο στη σύνθεσή τους, οδήγησε στη μελέτη της φυτοοιστρογονικής δράσης των ανωτέρω με πολύ θετικά αποτελέσματα. Μελέτες σχέσης δομής-δράσης έδειξαν πως η σχετική χημική συγγένεια της 2,4,4'-τριυδροξυδεοξυβενζοΐνης με τον υποδοχέα ERβ είναι 15 φορές μεγαλύτερη της ντετζεΐνης, ενώ των 2,4-διυδροξυ-4'-φθοροδεοξυβενζοΐνης, 2,4-διυδροξυ-4'-νιτροδεοξυβενζοΐνης, 2,4-διυδροξυ-4'-χλωροδεοξυβενζοΐνης και της 2,4-διυδροξυ-4'-βρωμοδεοξυβενζοΐνης είναι σχετικά μέτρια (Fokialakis et al., 2004).



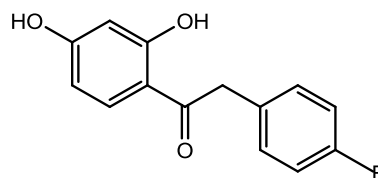
40. 2,4,4'-τριυδροξυδεοξυβενζοΐνη



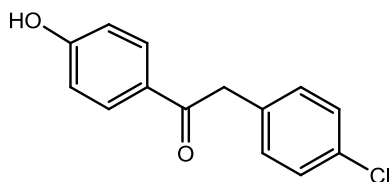
41. 2,4-διυδροξυ-4'-βρωμοδεοξυβενζοΐνη



42. 2,4-διϋδροξυ-4'-νιτροδεοξυβενζοΐνη



43. 2,4 -διϋδροξυ-4'-φθοροδεοξυβενζοΐνη



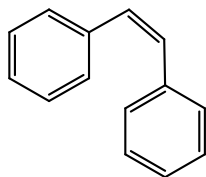
44. 2,4-διϋδροξυ-4'-χλωροδεοξυβενζοΐνη

Πιο συγκεκριμένα η 2,4-διϋδροξυ-4'-βρωμοδεοξυβενζοΐνη έδειξε αντιοιστρογονική δράση σε καρκινικά κύτταρα μαστού και οιστρογονική δράση σε οστεοβλάστες χωρίς όμως να προκαλεί ενεργοποίηση των ενδομητριακών κυττάρων (Papoutsi et al., 2007). Επομένως μπορεί να θεωρηθεί σαν πιθανός αντικαρκινικός παράγοντας κατά του καρκίνου του μαστού και σαν εναλλακτικό φάρμακο σε θεραπείες οιστρογονικής αποκατάστασης. Παρ' όλα αυτά απαιτούνται και in vivo μελέτες για να για να αποδειχτεί η αποτελεσματικότητά του ως αντιοστεοπορωτικός και αντικαρκινικός παράγοντας.

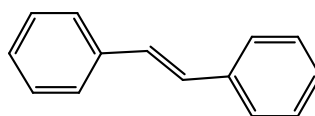
1.2 ΣΤΙΛΒΕΝΙΑ-ΔΙΪΔΡΟΣΤΙΛΒΕΝΙΑ

1.2.1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ

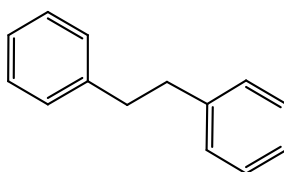
Αυτές οι ομάδες μορίων συναντώνται σε πλήθος φυσικών πηγών, στα βρυόφυτα, στα περιδόφυτα και στα ανώτερα φυτά και είναι πολύ εντυπωσιακό το ευρύτατο φάσμα βιολογικών δράσεων που παρουσιάζουν. Τα στιλβένια αποτελούνται από δύο αρωματικούς δακτυλίους ενωμένους με δύο άτομα άνθρακα που συνδέονται με διπλό δεσμό μεταξύ τους και εμφανίζουν *-cis* ή *-trans* ισομέρεια, ενώ τα διϋδροστιλβένια αποτελούνται από δύο αρωματικούς δακτυλίους που ενώνονται με μια απλή αλυσίδα δύο ατόμων άνθρακα. Είναι πολύ κοντινές ομάδες μορίων, καθώς τα διϋδροστιλβένια προκύπτουν από τα στιλβένια με μια απλή αντίδραση αναγωγής, και μελετώνται μαζί γιατί παρουσιάζει ενδιαφέρον η μεταξύ τους σύγκριση όσον αφορά στη βιολογική τους δραστηριότητα.



cis-στιλβένια



trans-στιλβένια

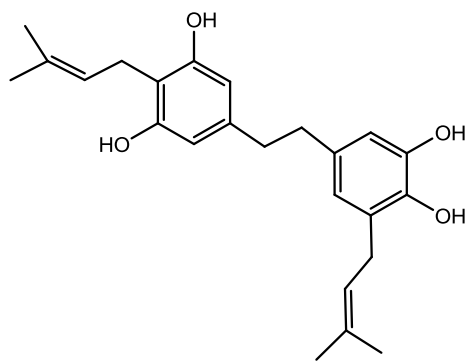


Διϋδροστιλβένια

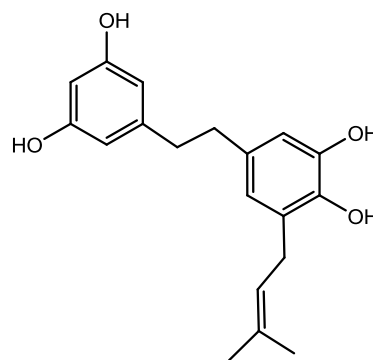
1.2.2 ΔΡΑΣΕΙΣ-ΦΥΣΙΚΕΣ ΠΗΓΕΣ

Αντιοξειδωτική δράση

Η *Glycyrrhiza glabra* είναι από τα αρχαιότερα και τα πιο διαδεδομένα φαρμακευτικά φυτά σε ανατολή και δύση. Ενώ η ρίζα του φυτού είναι ευρέως μελετημένη το ενδιαφέρον για τα υπέργεια τμήματα του φυτού ξεκίνησε όταν εκχυλίσματα των φύλλων του, έδειξαν ιδιαίτερα έντονη αντιοξειδωτική, αντιϊική και αντιμικροβιακή δράση, οι οποίες αποδίδονται στα φλαβονοειδή και τα διβενζυλικά παράγωγα που περιέχουν αυτά (Siracusa et al., 2001). Τα φύλλα φάνηκαν ιδιαίτερα πλούσια σε διϋδροστιλβένια, τα οποία αφού απομονώθηκαν, δοκιμάστηκαν για την αντιοξειδωτική τους δράση η οποία αποδείχτηκε ιδιαίτερος ισχυρή με κυριότερους εκπροσώπους το 3,5,3',4'-τετραυδροξυ-4,5'-δισοπεντυλ-διϋδροστιλβένιο και το 3,5,3',4'-τετραυδροξυ-5'-ισοπεντυλοδιϋδροστιλβένιο (Biondi et al., 2003 and 2005, Hayashi et al., 2003).

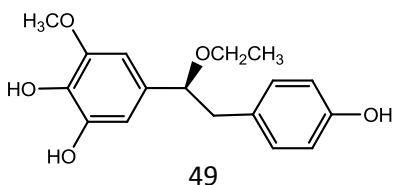
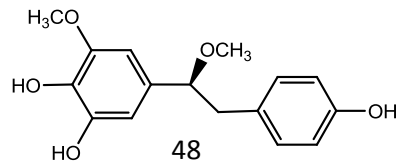
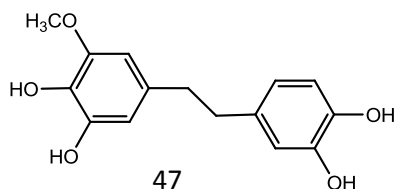


3,5,3',4'-τετραυδροξυ-4,5'-
δισοπεντυλοδιϋδροστιλβένιο, 45

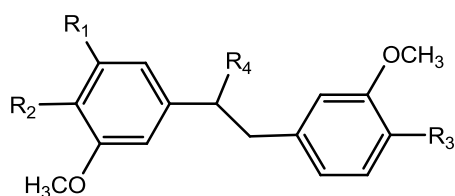


3,5,3',4'-τετραυδροξυ-5'-
ισοπεντυλοδιϋδροστιλβένιο, 46

Είδη του γένους *Dendrobium* (Orchidaceae) επίσης χρησιμοποιούνται χρόνια στην κινεζική ιατρική ως αντιπυρετικά και τονωτικά του ανοσοποιητικού συστήματος και σε καρδιαγγειακές ασθένειες. Γενικότερα η ευεργετική του δράση αποδίδεται στις αντιοξειδωτικές του ιδιότητες. Από το *Dendrobium candidum* έχουν απομονωθεί αρκετά διϋδοστιλβένια και παράγωγά τους, στα οποία αποδίδεται πολύ έντονη αντιοξειδωτική δράση, με το (49) να εμφανίζει την ισχυρότερη (Li et al., 2009).



Από το *Dendrobium nobile* τα διϋδροστιλβένια που απομονώθηκαν έδειξαν αντιοξειδωτική δράση σχεδόν ίση και σε κάποιες περιπτώσεις καλύτερη από αυτή της βιταμίνης C (Zhang et al., 2007).



50. $R_1=OCH_3, R_2=R_3=R_4=OH$, nobilin D

51. $R_1=R_2=OCH_3, R_3=OH, R_4=H$

52. $R_1=R_3=OCH_3, R_2=OH, R_4=H$

53. $R_1=OCH_3, R_2=R_3=OH, R_4=H$



Dendrobium nobile

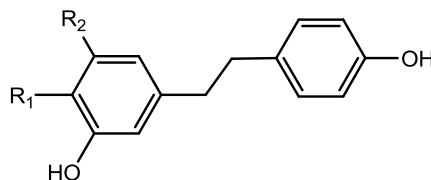
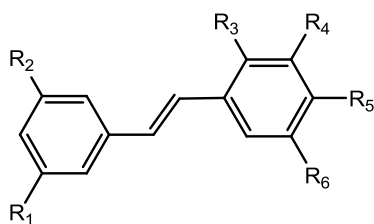
Αντιφλεγμονώδης δράση

Το *Pholidota chinesis* (Orchidaceae) χρησιμοποιείται για την αντιμετώπιση της χρόνιας βρογχίτιδας, των πονόδοντων, της ρευματοειδούς αρθρίτιδας και την αντιμετώπιση του έλκους, δράσεις που οφείλονται στις αντιφλεγμονώδεις ιδιότητες του φυτού (Wang et al., 2006). Έπειτα από μελέτες διαπιστώθηκε πως το αιθανολικό εκχύλισμα του φυτού, έδειξε ισχυρή αναστολή στην παραγωγή NO από τα μακροφάγα, η παραγωγή των οποίων παίζει ρόλο κλειδί στη διαδικασία της φλεγμονής, και η φυτοχημική ανάλυση έδειξε πως το αποτέλεσμα αυτό οφείλεται στην ύπαρξη



Pholidota chinesis

στιλβενίων και διϋδροστιλβενίων. Και οι δύο ομάδες μορίων έδειξαν ισχυρή αναστολή παραγωγής NO, ανάλογη της κερκετίνης, ενώ στην μελέτη της αντιοξειδωτικής δράσης, ισχυρότερη δράση παρουσίασαν τα στιλβένια.



ΣΤΙΛΒΕΝΙΑ

54. $R_1=OH, R_3=OCH_3, R_4=H, R_5=OH, R_6=R_7=H$

55. $R_1=OH, R_3=R_4=R_5=OCH_3, R_6=R_7=H$

56. $R_1=R_3=R_6=OH, R_4=R_5=R_7=H$

57. $R_1=R_5=OH, R_3=R_4=OCH_3, R_6=R_7=H$

ΔΙΪΔΡΟΣΤΙΛΒΕΝΙΑ

58. $R_1=H, R_2=OCH_3$

59. $R_1=OCH_3, R_2=H$

Αντιμικητιασική δράση-Αντιβακτηριδιακή δράση

Στο γένος *Stemona* συναντούμε περίπου 25 είδη μεταξύ των οποίων τα *S. tuberosa*, *S. japonica*, *S. sessifolia*, *S. collinsae* κ.ά. Η χρήση των φυτών αυτών είναι πολύ διαδεδομένη για την αντιμετώπιση αναπνευστικών

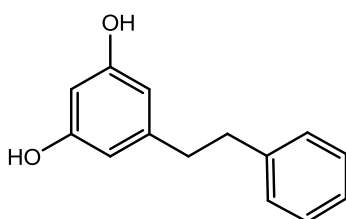


Stemona Tuberosa

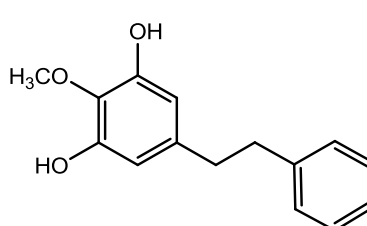


Stemona Japonica

προβλημάτων, της φυματίωσης, της βρογχίτιδας, ακόμη και των παρασίτων. Είναι ιδιαίτερα πλούσιο σε στιλβενοειδή και κυρίως διϋδροστιλβένια, στα οποία αποδίδεται κατά κύριο λόγο η αντιμικητιασική και αντιμικροβιακή δράση του φυτού. Ιδιαίτερα ισχυρή αντιμικητιασική δράση παρουσιάζουν τα φυσικά διϋδροστιλβένια που απομονώθηκαν από το φυτό *Stemona cf. pierrei* (αλλά τα συναντούμε σε όλο το γένος *Stemona*).

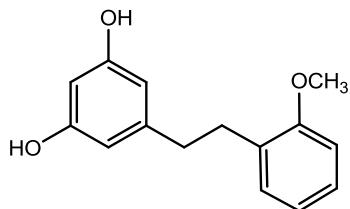


Διϋδροπινουσλβίνη, 60

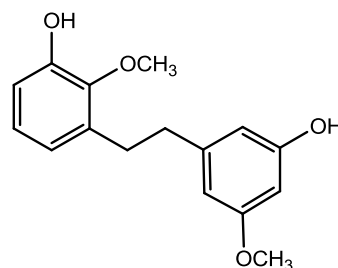


Στιλβοστεμίνη B, 61

Επίσης, τα διϋδροστιλβένια 3,5 διϋδροξυ-2'-μεθοξυδιβενζύλιο και 3,3'-διϋδροξυ-2-5'-διμεθοξυδιβενζύλιο που απομονώθηκαν από το *S. japonioca*, έδειξαν πολύ ισχυρή δράση έναντι του μύκητα *C. Albicans*. (Zhang et al., 2007, Pacher et al., 2002, Yang et al., 2006 and 2007, Kostecki et al., 2004).

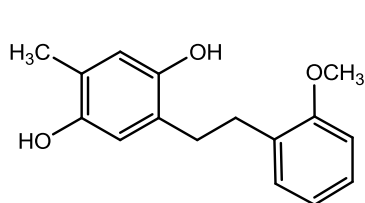


62. 3,5 διϋδροξυ-2'-μεθοξυδιβενζύλιο

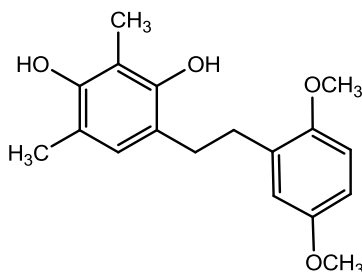


63. 3,3'-διϋδροξυ-2-5'-διμεθοξυδιβενζύλιο

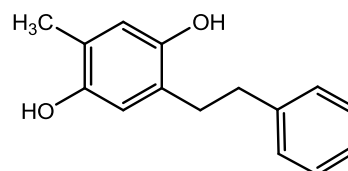
Διϋδροστιλβένια που έχουν απομονωθεί από το *S.japonioca* και το *S. tuberosa* έδειξαν πολύ ισχυρή αντιβακτηριδιακή δράση κατά του *Staphylococcus epidermidis* και του *Staphylococcus aureus*. (Lin et al., 2008, Yang et al., 2006)



64. 2,4-διϋδροξυ-2'-μεθοξυ-4μεθυλοδιβενζύλιο

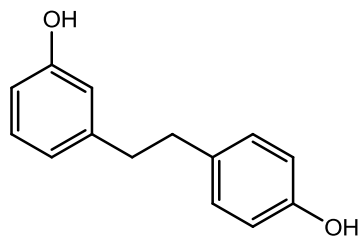


65. 2,4-διϋδροξυ-2'-5'-μεθοξυ-3-5-μεθυλοδιβενζύλιο



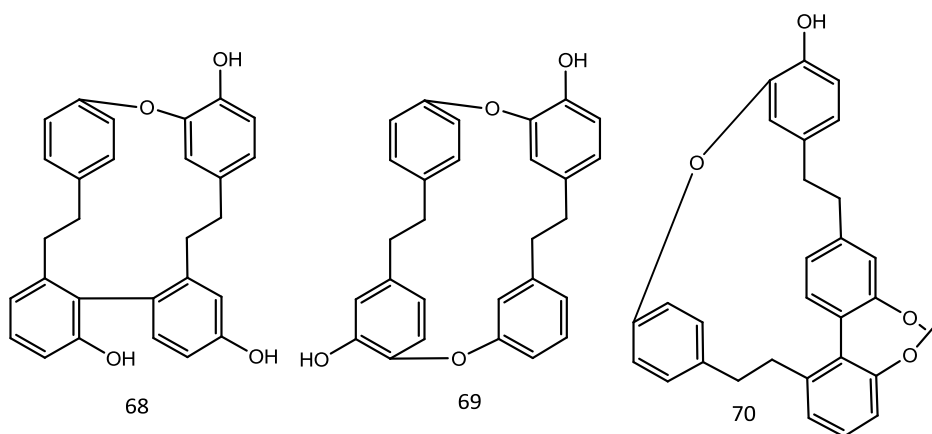
66. 2,4-διϋδροξυ-5-μεθυλοδιβενζύλιο

Παρόμοιες δράσεις επίσης παρουσιάζουν το διϋδροστιλβένιο από τη *Lunularia cruciata* το οποίο είναι γνωστό ως λουνουλαρικό οξύ (lunularic acid) (Hashimoto et al., 1988).

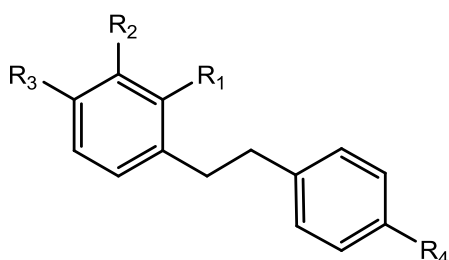


Lunularic acid 67

και διϋδροστιλβένια από τη *Marchantia polymorpha* της οποίας η αντιμυκητιασική και αντιβακτηριδιακή δράση αποδίδεται σε διμερή διβενζυλικών παραγώγων (Chong et al., 2006).



Επίσης ιδιαίτερα ισχυρή αντιβακτηριδιακή δράση έναντι του *Helicobacter pylori*, έδειξαν τα παρακάτω συνθετικά διϋδροστιλβενικά παράγωγα (Xia et al., 2010).



- 71. $R_1 = R_2 = R_3 = R_4 = \text{OH}$
- 72. $R_1 = \text{H}, R_2 = R_3 = R_4 = \text{OH}$
- 73. $R_1 = \text{H}, R_2 = R_3 = \text{OH}, R_4 = \text{Cl}$
- 74. $R_1 = \text{H}, R_2 = R_3 = \text{OH}, R_4 = \text{F}$

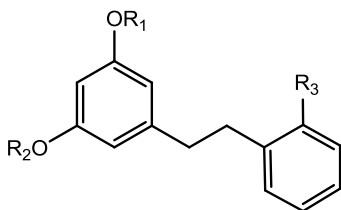
Αναστολείς ανάπτυξης-φυτοαλεξίνες

Οι φυτοαλεξίνες, είναι ουσίες που παράγουν τα φυτά όταν αυτά προσβληθούν από παθογόνους μικροοργανισμούς (μύκητες), με σκοπό την προστασία τους από τον «εισβολέα». Παίζουν ρόλο «κλειδί» στην άμυνα των φυτών καθώς χρησιμοποιούνται για να σταματήσουν την ανάπτυξη των παθογόνων οργανισμών. Η σημαντικότερη κατηγορία φυτοαλεξινών μέχρι και σήμερα είναι τα στιλβένια και τα διϋδροστιλβένια, ενώ σημαντικότεροι εκπρόσωποι αυτής της κατηγορίας εντοπίζονται κυρίως στο γένος *Dioscorea* (Cline et al., 1989, Adeanya et al., 1988, Fagboun et al., 1987, Fritzemeier and Kindl, 1983).



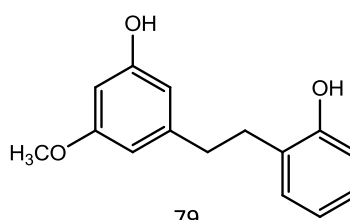
Dioscorea Batatas

Dioscorea batatas



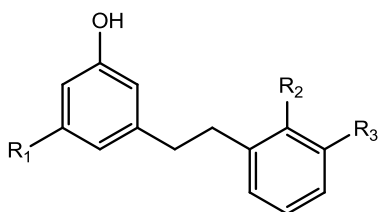
- 75. $R_1=R_2=R_3=H$ (dihydropininsylvin)
- 76. $R_1=R_3=H$, $R_2=CH_3$
- 77. $R_1=H$, $R_2=CH_3$, $R_3=OH$ (batatasin IV)
- 78. $R_1=R_2=CH_3$, $R_3=OH$

Dioscorea rotunda



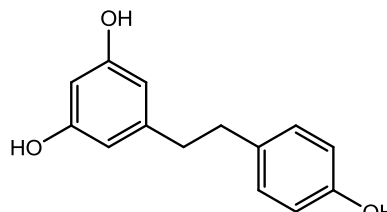
79

Dioscorea alata



- 80. $R_1=R_2=OH$, $R_3=H$ (demethylbatatasinIV)
- 81. $R_1=OCH_3$, $R_3=OH$, $R_2=H$ (batatasin III)
- 75. dihydropinosylvin
- 77. batatasin IV

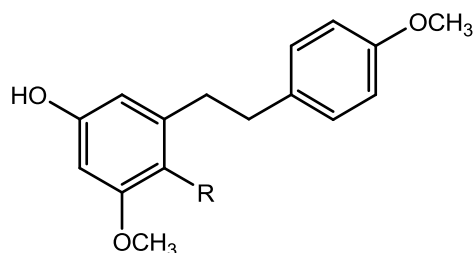
Dioscorea domentorum, Dioscorea bulbifera




82

Αντιτροπανοσωμική - αντιπαρασατική δράση

Η λείσμανίαση είναι μια παρασιτική ασθένεια που πλήττει μεγάλο ποσοστό πληθυσμού της Αμερικής, της Αφρικής, της Ασίας και τροπικών χωρών. Μπορεί να μην είναι θανατηφόρος ασθένεια αλλά δημιουργεί πολύ σοβαρές επιπτώσεις στην ανθρώπινη υγεία. Η δομική αναλογία του ισονοθολενικού οξέος (isonotholaenic acid) με τις κομπρεταστατίνες, που χρησιμοποιούνται ως αντιπαρασιτικά και θεωρούνται ισχυροί αντικαρκινικοί παράγοντες, οδήγησε στη σύνθεση κάποιων αναλόγων του οξέος και στη μελέτη της αντιπαρασιτικής τους δράσης. Το ισονοθολενικό οξύ που απομονώθηκε από το *Notholaena nivea*, επέδειξε πολύ ισχυρή αντιπαρασιτική δράση ενώ ένα από τα συνθετικά του ανάλογα που απεικονίζεται παρακάτω έδειξε 4 φορές καλύτερη δράση από αυτό.



83. R=COOH, isonotholaenic acid

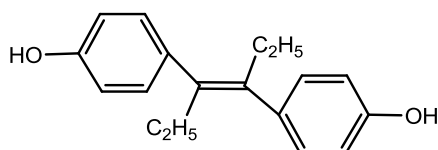
84. R=OCN 

Η μαλάρια είναι επίσης μια σοβαρή ασθένεια με πολύ περιορισμένη θεραπευτική αντιμετώπιση μέχρι σήμερα. Ωστόσο, η δράση που έδειξε το ισονοθολενικό οξύ και κάποια συνθετικά του παράγωγα, οδήγησαν στο συμπέρασμα πως τα στυλβενοειδή παράγωγα ίσως αποτελούν μια πολύ καλή βάση για την ανάπτυξη νέων φαρμάκων (Olmo et al., 2001 and 2003). Αντιμαλαριακή δράση έχουν δείξει και κάποια διβενζυλικά παράγωγα που έχουν απομονωθεί από το *Bauhinia malabarica* και *Bauhinia racemosa*.

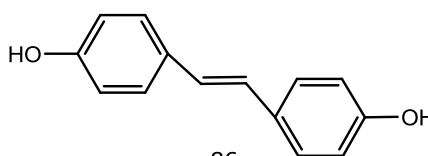
Οιστρογονικότητα - Αντικαρκινική δράση

Το DES (diethylstilbestrol), είναι από τα πιο γνωστά συνθετικά ανάλογα στυλβενίων καθώς χρησιμοποιούταν ευρέως για την αντιμετώπιση του καρκίνου του προστάτη και στήθους μέχρι που ενοχοποιήθηκε για την πρόκληση άλλων μορφών

καρκίνου (Metzler et al., 1984). Μελέτες έδειξαν πως το 4,4',-διϋδροξυστιλβένιο, το 4,4'-διϋδροξυ-α-μεθυλοστιλβένιο και το DES εκδηλώνουν ισχυρή οιστρογονική δράση, το 4-υδροξυστιλβένιο, το 4-αμινοστιλβένιο, και το 4-υδροξυ-4'-νιτροστιλβένιο μέτρια, ενώ σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις τα τελευταία εμφανίζουν αντιοιστρογονική δράση. Αξίζει να σημειωθεί πως τα α-μεθυλοστιλβένιο, το 4,4'-διμεθοξυστιλβένιο, 4-υδροξυ-α-μεθυλοστιλβένιο και κάποια διβενζύλια ενώ αρχικά δεν εμφάνισαν οιστρογονική δράση, μέσω μεταβολικών διεργασιών παρουσία ενζύμων μετατράπηκαν σε πιο δραστικές μορφές, σημειώνοντας αξιοσημείωτη οιστρογονική δράση.

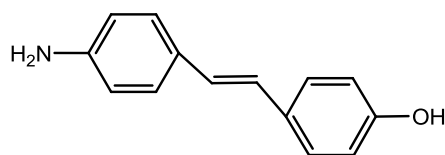


DES, 85



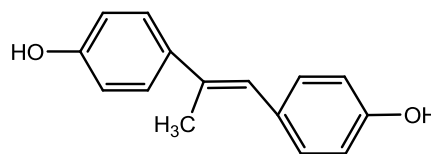
86

4,4',-διϋδροξυστιλβένιο



87

4-αμινο-4'υδροξυστιλβένιο



88

4,4'-διϋδροξυ-α-μεθυλοστιλβένιο

Μελέτες σχέσης δομής δράσης υποδεικνύουν πως για την εκδήλωση της μέγιστης οιστρογονικής δραστηριότητας των στιλβενικών παραγώγων, απαραίτητη είναι η παρουσία π-υδροξυ- υποκατάστασης στον Α δακτύλιο, διπλού δεσμού ανάμεσα στους φαινολικούς δακτυλίους και η προσθήκη υδρόφοβων αλυσίδων όπως στην περίπτωση του DES. Επίσης, νίτρο και άμινο ομάδες στον Α δακτύλιο είναι δεν είναι απαγορευτικές της δράσης (Sanoh et al., 2003).

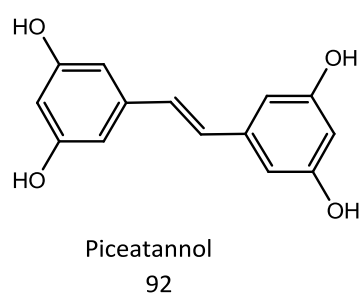
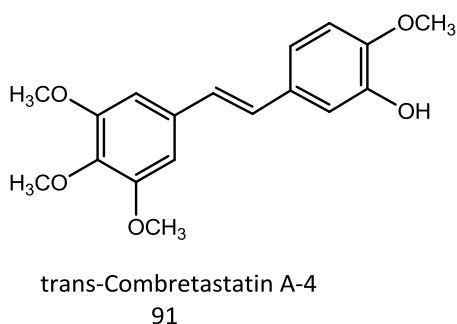
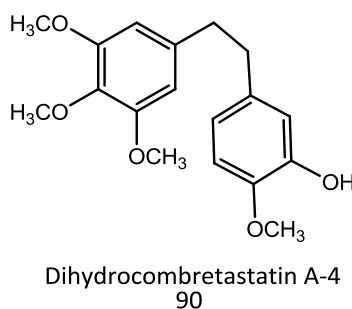
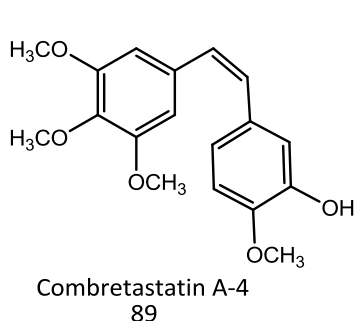
Ίσως το πιο μελετημένο στιλβένιο από την πλευρά της δραστηριότητάς του είναι η ρεσβερατρόλη. Αποτελεί βασικό συστατικό των σταφυλιών, του κρασιού, καρπών, φρούτων και λαχανικών. Η ρεσβερατρόλη μπορεί να χρησιμοποιηθεί σαν αποτελεσματικός χημειοπροστατευτικός παράγοντας (κεφάλαιο 1.4.1), σε

περιπτώσεις ορμονοεξαρτώμενων και μη καρκίνων, αλλά και σαν καρδιοαγγειοπροστατευτικός παράγοντας (Saiko et al., 2008).

Οι κομπρεταστατίνες ουσίες που έχουν απομονωθεί από το φυτό *Combretum caffrum* είναι πολύ ισχυροί κυτταροτοξικοί παράγοντες με την κομπρεταστατίνη (A-4), να είναι η πιο ισχυρή. Εκδηλώνουν έντονη αντικαρκινική δράση αναστέλλοντας τον πολυμερισμό της τουμπουλίνης (Cushman et al., 1991).



Combretum caffrum



Με βάση την κομπρεταστατίνη και την πικεατανόλη (piceatannol), τα οποία είναι αρκετά ισχυροί αντικαρκινικοί παράγοντες, μελετήθηκαν σειρές συνθετικών στιλβενίων και διϋδροστιλβενίων καταλήγοντας στο συμπέρασμα ότι τα *cis*-στιλβένια εμφανίζουν μεγαλύτερη δραστηριότητα έναντι των *trans*- και ότι η π-μεθόξυ-υποκατάσταση ενισχύει την αντικαρκινική δράση.

Αναστολείς τυροσινάσης

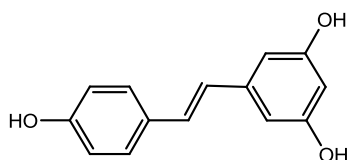
Όπως έχει ήδη αναφερθεί τα στιλβένια αποτελούν πολύ ισχυρούς παράγοντες αναστολής του ενζύμου τυροσινάσης. Η ρεσβερατρόλη, γνωστή για την αντιοξειδωτική και αντιφλεγμονώδη της δράση, αποδείχτηκε παρουσίασε πολύ μεγάλη δραστηριότητα, προκαλώντας σχεδόν πλήρη αναστολή της δράσης του ενζύμου, ενώ το αντίστοιχο υδρογονωμένο της παράγωγο (διϋδρορεσβερατρόλη)

σημείωσε πολύ μικρότερο ποσοστό αναστολής. Η γνετόλη (gnetol) η οποία απομονώθηκε από το *Gnetum gnemon*, αποδείχτηκε 30 φορές δραστικότερη του kojic acid όμως και πάλι το αντίστοιχο διϋδροστιλβένιο, η

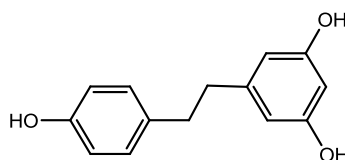


Gnetum gnemon

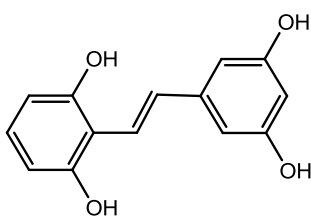
διϋδρογνετόλη (dihydrognetol), δεν εμφάνισε ίδια επίπεδα δραστηριότητας οδηγώντας στο συμπέρασμα πως η ύπαρξη διπλού δεσμού παίζει σημαντικό ρόλο στην εκδήλωση δραστηριότητας (Ohguchi et al., 2003). Ένα συμπέρασμα το οποίο νεότερες μελέτες ζευγών στιλβενίων-διϋδροστιλβενίων θα έρθουν να το αντικρούσουν όπως περιγράφεται στο κεφάλαιο 1.4.2. Ένα ακόμη φυσικό στιλβένιο που αναστέλει τη δράση της τυροσινάσης και την μελανογένεση είναι ο 2,3,5,4'-τετραυδροξυ-στιλβено-2-ο-β-D-γλυκοσίδη (THSG) (Kim et al., 2009).



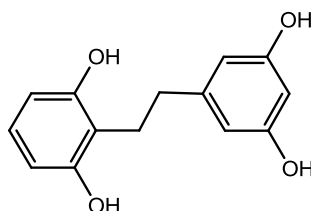
93. Ρεσβερατρόλη



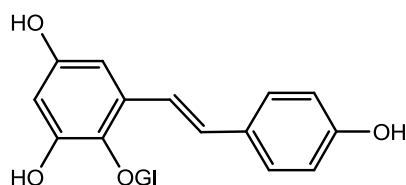
94. Διϋδρορεσβερατρόλη



95. Γνετόλη



96. Διϋδρογνετόλη

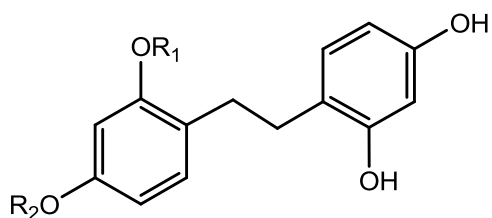


97. THSG



Τέλος, ισχυρή ανασταλτική δράση έναντι του ενζύμου της τυροσινάσης, παρουσίασαν και ο διβενζυλικός ξυλοσίδης (98), ο οποίος απομονώθηκε από το φυτό *Chlorophytum arundinaceum* (Liliaceae), αλλά και συνθετικά παράγωγα αυτού. Όλα τα παράγωγα που μελετήθηκαν παρουσίασαν ανασταλτική δράση ισχυρότερη του kojic acid με τις ουσίες 99 και 104 να εμφανίζουν την ισχυρότερη (Tajima et al., 2011).

*Chlorophytum
arundinaceum*



98. $R_1 = \text{Xyl}$, $R_2 = \text{H}$

99. $R_1 = \text{H}$, $R_2 = \text{Xyl}$

100. $R_1 = R_2 = \text{Xyl}$

101. $R_1 = R_2 = \text{Glc}$

102. $R_1 = R_2 = \text{Cel}$

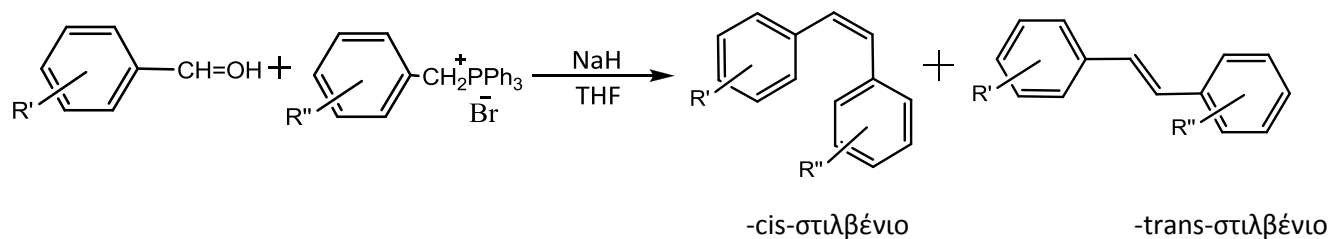
103. $R_1 = R_2 = \text{Mal}$

104. $R_1 = R_2 = \text{H}$

1.2.3 ΣΥΝΘΕΤΙΚΕΣ ΠΑΡΑΣΚΕΥΕΣ ΣΤΙΛΒΕΝΙΩΝ-ΔΙΪΔΡΟΣΤΙΛΒΕΝΙΩΝ

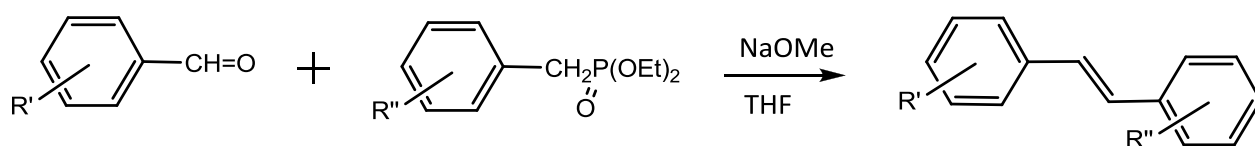
1.2.3.A ΣΥΝΘΕΤΙΚΕΣ ΠΑΡΑΣΚΕΥΕΣ ΣΤΙΛΒΕΝΙΩΝ

- I. Τα στιλβένια παράγονται μέσω της συμπύκνωσης Wittig ανάμεσα σε μία κατάλληλα προστατευμένη βενζαλδεΐδη και ένα βενζυλοτριφαινυλοφωσφονικό βρωμίδιο (Cushman et al., 1991).

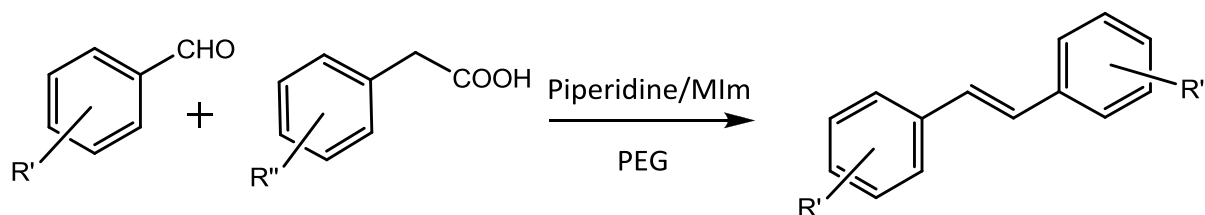


Μολονότι συνήθως προκύπτει ένα μίγμα και των δυο ισομερών, στις περισσότερες των περιπτώσεων σχηματίζεται σε μεγαλύτερο ποσοστό το *cis*-ισομερές.

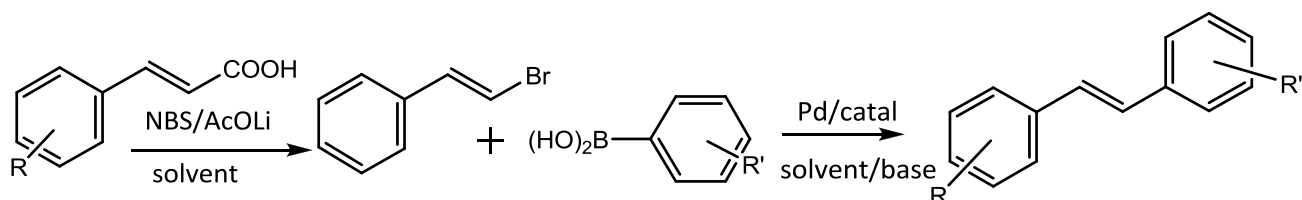
- II. Τα *trans*-ισομερή μπορούν να παραληφθούν ποσοτικά με αντίδραση Wittig-Horner ανάμεσα σε αρυλαλδεΐδες και φωσφονικούς εστέρες χρησιμοποιώντας MeONa ως βάση (Cushman et al., 1991).



- III. Τα *trans*-ισομερή εναλλακτικά μπορούν να παραληφθούν με την αντίδραση Perkin ανάμεσα σε υδρόξυ-υποκατεστημένες βενζαλδεΐδες και φαινυλοξικά οξέα (Sinha et al., 2007).

