



**ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ**

**ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ**

**ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ**

**ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΣΠΟΥΔΩΝ «ΧΗΜΕΙΑΣ»**

**ΕΙΔΙΚΕΥΣΗ «ΟΡΓΑΝΙΚΗ ΧΗΜΕΙΑ»**

**ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ ΔΙΠΛΩΜΑΤΟΣ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ**

**Σύνθεση και μελέτη αντιοξειδωτικής δράσης παραγώγων του  
3,4-διυδροξυφαινυλοξικού οξέος**

**ΑΙΚΑΤΕΡΙΝΗ ΠΑΓΩΝΗ**

**ΧΗΜΙΚΟΣ**

**ΑΘΗΝΑ**

**ΦΕΒΡΟΥΑΡΙΟΣ 2017**



## **ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ ΔΙΠΛΩΜΑΤΟΣ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ**

Σύνθεση και μελέτη αντιοξειδωτικής δράσης παραγώγων του 3,4-διυδροξυφαινυλοξικού οξέος

**ΑΙΚΑΤΕΡΙΝΗ ΠΑΓΩΝΗ**

**A.M.: 31501**

**ΕΠΙΒΛΕΠΟΥΣΑ ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ:**

**Βασιλείου Σταματία, Επίκουρη Καθηγήτρια ΕΚΠΑ**

**ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ**

Βασιλείου Σταματία, Επίκουρη Καθηγήτρια ΕΚΠΑ

Βουγιουκαλάκης Γεώργιος, Επίκουρος Καθηγητής ΕΚΠΑ

Μαγκριώτη Βικτωρία, Επίκουρη Καθηγήτρια ΕΚΠΑ

**ΦΕΒΡΟΥΑΡΙΟΣ 2017**



## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Στην παρούσα εργασία γίνεται μελέτη των πολυφαινολικών ενώσεων και της αντιοξειδωτικής τους δράσης. Αναλύονται οι κατηγορίες των πολυφαινολών και οι βιολογικές τους δράσεις, ενώ παρουσιάζεται αναλυτικά το πολυφαινολικό οξύ, 3,4-διυδροξυφαιτυλοξικό οξύ. Ως προς την αντιοξειδωτική δράση, αναφέρονται οι μηχανισμοί που λαμβάνουν χώρα κατά τις αντιδράσεις και γίνεται μια μικρή αναφορά για τις διάφορες μεθόδους προσδιορισμού της. Περιγράφεται εκτενώς η μέθοδος προσδιορισμού με χρήση της ρίζας DPPH, καθώς και η εφαρμογή της στις μελέτες των πολυφαινολικών ενώσεων. Στο τελευταίο μέρος της εργασίας, περιγράφεται η σύνθεση νέων πολυφαινολικών παραγώγων του 3,4-διυδροξυφαιτυλοξικού οξέος και η ταυτοποίηση τους με φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (NMR  $^1\text{H}$  και  $^{13}\text{C}$ ) και φασματομετρία μάζας (MS). Τέλος, παρουσιάζεται η αντιοξειδωτική μελέτη με τη μέθοδο προσδιορισμού του DPPH των ενώσεων που συντέθηκαν.

**ΘΕΜΑΤΙΚΗ ΠΕΡΙΟΧΗ:** Σύνθεση πολυφαινολικών παραγώγων και μελέτη της αντιοξειδωτικής τους δράσης

**ΛΕΞΕΙΣ ΚΛΕΙΔΙΑ:** πολυφαινόλες, 3,4-διυδροξυφαιτυλοξικό οξύ, αντιοξειδωτική δράση, DPPH

## **ABSTRACT**

In the present thesis, polyphenolic compounds and their antioxidant activity is examined. The categories of polyphenols and their biological activities are analyzed, and the polyphenolic acid, 3,4-dihydroxyphenylacetic acid is analytically presented. With regards to the antioxidant activity, the mechanisms that take place during the reactions are mentioned and there is a brief reference to the different determination methods. The DPPH assay is extensively discussed, as well as its application to studies of polyphenolic compounds. In the last part of the thesis, the synthesis of new derivatives of polyphenolic 3,4-dihydroxyphenylacetic acid and their identification by nuclear magnetic resonance ( $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  NMR) and mass spectrometry (MS) are described. Finally, the antioxidant study using the DPPH assay is outlined for the compounds that were synthesized.

**SUBJECT AREA:** Synthesis of polyphenolic derivatives and their antioxidant study

**KEYWORDS:** polyphenols, 3,4-dihydroxyphenylacetic acid, antioxidant activity, DPPH

## ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Για τη διεκπεραίωση της παρούσας ερευνητικής εργασίας, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά την επιβλέπουσα Επίκουρη Καθηγήτρια Βασιλείου Σταματία για την συνεργασία και την πολύτιμη συμβολή της στην ολοκλήρωσή της, καθώς και για την ανάθεση του θέματος, την καθοδήγηση, την υποστήριξη και τις πολύτιμες συμβουλές καθ' όλη τη διάρκεια.

Θα ήθελα επιπλέον να ευχαριστήσω τα μέλη της τριμελούς εξεταστικής επιτροπής, τον Επίκουρο Καθηγητή Βουγιουκαλάκη Γεώργιο και την Επίκουρη Καθηγήτρια Μαγκριώτη Βικτωρία για τις εύστοχες υποδείξεις και παρατηρήσεις τους με σκοπό την ολοκλήρωση και αρτιότερη παρουσίαση της εργασίας αυτής.

Ευχαριστώ ιδιαίτερα επίσης τον Επίκουρο Καθηγητή Προεστό Χαράλαμπο από το Εργαστήριο Χημείας Τροφίμων του Τμήματος Χημείας του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών για την συμβολή του και τις συμβουλές του κατά τη διάρκεια των πειραμάτων για την αντιοξειδωτική μελέτη των ενώσεων, καθώς και την μεταπτυχιακή φοιτήτρια Ροϊδάκη Άννα.

Θα ήταν παράληψη να μην ευχαριστήσω τα μέλη του Εργαστηρίου, Δρ. Σακκή Εσθήρ και Δρ. Πασχαλίδου Κατερίνα για την αμέριστη βοήθειά τους κατά τη λήψη των φασμάτων μάζας.

Ένα εξίσου μεγάλο ευχαριστώ θα ήθελα να εκφράσω σε όλα τα μέλη του Εργαστηρίου Οργανικής Χημείας με τα οποία συνεργάστηκα και ιδιαίτερα τον συνάδελφο υποψήφιο διδάκτορα Ντατσόπουλο Βασίλη για την άφογη συνεργασία και το ευχάριστο κλίμα που μου προσέφεραν στο εργαστήριο.

Τέλος, ευχαριστώ ολόψυχα τους γονείς μου για την ηθική και συναισθηματική υποστήριξη που προσέφεραν καθ' όλη την διάρκεια των σπουδών μου, καθώς και τους φίλους μου για την ενθάρρυνση τους.





# ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

<b>ΠΡΟΛΟΓΟΣ .....</b>	<b>19</b>
<b>1. ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1 .....</b>	<b>21</b>
1.1 Εισαγωγή.....	21
1.2 Κατηγορίες πολυφαινολών .....	21
1.2.1 Φλαβονοειδή.....	23
1.2.2 Μη φλαβονοειδή .....	26
1.3 Μορφή πολυφαινολών στα τρόφιμα και παράγοντες που την επηρεάζουν .....	29
1.4 Βιοδιαθεσιμότητα.....	30
1.5 Βιολογικές δράσεις των πολυφαινολών .....	30
1.5.1 Αντιμικροβιακή Δράση .....	31
1.5.2 Αντικαρκινική Δράση .....	34
1.5.3 Αντιφλεγμονώδης Δράση .....	36
1.5.4 Καρδιοπροστατευτική Δράση.....	37
1.5.5 Αντιγηραντική-Νευροπροστατευτική Δράση.....	38
1.5.6 Αντιοξειδωτική Δράση .....	38
1.6 3,4-Διυδροξυφαινυλοξικό οξύ .....	39
1.6.1 Εισαγωγή.....	39
1.6.2 Σχηματισμός .....	39
1.6.3 Βιολογικές δράσεις.....	43
<b>2. ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2 ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΗ ΔΡΑΣΗ .....</b>	<b>45</b>
2.1 Εισαγωγή.....	45
2.2 Δραστικές μορφές οξυγόνου (ROS) και οξειδωτικό στρες .....	45
2.3 Μηχανισμοί αντιοξειδωτικής δράσης .....	46
2.3.1 Μηχανισμός HAT .....	46
2.3.2 Μηχανισμός ET .....	47

2.4	Μέθοδοι Προσδιορισμού Αντιοξειδωτικής Δράσης .....	48
2.5	Αντιοξειδωτική μέθοδος DPPH .....	53
2.5.1	Εισαγωγή.....	53
2.5.2	Η χημεία της ρίζας DPPH.....	54
2.5.3	Πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα της μεθόδου DPPH.....	55
2.5.4	Πρωτότυπη Μέθοδος.....	57
2.5.5	Μηχανισμός της αντίδρασης με το DPPH .....	57
2.5.6	Μεθοδολογία μέτρησης.....	60
2.5.7	Επεξεργασία αποτελεσμάτων της μεθόδου .....	61
2.5.8	Αντιδράσεις DPPH-πολυφαινολών και διαλύτες .....	61
2.5.9	Επεξεργασία αποτελεσμάτων αντιοξειδωτικής δράσης πολυφαινολικών οξέων με τη μέθοδο DPPH.....	65
<b>3.</b>	<b>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3 ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ.....</b>	<b>68</b>
<b>4.</b>	<b>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4 .....</b>	<b>70</b>
4.1	Συνθετική πορεία πολυφαινολικών διεστέρων.....	70
4.2	Συνθετική πορεία πολυφαινολικών μονοεστέρων.....	79
4.3	Συνθετική πορεία πολυφαινολικού διαμιδίου .....	82
4.4	Συνθετική πορεία πολυφαινολικών μονοαμιδίων.....	87
4.5	Συνθετική πορεία πολυφαινολικών αμιδικών εστέρων .....	89
<b>5.</b>	<b>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5 .....</b>	<b>97</b>
5.1	Πειραματική διαδικασία.....	97
5.2	Συνολικά αποτελέσματα αντιοξειδωτικής δράσης.....	109
5.3	Φυσικοχημικές ιδιότητες των ενώσεων που παρασκευάστηκαν.....	115
5.4	Συμπεράσματα .....	118
<b>6.</b>	<b>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6 .....</b>	<b>120</b>
6.1	Γενικό Πειραματικό Μέρος.....	120
6.1.1	Αντιδραστήρια, διαλύτες.....	120

6.1.2	Χρωματογραφική ανάλυση .....	120
6.1.3	Ταυτοποίηση/Χαρακτηρισμός ενώσεων.....	121
6.2	Συνθετικές μέθοδοι/χαρακτηρισμοί ενώσεων .....	121
6.2.1	Γενική μέθοδος εστεροποίησης για την παρασκευή διεστέρων/μονοεστέρων 121	
6.2.2	Γενική μέθοδος αποπροστασίας των φαινολικών υδροξυλίων των διεστέρων/μονοεστέρων .....	128
6.2.3	Γενική μέθοδος παρασκευής διαμιδίων/μονοαμιδίων.....	134
6.2.4	Γενική μέθοδος αποπροστασίας των φαινολικών υδροξυλίων των διαμιδίων/μονοαμιδίων .....	136
6.2.5	Γενική μέθοδος παρασκευής αμιδικών αλκοολών.....	139
6.2.6	Γενική μέθοδος παρασκευής αμιδικών εστέρων .....	142
6.2.7	Γενική μέθοδος αποπροστασίας φαινολικών υδροξυλίων των αμιδικών εστέρων.....	146
<b>7.</b>	<b>ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ – ΑΡΚΤΙΚΟΛΕΞΑ – ΑΚΡΩΝΥΜΙΑ .....</b>	<b>150</b>
<b>8.</b>	<b>ΑΝΑΦΟΡΕΣ.....</b>	<b>151</b>

## ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΣΧΗΜΑΤΩΝ

Σχήμα 1: Κατηγορίες πολυφαινολών και κάποιοι εκπρόσωποι κάθε κατηγορίας. <sup>2</sup> .....	22
Σχήμα 2: Η γενική δομή των φλαβανονών.....	25
Σχήμα 3: Η γενική δομή των ισοφλαβονών. ....	25
Σχήμα 4: Η γενική δομή των φλαβονολών.....	26
Σχήμα 5: Η γενική δομή των ανθοκυανιδινών.....	26
Σχήμα 6: Δομή υδροξυβενζοϊκών και υδροξυκιναμμωμικών οξέων.....	28
Σχήμα 7: Δομή συμπυκνωμένης τανίνης. ....	28
Σχήμα 8: Δομή σπιλβενίου.....	28
Σχήμα 9: Γενική δομή λιγνανών.....	29
Σχήμα 10: Βιολογικές δράσεις πολυφαινολών.....	31
Σχήμα 11: Πολυφαινόλες με αντιφλεγμονώδη δράση.....	37
Σχήμα 12: Πολυφαινόλες με νευροπροστατευτική δράση.....	38
Σχήμα 13: Δομή 3,4-διυδροξυφαιτυλοξικού οξέος.....	39
Σχήμα 14: Ενζυματικός σχηματισμός του DHPAA από το HPAA με τυροσινάση. ....	40
Σχήμα 15: Μεταβολισμός της ντοπαμίνης. ....	41
Σχήμα 16: Μεταβολισμός κερκετίνης σε DOPAC.....	42
Σχήμα 17: Μεταβολική οδός τυροσόλης. ....	43
Σχήμα 18: Κύρια αντίδραση της αντιοξειδωτικής μεθόδου TEAC 1. ....	50
Σχήμα 19: Μοναδική αντίδραση της αντιοξειδωτικής μεθόδου TEAC-II.....	51
Σχήμα 20: Αντιδράσεις της μεθόδου ORAC.....	52
Σχήμα 21: Δομή φλουορεσκεΐνης. ....	52
Σχήμα 22: Η ελεύθερη ρίζα DPPH και η μη ριζική υδραζίνη της.....	53
Σχήμα 23: Δομές συντονισμού της ρίζας DPPH. ....	54
Σχήμα 24: Αντιδράσεις DPPH με μόρια που έχουν δύο ομάδες υδροξυλίου. ....	57

Σχήμα 25: Στους πολικούς διαλύτες, οι ελεύθερες ρίζες μπορούν να αποσπάσουν ένα άτομο υδρογόνου μόνο από τα ελεύθερα κλάσματα AgOH.....	58
Σχήμα 26: Μηχανισμός PCET στην αντίδραση μιας πολυφαινόλης με μία υπεροξειδική ρίζα.....	59
Σχήμα 27: Μηχανισμοί δέσμευσης της ρίζας DPPH σε μεθανόλη για τον μεθυλεστέρα του πρωτοκατεχοϊκού οξέος. ....	63
Σχήμα 28: Αντιδράσεις του μεθυλεστέρα του πρωτοκατεχοϊκού οξέος και της ρίζας DPPH σε διάλυμα ακετόνης.....	64
Σχήμα 29: Πιθανός μηχανισμός της δεύτερης αργής αντίδρασης της υδροξυτυροσόλης με το DPPH. ....	66
Σχήμα 30: Γενική μέθοδος παρασκευής διεστέρων. ....	70
Σχήμα 31: Διεστέρες που παρασκευάστηκαν. ....	71
Σχήμα 32: Γενική αντίδραση εστεροποίησης διολών με το 3,4-διμεθοξυφαινυλοξικό οξύ. ....	71
Σχήμα 33: Πιθανός μηχανισμός της εστεροποίησης της διόλης με το 3,4-διμεθοξυφαινυλοξικό οξύ. ....	73
Σχήμα 34: Γενική αντίδραση αποπροστασίας των φαινολικών υδροξυλίων. ....	75
Σχήμα 35: Πιθανός μηχανισμός αποπροστασίας των φαινολικών υδροξυλίων. ....	76
Σχήμα 36: Φάσμα <sup>1</sup> H NMR της ένωσης 32 σε δευτεριωμένη ακετόνη. ....	78
Σχήμα 37: Φάσμα <sup>13</sup> C NMR της ένωσης 32 σε δευτεριωμένη ακετόνη.....	79
Σχήμα 38: Γενική συνθετική πορεία μονοεστέρων. ....	79
Σχήμα 39: Μονοεστέρες που παρασκευάστηκαν.....	79
Σχήμα 40: Γενική αντίδραση σύζευξης της αλκοόλης με το 3,4-διμεθοξυφαινυλοξικό οξύ. ....	80
Σχήμα 41: Γενική αντίδραση αποπροστασίας των μονοεστέρων. ....	81
Σχήμα 42: Γενική συνθετική πορεία παρασκευής των διαμιδίων. ....	82
Σχήμα 43: Το διαμίδιο που παρασκευάστηκε. ....	82
Σχήμα 44: Αντίδραση σύζευξης της αιθυλοδιαμίνης με το 3,4-διμεθοξυφαινυλοξικό οξύ. ....	83

Σχήμα 45: Πιθανός μηχανισμός σύζευξης του 3,4-διμεθοξυφαινυλοξικού οξέος με την αιθυλοδιαμίνη. ....	84
Σχήμα 46: Αντίδραση αποπροστασίας του διαμιδίου 50. ....	85
Σχήμα 47: Φάσμα <sup>1</sup> H NMR της ένωσης 51 σε δευτεριωμένο DMSO. ....	86
Σχήμα 48: Φάσμα <sup>13</sup> C NMR της ένωσης 51 σε δευτεριωμένο DMSO. ....	87
Σχήμα 49: Γενική συνθετική πορεία παρασκευής μονοαμιδίων. ....	87
Σχήμα 50: Μονοαμίδια που παρασκευάστηκαν. ....	87
Σχήμα 51: Γενική αντίδραση σύζευξης των αμινών και του 3,4-διμεθοξυφαινυλοξικού οξέος. ....	88
Σχήμα 52: Γενική αντίδραση αποπροστασίας των μονοαμιδίων. ....	89
Σχήμα 53: Γενική συνθετική πορεία παρασκευής αμιδικών εστέρων. ....	89
Σχήμα 54: Αμιδικοί εστέρες που παρασκευάστηκαν. ....	90
Σχήμα 55: Γενική αντίδραση σύζευξης των αμινοαλκοολών και του 3,4-διμεθοξυφαινυλοξικού οξέος. ....	90
Σχήμα 56: Γενική αντίδραση εστεροποίησης συζευγμένων αλκοολών και του 3,4-διμεθοξυφαινυλοξικού οξέος. ....	92
Σχήμα 57: Γενική αντίδραση αποπροστασίας των φαινολικών υδροξυλίων των αμιδικών εστέρων. ....	93
Σχήμα 58: Φάσμα <sup>1</sup> H NMR της ένωσης 71 σε δευτεριωμένη ακετόνη. ....	95
Σχήμα 59: Φάσμα <sup>13</sup> C NMR της ένωσης 71 σε δευτεριωμένη ακετόνη. ....	96
Σχήμα 60: Δομή της ένωσης 35. ....	98
Σχήμα 61: Διάγραμμα απορρόφησης-χρόνου του μίγματος DPPH-διαλύματος συγκέντρωσης 500 μM της ένωσης 35. ....	99
Σχήμα 62: Διάγραμμα %RSA-χρόνου του μίγματος DPPH-διαλύματος συγκέντρωσης 500 μM για την ένωση 35. ....	100
Σχήμα 63: Διάγραμμα %RSA-χρόνου του μίγματος DPPH και των διαλυμάτων συγκέντρωσης 500, 250, 125 και 62.5 μM για την ένωση 35. ....	100
Σχήμα 64: Διάγραμμα %RSA-C για την ένωση 35 για τον υπολογισμό του EC <sub>50</sub> . ....	102
Σχήμα 65: Δομή της ένωσης 48. ....	104

Σχήμα 66: Διάγραμμα %RSA-χρόνου του μίγματος DPPH και των διαλυμάτων συγκέντρωσης 500, 375, 250 και 125 $\mu\text{M}$ για την ένωση 48.....	105
Σχήμα 67: Δομή της ένωσης 51.....	105
Σχήμα 68: Διάγραμμα %RSA-χρόνου του μίγματος DPPH και των διαλυμάτων συγκέντρωσης 500, 250 και 125 $\mu\text{M}$ για την ένωση 51.....	106
Σχήμα 69: Δομή της ένωσης 57.....	106
Σχήμα 70: Διάγραμμα %RSA-χρόνου του μίγματος DPPH και των διαλυμάτων συγκέντρωσης 750, 500 και 250 $\mu\text{M}$ για την ένωση 57.....	107
Σχήμα 71: Δομή της ένωσης 72.....	107
Σχήμα 72: Διάγραμμα %RSA-χρόνου του μίγματος DPPH και των διαλυμάτων συγκέντρωσης 500, 250, 175 και 125 $\mu\text{M}$ για την ένωση 72.....	108
Σχήμα 73: Δομή της ένωσης 1.....	108
Σχήμα 74: Διάγραμμα %RSA-χρόνου του μίγματος DPPH και των διαλυμάτων συγκέντρωσης 500, 375 και 250 $\mu\text{M}$ για την ένωση 1.....	109

## ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΕΙΚΟΝΩΝ

Εικόνα 1: Δομή της ρίζας DPPH. Τα κόκκινα, μπλε και γκρι χρώματα αντιπροσωπεύουν τα οξυγόνα, άζωτα και ανθρακόατομα, αντίστοιχα.....54



## ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ

Πίνακας 1: Οι κύριες κατηγορίες φλαβονοειδών με τις χημικές δομές τους, τα αντιπροσωπευτικά τους μέλη και τις διατροφικές τους πηγές. <sup>12,19</sup> .....	23
Πίνακας 2: Οι κύριες κατηγορίες μη φλαβονοειδών πολυφαινόλων με τις χημικές τους δομές, τα αντιπροσωπευτικά τους μέλη και τις διατροφικές τους πηγές. <sup>12,18,19</sup> .....	27
Πίνακας 3: Πολυφαινολικές ενώσεις και οι μικροοργανισμοί στους οποίους δρουν. <sup>36</sup> ...	32
Πίνακας 4: Κάποιες πολυφαινολικές ενώσεις, οι διατροφικές τους πηγές και οι μορφές καρκίνου που επιδρούν. ....	35
Πίνακας 5: <i>In vitro</i> μέθοδοι προσδιορισμού αντιοξειδωτικής δράσης. <sup>121</sup> .....	48
Πίνακας 6: Οι προστατευμένοι διεστέρες που παρασκευάστηκαν και οι αποδόσεις τους. ....	74
Πίνακας 7: Οι διεστέρες που παρασκευάστηκαν και οι αποδόσεις τους. ....	76
Πίνακας 8: Οι προστατευμένοι μονοεστέρες που παρασκευάστηκαν και οι αποδόσεις τους. ....	80
Πίνακας 9: Οι μονοεστέρες που παρασκευάστηκαν και οι αποδόσεις τους. ....	81
Πίνακας 10: Η απόδοση του προστατευμένου διαμιδίου που παρασκευάστηκε.....	84
Πίνακας 11: Η απόδοση του διαμιδίου που παρασκευάστηκε. ....	85
Πίνακας 12: Τα προστατευμένα μονοαμίδια που παρασκευάστηκαν και οι αποδόσεις τους. ....	88
Πίνακας 13: Τα μονοαμίδια που παρασκευάστηκαν και οι αποδόσεις τους.....	89
Πίνακας 14: Οι συζευγμένες αλκοόλες που παρασκευάστηκαν και οι αποδόσεις τους. 91	
Πίνακας 15: Οι προστατευμένοι αμιδικοί εστέρες που παρασκευάστηκαν και οι αποδόσεις τους.....	92
Πίνακας 16: Οι αμιδικοί εστέρες που παρασκευάστηκαν και οι αποδόσεις τους.....	93
Πίνακας 17: Οι χρόνοι $t_1$ και $t_2$ για τις διάφορες συγκεντρώσεις των διαλυμάτων με την ένωση 35. ....	101
Πίνακας 18: Παράμετροι MR, $t_1$ , $t_2$ , %RSA <sub>1</sub> , %RSA <sub>2</sub> , StR <sub>1</sub> και StR <sub>2</sub> για τις διάφορες συγκεντρώσεις της ένωσης 35.....	103

Πίνακας 19: Το EC <sub>50</sub> της ένωσης 35 σε mM και σε nmol <sub>35</sub> /μmol <sub>DPPH</sub> .....	104
Πίνακας 20: Οι παράμετροι MR, t <sub>1</sub> (min), t <sub>2</sub> (min), %RSA <sub>1</sub> , %RSA <sub>2</sub> , StR <sub>1</sub> και StR <sub>2</sub> για τις διάφορες συγκεντρώσεις όλων των ενώσεων που μελετήθηκαν ως προς την αντιοξειδωτική τους δράση. ....	109
Πίνακας 21: Τιμές EC <sub>50</sub> των ενώσεων που μελετήθηκαν ως προς την αντιοξειδωτική τους δράση σε μM και nmol <sub>ουσίας</sub> /μmol <sub>DPPH</sub> . ....	113
Πίνακας 22: Οι φυσικοχημικές ιδιότητες clogP, nON, nOHNH, nrotb, TPSA και M.W. των ενώσεων που μελετήθηκαν ως προς την αντιοξειδωτική τους δράση. ....	116

## **ΠΡΟΛΟΓΟΣ**

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Οργανικής Χημείας του Τμήματος Χημείας του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών στα πλαίσια του Μεταπτυχιακού Προγράμματος Σπουδών με ειδίκευση στην Γενική Οργανική Χημεία από τον Οκτώβριο του 2015 έως τον Φεβρουάριο του 2017 υπό την επίβλεψη της Επίκουρης Καθηγήτριας Σταματίας Βασιλείου.



## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1

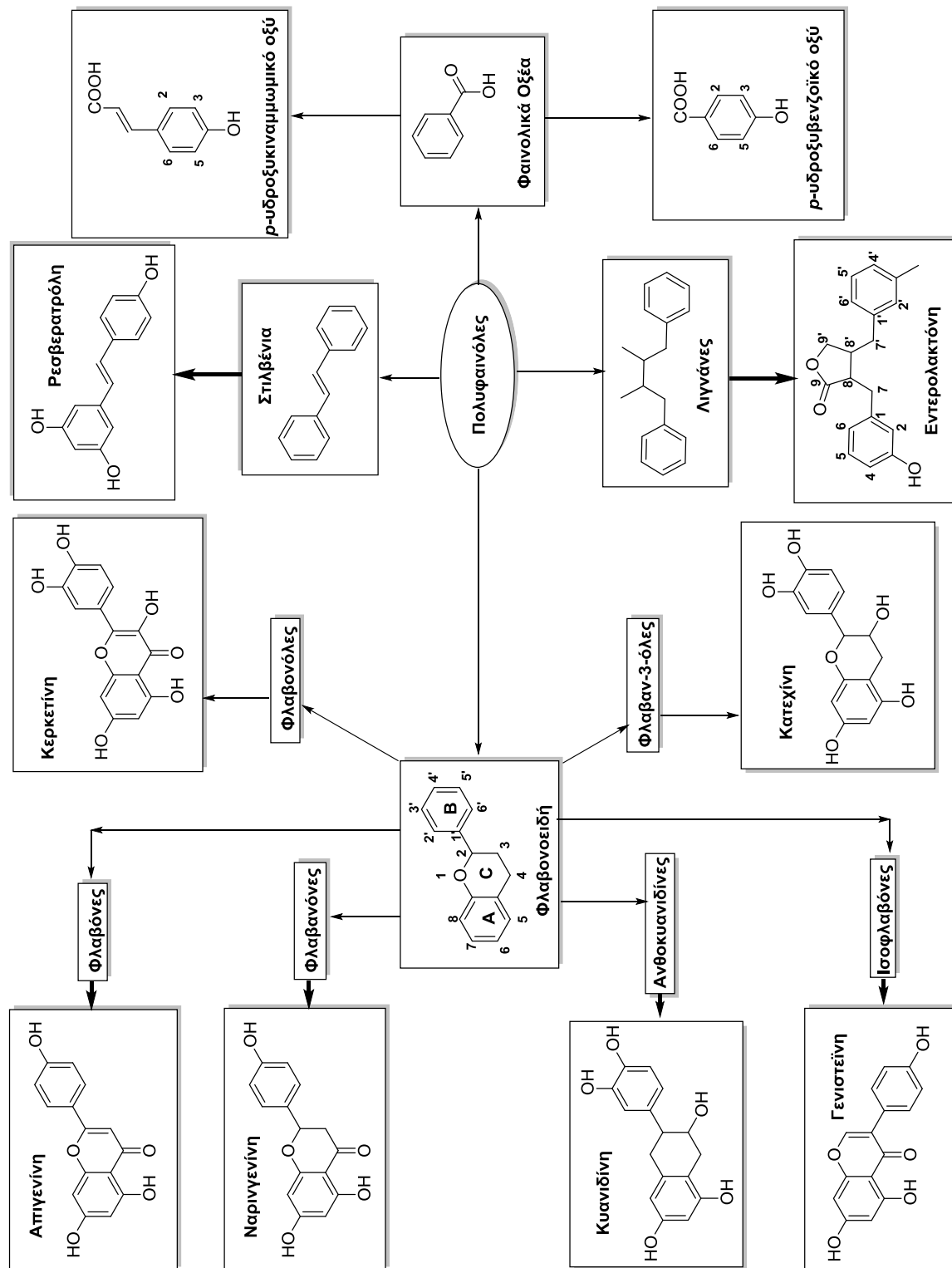
### ΠΟΛΥΦΑΙΝΟΛΕΣ

#### 1.1 Εισαγωγή

Οι πολυφαινόλες, μια ευρεία κατηγορία φυσικών ενώσεων, είναι δευτερογενείς μεταβολίτες φυτών,<sup>1</sup> που διαθέτουν έναν ή περισσότερους αρωματικούς δακτυλίους που φέρουν μία ή περισσότερες ομάδες υδροξυλίου.<sup>2</sup> Στη φύση οι πολυφαινόλες είναι συνήθως υδατοδιαλυτές ενώσεις και μπορούν επίσης να είναι και πτητικές.<sup>3,4</sup> Περισσότερες από 10000 πολυφαινολικές ενώσεις έχουν ταυτοποιηθεί σε διάφορα φυτά.<sup>1</sup> Θεωρούνται πολύπλοκα αντιοξειδωτικά που βρίσκονται σε αφθονία στην καθημερινή μας διατροφή. Ειδικότερα, μπορούν να βρεθούν στα φρούτα, τα όσπρια, τα μπαχαρικά, το κακάο, τα λαχανικά, τον καφέ, τα καρύδια, την μπύρα, το κρασί και το ελαιόλαδο.<sup>5</sup> Η μέση ημερήσια κατανάλωση πολυφαινολών υπολογίζεται ότι είναι περίπου ένα γραμμάριο.<sup>6</sup> Οι πολυφαινόλες επηρεάζουν το χρώμα, τη γεύση, την οσμή και την οξειδωτική σταθερότητα των τροφίμων.<sup>7</sup>