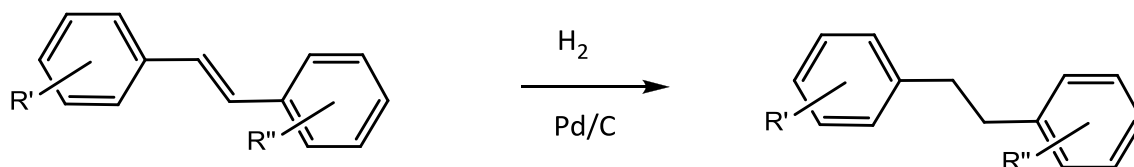


IV. Ένας ακόμη τρόπος παρασκευής των *trans*- στυλβενίων είναι με την αντίδραση Hunsdiecker-Suzuki, ξεκινώντας από καταλλήλως υποκατεστημένα κιναμμωμικά οξέα, τα οποία αρχικά μετατρέπονται σε (E)-βρωμοστυρένια και στη συνέχεια αντιδρούν με βορονικά προς σχηματισμό των επιθυμητών *trans*- στυλβενίων (Bazin et al., 2007).



1.2.3.B ΣΥΝΘΕΤΙΚΕΣ ΠΑΡΑΣΚΕΥΕΣ ΔΙΪΔΡΟΣΤΙΛΒΕΝΙΩΝ.

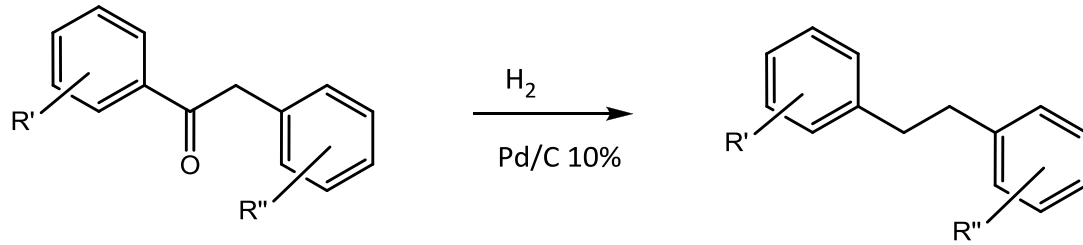
I. Τα διϋδροστυλβένια παράγονται συνθετικά μέσω των στυλβενίων με μια αντίδραση αναγωγής του διπλού δεσμού, μέσω καταλυτικής υδρογόνωσης (Cushman et al., 1991).



II. Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιείται ένας εναλλακτικός τρόπος συνθετικής παρασκευής διϋδροστυλβενίων από τις δεοξυβενζοΐνες με αναγωγή της κετονομάδας ($R_2C=O \rightarrow R_2CH_2$). Βιβλιογραφικά, η αναγωγή της κετονομάδας σε αλκάνιο μπορεί να γίνει με τρεις τρόπους:

- a. Μέσω της αντίδρασης αναγωγής Wolff-Kishner (με χρήση H_2NNH_2 -υδραζίνης σε διαιθυλενογλυκόλη DEG)
- b. Μέσω της αντίδρασης αναγωγής Clemmensen (με χρήση αμαλγάματος ψευδαργύρου, Zn-Hg, σε όξινο περιβάλλον)

- c. Μέσω καταλυτικής υδρογόνωσης, μέθοδος η οποία χρησιμοποιήθηκε για την παρασκευή των διϋδροστιλβενικών παραγώγων που παρουσιάζονται στην παρούσα εργασία.

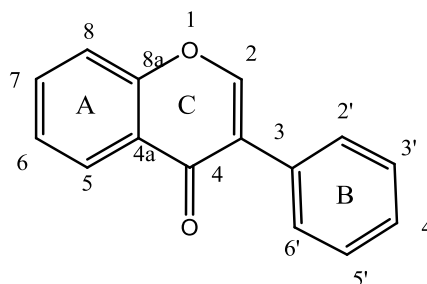


1.3 ΙΣΟΦΛΑΒΟΝΕΣ

1.3.1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Τα φλαβονοειδή αποτελούνται από διάφορες υποκατηγορίες όπως οι φλαβόνες, οι φλαβονόλες, οι φλαβανόνες, οι ισοφλαβόνες, οι ανθοκυανιδίνες, και οι κατεχίνες. Οι ισοφλαβόνες αποτελούν παράγωγα βενζο-γ-πυρόνης που φέρουν αρωματικό πυρήνα ως υποκαταστάτη στη θέση 3 του βασικού σκελετού.

Οι τρεις δακτύλιοι ονομάζονται A,B,C όπως απεικονίζεται και η αρίθμηση ξεκινά από το άτομο του οξυγόνου στον δακτύλιο με το ετεροάτομο.



Οι ισοφλαβόνες διαφέρουν από τις φλαβόνες στη θέση του δακτυλίου B όπου στην πρώτη περίπτωση συνδέεται στον C3 ενώ στη δεύτερη στο C2. Στα φυτά οι ισοφλαβόνες κυρίως απαντώνται ενωμένες με κάποιο σάκχαρο, τον οποίο στις περισσότερες περιπτώσεις είναι η γλυκόση.



Soya bean

(Leguminosae), σε καρπούς, φρούτα και λαχανικά (Dewick, 1994). Σε μεγάλη αφθονία υπάρχουν στη σόγια (*soyabean*) (Goto et al., 2009), με κυριότερους

εκπροσώπους τη ντεντζεΐνη, τη γενιστεΐνη, τη γλυκιτεΐνη, τη βιοχανίνη και τη φορμονονετίνη. Επιδημιολογικές

μελέτες έχουν αποδείξει πως πληθυσμοί που καταναλώνουν υψηλά επίπεδα λίπους και ζωικών πρωτεϊνών έχουν περισσότερες πιθανότητες να εμφανίσουν ορμονοεξαρτώμενους καρκίνους σε σχέση με πληθυσμούς των οποίων η διατροφή στηρίζεται σε κατανάλωση τροφών πλούσιων σε ισοφλαβονοειδή, δηλαδή υψηλή κατανάλωση λαχανικών, σόγιας και παραγώγων της (Houerou et al., 2000, Tham,



Soya

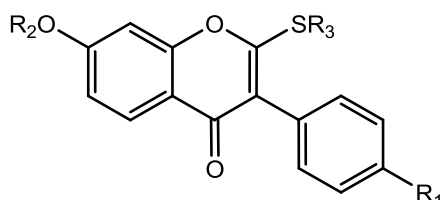
1998). Οι λόγοι αυτοί οδήγησαν στην εκτεταμένη μελέτη της βιολογικής δράσης των ισοφλαβονών.

1.3.2. ΒΙΟΛΟΓΙΚΕΣ ΔΡΑΣΕΙΣ ΙΣΟΦΛΑΒΟΝΩΝ

Οιστρογονική - αντιοιστρογονική δράση

Η δομική ομοιότητα των ισοφλαβονών με τα ενδογενή οιστρογόνα, τους προσδίδει ικανότητα πρόσδεσης με τον οιστρογονικό υποδοχέα εκδηλώνοντας έτσι οιστρογονική ή αντιοιστρογονική δράση. Το γεγονός αυτό καθιστά τις ισοφλαβόνες πολύ ωφέλιμες για την ανθρώπινη υγεία καθώς θα μπορούσαν να παίξουν καταλυτικό ρόλο στην πρόληψη (χημειοπροστασία) και τη θεραπεία ορμονοεξαρτώμενων καρκίνων (όπως καρκίνος μαστού, προστάτη και εντέρου), στην αντιμετώπιση της οστεοπόρωσης και στην προστασία από καρδιαγγειακές παθήσεις (Cornwell et al., 2004, Mueller et al., 2002, Wuttke et al., 2003). Ο μηχανισμός της δράσης των φυτοοιστρογόνων περιγράφεται αναλυτικά στο υποκεφάλαιο 1.4.1.

Οι φυσικές ισοφλαβόνες γενιστεΐνη και βιοχανίνη αποτελούν πολύ ισχυρούς χημειοπροστατευτικούς παράγοντες και τη βάση σχεδιασμού νέων δραστικών αναλόγων όπως αυτά που φαίνονται ακολούθως

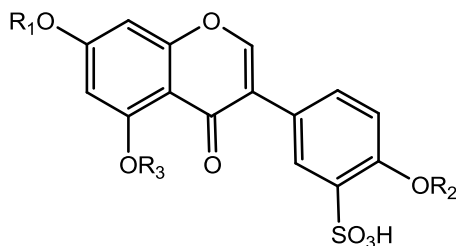
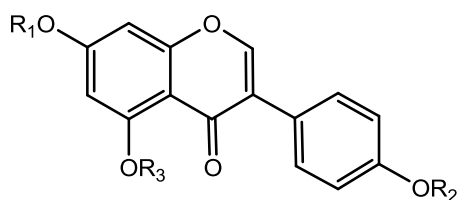


105. R₁=H, R₂=Bn, R₃=4-pyridilmethanothio

106. R₁=OH, R₂=H, R₃=4-pyridilmethanothio

107. R₁=OMe, R₂=H, R₃=4-pyridilmethanothio

Τα προαναφερόμενα παράγωγα δρουν μέσω αναστολής της αρωματάσης (Kim et al., 2004). Επίσης, μια σειρά συνθετικών αναλόγων της γενιστεΐνης εμφάνισαν έντονη κυτταροτοξική δράση ανάλογη του 5-φθοροουρακίλης, το οποίο είναι ισχυρό αντικαρκινικό φάρμακο (Li et al., 2006).



108. $R_1=EtOCOCH_2, R_2=R_3=H$

112. $R_1=R_2=BrCH_2CH_2CH_2, R_3=H$

116. $R_1=R_2=BrCH_2CH_2CH_2, R_3=H$

109. $R_1=R_2=EtOCOCH_2, R_3=H$

113. $R_1=R_2=R_3=BrCH_2CH_2CH_2$

117. $R_1=R_2=R_3=BrCH_2CH_2CH_2$

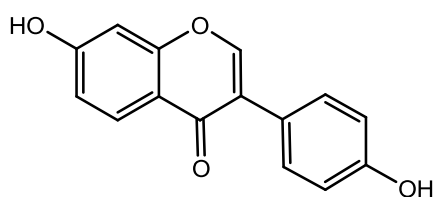
110. $R_1=R_2=R_3=EtOCOCH_2$

114. $R_1=R_2=R_3=HOCOCH_2$

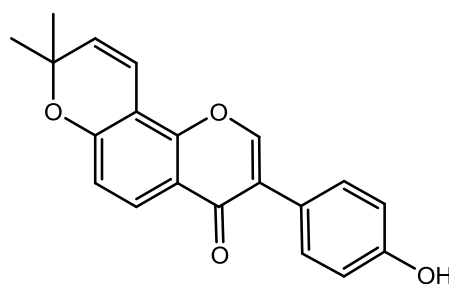
111. $R_1=R_2=BrCH_2CH_2, R_3=H$

115. $R_1=R_2=HOCOCH_2CH_2SCH_2CH_2,$
 $R_3=H$

Η ντετζεΐνη σε υψηλές συγκεντρώσεις εμφανίζει έντονη αντιοιστρογονική δράση, γεγονός που την καθιστά πολύ ισχυρό χημειοπροστατευτικό παράγοντα καλύτερο και ίσως καλύτερο από το φάρμακο 'ταμοξιφαίνη'. Μετά από παρασκευή και μελέτη αρκετών συνθετικών αναλόγων της ντετζεΐνης, βρέθηκε ένα που είναι ισχυρότερος αντιοιστρογονικός παράγοντας από αυτή, το (119) (Jiang et al., 2010).

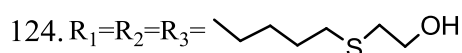
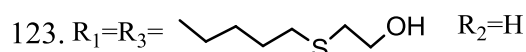
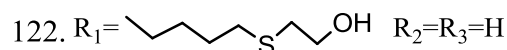
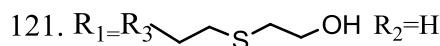
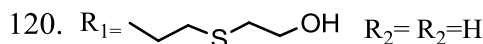
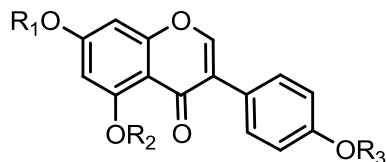
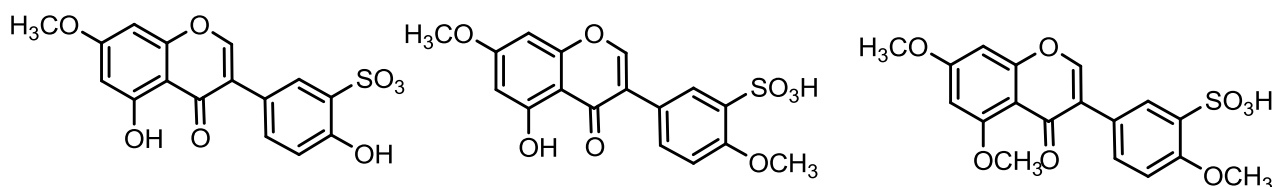


118. Ντετζεΐνη



119

Όπως αναφέρθηκε οι ισοφλαβόνες μπορούν να δρουν ευεργετικά έναντι των εμμηνόπαυσιακών συμπτωμάτων και κυρίως στην αντιμετώπιση της οστεοπόρωσης. Τα φυτοοιστρογόνα εμποδίζουν την απώλεια οστικής μάζας, φαινόμενο που συναντάται σε γυναίκες που μπαίνουν στην εμμηνόπαυση (Hooper et al., 2009). Στην περίπτωση αυτή λοιπόν, το ζητούμενο είναι η οιστρογονική δράση σε βαθμό όμως που να μην προκαλείται καρκινογένεση, όπως δρα η γενιστεΐνη και η ραλοξιφένη. Αυτό οδήγησε στη σύνθεση αναλόγων των οποίων η δράση ήταν ισχυρότερη της γενιστεΐνης, γι' αυτό και αποκαλούνται μελλοντικοί αντιοστεοπορωτικοί παράγοντες (Wang et al., 2005).



Όσον αφορά στην καρδιαγγειακή προστασία, επιδημιολογικές μελέτες έχουν δείξει πως γυναίκες των οποίων η διατροφή είναι υψηλής περιεκτικότητας σε ισοφλαβόνες εμφανίζουν σπανιότερα καρδιαγγειακά προβλήματα (Cano et al., 2010, Richard et al., 2010) ειδικότερα μετά την περίοδο της εμμηνόπαυσης (Saleh et al., 2011).

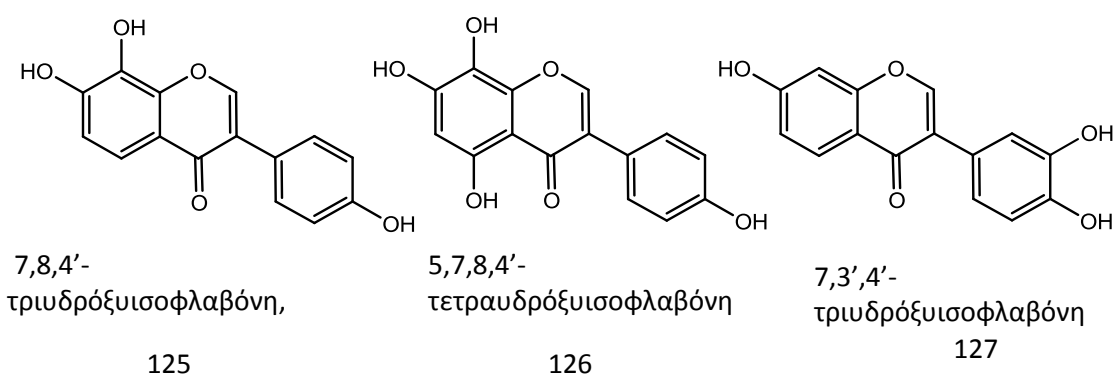
Αναστολείς αγγειογένεσης

Τα τελευταία χρόνια διευκρίνιστηκε πως η υπερβολική αγγειογένεση είναι υπεύθυνη για την ανάπτυξη πολλών χρόνιων ασθενειών που ταλαιπωρούν το δυτικό πληθυσμό, όπως η αθηροσκλήρωση, η αρθρίτιδα, η οστεομυελίτιδα, ο καρκίνος, ο διαβήτης κ.α. Η ανάγκη λοιπόν ανεύρεσης αντιοαγγειογενετικών παραγόντων είναι ιδιαίτερως σημαντική. Στην κατηγορία των ισοφλαβονών η γενιστεΐνη, η βιοχανίνη και η ντετζεΐνη αποτελούν γνωστούς παράγοντες αναστολής της αγγειογένεσης (Krenn and Paper, 2009).

Αναστολείς τυροσινάσης

Στα πλαίσια της προσπάθειας ανεύρεσης νέων πιθανών αναστολέων τυροσινάσης και σε συνδυασμό με την πλούσια βιολογική δραστηριότητα που παρουσιάζουν, οι ισοφλαβόνες δοκιμάστηκαν ως προς την ικανότητά τους να αναστέλλουν τη δράση του ενζύμου αυτού. Έπειτα από μελέτες διαπιστώθηκε πως η 7,8,4'-τριυδροξυισοφλαβόνη, η 5,7,8,4'-τετραυδροξυισοφλαβόνη και η 7,3',4'-

τριϋδροξυισοφλαβόνη αποτελούν σημαντικούς αναστολείς της τυροσινάσης. Και οι τρεις ισοφλαβόνες έχουν απομονωθεί από τη σόγια (Chang et al., 2007).



Αξίζει να σημειωθεί πως η θέση και ο αριθμός των υδροξυλομάδων στον Α δακτύλιο μπορεί να επηρεάσει την ικανότητα αλλά και το είδος της αναστολής.

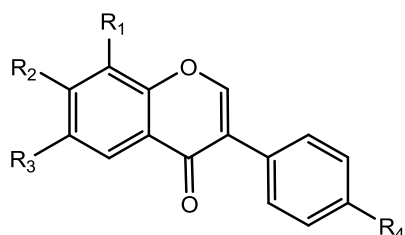
Αντιμικροβιακή-αντιβακτηριδιακή δράση

Αρκετές ισοφλαβόνες ανάμεσα τους και δύο από τους βασικότερους εκπροσώπους τους, η γενιστεΐνη και η ντετζεΐνη, εμφανίζουν αντιμικροβιακή δράση γεγονός που οδηγεί στο συμπέρασμα πως μπορούν να εμπλέκονται στους μηχανισμούς άμυνας των φυτών όταν αυτά προσβάλλονται από μικροοργανισμούς. Δρουν δηλαδή σαν φυτοαλεξίνες. Ανάμεσα στις ισοφλαβόνες που εμφανίζουν αντιμικροβιακή δράση εντοπίζονται και κάποια πρενυλιωμένα παράγωγα της γενιστεΐνης και της ντετζεΐνης που έχουν απομονωθεί από το *Phaseolus vulgaris* και γενικότερα από φυτά της οικογένειας Leguminosae. (Chang et al., 1994, Dewick et al., 1981, Sujata et al., 2004).

Ιδιαίτερα ισχυρή αντιβακτηριδιακή δράση και συγκεκριμένα κατά του *Helicobacter pylori* επέδειξε η 7,8,4'-τριϋδροξυ-ισοφλαβόνη, (125) (Xiao et al., 2007).

Αντιοξειδωτική δράση

Οι ισοφλαβόνες που παρουσιάζονται παρακάτω έχουν απομονωθεί από τη σόγια και εμφανίζουν αντιοξειδωτική δράση



118. R₁=R₃=H, R₂=OH, R₄=OMe, ντετζεΐνη

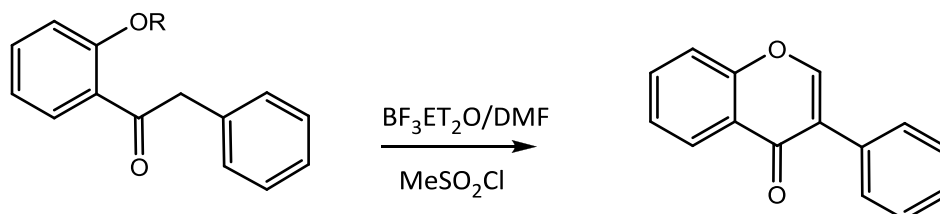
128. R₁=H, R₂=R₃=R₄=OH, 6-υδροξυντετζεΐνη

129. R₁=R₂=R₄=OH, R₃=OMe, 8-υδροξυγλυκυτεΐνη

1.3.3 ΣΥΝΘΕΤΙΚΕΣ ΠΑΡΑΣΚΕΥΕΣ ΙΣΟΦΛΑΒΟΝΩΝ

Τα βασικότερα συνθετικά μονοπάτια για τη σύνθεση των ισοφλαβονών είναι μέσω των δεοξυβενζοϊνών (I) ή των χαλκονών (II) (Sepulveda-Boza et al., 2001, Soidinsalo, 2007):

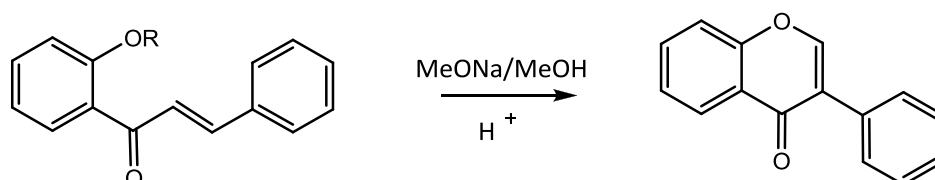
I. Φορμυλίωση των δεοξυβενζοϊνών



Για τη σύνθεση του ενδιάμεσου μορίου της δεοξυβενζοϊνης, μπορεί να χρησιμοποιηθεί ένας από τους τρόπους σύνθεσης που αναφέρονται στο υποκεφάλαιο 1.1.2.A ενώ στο στάδιο της κυκλοποίησης της μπορούν εναλλακτικά να χρησιμοποιηθούν BF₃Et₂O/DMF/PCl₅, Zn(CN)₂/HCl, HCO₂Et/Na, HC(OEt)₃/πυριδίνη και αμινοδιμεθυλομεθοξυμεθάνιο. Σε κάποιες περιπτώσεις η δημιουργία των ισοφλαβονών μπορεί να πραγματοποιηθεί σε ένα μόνο στάδιο, χωρίς την απομόνωση της δεοξυβενζοϊνης (one-pot reaction). Η αποτελεσματικότητα όμως αυτής της αντίδρασης εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από την υποκατάσταση των αντιδρώντων σωμάτων (Goto et al., 2009).

Στα πλεονεκτήματα αυτής της συνθετικής πορείας περιλαμβάνονται αρχικά το χαμηλό κόστος των αντιδραστηρίων, η ικανοποιητική απόδοση προϊόντων και το ότι δεν απαιτείται προστασία των φαινολικών υδροξυλίων, γεγονός που απλοποιεί σε μεγάλο βαθμό τη διαδικασία. Όλοι οι παραπάνω λόγοι μας οδήγησαν στην επιλογή αυτής της μεθόδου σύνθεσης.

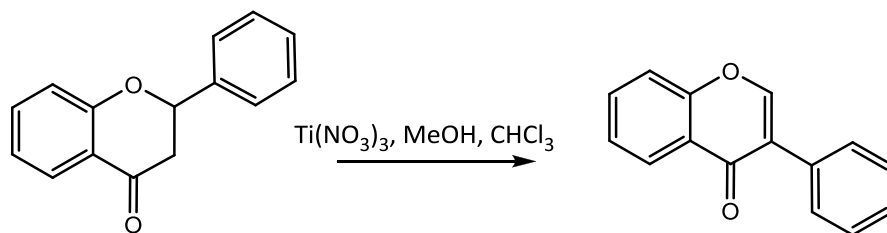
II. Οξειδωτική μετάθεση χαλκονών



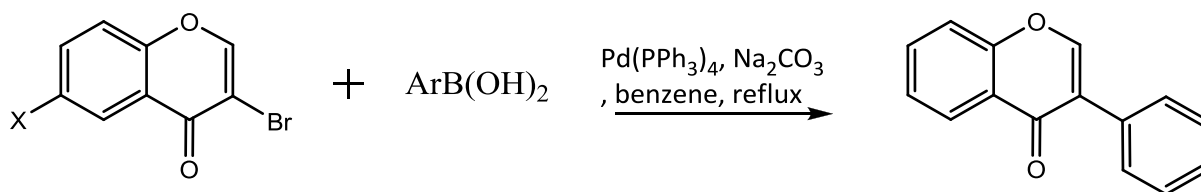
Οι ενδιάμεσες χαλκόνες συντίθενται μέσω συμπύκνωσης κατάλληλων προστατευμένων ακετοφαινονών και βενζαλδεϋδών, σε βασικό περιβάλλον.

Υπάρχουν άλλοι δύο τρόποι σύνθεσης ισοφλαβονών που δεν είναι πολύ συνηθισμένοι αλλά απαντώνται στη βιβλιογραφία:

III. Μετατροπή της φλαβανόνης σε ισοφλαβόνη (Soidinsalo, 2007),



IV. Αντίδραση Suzuki-cross-coupling (Soidinsalo, 2007, Felpin et al., 2007)



1.4. ΒΙΟΛΟΓΙΚΕΣ ΔΡΑΣΕΙΣ-ΣΤΟΧΟΙ

1.4.1 ΟΙΣΤΡΟΓΟΝΙΚΟΤΗΤΑ

Τα τελευταία χρόνια οι έρευνες επικεντρώνονται στην ανεύρεση φαρμακολογικών δραστικών μορίων, (φυσικών ή συνθετικών προϊόντων), τα οποία είναι ικανά να σταματούν ή να αποτρέπουν τη διαδικασία της καρκινογένεσης, «χημειοπροστασία». Η καρκινογένεση οφείλεται σε διαταραχές της διαφοροποίησης των κυττάρων που οδηγούν σε αναστρέψιμες ως ένα βαθμό δυσπλασίες (προκαρκινική κατάσταση), όπου μπορούμε και να επέμβουμε φαρμακολογικά με διάφορους τρόπους.

- Με κλασσικά χημειοθεραπευτικά καταστέλλοντας τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό
- με χορήγηση τοξικών αναλόγων ορμονών (ταμοξιφαίνη), ανατρέποντας το αποτέλεσμα της μη φυσιολογικής διαφοροποίησης και την εξέλιξη της καρκινογένεσης.
- με παρεμπόδιση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού με χρήση μη τοξικών παραγόντων οι οποίοι επάγουν είτε την απόπτωση είτε τη διαφοροποίηση των καρκινικών κυττάρων.

Οι τρεις παράπανω μηχανισμοί περιγράφουν τον τρόπο δράσης των χημειοπροστατευτικών παραγόντων.

Στους χημειοπροστατευτικούς παράγοντες κατατάσσονται και φυσικά μόρια τα οποία αναστέλλουν ή προλαβαίνουν την καρκινική ανάπτυξη μέσω:

A) αναστολής ενζύμων που εμπλέκονται στην καρκινογένεση

B) αναστολής δράσης υποδοχέων οιστρογόνων, ανδρογόνων και ρετινοειδών των οποίων η αυξημένη παρουσία σχετίζεται με την εμφάνιση διάφορων ορμονοεξαρτώμενων μορφών καρκίνου.

Στην παρούσα εργασία οι κατηγορίες των μορίων που εξετάζουμε, δρουν μέσω του (B) μηχανισμού και γι' αυτό και θα επικεντρωθούμε σε αυτόν. Δηλαδή στην περίπτωση αυτή χρησιμοποιούνται ανάλογα ορμονών (π.χ.ταμοξιφαίνη), τα οποία δρουν ανταγωνιστικά έναντι των οιστρογόνων ως προς τη σύνδεση με τους οιστρογονικούς υποδοχείς, αναχαιτίζοντας την εξάπλωση και τις μεταστάσεις ορμονοεξαρτώμενων μορφών καρκίνου (όπως μαστού, μήτρας ωοθηκών). Σημαντικός προγνωστικός δείκτης για τους ασθενείς που πάσχουν π.χ. από καρκίνο

μαστού, είναι ο υποδοχέας οιστρογόνων (ER), καθώς η παρουσία του σε περιπτώσεις ορμονοεξαρτώμενων καρκίνων στους ιστούς του μαστού ή της μήτρας είναι αυξημένη.

Τα οιστρογόνα ανήκουν στην κατηγορία στεροειδών ορμονών και ρυθμίζουν πάρα πολλές λειτουργίες όπως την ανάπτυξη του αναπαραγωγικού συστήματος, την προστασία γυναικών έναντι καρδιαγγειακών διαταραχών (μείωση LDL αύξηση HDL), την προστασία έναντι της οστεοπόρωσης και της νόσου Alzheimer. Ωστόσο ενοχοποιούνται και για ανάπτυξη καρκίνων του μαστού και της μήτρας. Έτσι λοιπόν τα αντιοιστρογονικά συνθετικά σκευάσματα, όπως και τα φυσικά, έχουν αποκλίνουσες δράσεις στα διαφορετικά όργανα του ίδιου οργανισμού. Δηλαδή, η θεραπεία υποκατάστασης με οιστρογόνα χρησιμοποιείται ευρέως για την καταπολέμηση των εμμηνοπαυσιακών συμπτωμάτων αλλά δυστυχώς υπάρχει ο κίνδυνος εμφάνισης ορμονοεξαρτώμενων καρκίνων και έξαρσης αυτοάνοσων νοσημάτων. Η αποκλίνουσα δράση των οιστρογόνων κατανοήθηκε μετά τη δεκαετία '70, όπου ανακαλύφθηκε πως τα οιστρογόνα δρουν σε αναπαραγωγικούς και μη αναπαραγωγικούς ιστούς και ανακαλύφθηκε και η ύπαρξη μιας δεύτερης μορφής υποδοχέα (Erβ). Οι οιστρογονικοί υποδοχείς ERα και ERβ είναι πυρηνικοί υποδοχείς (υποδοχείς πυρηνικών ορμονών), δεσμεύονται σε ειδικές θέσεις DNA (που ονομάζονται ως στοιχεία απόκρισης στο οιστρογόνο) και ενεργοποιούνται από τη σύνδεσή τους με την οιστραδιόλη και άλλα οιστρογόνα (προσδέματα). Αυτή λοιπόν η δημιουργία συμπλόκου προσδέματος-υποδοχέα ενεργοποιεί την γονιδιακή έκφραση. Αξίζει να σημειωθεί πως η σύνδεση του υποδοχέα με οποιοδήποτε μόριο προσδέτη επιφέρει σε αυτόν αλλαγή στη στερεοδιάταξή του. Επίσης οι δυο υποδοχείς ERα και ERβ δεν εκφράζονται στον ίδιο βαθμό σε όλα τα κύτταρα ή ιστούς, γεγονός που εξηγεί και τη διαφορετική δράση των οιστρογόνων κατά ιστό. Μάλιστα ορισμένοι από αυτούς έχουν τη δυνατότητα να μεταβολίζουν τα οιστρογόνα σε περισσότερο ή λιγότερο δραστικές μορφές. Όλα τα παραπάνω εξηγούν γιατί διαφορετικά οιστρογόνα δρούν μέσω του ίδιου υποδοχέα και επάγουν τόσο διαφορετικές βιολογικές δράσεις.

Επομένως όταν αναφερόμαστε στους χημειοπροστατευτικούς παράγοντες, αναφερόμαστε σε μια ομάδα «αντιορμονών», οι οποίες ανταγωνίζονται τη δράση των ορμονών στο επίπεδο του υποδοχέα στο κύτταρο αφού συνδέονται στην ίδια περιοχή που συνδέεται και η ορμόνη. Οι «αντιορμόνες» είναι συνθετικά ανάλογα στεροειδών ορμονών ή μόρια με τελείως διαφορετική δομή που όμως παρουσιάζουν

υψηλή χημική συγγένεια με τους υποδοχείς των οιστρογόνων, τα «φυτοοιστρογόνα». Οι «αντιορμόνες» συνδέονται με τους υποδοχείς στην ίδια ακριβώς θέση με τα οιστρογόνα, όμως η σύνδεση αυτή επιφέρει δομικές ανακατατάξεις στον οιστρογονικό υποδοχέα με αποτέλεσμα τη διαφορετική απόκρισή του αναστέλλοντας την ενεργοποίηση της γονιδιακής έκφρασης.(π.χ. ταμοξιφαίνη).(Fokialakis et al., 2004, Kuiper et al., 1997, Tzagrakis-Foster et al., 2001, Stryer).

1.4.2 ΤΥΡΟΣΙΝΑΣΗ

Η παραγωγή της μελανίνης, παίζει πρωταρχικό ρόλο στο χρώμα του δέρματος και στην προστασία του δέρματος από την υπεριώδη ηλιακή ακτινοβολία, ενώ η υπερπαραγωγή της και η συσσώρευσή της, μπορεί να οδηγήσει σε πληθώρα δερματικών διαταραχών όπως το μελάνωμα, οι φακίδες, και οι πανάδες. Η τυροσινάση είναι το ένζυμο που καταλύει τα δυο πρώτα στάδια της μελανογένεσης και ευθύνεται και για την οξειδωτική αμαύρωση των φρούτων και λαχανικών. Η ανάγκη αντιμετώπισης αυτών των φαινομένων οδήγησε στην αναζήτηση νέων πιθανών παραγόντων (φυσικών ή συνθετικών), που θα δρουν σαν αναστολείς τυροσινάσης με σκοπό τη χρήση τους στην ιατρική, στην κοσμετολογία αλλά και στα τρόφιμα.

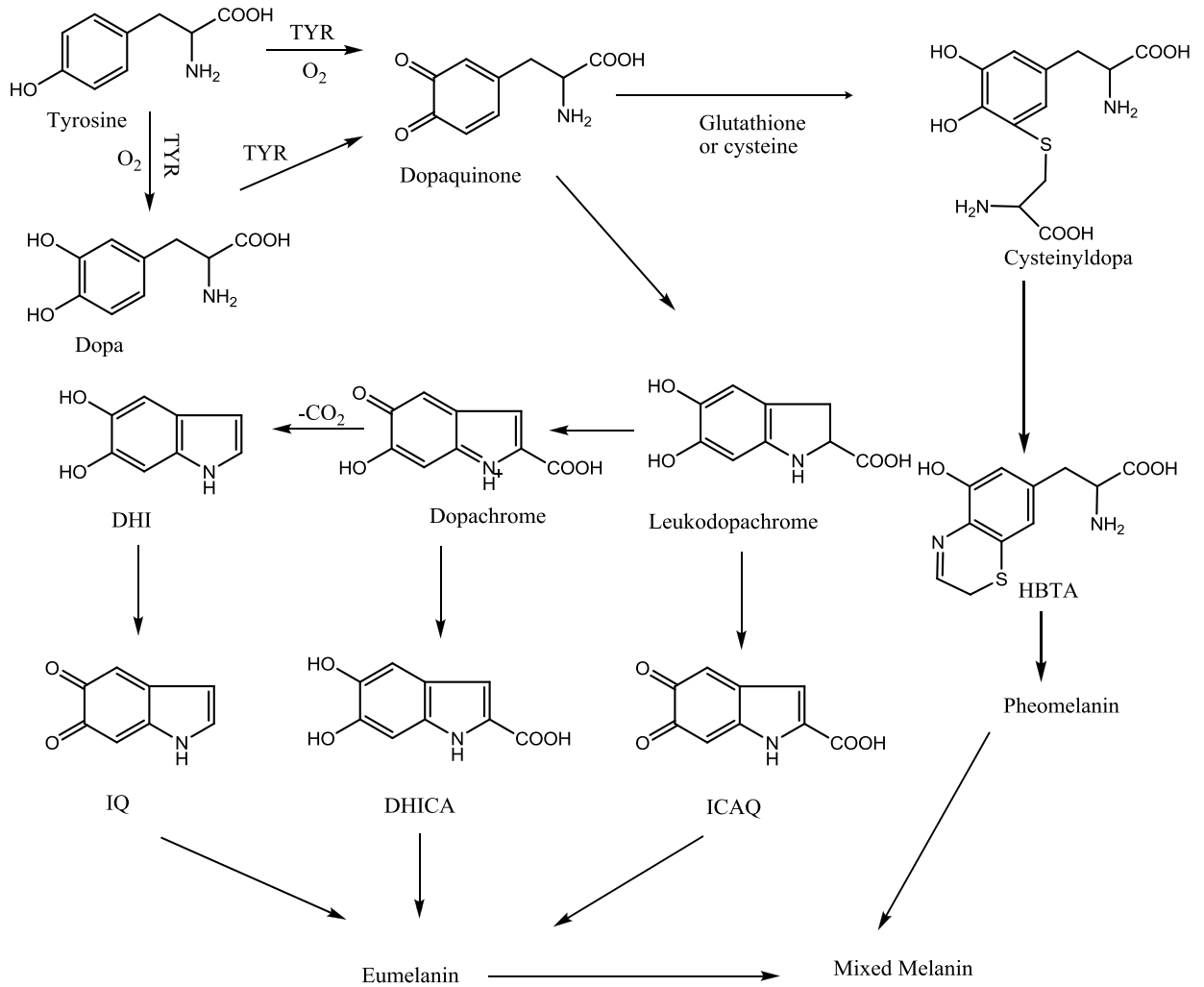
Το ένζυμο «κλειδί» στο βιοσυνθετικό μονοπάτι της μελανίνης είναι η τυροσινάση. Έχει παρατηρηθεί πως υπάρχει διάσπαρτη σε όλο το ζωικό βασίλειο από τα βακτήρια μέχρι τα θηλαστικά. Στους μύκητες η τυροσινάση καταλύει το πρώτο στάδιο σχηματισμού μελανίνης από τυροσίνη όπου και έχει το ρόλο υποστρώματος του ενζύμου, ενώ στα λαχανικά, το ρόλο του υποστρώματος τον έχουν κάποιες ποικιλίες φαινολικών που υπόκεινται σε ενζυματική οξείδωση μέσω τυροσινάσης με αποτέλεσμα την αμαύρωσή τους. Το ένζυμο του μανιταριού *A.bisporus* (mushroom tyrosinase) παρουσιάζει υψηλή ομολογία με αυτό των θηλαστικών γι' αυτό και θεωρείται το ιδανικό μοντέλο για τη μελέτη της μελανογένεσης. Για την ακρίβεια σχεδόν όλες οι μελέτες πάνω στην αναστολή τυροσινάσης έχουν γίνει με χρήση αυτού του ενζύμου καθώς είναι εμπορικά διαθέσιμο.

Το ενεργό κέντρο της τυροσινάσης αποτελείται από ένα διπυρηνικό σύμπλεγμα χαλκού. Το κάθε άτομο χαλκού συνδέεται με τρεις ιστιδίνες και αλληλεπιδρά με δυο άτομα οξυγόνου και το φαινολικό υπόστρωμα του ενζύμου. Καταλύει δυο πολύ σημαντικές αντιδράσεις στα δυο πρώτα στάδια της διαδικασίας της μελανογένεσης, χρησιμοποιώντας μοριακό οξυγόνο:

α) την υδροξυλίωση των μονοφαινολών σε ο-διφαινόλες (την υδροξυλίωση της τυροσίνης σε L-DOPA) και

β) την οξείδωση των ο-διφαινολών σε ο-κινόνες (οξείδωση της L-DOPA σε Dopaquinone). Οι κινόνες είναι πολύ δραστικά μόρια τα οποία πολυμερίζονται

δημιουργώντας μόρια υψηλού μοριακού βάρους ή καφέ χρωστικές, ευμελανίνη, φαιομελανίνη (eumelanin, pheomelanin), ή αντιδρούν με αμινοξέα και πρωτεΐνες που προάγουν τη δημιουργία καφέ χρώματος.



Βιοσύνθεση της μελανογένεσης. TYR: tyrosinase, dopa: 3,4 dihydroxyphenylalanine, DHICA: 5,6 dihydroxyindole-2-carboxylic acid, DHI: 5,6 dihydroxyindole, ICAQ: indole-2-carboxylic acid-5,6-quinone, IQ: indole-5,6-quinone, HBTA: 5-hydroxy-1,4-benzothiazinylalanine.

Αναστολείς τυροσινάσης

Όπως έχει προαναφερθεί η πληθώρα δερματικών διαταραχών που οφείλονται στην υπερπαραγωγή και συσσώρευση της μελανίνης και η ενζυματική αμαύρωση φρούτων και λαχανικών είναι ανεπιθύμητα φαινόμενα και οφείλονται στη δράση του ενζύμου της τυροσινάσης, γεγονός που οδήγησε στην ανάγκη εύρεσης πιθανών παραγόντων που θα δρουν ανασταλτικά στη λειτουργία του ενζύμου αυτού. Οι κυριότεροι τύποι αναστολέων της τυροσινάσης χωρίζονται σε δύο κατηγορίες :

(α) ειδικοί απενεργοποιητές τυροσινάσης οι οποίοι ονομάζονται και «suicide substrates». Οι αναστολείς αυτοί καταλύονται από την τυροσινάση και σχηματίζουν ομοιοπολικό δεσμό με το ένζυμο, απενεργοποιώντας το έτσι μη αντιστρεπτά κατά της διάρκειας της καταλυτικής αντίδρασης. Δηλαδή αναστέλλουν τη δράση της τυροσινάσης, με το να επάγουν το ένζυμο να καταλύει τη “suicide reaction”.

(β) ειδικοί αναστολείς τυροσινάσης οι οποίοι συνδέονται αντιστρεπτά με το ένζυμο και μειώνουν σε μεγάλο βαθμό την καταλυτική του ικανότητα.

Τα μόρια που ανήκουν στις παραπάνω κατηγορίες αναστολέων της τυροσινάσης, ονομάζονται «αληθινούς αναστολείς», οι οποίοι πραγματικά προσδέονται με το ένζυμο αναστέλλοντας τη λειτουργία του και με βάση το είδος της αναστολής που προκαλούν κατατάσσονται σε τέσσερις κατηγορίες:

- I. Ανταγωνιστικούς αναστολείς-competitive inhibitors, ουσίες που συνδέονται με το ελεύθερο ένζυμο με τέτοιο τρόπο που εμποδίζουν την ένωση του ενζύμου με τον υπόστρωμα. Δηλαδή ο αναστολέας δρα σαν υπόστρωμα-ανταγωνίζεται το υπόστρωμα.
- II. Συναγωνιστικούς αναστολείς-uncompetitive inhibitors, ουσίες που συνδέονται με το σύμπλοκο ενζύμου-υποστρώματος είτε μέσω υποστρώματος είτε απ' ευθείας με το ένζυμο.
- III. Μικτούς αναστολείς-competitive/uncompetitive inhibitors, συνδέονται είτε με το ελεύθερο ένζυμο είτε με το σύμπλοκο ενζύμου υποστρώματος και ο αναστολέας δεν επιδρά μόνο στο ένζυμο αλλά και στο υπόστρωμα.
- IV. Μη ανταγωνιστικούς αναστολείς-non competitive inhibitors, δεν επηρεάζουν την τάση σύνδεση ενζύμου υποστρώματος αλλά απενεργοποιούν μέρος του ενζύμου ή ολόκληρο το ένζυμο για κάποιο χρονικό διάστημα.

Το Kojic acid θεωρείται από τους ισχυρότερους παράγοντες αναστολής της τυροσινάσης και συχνά χρησιμοποιείται ως πρότυπο στη μελέτη της δραστηριότητας αγνώστων μορίων. Χρησιμοποιείται ευρέως στην κοσμητολογία σαν λευκαντικός παράγοντας και σαν συντηρητικό τροφίμων για την πρόληψη της ενζυματικής αμαύρωσης φρούτων και λαχανικών.

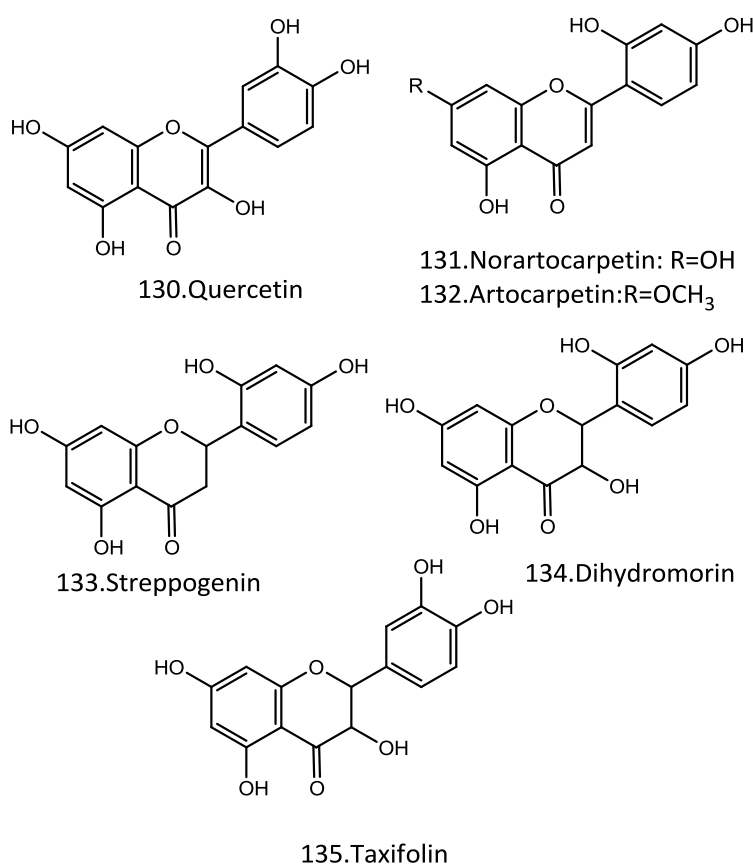
Με βάση τη βιβλιογραφία τα τελευταία χρόνια πλήθος νέων μορίων που δρουν ανασταλτικά ως προς την τυροσινάση έχουν ανακαλυφθεί και αναφέρονται παρακάτω ενδεικτικά:

- *Πολυφαινόλες.*

Είναι ένα σύνολο χημικών μορίων που συναντώνται διάσπαρτα στη φύση και μέχρι τώρα αποτελούν το μεγαλύτερο σύνολο αναστολέων τυροσινάσης που έχει μελετηθεί. Μερικά από αυτά τα συναντούμε στα φυτά σε φύλλα, ρίζες, καρπούς ενώ κάποια άλλα σε φρέσκα φρούτα, λαχανικά και τσάϊ. Πολλές **φλαβονόλες** έχουν απομονωθεί από φυτά και αρκετές χαρακτηρίστηκαν ως αναστολείς τυροσινάσης. Οι φλαβονόλες συνήθως δρουν σαν ανταγωνιστικοί αναστολείς για την οξείδωση της L-dopa από την τυροσινάση, και ο σκελετός τους (3-υδροξύ-4-κέτο) παίζει ρόλο κλειδί στη δημιουργία συμπλόκου με τον χαλκό στο ενεργό κέντρο του ενζύμου. Σε επίπεδο αναστολής μπορούν να καταταχθούν ως εξής: Κερκετίνη >μυρικετίνη>καιμφερόλη>galangin>morin. Η 6-υδροξύ καιμφερόλη φαίνεται να παρουσιάζει διπλάσια δραστηριότητα από την καιμφερόλη και οι γλυκοσίδες της κερκετίνης και της καιμφερόλης χαρακτηρίστηκαν πολύ λιγότερο δραστικοί από τα άγλυκά τους. Παρ' όλη τη δραστηριότητα των μορίων αυτών η κερκετίνη (η πιο δραστική φλαβονόλη) παρουσιάζει μόνο το 20% της δραστηριότητας των «αληθινών αναστολέων».

Το ίδιο παρατηρείται και στην περίπτωση των φλαβονοειδών νομπιλετίνη (nobiletin), ναριγγίνη (naringin), νεοεσπεριδίνη (neohesperidin) (συστατικά που εντοπίζονται στη φλούδα λεμονιού) τα οποία αναστέλλουν μεν τη δράση της τυροσινάσης αλλά σε πολύ χαμηλότερα επίπεδα σε σχέση με το kojic acid. Επίσης, από το φυτό *Morus alba*, το οποίο είναι πλούσιο σε πολυφαινόλες, απομονώθηκαν από τα φύλλα οι ουσίες mulberroside F (moracin M-6,3'-di-*O*- β -glucopyranoside), η οποία έδειξε δράση 4.5 φορές μεγαλύτερη του kojic acid, και η νοραρτοκαρπετίνη (norartocarpetin) (5,7,2',4'-τετραυδροξύ-φλαβόνη) όπου έδειξε 10 φορές ισχυρότερη δράση του kojic acid. Από τη ρίζα του φυτού απομονώθηκαν η οξυρεσβερατρόλη

(oxyresveratrol), η νοραρτοκαρπετίνη (norartocarpetin) και η στρεπογενίνη (streppogenin) (5,7,2',4'-τετραυδροξυφλαβόνη), μια φλαβονόνη με μεγάλες ομοιότητες με τη νοραρτοκαρπετίνη στη δομή και επομένως και στα επίπεδα αναστολής. Επίσης, δύο πολύ ισχυροί αναστολείς της τυροσινάσης η διϋδρομορίνη (dihydromorin) (5,7,2',4'-τετραυδροξυφλαβονόλη) και η αρτοκαρπετίνη (artocarpetin) (7-μεθοξυ-5,2',4'τριϋδροξυφλαβονόλη), απομονώθηκαν πρόσφατα από τον κορμό του *Artocarpus heterophyllus*.



Αξίζει να σημειωθεί πως παρατηρείται μεγάλη διαφορά στη δραστικότητα των αναστολέων όταν το υδροξύλιο στην 7-θέση δεν είναι ελεύθερο (π.χ. artocarpetin), καθώς η ύπαρξη ελεύθερου υδροξυλίου στη θέση αυτή (π.χ. norartocarpetin), αυξάνει την ικανότητα πρόσδεσης του αναστολέα στην ενεργή περιοχή του ενζύμου. Επίσης, αναφέρθηκε πως η νοραρτοκαρπετίνη (norartocarpetin) και η στρεπογενίνη (streppogenin) παρουσιάζουν παρόμοια δραστικότητα σε επίπεδο αναστολής. Αντίθετα η διϋδρομορίνη (dihydromorin) εμφανίζει πολύ μειωμένη δραστικότητα, γεγονός που έρχεται σε σύγκρουση με τη θεωρία που υποστήριζε πως για την εκδήλωση δραστικότητας είναι απαραίτητη η ύπαρξη υδροξυλίου στη 3-

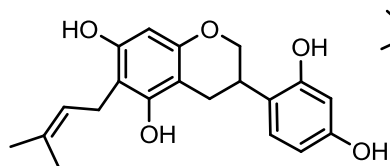
θέση γιατί ευνοεί τη δημιουργία συμπλόκου με το χαλκό. Αυτή η παρατήρηση ενίσχυσε την περαιτέρω μελέτη όσον αναφορά στα κριτήρια για την εκδήλωση αναστολής της τυροσινάσης, η οποία κατέληξε στο συμπέρασμα πως είναι απαραίτητη η ύπαρξη υδροξυλίων στους δακτυλίους A και B (C6-C8, C2'-C4') για τη σύνδεση αναστολέα-ενζύμου και πως το υδροξύλιο στη 3-θέση τελικά δυσχεραίνει τη δημιουργία συμπλόκου. Έτσι εξηγείται και το γεγονός ότι οι περισσότερες φλαβονόλες και φλαβανόλες παρουσιάζουν μέτρια δραστικότητα. Η ταξιφολίνη (taxifolin) που απομονώθηκε από το *Polygonum hydropiper*, έδειξε ίδια επίπεδα αναστολής με το kojic acid.

Εκχυλίσματα της ρίζας και καρπών του φυτού *Glycyrrhiza* (*Leguminosae*) χρησιμοποιούνται ανέκαθεν ως λευκαντικοί παράγοντες στην ανατολική Ασία. Η δράση αυτή οφείλεται στη γκλαμπριδίνη (Glabridine) που ήταν ο πρώτος μεταβολίτης που απομονώθηκε με ανασταλτική δράση της τυροσινάσης 15 φορές μεγαλύτερη του kojic acid και λευκαντική δράση καλύτερη από της αρβουτίνης (arbutin). Αντιθέτως το glabrene, αποδείχτηκε 100 φορές λιγότερο δραστικό από τη Glabridine. Η Glyasperin C απομονώθηκε πρόσφατα από τις ρίζες του φυτού και εμφάνισε δραστικότητα διπλάσια της Glabridine.

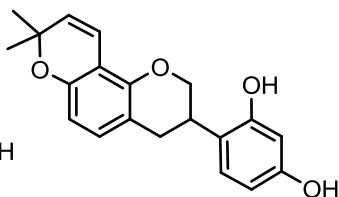
Πιθανοί αναστολείς τυροσινάσης θεωρούνται επίσης και οι **ισοφλαβόνες** 6-υδροξυντετζεΐνη (6-hydroxydaidzein) (6,7,4'-τριϋδροξυισοφλαβόνη), 8-υδροξυντετζεΐνη (8-hydroxydaidzein) (7,8,4'-τριϋδροξυισοφλαβόνη), και 8-υδροξυγενιστεΐνη (8-hydroxygenistein) (5,7,8,4'-τετραυδροξυισοφλαβόνη), οι οποίες απομονώθηκαν από το *Aspergillus oryzae*. Ανάμεσά τους, η 6-υδροξυντετζεΐνη (6-hydroxydaidzein) με 6 φορές καλύτερη δράση από το kojic acid δρα ανταγωνιστικά στη L-tyrosine καθώς προσδένεται στο ενεργό κέντρο του ενζύμου εμποδίζοντας τη σύνδεσή της σε αυτό, ενώ οι άλλες δύο 8-υδροξυισοφλαβόνες συνδέονται μη αντιστρεπτά με το ένζυμο και ανήκουν στα suicide substrates της τυροσινάσης. Αξίζει να σημειωθεί πως η θέση και ο αριθμός των υδροξυλίων στον A δακτύλιο της ισοφλαβόνης, επηρεάζει και την ικανότητα αναστολής αλλά και το είδος αναστολής της τυροσινάσης. Για παράδειγμα μια ισοφλαβόνη με υδροξύλια στις θέσεις 6 και 7 του δακτυλίου A (6,7,4'-τριϋδροξυισοφλαβόνη) θα παρουσίαζε 10 φορές πιο μεγάλη ανασταλτική δράση και συγγένεια-συνδεσιμότητα με το ένζυμο, συγκριτικά με τις ισοφλαβόνες που φέρουν είτε ένα μόνο υδροξύλιο (στη θέση 7 συνήθως) είτε κανένα υδροξύλιο στο δακτύλιο αυτό. Εναλλακτικά, οι υδροξυλομάδες στους C7 και C8 (7,8,4'-τριϋδροξυισοφλαβόνη και 5,7,8,4'-τετραυδροξυισοφλαβόνη) θα άλλαζαν

τελείως το είδος της αναστολής των ισοφλαβονών από ανταγωνιστική αναστολή σε μη αντιστρέψιμη μορφή 'suicide form'. Ο λεπτομερής μηχανισμός της επίδρασης της θέσης των υδροξυλίων του Α δακτυλίου στη δραστικότητα των ισοφλαβονών χρειάζεται περαιτέρω μελέτη. Πέρα από τα ισοφλαβονοειδή της *Glycyrrhiza*, η Haginin A που απομονώθηκε από τα κλαδιά της *Lespedeza cyrtobotrya* παρουσίασε 10 φορές μεγαλύτερη δραστικότητα από το kojic μέσω μη ανταγωνιστικής αναστολής. Η ένωση αυτή ανάστειλε σε μεγάλο βαθμό τη σύνθεση μελανίνης στα μελανοκύτταρα και μείωσε σε μεγάλο βαθμό το σχηματισμό καφέ κηλίδων από την υπεριώδη ακτινοβολία στους χοίρους γουινέας. Η Dalbergioidin (5,7,2',4'-τετραυδροξυισοφλαβάνη) απομονώθηκε επίσης από τη *Lespedeza cyrtobotrya* και περιορίζει τη σύνθεση μελανίνης στα μελανοκύτταρα μέσω μη ανταγωνιστικής αναστολής. Τέλος, η calycosin (7,4'-διυδροξυ-7-μεθοξυισοφλαβόνη) έδειξε επίσης ισχυρότερη δράση από το kojic acid. Το φλαβονοειδές αυτό δρα μέσω δυο μηχανισμών για να μειώσει την παραγωγή μελανίνης από τα μελανοκύτταρα. Αναστέλλει τη δράση της τυροσινάσης και μειώνει την έκφρασή της.

ISOFLAVANS

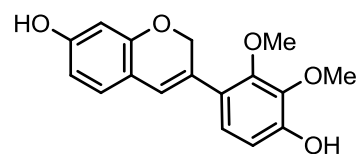


136.Glyasperin C



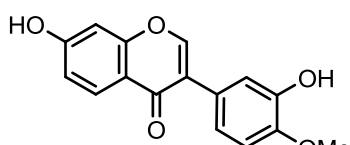
137.Glabridine

ISOFLAVEN-3-EN

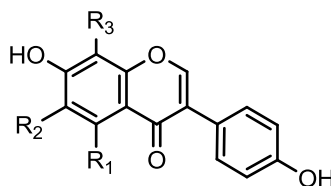


138.Haginin A

ISOFLAVONES



139.Calycosin



140.6-hydroxydaidzein R1=R3=H, R2=OH
 141.8-hydroxydaidzein R1=R2=H, R3=OH
 142.8-hydroxygenistein R1=R3=OH, R2=H

Επιπρόσθετα, αρκετές πρενυλιωμένες χαλκόνες που απομονώθηκαν από φυτά έδειξαν ανασταλτική δράση της τυροσινάσης. Η licuraside, η isoliquiritin, και η licochalcone A απομονώθηκαν από τις ρίζες της *Glycyrrhiza* και έδειξαν δραστηριότητα μέσω ανταγωνιστικής αναστολής. Συγκεκριμένα, η licochalcone A έδειξε δράση 5 φορές μεγαλύτερη του kojic acid. Μια άλλη πρενυλιωμένη χαλκόνη, η kuraridin από το φυτό *Sophora flavescens* εμφανίστηκε 34 φορές δραστηρότερη του kojic acid, ενώ το υδροξύ- ανάλογο της 'kuraridinol' 18.4 φορές δραστηρότερο. Το γεγονός ότι δυο πρενυλιωμένες χαλκόνες εμφάνισαν σημαντικά μεγαλύτερη δραστηριότητα σε σχέση με τις αντίστοιχες φλαβονόνες η kuraridin (χαλκόνη) 10 φορές δραστηρότερη της kurarinone (φλαβονόνη) και η kuraridinol (χαλκόνη) 10 φορές δραστηρότερη της kurarinol (φλαβονόνη)) φανερώνει πως αναστολείς τυροσινάσης με σκελετό ανάλογο των χαλκονών παρουσιάζουν ιδιαίτερο ενδιαφέρον και αξίζει να μελετηθούν αναλυτικότερα. Η 2,4,2',4'-τετραυδροξύ-3-(3-μεθυλο-2-βουτενυλ)-χαλκόνη, η οποία απομονώθηκε από το *Morus nigra*, αποδείχτηκε 26 φορές δραστηρότερη του kojic, με ιδιαίτερα εντυπωσιακά αποτελέσματα κατά της μελανογένεσης, γεγονός που αποδόθηκε στην άμεση αναστολή της δράσης της τυροσινάσης.

Όπως φαίνεται από τις χαλκόνες που έχουν μελετηθεί, η ύπαρξη 2,4-διυδροξύ- ομάδων στον αρωματικό δακτύλιο (4-ρεσορκινόλη) είναι το "κλειδί" για την εκδήλωση δραστηριότητας. Αρχικά υποστηρίχθηκε πως η ύπαρξη υδροξυλίου στην 4'- θέση στο B δακτύλιο είναι απαραίτητη, γιατί έτσι ο σκελετός παρουσιάζει ομοιότητες με το υπόστρωμα L-tyrosine. Έπειτα, ανακαλύφθηκε πως η 2,4,2',4'-τετραυδροξύχαλκόνη εμφανίζει μεγαλύτερη δραστηριότητα σε σχέση με τη 3,4,2',4'-τετραυδροξύχαλκόνη και τη 2,4,3',4'-τετραυδροξύχαλκόνη. Άρα η ύπαρξη 2,4-διυδροξύ- ομάδων στον αρωματικό δακτύλιο των χαλκονών παίζει το σημαντικότερο ρόλο για την εκδήλωση δραστηριότητας. Στη συνέχεια συντέθηκε μια σειρά χαλκονών, οι οποίες δοκιμάστηκαν ως πιθανοί αναστολείς τυροσινάσης και τα αποτελέσματα επιβεβαίωσαν το αρχικό συμπέρασμα. Δηλαδή η 2,4,2',4',6'-πενταυδροξύχαλκόνη είναι 5 φορές δραστηρότερη από τη 2,4,2',4'- τετραυδροξύχαλκόνη, δρώντας ανταγωνιστικά προς την L-tyrosine. Στο σημείο αυτό αξίζει να τονιστεί πως τα μόρια artocarpetin, norartocarpetin, and streppogenin που αναφέραμε ως ικανούς αναστολείς τυροσινάσης περιέχουν στο σκελετό τους διυδροξύ υποκατάσταση στη 2,4 θέση του δακτύλιο. Άρα η υποκατάσταση αυτή παίζει πολύ σημαντικό ρόλο στην αναστολή της τυροσινάσης όχι μόνο όταν είναι παρούσα στο σκελετό των χαλκονών αλλά και στο σκελετό άλλων φλαβονοειδών.

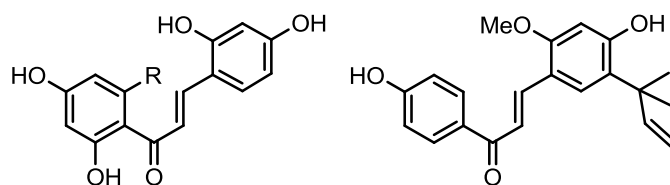
Τα **στιλβένια** αποτελούνται από δυο αρωματικούς δακτυλίους οι οποίοι ενώνονται με δυο άτομα άνθρακα που μεταξύ τους συνδέονται με διπλό δεσμό. Η οξυρεσβερατρόλη (2,4,3',5'-τετραυδροξυ-*trans*-στιλβένιο) που απομονώθηκε από το *Morus alba* επέδειξε 32 φορές ισχυρότερη δράση από το kojic acid. Ο μηχανισμός της ανασταλτικής δράσης της αποδείχτηκε ότι είναι η άμεση αναστολή της δραστηριότητας του ενζύμου χωρίς όμως να επηρεάζεται η γονιδιακή έκφρασή του. Αξίζει να σημειωθεί πως η οξυρεσβερατρόλη περιέχει και αυτή 2,4-διυδροξυ-υποκατάσταση στο Β δακτύλιο και 3',5'-διυδροξυ υποκατάσταση στον Α δακτύλιο, που όπως αναφέρθηκε παραπάνω αποτελούν την ιδανική υποκατάσταση για πιθανούς αναστολείς τυροσινάσης. Για την ακρίβεια είναι 50 φορές πιο ισχυρή από το ανάλογό της, τη ρεσβερατρόλη (2,3',5'-τριυδροξυ-*trans*-στιλβένιο), από την οποία λείπει το υδροξύλιο στην 4 θέση. Αν λοιπόν συμπεριληφθούν υπ' οψην όλα τα παραπάνω, παρατηρούμε πως η ύπαρξη 2,4-διυδροξυομάδων στο Β δακτύλιο και 3',5'-διυδροξυ ομάδων στον Α δακτύλιο, αποτελεί πλέον κριτήριο για το μελλοντικό σχεδιασμό πιθανών αναστολέων τυροσινάσης.

Πέρα από την οξυρεσβερατρόλη, άλλα τρία υδροξυστιλβένια ταυτοποιήθηκαν ως ικανοί αναστολείς τυροσινάσης. Το Chloroporphin (4-geranyl-3,5,2',4'-tetrahydroxy-*trans*-stilbene), το οποίο απομονώθηκε από το *Chlorophora excelsa* και επέδειξε 14 φορές ισχυρότερη δράση από το kojic acid. Η γνετόλη (gnetol) (2,6,3',5'-τετραυδροξυ-*trans*-στιλβένιο, που απομονώθηκε από το φυτό *Gnetum gnemon*, έδειξε 30 φορές ισχυρότερη δράση από το kojic acid, ενώ και η piceatannol (3,5,3',4'-τετραυδροξυ-*trans*-στιλβένιο), που υπάρχει σε σταφύλια και κόκκινο κρασί, έδειξε ιδιαίτερος ισχυρή ανασταλτική δράση.

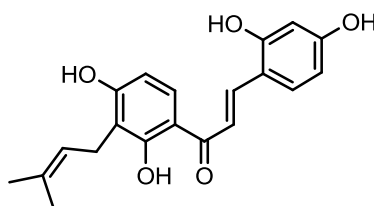
Με σκοπό τη μελέτη δομής δράσης συντέθηκε και μελετήθηκε μεγάλος αριθμός στιλβενίων, όπου ιδιαίτερη σημασία δόθηκε στη συνεισφορά του διπλού δεσμού στην ανασταλτική δράση αυτών των ενώσεων. Αρχικά υπήρξε η παραδοχή πως η ύπαρξη *-trans* ισομέρειας είναι απαραίτητη για την εκδήλωση αναστολής, γεγονός που διαψεύστηκε προσφάτως όταν μελετήθηκε το *cis*-3,5-διυδροξυστιλβένιο και επέδειξε καλύτερη δράση από το *-trans* ισομερές του. Από την άλλη μεριά το αντίστοιχο διυδροστιλβένιο της γνετόλης, η διυδρογνετόλη (dihydrognetol), έδειξε πολύ μειωμένη δραστηριότητα, γεγονός που οδηγεί στο συμπέρασμα πως η ύπαρξη του διπλού δεσμού θεωρείται απαραίτητη για την εκδήλωση δραστηριότητας. Την παραδοχή αυτή έρχεται να αντικρούσει η μελέτη του αντίστοιχου διυδροστιλβενίου της οξυρεσβερατρόλης, η διυδρορεσβερατρόλη (dihydrooxyresveratrol), η οποία ενώ

δεν φέρει το διπλό δεσμό ανάμεσα στα δυο βενζύλια εκδηλώνει 8 φορές μεγαλύτερη δραστικότητα από την οξυρεσβερατρόλη. Μια πιθανή εξήγηση είναι πως με την μετατροπή του διπλού δεσμού σε απλό αυξήθηκε η ευκινισία του μορίου και έτσι οι φαινολικές ομάδες μπόρεσαν να αλληλεπιδράσουν καλύτερα με το ένζυμο. Επομένως η ύπαρξη διπλού δεσμού δεν αποτελεί κριτήριο για την ύπαρξη δραστικότητας. Ωστόσο ένα ισοστερές της οξυρεσβερατρόλης, το HNB [4-(6-υδροξυ-2-ναφθανυλυλο)-1,3-διϋδροξυ-βενζόλιο], το οποίο έδειξε 500 φορές καλύτερη δράση από το kojic acid θεωρείται μέχρι σήμερα ο ισχυρότερος αναστολέας τυροσινάσης.

CHALCONES

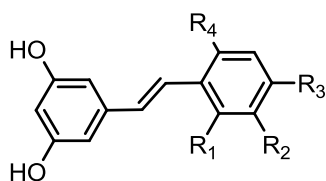


143. 2,4,2',4'-tetrahydroxychalcone R=H
144. 2,4,6,2',4'-pentahydroxychalcone R=OH
145. Licochalcone A

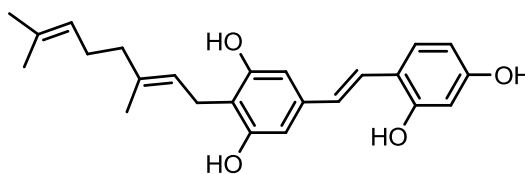


146. TMBC

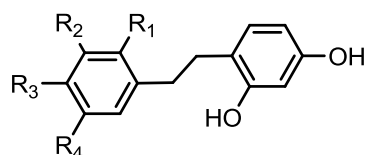
STILBENES-DIHYDROSTILBENES



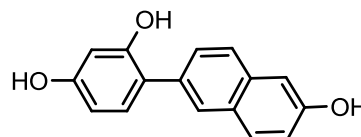
147. Oxyresveratrol $R_1=R_3=OH, R_2=R_4=H$
148. Gnetol $R_1=R_4=OH, R_2=R_3=H$
149. Piceatannol $R_1=R_4=H, R_2=R_3=OH$



150. Chloroporphin



151. 2,4, 3',5' tetrahydroxybibenzyl $R_1=R_3=H, R_2=R_4=OH$
152. 2,4, 2',4' tetrahydroxybibenzyl $R_1=R_3=OH, R_2=R_4=H$
153. 2,4, 2' trihydroxybibenzyl $R_1=OH, R_2=R_3=R_4=H$



154. HNB

Από την κατηγορία των κουμαρινών σημαντικότεροι εκπρόσωποι ως αναστολείς τυροσινάσης είναι ο γλυκοσίδης της αλοεσίνης (aloesin) που έχει απομονωθεί από την *Aloe vera* και χρησιμοποιείται σε καλλυντικά για λεύκανση του δέρματος και η 9-hydroxy-4-methoxypsoralen από την *Angelica dahurica* που έδειξε 6 φορές μεγαλύτερη δραστηριότητα από αυτή του kojic.

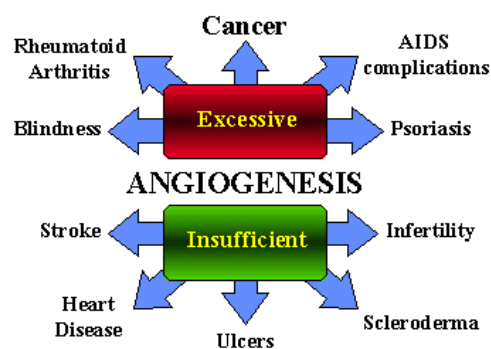
- *Βενζαλδεΐδες και βενζοϊκά παράγωγα*

Την τελευταία δεκαετία μεγάλος αριθμός βενζαλδεΐδών και παραγώγων τους έχουν απομονωθεί από φυτά και έχουν χαρακτηριστεί ως ικανοί αναστολείς τυροσινάσης, όπως: βενζοϊκό οξύ, βενζαλδεΐδες, ανισικικό οξύ, ανισαλδεΐδη, κινναμωμικό οξύ, και μεθοξυ-κινναμωμικό οξύ από τις ρίζες του *Pulsatilla cernua*, 4-υποκατεστημένες-αλδεΐδες, 4-μεθοξυ-2-υδροξυ-βενζαλδεΐδες από τις ρίζες *Mondia whitei* π-κουμαρικό οξύ από τα φύλλα of *Panax ginseng*, υδροξυκινναμύλο-παράγωγα, από κόκκους καφέ κ.α. Στις αλδεΐδες η ανασταλτική δράση αποδίδεται στην ικανότητα δημιουργίας εκ μέρους της αλδεΐδομάδας μιας βάσης Schiff με την πρωτοταγή αμινομάδα του ενζύμου. Στην περίπτωση των παραγώγων οξέων ο μηχανισμός της ανασταλτικής τους δράσης περιλαμβάνει το σχηματισμό ενός συμπλόκου οξέος-χαλκού στο ενεργό κέντρο του ενζύμου. Υποκατάσταση στην πάρα θέση του φαινολικού δακτυλίου έδειξε αύξηση αναστολής. Γενικά, οι ομάδες αυτές παρουσιάζουν ασθενή μέχρι μέτρια αναστολή.

Αξίζει να σημειωθεί πως το γαλλικό οξύ το οποίο έχει απομονωθεί από πολλά φυτά, παρουσιάζει αρκετά καλή δράση, χαμηλότερη όμως του kojic acid (Seo S.Y. et al., 2003, Chang T.S., 2009, Kim Y.J, 2007, Masuda T. et al., 2007, Lall N. 2008).

1.4.3 ΑΓΓΕΙΟΓΕΝΕΣΗ

Ο όρος αγγειογένεση αναφέρεται στη διαδικασία δημιουργίας νέων αιμοφόρων αγγείων, τα οποία διατρέχουν πρακτικά όλα τα όργανα του ανθρώπινου σώματος διασφαλίζοντας τη μεταβολική ομοιόσταση με την προσφορά οξυγόνου και θρεπτικών συστατικών και την παράλληλη απομάκρυνση των άχρηστων προϊόντων. Επομένως δεν αποτελεί έκπληξη το γεγονός ότι τα αγγεία είναι απαραίτητα για την ανάπτυξη των οργάνων στα έμβρυα και για διάφορες βιολογικές διεργασίες στους ενήλικες, στις οποίες περιλαμβάνονται από την επούλωση των πληγών και την φυσιολογία του εμμηνορροϊκού κύκλου στις γυναίκες ως και την υποβοήθηση της κυκλοφορίας στην καρδιακή ισχαιμία. Αξιοσημείωτο είναι ωστόσο το γεγονός ότι η μη ισορροπημένη αγγειογένεση συμβάλλει στην παθογένεια μιας σειράς παθήσεων. Ανώμαλη αγγειογένεση έχουμε όταν το σώμα χάνει τον έλεγχο με αποτέλεσμα την υπερβολική ή την ανεπαρκή ανάπτυξη των αιμοφόρων αγγείων. Για παράδειγμα, καταστάσεις όπως το έλκος του στομάχου, τα εγκεφαλικά επεισόδια και οι καρδιακές προσβολές μπορεί να γίνουν πιο περίπλοκες από την απουσία της αγγειογένεσης που κανονικά είναι απαραίτητη για την φυσική επούλωση. Από την άλλη μεριά, η υπερβολική δημιουργία και διασπορά αιμοφόρων αγγείων μπορεί να ευνοήσει την ανάπτυξη του όγκου και των μεταστάσεων, την τύφλωση και την αρθρίτιδα. Είναι ευρέως αποδεκτό ότι η αγγειογένεση στην περίπτωση όγκων έχει ιδιαίτερη σημασία για την ανάπτυξη στερεών όγκων πέρα από ένα όριο μεγέθους (περίπου 2mm) και για την μεταστατική εξάπλωσή τους. Ενώ η σημασία της αγγειογένεσης σε συμπαγείς όγκους είναι προφανής, έχει αναφερθεί τελευταία ότι ίσως παίζει ρόλο και στις αιματολογικές κακοήθειες, όπως είναι οι λευχαιμίες και μυελοδυσπλαστικά σύνδρομα.



Ασθένειες σχετικές με τη μη φυσιολογική αγγειογένεση

Περισσότερες προσπάθειες για την επαγωγή ή της αναστολή της αγγειογένεσης στο παρελθόν είχαν εστιαστεί στον αγγειογενετικό παράγοντα VEGF, με αποτέλεσμα την επικράτηση διαφόρων φαρμάκων για τη θεραπεία του καρκίνου

και παθήσεων των οφθαλμών. Ως παράδειγμα αναφέρεται η ουσία ‘bevacizumab’ η οποία είναι ένα γενετικά ανθρωποποιημένο μονοκλωνικό αντίσωμα ανοσοσφαιρίνης G₁, το οποίο μπλοκάρει τον VEGF υποδοχέα στα ενδοθηλιακά κύτταρα, με αποτέλεσμα τη διακοπή της αιμάτωσης του όγκου. Αν και το αντίσωμα αυτό αυξάνει τη βιοσιμότητα για κάποιους ασθενείς, κλινικά στοιχεία έχουν φανερώσει τόσο την πιθανότητα ανάπτυξης αντοχής στην VEGF-στοχευμένη θεραπεία όσο και την εμφάνιση μιας σειράς παρενεργειών, όπως η λευκοπενία, η διάρροια, ο μεγάλος κίνδυνος θρομβώσεων, η θανατηφόρα αιμορραγία (και σπλαχνική διάτρηση). Ως εκ τούτου είναι επιτακτική η ανάγκη για την ανεύρεση και άλλων αναστολέων της αγγειογένεσης. Τελευταία, έχει μελετηθεί εκτενώς η αντιαγγειογενετική δράση ενώσεων που προέρχονται από φυτά. Συγκεκριμένα έχει δειχθεί ότι διάφοροι από αυτούς τους παράγοντες στοχεύουν και αναστέλλουν σε διαφορετικά επίπεδα την αγγειογένεση συμπεριλαμβανομένης της σηματοδότησης της έναρξής της, η οποία ξεκινάει από τα καρκινικά κύτταρα. Είναι προφανές πως υπάρχει μεγάλη ανάγκη ανεύρεσης και ανάπτυξης νέων αντιαγγειογενετικών παραγόντων με στόχο τη θεραπευτική αντιμετώπιση πληθώρας ασθενειών όπως καρκίνου, ρευματοειδούς αρθρίτιδας, ψωρίασης, διαβήτη κ.α. Από την άλλη πλευρά, αγγειογενετικοί παράγοντες, που επάγουν την ανάπτυξη αγγείων θα μπορούσαν να παίξουν ρόλο κλειδί στην αντιμετώπιση καρδιαγγειακών νοσημάτων. Συνεπώς το ενδιαφέρον επικεντρώνεται στην ανεύρεση νέων αγγειορυθμιστικών παραγόντων (με ανασταλτική ή επαγωγική δράση) που είτε φυσικών προϊόντων είτε συνθετικών αναλόγων (Carmeliet, 2000).

2^ο ΚΕΦΑΛΑΙΟ – ΠΡΟΣΩΠΙΚΑ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

2.1 ΣΥΝΘΕΣΗ ΑΝΑΛΟΓΩΝ ΔΕΟΞΥΒΕΝΖΟΙΝΩΝ

2.1.1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ

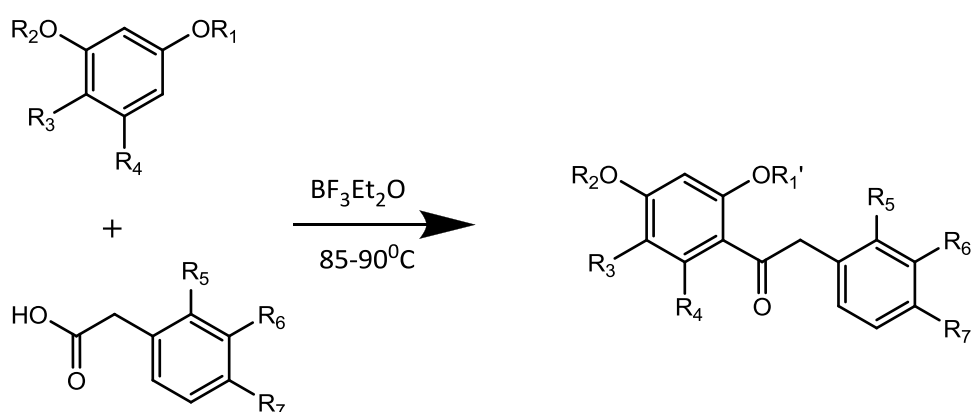
Οι δεοξυβενζοΐνες όπως έχει ήδη αναφερθεί, είναι φυσικά προϊόντα που απομονώνονται από χερσαίους αλλά και θαλάσσιους οργανισμούς και παρουσιάζουν ιδιαίτερα πλούσιο βιολογικό ενδιαφέρον. Οι δεοξυβενζοΐνες είναι μόρια με γνωστή συνθετική παρασκευή, που έχουν μελετηθεί ευρέως με βάση τη διεθνή βιβλιογραφία, και έχουν συντεθεί παλαιότερα και από το εργαστήριό μας. Επίσης, αποτελούν πρόδρομα μόρια σύνθεσης των ισοφλαβονών, και το βασικό σκελετό για τη δημιουργία διαφόρων παραγώγων, όπως αλκοολικών παραγώγων και διϋδροστιλβενίων τα οποία και μελετώνται στην παρούσα εργασία.

Επομένως όλοι οι παραπάνω λόγοι μας οδήγησαν στην ανάγκη σύνθεσης μίας σειράς αναλόγων των δεοξυβενζοΐνών με ποικίλους υποκαταστάτες.