#### 1.2 Κατηγορίες πολυφαινολών

Οι φαινολικές ενώσεις περιλαμβάνουν όχι μόνο τις πολυφαινόλες, αλλά και φαινολικά οξέα και φαινολικές αλκοόλες, δηλαδή μόρια με έναν ή περισσότερους φαινολικούς δακτυλίους.<sup>8</sup> Οι ενώσεις αυτές μπορούν να χωριστούν σε διάφορες κατηγορίες ανάλογα με τον αριθμό των φαινολικών δακτυλίων που περιέχουν και με βάση τα δομικά στοιχεία που συνδέουν τους δακτυλίους αυτούς.<sup>1</sup> Οι δύο βασικές κατηγορίες πολυφαινολών είναι τα φλαβονοειδή και τα μη-φλαβονοειδή.<sup>2</sup> Τα φλαβονοειδή περιλαμβάνουν διάφορες υποκατηγορίες με τις πιο αντιπροσωπευτικές από αυτές να είναι οι φλαβονόλες, οι φλαβόνες, οι φλαβαν-3-όλες, οι ανθοκυανιδίνες, οι φλαβανόνες και οι ισοφλαβόνες.<sup>9</sup> Τα μη-φλαβονοειδή αποτελούνται από τις ακόλουθες κύριες κατηγορίες: φαινολικά οξέα, στιλβένια, λιγνάνες, τανίνες και άλλες πολυφαινόλες (Σχήμα 1).<sup>10,11,12</sup> Το 60% των πολυφαινολών είναι φλαβονοειδή και το 30% φαινολικά οξέα.<sup>11,13</sup>



Σχήμα 1: Κατηγορίες πολυφαινολών και κάποιοι εκπρόσωποι κάθε κατηγορίας.<sup>2</sup>

Η κατηγορία των φλαβονοειδών αποτελείται από δύο βενζολικούς δακτυλίους, οι οποίοι συνδέονται με ένα ετεροκυκλικό ανθρακικό C-δακτύλιο, ενώ η

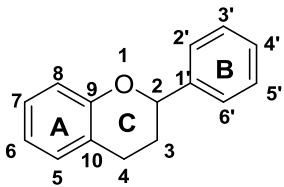
κατηγορία των μη-φλαβονοειδών περιλαμβάνει πιο περίπλοκα μόρια (στιλβένια, λιγνάνες, φαινολικά οξέα, τανίνες, γαλλοτανίνες κ.α.).<sup>14,15</sup>

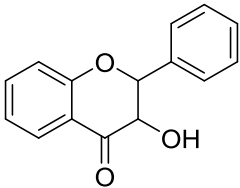
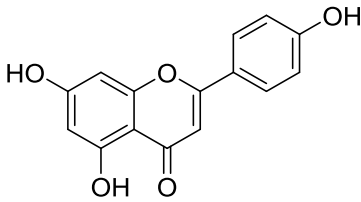
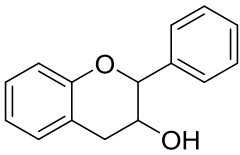
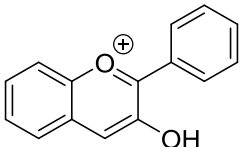
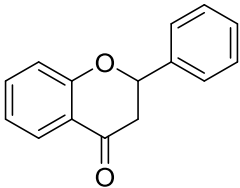
### 1.2.1 Φλαβονοειδή

Τα φλαβονοειδή θεωρείται ότι είναι η μεγαλύτερη κατηγορία των πολυφαινόλων και χαρακτηρίζονται από το χαμηλό μοριακό βάρος τους.<sup>16,17</sup> Τα δομικά χαρακτηριστικά των φλαβονοειδών μπορούν να καθορίσουν τις λειτουργίες και την βιοδιαθεσιμότητά τους. Επίσης, μπορούν να χρησιμοποιηθούν και για την ταξινόμηση τους σε διάφορες ομάδες.<sup>2</sup>

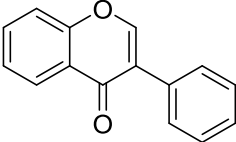
Η βασική δομή των φλαβονοειδών αποτελείται από έναν πυρήνα φλαβόνης που περιέχει 15 άτομα άνθρακα, τα οποία σχηματίζουν τρεις δακτυλίους (Α-δακτύλιος (C6), Β-δακτύλιος (C6), και C-δακτύλιος (C3)).<sup>2</sup> Ουσιαστικά, η δομή αποτελείται από δύο αρωματικούς δακτυλίους, Α και Β, που ενώνονται με μια γέφυρα τριών ανθράκων, συνήθως με τη μορφή ενός ετεροκυκλικού δακτυλίου, C.<sup>8</sup> Η διαφοροποίηση ανάμεσα στα φλαβονοειδή εξαρτάται από αλλαγές: α) στο C-δακτύλιο (παρουσία της 3-υδροξυλικής ομάδας και του διπλού δεσμού ή της 4-οξο ομάδας) και β) στους Α και Β δακτυλίους, όπως για παράδειγμα η διαφορά στον αριθμό και τη θέση των υδρόξυ και μεθόξυ ομάδων. Εάν μία ή περισσότερες ομάδες σακχάρου συνδέεται με την φλαβονοειδή δομή, τότε ονομάζονται «φλαβονοειδείς γλυκοζίτες», ενώ τα φλαβονοειδή χωρίς ομάδα σακχάρου αναφέρονται ως «αγλυκόνες». Τα διατροφικά φλαβονοειδή είναι κυρίως «φλαβονοειδείς γλυκοζίτες», εκτός από τις φλαβανόλες (Πίνακας 1).<sup>2</sup>

**Πίνακας 1: Οι κύριες κατηγορίες φλαβονοειδών με τις χημικές δομές τους, τα αντιπροσωπευτικά τους μέλη και τις διατροφικές τους πηγές.**<sup>12,18,19,20</sup>

Ομάδα φλαβονοειδών	Χημική Ένωση	Αντιπροσωπευτικά Μέλη	Διατροφικές Πηγές
Φλαβονοειδή			

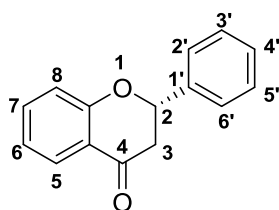
Φλαβονόλες		Κερκετίνη Καεμπφερόλη Μυρικετίνη	Κρεμμύδια Σπανάκι Φράουλες Κουνουπίδι
Φλαβόνες		Απιγενίνη Λουτεολίνη	Σέλινο Μαϊντανός Αγγινάρα
Φλαβαν-3-όλες/Πρωτοανθοκυανιδίνες		Επικατεχίνη Επιγαλλοκατεχίνη Επιγαλλοκατεχينو-3-O-γαλλοξικός εστέρας Προκυανιδίνη 2	Σταφύλια Μούρα Ανανάς Φουντούκια Μέντα
Ανθοκυανιδίνες/ Ανθοκυανίνες		Κυανιδίνη Πελαργονιδίνη Δελφινιδίνη Μαλβιδίνη	Βερίκοκα Κόκκινα μούρα Μπλε μούρα
Φλαβανόνες		Ναρινγενίνη Χεσπεριτίνη	Πορτοκάλι Λεμόνι Γκρέιπφρουτ Ντομάτες



Ισοφλαβόνες		Γενιστεΐνη Δαϊδζεΐνη Γλυκίτινη	Φασόλια
-------------	---	--------------------------------------	---------

### 1.2.1.1 Φλαβανόνες

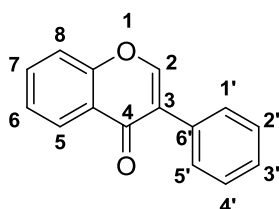
Οι φλαβανόνες είναι τα φλαβονοειδή που έχουν μια κορεσμένη αλυσίδα τριών ανθράκων και ένα άτομο οξυγόνου που συνδέεται με τον C(4) (Σχήμα 2). Είναι γενικά γλυκοζυλιωμένες από ένα μονοσακχαρίτη/δισακχαρίτη στον C(7). Οι φλαβανόνες είναι παρούσες σε υψηλές συγκεντρώσεις στα εσπεριδοειδή, στις ντομάτες και σε μερικά αρωματικά φυτά, όπως η μέντα. Οι φλαβανόνες είναι ενώσεις που δίνουν σε πολλά φυτά χρώμα και επηρεάζουν και την γεύση τους. Σε γενικές γραμμές, μπορούν να βοηθήσουν στην αντίδραση του οργανισμού σε ιούς, αλλεργιογόνα, ακόμα και καρκινογόνες ουσίες.<sup>8</sup>



Σχήμα 2: Η γενική δομή των φλαβανονών.

### 1.2.1.2 Ισοφλαβόνες

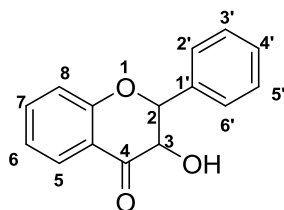
Οι ισοφλαβόνες έχουν ομάδες υδροξυλίου στις θέσεις C(7) και C(4') (Σχήμα 3). Είναι φυτοχημικά που βρίσκονται σε πολλά φυτά και σε τροφές φυτικής προέλευσης, τόσο στη φυσική («αγλυκόνες»), όσο και στις ακετυλο- ή μηλονυλο-β-γλυκοζιτικές μορφές τους.<sup>8</sup>



Σχήμα 3: Η γενική δομή των ισοφλαβονών.

### 1.2.1.3 Φλαβονόλες

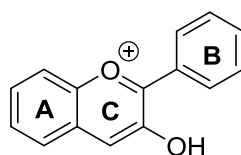
Οι φλαβονόλες είναι μία κατηγορία φλαβονοειδών που έχουν ως κορμό την 3-υδροξυφλαβόνη (Σχήμα 4). Η ποικιλομορφία τους πηγάζει από τις διαφορετικές θέσεις των ομάδων -OH.<sup>8</sup> Οι φλαβονόλες είναι μία κατηγορία φλαβονοειδών που βρίσκονται συνήθως σε πολλά φρούτα και λαχανικά, ενώ το περιεχόμενό τους ποικίλλει ευρέως, ανάλογα με περιβαλλοντικούς παράγοντες, όπως οι συνθήκες, το κλίμα, η αποθήκευση και οι συνθήκες μαγειρέματος.<sup>21</sup>



Σχήμα 4: Η γενική δομή των φλαβονολών.

### 1.2.1.4 Ανθοκυανιδίνες

Η βασική δομή των ανθοκυανιδινών αποτελείται από έναν αρωματικό δακτύλιο A, ο οποίος συνδέεται με ένα ετεροκυκλικό δακτυλίο C που περιέχει ένα ιόν οξονίου, ο οποίος επίσης συνδέεται με ένα δεσμό άνθρακα-άνθρακα με έναν τρίτο αρωματικό δακτύλιο B (Σχήμα 5). Όταν οι ανθοκυανιδίνες βρίσκονται στην μορφή του γλυκοζίτη τους (συνδεδεμένες με μία ομάδα σακχάρου) είναι γνωστές ως ανθοκυανίνες.<sup>8</sup>

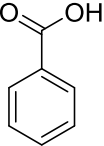
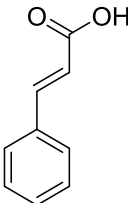
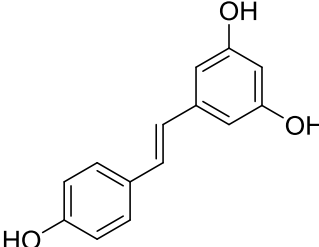


Σχήμα 5: Η γενική δομή των ανθοκυανιδινών.

### 1.2.2 Μη φλαβονοειδή

Οι κύριες κατηγορίες μη φλαβονοειδών είναι τα φαινολικά οξέα, οι τανίνες, οι λιγνάνες και τα στυλβένια (Πίνακας 2).<sup>8</sup>

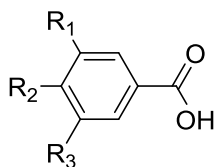
Πίνακας 2: Οι κύριες κατηγορίες μη φλαβονοειδών πολυφαινολών με τις χημικές τους δομές, τα αντιπροσωπευτικά τους μέλη και τις διατροφικές τους πηγές.<sup>12,18,19</sup>

Ομάδα μη φλαβονοειδών	Χημική Ένωση	Αντιπροσωπευτικά Μέλη	Διατροφικές Πηγές
Φαινολικά Οξέα-Βενζοϊκό Οξύ C <sub>6</sub> -C <sub>1</sub>		Γαλλικό οξύ Συριγγικό οξύ Βανιλλικό οξύ	Ρύζι Σιτάρι Βρώμη Κριθάρι
Φαινολικά Οξέα-Κιναμμωμικό Οξύ C <sub>6</sub> -C <sub>3</sub>		Καφεϊκό οξύ Φερουλικό οξύ Χλωρογενικό οξύ	Μήλα Καρότα
Στιλβένια C <sub>6</sub> -C <sub>2</sub> -C <sub>6</sub>		Ρεσβερατρόλη	Κόκκινο Κρασί Φυστίκια Σπανάκι

### 1.2.2.1 Φαινολικά οξέα

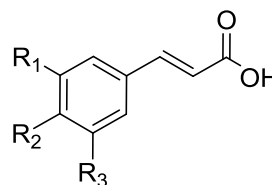
Τα φαινολικά οξέα ή φαινολοκαρβοξυλικά οξέα είναι ένας τύπος ενώσεων αρωματικού οξέος. Οι ενώσεις που περιλαμβάνονται στην εν λόγω κατηγορία είναι ουσίες που περιέχουν έναν φαινολικό δακτύλιο και ένα οργανικό καρβοξυλικό οξύ (C<sub>6</sub>-C<sub>1</sub> σκελετός).<sup>8</sup> Οι κύριες διαφορές μεταξύ των μορίων αυτής της κατηγορίας, οφείλονται στις διαφορετικές υδροξυλιώσεις και μεθοξυλιώσεις των αρωματικών τους δακτυλίων.<sup>22</sup> Τα φαινολικά οξέα αποτελούνται από δύο υποομάδες: τα υδροξυβενζοϊκά (C<sub>6</sub>-C<sub>1</sub> δομή) και υδροξυκιναμμωμικά οξέα, τα οποία είναι αρωματικές ενώσεις με μία πλευρική αλυσίδα τριών ανθράκων (C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>) (Σχήμα 6).<sup>8</sup>

### Υδροξυβενζοϊκά οξέα



R<sub>1</sub>=R<sub>2</sub>=R<sub>3</sub>=OH: γαλλικό οξύ  
R<sub>1</sub>=R<sub>2</sub>=OH, R<sub>3</sub>=H: πρωτοκατεχοϊκό οξύ

### Υδροξυκινναμωμικά οξέα

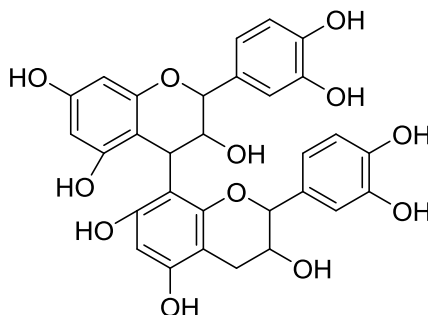


R<sub>1</sub>=OH, R<sub>2</sub>=R<sub>3</sub>=H: κουμαρινικό οξύ  
R<sub>1</sub>=R<sub>2</sub>=OH, R<sub>3</sub>=H: καφεϊκό οξύ

Σχήμα 6: Δομή υδροξυβενζοϊκών και υδροξυκινναμωμικών οξέων.