2.1.2 ΣΥΝΘΕΣΗ ΔΕΟΞΥΒΕΝΖΟΪΝΩΝ

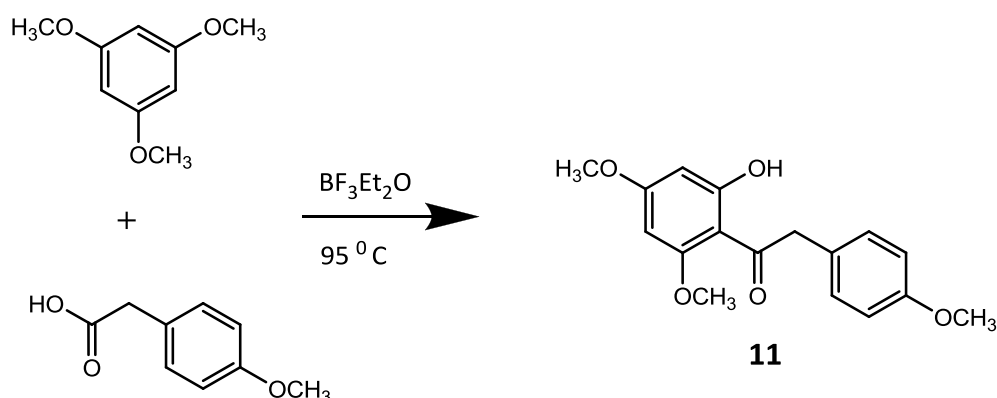
Γενικά για τη σύνθεση των απαραίτητων υποκατεστημένων δεοξυβενζοϊνών, χρησιμοποιήθηκε η αντίδραση ακυλίωσης Friedel-Crafts (αντίδραση ηλεκτρονιόφιλης προσθήκης) της ρεσορκινόλης (ή 5-χλώρο-ρεσορκινόλης) από ένα υποκατεστημένο φαινυλοξικό οξύ παρουσία $\text{BF}_3\text{Et}_2\text{O}$ όπου δρα σαν καταλύτης αλλά και σαν διαλύτης της αντίδρασης. Το γενικό σχήμα παρασκευής τους περιγράφεται παρακάτω και για την παρασκευή όλων των παραγώγων που περικλείονται στον πίνακα ακολουθήθηκε η ίδια διαδικασία, η οποία περιγράφεται αναλυτικά στο πειραματικό μέρος (Ng et al., 2009, Wahala and Hase, 1991, Goto et al., 2009).

ΓΕΝΙΚΟ ΣΥΝΘΕΤΙΚΟ ΣΧΗΜΑ



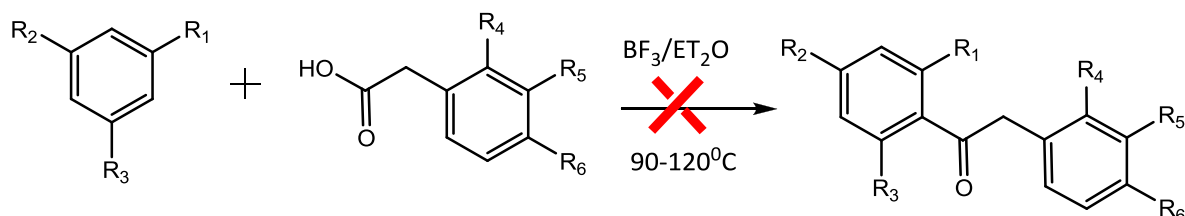
ΠΡΟΪΟΝ	R_1	$\text{R}_{1'}$	R_2	R_3	R_4	R_5	R_6	R_7
1	H	H	H	H	H	H	H	OH
2	H	H	H	H	H	H	H	Br
3	H	H	H	H	H	H	H	NO_2
4	H	H	H	Cl	H	H	H	OH
5	H	H	H	H	H	H	H	OCH_3
6	H	H	H	Cl	H	H	OH	OH
7	H	H	H	H	H	H	H	F
8	H	H	H	H	H	Cl	H	H
9	H	H	H	H	H	H	H	Cl
10	H	H	H	H	H	H	Br	H
11	OCH_3	OH	OCH_3	H	OCH_3	H	H	OCH_3

Ενδεικτικά περιγράφεται η σύνθεση της δεοξυβενζοΐνης (**11**) για την παρασκευή της οποίας χρησιμοποιήθηκε ισομοριακή ποσότητα 1,3,5-τριμεθοξυβενζολίου και 4-μεθοξυφαινυλοξικού οξέος, σε τριπλάσια περίσσεια $\text{BF}_3\text{-Et}_2\text{O}$ σε ατμόσφαιρα αζώτου. Το μίγμα θερμάνθηκε σε ελαιόλουτρο στους 95°C υπό συνεχή ανάδευση για 2 ώρες, έως ότου σταμάτησε να παρατηρείται κατανάλωση των αντιδρώντων. Ακολούθησε επεξεργασία της αντίδρασης, απόχυση σε παγόνερο, διαδοχικές εκχυλίσεις με EtOAc και συλλογή και συμπύκνωση των συλλεχθέντων οργανικών φάσεων.



Αξίζει να σημειωθεί πως η συγκεκριμένη αντίδραση παρασκευής της δεοξυβενζοΐνης (**11**) πραγματοποιήθηκε και σε συσκευή μικροκυμάτων με σκοπό κυρίως την αύξηση της απόδοσης του επιθυμητού προϊόντος αλλά και τη μείωση του χρόνου αντίδρασης. Ενώ ο χρόνος αντίδρασης με τη χρήση ακτινοβολίας μειώθηκε σημαντικά (μερικά λεπτά), η απόδοση της αντίδρασης κυμάνθηκε στα ίδια επίπεδα.

Παρακάτω αναφέρονται κάποιες προσπάθειες σύνθεσης δεοξυβενζοΐνών που δεν απέδωσαν τον επιθυμητό αποτέλεσμα.



- $\text{R}_1=\text{R}_2=\text{OH}$, $\text{R}_4=\text{Br}$, $\text{R}_3=\text{R}_5=\text{R}_6=\text{H}$
- $\text{R}_1=\text{R}_2=\text{R}_3=\text{R}_6=\text{OH}$, $\text{R}_4=\text{R}_5=\text{H}$
- $\text{R}_1=\text{R}_2=\text{R}_3=\text{OH}$, $\text{R}_4=\text{R}_6=\text{OCH}_3$, $\text{R}_5=\text{H}$
- $\text{R}_1=\text{R}_2=\text{R}_3=\text{R}_4=\text{R}_6=\text{OCH}_3$, $\text{R}_5=\text{H}$
- $\text{R}_1=\text{R}_2=\text{R}_3=\text{OCH}_3$, $\text{R}_4=\text{H}$, $\text{R}_5=\text{R}_6=\text{OH}$

2.2 ΣΥΝΘΕΣΗ ΠΑΡΑΓΩΓΩΝ ΤΩΝ ΔΕΟΞΥΒΕΝΖΟΙΝΩΝ

2.2.1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Όπως έχει ήδη αναφερθεί, σκοπός αυτής της εργασίας είναι η συνθετική παρασκευή διαφόρων ομάδων μορίων που μπορούν εύκολα να προκύψουν από τις δεοξυβενζοΐνες, η συγκριτική μελέτη της βιολογικής τους δραστηριότητας και το κατά πόσο αυτή επηρεάζεται από τις διαφορετικές λειτουργικές ομάδες σε κάθε περίπτωση. Τα παράγωγα που επιλέχθηκαν να συντεθούν και να μελετηθούν είναι οι αλκοόλες, τα διϋδροστιλβένια και οι ισοφλαβόνες, στις οποίες θα αναφερθούμε στο επόμενο υποκεφάλαιο. Το γεγονός που μας οδήγησε σε αυτές τις κατηγορίες μορίων, είναι αρχικά η διαπίστωση με βάση τη βιβλιογραφία πως ίσως θα εμφανίζουν αρκετά καλή δραστηριότητα στους στόχους που επιθυμούμε και η σχετικά εύκολη δυνατότητα συνθετικής τους παρασκευής από τους βασικούς μας σκελετούς.

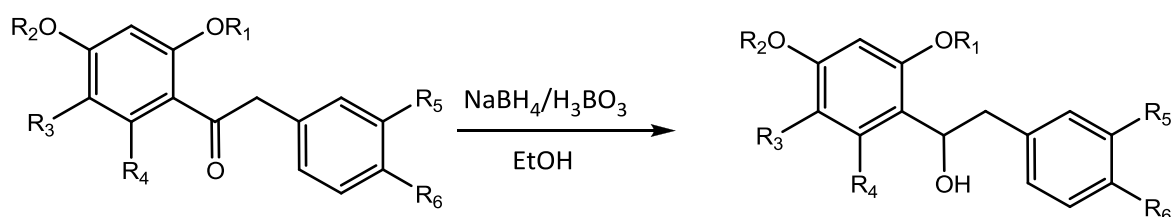
Στην περίπτωση των αλκοολικών παραγώγων (2.2.2), μελέτες έχουν δείξει πως η προσθήκη πολικών ομάδων σε αυτές τις κατηγορίες μορίων αυξάνει κατά πολύ τη δραστηριότητά τους (φυτοιστρογονικότητα), και επίσης υπάρχουν ελάχιστες βιβλιογραφικές αναφορές ως προς τη συνθετική τους παρασκευή και τη μελέτη της βιολογικής τους δράσης.

Στην περίπτωση των διϋδροστιλβενίων (2.2.3), είναι μια ομάδα μορίων η οποία σε συνδυασμό με τα στιλβένια, είναι αρκετά μελετημένη καθώς αποτελούν δυο πολύ σημαντικές κατηγορίες φυσικών προϊόντων που απαντώνται σε πλήθος φυτικών οργανισμών και εμφανίζουν ένα ιδιαίτερος ευρύ φάσμα δράσεων. Το γεγονός αυτό, η ομοιότητα στη δομή των διϋδροστιλβενίων με τις δεοξυβενζοΐνες και η έλλειψη βιβλιογραφικών αναφορών σε σχέση με τη συνθετική τους παρασκευή μέσω αυτών, μας οδήγησε σε αυτή την επιλογή.

2.2.2 ΣΥΝΘΕΣΗ ΑΛΚΟΟΛΙΚΩΝ ΠΑΡΑΓΩΓΩΝ

Για τη σύνθεση των παραγώγων αυτών στηριχθήκαμε σε μια αντίδραση αναγωγής δεοξυβενζοϊνών **1,2,4,5,6** και **11**. Η αντίδραση αναγωγής κετονών θεωρείται μια από τις συνηθέστερες αντιδράσεις πυρηνόφιλης προσθήκης. Το γενικό σχήμα συνθετικής παρασκευής των αλκοολικών παραγώγων περιγράφεται παρακάτω, ενώ για τη δημιουργία όλων των παραγώγων που αναγράφονται στον πίνακα χρησιμοποιήθηκαν οι ίδιες συνθήκες (Mohanazadeh F. et al, 2005, Cho B.C. et al, 2006).

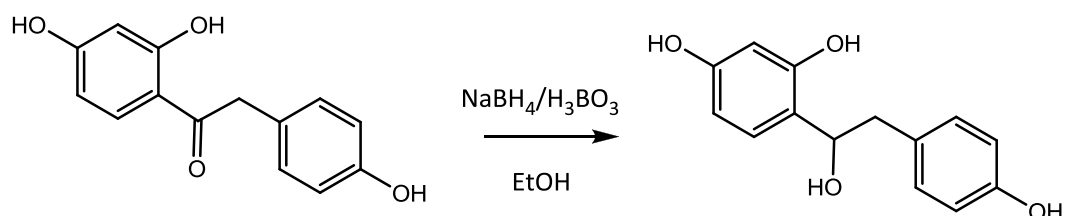
ΓΕΝΙΚΟ ΣΥΝΘΕΤΙΚΟ ΣΧΗΜΑ



R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅	R ₆
H	H	H	H	H	OH
H	H	H	H	H	Br
H	H	H	H	H	OCH ₃
H	H	Cl	H	H	OH
H	H	Cl	H	OH	OH
CH ₃	CH ₃	H	OH	H	OCH ₃

Ενδεικτικά περιγράφεται η σύνθεση του πρώτου προϊόντος με βάση τον πίνακα ,1-(2,4-διυδροξυφαινυλ)-2-(4'-υδροξυφαινυλ)-αιθανόλης, για την παρασκευή του οποίου χρησιμοποιήθηκαν 100 mg δεοξυβενζοϊνης (**1**), πενταπλάσια περίσσεια αναγωγικού μέσου NaBH₄ και πενταπλάσια περίσσεια H₃BO₃ σε 2ml EtOH. Το μίγμα

αφέθηκε υπό ανάδευση σε θερμοκρασία δωματίου έως ότου καταναλώθηκε πλήρως το αντιδρών, ακολούθησε επεξεργασία της αντίδρασης, προσθήκη κορεσμένου υδατικού διαλύματος NaHCO_3 στο μίγμα της αντίδρασης, διαδοχικές εκχυλίσεις με EtOAc και τέλος συλλογή και συμπύκνωση των συλλεχθέντων οργανικών φάσεων.

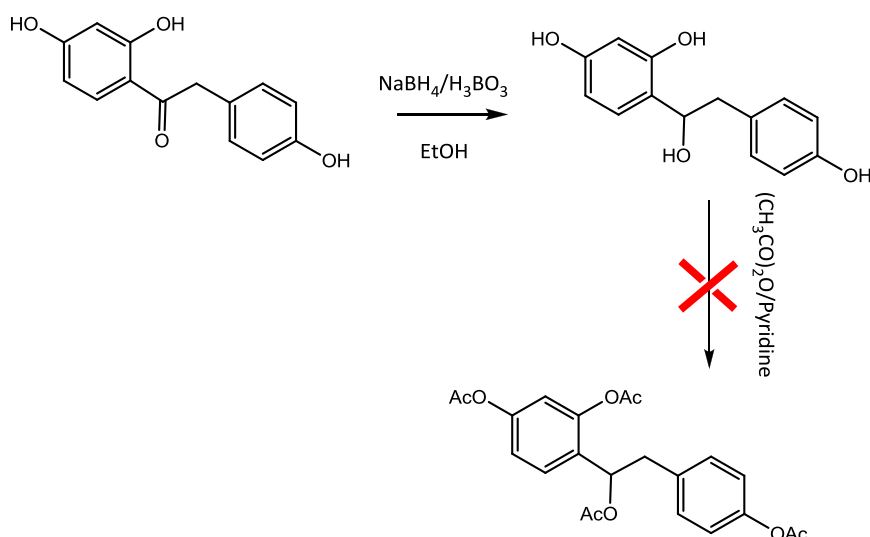


Όπως σε όλες τις αντιδράσεις, έτσι και σε αυτή την περίπτωση ο έλεγχος της πορείας της αντίδρασης έγινε με τη βοήθεια της χρωματογραφίας λεπτής στοιβάδος. Αμέσως μετά την ολοκλήρωση της αντίδρασης το χρωματογράφημα του προϊόντος έδινε μια πολύ ξεκάθαρη και ευκρινή κηλίδα στην πλάκα TLC η οποία απορροφούσε και στα 2 μήκη κύματος στα 254nm και 366 nm και στη συνέχεια εμφανιζόταν με ψεκασμό με διάλυμα θειϊκής βανιλίνης. Η ταυτοποίηση της δομής του έγινε με τη βοήθεια πειράματος NMR μίας διάστασης (^1H NMR). Μετά την πάροδο κάποιων ημερών και ενώ το προϊόν φυλασσόταν σε πολύ χαμηλή θερμοκρασία ($-20\text{ }^\circ\text{C}$), ο έλεγχος με TLC φσνέρωσε μια εικόνα διάσπασης του προϊόντος (χωρίς να μεταπίπτει σε κάποιο άλλο συγκεκριμένο προϊόν), γεγονός που επιβεβαιώθηκε και από το φάσμα NMR. Επανελέγχος σε όλα τα αλκοολικά παράγωγα του πίνακα που είχαν παρασκευαστεί έδωσε δυστυχώς τα ίδια αποτελέσματα. Αξίζει να σημειωθεί πως στις περισσότερες περιπτώσεις δεν προλάβαμε να κάνουμε ούτε πείραμα NMR καθώς τα προϊόντα, με βάση το χρωματογράφημα της TLC, είχαν ήδη διασπαστεί.

Οι αντιδράσεις αναγωγής επαναλήφθηκαν με μικρές τροποποιήσεις στις πειραματικές συνθήκες, όπως μικρότερη περίσσεια αναγωγικού μέσου, αλλαγή διαλύτη της αντίδρασης, διαφορετική επεξεργασία της αντίδρασης, οι οποίες πάλι κατέληγαν στο σχηματισμό του επιθυμητού προϊόντος και μετά από λίγες ημέρες ή ώρες στη διάσπασή αυτού. Τροποποιήσεις έγιναν και στις συνθήκες αποθήκευσης των αλκοολικών παραγώγων (π.χ. υπό ατμόσφαιρα αζώτου), χωρίς όμως να παρατηρείται κάποια διαφορά στη συμπεριφορά των προϊόντων αυτών.

Καταλήξαμε λοιπόν στο συμπέρασμα πως πρόκειται για ιδιαίτερος ασταθή παράγωγα, και έγινε μια τελευταία προσπάθεια σύνθεσης των αλκοολικών παραγώγων η οποία στηριζόταν στην άμεση ακετυλίωσή τους μετά το σχηματισμό τους. Επομένως, 100 mg της δεοξυβενζοΐνης (1) διαλύθηκαν σε 3 ml EtOH και

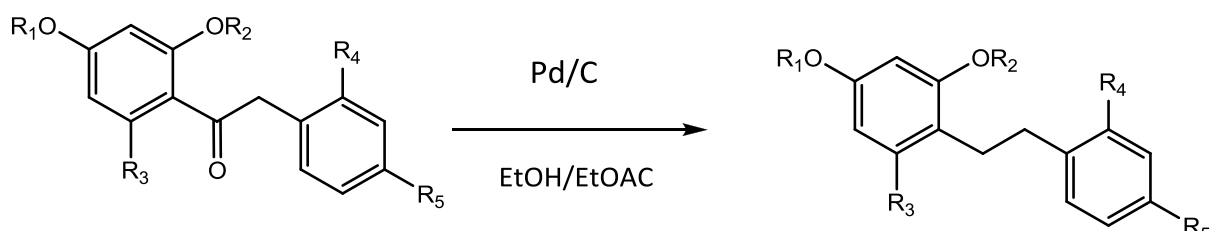
ακολούθησε σταδιακή προσθήκη πενταπλάσιας περίσσειας NaBH_4 και πενταπλάσιας περίσσειας H_3BO_3 . Η αντίδραση αφέθηκε υπό ανάδευση για 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου. Ακολούθησε προσθήκη κορεσμένου υδατικού διαλύματος NaHCO_3 στο μίγμα της αντίδρασης και διαδοχικές εκχυλίσεις με EtOAc . Οι οργανικές φάσεις συλλέχθηκαν και εκπλύθηκαν μια φορά με νερό και μια φορά με υδατικό διάλυμα χλωριούχου νατρίου. Ακολούθησε εξάτμιση της οργανικής φάσης με τη χρήση υψηλού κενού και το στερεό υπόλειμμα υποβλήθηκε αμέσως σε αντίδραση ακετυλίωσης, αφού επιβεβαιώθηκε πως είναι το επιθυμητό προϊόν με την τεχνική της χρωματογραφίας λεπτής στοιβάδος. Το στερεό υπόλειμμα που παραλήφθηκε διαλύθηκε σε 1ml πυριδίνης και ακολούθησε προσθήκη 1ml οξεϊκού ανυδρίτη υπό ανάδευση, σε θερμοκρασία δωματίου. 1 ώρα μετά η TLC έδειξε πως άρχισε σχηματισμός προϊόντος και η αντίδραση αφήνεται για 24 ώρες. Η TLC μετά το τέλος της αντίδρασης έδειξε πλήρη διάσπαση του προϊόντος.



2.2.3 ΣΥΝΘΕΣΗ ΔΙΪΔΡΟΣΤΙΛΒΕΝΙΩΝ

Για τη σύνθεση των διϋδροστιλβενίων στηριχθήκαμε στην αντίδραση αναγωγής με καταλυτική υδρογόνωση της κετονομάδας ($-C=O$) σε αλκάνιο ($-CH_2$) των δεοξυβενζοϊνών (**1,2,4,5,7,8,9,11**). Στην περίπτωσή μας οι αντιδράσεις υδρογόνωσης πραγματοποιήθηκαν με καταλύτη Pd προσροφημένο σε ενεργό άνθρακα (Pd/C 10%), μίγμα διαλυτών EtOH/EtOAc και σε συσκευή ελεγχόμενης πίεσης. Το γενικό σχήμα παρασκευής των παραγώγων περιγράφεται παρακάτω.

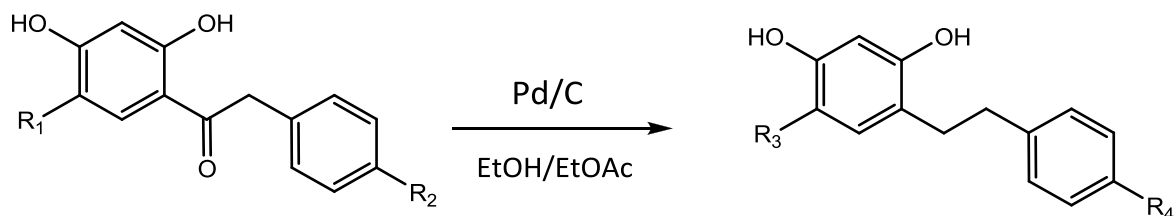
ΓΕΝΙΚΟ ΣΥΝΘΕΤΙΚΟ ΣΧΗΜΑ



ΠΡΟΙΟΝ	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅
12	H	H	H	H	OH
13	H	H	H	H	OCH ₃
14	H	H	H	H	F
15	H	H	H	Cl	H
16	CH ₃	CH ₃	OH	H	OCH ₃

Στις τρεις περιπτώσεις που ακολουθούν, δεν καταφέραμε να παραλάβουμε τα αντίστοιχα υδρογονωμένα παράγωγα των αρχικών δεοξυβενζοϊνών καθώς μάλλον οι έντονες συνθήκες της αντίδρασης οδήγησαν στην υδρογονόλυση των αλογόνων από τον αρωματικό πυρήνα (Xia C. et al, 2009). Παρ' όλα αυτά πραγματοποιήθηκε η αναγωγή της κετονομάδας, με αποτέλεσμα να παραλάβουμε στην περίπτωση της αναγωγής των 2,4-διϋδροξυ-4'-χλωροδεοξυβενζοϊνης (**9**) και 4'-βρωμο-2,4-διϋδροξυδεοξυβενζοϊνης (**2**) το 2,4-διϋδροξυδιϋδροστιλβένιο (**17**), ενώ στην

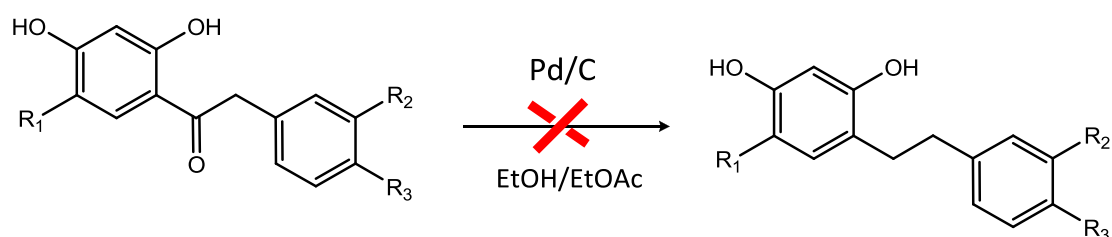
περίπτωση αναγωγής της 2,4,4'-τριϋδροξυ-5-χλώροδεοξυβενζοΐνης (**4**) το 2,4,4'-τριϋδροξυδιϋδροστιλβένιο (**12**), το οποίο παραλάβαμε και από την αναγωγή της 2,4,4'-τριϋδροξυδεοξυβενζοΐνης (**1**).



ΠΡΟΙΟΝ	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄
17	H	Cl	H	H
17	H	Br	H	H
12	Cl	OH	H	OH

Αξίζει να σημειωθεί πως τα παράγωγα των διϋδροστιλβενίων δεν τα παραλάβαμε ποσοτικά όπως θα περιμέναμε θεωρητικά. Ειδικότερα σε κάποιες περιπτώσεις χρειάστηκε να επαναληφθούν οι αντιδράσεις με περισσότερη ποσότητα καταλύτη και περισσότερη πίεση ώστε να παραλάβουμε το επιθυμητό προϊόν καθώς δεν προχωρούσε η αντίδραση, ενώ σε κάποιες άλλες περιπτώσεις χρησιμοποιήσαμε ηπιότερες συνθήκες καθώς δεν καταφέραμε να παραλάβουμε προϊόν, παρά μόνο προϊόντα διάσπασης. Μια πιθανή εξήγηση γι' αυτό το αποτέλεσμα είναι ίσως πως η διαδικασία αναγωγής μέσω της υδρογόνωσης γίνεται σε δυο στάδια και όχι ακαριαία. Η κετονομάδα αρχικά ανάγεται σε αλκοολομάδα και έπειτα σε αλκάνιο. Έτσι με βάση την παραπάνω παρατήρηση πως τα αλκοολικά παράγωγα είναι ιδιαίτερος ασταθή και σε συνδυασμό με τις έντονες συνθήκες κατά τις οποίες λαμβάνει χώρα η υδρογόνωση, δεν είναι εφικτή η πλήρης μετατροπή του αλκοολικού παραγώγου σε αλκάνιο. Έτσι εξηγούνται και διάφορα παραπροϊόντα διάσπασης που παρατηρούνται κατά τον χρωματογραφικό έλεγχο των αντιδράσεων της καταλυτικής υδρογόνωσης.

Παρακάτω ακολουθούν κάποιες προσπάθειες σύνθεσης διϋδροστιλβενίων που δεν απέδωσαν τον επιθυμητό αποτέλεσμα.



- R₁=R₃=H, R₂=Br
- R₁=R₂=H, R₃=Br
- R₁=Cl, R₂=R₃=OH
- R₁=R₂=H, R₃=NO₂

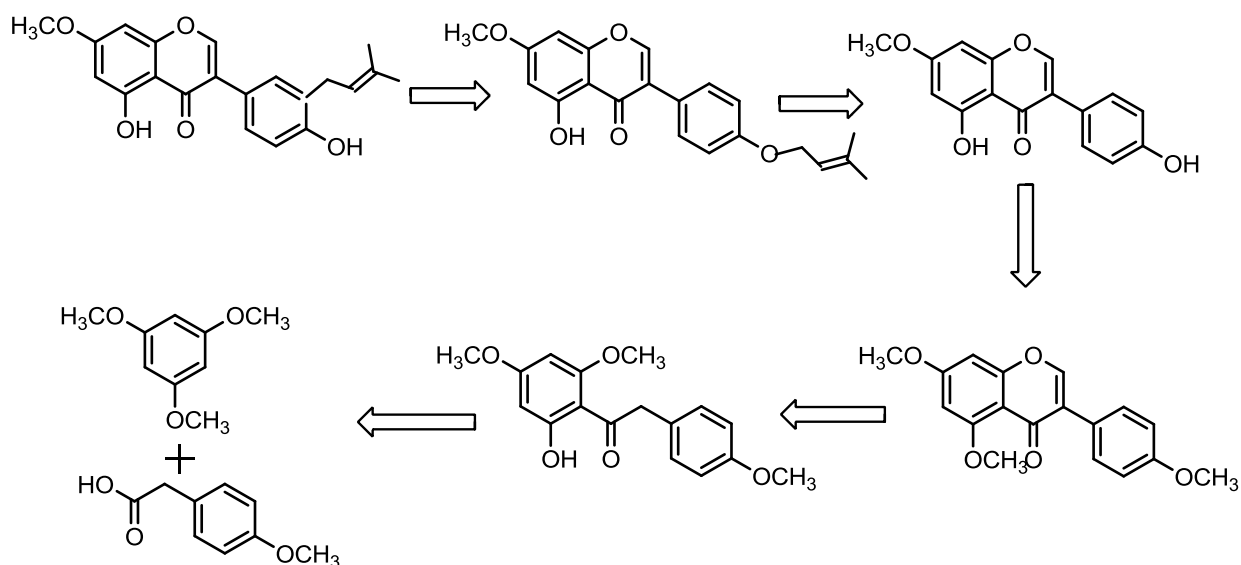
Οι αντιδράσεις αυτές πραγματοποιήθηκαν στις ίδιες συνθήκες με τις παραπάνω. Δηλαδή 100 mg της αντίστοιχης δεοξυβενζοΐνης διαλύθηκαν σε μίγμα διαλυτών EtOH/EtOAc 1/1 (15 ml), προστέθηκαν 55 mg καταλύτη Pd/C 10%, αποκαταστάθηκε η ατμόσφαιρα H₂ και η αντίδραση αφέθηκε για 6 ώρες. Μετά την επεξεργασία της αντίδρασης, δεν παρατηρήθηκε σχηματισμός προϊόντος παρά μόνο η αρχική δεοξυβενζοΐνη. Οι αντιδράσεις πραγματοποιήθηκαν με μεγαλύτερη ποσότητα καταλύτη και σε μεγαλύτερη πίεση αλλά αυτή τη φορά παρατηρήθηκαν μόνο προϊόντα διάσπασης και όχι το αντίστοιχο υδρογονωμένο παράγωγο της δεοξυβενζοΐνης.

2.3 ΣΥΝΘΕΣΗ ΑΝΑΛΟΓΩΝ ΙΣΟΦΛΑΒΟΝΩΝ

2.3.1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η τρίτη ομάδα που μελετάται στην παρούσα εργασία είναι οι ισοφλαβόνες, μια κατηγορία μορίων που απαντάται σε ανώτερα και κατά κύριο λόγο εδώδιμα φυτά. Οι ισοφλαβόνες με κυριότερους εκπροσώπους τη γενιστεΐνη, τη ντεντζεΐνη και τη βιοχανίνη είναι γνωστό πως αποτελούν μια από τις κυριότερες ομάδες φυτοοιστρογόνων. Θεωρείται πως κατέχουν κυρίαρχο ρόλο στην πρόληψη ορμονοεξαρτώμενων καρκίνων καθώς και καρδιαγγειακών νοσημάτων όταν προσλαμβάνονται μέσω της διατροφής.

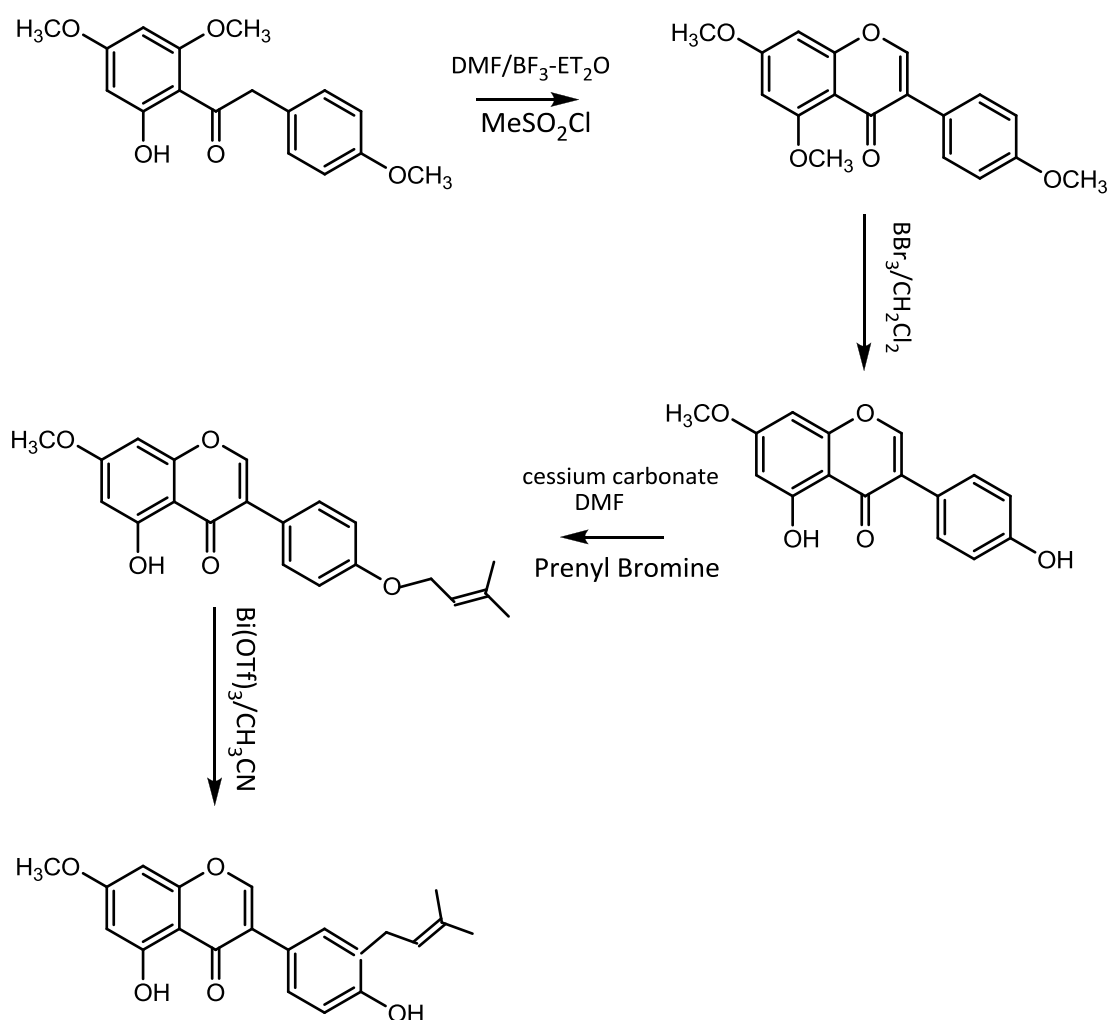
Ένας από τους στόχους της παρούσας εργασίας ήταν η συνθετική παρασκευή της 5,4'-διϋδροξυ-7-μεθοξυ-3'-πρενυλ-ισοφλαβόνης, η οποία έχει απομονωθεί από την ερευνητική μας ομάδα, από το φυτό *Erythrina roeppigiana* (*Fabaceae*) (Djiogue, S. et al, 2009) και παρουσίασε οιστρογονική δράση. Για τη σύνθεση της ισοφλαβόνης αποφασίσαμε να ακολουθήσουμε το δρόμο μέσω των δεοξυβενζοϊνών, καθώς όπως ήδη έχει αναφερθεί αποτελούν τα πρόδρομα μόρια σύνθεσης των ισοφλαβονών. Ο σχεδιασμός της συνθετικής πορείας που ακολουθήσαμε για τη σύνθεση του επιθυμητού προϊόντος απεικονίζεται στον παρακάτω *retro*-σχεδιασμό.



2.3.2 ΣΥΝΘΕΣΗ ΤΗΣ ΙΣΟΦΛΑΒΟΝΗΣ

Σκοπός μας ήταν ο σχεδιασμός μιας συνθετικής πορείας η οποία θα εξασφάλιζε τις μεγαλύτερες δυνατές αποδόσεις σε κάθε στάδιο και τα συντομότερα στάδια. Για το λόγο αυτό και παρ' ότι δοκιμάστηκαν διάφοροι τρόποι σύνθεσης, καταλήξαμε στην παρακάτω συνθετική πορεία, η οποία αποτελείται από πέντε στάδια.

ΣΥΝΘΕΤΙΚΟ ΣΧΗΜΑ



Στο πρώτο στάδιο της συνθετικής μας πορείας συντέθηκε η δεοξυβενζοΐνη (**11**), της οποίας η σύνθεση περιγράφεται στο υποκεφάλαιο 2.1.2.

Στο δεύτερο στάδιο ακολουθεί η σύνθεση της ισοφλαβόνης από τη δεοξυβενζοΐνη (**11**) με χρήση DMF, BF₃Et₂O και MeSO₂Cl. Με βάση αυτή τη μέθοδο παρασκευής η δεοξυβενζοΐνη, θερμαίνεται με BF₃Et₂O και DMF για λίγα λεπτά και ακολουθεί προσθήκη MeSO₂Cl. Η αντίδραση αφήνεται στους 85 °C, σε άνυδρες συνθήκες για 2 ώρες, μέχρις ότου δεν παρατηρείται αύξηση παραγωγής της ισοφλαβόνης (Goto H. et al, 2009, Fokialakis N. et al, 2004, Balasubramanian, S. et al, 2000, Chang Y.C. et al, 1994).

➤ Με σκοπό την αύξηση της απόδοσης της παραγωγής του επιθυμητού προϊόντος η αντίδραση αυτή επαναλήφθηκε και σε συσκευή μικροκυμάτων όπου πέρα από τη μείωση του χρόνου της αντίδρασης δεν παρατηρήθηκε αξιοσημείωτη διαφορά στην απόδοσή της.

➤ Επιπλέον έγινε απόπειρα σύνθεσης της ισοφλαβόνης σε ένα στάδιο, χωρίς να μεσολαβεί η απομόνωση της δεοξυβενζοΐνης σε συσκευή μικροκυμάτων. Επομένως, το 1,3,5-τριμεθοξυβενζόλιο και το 4-μεθοξυφαινυλοξικό οξύ, διαλύθηκαν σε BF₃Et₂O και η αντίδραση αφέθηκε για 10 λεπτά (T=95⁰C, P=150W) προς σχηματισμό της δεοξυβενζοΐνης. Έπειτα, αφού το μίγμα έφτασε σε θερμοκρασία δωματίου, προστέθηκε DMF και η αντίδραση αφέθηκε για 3 λεπτά (T=50⁰C, P=100W). Ακολούθησε προσθήκη MeSO₂Cl, και η αντίδραση αφέθηκε για 22 λεπτά (T=100⁰C, P=150W). Ακόμη και σε αυτή την περίπτωση η τελική απόδοση της αντίδρασης κυμάνθηκε στα ίδια επίπεδα με την αρχική.

Στο τρίτο στάδιο της συνθετικής πορείας, η 7,5,4'-τριμεθοξυισοφλαβόνη (**18**) υποβλήθηκε σε μια αντίδραση εκλεκτικής απομεθυλίωσης με BBr₃ σε διάλυμα CH₂Cl₂, με σκοπό την απομεθυλίωση των θέσεων (4'-5), όπου με βάση τη βιβλιογραφία απομεθυλιώνονται πρώτες, και καταλήξαμε στο σχηματισμό του επιθυμητού προϊόντος 7-μεθοξυ-5,4'-διϋδροξυισοφλαβόνης (**19**). Αξίζει να σημειωθεί πως από την αντίδραση αυτήν απομονώθηκαν και σε μικρές αποδόσεις τα παραπροϊόντα 7,5-μεθοξυισοφλαβόνη (**21**) και η 7,5,4'-τριϋδροξυισοφλαβόνη ή γενιστεΐνη (**20**) (Wilhelm H. et al, 2006, Miller C. et al, 2003, Horie T. et al, 1991).

Στο τέταρτο στάδιο της συνθετικής πορείας, περιγράφεται η αντίδραση πρενυλίωσης του υδροξυλίου της ισοφλαβόνης στην 4' θέση, με χρήση αναθρακικού κεσίου σαν σχετικά ήπια βάση για την απόσπαση του πρωτονίου του υδροξυλίου και περισσότερο διαλυτή σε οργανικού διαλύτες σε σχέση με το ανθρακικό κάλιο, DMF σαν διαλύτη και πρενυλοβρωμίδιο για την εισαγωγή της πρενυλομάδας. Και σε αυτή

την περίπτωση μετά το τέλος της αντίδρασης ανιχνεύτηκαν σε μικρά ποσοστά και τα παραπροϊόντα: 7-μεθοξυ-5-υδροξυ-6-πρενυλ-4'-πρενυλαιθέρας της ισοφλαβόνης (**24**), 7-μεθοξυ-5,4'-ισοφλαβονυλο-διπρενυλαιθέρας (**23**), 7-μεθοξυ-5-υδροξυ-8-πρενυλ-4'-πρενυλαιθέρας της ισοφλαβόνης (**25**). Η αντίδραση πρενυλίωσης του υδροξυλίου πραγματοποιήθηκε και με χρήση ανθρακικού καλίου, από την οποία παραλήφθηκε το επιθυμητό προϊόν 7-μεθοξυ-5-υδροξυ-4'-ισοφλαβονυλο-πρενυλαιθέρας (**22**) αλλά και το προϊόν 7-μεθοξυ-4'-υδροξυ-5-πρενυλαιθέρας της ισοφλαβόνης (**26**) (Mukherjee S. et al, 2001).

Στο πέμπτο στάδιο της συνθετικής μας πορείας περιγράφεται η αντίδραση μετάθεσης της πρενυλομάδας σε ortho-θέση, με χρήση Bismuthium triflate σε διαλύτη ακετονιτρίλιο, όπου και παραλήφθηκε το επιθυμητό προϊόν της 5,4'-διυδροξυ-7-μεθοξυ-3'-(3-μεθυλβουτεν-2-υλ) ισοφλαβόνης (**28**) (Sreedhar B. Et al, 2004). Εναλλακτικά σε μια άλλη προσπάθεια παραλαβής του επιθυμητού προϊόντος, στο στάδιο αυτό είχε χρησιμοποιηθεί N,N διαιθυλανιλίνη απ' όπου παραλάβαμε το προϊόν της 7-μεθοξυ-5-υδροξυ-3'-(3-μεθυλοβουτ-3-εν-2-υλ)ισοφλαβόνης (**27**) (Marvell E.N. et al, 1964, Hiersemman M. And Nubemmeyer Udo, Wilhelm H.et al, 2006, Miller C. et al, 2003).

2.4 ΒΙΟΛΟΓΙΚΕΣ ΔΡΑΣΕΙΣ

Στο κεφάλαιο αυτό παρουσιάζονται οι βιολογικοί στόχοι στους οποίους δοκιμάστηκαν τα συνθετικά παράγωγα που παρουσιάζονται στην παρούσα εργασία. Αφορούν σε θεωρητική μελέτη πρόσδεσης των αναλόγων με τον υποδοχέα οιστρογόνων και τυροσινάσης, μέτρηση ποσοστού αναστολής έναντι του ενζύμου τυροσινάσης και πρακαταρτικό έλεγχο σχετικά με τη δυνατότητα των μορίων να αναστέλλουν την αγγειογένεση.

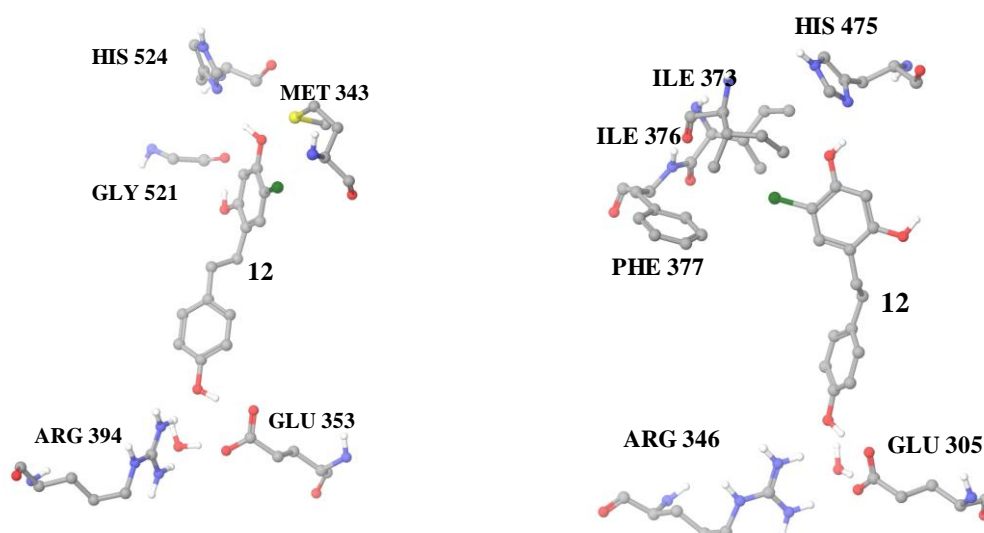
2.4.1. ΜΕΛΕΤΗ ΠΡΟΣΔΕΣΗΣ ΑΝΑΛΟΓΩΝ ΜΕ ΥΠΟΔΟΧΕΑ ΟΙΣΤΡΟΓΟΝΩΝ

Τα νέα μόρια που συντέθηκαν μελετήθηκαν και για την δυνατότητα σύνδεσης τους με τον υποδοχέα οιστρογόνων. Από πρόσφατη μελέτη (Fokialakis et al., 2004) στο εργαστήριό μας έχουμε ενδείξεις ότι τα ανάλογα (**1-11**) έχουν πιθανή αγωνιστική δράση αλλά χαμηλή συγγένεια με τον υποδοχέα οιστρογόνων. Αν και η βιολογική τους αποτίμηση είναι σε εξέλιξη, μια πρώτη υπολογιστική αξιολόγηση έγινε με την εφαρμογή εικονικής σάρωσης σε 2 κρυσταλλογραφικές δομές του υποδοχέα οιστρογόνων. Η πρώτη είναι η αγωνιστική διαμόρφωση του υποδοχέα οιστρογόνων ER α (κωδικός PDB 3ERD) (Shiau et al., 1998) σε σύμπλοκο με την διαιθυλστυλβεστρόλη (DES) και η δεύτερη είναι η μερική αγωνιστική διαμόρφωση του υποδοχέα οιστρογόνων ER β (κωδικός PDB 1QKM) (Pike et al., 1999) σε σύμπλοκο με το γνωστό φυτοοιστρογόνο γενιστεΐνη (GEN).

Η εικονική σάρωση έγινε με το λογισμικό Glide 3.5 (Friesner et al., 2004) το οποίο διατηρεί σταθερή τη δομή του υποδοχέα και βάζει τα μόρια σε διάφορες πιθανές θέσεις στο ενεργό κέντρο που έχει ορίσει ο χρήστης και αφού υπολογίσει την ενέργεια κάθε θέσης επιλέγει τη δομή του συμπλόκου με την χαμηλότερη ενέργεια. (Βλέπε πειραματικό μέρος). Όλα τα ανάλογα τοποθετήθηκαν στο ενεργό κέντρο σχηματίζοντας αλληλεπιδράσεις με τα αμινοξέα που είναι υπεύθυνα για την

αναγνώριση του προσδέματος όπως είναι η ιστιδίνη 524, η αργινίνη 394 και το ασπαρτικό οξύ 353. Ενδεικτικά φαίνονται στο σχήμα 1

οι δομές πρόσδεσης του αναλόγου **2,4,4'-τριϋδροξυ-5-χλωρο-διφαινυλαιθανίου** στον υποδοχέα οιστρογόνων ERα και ERβ.



Σχήμα 1: Δομή ολικού ελαχίστου έπειτα από υπολογισμού πρόσδεσης του αναλόγου **2,4,4'-τριϋδροξυ-5-χλωρο-διφαινυλαιθανίου** στο ενεργό κέντρο του ERα (A) και του ERβ (B) αντίστοιχα. Για λόγους ευκρίνειας μόνο τα σημαντικά αμινοξέα εμφανίζονται.

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

I. Υπολογισμοί Πρόσδεσης με σταθερή τη δομή του υποδοχέα (Rigid Docking)

Το λογισμικό Glide 3.5 αναπτύχθηκε από την εταιρεία SHRÖDINGER και στοχεύει στην γρήγορη εύρεση των πιθανών τοποθετήσεων ενός μορίου στο ενεργό κέντρο μιας πρωτεΐνης. Η πρωτεΐνη προσομιώνεται από σημεία στον χώρο σταθερής απόστασης το ένα από το άλλο, και έχουν συγκεκριμένες φυσικοχημικές ιδιότητες και υπολογίζονται οι αλληλεπιδράσεις ανάμεσα στα σημεία αυτά και στα μόρια που είναι υποψήφια για να συνδεθούν. Αρχικά επιλέγει διάφορες θέσεις του μορίου μέσα στο ενεργό κέντρο και ελέγχει αν είναι αποδεκτές με βάση τον όγκο του ενεργού κέντρου και των παρακείμενων αμινοξέων κάθε θέσης για κάθε διαμόρφωση ξεχωριστά. Το δεύτερο βήμα είναι ο έλεγχος της θέσης των πλέον απομακρυσμένων ατόμων (διάμετρος μορίου) της υπό μελέτη διαμόρφωσης. Αν υπάρχουν πολλές στερικές

παρεμποδίσσης τότε η διαμόρφωση απορρίπτεται. Έπειτα γίνεται περιστροφή γύρω από τον οριζόντιο και κάθετο άξονα του μορίου και βαθμολογούνται οι διαμορφώσεις με βάση τον αριθμό των δεσμών υδρογόνου που συμμετέχουν και των αλληλεπιδράσεων με μέταλλα της πρωτεΐνης. Αν η βαθμολογία είναι αρκετά καλή, βαθμολογούνται εκ νέου όλες οι δυνατές αλληλεπιδράσεις. Η βαθμολόγηση σε αυτά τα τρία στάδια γίνεται με βάση τον εμπειρικό αλγόριθμο ChemScore (Friesner R.A. et al ,2004)

II. Υπολογισμοί Πρόσδεσης με ευέλικτη δομή του υποδοχέα (Flexible Docking)

Για τους υπολογισμούς πρόσδεσης με το λογισμικό Macromodel 6.5 χρησιμοποιήθηκαν όλα τα αμινοξέα σε ακτίνα 12Å γύρω από το ενεργό κέντρο. Από αυτά μόνο τα αμινοξέα σε ακτίνα 6Å από το πρόσδεμα ήσαν ελεύθερα να κινηθούν κατά την διάρκεια των υπολογισμών. Όλα τα κρυσταλλογραφικά μόρια νερού αφαιρέθηκαν. Από τις τυχαίες δομές που προέκυψαν προς ελαχιστοποίηση οι μισές πρέκυψαν από τον αλγόριθμο Monte Carlo και οι υπόλοιπες από τον αλγόριθμο Low Mode Search. Σε κάθε διαμόρφωση που προέκυπτε, ακολουθούσε ελαχιστοποίηση της ενέργειας με τον μαθηματικό αλγόριθμο TNCG μέχρις ότου η κλίση της εξίσωσης της ενέργειας γίνει μικρότερη από 0.05 kJ/Å² mol. Μόνο οι δομές που είχαν ενέργεια μέχρι 10 kcal/mol από το ολικό ελάχιστο αποθηκεύτηκαν στο τέλος των υπολογισμών. Οι βαθμοί ελευθερίας σε κάθε βήμα Monte Carlo ήταν η σχετική θέση του προσδέματος ως προς την πρωτεΐνη καθώς και οι όλες οι διεδρες γωνίες του προσδέματος που δεν συμμετείχαν σε δακτυλίους. Η μεταβολή των διεδρων γωνιών ήταν τυχαία από 0° έως 180° ενώ η σχετική θέση του προσδέματος μεταβαλλόταν είτε με μετακίνηση στους τρεις καρτεσιανούς άξονες από 0 έως 0.5 Å είτε με περιστροφή από 0° έως 180°.

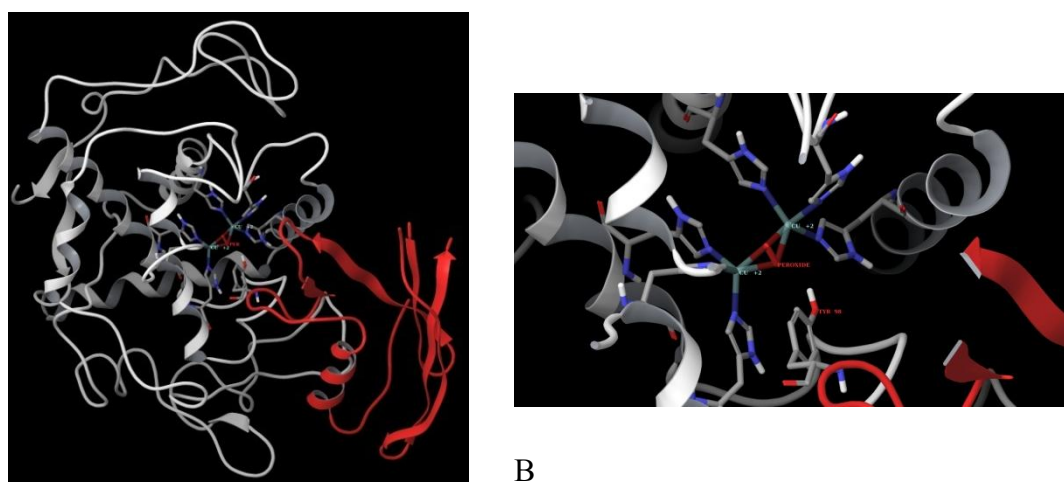
2.4.2 ΑΝΑΣΤΟΛΗ ΤΟΥ ΕΝΖΥΜΟΥ ΤΥΡΟΣΙΝΑΣΗ ΑΝΑΛΟΓΩΝ

2.4.2.A ΜΕΛΕΤΗ ΠΡΟΣΔΕΣΗΣ ΜΕ ΤΟΝ ΥΠΟΔΟΧΕΑ ΤΥΡΟΣΙΝΑΣΗΣ. ΣΧΕΣΗ ΔΟΜΗΣ – ΔΡΑΣΗΣ

Σε πρώτο επίπεδο έγινε μια θεωρητική μελέτη της πρόσδεσης των συνθετικών αναλόγων με τον υποδοχέα της τυροσινάσης και της επίδρασης των υποκαταστατών τους, με σκοπό τη διεξαγωγή συμπερασμάτων όσον αφορά στις σχέσεις δομής-δράσης.

Τυροσινάση

Η τυροσινάση ανήκει στην τύπου 3 οικογένεια των χαλκοπρωτεϊνών (Solomon E.I. et al, 1996). Περιέχει στο ενεργό της κέντρο 2 ιόντα Cu, το καθένα από τα οποία δημιουργεί χηλικό σύμπλοκο με 3 υπόλοιπα ιστιδίνης (σχήμα 2). Τα ιόντα χαλκού συμμετέχουν άμεσα στην υδροξυλίωση μονοφαινόλων σε *ο*-φαινόλες και στη συνέχεια στη μετατροπή των *ο*-φαινόλων σε *ο*-κινόνες. Η τυροσινάση είναι ευρέως διαδεδομένη στο ζωικό και φυτικό βασίλειο και για αυτό το λόγο συναντάται με αρκετές διαφορές ως προς την αλληλουχία των αμινοξέων της. Η τυροσινάση που χρησιμοποιήθηκε στις βιολογικές δοκιμασίες της παρούσας διατριβής προέρχεται από μανιτάρια (*Agaricus Bisporus*).



A

B

Σχήμα 2: A) Κρυσταλλογραφική δομή της Τυροσινάσης *Streptomyces*

Castaneoglobisporus παρουσία του φορέα ενεργοποίησης ORF378

Β) Λεπτομέρεια του ενεργού κέντρου, όπου φαίνεται το σύμπλοκο των δυο ιόντων Cu^{+2} με τις 6 ιστιδίνες, το O_2^{-2} του ενεργού κέντρου και το κατάλοιπο τυροσίνης του φορέα ORF378.

Η κρυσταλλογραφική δομή της τυροσινάσης των μανιταριών δεν έχει μέχρι σήμερα αποδοθεί ώστε να γνωρίζουμε την ακριβή τρισδιάστατη δομή της. Στην βιβλιογραφία έχουν αναφερθεί μόνο η κρυσταλλογραφική δομή της τυροσινάσης του *Streptomyces Castaneoglobisporus* (Matoba et al., 2006) και του *Bacillus megaterium* (Sendovski et al., 2004). Η λειτουργικότητα των συγκεκριμένων πρωτεϊνών είναι παρόμοια και έχουν αρκετή ομολογία, τόσο στο ενεργό τους κέντρο όσο και στην συνολική αλληλουχία. Πιο συγκεκριμένα η δομή της τυροσινάσης του στρεπτομύκητα σε σχέση με αυτή του μανιταριού εμφανίζει 21% ομοιότητα και 39% σχετικότητα στην ακολουθία των αμινοξέων (Sendovski et al., 2004).

Στην παρούσα εργασία με τη χρήση μοντέλων ομολογίας, δημιουργήσαμε την τρισδιάστατη δομή της τυροσινάσης των μανιταριών χρησιμοποιώντας ως πρότυπο την δομή από τον *Streptomyces Castaneoglobisporus* που έχει κωδικό στη Πρωτεϊνική Βάση Δεδομένων (Protein Data Bank) 1WX2 (<http://www.pdb.org>). Η αντιστοίχιση των αλληλουχιών φαίνεται στο σχήμα 3 (Takahashi et al., 2010). Για το μοντέλο ομολογίας χρησιμοποιήσαμε το λογισμικό MODELLER9v8 (Sali and Blundell, 1993)

```

1                               46
TY_SCA  MIVRKNQATLTADEKRRFVAAVLELKR-----GRYDEFVRTNNEFIM-----SDT
TY_MUS  VKNRLNIVDFVKNE-KFFTLVRSLELLQAKEQHDYSSFFOLAGIHGLPFTWAKERPSM
      :. * * . : . : * : * . * : . : : . * . : ..

47                               86
TY_SCA  DSG--ERTGHRSPSFLPWHRRLDDEQALOSVDSS-----VTLFYW
TY_MUS  NLYKAGYCTHGOVLPPTWHRTYLSVLEOILQGAIEVAKKFTSNQTDWVQAAQDLROPYW
      :      * . * .*** : * : ** * . . . : ***

87                               131
TY_SCA  DHS-----ADRTVRASLWAPDFLGGTGRSTDG-----RVMDGPPAASTGNWPINV
TY_MUS  DWGFELMPDDEVIKNEEVNITNYDGRKISVENPILRYHEHPIDPSFKPYG-DFATWRTTV
      ** . . * . : : . . * . * . . . * . . . . * . *

132                               183
TY_SCA  RVDS-RTYLRRSLG-----GSVABLEPTRAEVESVLAISAYDLPPYNSASE-GFRNHLEG
TY_MUS  RHPDR---NRREDIPGLIKK-MRLEEGQIREKTYNMLKFN---DAMERFSNHGISDDQHA
      * . ** . * * : . : : * : * : . . .

184                               237
TY_SCA  WRGVNLINRNVWVGG----QMAT-GVSENDVFNLIHAYVDKLAENQRHPDSAYVP
TY_MUS  NSLESVHDDIHMVGVGKIEGHMDHFFFAAFDPIFNLIHHTNVDRLLSLWKAINPDVWVTS
      . : * : ** * . : * . : . : ** : * * * : * : * : ** ..

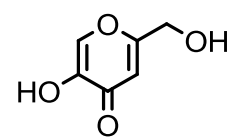
238                               273
TY_SCA  TGGTDPDVEDINETHKFWNT-VRPADLLDHTAYYTFDA
TY_MUS  GRNRDGT-MGIAINAQINSETPLEPFYQ-EGDKVWTS
      . . . . * : . . : : . . : :

```

Σχήμα 3:
Αντιστοίχιση αλληλουχίας Τυροσινάσης *Streptomyces Castaneoglobisporus* και *Agaricus Bisporus*

Kojic acid – Μηχανισμός Ανταγωνισμού Τυροσινάσης

Στην εργασία όπου αποδόθηκε η κρυσταλλογραφική δομή της τυροσινάσης του *Bacillus megaterium* (Sendovski et al., 2004), ένα από τα προσδέματα που συν-κρυσταλλώθηκε ήταν και το μόριο ανταγωνιστής Kojic Acid. Το Kojic acid αν και δεν φέρει χαρακτηριστική ομάδα καρβοξυλίου, συμπεριφέρεται ως οξύ καθώς το πρωτόνιο του OH δίπλα στην κετόνη είναι ελαφρώς όξινο με pKa 7.72 (Pirselova et al., 1997). Πιστεύεται ότι ο μηχανισμός δράσης του είναι η δημιουργία χηλικού συμπλόκου με τα ιόντα Cu και έτσι παρεμποδίζει την τυροσίνη να προσεγγίσει στο ενεργό κέντρο. Εντούτοις η κρυσταλλογραφική δομή της τυροσινάσης σε σύμπλοκο με το *kojic acid* έδειξε ότι συνδέεται αρκετά σταθερά με το εξωτερικό τμήμα του ενεργού κέντρου, γεγονός που δείχνει ένα σταθερό ενδιάμεσο σύμπλοκο. Έτσι οι συγγραφείς καταλήγουν στο συμπέρασμα ότι ο ακριβής μηχανισμός ανταγωνισμού του *kojic acid* είναι ακόμα υπό διερεύνηση. Επίσης μελέτες κινητικής του υποδοχέα της τυροσινάσης (Si, 2011) έχουν δείξει ότι ένας πιθανός μηχανισμός ανταγωνισμού είναι η ισχυρή πρόσδεση ενός μορίου στην είσοδο του ενεργού κέντρου που παρεμποδίζει την τυροσίνη ή την L-DOPA να προσεγγίσει το ενεργό κέντρο.



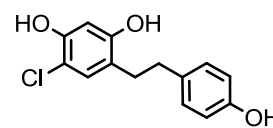
Kojic acid

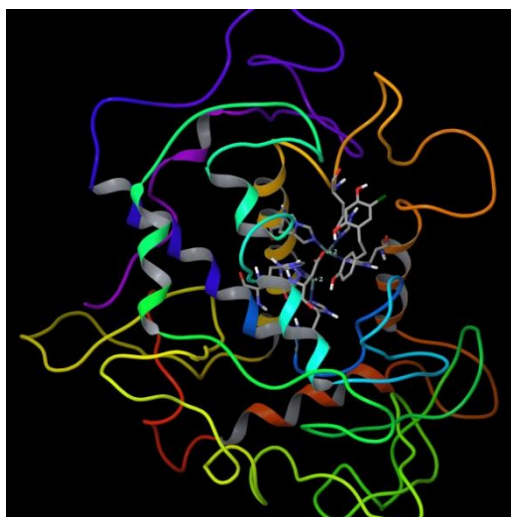
Σχέσεις Δομής Δράσης

Παρατήρηση ανάμεσα στις δομές των μορίων **1-17** και του ποσοστού ανταγωνισμού, μας αποκαλύπτει ότι τα μόρια που φέρουν καρβονύλιο στην πλευρική αλυσίδα (**1-11**) δεν έχουν καλή ανταγωνιστική δράση, με εξαίρεση ίσως το ανάλογο **7** ενώ όλα τα ανάλογα που δεν φέρουν το καρβονύλιο (**12-17**) έχουν πολύ καλή ανταγωνιστική δράση. Υπολογίζοντας την δομή ολικού ελαχίστου με τον αλγόριθμο Low Mode/Monte Carlo (Fokialakis et al., 2004) για τα ανάλογα **1-11** παρατηρούμε ότι το OH στη θέση 2 σχηματίζει ενδομοριακό δεσμό υδρογόνου με το καρβονύλιο, ενώ στα ανάλογα **12-17** απουσιάζει αυτός ο δεσμός. Επομένως είναι απαραίτητη η παρουσία του OH στη θέση 2 και πρέπει επίσης να είναι ελεύθερο να αλληλεπιδράσει με τον υποδοχέα.

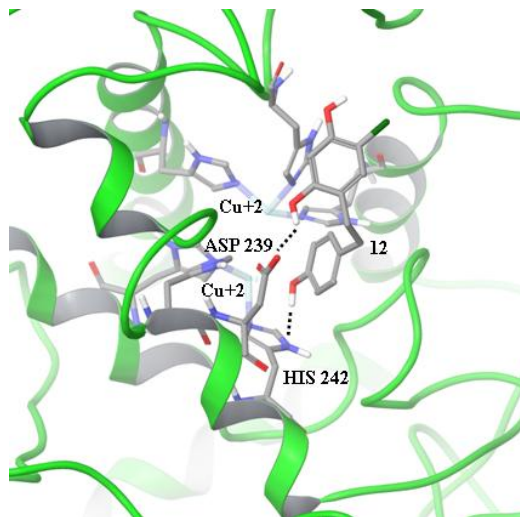
Υπολογισμοί Πρόσδεσης

Για να επιβεβαιώσουμε την υπόθεση αυτή έγιναν υπολογισμοί ευέλικτης πρόσδεσης (flexible docking, βλέπε πειραματικό μέρος) του αναλόγου **2,4,4'-τριϋδροξυ-5-χλωρο-διφαινυλαιθανίου** με τον υποδοχέα της τυροσινάσης που προέκυψε από τους υπολογισμούς ομολογίας, ώστε να διευκρινιστεί ο τρόπος σύνδεσης του μορίου με την πρωτεΐνη. Για την διερεύνηση όλων των πιθανών θέσεων του προσδέματος σε σχέση με τον υποδοχέα επιλέξαμε 1000 βήματα του αλγορίθμου Low mode/Monte Carlo (Lambrinidis et al., 2006) όπως εφαρμόζεται στο λογισμικό Macromodel 6.5 (Mohamadi et al., 1990). Σε κάθε δομή που προέκυψε ακολούθησε ελαχιστοποίηση της ενέργειας του συμπλόκου με χρήση του αλγορίθμου TNCG έως ότου η κλίση της εξίσωσης ενέργειας να γίνει μικρότερη από $0.05\text{kJ/mol}\cdot\text{\AA}$.





A



B

Σχήμα 4: Δομή ελάχιστης ενέργειας μετά από υπολογισμούς πρόσδεσης του αναλόγου **12** στο ενεργό κέντρο της τυροσινάσης μανιταριού.

Η δομή που προέκυψε από τους υπολογισμούς πρόσδεσης φαίνεται στο σχήμα 4. Παρατηρούμε ότι το ανάλογο **2,4,4'-τριϋδροξυ-5-χλωρο-διφαινυλαιθάνιο** δεν αλληλεπιδρά άμεσα με τα ιόντα Cu στο ενεργό κέντρο αλλά σχηματίζει αλληλεπιδράσεις με τα αμινοξέα που βρίσκονται στην είσοδο του ενεργού κέντρου. Η δομή αυτή βρίσκεται σε συμφωνία με πρόσφατη κρυσταλλογραφική δομή του προτύπου αναστολέα *Kojic Acid* σε σύμπλοκο με την τυροσινάση του *Bacillus Megaterium* που αναφέρθηκε προηγουμένως.

Το OH της θέσης 2 του αναλόγου σχηματίζει δεσμό υδρογόνου με το καρβοξύλιο του ασπαρτικού οξέως 239 που βρίσκεται κοντά στην είσοδο του ενεργού κέντρου του υποδοχέα, γεγονός που επιβεβαιώνει την αρχική μας υπόθεση για την σπουδαιότητα του για την εμφάνιση ισχυρού ανταγωνισμού. Επίσης το OH στη θέση 4' βρίσκεται 2.4Å από τον ιμιδαζολικό δακτύλιο της ιστιδίνης 242 και 3.1Å από το ένα ιόν Cu^{+2} , σχηματίζοντας ασθενέστερες ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις. Τέλος το OH στη θέση 4 δεν φαίνεται να σχηματίζει κάποια αξιοσημείωτη αλληλεπίδραση.

2.4.2.B ΜΕΤΡΗΣΗ ΠΟΣΟΣΤΟΥ ΑΝΑΣΤΟΛΗΣ ΤΥΡΟΣΙΝΑΣΗΣ

Το πρωτόκολλο που ακολουθήθηκε περιγράφεται παρακάτω:

Σε πλάκα 96 πηγαδιών, χρησιμοποιήθηκαν στο σύνολο 8 πηγάδια A (3 πηγάδια), B (1 πηγάδι), C (3 πηγάδια), D (1 πηγάδι) στα οποία τοποθετήθηκαν (Masuda et al., 2007 and 2008):

A: 120μl ρυθμιστικού διαλύματος phosphate buffer 1/15(NaH₂PO₄/Na₂HPO₄) και 40μl tyrosinase (92 units/ml) στο ίδιο ρυθμιστικό διάλυμα

B: 160μl ίδιου ρυθμιστικού διαλύματος

C: 80μl ίδιου ρυθμιστικού διαλύματος, 40μl δείγματος διαλυμένα στο ίδιο ρυθμιστικό διάλυμα και 40μl tyrosinase (92 units/ml) επίσης στο ίδιο ρυθμιστικό διάλυμα.

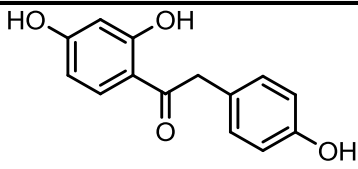
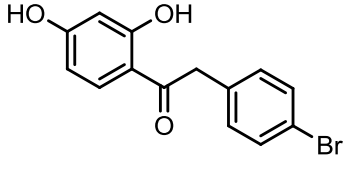
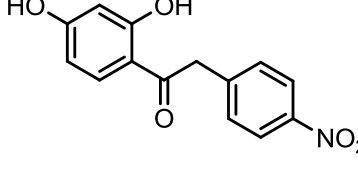
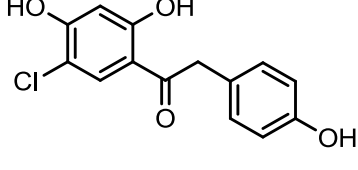
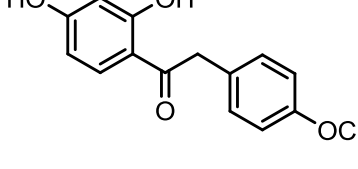
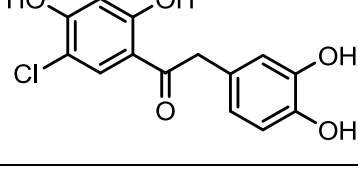
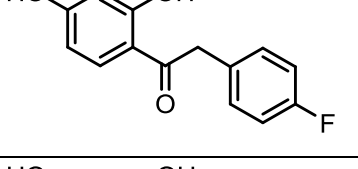
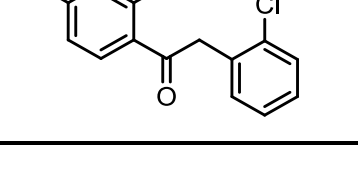
D: 120μl ίδιου ρυθμιστικού διαλύματος και 40μl δείγματος διαλυμένα στο ίδιο ρυθμιστικό διάλυμα.

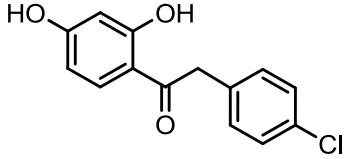
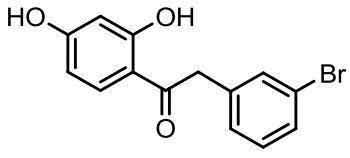
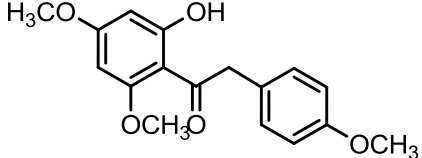
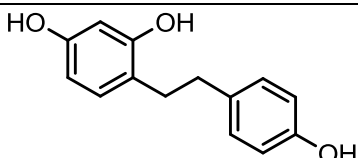
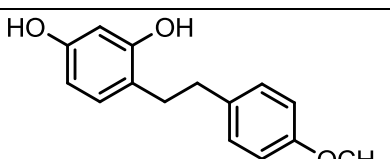
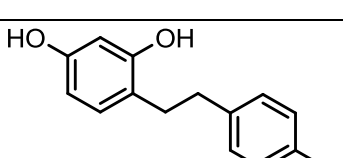
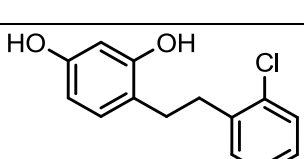
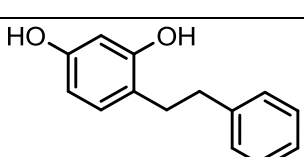
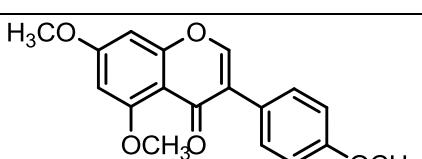
Τα δείγματα επώστηκαν στους 23⁰C για 10 λεπτά και ακολούθησε προσθήκη 40μl L-DOPA 2.5mM διαλυμένης στο ίδιο ρυθμιστικό διάλυμα, σε όλα τα πηγάδια. Ακολούθησε επώαση των δειγμάτων για 5 λεπτά στους 23⁰C και μετρήθηκε η απορρόφηση όλων των δειγμάτων στα 475nm. Το % ποσοστό της αναστολής υπολογίστηκε με βάση τον ακόλουθο τύπο

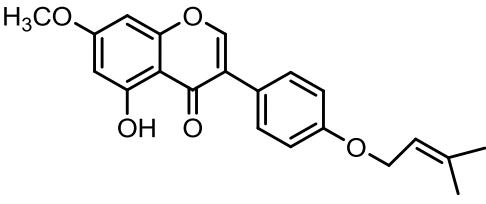
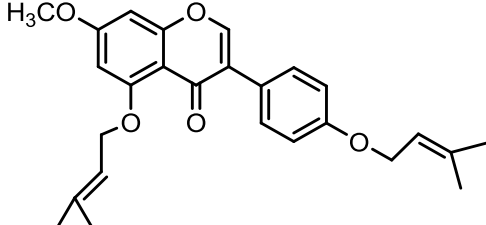
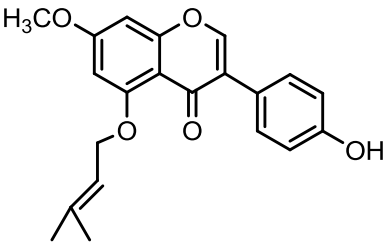
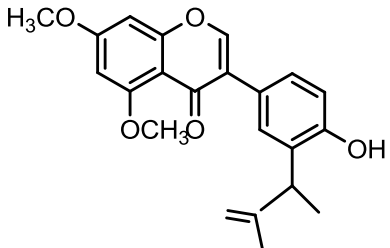
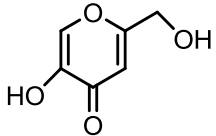
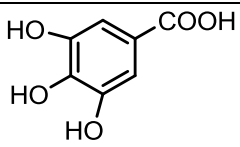
$$\% \text{ αναστολή} = \frac{(A - B) - (C - D)}{(A - B)} * 100$$

Η τελική συγκέντρωση του DMSO στα δείγματα δεν ξεπέρασε το 1% και σαν πρότυπες ουσίες αναφοράς χρησιμοποιήθηκαν το kojic acid (ισχυρή αναστολή) και το gallic acid (μέτρια αναστολή). Αρχικά μελετήθηκε η δραστηριότητα των προϊόντων

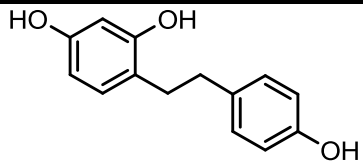
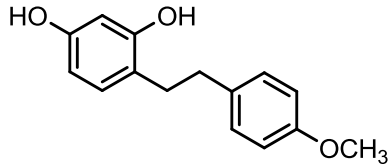
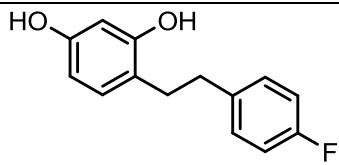
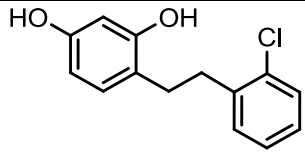
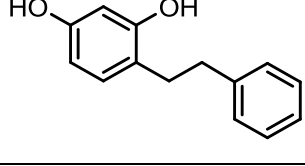
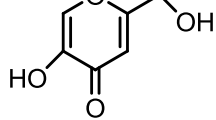
σε τελική συγκέντρωση 100μg/ml και στη συνέχεια επιλέχθηκαν οι ουσίες που εμφάνιζαν τη μεγαλύτερη αναστολή και υπολογίστηκε το IC50. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στους παρακάτω πίνακες.

Προϊόντα	Ενώσεις (100μg/ml)	Ποσοστό αναστολής
1		16,32 ± 0,41
2		12.3 ± 0,72
3		N/A
4		N/A
5		33.3 ± 0,56
6		6.2 ± 0,34
7		65.8 ± 1,24
8		5.7 ± 0,25

<i>Προϊόντα</i>	<i>Ενώσεις (100μg/ml)</i>	<i>Ποσοστό αναστολής</i>
9		9.7 ± 0,96
10		13.3 ± 0,55
11		7.2 ± 0,45
12		95.1 ± 0,09
13		94.2 ± 0,03
14		88,0 ± 0,24
15		92.3 ± 0,17
17		89.7 ± 0,05
18		25.3 ± 0,60

<i>Προϊόντα</i>	Ενώσεις (100μg/ml)	Ποσοστό αναστολής
22		3,0 ± 0,34
23		2.3 ± 1,73
26		4.2 ± 1,07
27		19,0 ± 0,46
<i>Kojic acid</i>		96,9 ± 0,24
<i>Gallic acid</i>		31,7 ± 0,79

νηξινη

Προϊόντα	Ενώσεις	IC50 μ M
12		0,22
13		0,24
14		0,43
15		0.41
17		0,65
kojic		20.84

Συμπεράσματα

Όπως παρατηρούμε και από τον πίνακα, δοκιμάστηκαν παράγωγα και από τις τρεις κατηγορίες αναλόγων που συντέθηκαν στην παρούσα εργασία: δεοξυβενζοΐνες (1-11), διϋδροστιλβένια (12-15, 17) και ισοφλαβόνες (18,22,23,26,27).

Τα δεοξυβενζοΐνικά παράγωγα -εκτός των (5,7)- δεν παρουσίασαν ανασταλτική δράση έναντι του ενζύμου της τυροσινάσης κάτι που ήταν αναμενόμενο βάση της θεωρητικής μελέτης που αναφέρεται παραπάνω. Η ύπαρξη του καρβονυλίου στην πλευρική αλυσίδα δεν προσδίδει ευελιξία στην πρόσδεση των αναλόγων με τον υποδοχέα και δημιουργεί δεσμό υδρογόνου με το ελεύθερο -OH στη θέση 2, παρεμποδίζοντάς το να αλληλεπιδράσει με τον υποδοχέα.

Αντιθέτως τα διϋδροστιλβενικά παράγωγα παρουσιάζουν ιδιαίτερα ισχυρή ανασταλτική δράση έναντι του ενζύμου, γεγονός που επιβεβαιώνει την υπόθεση πως η αναγωγή της κετονομάδας θα αύξανε τη δραστικότητα των παραγώγων. Όπως αποδεικνύεται και από τη μελέτη πρόσδεσης του διϋδροστιλβενίου (2,4,4'-τριϋδροξυ-5-χλωρο-διφαινυλαιθάνιο) με τον υποδοχέα της τυροσινάσης, παρατηρούμε πως τα συνθετικά ανάλογα δεν προσδέονται στο ενεργό κέντρο του ενζύμου αλλά σχηματίζουν αλληλεπιδράσεις με τα αμινοξέα που βρίσκονται στην είσοδο αυτού. Επομένως το ελεύθερο πια OH της θέσης 2 του αναλόγου σχηματίζει δεσμό υδρογόνου με το καρβοξύλιο του ασπαρτικού οξέως 239 που βρίσκεται κοντά στην είσοδο του ενεργού κέντρου του υποδοχέα, γεγονός που αποδεικνύει την σπουδαιότητα του για την εμφάνιση ισχυρού ανταγωνισμού. Παρ' όλα αυτά, το OH στη θέση 4 δεν φαίνεται να εμφανίζει κάποια αξιοσημείωτη αλληλεπίδραση.

Το μεγαλύτερο ποσοστό αναστολής παρουσιάζει το ανάλογο (**12**) γεγονός που μάλλον οφείλεται σε ασθενείς ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις ανάμεσα στο OH-4' με το δακτύλιο της ιστιδίνης 242 ή το ιόν Cu^{+2} . Δεν φαίνεται όμως να είναι καθοριστικός παράγοντας για την εκδήλωση ανασταλτικής δράσης καθώς διαφορετική υποκτάσταση στον Β δακτύλιο δεν μεταβάλλει σχεδόν καθόλου το ποσοστό αναστολής που παρουσιάζουν τα ανάλογα των διϋδροστιλβενίων (**12-15**, **17**). Από τις τιμές του IC50 παρατηρούμε πως τα διϋδροστιλβενικά παράγωγα εμφανίζουν ισχυρή ανασταλτική δράση έναντι του ενζύμου της τυροσινάσης, καθώς η δραστικότητά τους είναι από 32 μέχρι 86 φορές ισχυρότερη του kojic acid ενώ η ανασταλτική δράση του παραγώγου (**12**) συγκεκριμένα εμφανίζεται 96 φορές ισχυρότερη, μια από τις υψηλότερες που έχει περιγραφεί στη βιβλιογραφία.

Τα παράγωγα ισοφλαβονών που δοκιμάστηκαν δεν παρουσίασαν ανασταλτική δράση έναντι του ενζύμου γεγονός που δικαιολογείται πιθανώς λόγω του μεγάλου όγκου και της μειωμένης ευκαμψίας των μορίων αυτών.