#### 1.2.2.2 Τανίνες

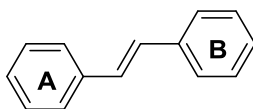
Πρόκειται για ενώσεις υψηλού μοριακού βάρους, οι οποίες μπορεί να είναι υδρολυόμενες ή μη συμπυκνωμένες τανίνες. Οι τανίνες είναι παράγωγα του γαλλικού οξέος (3,4,5-τριυδροξυβενζοϊκό οξύ). Οι συμπυκνωμένες τανίνες είναι πολυμερή φλαβονοειδών και έχουν σαν βάση τις φλαβαν-3-όλες, (-)-επικατεχίνη και (+)-κατεχίνη (Σχήμα 7).<sup>8</sup>



Σχήμα 7: Δομή συμπυκνωμένης τανίνης.

#### 1.2.2.3 Στιλβένια

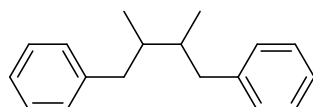
Τα στιλβένια είναι 1,2-διαρυλοαιθέρια. Ο δακτύλιος Α των στιλβενίων φέρει συνήθως δύο ομάδες υδροξυλίου στην *m*-θέση, ενώ ο δακτύλιος Β υποκαθιστάται με υδρόξυ- και μεθόξυ- ομάδες στις *o*-, *m*- ή *p*-θέσεις (Σχήμα 8). Συντίθενται από παράγωγα κινναμωμικού οξέος και οι υποκαταστάτες του κινναμωμικού οξέος εμφανίζονται στον δακτύλιο Β του στιλβενίου.<sup>8</sup>



Σχήμα 8: Δομή στιλβενίου.

#### 1.2.2.4 Λιγνάνες

Οι λιγνάνες ορίζονται ως ενώσεις οι οποίες διαθέτουν δομή 1,4-διαρυλοβουτανίου (Σχήμα 9). Οι λιγνάνες παράγονται με οξειδωτικό διμερισμό δύο μονάδων φαινυλοπροπανίου και υπάρχουν ως επί το πλείστον στην φύση σε ελεύθερη μορφή, ενώ τα γλυκοζιτικά τους παράγωγα είναι περιορισμένα. Οι λιγνάνες είναι ευρέως διαδεδομένες ως δευτερεύοντα συστατικά ορισμένων φυτικών ειδών.<sup>8</sup>



Σχήμα 9: Γενική δομή λιγνάνων.

### 1.3 Μορφή πολυφαινολών στα τρόφιμα και παράγοντες που την επηρεάζουν

Οι πολυφαινόλες υπάρχουν στα τρόφιμα ως περίπλοκοι συνδυασμοί από χημικές διαμορφώσεις διαφόρων πολυφαινολικών ενώσεων, όπως ολιγομερή, χλωρογενικά οξέα, υδροξυκιναμμωμικά οξέα και επικατεχίνες.<sup>23</sup> Επιπλέον, οι πολυφαινόλες υφίστανται σε συνδυασμό με σάκχαρα, που ενώνονται με ομάδες υδροξυλίου και αρωματικούς υδρογονάνθρακες και μπορούν να συνδυαστούν με οργανικά και καρβοξυλικά οξέα, καθώς και με αμίνες.<sup>24</sup> Στον τομέα των σιτηρών, οι πολυφαινόλες είναι συζευγμένες με πολυσακχαρίτες του κυτταρικού τοιχώματος,<sup>25</sup> ενώ στα φρούτα το ποσοστό των συζευγμένων πολυφαινολών είναι πολύ υψηλότερο από αυτό των ελεύθερων.<sup>26</sup>

Υπάρχει μια σειρά από παράγοντες που μπορούν να επηρεάσουν το ποσοστό των πολυφαινολών στα τρόφιμα, όπως οι περιβαλλοντικές συνθήκες, η αποθήκευση και η επεξεργασία τροφίμων.<sup>1</sup> Για παράδειγμα, η έκθεση στον ήλιο, την βροχή, καθώς και ο βαθμός ωριμότητας θα μπορούσε να επηρεάσει τις συγκεντρώσεις και τις αναλογίες των πολυφαινολών με διαφορετικούς τρόπους.<sup>27,28</sup> Σε γενικές γραμμές, η συγκέντρωση φαινολικών οξέων μειώνεται κατά τη διάρκεια της ωρίμανσης, ενώ η συγκέντρωση ανθοκυανινών αυξάνεται. Μέθοδοι μαγειρέματος, όπως ο βρασμός και το τηγάνισμα, προκαλούν σημαντική μείωση στην συγκέντρωση των πολυφαινολών. Η αποθήκευση επηρεάζει επίσης αρνητικά το ποσοστό τους.<sup>1</sup>

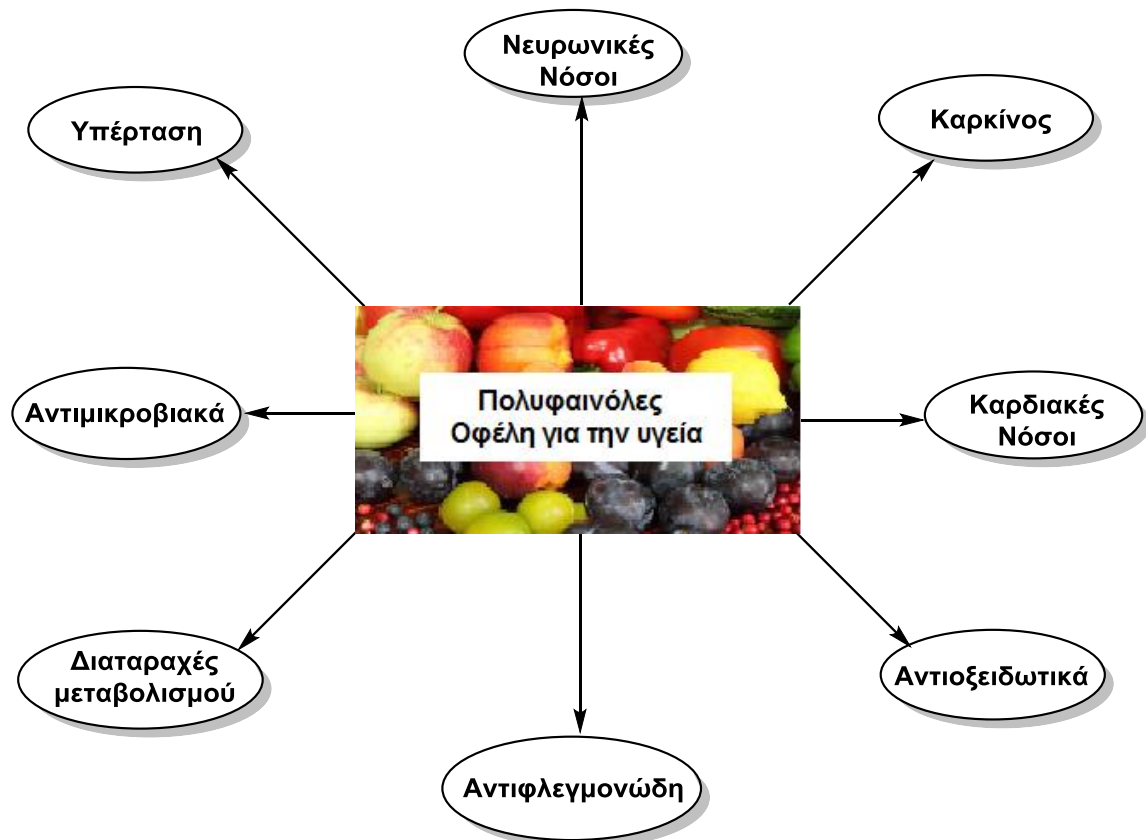
#### 1.4 Βιοδιαθεσιμότητα

Η βιοδιαθεσιμότητα των πολυφαινολών διαφοροποιείται σημαντικά από τη μία ένωση στην άλλη, λόγω της χημικής τους δομής.<sup>29</sup> Ο ρυθμός απορρόφησης, ο μεταβολισμός και η βιολογική δραστηριότητά τους επηρεάζονται από τη σύνθεσή τους, αλλά επίσης εξαρτώνται από την άμεση αλληλεπίδραση με άλλα διατροφικά συστατικά, όπως τις πρωτεΐνες, τους υδατάνθρακες, τις ίνες και τα λιπαρά.<sup>30,31</sup> Μόνο μερικές αγλυκόνες μπορούν να απορροφηθούν από το λεπτό έντερο.<sup>32,33</sup> Αντίθετα, οι περισσότερες πολυφαινολικές ενώσεις (δηλαδή εστέρες, πολυμερή και γλυκοσυλιωμένες μορφές) συνήθως μεταβολίζονται σε μεγάλο βαθμό ή αποβάλλονται γρήγορα.<sup>32,34</sup> Έτσι, οι ενώσεις αυτές απογλυκοζυλιώνονται, αποϋδροξυλιώνονται ή απομεθυλιώνονται μέσω ενζύμων του εντέρου ή της μικροχλωρίδας του παχέος εντέρου.<sup>31</sup> Μόλις απορροφηθούν, οι πολυφαινολικές ενώσεις απελευθερώνονται από τα κύτταρα του εντέρου εντός της λύμφης και εν συνεχεία στο αίμα, και παθαίνουν ουσιαστικά βιομετασχηματισμό με την μορφή της μεθυλίωσης, θείωσης και άλλων αντιδράσεων.<sup>31,35</sup> Αυτές οι τροποποιήσεις μεταβάλλουν τις χημικές ιδιότητες των πολυφαινολικών μεταβολιτών, με αποτέλεσμα να έχουν πλέον νέες βιολογικές δράσεις.<sup>32</sup> Εκτός από την γαστρεντερική οδό, άλλες θέσεις για το μεταβολισμό των διατροφικών πολυφαινολών είναι το ήπαρ, ο εγκέφαλος και το δέρμα.<sup>30</sup>

#### 1.5 Βιολογικές δράσεις των πολυφαινολών

Κατά τη διάρκεια των τελευταίων 20 ετών, οι πολυφαινόλες έχουν μελετηθεί για την πιθανή εμπλοκή τους στην πρόληψη των χρόνιων ασθενειών, όπως η καρδιαγγειακή νόσος, ο καρκίνος, η οστεοπόρωση, ο σακχαρώδης διαβήτης και οι νευροεκφυλιστικές ασθένειες. Η προστατευτική τους δράση αποδόθηκε αρχικά στην ικανότητά τους να δεσμεύουν ελεύθερες ρίζες και να δρουν ως μεταλλικά χημικά αντιδραστήρια, έπειτα στην ικανότητα αναστολής διαφόρων ενζύμων<sup>36</sup> και περισσότερο τα τελευταία χρόνια, στην αλληλεπίδραση τους με οδούς μεταγωγής σήματος και κυτταρικούς υποδοχείς.<sup>37,38,39</sup>

Οι βασικότερες βιολογικές τους δράσεις φαίνονται στο παρακάτω σχήμα (Σχήμα 10):



Σχήμα 10: Βιολογικές δράσεις πολυφαινολών.<sup>40</sup>

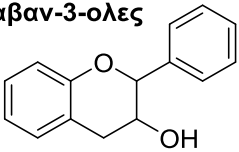
### 1.5.1 Αντιμικροβιακή Δράση

Η αντιμικροβιακή δράση των πολυφαινολών, που εμφανίζονται σε φυτικά τρόφιμα και φαρμακευτικά φυτά, έχει ερευνηθεί εκτενώς έναντι ενός ευρέος φάσματος μικροοργανισμών. Μεταξύ των πολυφαινολών, οι φλαβαν-3-όλες, οι φλαβονόλες και οι τανίνες έχουν λάβει τη μεγαλύτερη προσοχή λόγω του ευρέος φάσματος τους και της υψηλότερης αντιμικροβιακής δράσης τους σε σύγκριση με άλλες πολυφαινόλες, και στο γεγονός ότι οι περισσότερες από αυτές είναι σε θέση να καταστείλουν μια σειρά από μικροβιακούς λοιμογόνους παράγοντες και δείχνουν συνέργεια με αντιβιοτικά.<sup>36</sup> Οι αντιμικροβιακές ιδιότητες ορισμένων κατηγοριών των πολυφαινολών έχουν προταθεί είτε στην ανάπτυξη νέων συντηρητικών τροφίμων,<sup>41</sup> λόγω της αυξανόμενης πίεσης των καταναλωτών στη βιομηχανία τροφίμων για την αποφυγή των συνθετικών συντηρητικών, ή για την ανάπτυξη καινοτόμων θεραπειών στην αντιμετώπιση διαφόρων μικροβιακών λοιμώξεων,<sup>42,43</sup>

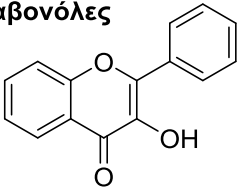
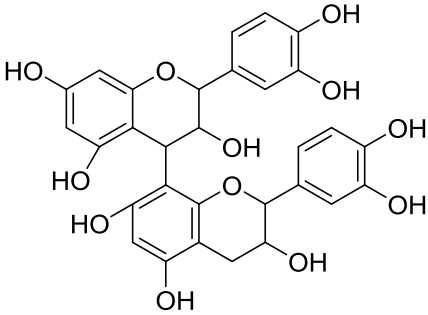
λαμβάνοντας υπόψη την αύξηση της μικροβιακής αντοχής έναντι της συμβατικής αντιβιοτικής θεραπείας.