2.4.3 ΑΓΓΕΙΟΓΕΝΕΣΗ

Στα πλαίσια της μελέτης της βιολογικής δραστηριότητας των παραγώγων που συντέθηκαν και βάση βιβλιογραφικών αναφορών που θέλουν τις ισοφλαβόνες να αποτελούν ικανούς αντιαγγειογενετικούς παράγοντες, έγινε ένας προκαταρκτικός έλεγχος της δραστηριότητάς τους, σε καλλιέργειες της EA.hy926 ενδοθηλιακής κυτταρικής σειράς, καθώς όπως είναι γνωστό τα ενδοθηλιακά κύτταρα αποτελούν σημαντικά συστατικά για τη δημιουργία νέων αγγείων.

Το πρωτόκολλο που ακολουθήθηκε περιγράφεται παρακάτω:

1. Ανθρώπινα ενδοθηλιακά κύτταρα, EA.hy926cells τοποθετήθηκαν σε πλάκα 96 πηγαδίων (4000 κύτταρα /πηγάδι), με θρεπτικό μέσο DMEM το οποίο εμπλουτίστηκε με 10% ορό έμβριου μόσχου (FCS), γλουταμίνη (Gln), αντιβιοτικά, και ειδικά συμπληρώματα. Τα κύτταρα επώαστηκαν με αυτό το θρεπτικό μέσο για περίπου 12 ώρες.

2. Την επόμενη μέρα, αφού απομακρύνθηκε το προηγούμενο θρεπτικό μέσο, προστέθηκε θρεπτικό μέσο χωρίς ορό (SF), που περιείχε 0.25% αλβουμίνη από ορό βοοειδών (BSA) και ακολούθησε επώαση 6 ωρών έτσι ώστε τα κύτταρα να συγχρονιστούν στην ίδια φάση του κυτταρικού κύκλου.

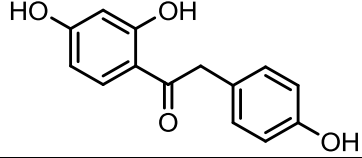
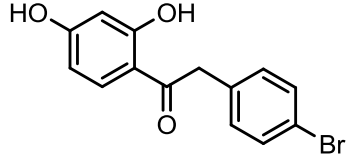
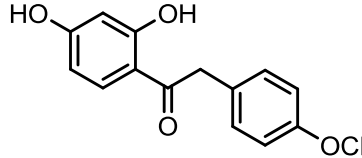
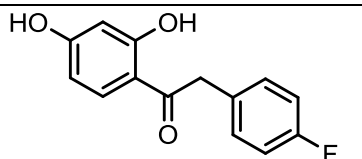
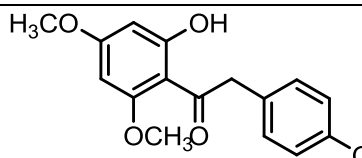
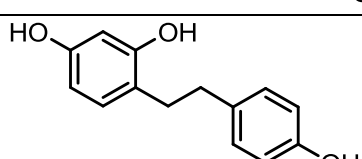
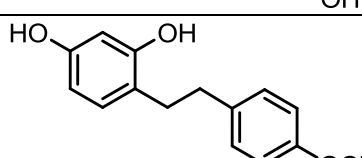
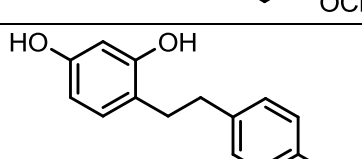
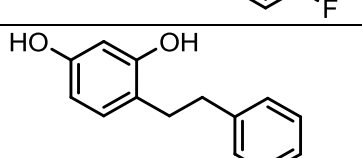
3. Ακολούθησε αντικατάσταση του SF με 100 μl θρεπτικού μέσου εμπλουτισμένου με 2.5% ορό στο οποίο έγινε προσθήκη των δειγμάτων μας σε τελικές συγκεντρώσεις 10 και 100 μM, σε 0.1% DMSO (4-6 πηγάδια ανά συνθήκη). Ως τυφλό δείγμα χρησιμοποιήθηκε το ίδιο θρεπτικό μέσο με 0.1% DMSO.

4. Ακολουθεί επώαση 48 ωρών.

5. Στη συνέχεια, έγινε αντικατάσταση του προηγούμενου θρεπτικού μέσου με SF, 0.25% BSA και 25% διάλυμα MTT (Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide) σε όλα τα πηγάδια. Η τελική συγκέντρωση του MTT ήταν 0.5 mg/ml. Ακολούθησε επώαση στους 37°C παρουσία 5% CO₂.

6. Στη τελική φάση έγινε η απομάκρυνση του μέσου και προσθήκη 100 μl 0.1N HCl σε άνυδρη προπανόλη για τη διαλυτοποίηση των κρυστάλλων που έχουν δημιουργηθεί λόγω του MTT. Η απορρόφηση μετρήθηκε στα 595 nm με διορθωτική στα 630 nm. Η αντιστοίχιση της απορρόφησης των δειγμάτων με τον αριθμό των κυττάρων έγινε χρησιμοποιώντας καμπύλη αναφοράς των EA.hy926 κυττάρων.

7. εύρους 1.000 έως 50.000 κύτταρα ανα πηγάδι

% μείωση ζωτικότητας κυττάρων σε σχέση με το μάρτυρα			
Προϊόντα	Ενώσεις	Χαμηλή συγκέντρωση	Υψηλή συγκέντρωση
1		N/A	N/A
2		11.97	38.51
5		N/A	N/A
7		N/A	23.52
11		9.47	7.88
12		3.08	8.22
13		11.07	59.02
14		4.79	61.87
17		26.37	73.86

Συμπεράσματα

Μελετήθηκε η βιολογική δραστικότητα των συνθετικών αναλόγων των δεοξυβενζοϊνών (**1**), (**2**), (**5**), (**7**), (**11**) και των διϋδροστιλβενικών παραγώγων (**12**), (**13**), (**14**), (**17**) και με βάση τα πειραματικά αποτελέσματα οι δεοξυβενζοΐνες δεν σημείωσαν κάποια ιδιαίτερη επαγωγική ή ανασταλτική επίδραση ως προς τη ζωτικότητα των ενδοθηλιακών κυττάρων. Αντιθέτως, τα διϋδροστιλβενικά παράγωγα (**13**), (**14**), (**17**) παρουσίασαν ισχυρή αναστολή της ζωτικότητας ενδοθηλιακών κυττάρων σε μεγάλη συγκέντρωση (100 μM) γεγονός που ανοίγει το δρόμο μελλοντικά για περαιτέρω μελέτη της αντιαγγειογενετικής τους δράσης και τη διερεύνηση του μηχανισμού αυτής.

Τέλος αναμένονται τα αποτελέσματα της μελέτης της βιολογικής δραστικότητας των συνθετικών ισοφλαβονών (**18**), (**19**), (**21**).

3⁰ ΚΕΦΑΛΑΙΟ – ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

3.1 ΓΕΝΙΚΑ (ΤΕΧΝΙΚΕΣ – ΟΡΓΑΝΟΛΟΓΙΑ)

ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ ΛΕΠΤΗΣ ΣΤΟΙΒΑΔΑΣ(TLC)

Για τον ποιοτικό έλεγχο των μιγμάτων των αντιδράσεων χρησιμοποιήθηκαν χρωματογραφίες λεπτής στοιβάδας TLC σε πλάκες αλουμινίου με επίστρωση πυριτίου (silica gel 60 F₂₅₄-Merck). Τα χρωματογραφήματα ελέγχθησαν αρχικά με έκθεση στην υπεριώδη ακτινοβολία στα 254 nm και 366 nm και στη συνέχεια με ψεκασμό με διάλυμα θειϊκής βανιλίνης.

ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΚΟΙ ΔΙΑΧΩΡΙΣΜΟΙ ΠΡΟΙΟΝΤΩΝ

Για το διαχωρισμό των προϊόντων χρησιμοποιήθηκαν:

α) υγρή χρωματογραφία ανοιχτής στήλης υπό χαμηλή πίεση (300 bar). Ως στατική φάση χρησιμοποιήθηκε γέλη πυριτίου silica gel 40-60 μm ενώ ως κινητή συστήματα οργανικών διαλυτών κατάλληλης πολικότητας. Τεχνική χρωματογραφίας flash.

β) παρασκευαστικές χρωματογραφίες λεπτής στοιβάδας σε υάλινες πλάκες με επίστρωση πυριτίου kieselgel 60 f₂₅₄-Merck.

ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΑ ΠΥΡΗΝΙΚΟΥ ΜΑΓΝΗΤΙΚΟΥ ΣΥΝΤΟΝΙΣΜΟΥ (NMR)

Ο προσδιορισμός της δομής των συνθετικών παραγώγων πραγματοποιήθηκε με τη βοήθεια φασμάτων NMR 1D (¹H-NMR) και 2D (COSY, HMQC, HMBC). Τα αντίστοιχα πειράματα εκτελέστηκαν σε φασματογράφο Bruker Avance III 600. Ο διαλύτης που χρησιμοποιήθηκε στην λήψη φασμάτων NMR ήταν η δευτεριωμένη ακετόνη (Me₂CO-*d*₆), το δευτεριωμένο χλωροφόρμιο (CDCl₃) και η δευτεριωμένη μεθανόλη (MeOD). Οι χημικές μετατοπίσεις (δ) είναι εκφρασμένες σε ppm, με TMS ως εσωτερικό πρότυπο, ενώ οι σταθερές σύζευξης (J) είναι εκφρασμένες σε Hz. Η πολλαπλότητα των κορυφών αποδίδεται ως εξής : s= μονή, d= διπλή, t= τριπλή, dd= διπλή διπλής, m= πολλαπλή και brs= ευρεία.

ΣΥΣΚΕΥΗ ΜΙΚΡΟΚΥΜΑΤΩΝ

Οι αντιδράσεις που πραγματοποιήθηκαν υποβοηθούμενες υπό ακτινοβολία μικροκυμάτων, έγιναν σε συσκευή Milestone Start E (Microwave Extraction System).

ΣΥΣΚΕΥΗ ΥΔΡΟΓΟΝΩΣΗΣ

Οι αντιδράσεις υδρογόνωσης πραγματοποιήθηκαν σε συσκευή Parr, υπό πίεση

ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ

Τα αντιδραστήρια και οι πρώτες ύλες για τις αντιδράσεις προήλθαν από την Aldrich Chemical Co.

ΣΥΝΘΗΚΕΣ ΑΝΤΙΔΡΑΣΕΩΝ

Όλα τα υαλικά στα οποία έγιναν οι αντιδράσεις ξηράνθηκαν σε φούρνο πρίν απο κάθε χρήση.

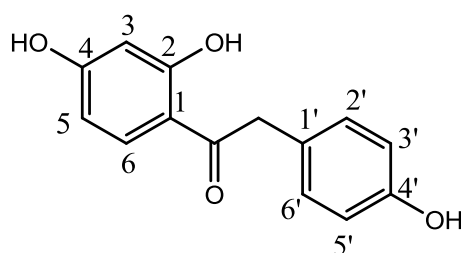
Όλες οι αντιδράσεις πραγματοποιήθηκαν κάτω απο άνυδρες συνθήκες, σε κορεσμένη ατμόσφαιρα και με συνεχή παροχή αργού.

Οι διαλύτες που χρησιμοποιήθηκαν ήταν άνυδροι και επιπλέον εξαερώθηκαν πρίν απο κάθε χρήση με παροχή αργού. Όσοι διαλύτες δεν είχαν αποθηκευτεί υπό άνυδρες συνθήκες, ακολουθήσαμε τη διαδικασία απομάκρυνσης της υγρασίας, με χρήση μοριακών κοσκίνων 4Å.

3.2 ΣΥΝΘΕΣΗ ΤΩΝ ΔΕΟΞΥΒΕΝΖΟΪΝΩΝ

3.2.1 Σύνθεση της 2,4,4'-τριϋδροξυδεοξυβενζοΐνης, ή {1-(2,4-διϋδροξυφαινυλ)-2-(4'-ϋδροξυφαινυλ)-αιθανόνης} (1)

Σε μίγμα 550 mg (0,005 mol) ρεσορκινόλης (1,3-διϋδροξυβενζόλιο) και 760 mg (0,005 mol) 4-ϋδροξυφαινυλοξικού οξέος προστέθηκαν 12,5 ml $\text{BF}_3\text{-Et}_2\text{O}$ σε ατμόσφαιρα αζώτου. Το μίγμα θερμάνθηκε σε ελαιόλουτρο στους 85°C υπό συνεχή ανάδευση για 3 ώρες. Ακολούθησε απόχυση σε παγόνερο του μίγματος της αντίδρασης και διαδοχικές εκχυλίσεις με οξικό αιθυλεστέρα. Οι οργανικές φάσεις συλλέχθηκαν και εκπλύθηκαν μια φορά με νερό και μια φορά με υδατικό διάλυμα χλωριούχου νατρίου. Έπειτα εξατμίστηκε ο διαλύτης της οργανικής στοιβάδας υπό ελατωμένη πίεση και το υπόλειμμα υποβλήθηκε σε χρωματογραφία flash με σύστημα διαλυτών $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ αυξανόμενης πολικότητας. Από τη στήλη παραλήφθηκαν 1,0954g και η απόδοση της αντίδρασης υπολογίζεται $\alpha=89,7\%$



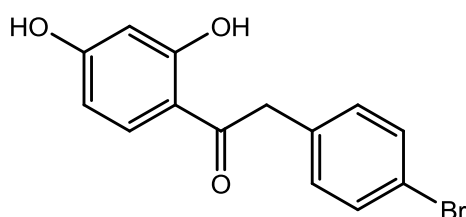
$^1\text{H-NMR}$: ($\text{Me}_2\text{CO}-d_6$) δ : 12.75 (1H, s, 2-OH), 7.95 (1H, 1d, $J=8.0$ Hz, H-6), 7.16 (2H, 1d, $J=8.0$ Hz, H-2'/6'), 6.77 (2H, 1d, $J=8.0$ Hz, H-3'/5'), 6.43 (1H, dd, $J=8.0/2.0$ Hz, H-5), 6.31 (1H, d, $J=2.0$ Hz, H-3), 4.07 (2H, s, CH_2)

$^{13}\text{C-NMR}$: ($\text{Me}_2\text{CO}-d_6$) δ : 203.8 (C=O), 166.2 (C-2), 165.7 (C-4), 157.4 (C-4'), 135.2 (C-6), 131.9 (C-2'/6'), 126.8 (C-1'), 116.9 (C-3'/5'), 113.5 (C-1), 109.5 (C-5), 104.28 (C-3), 44.9 (CH_2).

3.2.2 Σύνθεση της 4'-βρωμο-2,4-διϋδροξυδεοξυβενζοΐνης ή {2(4-βρωμοφαινυλο)-1-(2,4-διϋδροξυφαινυλ)αιθανόνης}.(2)

Σε μίγμα 550 mg (0,005 mol) ρεσορκινόλης (1,3-διϋδροξυβενζόλιο) και 1,07 g (0,005 mol) 4-βρωμοφαινυλοξικού οξέος προστέθηκαν 12,5 ml $\text{BF}_3\text{-Et}_2\text{O}$ σε ατμόσφαιρα

αζώτου. Το μίγμα θερμάνθηκε σε ελαιόλουτρο στους 90 °C υπό συνεχή ανάδευση για 5 ώρες. Ακολούθησε απόχυση σε παγόνερο του μίγματος της αντίδρασης και διαδοχικές εκχυλίσεις με οξικό αιθυλεστέρα. Οι οργανικές φάσεις συλλέχθηκαν και εκπλύθηκαν μια φορά με νερό και μια φορά με υδατικό διάλυμα χλωριούχου νατρίου. Έπειτα εξατμίστηκε ο διαλύτης της οργανικής στοιβάδας υπό ελαττωμένη πίεση και το υπόλειμμα υποβλήθηκε σε χρωματογραφία flash με σύστημα διαλυτών *c*-hexane/EtOAc αυξανόμενης πολικότητας. Από τη στήλη παραλήφθηκαν 850 mg και η απόδοση της αντίδρασης υπολογίζεται $\alpha=55,35\%$



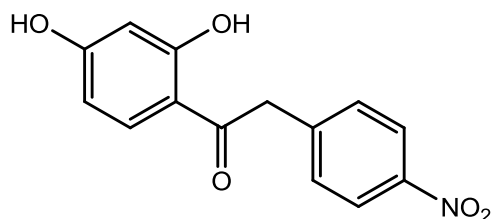
¹H-NMR:(Me₂CO-*d*₆) δ:12.59 (1H, s, 2-OH), 7.95 (1H, d, J=8.8Hz, H-6), 7.50 (2H, d, J=8.8Hz, H3'/5'), 7.29 (2H, d, J=8.8Hz, H2'/6'), 6.45 (1H, dd, J=8.8/2.2Hz, H-5), 6.33 (1H, d, J=2.2Hz), 4.32 (2H, s, CH₂).

¹³C-NMR:(Me₂CO-*d*₆) δ: 202.6 (C=O), 165.7 (C-2,C-4), 135.4 (C-1'), 131.8 (C2'/6'), 131.5 (C3'/5'), 120.8 (C-4'), 113.8 (C-1), 113.1 (C-6), 108.8 (C-3), 107.9 (C-5), 43.68 (CH₂).

3.2.3 Σύνθεση της 2,4-διϋδροξυ-4'-νιτροδεοξυβενζοΐνης, ή {1-(2,4-διϋδροξυφαινυλο)- 2-(4-νιτροφαινυλ)--αιθανόνης}(3)

Σε μίγμα 550 mg (0,005 mol) ρεσορκινόλης (1,3-διϋδροξυβενζόλιο) και 850 mg (0,005 mol) 4-νιτροφαινυλοξικού οξέος προστέθηκαν 12,5 ml BF₃-Et₂O σε ατμόσφαιρα αζώτου. Το μίγμα θερμάνθηκε σε ελαιόλουτρο στους 90⁰C υπό συνεχή ανάδευση για 4 ώρες. Ακολούθησε απόχυση σε παγόνερο του μίγματος της αντίδρασης και διαδοχικές εκχυλίσεις με οξικό αιθυλεστέρα. Οι οργανικές φάσεις συλλέχθηκαν και εκπλύθηκαν μια φορά με νερό και μια φορά με υδατικό διάλυμα χλωριούχου νατρίου. Έπειτα εξατμίστηκε ο διαλύτης της οργανικής στοιβάδας υπό ελαττωμένη πίεση και το υπόλειμμα υποβλήθηκε σε χρωματογραφία flash με

σύστημα διαλυτών CH₂Cl₂/MeOH αυξανόμενης πολικότητας. Από τη στήλη παραλήφθησαν 793 mg και η απόδοση της αντίδρασης υπολογίζεται α=58,04%

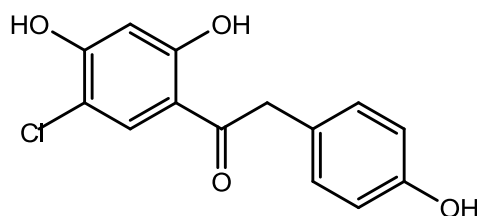


¹H-NMR:(Me₂CO-*d*₆) δ: 12.47 (1H, s, 2-OH), 8.21 (2H, d, J=8.0Hz, H-3'/5'), 7.98 (1H, d, J=8.0Hz, H-6), 7.63 (2H,d, J=8.0Hz,H-2'/6'), 6.48 (1H, dd, J=8.0/2.0Hz, H-5), 6.34 (1H, d, J=2.0Hz, H-3), 4.55 (2H, s, CH₂).

¹³C-NMR:(Me₂CO-*d*₆) δ:201.6 (C=O), 166.2 (C-2/C-4), 148.2 (C-4'), 143.6 (C-1'), 134.5 (C-6), 132.4 (C2'/6'), 124.75 (C3'/5'), 113.4 (C-1), 109.9 (C-5), 104.1 (C-3), 45.14 (CH₂).

3.2.4 Σύνθεση της 2,4,4'-τριϋδροξυ-5-χλωροδεοξυβενζοΐνης, ή {1-(2,4-διϋδροξυ-5-χλωρο-φαινυλ)-2-(4-υδροξυφαινυλ)-αιθανόνης}(4)

Σε μίγμα 550 mg (0,005 mol) 4-χλωρορεσορκινόλης (4-χλωρο-1,3-διϋδροξυβενζόλιο) και 760 mg (0,005 mol) 4-υδροξυφαινυλοξικού οξέος προστέθηκαν 12,5 ml BF₃-Et₂O σε ατμόσφαιρα αζώτου. Το μίγμα θερμάνθηκε σε ελαιόλουτρο στους 90⁰C υπό συνεχή ανάδευση για 7 ώρες. Ακολούθησε απόχυση σε παγόνερο του μίγματος της αντίδρασης και διαδοχικές εκχυλίσσεις με οξικό αιθυλεστέρα. Οι οργανικές φάσεις συλλέχθηκαν και εκπλύθηκαν μια φορά με νερό και μια φορά με υδατικό διάλυμα χλωριούχου νατρίου. Έπειτα εξατμίστηκε ο διαλύτης της οργανικής στοιβάδας υπό ελατωμένη πίεση και το υπόλειμμα υποβλήθηκε σε χρωματογραφία flash με σύστημα διαλυτών *c*-hexane/EtOAc αυξανόμενης πολικότητας. Από τη στήλη παραλήφθησαν 784 mg και η απόδοση της αντίδρασης υπολογίζεται α=56,29%

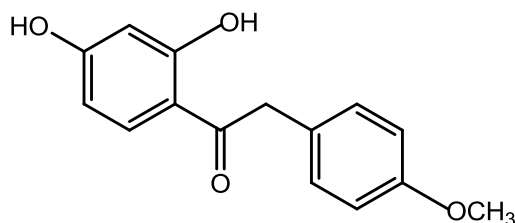


¹H-NMR: (Me₂CO-*d*₆) δ: 12.58 (1H, s, 2-OH), 8.09 (1H, s, H-6), 7.17 (2H, d, J=8.2Hz, H-2'/6'), 6.80 (2H, d, 8.2 Hz, H3'/5'), 6.50 (1H, s, H-3), 4.25 (2H, s, CH₂).

¹³C-NMR: (Me₂CO-*d*₆) δ: 203.4 (C=O), 164.5 (C-2), 160.5 (C-4), 157.4 (C-4'), 134.2 (C-6), 132.1 (C-2'/6'), 116.6 (C3'/5'), 114.0 (C-5), 105.6 (C-3), 45.15 (CH₂).

3.2.5 Σύνθεση της 2,4-διυδροξυ-5'-μεθοξυδεοξυβενζοϊνης, ή {1-(2,4-διυδροξυφαινυλο)-2-(4-μεθοξυφαινυλο)-αιθανόνης}(5)

Σε μίγμα 550 mg (0,005 mol) ρεσορκινόλης (1,3-διυδροξυβενζόλιο) και 830 mg (0,005 mol) 4-μεθοξυφαινυλοξικού οξέος προστέθηκαν 12,5 ml BF₃-Et₂O σε ατμόσφαιρα αζώτου. Το μίγμα θερμάνθηκε σε ελαιόλουτρο στους 90⁰C υπό συνεχή ανάδευση για 3 ώρες. Ακολούθησε απόχυση σε παγόνερο του μίγματος της αντίδρασης και διαδοχικές εκχυλίσεις με οξεϊκό αιθυλεστέρα. Οι οργανικές φάσεις συλλέχθηκαν και εκπλύθηκαν μια φορά με νερό και μια φορά με υδατικό διάλυμα χλωριούχου νατρίου. Έπειτα εξατμίστηκε ο διαλύτης της οργανικής στοιβάδας υπό ελατωμένη πίεση και το υπόλειμμα υποβλήθηκε σε χρωματογραφία flash με σύστημα διαλυτών CH₂Cl₂/MeOH αυξανόμενης πολικότητας. Από τη στήλη παραλήφθηκαν 531,2 mg και η απόδοση της αντίδρασης υπολογίζεται α=41,18%

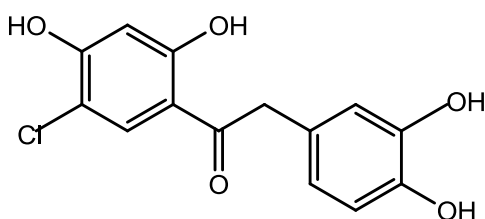


¹H-NMR:(Me₂CO-*d*₆) δ:12.7 (1H, s, OH), 7.9 (1H,d, J=8.8Hz, H-6), 7.2 (2H, d, J=8.8Hz, H2'/6'), 6.9 (2H,d, J=8.8Hz, H3'/5'), 6.4 (1H, dd, J=8.8/2.7Hz, H-5), 6.3 (1H,d, J=2.7Hz, H-3), 4.2 (2H, s, CH₂), 3.7 (3H, s, OCH₃).

¹³C-NMR:(Me₂CO-*d*₆) δ: 203.9 (C=O), 166.6 (C-2), 165.9 (C-4), 159.7 (C-4'), 135.01 (C-6), 132.1 (C2'/6'), 127.9 (C-1'), 115.53 (C3'/5'), 113.3 (C-1), 109.5 (C-5), 104.2 (C-3), 56.05 (OCH₃), 44.7 (CH₂).

3.2.6 Σύνθεση της 2,4,3',4'-τετραυδροξυ-5-χλωροδεοξυβενζοΐνης, ή {1-2,4-διϋδροξυ-5-χλωρο-φαινυλ)-2-(3,4-υδροξυφαινυλ)-αιθανόνης(6)

Σε μίγμα 350 mg (mol) 4-χλωρορεσορκινόλης (4-χλωρο-1,3-διϋδροξυβενζόλιο) και 760 mg (0,005 mol) 4-υδροξυφαινυλοξικού οξέος προστέθηκαν 6,5 ml $\text{BF}_3\text{-Et}_2\text{O}$ σε ατμόσφαιρα αζώτου. Το μίγμα θερμάνθηκε σε ελαιόλουτρο στους 90°C υπό συνεχή ανάδευση για 5 ώρες. Ακολούθησε απόχυση σε παγόνερο του μίγματος της αντίδρασης και διαδοχικές εκχυλίσεις με οξικό αιθυλεστέρα. Οι οργανικές φάσεις συλλέχθηκαν και εκπλύθηκαν μια φορά με νερό και μια φορά με υδατικό διάλυμα χλωριούχου νατρίου. Έπειτα εξατμίστηκε ο διαλύτης της οργανικής στοιβάδας υπό ελατωμένη πίεση και το υπόλειμμα υποβλήθηκε σε χρωματογραφία flash με σύστημα διαλυτών *c*-hexane/EtOAc αυξανόμενης πολικότητας. Από τη στήλη παραλήφθηκαν 250 mg και η απόδοση της αντίδρασης υπολογίζεται $\alpha=33,97\%$



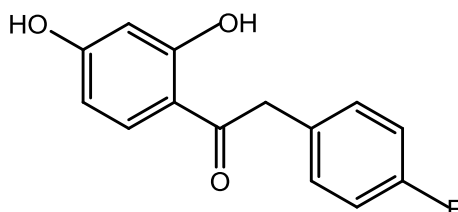
$^1\text{H-NMR}$:($\text{Me}_2\text{CO-}d_6$) δ : 12.60 (1H, s), 8.05 (1H, s, H-6), 6.83 (1H, d, $J=2.0\text{Hz}$, H-2'), 6.77 (1H, d, $J=8.0\text{Hz}$, H-5'), 6.68 (1H, dd, $J=8.0/2.0\text{Hz}$, H-6'), 6.50 (1H, s, H-3), 4.17 (2H, s, CH_2).

$^{13}\text{C-NMR}$:($\text{Me}_2\text{CO-}d_6$) δ :203.6 (C=O), 165.1 (C-2), 160.1 (C-4), 145.6 (C-3'), 145.6 (C-4'), 134.2 (C-6), 127.3 (C-1'), 122.2 (C-6'), 117.7 (C-2'), 116.5 (C-5'), 113.6 (C-1), 113.6 (C-5'), 105.6 (C-3), 45.3 (CH_2).

3.2.7 Σύνθεση της 2,4-διϋδροξυ-4'-φθοροδεοξυβενζοΐνης ή 1-(2,4-υδροξυφαινυλο)- 2-(4-φθοροφαινυλ) -αιθανόνης}. (7)

Σε μίγμα 550 mg (0,005 mol) ρεσορκινόλης (1,3-διϋδροξυβενζόλιο) και 770 mg (0,005 mol) 4-φθοροφαινυλοξικού οξέος προστέθηκαν 12,5 ml $\text{BF}_3\text{-Et}_2\text{O}$ σε ατμόσφαιρα αζώτου. Το μίγμα θερμάνθηκε σε ελαιόλουτρο στους 90°C υπό συνεχή ανάδευση για $4^{1/2}$ ώρες. Ακολούθησε απόχυση σε παγόνερο του μίγματος της αντίδρασης και διαδοχικές εκχυλίσεις με οξικό αιθυλεστέρα. Οι οργανικές φάσεις

συλλέχθηκαν και εκπλύθηκαν μια φορά με νερό και μια φορά με υδατικό διάλυμα χλωριούχου νατρίου. Έπειτα εξατμίστηκε ο διαλύτης της οργανικής στοιβάδας υπό ελατωμένη πίεση και το υπόλειμμα υποβλήθηκε σε χρωματογραφία flash με σύστημα διαλυτών c-hexane/EtOAc αυξανόμενης πολικότητας. Από τη στήλη παραλήφθηκαν 650 mg και η απόδοση της αντίδρασης υπολογίζεται $\alpha=52,84\%$

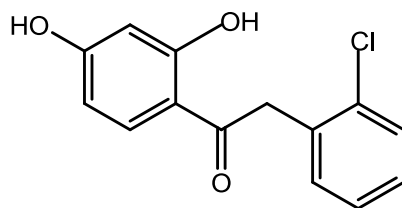


$^1\text{H-NMR}$:($\text{Me}_2\text{CO}-d_6$) δ :12.64 (1H, s, OH), 7.97 (1H, d, $J=8.8\text{Hz}$, H-6), 7.36 (2H, d, $J=8.8\text{Hz}$, H-2'/6'), 7.10 (2H, d, $J=8.8\text{Hz}$, H-3'/5'), 6.45 (1H, dd, $J=8.8/2.2\text{Hz}$, H-5), 6.33 (1H, d, $J=2.2\text{Hz}$, H-3), 4.32 (2H, s, CH_2).

$^{13}\text{C-NMR}$:($\text{Me}_2\text{CO}-d_6$) δ :203.1 (C=O), 166.6 (C-2,C-4), 163.2 (C-4'), 134.9 (C-6), 133.3 (C-2'/6'), 132.6 (C-1'), 116.5 (C3'/5'), 113.7 (C-1), 109.5 (C-5), 104.3 (C-3), 44.5 (CH_2).

3.2.8 Σύνθεση της 2,4-διϋδροξυ-2'-χλωροδεοξυβενζοΐνης ή {1-(2,4-υδροξυφαινυλο)- 2-2-χλωροφαινυλ)-αιθανόνης}. (8)

Σε μίγμα 550 mg (0,005 mol) ρεσορκινόλης (1,3-διϋδροξυβενζόλιο) και 850 mg (0,005 mol) 2-χλωροφαινυλοξικού οξέος προστέθηκαν 2 ml $\text{BF}_3\text{-Et}_2\text{O}$ σε ατμόσφαιρα αζώτου. Το μίγμα θερμάνθηκε σε ελαιόλουτρο στους 120°C υπό συνεχή ανάδευση για 41/2 ώρες. Ακολούθησε απόχυση σε παγόνερο του μίγματος της αντίδρασης και διαδοχικές εκχυλίσεις με οξεϊκό αιθυλεστέρα. Οι οργανικές φάσεις συλλέχθηκαν και εκπλύθηκαν μια φορά με νερό και μια φορά με υδατικό διάλυμα χλωριούχου νατρίου. Έπειτα εξατμίστηκε ο διαλύτης της οργανικής στοιβάδας υπό ελατωμένη πίεση και το υπόλειμμα υποβλήθηκε σε χρωματογραφία flash με σύστημα διαλυτών c-hexane/EtOAc αυξανόμενης πολικότητας. Από τη στήλη παραλήφθηκαν 730 mg και η απόδοση της αντίδρασης υπολογίζεται $\alpha=55,62\%$

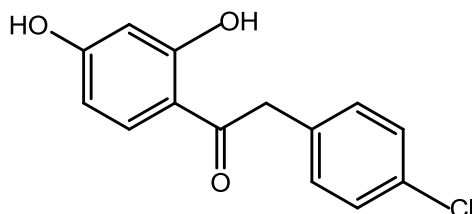


¹H-NMR: (Me₂CO-*d*₆) δ:12.48 (1H, s, OH), 7.99 (1H, d, J=8.8Hz, H-6), 7.45-7.40 (2H, m, H-3'/H-6'), 7.32-7.29 (2H, m, H-4'/H-5'), 6.49 (1H, dd, J=8.8/2.2Hz, H-5), 6.35 (1H, d, J=2.2Hz, H-3), 4.53 (2H, s, CH₂).

¹³C-NMR:(Me₂CO-*d*₆) δ:202.4 (C=O), 166.2 (C-2), 165.4 (C-4), 134.5 (C-6), 134.0 (C-6'), 133.6-130.6 (C-1'/C2'/C3'), 130.1 (C-4'), 128.5 (C-5'), 113.5 (C-1), 109.7 (C-5), 104.3 (C-3), 43.8 (CH₂).

3.2.9 Σύνθεση της 2,4-διϋδροξυ-4'-χλωροδεοξυβενζοΐνης ή {1-(2,4-υδροξυφαινυλο)- 2-(4-χλωροφαινυλ)-αιθανόνης}(9)

Σε μίγμα 550 mg (0,005 mol) ρεσορκινόλης (1,3-διϋδροξυβενζόλιο) και 850 mg (0,005 mol) 4-χλωροφαινυλοξικού οξέος προστέθηκαν 2 ml BF₃-Et₂O σε ατμόσφαιρα αζώτου. Το μίγμα θερμάνθηκε σε ελαιόλουτρο στους 120⁰C υπό συνεχή ανάδευση για 4^{1/2} ώρες. Ακολούθησε απόχυση σε παγόνερο του μίγματος της αντίδρασης και διαδοχικές εκχυλίσεις με οξεϊκό αιθυλεστέρα. Οι οργανικές φάσεις συλλέχθηκαν και εκπλύθηκαν μια φορά με νερό και μια φορά με υδατικό διάλυμα χλωριούχου νατρίου. Έπειτα εξατμίστηκε ο διαλύτης της οργανικής στοιβάδας υπό ελαττωμένη πίεση και το υπόλειμμα υποβλήθηκε σε χρωματογραφία flash με σύστημα διαλυτών *n*-hexane/EtOAc αυξανόμενης πολικότητας. Από τη στήλη παραλήφθηκαν 374 mg και η απόδοση της αντίδρασης υπολογίζεται α=28,49%

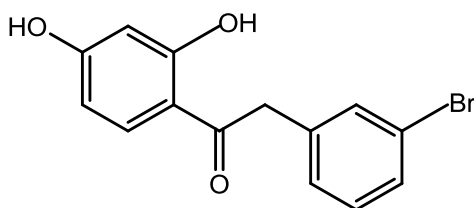


¹H-NMR: (Me₂CO-*d*₆) δ: 12.60 (1H, s, 2-OH), 7.96 (1H, d, J=8.8Hz, H-6), 7.35 (4H, s), 6.46 (1H, dd, J=8.8/2.2Hz, H-5), 6.33 (1H, d, 2.2Hz, H-3), 4.34 (2H, s, CH₂).

¹³C-NMR: (Me₂CO-*d*₆) δ: 203.2 (C=O), 166.7 (C-2), 165.84 (C-4), 134.75 (C-6), 133-129 (C-2'/6'/3'/5') 113.8 (C-1), 109.8 (C-5), 104.3 (C-3), 44.84 (CH₂).

3.2.10 Σύνθεση της 3'-βρωμο-2,4-διϋδροξυδεοξυβενζοΐνης ή {2-(3-βρωμοφαινυλ)-αιθανόνης 1-(2,4-υδροξυφαινυλ) αιθανόνης}(10)

Σε μίγμα 550 mg (0,005 mol) ρεσορκινόλης (1,3-διϋδροξυβενζόλιο) και 1,07 g (0,005 mol) 4-βρωμοφαινυλοξικού οξέος προστέθηκαν 2,5 ml BF₃-Et₂O σε ατμόσφαιρα αζώτου. Το μίγμα θερμάνθηκε σε ελαιόλουτρο στους 120⁰C υπό συνεχή ανάδευση για 3 ώρες. Ακολούθησε απόχυση σε παγόνερο του μίγματος της αντίδρασης και διαδοχικές εκχυλίσεις με οξικό αιθυλεστέρα. Οι οργανικές φάσεις συλλέχθηκαν και εκπλύθηκαν μια φορά με νερό και μια φορά με υδατικό διάλυμα χλωριούχου νατρίου. Έπειτα εξατμίστηκε ο διαλύτης της οργανικής στοιβάδας υπό ελλειψωμένη πίεση και το υπόλειμμα υποβλήθηκε σε χρωματογραφία flash με σύστημα διαλυτών *n*-hexane/EtOAc αυξανόμενης πολικότητας. Από τη στήλη παραλήφθηκαν 650 mg και η απόδοση της αντίδρασης υπολογίζεται α=40,62%

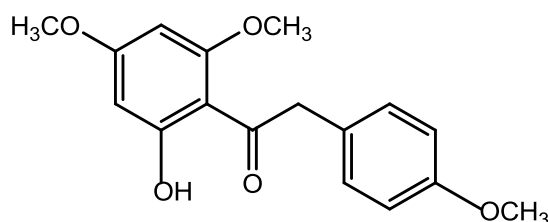


¹H-NMR: (Me₂CO-*d*₆) δ: 12,57 (1H, s, 2-OH), 7.97 (1H, d, J=8.2Hz, H-6), 7.55 (1H, t, J=1.5Hz, H-2'), 7.44 (1H, dt, J=8.2/1.5 Hz, H-4'), 7.35 (1H, dt, J=8.2/1.5Hz, H-6') 7.29(1h, d, J=8.2Hz), 6.47 (1H, dd, J=8.2/2.4Hz, H-5), 6.34 (1H, d, J=2.4Hz, H-3), 4.36 (2H, s, CH₂).

¹³C-NMR: (Me₂CO-*d*₆) δ: 202.7 (C=O), 166.7 (C-4/C-2), 138.9 (C-1'), 134.9 (C-6), 134.2 (C-2'), 122.6 (C-2'), 131.8 (C-5'), 131.5 (C-4'), 130.5 (C-6'), 113.8 (C-1), 109.6 (C-5), 104.3 (C-3), 45.19 (CH₂).

3.2.11 Σύνθεση της 4,6,4'-τριμεθοξυ-2-υδροξυδεοξυβενζοϊνης ή {1-(4,6-μεθοξυ-2-υδροξυ φαινυλο)- 2-(4-μεθοξυφαινυλ)-αιθανόνης}(11)

Σε μίγμα 1g (0,006 mol) τριμεθοξυβενζολίου (1,3,5-τριμεθοξυβενζόλιο) και 1 g (0,006 mol) 4-μεθοξυφαινυλοξικού οξέος προστέθηκαν 2,5 ml $\text{BF}_3\text{-Et}_2\text{O}$ σε ατμόσφαιρα αζώτου. Το μίγμα θερμάνθηκε σε ελαιόλουτρο στους 95°C υπό συνεχή ανάδευση για 2 ώρες. Ακολούθησε απόχυση παγόνερου στο μίγμα της αντίδρασης και διαδοχικές εκχυλίσεις με οξικό αιθυλεστέρα. Οι οργανικές φάσεις συλλέχθηκαν και εκπλύθηκαν μια φορά με νερό και μια φορά με υδατικό διάλυμα χλωριούχου νατρίου. Έπειτα εξατμίστηκε ο διαλύτης της οργανικής στοιβάδας υπό ελαττωμένη πίεση και το υπόλειμμα υποβλήθηκε σε χρωματογραφία flash με σύστημα διαλυτών *c*-hexane/EtOAc αυξανόμενης πολικότητας. Από τη στήλη παραλήφθηκαν 900 mg και η απόδοση της αντίδρασης υπολογίζεται $\alpha=42,5\%$



$^1\text{H-NMR}$: ($\text{Me}_2\text{CO-}d_6$) δ : 13.84 (1H, s, OH), 7.16 (2H, d, $J=8.2\text{Hz}$, H-2'/H-6'), 6.85 (2H, d, $J=8.2\text{Hz}$, H3'/H-5'), 6.07 (1H, d, $J=2.3\text{Hz}$, H-5), 6.04 (1H, d, $J=2.3\text{Hz}$, H-3), 4.25 (2H, CH₂), 3.94 (3H, s, 4-OCH₃), 3.85 (3H, s, 2-OCH₃), 3.76 (3H, s, 4'-OCH₃).

$^{13}\text{C-NMR}$:($\text{Me}_2\text{CO-}d_6$) δ : 204.3 (C=O), 167.6 (C-2), 167.6 (C-6), 163.7 (C-4), 159.6 (C-4'), 131.9 (C-2'/C-6'), 128.9 (C-1'), 115.2 (C-3'/C-5'), 95.2 (C-3), 92.2 (C-5), 56.8 (4-OCH₃), 56.4 (2-OCH₃), 56.1 (4'-OCH₃), 50.5 (CH₂).

Η αντίδραση αυτή επαναλήφθηκε και σε συσκευή μικροκυμάτων με σκοπό την βελτίωση της απόδοσης της αντίδρασης καθώς το σώμα αυτό θα χρησιμοποιηθεί και σαν πρώτη ύλη για τις επόμενες αντιδράσεις.

Σε μίγμα 1g (0,006 mol) τριμεθοξυβενζολίου (1,3,5-τριμεθοξυβενζόλιο) και 1 g (0,006 mol) 4-μεθοξυφαινυλοξικού οξέος προστέθηκαν 5 ml $\text{BF}_3\text{-Et}_2\text{O}$ σε ατμόσφαιρα αζώτου. Ρυθμίζουμε αρχικά στα 200 W για 30 λεπτά και στη συνέχεια

στα 150W εως ότου σταματήσει η κατανάλωση των αντιδρώντων (5 λεπτά). Ακολούθησε απόχυση σε παγόνερο του μίγματος της αντίδρασης και διαδοχικές εκκλίσεις με οξεικό αιθυλεστέρα. Οι οργανικές φάσεις συλλέχθησαν και εκπλύθηκαν μια φορά με νερό και μια φορά με υδατικό διάλυμα χλωριούχου νατρίου. Έπειτα εξατμίστηκε ο διαλύτης της οργανικής στοιβάδας υπό ελατωμένη πίεση και το υπόλειμμα υποβλήθηκε σε χρωματογραφία flash με σύστημα διαλυτών c-hexane/EtOAc αυξανόμενης πολικότητας. Από τη στήλη παραλήφθησαν 1,09 g και η απόδοση $\alpha=52\%$.

3.3 ΣΥΝΘΕΣΗ ΔΙΥΔΡΟΣΤΙΛΒΕΝΙΩΝ

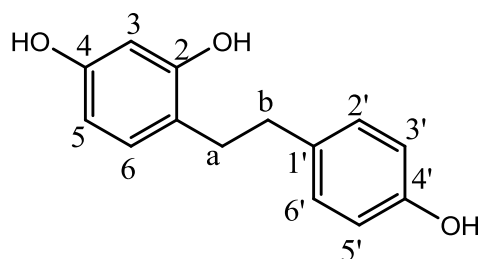
Για την παρασκευή των διϋδροστιλβενίων, ως πρώτες ύλες χρησιμοποιήθηκαν οι δεοξυβενζοΐνες των οποίων η σύνθεση περιγράφεται παραπάνω.

3.3.1 Σύνθεση του 2,4,4'-τριϋδροξυδιϋδροστιλβενίου ή {1-(2,4-διϋδροξυφαινυλ)-2-(4-ϋδροξυφαινυλ)-αιθανίου} (12)

Σε διάλυμα της δεοξυβενζοΐνης (1) 100 mg σε EtOAc 5 ml προστέθηκε καταλύτης 10% Pd/C 50 mg και αποκαταστάθηκε ατμόσφαιρα H₂. Το μίγμα αναδεύτηκε για 24 ώρες σε θερμοκρασία περιβάλλοντος. Ακολούθησε διήθηση σε κελίτη και έκπλυση με EtOAc. Το διήθημα εξατμίστηκε υπό ελαττωμένη πίεση και το υπόλειμμα υποβλήθηκε σε χρωματογραφία flash με σύστημα διαλυτών CH₂Cl₂/MeOH αυξανόμενης πολικότητας. Από τη στήλη παραλήφθησαν 50 mg και η απόδοση της αντίδρασης υπολογίζεται α=54,26%

Επίσης το ίδιο προϊόν παραλήφθηκε και με την παρακάτω αντίδραση:

Σε διάλυμα της δεοξυβενζοΐνης (4) 100 mg μίγματος EtOH 10 ml και EtOAc 10 ml, προστέθηκε καταλύτης 10% Pd/C 55 mg και αποκαταστάθηκε ατμόσφαιρα H₂ υπό πίεση 55 psi. Το μίγμα αναδεύτηκε για 5 ώρες σε θερμοκρασία περιβάλλοντος, έως ότου σταμάτησε να παρατηρείται κατανάλωση H₂ και η πίεση έφτασε στα 54 psi. Ακολούθησε διήθηση σε κελίτη και έκπλυση με EtOAc. Το διήθημα εξατμίστηκε υπό ελαττωμένη πίεση και το υπόλειμμα υποβλήθηκε σε χρωματογραφία flash με σύστημα διαλυτών CH₂Cl₂/MeOH αυξανόμενης πολικότητας. Από τη στήλη παραλήφθησαν 60 mg και η απόδοση της αντίδρασης υπολογίζεται α=64,7%

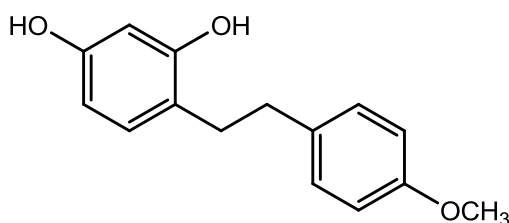


¹H-NMR: (Me₂CO-*d*₆) δ: 7.03 (2H, d, J=8.2Hz, H-2'/6'), 6.72 (2H, d, J=8.2, H-3'/5'), 6.39 (1H, d, J=2.4Hz, H-3), 6.38 (1H, d, J=8.2Hz, H-6), 6.24 (1H, dd, J=8.2/2.4 Hz, H-5), 2.74 (4H, s).

¹³C-NMR:(Me₂CO-*d*₆) δ: 156.7 (C-2, C-4), 156.3 (C-4'), 131.9 (C-6), 130.9 (C-2'/6'), 129.9 (C-1'), 120.2 (C-1), 116.4 (C-3'/5'), 107.6 (C-5), 104.3 (C-3), 37.27 (C-b), 33.5 (C-a).

3.3.2 Σύνθεση του 2,4-διϋδροξυ-4'-μεθοξυδιϋδροστιλβενίου {1-(2,4-διϋδροξυφαινυλο)-2-(4-μεθοξυφαινυλ)-αιθανίου.(13)}

Σε διάλυμα της δεοξυβενζοΐνης (5) 100 mg EtOH 10 ml προστέθηκε καταλύτης 10% Pd/C 40 mg, 1 σταγόνα πυκνό HCl και αποκαταστάθηκε ατμόσφαιρα H₂ υπό πίεση 52 psi. Το μίγμα αναδεύτηκε για 5 ώρες σε θερμοκρασία περιβάλλοντος, έως ότου σταμάτησε να παρατηρείται κατανάλωση H₂ και η πίεση έφτασε στα 50 psi. Ακολούθησε διήθηση σε κελίτη και έκπλυση με EtOAc. Το διήθημα εξατμίστηκε υπό ελαττωμένη πίεση και το υπόλειμμα υποβλήθηκε σε χρωματογραφία flash με σύστημα διαλυτών CH₂Cl₂/MeOH αυξανόμενης πολικότητας. Από τη στήλη παραλήφθησαν 40 mg και η απόδοση της αντίδρασης υπολογίζεται α=43.08%

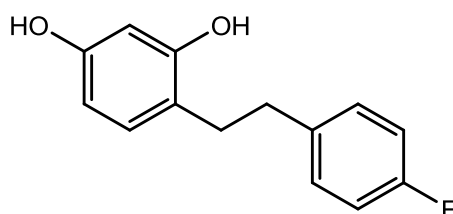


¹H-NMR: (Me₂CO-*d*₆) δ: 8.10 (1H, s, 2-OH), 7.93 (1H, s, 4-OH), 7.12 (2H, d, J=8.2Hz, H-2'/6'), 6.84 (1H, d, J=8.2Hz, H-6), 6.81 (2H, d, J=8.2Hz, H-3'/5'), 6.39 (1H, d, J=2.2Hz, H-3), 6.24 (1H, dd, J=8.2/2.2Hz, H-5), 3.75 (3H, s, OCH₃), 2.77 (4H, s, 2xCH₂).

¹³C-NMR:(Me₂CO-*d*₆) δ:159.6 (C-4'), 156.9 (C-2), 156.4 (C-4), 135.8 (C-1'), 132.1 (C-6), 131.1 (C-2'/6'), 120.3 (C-1), 115.1 (C-3'/5'), 107.9 (C-5), 104.0 (C-3), 56.00 (OCH₃), 36.9 (Cb), 33.6 (Ca).

3.3.3 Σύνθεση του 2,4-διϋδροξυ-4'φθοροδιϋδροστιλβενίου ή {1-(2,4-υδροξυφαινυλ)-2-(4-φθοροφαινυλ)-αιθανίου.(14)

Σε διάλυμα της δεοξυβενζοΐνης (7) 100 mg σε μίγμα EtOH 10 ml και EtOAc 10 ml, προστέθηκε καταλύτης 10% Pd/C 55 mg και αποκαταστάθηκε ατμόσφαιρα H₂ υπό πίεση 53 psi. Το μίγμα αναδεύτηκε για 4 ώρες σε θερμοκρασία περιβάλλοντος, έως ότου σταμάτησε να παρατηρείται κατανάλωση H₂ και η πίεση έφτασε στα 51,5 psi. Ακολούθησε διήθηση σε κελίτη και έκπλυση με EtOAc. Το διήθημα εξατμίστηκε υπό ελαττωμένη πίεση και το υπόλειμμα υποβλήθηκε σε χρωματογραφία flash με σύστημα διαλυτών CH₂Cl₂/MeOH αυξανόμενης πολικότητας. Από τη στήλη παραλήφθηκαν 62 mg και η απόδοση της αντίδρασης υπολογίζεται α=62%



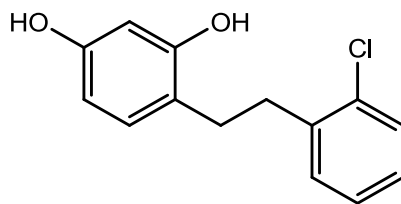
¹H-NMR: (Me₂CO-*d*₆) δ: 8.17 (1H, s, 2-OH), 8.03 (1H, s, 4-OH), 7.22 (2H, d, J=8.0, H2'/6'), 6.99 (2H, d, J=8.0Hz, H3'/5'), 6.82 (1H, d, J=8.0Hz, H-6), 6.40 (1H, d, J=2.0Hz, H-3), 6.25 (1H, dd, J=8.0/2.0Hz, H-5), 2.85-2.82 (2H, m, -CH_{2b}), 2.80-2.77 (2H, m, -CH_{2a})

¹³C-NMR: (Me₂CO-*d*₆) δ: 161.82 (C-4'), 156.66 (C-2'/C-4'), 139.10 (C-1'), 132.1 (C-6), 131.73 (C-2'/C-6'), 119.28 (C-1), 116.10 (C-3'/C-5'), 107.88 (C-5), 104.33 (C-3), 36.98 (Cb), 33.60 (Ca).

3.3.4 Σύνθεση του 2,4-διϋδροξυ-2-χλωροδιϋδροστιλβενίου ή {1-(2,4-υδροξυφαινυλο)-2(2-χλωροφαινυλ)-αιθανίου.(15)

Σε διάλυμα της δεοξυβενζοΐνης (8) 100 mg σε μίγμα EtOH 10 ml και EtOAc 10 ml, προστέθηκε καταλύτης 10% Pd/C 50 mg και αποκαταστάθηκε ατμόσφαιρα H₂ υπό πίεση 55 psi. Το μίγμα αναδεύτηκε για 6 ώρες σε θερμοκρασία περιβάλλοντος, έως ότου σταμάτησε να παρατηρείται κατανάλωση H₂ και η πίεση έφτασε στα 54 psi. Ακολούθησε διήθηση σε κελίτη και έκπλυση με EtOAc. Το διήθημα εξατμίστηκε υπό ελαττωμένη πίεση και το υπόλειμμα υποβλήθηκε σε χρωματογραφία flash με

σύστημα διαλυτών CH₂Cl₂/MeOH αυξανόμενης πολικότητας. Από τη στήλη παραλήφθηκαν 56 mg και η απόδοση της αντίδρασης υπολογίζεται α=60%

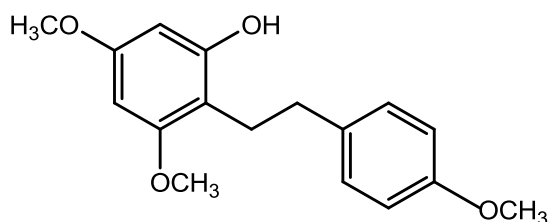


¹H-NMR: (Me₂CO-*d*₆) δ: 7.26-7.21 (4H, m, H-3'/4'/5'/6'), 6.84 (1H, d, J=8.0Hz, H-6), 6.41 (1H, d, J=2.5 Hz, H-3), 6.24 (1H, dd, J=8.0/2.5Hz, H-5), 2.85-2.82 (2H, m, H_b), 2.81-2.78 (2H, m, H_a).

¹³C-NMR:(Me₂CO-*d*₆) δ: 157.24 (C-2/C-4), 143.65 (C-2'), 132.05 (C-6), 131.87 (C-1'), 129.95-127.37 (C-3'/4'/5'/6'), 119.74 (C-1), 107.87 (C-5), 104.33 (C-3), 37.94 (-CH₂a), 33.59 (-CH₂b).

3.3.5 Σύνθεση του 4,6,4'-τριμεθοξυ-2-υδροξυδιϋδροστυλβενίου ή {1-(2-υδροξυ-4,6-μεθοξυφαινυλο)-2-(4-μεθοξυφαινυλ)-αιθανίου.(16)}

Σε διάλυμα της δεοξυβενζοΐνης (11) 120 mg σε EtOAc 15 ml, προστέθηκε καταλύτης 10% Pd/C 80 mg και αποκαταστάθηκε ατμόσφαιρα H₂ υπό πίεση 60 psi. Το μίγμα αναδεύτηκε για 7_{1/2} ώρες σε θερμοκρασία περιβάλλοντος, έως ότου σταμάτησε να παρατηρείται κατανάλωση H₂ και η πίεση έφτασε στα 57,5 psi. Ακολούθησε διήθηση σε κελίτη και έκπλυση με EtOAc. Το διήθημα εξατμίστηκε υπό ελαττωμένη πίεση και το υπόλειμμα υποβλήθηκε σε χρωματογραφία flash με σύστημα διαλυτών *c*-hexane /EtOAc αυξανόμενης πολικότητας. Από τη στήλη παραλήφθηκαν 40 mg και η απόδοση της αντίδρασης υπολογίζεται α=35%



¹H-NMR: (Me₂CO-*d*₆) δ: 7.13 (2H, d, J=8.2Hz, H-2'/H-6'), 6.82 (2H, d, J=8.2Hz, H-3'/H-5'), 6.11 (1H, d, J=2.3Hz, H-5), 6.08 (1H, d, J=2.3Hz, H-3), 3.75 (3H, s, -

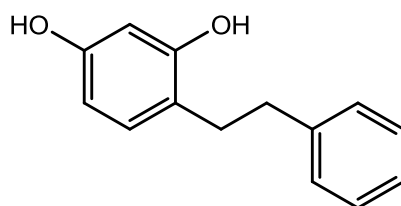
OCH₃), 3.76 (3H, s, -OCH₃), 3.70 (3H, s, -OCH₃), 5.64 (1H, s, -OH), 2.8-2.75 (2H, m, -CH₂), 2.70-2.65 (2H, m, -CH₂).

3.3.6 Σύνθεση του 2,4-διϋδροξυδιϋδροστιλβενίου ή {1-(2-4-υδροξυφαινυλο)- 2-(φαινυλ)-αιθανίου (17)}

Σε διάλυμα της δεοξυβενζοΐνης (7) 100 mg σε μίγμα EtOH 10 ml και EtOAc 10 ml, προστέθηκε καταλύτης 10% Pd/C 65 mg και αποκαταστάθηκε ατμόσφαιρα H₂ υπό πίεση 55 psi. Το μίγμα αναδεύτηκε για 5 ώρες σε θερμοκρασία περιβάλλοντος, έως ότου σταμάτησε να παρατηρείται κατανάλωση H₂ και η πίεση έφτασε στα 50 psi. Ακολούθησε διήθηση σε κελίτη και έκπλυση με EtOAc. Το διήθημα εξατμίστηκε υπό ελαττωμένη πίεση οπότε και παραλήφθηκαν 94 mg προϊόντος με απόδοση της αντίδρασης α=99,5%.

Επίσης το ίδιο προϊόν παραλήφθηκε και με την παρακάτω αντίδραση:

Σε διάλυμα της δεοξυβενζοΐνης (2) 100 mg σε EtOH 10 ml προστέθηκε καταλύτης 10% Pd/C 62 mg και αποκαταστάθηκε ατμόσφαιρα H₂ υπό πίεση 52.5 psi. Το μίγμα αναδεύτηκε για 4½ ώρες σε θερμοκρασία περιβάλλοντος, έως ότου σταμάτησε να παρατηρείται κατανάλωση H₂ και η πίεση έφτασε στα 50 psi. Ακολούθησε διήθηση σε κελίτη και έκπλυση με EtOAc. Το διήθημα εξατμίστηκε υπό ελαττωμένη πίεση και το υπόλειμμα υποβλήθηκε σε χρωματογραφία flash με σύστημα διαλυτών Cyclo/EtOAc αυξανόμενης πολικότητας. Από τη στήλη παραλήφθηκαν 40 mg και η απόδοση της αντίδρασης υπολογίζεται α=58%



¹H-NMR: (Me₂CO-d₆) δ: 8.13 (1s, 2-OH), 7.95 (1s, 4-OH), 7.25-7.18 (5H, m, H-2'/3'/4'/5'/6'), 6.84 (1H, d, J=8.2Hz, H-6), 6.40 (1H, brs H-3), 6.24 (1H, brd, J=8.2, H-5), 2.84-2.82 (2H, m, H_b), 2.80-2.78 (2H, m, H_a).

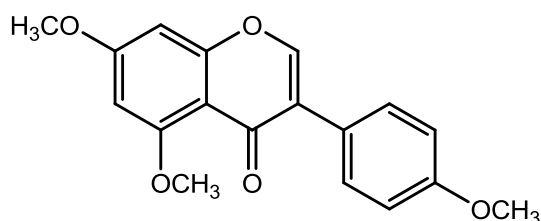
¹³C-NMR:(Me₂CO-d₆) δ: 157.78 (C-2), 157.35 (C-4), 143.8-126 (C-2'/3'/4'/5'/6'), 131.95 (C-6), 131.35 (C-1'), 119.96 (C-1), 107.75 (C-5), 104.24 (C-3), 37.85 (-CH₂b), 32.85(-CH₂a).

3.4 ΣΥΝΘΕΣΗ ΙΣΟΦΛΑΒΟΝΗΣ

Για τη σύνθεση της ισοφλαβόνης χρησιμοποιήθηκε ως πρώτη ύλη η δεοξυβενζοΐνη (11) της οποίας η σύνθεση περιγράφεται παραπάνω.

3.4.1. Σύνθεση της {5,7,4'-τριμεθοξυισοφλαβόνης} (18)

Σε διάλυμα 400 mg (1,32 mmol) της δεοξυβενζοΐνης (11) σε 1,5ml DMF προστέθηκε 0,5 ml $\text{BF}_3\text{Et}_2\text{O}$ σε ατμόσφαιρα αργού (άνυδρες συνθήκες). Το μίγμα θερμάνθηκε αρχικά στους 50°C για 10 λεπτά σε ελαιόλουτρο. Έπειτα ακολουθεί προσθήκη 0,6 ml MeSO_2Cl και το μίγμα της αντίδρασης θερμαίνεται υπό ανάδευση στους 85°C για 2 ώρες. Μετά το τέλος της αντίδρασης, το μίγμα αποχύνεται σε παγόνερο και ακολουθούν διαδοχικές εκχυλίσεις με οξεϊκό αιθυλεστέρα. Οι οργανικές φάσεις συλλέχθηκαν και εκπλύθηκαν μια φορά με νερό και μια φορά με υδατικό διάλυμα χλωριούχου νατρίου. Έπειτα εξατμίστηκε ο διαλύτης της οργανικής στοιβάδας με εξάτμιση υπό ελατωμένη πίεση και το υπόλειμμα υποβλήθηκε σε χρωματογραφία flash με σύστημα διαλυτών c-hexane/EtOAc αυξανόμενης πολικότητας. Από τη στήλη παραλήφθηκαν 150 mg του επιθυμητού προϊόντος, $\alpha=36,4\%$.

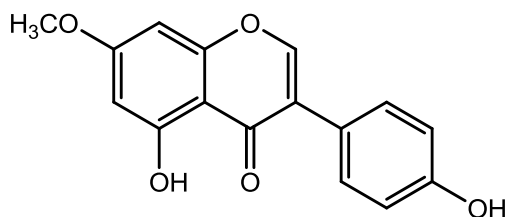


$^1\text{H-NMR}$: ($\text{Me}_2\text{CO}-d_6$) δ : 7.94 (1H, s, H-2), 7.45 (2H, d, $J=8.4\text{Hz}$, H-2'/6'), 6.91 (2H, d, $J=8.8\text{Hz}$ H-3'/5'), 6.54 (1H, d, $J=2.0\text{Hz}$, H-8), 6.45 (1H, d, $J=2.0\text{Hz}$, H-6), 3.93 (3H, s, 7-OCH₃), 3.88 (3H, s, 5-OCH₃), 3.78 (3H, s, 4'-OCH₃).

3.4.2 Σύνθεση της 5,4'-διϋδροξυ-7-μεθοξυισοφλαβόνης (19)

Διάλυμα 65 mg (0.21mmol) της ισοφλαβόνης σε 2 ml άνυδρου CH_2Cl_2 ψύχεται στους -78°C σε ατμόσφαιρα αργού, ακολουθεί σταδιακή προσθήκη 2,1 ml διαλύματος 1M BBr_3 σε CH_2Cl_2 και το μίγμα αφήνεται υπό ανάδευση για 1 ώρα. Ακολουθεί σταδιακή άνοδος της θερμοκρασίας του διαλύματος στους 0°C όπου και παραμένει για 2 ώρες. τέλος ακολουθεί επαναφορά του διαλύματος σε θερμοκρασία δωματίου όπου και αφήνεται υπό ανάδευση για 24 ώρες. Μετά το πέρας της αντίδρασης το μίγμα αποχύνεται σε παγόνερο και ακολουθούν διαδοχικές εκχυλίσεις

με EtOAc. Οι οργανικές φάσεις συλλέχθηκαν και εκπλύθηκαν μια φορά με νερό και μια φορά με υδατικό διάλυμα χλωριούχου νατρίου. Έπειτα εξατμίστηκε ο διαλύτης της οργανικής στοιβάδας με εξάτμιση υπό ελαττωμένη πίεση και το υπόλειμμα υποβλήθηκε σε χρωματογραφία flash με σύστημα διαλυτών CH₂Cl₂/MeOH αυξανόμενης πολικότητας. Από τη στήλη παραλήφθηκαν 50 mg του επιθυμητού μονομεθυλιωμένου προϊόντος Η απόδοση της αντίδρασης υπολογίζεται ίση με α=83,3%.

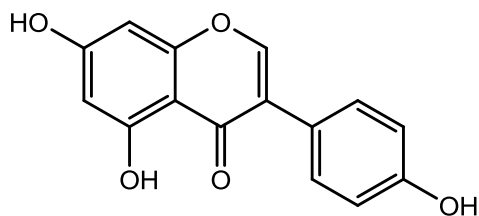


¹H-NMR: (Me₂CO-*d*₆) δ: 13.00 (1H, s, 5-OH), 8.67 (1H, s, 4'-OH), 8.22 (1H, s, H-2), 7.45 (2H, d, J=8.5Hz, H-2'/6'), 6.90 (2H, d, J=8.5Hz, H-3'/5'), 6.55 (1H, d, J=2.2Hz, H-8), 6.35 (1H, d, J=2.2Hz, H-6), 3.92 (3H, s, 7-OCH₃).

¹³C-NMR:(Me₂CO-*d*₆) δ: 181.9 (C-4), 166.92 (C-7), 163.48 (C-5), 158.55 (C-4'), 155.08 (C-2), 132.34 (C-2'/C-6'), 123.74 (C-3), 122.87 (C-1'), 116.71 (C-3'/C-5'), 106.76 (C-4a), 99.96 (C-6), 93.67 (C-8), 57.00 (7-OCH₃).

3.4.3 Σύνθεση της 7,5,4'-τριϋδροξυισοφλαβόνης (20)

Το προϊόν αυτό παραλήφθηκε κατά τη διαδικασία παρασκευής του προϊόντος (19) ως παραπροϊόν της αντίδρασης απομεθυλίωσης. Από το χρωματογραφικό διαχωρισμό παραλήφθηκαν 10mg του παραπροϊόντος (20) και η απόδοση της αντίδρασης υπολογίζεται ίση με α=16%.

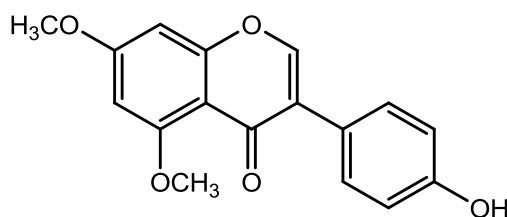


¹H-NMR: (Me₂CO-*d*₆) δ: 8.17 (1H, s, H-2), 7.45 (2H, d, J=8.0Hz, H-2'/6'), 6.90 (2H, d, J=8.0Hz, H-3'/5'), 6.41 (1H, d, J=2.4Hz, H-8), 6.28 (1H, d, J=2.4Hz, H-6).

¹³C-NMR:(Me₂CO-*d*₆) δ:181.4 (C-4), 164.7 (C-7), 163.5 (C-5), 158.5 (C-8a), 158.0 (C-4'), 154.0 (C-2), 131.2 (C-2'/6'), 123.9 (C-3), 123.4 (C-1'), 117.8 (C-4a), 116.0 (C-6), 116.0 (C-3'/5'), 103.2 (C-8).

3.4.4 Σύνθεση της 5,7-διμεθοξυ-4'-υδροξυισοφλαβόνης (21)

Το προϊόν αυτό παραλήφθηκε κατά τη διαδικασία παρασκευής του προϊόντος (19) ως παραπροϊόν προηγούμενης αντίδρασης απομεθυλίωσης, κατά την οποία δεν παραλάβαμε τη γενιστεΐνη. Από το χρωματογραφικό διαχωρισμό παραλήφθηκαν 20 mg του παραπροϊόντος (21) και η απόδοση της αντίδρασης υπολογίζεται ίση με α=30,5%.



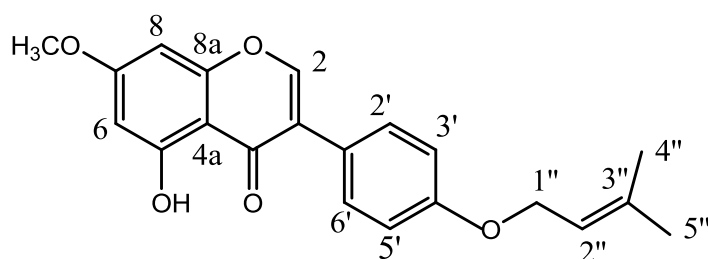
¹H-NMR: (Me₂CO-*d*₆) δ: 8.54 (1H, s, 4'-OH), 7.97 (1H, s, H-2), 7.39 (2H, d, J=8.5Hz, H-2'/6'), 6.85 (2H, d, J=8.5Hz, H-3'/5'), 6.57 (2H, d, J=2.2Hz, H-8), 6.48 (2H, d, J=2.2Hz, H-6), 3.93 (3H, s, 7-OCH₃), 3.88 (3H, s, 5-OCH₃).

¹³C-NMR:(Me₂CO-*d*₆) δ: 174.4 (C-4), 164.7 (C-7), 162.1 (C-2), 160.4 (C-8a), 158.10 (C-4'). 151.5 (C-2), 131.6 (C-2'/6'), 126.1 (C-3), 124.5 (C-1'), 116.5 (C-3'/5'), 110.5 (C-4a), 97.6 (C-6), 93.6 (C-8), 57.4 (5-OCH₃), 56.3 (7-OCH₃)

3.4.5 Σύνθεση του 7-μεθοξυ-5-υδροξυ-4'-ισοφλαβονυλοπρενυλαιθέρα (22)

Σε μίγμα 55mg (0,2 mmol) του παραγώγου (19) και 195,48mg (0,6mmol) ανθρακικό κέσιο, προστέθηκαν 2ml άνυδρου DMF και 2 σταγόνες νερού, υπό ατμόσφαιρα αργού. Η αντίδραση αφέθηκε υπό ανάδευση στους 40⁰C για μισή ώρα. Ακολούθησε στάγδην προσθήκη 46,8 μl (0,4 mmol) prenyl bromine η αντίδραση αφέθηκε για 1 ώρα επιπλέον, μέχρι πλήρους κατανάλωσης του αντιδρώντος. Ακολούθησε απόχυση

σε παρόντο του μίγματος της αντίδρασης και διαδοχικές εκχυλίσεις με EtOAc. Οι οργανικές φάσεις συλλέχθηκαν και εκπλύθηκαν μια φορά με νερό και μια φορά με υδατικό διάλυμα χλωριούχου νατρίου. Έπειτα εξεταμίστηκε ο διαλύτης της οργανικής στοιβάδας με εξάτμιση υπό ελατωμένη πίεση και το υπόλειμμα υποβλήθηκε σε παρασκευαστική χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας για το διαχωρισμό των προϊόντων. Παραλήφθηκαν 40mg προϊόντος και η απόδοση της αντίδρασης υπολογίζεται ίση με $\alpha=54,5\%$.

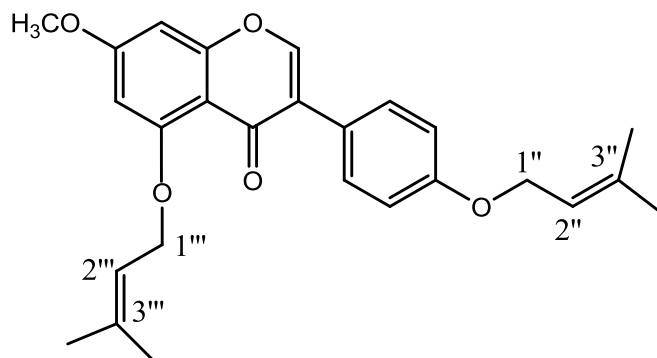


¹H-NMR: (Me₂CO-*d*₆) δ : 12.97 (1H, s, 5-OH), 8.24 (1H, s, H-2), 7.53 (2H, d, $J=8.8\text{Hz}$, H-2'/6'), 6.99 (2H, d, $J=8.8\text{Hz}$, H-3'/5'), 6.54 (1H, d, $J=2.4\text{Hz}$, H-8), 6.35 (1H, d, $J=2.4\text{Hz}$, H-6), 5.48 (1H, m, -H-2''), 4.60 (2H, d, $J=6.0\text{ Hz}$, -H-1''), 3.92 (3H, s, -OCH₃), 1.78 (3H, s, -H-4''), 1.76 (3H, s, -CH-5'').

¹³C-NMR:(Me₂CO-*d*₆) δ : 181.6 (C-4), 166.6 (C-7), 163.6 (C-5), 159.5 (C-4'), 159.1 (C-8a), 155.4 (C-2), 138.0 (-C-3''), 132.0 (C-2'/C-6'), 130.9 (C-3), 123.8 (C-1'), 121.9 (-C-2''), 115.9 (C-3'/C-5'), 107.3 (C-4a), 99.5 (C-6), 93.5 (C-8), 66.2 (C-1''), 57.1 (7-OCH₃), 25.9 (-C-4''), 18.4 (-C-5'').

3.4.6 Σύνθεση του 7-μεθοξυ-5, 4'-ισοφλαβονυλοδιπρενυλαιθέρα (23)

Το προϊόν αυτό παραλήφθηκε κατά τη παρασκευή του παραγώγου (22) ως παραπροϊόν. Από την προπαρασκευαστική χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας απόμονώθηκαν 14 mg προϊόντος, με απόδοση αντίδρασης $\alpha=16\%$

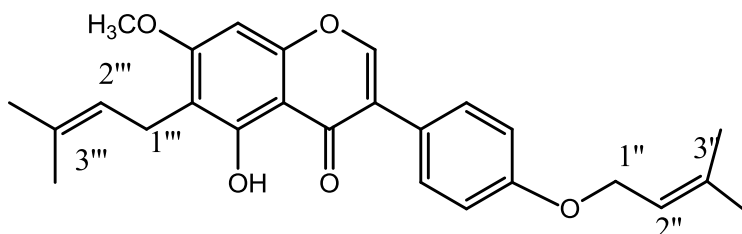


¹H-NMR: (Me₂CO-*d*₆) δ: 7.99 (1H, s, H-2), 7.47 (2H, d, J=8.8Hz, H-2'/6'), 6.94 (2H, d, J=8.8Hz, H-3'/5'), 6.56 (1H, d, J=2.4Hz, H-8), 6.49 (1H, d, J=2.4Hz, H-6), 5.53 (1H, m, -H-2'''), 5.48 (1H, m, -H-2''), 4.66 (2H, d, J=6.6 Hz, -H-1'''), 4.58 (2H, d, J=6.6 Hz, -H-1''), 3.92 (3H, s, -OCH₃), 1.78 (6H, s, -H-4'''/H-4''), 1.76 (6H, s, -H-5'''/H-5'').

¹³C-NMR:(Me₂CO-*d*₆) δ: 174.5 (C-4), 164.4 (C-7), 161.7 (C-5), 160.6 (C-8a), 159.5(C-4'), 151.5 (C-2), 137.6 (-C-3''), 131.9 (C-2'/C-6'), 130.5 (C-3), 126.1 (C-1'), 122.2 (-C-2''), 121.3 (-C-2'''), 115.8 (C-3'/C-5'), 110.7 (C-4a), 98.7 (C-6), 94.1 (C-8), 67.4 (C-1'''), 65.9 (C-1''), 57.0 (7-OCH₃), 26.5 (-C-4'''/C-4''), 18.8 (-C-5'''/C-5'').

3.4.7 Σύνθεση του 7-μεθοξυ-5-υδροξυ-6-πρενυλο- 4' πρενυλαιθερα της ισοφλαβόνης (24)

Το προϊόν αυτό παραλήφθηκε κατά τη παρασκευή του παραγώγου (22), ως παραπροϊόν. Από την προπαρασκευαστική χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας απομονώθηκαν 9mg προϊόντος, με απόδοση αντίδρασης α=9%



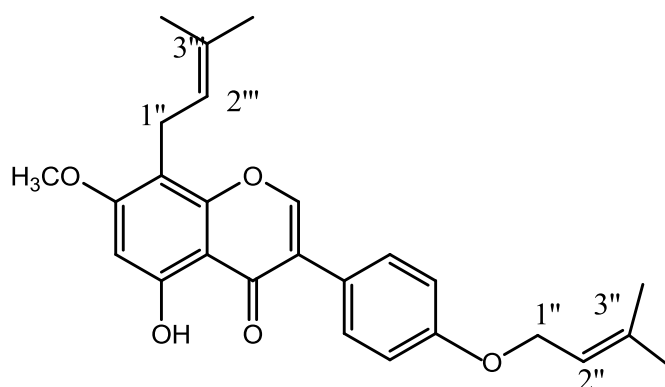
¹H-NMR: (Me₂CO-*d*₆) δ: 8.25 (1H, s, H-2), 7.54 (2H, d, J=8.8Hz, H-2'/6'), 6.99 (2H, d, J=8.8Hz, H-3'/5'), 6.65 (1H, s, H-8), 5.48 (1H, m, -H-2''), 5.21 (1H, m, -H-2'''), 4.61 (2H, d, J=6.6 Hz, -H-1''), 3.97 (3H, s, 7-OCH₃), 3.34 (2H, d, J=6.6 Hz, -H-1'''), 1.78 (3H, s, -H-4'), 1.77 (3H, s, -CH-4'''), 1.76 (3H, s, -CH-5''), 1.64 (3H, s, H-5''').

¹³C-NMR:(Me₂CO-*d*₆) δ: 181.6, (C-4), 164.4 (C-7), 160.1 (C-4'), 159.5 (C-5), 157.3 (C-8a), 155.0 (C-2), 137.9 (-C-3''), 131.9, (C-2'/C-6'), 13.7 (-C-3'''), 124.2 (C-3), 123.8 (C-1'), 123.5 (-C-2'''), 121.8 (-C-2''), 115.8 (C-3'/C-5'), 112.8 (C-6), 106.6

(C-4a), 91.4 (C-8), 65.8 (C-1''), 57.4 (7-OCH₃), 26.3 (C-4''), 25.82 (C-4'''), 22.3 (C-1'''), 17.9 (C-5''/C-5''').

3.4.8 Σύνθεση του 7-μεθοξυ-5-υδροξυ- 8-πρενυλο- 4' πρενυλαιθερα της ισοφλαβόνης (25)

Το προϊόν αυτό παραλήφθηκε κατά τη παρασκευή του παραγώγου (22) ως παραπροϊόν. Από την προπαρασκευαστική χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας απομονώθηκαν προϊόντος 7mg, με απόδοση αντίδρασης α=8%



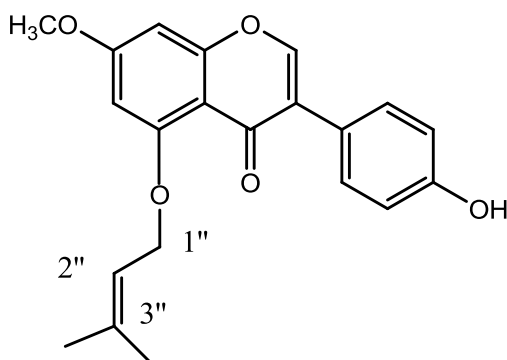
¹H-NMR: (Me₂CO-*d*₆) δ: 8.31 (1H, s, H-2), 7.55 (2H, d, J=8.8Hz, H-2'/6'), 7.00 (2H, d, J=8.8Hz, H-3'/5'), 6.50 (1H, s, H-6), 5.49 (1H, m, -H-2''), 5.19 (1H, m, H-2'''), 4.60 (2H, d, J=6.6 Hz, H-1''), 3.97 (3H, s, 7-OCH₃), 3.43 (2H, d, J=6.6 Hz, H-1'''), 1.80 (3H, s, H-4'''), 1.78 (3H, s, H-4''), 1.76 (3H, s, H-5''), 1.64 (3H, s, H-5''').

¹³C-NMR:(Me₂CO-*d*₆) δ: 182.1 (C-4), 163.6 (C-7), 162.8 (C-5), 159.9 (C-4'), 155.5 (C-2), 155.3 (C-8a), 138.1 (-C-3''), 132.1 (-C-3'''), 131.9, (C-2'/C-6'), 123.9 (C-1'), 123.4 (C-3), 123.2 (-C-2'''), 121.91 (-C-2''), 115.9 (C-3'/C-5'), 108.2 (C-8), 96.6 (C-6), 66.3 (C-1''), 57.4 (7-OCH₃), 22.7 (C-1'''), 25.7 (C-4''/C-4'''), 18.8(-C-5''), 17.8 (C-5''').