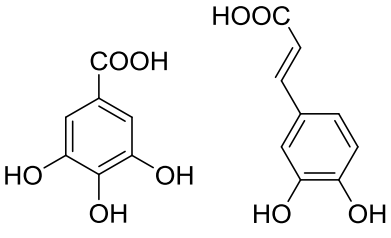
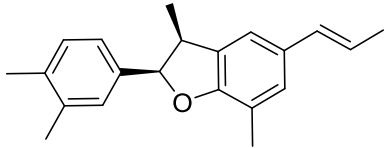
Στον παρακάτω πίνακα φαίνονται οι αντιμικροβιακές δράσεις πολυφαινολικών ενώσεων έναντι κάποιων μικροοργανισμών (Πίνακας 3):

Πίνακας 3: Πολυφαινολικές ενώσεις και οι μικροοργανισμοί στους οποίους δρουν.<sup>36</sup>

Ενώσεις	Μικροοργανισμοί		
	Βακτήρια	Ιοί	Μύκητες
<p>Φλαβαν-3-ολες</p> 	<p><i>V.cholerae</i></p> <p><i>S.mutans</i></p> <p><i>C.jejuni</i></p> <p><i>C.perfringes</i></p> <p><i>E.coli</i></p> <p><i>B.Cereus</i></p> <p><i>H.pylori</i></p> <p><i>S.aureus</i></p> <p><i>L.acidophilus</i></p> <p><i>A.naeslundii</i></p> <p><i>P.oralis</i></p> <p><i>P.gingivalis</i></p> <p><i>P.melaninogenica</i></p> <p><i>F.nucleatum</i></p> <p><i>C.pneumonia</i></p>	<p><i>Adenovirus</i></p> <p><i>Enterovirus</i></p> <p><i>Flu virus</i></p>	<p><i>Candida albicans</i></p> <p><i>Microsporium gypseum</i></p> <p><i>Trichophyton mentagrophytes</i></p> <p><i>Trichophyton rubrum</i></p>



<p>Φλαβονόλες</p> 	<p><i>V.cholerae</i></p> <p><i>S.mutans</i></p> <p><i>C.jejuni</i></p> <p><i>C.perfringes</i></p> <p><i>E.coli</i></p> <p><i>B.Cereus</i></p> <p><i>H.pylori</i></p> <p><i>S.aureus</i></p> <p><i>L.acidophilus</i></p> <p><i>A.naeslundii</i></p> <p><i>P.oralis</i></p> <p><i>P.gingivalis</i></p> <p><i>P.melaninogenica</i></p> <p><i>F.nucleatum</i></p> <p><i>C.pneumonia</i></p>	<p><i>Adenovirus</i></p> <p><i>Enterovirus</i></p> <p><i>Flu virus</i></p>	<p><i>Candida albicans</i></p> <p><i>Microsporium gypseum</i></p> <p><i>Trichophyton mentagrophytes</i></p> <p><i>Trichophyton rubrum</i></p>
 <p>Συμπυκνωμένες τανίνες</p>	<p><i>S.mutans</i></p> <p><i>E.coli</i></p> <p><i>S.aureus</i></p>	<p><i>influenza A type -1 herpes (HSV)</i></p>	

 <p><b>Φαινολικά οξέα</b></p>	<p><i>S.aureus</i> <i>L.monocytogenes</i> <i>E.coli</i> <i>P.aeruginosa</i></p>		
 <p><b>Νεολιγνάνες</b></p>	<p><i>Mycobacterium tuberculosis</i></p>		

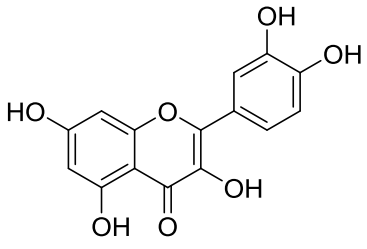
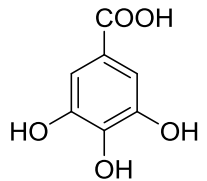
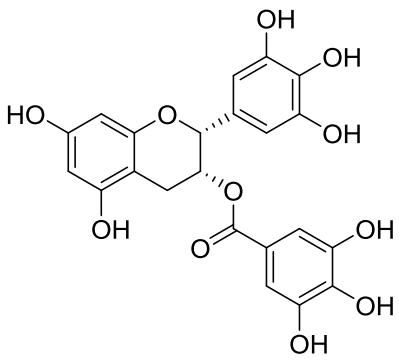
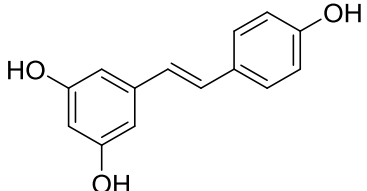
### 1.5.2 Αντικαρκινική Δράση

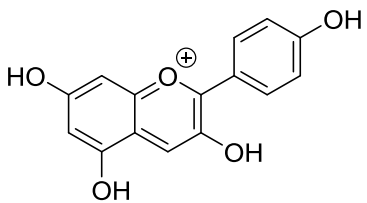
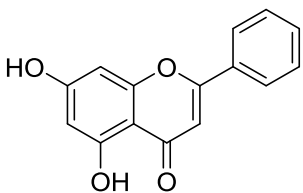
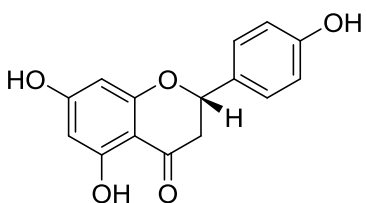
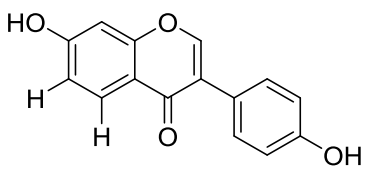
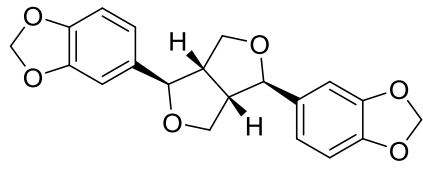
Ο καρκίνος είναι ένα μείζον πρόβλημα υγείας και η κύρια αιτία θανάτου σε όλο τον κόσμο, ενώ υπολογίζεται ότι αφορά 28.8 εκατομμύρια ανθρώπους<sup>44</sup> και μετράει 7.6 εκατομμύρια θανάτους το 2008.<sup>45</sup> Ο αριθμός των θανάτων που προκύπτουν από καρκίνο αυξάνεται από τις χώρες χαμηλού προς τις χώρες υψηλού εισοδήματος.<sup>46,47</sup> Οι πιο συχνά διαγνωσμένοι καρκίνοι παγκοσμίως είναι του πνεύμονα (12,7%), του μαστού (10,9%), του παχέος εντέρου (9,7%) και του στομάχου (7,81%). Παράγοντες όπως η εθνικότητα, η ηλικία, ο τρόπος ζωής και η διατροφή έχουν σημαντικό αντίκτυπο στην έκφραση και την εξέλιξη της νόσου.<sup>48</sup>

Εκτιμάται ότι το 30% των θανάτων από καρκίνο οφείλονται σε πέντε κορυφαίους διατροφικούς παράγοντες, συμπεριλαμβανομένου του μεγάλης μάζας δείκτη σώματος, της έλλειψης σωματικής άσκησης, του καπνίσματος, της κατανάλωσης αλκοόλ και της χαμηλής κατανάλωσης φρούτων και λαχανικών.<sup>44</sup> Τα τελευταία χρόνια, η επίδραση των πολυφαινολών στην υγεία έχει προσελκύσει την προσοχή των ερευνητών, των διατροφολόγων και των κατασκευαστών τροφίμων. Η αντικαρκινική αποτελεσματικότητα των φυσικών πολυφαινολών αποδίδεται σε μεγάλο βαθμό στην ισχυρή αντιοξειδωτική και αντιφλεγμονώδη δράση τους, καθώς και στις ικανότητές τους να διαμορφώνουν μοριακούς στόχους και οδούς σηματοδότησης, οι οποίοι

συνδέονται με την επιβίωση του κυττάρου, τον πολλαπλασιασμό, τη διαφοροποίηση, τη μετανάστευση, την αγγειογένεση κλπ. (Πίνακας 4).<sup>48</sup>

**Πίνακας 4: Κάποιες πολυφαινολικές ενώσεις, οι διατροφικές τους πηγές και οι μορφές καρκίνου που επιδρούν.**

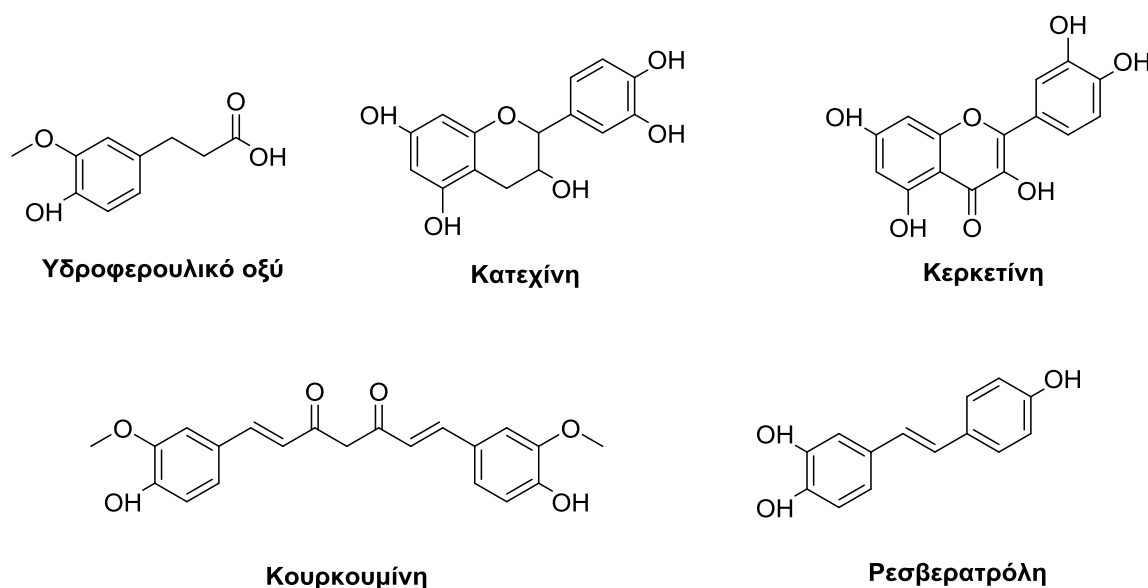
Πολυφαινόλη	Όνομα (Κατηγορία)	Προέλευση	Καρκίνος
	Κερκετίνη (φλαβονόλη)	Μήλα <sup>49</sup> Εμπορικά διαθέσιμο <sup>50</sup> Φράουλες <sup>51</sup>	Στήθος Συκώτι Παχύ έντερο Προστάτης Αυχέννας Στοματική κοιλότητα
	Γαλλικό οξύ (φαινολικό οξύ)	Εμπορικά διαθέσιμο Φραγκοστά- φυλα	Στομάχι <sup>52</sup> Λευχαιμία <sup>53</sup> Στήθος <sup>54</sup>
	(-)- Επιγαλλοκατεχι- νογαλλικός εστέρας (φλαβανόλη)	Εμπορικά διαθέσιμο	Λευχαιμία <sup>55</sup>
	Ρεσβερατρόλη (στιλβένιο)	Εμπορικά διαθέσιμο	Δέρμα <sup>56</sup>

	Πελαργονιδίνη (ανθοκυανίνη)	Φράουλες <sup>51</sup>	Αυχένιας Παχύ έντερο Στοματική κοιλότητα Προστάτης
	Χρυσίνη (φλαβόνη)	Εμπορικά διαθέσιμο Πρόπολη	Στήθος <sup>57</sup> Δέρμα <sup>58</sup>
	Ναρινγενίνη (φλαβανόνη)	Εσπεριροειδή	Παχύ έντερο <sup>59</sup> Συκώτι <sup>60</sup> Στήθος <sup>61</sup>
	Δαϊδζεΐνη (ισοφλαβόνη)	Σόγια	Συκώτι <sup>62</sup> Στήθος <sup>63</sup>
	Σεσαμίνη (λιγνάνη)	Σησαμέλαιο	Στήθος Προστάτης 64

### 1.5.3 Αντιφλεγμονώδης Δράση

Η υπερβολική φλεγμονή θεωρείται κρίσιμος παράγοντας σε πολλές χρόνιες ασθένειες του ανθρώπου, συμπεριλαμβανομένης της παχυσαρκίας, του διαβήτη τύπου II, των καρδιαγγειακών ασθενειών, των νευροεκφυλιστικών ασθενειών και της γήρανσης.<sup>1</sup> Οι πολυφαινόλες έχουν δείξει σημαντική

αντιφλεγμονώδη δράση *in vivo* και *in vitro*.<sup>65</sup> Οι πολυφαινόλες με τη μεγαλύτερη δράση είναι το υδροφερουλικό οξύ, οι κατεχίνες, η κουρκουμίνη, η κερκετίνη<sup>66</sup> και η ρεσβερατρόλη (Σχήμα 11).<sup>1</sup> Οι πολυφαινόλες μπορούν να επηρεάσουν την αγγειακή φλεγμονή, όχι μόνο ως αντιοξειδωτικά, αλλά και ως ρυθμιστές.<sup>66,67</sup> Οι μοριακοί στόχοι τους μπορούν να χωριστούν σε αυτούς που σχετίζονται με την αναστολή της φωσφολιπάσης A<sub>2</sub> και της λιποξυγενάσης, και σε αυτούς που σχετίζονται με οδούς που εξαρτώνται από το αραχιδονικό οξύ.<sup>68,69</sup>



Σχήμα 11: Πολυφαινόλες με αντιφλεγμονώδη δράση.