3.4.9 Σύνθεση του 7-μεθοξυ-4'-υδροξυ- 5-πρενυλαιθερα της ισοφλαβόνης (26)

Το προϊόν αυτό απομονώθηκε κατά την παρασκευή του παραγώγου (22) σε προηγούμενη αντίδραση αιθεροποίησης. Σε μίγμα 35mg (0,13 mmol) του παραγώγου (19) και 53,8 mg (0,39mmol) potassium carbonate προστέθηκαν 2ml άνυδρου DMF υπό ατμόσφαιρα αργού. Η αντίδραση αφέθηκε υπό ανάδευση στους

40⁰C για μισή ώρα. Ακολούθησε στάγδην προσθήκη 30,2μl (0,26 mmol) πρενυλοβρωμιδίου η αντίδραση αφέθηκε για 24 ώρες. Ακολούθησε απόχυση σε παγόνερο του μίγματος της αντίδρασης και διαδοχικές εκχυλίσεις με EtOAc. Οι οργανικές φάσεις συλλέχθηκαν και εκπλύθηκαν μια φορά με νερό και μια φορά με υδατικό διάλυμα χλωριούχου νατρίου. Έπειτα εξατμίστηκε ο διαλύτης της οργανικής στοιβάδας με εξάτμιση υπό ελατωμένη πίεση και το υπόλειμμα υποβλήθηκε σε παρασκευαστική χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας για το διαχωρισμό των προϊόντων. Παραλήφθηκαν 15mg προϊόντος και η απόδοση της αντίδρασης υπολογίστηκε α=32%.

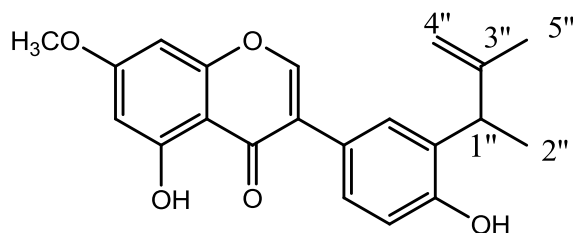


¹H-NMR: (Me₂CO-*d*₆) δ: 8.22 (1H, s, H-2), 7.46 (2H, d, J=8.0Hz, H-2'/6'), 6.90 (2H, d, J=8.0Hz, H-3'/5'), 6.56 (1H, d, J=2.0Hz, H-8), 6.49 (1H, d, J=2.0Hz, H-6), 5.53 (1H, m, H-2''), 4.65 (2H, d, J=6.6 Hz, H-1''), 3.92 (3H, s, 7-OCH₃), 1.77 (3H, s, H-4''), 1.76 (3H, s, -H-5'').

¹³C-NMR:(Me₂CO-*d*₆) δ: : 182.1 (C-4), 165.7 (C-7), 161.1 (C-5), 159.1 (C-8a), 158.0 (C-4'), 154.1 (C-2), 137.2 (-C-3''), 130.4 (C-2'/C-6'), 123.4 (C-3), 123.1 (C-1'), 120.1 (-C-2''), 115.1 (C-3'/C-5'), 110.7 (C-4a), 97.6 (C-6), 92.3 (C-8), 66.0 (C-1''), 55.7 (7-OCH₃), 25.6 (-C-4''), 18.1 (-C-5'').

3.4.10 Σύνθεση της 7-μεθοξυ-5-υδροξυ-3'-(3-μεθυλοβουτ-3-εν-2-υλ)ισοφλαβόνης (27)

20mg του παραγώγου (22), διαλύονται σε 2ml N,N-διαιθυλανιλίνης υπό ατμόσφαιρα αργού και το μίγμα αφήνεται υπό ανάδευση στους 200⁰C για 72 ώρες.

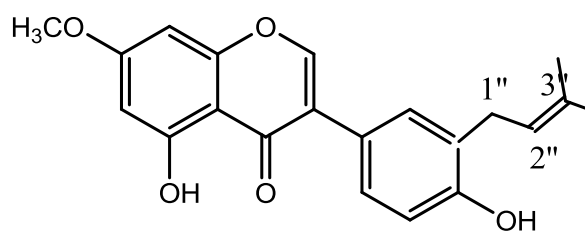


¹H-NMR: (Me₂CO-*d*₆) δ: 13.06 (1H, s, 5-OH), 8.49 (1H, s, 4'-OH), 8.19 (1H, s, H-2), 7.35 (1H, d, J=2.0Hz, H-2'), 7.29 (1H, dd, J=8.0/2.0Hz, H-6'), 6.92 (1H, d, J=8.0Hz, H-5'), 6.55 (1H, d, J=2.0Hz, H-8), 6.35 (1H, d, J=2.0Hz, H-6), 4.89 (2H, d, J=17Hz, H-4''), 3.92 (3H, s, 7-OCH₃), 3.90 (1H, m, H-1''_{pr}), 1.68 (3H, s, H-5''_{pr}), 1.34 (3H, d, J=7.0Hz, H-2''_{pr}).

¹³C-NMR:(Me₂CO-*d*₆) δ: 181.7 (C-4), 166.7 (C-7), 163.7(C-5), 159.0 (C-8a), 155.7 (C-4'), 155.1 (C-2), 149.5 (-C-3''_{pr}), 132.3 (C-3'), 129.8 (C-2'), 129.3 (C-6'), 123.9 (C-3), 123.10 (C-1'), 116.61 (C-5'), 110.9 (C-4''), 106.76 (C-4a), 99.37 (C-6), 93.72 (C-8), 57.14 (7-OCH₃), 39.10 (-C-1''), 23.0 (C-5''), 20.40 (C-2'').

3.4.11. Σύνθεση της 5,4'-διϋδροξυ-7-μεθοξυ-3'-(3-μεθυλοβουτεν-2-υλ)ισοφλαβόνης (28).

Σε διάλυμα 14mg (0.04mmol) του 7-μεθοξυ-5υδροξυ-4'-(3-μεθυλ-βουτεν-2-υλ)ισοφλαβονυλαιθέρα σε 0,5 ml ακετονιτριλίου (CH₃CN), προστίθεται καταλυτική ποσότητα bismuthium triflate Bi(OTf)₃ 1.3 mg (0.002mmol). Το μίγμα αναδεύεται σε θερμοκρασία δωματίου για 3 ώρες και στους 35⁰C για 1,5 ώρα. Η αντίδραση συνεχίστηκε έως ότου δεν παρατηρήθηκε παραιτέρω κατανάλωση πρώτης ύλης, εξατμίστηκε ο διαλύτης με εξάτμιση υπό ελατωμένη πίεση και το υπόλειμμα υποβλήθηκε σε παρασκευαστική χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας για το διαχωρισμό των προϊόντων. Από την προπαρασκευαστική χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας απόμονώθηκαν 6mg προϊόντος, με απόδοση αντίδρασης α=42%



¹H-NMR: (CDCl₃) δ: 12.88 (1H, s, 5-OH), 7.85 (1H, s, H-2), 7.22 (2H, m, H-2'/6'), 6.86 (1H, d, J=8.2Hz, H-5'), 6.40 (1H, d, J=2.2Hz, H-8), 6.38 (1H, d, J=2.2Hz, H-6), 5.34 (1H, m, H-2''), 3.39 (2H, d, J=7Hz, H-1''), 3.88 (3H, s, 7-OCH₃), 1.79 (3H, s, H-4''), 1.78 (3H, s, H-5''),

¹³C-NMR: (CDCl₃) δ: 196.2 (-C=O), 180.9 (C-4), 165.5 (C-7), 162.70 (C-5), 157.9 (C-8a), 154.7 (C-4'), 152.7 (C-2), 135 (C-3''), 130.5 (C-2'), 128.2 (C-6'), 127.1 (C-3'), 123.9 (C-3), 122.7 (C-1'), 121.5 (C-2''), 115.9 (C-5'), 106.3 (C-4a), 98.2 (C-6), 92.4 (C-8), 55.8 (7-OCH₃), 29.8 (C-1''), 25.8 (C-4''), 17.9 (C-5'').

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ-ΠΡΟΟΠΤΙΚΕΣ

Συμπερασματικά στα πλαίσια της παρούσας εργασίας ασχοληθήκαμε με τη σύνθεση δεοξυβενζοϊνών, διϋδροστιλβενίων και ισοφλαβονών και τη μελέτη της βιολογικής τους δραστηριότητας σε οιστρογονικούς υποδοχείς, στην αναστολή δράσης του ενζύμου της τυροσινάσης και στην αγγειογένεση.

- Πιο συγκεκριμένα παρασκευάστηκαν έντεκα δεοξυβενζοΐνες (**1-11**) με την αντίδραση ακυλίωσης Friedel-Crafts, 6 διϋδροστιλβένια (**12-17**) με καταλυτική υδρογόνωση υπό πίεση των αντίστοιχων δεοξυβενζοϊνών και 11 ισοφλαβόνες (**18-28**) μέσω της αντίδρασης φορμυλίωσης της δεοξυβενζοΐνης (**11**) και αντιδράσεων απομεθυλίωσης και πρενυλίωσης.
- Ασχοληθήκαμε με τη σύνθεση διαρυλαιθανολών από τις αντίστοιχες δεοξυβενζοΐνες, ενώσεις που αποδείχτηκαν πολύ ασταθείς και δεν καταφέραμε να τις απομονώσουμε. Επίσης έγιναν προσπάθειες σύνθεσης 5 δεοξυβενζοϊνών και 4 διϋδροστιλβενίων που δεν απέδωσαν το επιθυμητό αποτέλεσμα.

Με βάση τα αποτελέσματα της μελέτης της βιολογικής δραστηριότητας των συνθετικών παραγώγων στους προαναφερόμενους στόχους

- τα διϋδροστιλβενικά παράγωγα αποδείχτηκαν ισχυροί αναστολείς της τυροσινάσης, με δραστηριότητα έως και 92 φορές μεγαλύτερη του kojic acid, το οποίο αποτελεί έναν από τους ισχυρότερους αναστολείς του ενζύμου
- προκαταρκτικός έλεγχος της δραστηριότητάς τους, σε καλλιέργειες της EA.hy926 ενδοθηλιακής κυτταρικής σειράς, έδειξε πως τα παράγωγα (**13, 15, 17**) προκαλούν ισχυρή αναστολή της ζωτικότητας των κυττάρων ενώ
- οι δεοξυβενζοΐνες και οι ισοφλαβόνες πρέπει να μελετηθούν εκτενέστερα ως προς την αλληλεπίδρασή τους με τους οιστρογονικούς υποδοχείς

Στηριζόμενοι στα παραπάνω αποτελέσματα σκοπεύουμε στο μέλλον να ασχοληθούμε εκτενέστερα με τη συνθετική παρασκευή υποκατεστημένων διϋδροστιλβενικών παραγώγων και *cis-,trans-* στιλβενίων με σκοπό την εξαγωγή

συμπερασμάτων όσον αφορά στις σχέσεις δομής-δράσης καθώς επίσης και μελέτη του μηχανισμού αυτής. Τέλος, άμεσος στόχος μας είναι και η τροποποίηση της συνθετικής πορείας της ισοφλαβόνης με σκοπό τη βελτίωση της συνολικής απόδοσης του προϊόντος καθώς και η σύνθεση αναλόγων ισοφλαβονών με πρενυλομάδες με σκοπό τη συγκριτική μελέτη της βιολογικής τους δράσης σε διάφορους στόχους.

Βιβλιογραφία

1. Adesanya, S.A.; Ogundana, S. K.; Roberts, M.F. Dihydrostilbene phytoalexins from *Dioscorea bulbifera* and *D. dumentorum*. *Phytochem.*, **1989**, *28*, 713-174.
2. Balasubramanian, S.; Nair, M.G. An efficient “one pot” synthesis of isoflavone. *Synth. Commun.*, **2000**, *30*, 469–484.
3. Balasubramanian, S.; Ward, D. L.; Nair, M.G. The first isolation and crystal structure of a boron difluoro complex (isoflavone yellow). Biologically active intermediates produced during isoflavone synthesis. *J. Chem. Soc., Perkin Trans*, **2000**, *1*, 567–569.
4. Barend, C.B.; Bezuidenhout, E.; Brandt, V.; Ferreira, F.; Flavonoid analogues from *Pterocarpus* species. *Phytochem.*, **1987**, *26*, 531-535.
5. Bazin, M.A; Kihel, L.; Lancelot, J.C.; Raul, S. Original one-pot microwave-promoted Hunsdiecker–Suzuki strategy: straightforward access to *trans*-1,2-diarylethenes from cinnamic acids *Tetrahedron Lett.*, **2007**, *48*, 4347-4351.
6. Beck, A.B.; Kowala, C.; Lamberton, J.A. 2,4-Dihydroxy-4'-methoxybenzil, a probable artefact from formononetin in subterranean clover extracts. *Aust. J. Chem.*, **1966**, *19*, 1755–1757.
7. Biondi, D.M.; Rocco C.; Ruberto, G. Dihydrostilbene Derivatives from *Glycyrrhiza glabra* Leaves. *J. Nat. Prod.*, **2005**, *68*, 1099-1102.
8. Biondi D.M., Rocco C. and Ruberto G. New Dihydrostilbene Derivatives from the Leaves of *Glycyrrhiza glabra* and Evaluation of Their Antioxidant Activity. *J. Nat. Prod.*, **2003**, *66*, 477-480.
9. Blaich, G.; Pfaff, E.; Metzler, M. Metabolism of diethylstilbestrol in hamster hepatocytes. *Biochem. Pharmacol.*, **1987**, *36*, 19, 3135-3140,.
10. Cano, A.; Garcia-Perez, M.A.; Tarin, J.J. Isoflavones and cardiovascular disease. *Maturitas*, **2010**, *67*, 219–226.
11. Carmeliet, P. Mechanisms of angiogenesis and arteriogenesis. *Nat. Med.*, **2000**, *4*, 389-395.
12. Chang, T.S. An Updated Review of Tyrosinase Inhibitors. *Int. J. Mol. Sci.* **2009**, *10*, 2440-2475.
13. Chang, T.S.; Ding, H.Y.; Tai, S.S.K.; Wud, C.Y. Mushroom tyrosinase inhibitory effects of isoflavones isolated from soygerm koji fermented with *Aspergillus oryzae* BCRC 32288. *Food Chem.*, **2007**, *105*, 1430–1438.

14. Changlt, Y.C.; Nair, M.G.; Santell, R.C.; Helferich, G.W. Microwave-Mediated Synthesis of Anticarcinogenic Isoflavones from Soybeans. *J. Agric. Food Chem.*, **1994**, *42*, 1869-1871
15. Cho, B.T.; Kang, S.K.; Kim, M.S.; Ryu, S.R.; An, D.K. Solvent-free reduction of aldehydes and ketones using solid acid-activated sodium borohydride. *Tetrahedron*, **2006**, *62*, 8164–8168.
16. Cline, E.R.I.; Adesanya, S.; Ogundana, A.S.K.; Roberts, M.F. Induction of PAL activity and dihydrostilbene phytoalexins in *Dioscorea alata* and their plant growth inhibitory properties. *Phytochem.*, **1989**, *28*,10, 2621-2625.
17. Collins, P. Plant-derived estrogens relax coronary arteries in vitro by a calcium antagonistic mechanism. *J. Am. Coll. Cardiol.* **2000**, *35*, 1977–1985.
18. Cornwell, T.; Cohick, W.; Raskin, I. Dietary phytoestrogens and health. *Phytochem.*, **2004**, *65*, 995–1016.
19. Cushman, M.; Nagarathnam, D.; Burg, D. L.; Geahlen, R.L. Synthesis and Evaluation of Stilbene and Dihydrostilbene Derivatives as Potential Anticancer Agents That Inhibit Tubulin Polymerization. *J. Med. Chem.*, **1991**, *34*, 2579-25-78.
20. Dewick, P.M.; Steele, M.J. Biosynthesis of the phytoalexin phaseollin in *Phaseolus vulgaris*. *Phytochem.*, **1982**, *21*, 7,1599-1603.
21. Dewick, P.M. The Flavonoids: Advances in research since 1986, Harborne, J. B. Ed., Chapman and Hall L, **1994**, 676.58, 10027–10032.
22. Djiogue, S.; Halabalaki, M.; Alexi, X.; Njamen, D.; Fomum, Z.T.; Alexis, M.N.; Skaltsounis, A.L. Isoflavonoids from *Erythrina poeppigiana*: Evaluation of Their Binding Affinity for the Estrogen Receptor. *J. Nat. Prod.*, **2009**, *72*, 1603–1607.
23. Eldridge, M.D.; Murray, C.W.; Auton, T.R.; Paolini, G.V.; Mee, R.P. *J. Comput. Aid. Mol. Des.*, **1997**, *11*, 425.
24. Fagboyn, D.E.; Ogundana, S.K.; Adesanya, S.A.; Roberts, M.F. Dihydrostilbenes phytoalexins from *Dioscorea rotunda*. *Phytochem.*, **1987**, *26*, 12, 3187-3189.
25. Fang, L.; Guo, H.F.; Lou, H.X. Three New Bibenzyl Derivatives from the Chinese Liverwort *Marchantia polymorpha*. *L. Helv. Chim. Acta*, **2007**, *90*.
26. Felpin, F.X.; Lory, C.; Sow, H.; Acherar, S. Practical and efficient entry to isoflavones by Pd(0)/C-mediated Suzuki–Miyaura reaction. Total synthesis of geranylated isoflavones. *Tetrahedron*, **2007**, *63*, 14, 3010-3016.

27. Figtree, G.A.; Griffiths, H.; Lu, Y.Q.; Webb, C.M.; MacLeod, K.; Collins, P. Plant-derived estrogens relax coronary arteries in vitro by a calcium antagonistic mechanism. *J. Am. Coll. Cardiol.*, **2000**, *35*, 1977–1985.
28. Fokialakis, N.; Lambrinidis, G.; Mitsiou, D.J.; Aligiannis, N.; Mitakou, S.; Skaltsounis, A.L.; Pratsinis, H.; Mikros, E.; Alexis, M.N. A New Class of Phytoestrogens: Evaluation of the Estrogenic Activity of Deoxybenzoins *Chem. Biol.* **2004**, *11*, 397.
29. Friesner, R.A.; Banks, J.L.; Murphy, R.B.; Halgren, T.A.; Klicic, J.J.; Mainz, D.T.; Repasky, M.P.; Knoll, E.H.; Shelley, M.; Perry, J.K.; Shaw, D.E.; Francis, P.; Shenkin, P.S. *J. Med. Chem.*, **2004**, *47*, 1739.
30. Fritzeimer, K.H.; Kindl, H. 9,10 Dihydrophenanthrenes as phytoalexins of Orchidaceae. Biosynthetic studies in vitro and in vivo proving the route from L-Phenylalanine to dihydro-m-coymaric acid, dihydrostilbene and dihydrophenanthrenes. *Eur. J. Biochem.* **1983**, *113*, 545-550.
31. Fukai, T.; Wang, Q.H.; Nomuras, T. Six prenylated phenols from *Glycyrrhiza uralensis*. *Phytochem.*, **1991**, *30*, 4, 1245-1250.
32. Goswami, S.K.; Das, D.K. Resveratrol and chemoprevention. *Cancer Lett.*, **2009**, *284*, 1–6.
33. Goto, H.; Terao, Y.; Akai, S. Synthesis of Various Kinds of Isoflavones, and Biphenyl-Ketones and Their 1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl Radical-Scavenging Activities. *Chem. Pharm. Bul*, **2009**, *57*, 346-360.
34. Hashimoto, T.; Tori, M.; Asakawa, Y. A highly efficient preparation of lunularic acid and some biological activities of stilbene and dihydrostilbene derivatives *Phytochem.*, **1988**, *27*, 109-113.
35. Hayashi, H.; Zhang, S.L.; Nakaizumi, T.; Shimura, K.; Yamaguchi, M.; Inoue, K.; Sasrsenbaev, K.; Ito, M.; Honda, G. Field Survey of *Glycyrrhiza* Plants in Central Asia. Characterization of Phenolics and Their Variation in the Leaves of *Glycyrrhiza* Plants Collected in Kazakhstan *Chem. Pharm. Bull*, **2003**, *51*, 1147-1152.
36. Hooper, L.; Ryder, J.J.; Kurzer, M.S.; Lampe, J.W.; Messina, M.J.; Phipps, W.R.; Cassidy, A. Effects of soy protein and isoflavones on circulating hormone concentrations in pre- and post-menopausal women: a systematic review and meta-analysis. *Hum. Reprod.*, **2009**, *15*, 423–440.
37. Horie, T.; Tominaga, H.; Kawamura, Y.; Yamadat, T. Studies of the Selective O-Alkylation and Dealkylation of Flavonoids. An Improved Method for Synthesizing 5,6,7-Trihydroxyflavones from 6-Hydroxy-5,7-dimethoxyflavones *J. Org. Chem.*, **1992**, *57*, 3343-3347.

38. Houerou, C.; Bennetau-Pelissero, C.; Lamothe, V.; Menn, F.; Babind, P.; Bennetau, B. Syntheses of Novel Hapten-Protein Conjugates for Production of Highly Specific Antibodies to Formononetin, Daidzein and Genistein. *Tetrahedron*, **2000**, *56*, 295-301.
39. Jiang, Q.; Payton-Stewart, F.; Elliott, S.; Driver, J.; Rhodes, L.V.; Zhang, Q.; Zheng, S.; Bhatnagar, D.; Boue, S.M.; Collins-Burow, B.M.; Sridhar, J.; Stevens, C.; McLachlan, J.A.; Wiese, T.E.; Burow, M.E.; Wang, G. Effects of 7-O substitutions on estrogenic and anti-estrogenic activities of daidzein analogues in MCF-7 breast cancer. *J. Med. Chem.*, **2010**, *53*, 6153-63.
40. Kim, U.J. Antimelanogenic and Antioxidant Properties of Gallic Acid. *Biol. Pharm. Bull*, **2007**, *30*, 1052-1055.
41. Kim, Y.W.; Hackett, J.C.; Brueggemeier, R.W. Synthesis and Aromatase Inhibitory Activity of Novel Pyridine-Containing Isoflavones. *J. Med. Chem*, **2004**, *47*, 4032.
42. Kim, J.; Kima, J.H.; Jeung, E.S.; Park, I.S.; Choe, C.H.; Kwon, T.H.; Yu, K.Y.; Jeong, S. Inhibitory Effects of Stilbene Glucoside Isolated from the Root of *Polygonum multiflorum* on Tyrosinase Activity and Melanin Biosynthesis. *J. Korean Soc. Appl. Biol. Chem*, **2009**, *52*, 342-345.
43. Kim, S.J.; Son, K.H.; Chang, H.W.; Kang, S.S.; Kim, H.P. Tyrosinase Inhibitory Prenylated Flavonoids from *Sophora flavescens*. *Biol. Pharm. Bull.*, **2003**, *26*, 1348-1350.
44. Kiuchi, F.; Chen, X.; Tsuda, Y. Four new phenolic constituents from Licorise (root of *Glycyrrhiza sp.*). *Heterocycles*, **1990**.
45. Kostecki, K.; Engelmeier, D.; Pacher, T.; Hofer, O.; Vajrodaya, S.; Greger, H. Dihydrophenanthrenes and other antifungal stilbenoids from *Stemona cf. pierrei* *Phytochemistry* **2004**, *65*, 99-106.
46. Krenn, L.; Paper, D.H. Inhibition of angiogenesis and inflammation by an extract of red clover (*Trifolium pratense L.*). *Phytomedicine*, **2009**, *16*, 1083-1088.
47. Lambrinidis, G.; Halabalaki, M.; Katsanou, E.S.; Skaltsounis, A.L.; Alexis, M.N.; Mikros, E. *Environmental Chem. Lett.*, **2006**, *4*, 159.
48. Lee, N.K.; Son, K.H.; Chang, H.W.; Kang, S.S.; Park, H.; Heo, M.Y.; Kim, H.P. Prenylated flavonoids as tyrosinase inhibitors. *Arch. Pharm*, **2004**, *27*, 1132-113.
49. Li, H.Q.; Ge, H.M.; Chen, Y.X.; Xu, C.; Shi, L.; Ding, H.; Zhu, H.L.; Tan, R.X. Synthesis and cytotoxic evaluation of a series of genistein derivatives. *Chem. Biodivers.*, **2006**, *4*, 463-72.
50. Li, H.Q.; Xue, J.Q.; Shi, L.; Gui, S.Y.; Zhu, H.L. Synthesis, crystal structure and antimicrobial activity of deoxybenzoin derivatives from genistein. *Eur. J. Med. Chem.*, **2008**, *43*, 662-667.

51. Li, Y.; Wang, C.L.; Wang, Y.J.; Guo, S.X.; Yang, J.S.; Chen, X.M.; Xiao, P.G. Three New Bibenzyl Derivatives from *Dendrobium candidum* *Chem. Pharm. Bull.*, **2009**, *57*, 218-219.
52. Lin, L.G.; Yang, X.Z.; Tang, C.P.; Ke, C.Q.; Zhang, J.B.; Ye, Y. Antibacterial stilbenoids from the roots of *Stemona tuberosa*, *Phytochem.*, **2008**, *69*, 457–463.
53. Lu, T.M.; Kuo, D.H.; Ko, H.H.; Ng, L.T. Synthesis and Structure-Activity Relationship Study of Deoxybenzoins on Relaxing Effects of Porcine Coronary Artery. *J. Agric. Food Chem.*, **2010**, *58*, 10027-10032.
54. Maarit, S. Identification of isoflavonoid metabolites in Humans, Heinonen.
55. Magalhaes, A.F.; Tozzi, A.; Magalhaes, M.E.G.; Moraes, V.R. Prenylated flavonoids from *Deguelia hatschbachii* and their systematic significance in *Deguelia*. *Phytochem.*, **2001**, *57*, 77–89.
56. Magalhaes, A.F.; Tozzi, A.M.; Magalhaes, E.G.; Souza-Neta, L.C. New prenylated metabolites from *Deguelia longeracemosa* and evaluation of their antimicrobial potential. *Planta Med.*, **2006**, *72*, 358–363.
57. Marvell, E.N.; Richardson, B.; Anderson, R.; Stephenson, J.L.; Crandall, T. Claisen Rearrangement of Allyl 2-Alkylphenyl Ethers. *J. Org. Chem.*, **1965**, *30*, 1032-5.
58. Masuda, T.; Fujita, N.; Yuka, O.; Takeda, Y.; Yonemori, S.; Nakamoto, K.; Kyninaga, H. Tyrosinase inhibitory activity of ethanolextracts from medicinal and edible plants cultivated in Okinawa and identification of a water-soluble inhibitor from the leaves of *Nadina domestica*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **2007**, *71*, 2316-2320.
59. Masuda, T.; Odaka, Y.; Ogawa, N.; Nakamoto, K.; Kuninaga, H. Identification of geranic acid, a Tyrosinase inhibitor in lemongrass *Cymbopogon citrates*. *J. Agri. Food Chem.*, **2008**, *56*, 597–601.
60. Matoba, Y.; Kumagai, T.; Yamamoto, A.; Yoshitsu, H.; Sugiyama, M. Crystallographic Evidence That the Dinuclear Copper Center of Tyrosinase Is Flexible during Catalysis. *J. Biol. Chem.*, **2006**, *281*, 8981.
61. Miller, C.P.; Collinia, M.D.; Heather, A. H. Constrained Phytoestrogens and Analogues as ER_α Selective Ligands. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2003**, *13*, 2399–2403.

62. Mohamadi, F.; Richards, N.G.J.; Guida, W.C.; Liskamp, R.; Lipton, M.; Caufield, C.; Chang, G.; Hendrickson, T.; Still, W. C. *J Comput Chem*, **1990**, *11*, 440.
63. Mohanazadeh, F.; Hosini, M.; Tajbakhsh, M. Sodium Borohydride – Ammonium Carbonate: An Effective Reducing System for Aldehydes and Ketones *Monatsh. Chem.*, **2005**, *136*, 2041–2043.
64. Momtaz, S.; Lall, N.; Basson, A. Inhibitory activities of mushroom tyrosine and DOPA oxidation by plant extracts *South African Journal of Botany*, **2008**, *74*, 577–582.
65. Monthakantirat, O.; De-Eknamkul, W.; Umehara, K.; Yoshinaga, Y.; Miyase, T.; Warashina, T.; Noguchi, H. Phenolic constituents of the rhizomes of the Thai medicinal plant *Belamcanda chinensis* with proliferative activity for two breast cancer cell lines. *J. Nat. Prod*, **2005**, *68*, 361–364.
66. Mueller, S.O. Overview of in vitro tools to assess the estrogenic and antiestrogenic activity of phytoestrogens, *J. Chromatogr.*, **2002**, *77*, 155–165.
67. Mukherjee, S.; Kumar, V.; Prasad, A.K.; Raj, H.G.; Bracke, M.E.; Olsen, C.E.; Jain, S.C.; Parmar, V.S. Synthetic and biological activity evaluation studies on novel 1,3-diarylpropenones. *Bioorg. Med. Chem.*, **2001**, *9*, 337-345.
68. Nakamura, Y.; Watanabe, S.; Miyake, N.; Kohno, H.; Osawa, T. Dihydrochalcones: evaluation as novel radical scavenging antioxidants. *J. Agric. Food Chem*, **2003**, *51*, 3309–3312.
69. Ng, L.T.; Ko, H.H.; Lu, T.M. Potential antioxidants and tyrosinase inhibitors from synthetic polyphenolic deoxybenzoins. *Bioorg. Med. Chem*, **2009**, *17*, 4360–4366.
70. Ohguchi, K.; Tanaka, T.; Kido, T.; Baba, K.; Inuma, M.; Matsumoto, K.; Akao, Y.; Nozawaa, Y. Effects of hydroxystilbene derivatives on tyrosinase activity *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **2003**, *307*, 861–863.
71. Ohguchi, K.; Tanaka, T.; Ito, T.; Inuma, M.; Matsumoto, K.; Akao, Y.; Nozawa, Y. Inhibitory effects of resveratrol from Dipterocarpaceae Plants on tyrosinase activity. *Biosci. Biotechnol. Biochem*, **2003**, *67*, 1587-1589.
72. Olmo, E.; Armas, M.G.; Lopez-Perez, J. L.; Munoz, V.; Deharo, E.; Feliciano, A. Leishmanicidal Activity of Some Stilbenoids and Related Heterocyclic Compounds. *Bioorg. Med. Chem. Let.*, **2001**, *11*, 2123–2126.
73. Olmo, E.; Armas, M.G.; Ybarra, M.I.L.; Lopez, H.L.; Oporto, P.; Gimenez, A.; Deharo, E.; Feliciano, A.S. The Imidazo[2,1-a]isoindole System. A New Skeletal Basis for Antiplasmodial Compounds *Bioorg. Med. Chem. Let.*, **2003**, *13*, 2769–2772.

74. Pacher, T.; Seger, C.; Engelmeier, D.; Vajrodaya, S.; Hofer, O.; Greger, H. Antifungal Stilbenoids from *Stemona collinsae* *J. Nat. Prod.*, **2002**, *65*, 820-827.
75. Papoutsis, Z.; Kassi, E.; Fokialakis, N.; Mitakou, S.; Lambrinidis, S.; Mikros, E.; Moutsatsou, P. Deoxybenzoins are novel potent selective estrogen receptor modulators. *Steroids*, **2007**, *72*, 693–704.
76. Pike, A.C.W.; Brzozowski, A.M.; Hubbard, R.E.; Bonn T.; Thorsell, A.G.; Engstrom, O.; Ljunggren, J.; Gustafsson, J.K.; Carlquist, M. Structure of the ligand-binding domain of oestrogen receptor beta in the presence of a partial agonist and a full antagonist. *EMBO J.*, **1999**, *18*, 4608.
77. Pirsellova K., Balaz S., Sturdik E., Ujhelyova R., Veverka M., Uher M., Brtko J. Quantitative Structure-Activity Relationships (QSTAR) : pH-Dependent Growth Inhibition of *Escherichia coli* by Ionizable and Nonionizable Kojic Acid Derivatives. Part II. *Quant. Struct-Act Rel.*, **1997**, *16*, 283.
78. Qu, J.B.; Xie, C.F.; Ji, M.; Shi, Y.Q.; Lou, H.X. Water-Soluble Constituents from the Liverwort *Marchantia polymorpha* *Helv. Chim. Acta*, **2007**, *90*.
79. Richard, C.M.; Siow, G.; Mann, E. Review Dietary isoflavones and vascular protection: Activation of cellular antioxidant defenses by SERMs or hormesis. *Mol. Asp. Med.*, **2010**, *31*, 468–477.
80. Saiko, P.; Szakmary, A.; Jaeger, W.; Szekeres, T. Resveratrol and its analogs: Defense against cancer, coronary disease and neurodegenerative maladies or just a fad? *Mutat. Res.*, **2008**, *658*, 68–94.
81. Saleh, F.; Afnan, F.; Ara, F.; Yasmin, S.; Nahar, K.; Khatun, F.; Ali, L. Phytoestrogen intake and cardiovascular risk markers in bangladeshi postmenopausal women. *Mymensingh Med J*, **2011**, 219-25.
82. Sali, A.; Blundell, T. L. Comparative protein modeling by satisfaction of spatial restraints. *J.Mol. Biol.*, **1993**, *234*, 779.
83. Sanduja, R.; Weinheimer, A.J.; Alam, M. Albizoin isolation and structure of a Deoxybenzoins from the marine mollusc *Nerita albicilla* *Endocrinology, J. Chem. Res. Synop*, **1985**, 56–57.
84. Sanoh, S.; Shigeyuki, K.; Kazumi, S.; Fujimoto, N.; Ohta, S. Estrogenic activity of stilbene derivatives. *J. Health Sci.*, **2003**, *49*, 359-367.
85. Sendovski, M.; Kanteev, M.; Ben-Yosef, V.S.; Adir, N.; Fishman, A. First Structures of an Active Bacterial Tyrosinase Reveal Copper Plasticity *J. Mol. Biol.*, **2011**, *405*, 227.
86. Seo, S.U.; Sharma, V.K.; Sharma, N. Mushroom Tyrosinase: Recent Prospects *J. Agric. Food Chem.*, **2003**, *51*, 2837-2853.

88. Shiau, A.K.; Barstad, D.; Loria, P.M.; Cheng, L.; Kushner, P.J.; Agard, D.A.; Greene, G.L. The Structural Basis of Estrogen Receptor/Coactivator Recognition and the Antagonism of This Interaction by Tamoxifen *Cell*, **1998**, *95*, 927.
89. Si, Y.X.; Yin, S.J.; Park, D.; Chung, H.Y.; Yan, L.; Lu, Z.R.; Zhou, H.M.; Yang, J.M.; Qian, G.Y.; Park, Y.D. Tyrosinase inhibition by isophthalic acid: Kinetics and computational simulation. *Int. J Biol. Macromol.*, **2011**, *48*, 700.
90. Sinha, A.K.; Kumar, V.; Sharma, A.; Sharma, A.; Kumar, R. An unusual, mild and convenient one-pot two-step access to (E)-stilbenes from hydroxy-substituted benzaldehydes and phenylacetic acids under microwave activation: a new facet of the classical Perkin reaction *Tetrahedron*, **2007**, *63*, 11070–11077.
91. Siracusa, L.; Saija, A.; Cristani, M.; Cimino, F.; D'Arrigo, M.; Trombetta, D.; Rao, F.; Ruberto, G. Phytocomplexes from liquorice (*Glycyrrhiza glabra* L.) leaves - Chemical characterization and evaluation of their antioxidant, antigenotoxic and anti-inflammatory activity. *Fitoterapia*, **2011**, *82*, 546–556.
92. Soidinsalo O. Synthesis of Isoflavone Conjugates. Laboratory of Organic Chemistry, Department of Chemistry, Faculty of Science, University of Helsinki, **2007**.
93. Solomon, E.I.; Sundaram, U.M.; Machonkin, T.E. Multicopper Oxidases and Oxygenases *Chem. Rev.*, **1996**, *96*, 2563-2605.
94. Sreedhar, B.; Swapn, V.; Sridhar, Ch. Bismuth(III) Triflate: Novel and Efficient Catalyst for Claisen and Fries Rearrangements of Allyl Ethers and Phenyl Esters *Synth. Comm.*, **2004**, *34*, 1433–1440.
95. Stryer, L.; Tymoczko, J.L.; Berg, J.M. Biochemistry 5th edition.
96. Sujata, G.; Dastidar, A.; Manna, K.; Kumar, A.; Mazumdar, K.; Dutta, N.K.; Chakrabarty, A.N.; Motohashi, N.; Shirataki, Y. Studies on the antibacterial potentiality of isoflavones *Int. . Ant. Ag.*, **2004**, *23*, 99–102.
97. Tajima, R.; Oozeki, H.; Muraoka, S.; Tanaka, S.; Motegi, Y.; Nihei, H.; Yamada, Y.; Masuoka, N.; Nihei, K. Synthesis and evaluation of bibenzyl glycosides as potent tyrosinase inhibitors. *Eur.J.Med. Chem.*, **2011**, *46*, 1374-1381.
98. Takahashi, S.; Kamiya, T.; Saeki, K.; Nezu, T.; Takeuchi, S.; Takasawa, R.; Sunaga, S.; Yoshimori, A.; Ebizuka, S.; Abe, T.; Tanuma, Structural insights into the hot spot amino acid residues of mushroom tyrosinase for the bindings of thujaplicins S. *Bioorg. Med. Chem.*, **2010**, *18*, 8112-8118.

99. Tham, D. M.; Gardner, C.D.; Haskell, W.L. Potential Health Benefits of Dietary Phytoestrogens: A Review of the Clinical, Epidemiological, and Mechanistic Evidence. *J. Clin. Endocrinol.Metab*, **1998**, *83*, 2223.
100. Wahala, K.; Hase, T.A. Expedient synthesis of polyhydroxyisoflavonoids, *J. Chem. Soc. Perkin Trans*, **1991**, 3005–3008.
101. Wang, S.F.; Jiang, Q.; Ye, Y.H.; Li, Y.; Tan, R.X. Genistein derivatives as selective estrogen receptor modulators: sonochemical synthesis and in vivo anti-osteoporotic action. *Bioorg. Med. Chem.*, **2005**; Aug 15, *13*(16):4880-90.
102. Wang, J.; Matsuzaki, K.; Kitanaka, S. Stilbene Derivatives from *Pholidota chinensis* and Their Anti-inflammatory Activity. *Chem. Pharm. Bull*, **2006**, *54*, 1216 - 1218.
103. Wilhelm, H.; Wessjohann, L.A. An efficient synthesis of the phytoestrogen 8-prenylnaringenin from xanthohumol by a novel demethylation process. *Tetrahedron*, **2006**, *62*, 6961–6966.
104. Wuttke, W.; Jarry, H.; Westphalen, S.; Christoffel, V.; Seidlova-Wuttke, D. Phytoestrogens for hormone replacement therapy. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol*, **2003**, *83*, 133–147.
105. Xia, C.; Liu, Y.; Xu, J.; Yu, J.; Qin, W.; Liang, X. Catalytic hydrodechlorination reactivity of monochlorophenols in aqueous solutions over palladium/carbon catalyst *Catal. Commun.*, **2009**, *10*, 456–458.
106. Xiao, Z.P.; Shi, D.H.; Li, H.Q.; Zhang, L.N.; Xua, C.; Zhua, H.L. Polyphenols based on isoflavones as inhibitors of *Helicobacter pylori* urease *Bioorg.Med. Chem.*, **2007**, *15*, 3703–3710.
107. Xiao, Z.P.; Maa, T.W.; Fu, W.C.; Peng, X.C.; Zhang, A.H.; Zhu, H.L. The synthesis, structure and activity evaluation of pyrogallol and catecholderivatives as *Helicobacter pylori* urease inhibitors *Eur. J. Med. Chem.*, **2010**, *45*, 5064-5070.
108. Yang, X.Z.; Tang, C.P.; Ye, Y. Stilbenoids from *Stemona japonica* *J. Asian Nat. Prod. Res.*, **2006**, *8*, 47–53.
109. Yang, X.Z.; Tang, C.P.; Ke, C.Q.; Ye, Y. Stilbenoids from *Stemona sessilifolia* *J. Asian Nat. Prod. Res.*, **2007**, *9*, 261–266.
110. Yuan, J.P.; Wang, J.H.; Liu, X. Metabolism of dietary soyisoflavones to equol by human intestinal microflora – implications for health. *Mol. Nutr. Food Res*, **2007**, *51*, 765–781.

111. Zhanga, Y.Z.; Xua, G.B.; Zhang, T. Antifungal stilbenoids from *Stemona japonica* *J. Asian Nat. Prod. Res.*, **2008**, *10*, 634–639.
112. Zhang, X.; Xu, J.Q.; Wang, J.; Wang, N.L.; Kurihara, H.; Kitanaka, S.; Yao, X.S. Bioactive Bibenzyl Derivatives and Fluorenones from *Dendrobium nobile*. *J. Nat. Prod.*, **2007**, *70*, 24-28.