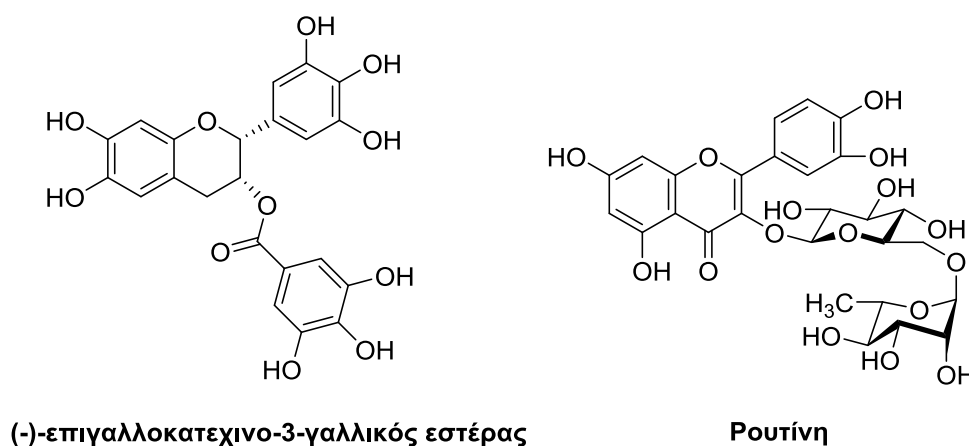
#### 1.5.4 Καρδιοπροστατευτική Δράση

Η μεταγευματική υπερτριγλυκεριδαιμία και το οξειδωτικό στρες, δύο καλά καθορισμένοι παράγοντες κινδύνου για την πρόκληση της αθηροσκλήρωσης μπορούν να μειωθούν από τις πολυφαινόλες. Η αθηροσκλήρωση αναπτύσσεται σε περιοχές που είναι επιρρεπείς σε βλάβες των μεσαίου μεγέθους αρτηριών.<sup>1</sup> Η αθηροσκλήρωση μπορεί να είναι παρούσα ή κλινικά σιωπηλή για δεκαετίες πριν γίνει ενεργή και παράγει παθολογικές καταστάσεις, όπως οξύ έμφραγμα του μυοκαρδίου και αιφνίδιο καρδιακό θάνατο.<sup>70</sup> Πολυάριθμες μελέτες έχουν δείξει ότι οι πολυφαινόλες θα μπορούσαν να μειώσουν τον κίνδυνο θρόμβωσης, που είναι μία από τις κύριες αιτίες για το έμφραγμα του μυοκαρδίου.<sup>71,72,73</sup> Επιπλέον, επιδημιολογικές μελέτες έδειξαν ότι η συχνότητα εμφάνισης της

καρδιαγγειακής νόσου είναι χαμηλή στην περιοχή της Μεσογείου.<sup>1</sup> Η μεσογειακή δίαιτα, η οποία είναι πλούσια σε πράσινα λαχανικά, φρούτα, ψάρια και κρασί (ιδιαίτερα το κόκκινο κρασί) έδωσε το μεγαλύτερο όφελος στην πρόληψη της στεφανιαίας νόσου από άλλες δίαιτες.<sup>74,75</sup> Οι φαινολικές ενώσεις που έχουν δείξει την μεγαλύτερη καρδιοπροστατευτική δράση είναι η ρεσβερατρόλη,<sup>1</sup> που περιέχεται στο κόκκινο κρασί, και τα υδροξυκιναμμωμικά οξέα και μονοφαινόλες (όπως η τυροσόλη), που περιέχονται στο λευκό κρασί.<sup>76</sup>

### 1.5.5 Αντιγηραντική-Νευροπροστατευτική Δράση

Οι πολυφαινόλες, λόγω της αξιοσημείωτης αντιοξειδωτικής τους δράσης, μπορούν να είναι ευεργετικές για την αναστροφή της πορείας της νευρωνικής και συμπεριφορικής γήρανσης. Οι ενώσεις που παρουσιάζουν την ισχυρότερη νευροπροστατευτική δράση είναι ο (-)-επιγαλλοκατεχίνο-3-γαλλικός εστέρας που μειώνει τον κίνδυνο της νόσου του Πάρκινσον, η ρουτίνη που καταπολεμά την νόσο του Αλτσχάιμερ και άλλες (Σχήμα 12).<sup>1</sup>



Σχήμα 12: Πολυφαινόλες με νευροπροστατευτική δράση.

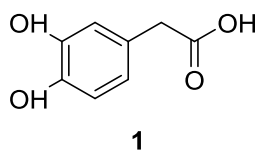
### 1.5.6 Αντιοξειδωτική Δράση

Η αντιοξειδωτική δράση των πολυφαινολικών ενώσεων οφείλεται στις φαινολικές ομάδες, οι οποίες μπορούν να δεχθούν ένα ηλεκτρόνιο για να σχηματίσουν σχετικά σταθερές ρίζες φαινοξυλίου.<sup>29</sup> Οι πολυφαινόλες διαταράσσουν έτσι αλυσιδωτές αντιδράσεις οξείδωσης σε κυτταρικά συστατικά.<sup>77</sup> Λεπτομέρειες για αυτή την δράση των πολυφαινολών θα περιγραφούν στο Κεφάλαιο 2.

## 1.6 3,4-Διυδροξυφαινυλοξικό οξύ

### 1.6.1 Εισαγωγή

Το 3,4-διυδροξυφαινυλοξικό οξύ (Σχήμα 13) (3,4-dihydroxyphenylacetic acid, DHPAA ή DOPAC) είναι ένα παράγωγο κατεχόλης το οποίο έχει λάβει πρόσφατα σημαντική προσοχή,<sup>78</sup> δεδομένου ότι παρουσιάζει ποικίλες βιολογικές δράσεις. Η μέση ημερήσια πρόσληψη του DOPAC από τα τρόφιμα είναι 7.27 mg και υπάρχει σε νανομοριακές συγκεντρώσεις στο ανθρώπινο πλάσμα.<sup>79,80</sup>



Σχήμα 13: Δομή 3,4-διυδροξυφαινυλοξικού οξέος.

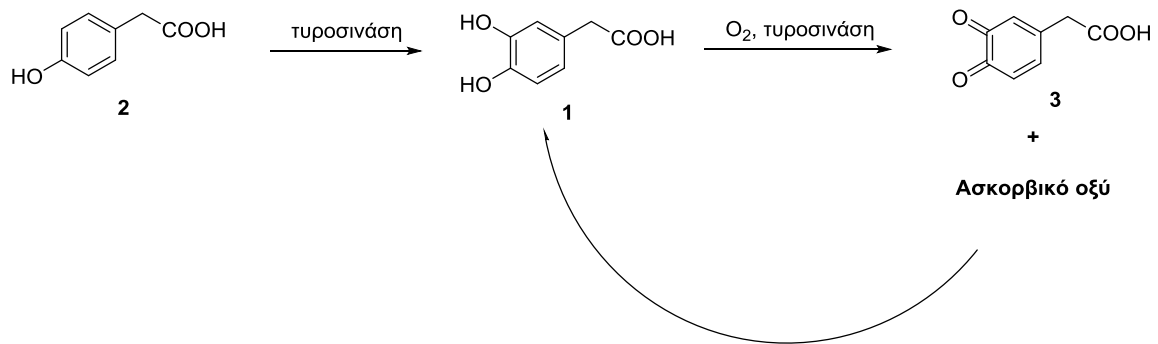
Πρόκειται ουσιαστικά για έναν μεταβολίτη φαινολικών ενώσεων, ο οποίος μπορεί να βρεθεί στην κυκλοφορία του αίματος μετά την κατανάλωση φυτικών τροφών που περιέχουν προανθοκυανιδίνες και φλαβαν-3-όλες, όπως το κακάο, το τσάι, το κρασί και η ελιά.<sup>81</sup> Ανήκει στην κατηγορία των μη φλαβονοειδών πολυφαινολών και συγκεκριμένα στην υποκατηγορία των φαινολικών οξέων. Αποτελεί μεταβολίτη τριών πολυφαινολικών ενώσεων: της ντοπαμίνης, της υδροξυτυροσόλης και της κερκετίνης. Το DOPAC μπορεί να θεωρηθεί ως ένας δακτύλιος κατεχόλης (ορθο-διυδροξυφαινολικός δακτύλιος) με ένα οξύ σαν πλευρική αλυσίδα ή εναλλακτικά ως ένα φαινυλοξικό οξύ επταυξημένο με μία διυδρόξυ χαρακτηριστική ομάδα.<sup>82</sup>

### 1.6.2 Σχηματισμός

Μέχρι σήμερα έχουν παρουσιαστεί, μέσα από μελέτες, διάφοροι τρόποι σχηματισμού της ένωσης:

1. Η δομή κατεχόλης του DHPAA περιέχει δύο γειτονικές ομάδες υδροξυλίου οι οποίες μπορούν να δημιουργηθούν ενζυματικά από το 4-υδροξυφαινυλοξικό οξύ **2** (HPAA) χρησιμοποιώντας την τυροσινάση ως καταλύτη.<sup>83,84</sup> Η τυροσινάση καταλύει την ορθοϋδροξυλίωση του μονοφαινολικού HPAA στο ο-διφαινολικό DHPAA **1** και την οξειδωση των ο-διφαινολών στις ο-κινόνες **3** χρησιμοποιώντας μοριακό

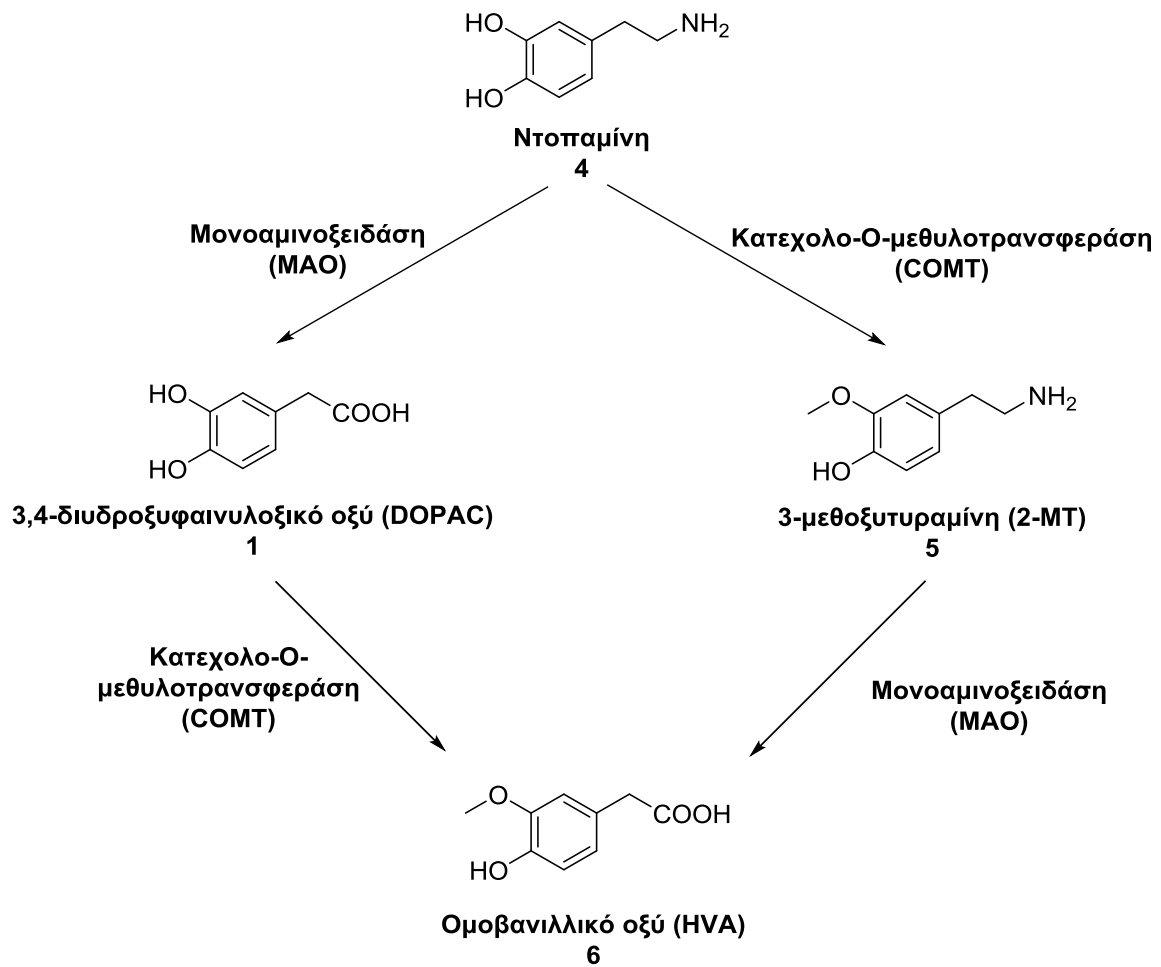
οξυγόνο.<sup>85</sup> Ο σχηματισμός των ο-κινονών μπορεί να αποτραπεί με προσθήκη ασκορβικού οξέος (Σχήμα 14).<sup>83,84,86,87</sup>



**Σχήμα 14: Ενζυματικός σχηματισμός του DHPAA από το ΗΡΑΑ με τυροσινάση.**

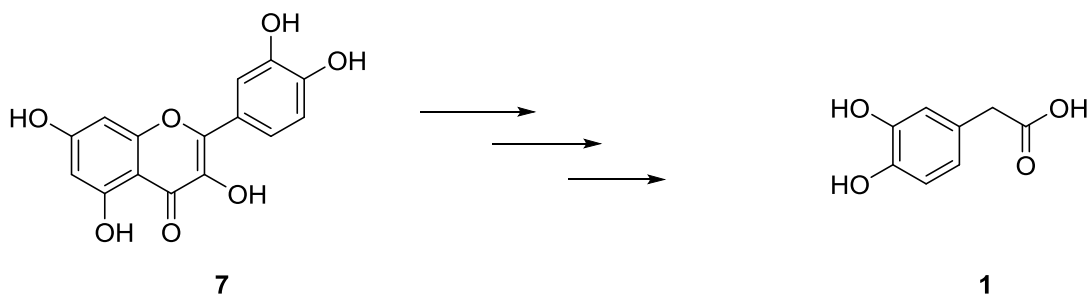
2. Το 3,4-διυδροξυφαιτυλοξικό οξύ (DOPAC) είναι ένας από τους πιο σημαντικούς μεταβολίτες της ντοπαμίνης.<sup>82</sup> Η ντοπαμίνη **4** είναι νευροδιαβιβαστής του εγκεφάλου και μπορεί να μεταβολιστεί σε τρεις ενώσεις: DOPAC **1**, 3-μεθοξυτυραμίνη **5** (2-MT) και νορεπινεφρίνη. Ο σχηματισμός του DOPAC καταλύεται από το ένζυμο μονοαμινοξειδάση (MAO) και στην συνέχεια το DOPAC με την βοήθεια του ενζύμου κατεχολ-Ο-μεθυλ-τρανσφεράση (COMT) μετατρέπεται στο ομοβανιλλικό οξύ **6** (HVA) (Σχήμα 15).<sup>88,89,90</sup>





Σχήμα 15: Μεταβολισμός της ντοπαμίνης.

3. Οι διαιτητικοί φλαβονοειδείς γλυκοζίτες,<sup>91</sup> συμπεριλαμβανομένης της κερκετίνης **7** από το κρεμμύδι, απορροφώνται ελάχιστα από την γαστρεντερική οδό, οπότε μετατρέπονται σε μικρότερα φαινολικά οξέα, τα οποία μπορούν να απορροφηθούν μέσα στην κυκλοφορία. Μεταξύ των σημαντικότερων μεταβολιτών της κερκετίνης είναι το 3,4-διυδροξυφαινυλοξικό οξύ (DOPAC), το οποίο έχει μία χαρακτηριστική ομάδα κατεχόλης (Σχήμα 16). Το DOPAC θεωρείται το πλέον βιολογικώς δραστικό φαινολικό οξύ, που προέρχεται από τον καταβολισμό των γλυκοζιτών της κερκετίνης, για την αντιοξειδωτική του ικανότητα.<sup>92</sup>

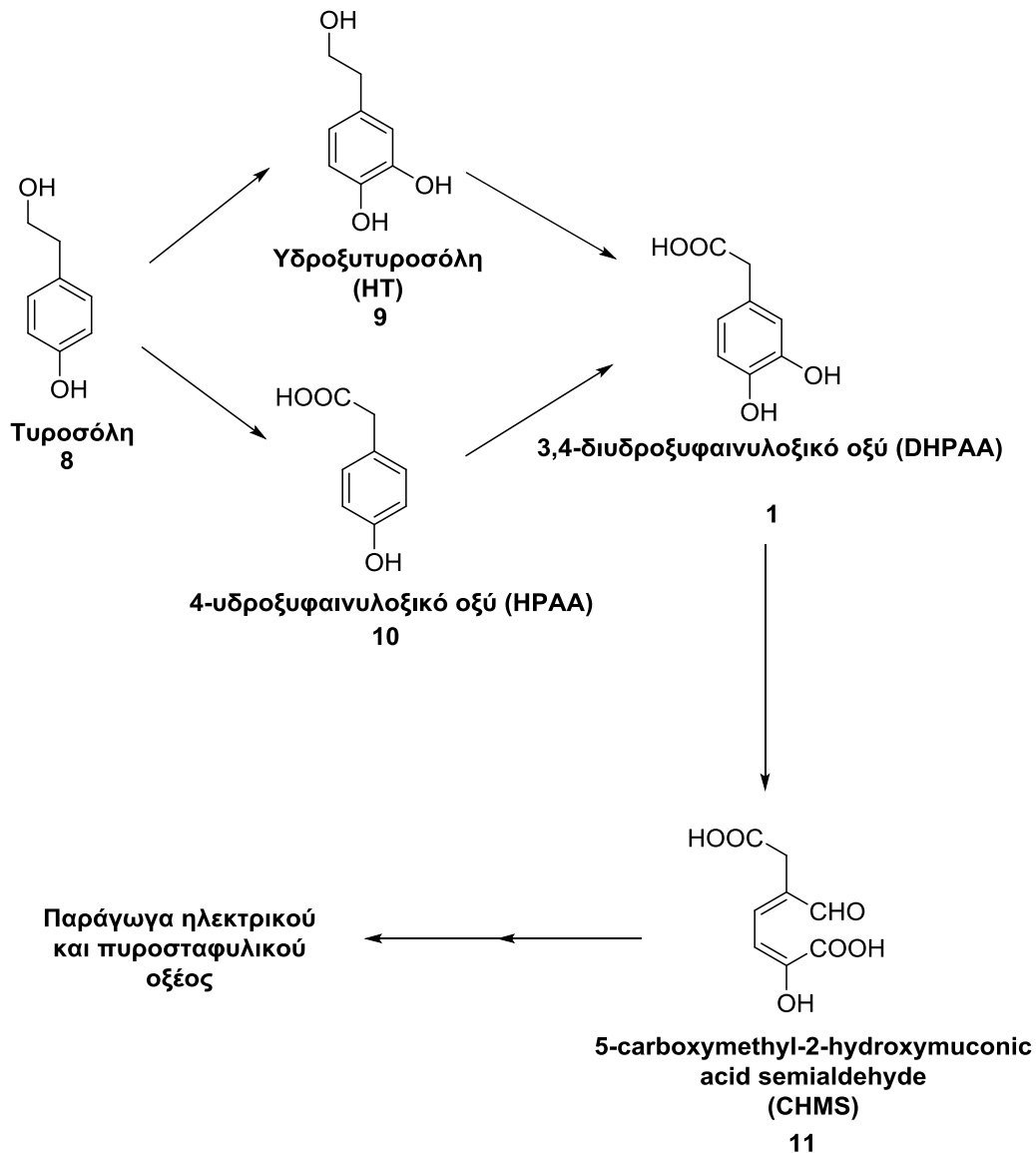


**Σχήμα 16: Μεταβολισμός κερκετίνης σε DOPAC.**

4. Το ελαιόλαδο είναι μια πλούσια πηγή σε μονοακόρεστα λιπαρά οξέα και φαινολικές ενώσεις, από απλές έως πολύ πολύπλοκες.<sup>93</sup> Οι υδατοδιαλυτές απλές φαινόλες χαμηλότερου μοριακού βάρους, συμπεριλαμβανομένου και του 3,4-διυδροξυφαινυλοξικού οξέος (3,4-DHPAA), χάνονται κατά τη διάρκεια της παραγωγής των ελαίων. Περνούν στην υδατική φάση που ονομάζεται «Olive Mill Waste Water» (OMWW).<sup>93,94,95</sup>

Η τυροσόλη **8** είναι μία από τις σημαντικότερες φαινολικές ενώσεις που υπάρχουν στα OMWW και μπορεί να μεταβολιστεί αερόβια στην ένωση DOPAC με την βοήθεια μικροοργανισμών.

Η μικροβιακή πορεία που εμπλέκεται στον αερόβιο μεταβολισμό της τυροσόλης, ξεκινά με αντιδράσεις υδροξυλίωσης του αρωματικού της δακτυλίου και έπειτα μεσολαβούν μονο- και δι-οξυγενάσες για να αποσταθεροποιήσουν τον συντονισμό του βενζολικού δακτυλίου. Αρχικά απομονώνεται από τα OMWW τυροσόλη. Στην συνέχεια, η τυροσόλη μεταβολίζεται κυρίως σε υδροξυτυροσόλη **9**, με μία αντίδραση υδροξυλίωσης στον C(3) και σε μικρότερο ποσοστό σε 4-υδροξυφαινυλοξικό οξύ **10** (HPAA). Έπειτα, ακολουθεί ο σχηματισμός του DHPAA με οξείδωση της υδροξυτυροσόλης (HT) και υδροξυλίωση του HPAA. Το DHPAA, έπειτα, μεταβολίζεται στην αλδεύδη **11** (5-carboxymethyl-2-hydroxymuconic acid semoaldehyde, CHMS) και μετά σε παράγωγα ηλεκτρικού και πυροσταφυλικού οξέος (Σχήμα 17).<sup>96</sup>



Σχήμα 17: Μεταβολική οδός τυροσόλης.

### 1.6.3 Βιολογικές δράσεις

Το 3,4-διυδροξυφαινυλοξικό οξύ, όπως όλες οι πολυφαινολικές ενώσεις και τα παράγωγά τους, παρουσιάζει ποικίλες βιολογικές δράσεις. Αν και το DOPAC δεν είναι τόσο δραστικό, όπως κάποιες από τις πρόδρομες ενώσεις του (υδροξυτυροσόλη, κερκετίνη), παρόλα αυτά είναι λιγότερο κυτταροτοξικό, καθώς και πιο βιοδιαθέσιμο.

Το 3,4-διυδροξυφαινυλοξικό οξύ παρουσιάζει σημαντική δράση δέσμευσης, όχι μόνο της ρίζας DPPH, αλλά και της ρίζας του ανιόντος σουπεροξειδίου ( $O_2^{\cdot-}$ ).<sup>91</sup> Πιθανότατα δρα ως αντιοξειδωτικό κυρίως στο ενδιάμεσο βιολογικών μεμβρανών, ενώ δρα συνεργιστικά με άλλα αντιοξειδωτικά.<sup>97</sup> Η

χαρακτηριστική ομάδα ο-διφαινόλη είναι απαραίτητη για την δράση παγίδευσης ριζών.<sup>98,99</sup> Επίσης, η ομάδα μεθυλενίου που συνδέεται με το δακτύλιο του βενζολίου της ένωσης παίζει ενισχυτικό ρόλο, όχι μόνο στην δράση παγίδευσης ριζών, αλλά και στην παραγωγή υπεροξειδίου του υδρογόνου η οποία εξαρτάται από μία αυτοοξειδωση.<sup>91</sup> Εκτός απ' αυτά, το DOPAC αναστέλλει σημαντικά την κυτταροτοξικότητα που προκαλείται από το υπεροξείδιο του υδρογόνου και αναστέλλει την έκκριση προ-φλεγμονωδών κυτοκινών στα περιφερειακά μονοπύρρηνα κύτταρα του αίματος που διεγείρονται από λιποπολυσακχαρίτες.<sup>100</sup>

Πρέπει να αναφερθεί ότι το DOPAC προστατεύει τα παγκρεατικά β-κύτταρα από τη δυσλειτουργία η οποία προκαλείται από υψηλή χοληστερόλη.<sup>78</sup> Ως εκ τούτου, έχει προταθεί ως ένα υποσχόμενο φάρμακο για την πρόληψη ή την καθυστέρηση της μετάβασης από τον προ-διαβήτη στο διαβήτη, ο οποίος αποτελεί σήμερα ένα σημαντικό ζήτημα για την υγεία σε όλο τον κόσμο.<sup>101</sup>

Όπως, όλα τα φαινολικά αντιοξειδωτικά από το ελαιόλαδο, έτσι και το DOPAC προστατεύει τις λιποπρωτεΐνες χαμηλής πυκνότητας (LDL) έναντι των οξειδωτικών τροποποιήσεων<sup>102,103,104,105,106</sup> και έχει ευεργετική επίδραση έναντι της αθηροσκλήρωσης.<sup>97</sup> Είναι ενεργό στην άμυνα του καρδιαγγειακού, ανοσοποιητικού και αναπνευστικού συστήματος στον άνθρωπο,<sup>102</sup> καθώς επίσης μειώνει τον κίνδυνο των γαστρεντερικών παθήσεων.<sup>103</sup>

Τέλος, παρουσιάζει αντικαρκινική δυναμική,<sup>107</sup> καθώς επιδεικνύει αντιπολλαπλασιαστική δράση σε καρκίνους του προστάτη<sup>108</sup> και του παχέος εντέρου.<sup>108,109,110</sup>

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2

### ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΗ ΔΡΑΣΗ

#### 2.1 Εισαγωγή

Τα αντιοξειδωτικά περιλαμβάνουν μία ευρεία ποικιλία από φυτοχημικά, τα οποία έχουν δυνατότητα οξειδοαναγωγής, μεσολαβώντας έτσι στην μείωση των δραστικών μορφών οξυγόνου.<sup>8</sup> Μεταξύ των αξιοσημείωτων βιολογικών δράσεων των πολυφαινόλων, οι αντιοξειδωτικές τους δράσεις έχουν μελετηθεί εκτενώς.

#### 2.2 Δραστικές μορφές οξυγόνου (ROS) και οξειδωτικό στρες

Στα βιολογικά συστήματα κατά τη διάρκεια της αναπνοής, ένα σημαντικό μέρος του οξυγόνου ανάγεται ατελώς. Αυτό το μερικώς ανηγμένο οξυγόνο, και τα παράγωγά του, είναι γνωστά ως δραστικές μορφές οξυγόνου (ROS), οι οποίες είναι εξαιρετικά δραστικά προ-οξειδωτικά και τοξικές ενώσεις.<sup>111</sup> Τα ROS επίσης περιλαμβάνουν τις ελεύθερες ρίζες και τα μη ριζικά παράγωγα του οξυγόνου.<sup>112</sup> Η δραστικότητα τους μπορεί να προκαλέσει λειτουργικές βλάβες στα βιολογικά συστήματα, προκαλώντας μια σειρά εκφυλιστικών ασθενειών, όπως μεταλλαξιγένεση, καρκινογένεση, κυκλοφορικές διαταραχές και γήρανση.<sup>113,114</sup>

Με τον όρο ελεύθερη ρίζα ορίζεται οποιαδήποτε ένωση μπορεί να υπάρξει ανεξάρτητα και η οποία έχει ένα ή περισσότερα ασύζευκτα ηλεκτρόνια. Οι ελεύθερες ρίζες (ιδιαίτερα του υπεροξειδίου,  $O_2^{2-}$ ) και άλλες δραστικές μορφές οξυγόνου, όπως το υπεροξειδίο του υδρογόνου ( $H_2O_2$ ), παράγονται συνεχώς *in vivo*.<sup>115</sup> Τα ROS είναι ένας συνολικός όρος που περιλαμβάνει ρίζες που έχουν ως επίκεντρο το οξυγόνο και μερικά μη-ριζικά παράγωγά του, όπως το μονήρες οξυγόνο και το υποχλωριώδες οξύ.<sup>116</sup>

Το οξειδωτικό στρες μπορεί να θεωρηθεί ως μια ανισορροπία μεταξύ της παραγωγής ελευθέρων ριζών (προοξειδωτικά) και των αντιοξειδωτικών στον οργανισμό.<sup>111</sup> Το οξύ και χρόνιο οξειδωτικό στρες εμπλέκεται σε έναν αριθμό εκφυλιστικών ασθενειών, όπως είναι η αθηροσκλήρωση, ο σακχαρώδης διαβήτης, η νόσος του Alzheimer, οι φλεγμονώδεις ασθένειες, η καρκινογένεση, οι νευροεκφυλιστικές ασθένειες, η υπέρταση, οι οφθαλμικές

και οι πνευμονικές παθήσεις.<sup>117,118</sup> Οι βλάβες που προκαλούνται από τα ROS μπορεί να οφείλονται σε επίθεσή τους σε μεμβράνες λιπιδίων, σε ενδοκυτταρικές πρωτεΐνες/ένζυμα, σε υδατάνθρακες και στο πυρηνικό DNA κυττάρων και ιστών.<sup>111</sup>

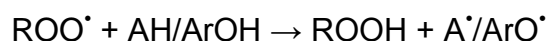
Στα βιολογικά συστήματα, τα αντιοξειδωτικά έχουν οριστεί ως οποιαδήποτε ουσία που, όταν υπάρχει σε χαμηλές συγκεντρώσεις σε σύγκριση με αυτές ενός ευοξειδωτου υποστρώματος, καθυστερεί σημαντικά ή εμποδίζει την οξείδωση του υποστρώματος.<sup>119</sup> Ωστόσο, σε συστήματα τροφίμων, τα αντιοξειδωτικά έχουν ταξινομηθεί ως ουσίες, οι οποίες είναι σε θέση να προλαμβάνουν ή να επιβραδύνουν την οξείδωση ευοξειδωτων υλικών, όπως είναι τα λιπίδια σε μικρές ποσότητες.<sup>120</sup> Ένα διατροφικό αντιοξειδωτικό μπορεί είτε να δεσμεύσει τις δραστικές μορφές οξυγόνου για να σταματήσει τις αλυσιδωτές ριζικές αντιδράσεις, είτε να εμποδίσει τα δραστικά οξειδωτικά να σχηματιστούν εξ αρχής.<sup>121</sup>

### **2.3 Μηχανισμοί αντιοξειδωτικής δράσης**

Η ύπαρξη τρόπων μελέτης και αξιολόγησης της δράσης των αντιοξειδωτικών είναι άκρως απαραίτητη. Η ικανότητα παγίδευσης ριζών σχετίζεται άμεσα με τη δυνατότητα μεταφοράς ατόμων υδρογόνου μιας ένωσης και δε σχετίζεται μόνο με το δυναμικό οξειδοαναγωγής.<sup>124</sup> Με βάση τις χημικές αντιδράσεις που εμπλέκονται, οι κύριες μέθοδοι εκτίμησης της αντιοξειδωτικής ικανότητας μπορούν να διαιρεθούν σε δύο κατηγορίες: (1) τις δοκιμασίες που βασίζονται στην αντίδραση μεταφοράς ατόμου υδρογόνου (HAT) και (2) αυτές που βασίζονται στην απλή μεταφορά ηλεκτρονίων (ET).<sup>121</sup>

#### **2.3.1 Μηχανισμός HAT**

Οι αναλύσεις με βάση τον μηχανισμό HAT μετράνε την ικανότητα ενός αντιοξειδωτικού να απενεργοποιεί τις ελεύθερες ρίζες (τις υπεροξειδικές ρίζες κυρίως) μεταφέροντας ένα άτομο H. Οι υπεροξειδικές ρίζες ROO<sup>•</sup> επιλέγονται γενικά ως τα δραστικά είδη σε αυτές τις δοκιμασίες, εξαιτίας της υψηλότερης βιολογικής τους συνάφειας και του μεγαλύτερου χρόνου ημιζωής τους (σε σύγκριση με τις υδροξυλικές ρίζες). Ο μηχανισμός HAT, στον οποίο το άτομο του υδρογόνου (H<sup>•</sup>) μιας φαινόλης (ArOH) μεταφέρεται σε μία ROO<sup>•</sup> ρίζα, μπορεί να συνοψιστεί από την αντίδραση:

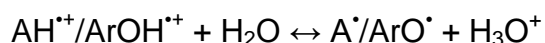
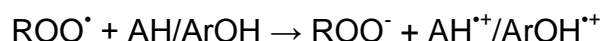


όπου η αρυλόξυ ρίζα ( $\text{ArO}^\bullet$ ), που σχηματίζεται από την αντίδραση του φαινολικού αντιοξειδωτικού με την υπεροξειδική ρίζα, συνήθως σταθεροποιείται με συντονισμό. Τα AH και ArOH δηλώνουν τα προστατευόμενα βιομόρια και αντιοξειδωτικά, αντίστοιχα.<sup>122</sup> Τα αποτελεσματικά φαινολικά αντιοξειδωτικά πρέπει να αντιδρούν πιο γρήγορα με τις ελεύθερες ρίζες από ότι τα βιομόρια για την προστασία των τελευταίων από την οξειδωση. Επίσης, τα  $\text{A}^\bullet$  πρέπει να μετατρέπονται γρήγορα σε αδρανέστερες μορφές.<sup>123</sup>

Σε αυτές τις μεθόδους, χρησιμοποιώντας έναν φθορισμομετρικό ανιχνευτή, τόσο ο ανιχνευτής όσο και το αντιοξειδωτικό αντιδρούν ταυτόχρονα με την ρίζα  $\text{ROO}^\bullet$  και η αντιοξειδωτική δράση μπορεί να υπολογιστεί από τις κινητικές ανταγωνισμού με τη μέτρηση της καμπύλης εξασθένησης φθορισμού του ανιχνευτή, παρουσία και απουσία του αντιοξειδωτικού και ενσωματώνοντας την περιοχή κάτω από τις καμπύλες (προσέγγιση AUC).<sup>124</sup> Η διαφορά AUC μεταξύ του τυφλού αντιδραστήριου και του δείγματος σχετίζεται στη συνέχεια με τις συγκεντρώσεις αντιοξειδωτικού στο δείγμα.<sup>121,125</sup>

### 2.3.2 Μηχανισμός ET

Ο μηχανισμός ET για την μελέτη της αντιοξειδωτικής δράσης με μία βιολογικά σχετική ρίζα βασίζεται στις αντιδράσεις:



οι οποίες θεωρείται γενικά ότι είναι σχετικά βραδύτερες από εκείνες των δοκιμασιών του μηχανισμού HAT και είναι εξαρτώμενες και από τον διαλύτη και από το pH. Η εξάρτηση από το pH είναι προφανής από την παραπάνω αλληλουχία αντιδράσεων του μηχανισμού ET. Για παράδειγμα, οι φαινολικές ενώσεις (ArOH), έχοντας ασθενώς όξινες ομάδες -OH, δίστανται σε μεγαλύτερο βαθμό σε υψηλό pH και γίνονται πιο ευαίσθητες σε οξειδωση. Έτσι, οι περισσότερες αντιδράσεις ET λαμβάνουν χώρα κατά κύριο λόγο σε

υψηλότερο pH.<sup>122</sup> Σε γενικές γραμμές, τα δυναμικά ιονισμού των φαινολικών αντιοξειδωτικών μειώνονται με την αύξηση του pH, το οποίο προκαλεί αύξηση της ικανότητας μεταφοράς ηλεκτρονίων με ταυτόχρονη αποπρωτονίωση.<sup>125</sup> Η αρυλόξυ ρίζα (ArO<sup>•</sup>) στη συνέχεια οξειδώνεται προς την αντίστοιχη κινόνη (Ar=O). Όσο πιο σταθεροποιημένη είναι η αρυλόξυ ρίζα, τόσο ευκολότερη θα είναι η οξείδωση της ArOH σε Ar=O, λόγω της μειωμένης οξειδοαναγωγικής ικανότητας,<sup>123</sup> και τόσο ισχυρότερο θα είναι το αντιοξειδωτικό.

Οι μέθοδοι με μηχανισμό ET μπορεί να γίνονται καλύτερα κατανοητές, από ότι αυτές με μηχανισμό HAT, λαμβάνοντας υπόψη το γεγονός ότι τα αντιοξειδωτικά είναι επίσης καλά αναγωγικά μέσα, ικανά για αναγωγική απόσβεση των ROS. Ωστόσο, αυτές οι δοκιμασίες δε χρησιμοποιούν απαραίτητα βιολογικά δραστικά είδη (όπως υπεροξειδικές ρίζες).<sup>122</sup> Αντ' αυτού, χρησιμοποιούν τεχνητούς ανιχνευτές που αλλάζουν χρώμα ή φθορισμό όταν μειώνονται από τα αντιοξειδωτικά (π.χ DPPH, ABTS<sup>•+</sup>).<sup>121,123</sup>

## 2.4 Μέθοδοι Προσδιορισμού Αντιοξειδωτικής Δράσης

Ένας αριθμός δοκιμασιών έχουν εισαχθεί για τον προσδιορισμό της ολικής αντιοξειδωτικής δράσης, η οποία προσδιορίζεται ως η αθροιστική ικανότητα των ενώσεων να δεσμεύουν ελεύθερες ρίζες.<sup>126,127</sup> Κάποιες από τις πιο γνωστές μεθόδους παρουσιάζονται στον Πίνακα 5:

Πίνακας 5: *In vitro* μέθοδοι προσδιορισμού αντιοξειδωτικής δράσης.<sup>121</sup>

<b><i>In vitro</i> μέθοδοι προσδιορισμού αντιοξειδωτικής δράσης</b>	
<p>Μέθοδοι που βασίζονται σε αντιδράσεις μεταφοράς ατόμου υδρογόνου (HAT):</p> $ROO^{\bullet} + AH \rightarrow ROOH + A^{\bullet}$	ORAC (oxygen radical absorbance capacity)
	TRAP (total radical trapping antioxidant parameter)
	Crocin bleaching assay
	IOU (inhibited oxygen uptake)
	Inhibition of linolenic acid oxidation



	Inhibition of LDL oxidation
<p>Μέθοδοι που βασίζονται σε αντιδράσεις μεταφοράς ηλεκτρονίων (ET):</p> $M(n) + e^- (\text{από AH}) \rightarrow AH^{n+} + M(n-1)$	TEAC (Trolox equivalent antioxidant capacity)
	FRAP (ferric ion reducing antioxidant parameter)
	DPPH (diphenyl-1-picrylhydrazyl)
	Copper(II) reduction capacity
	Total phenols assay by Folin-Ciocalteu reagent
Άλλες μέθοδοι	TOSC (total oxidant scavenging capacity) <sup>128</sup>
	Inhibition of Briggs-Rauscher oscillation reaction <sup>129</sup>
	Chemiluminescence <sup>130</sup>
	Electrochemiluminescence <sup>131</sup>

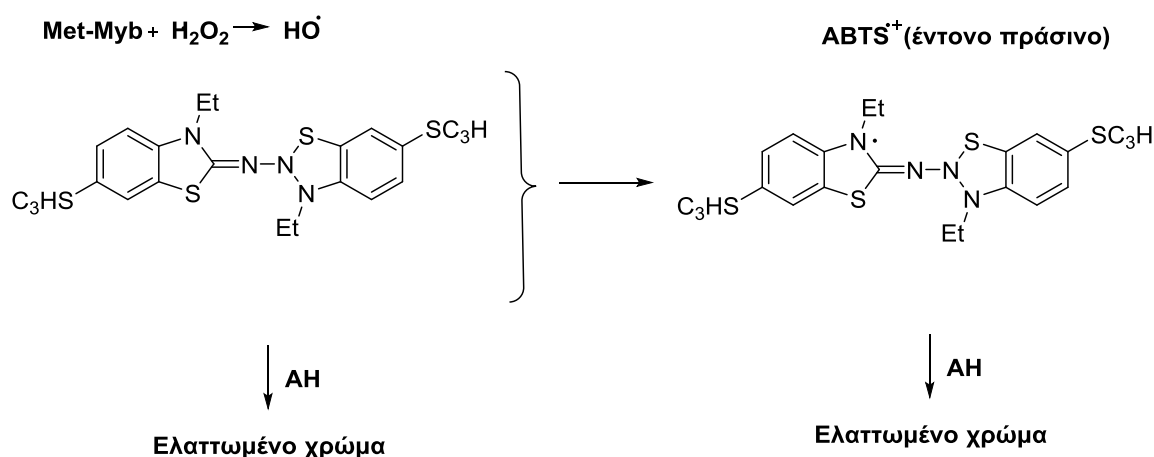
Όπως παρατηρείται, υπάρχει μια πληθώρα δοκιμασιών για την μελέτη της αντιοξειδωτικής δράσης. Κάποιες από τις σημαντικότερες περιγράφονται εν συντομία παρακάτω:

**TEAC/ABTS<sup>•+</sup>** – Trolox equivalent antioxidant capacity/2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) assay

Η δοκιμασία του 2,2-αζινοδι-(3-αιθυλοβενζοθειαζολινο-6-σουλφονικού οξέος) [2,2-azinobis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid), ABTS] βασίζεται στην αναστολή της απορρόφησης της κατιοντικής ρίζας ABTS<sup>•+</sup> από αντιοξειδωτικά, η οποία παρουσιάζει μια κύρια κορυφή απορρόφησης στα 415 nm. Όταν το Trolox (υδατοδιαλυτό ανάλογο της βιταμίνης E) χρησιμοποιείται ως πρότυπη ένωση, η μέθοδος ονομάζεται TEAC (Trolox

Equivalent Antioxidant Capacity).<sup>111</sup> Η μέθοδος TEAC μετρά την αντιοξειδωτική δράση ως την ικανότητα των αντιοξειδωτικών που δοκιμάζονται (AH) να μειώσουν το χρώμα του ABTS<sup>•+</sup> (α) με αναχαίτιση της αρχικής οξειδωσης και αποτροπή της παραγωγής ABTS<sup>•+</sup> ή (β) με άμεση αντίδραση με το ABTS<sup>•+</sup>. Με βάση αυτές τις δύο προσεγγίσεις, χρησιμοποιούνται δύο τρόποι για αυτήν την δοκιμασία.<sup>132</sup>

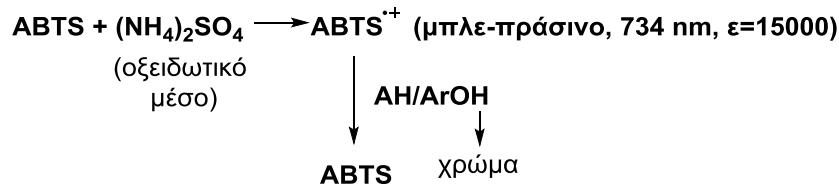
Η πρωτότυπη μέθοδος (TEAC 1) χρησιμοποιούσε την μυοσφαιρίνη-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> για να δημιουργήσει ρίζες υδροξυλίου, οι οποίες οξειδώνουν το ABTS στην έγχρωμη μορφή του ως ελεύθερη ρίζα, ABTS<sup>•+</sup>. Στην συνέχεια η ρίζα ABTS<sup>•+</sup> αντιδρά με τα αντιοξειδωτικά (AH) και η αντίδραση αυτή έχει ως αποτέλεσμα την απώλεια του πράσινου χρώματος της ρίζας (Σχήμα 18).<sup>133,134</sup>



**Σχήμα 18:** Κύρια αντίδραση της αντιοξειδωτικής μεθόδου TEAC 1.

Ωστόσο, η αντίδραση είναι διφορούμενη επειδή τα αντιοξειδωτικά (AH) μπορούν να αντιδράσουν και με την αρχική οξειδωτική ρίζα HO<sup>•</sup>, και με την μυοσφαιρίνη και με το ABTS<sup>•+</sup>, προκαλώντας μια υπερεκτίμηση της αντιοξειδωτικής δράσης.<sup>135</sup>

Στην μέθοδο TEAC-II, για να ξεπεραστούν τα προβλήματα της διπλής αντίδρασης, το ABTS<sup>•+</sup> μπορεί να παραχθεί άμεσα σε υψηλή απόδοση χρησιμοποιώντας υπερθειικό κάλιο ως οξειδωτικό μέσο.<sup>136</sup> Τα αντιοξειδωτικά, στη συνέχεια, αντιδρούν μόνο με την ρίζα ABTS<sup>•+</sup> και το χρώμα ελαττώνεται από μία μόνο αντίδραση (Σχήμα 19):



**Σχήμα 19: Μοναδική αντίδραση της αντιοξειδωτικής μεθόδου TEAC-II.**

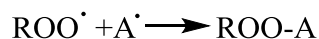
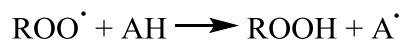
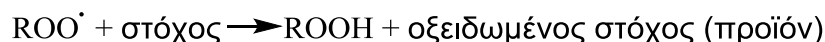
Για την αντίδραση, κλάσματα από το διάλυμα του  $\text{ABTS}^{++}$  είναι αραιωμένα, έτσι ώστε να έχουν απορρόφηση  $\sim 1.0$  στα 734 nm, η οποία καταγράφεται ως σημείο εκκίνησης. Το αντιοξειδωτικό προστίθεται και αναμιγνύεται και η πτώση στην απορρόφηση ( $A_0 - A_f$ ) συνήθως μετράται μετά από συγκεκριμένες περιόδους αντίδρασης που κυμαίνονται από λεπτά μέχρι και ώρες. Η αντιοξειδωτική δράση αναφέρεται ως ισοδύναμο Trolox συγκρίνοντας την τιμή ( $A_0 - A_f$ ) του αντιοξειδωτικού που δοκιμάζεται με την τιμή ( $A_0 - A_f$ ) των προτύπων Trolox ή ως η συγκέντρωση του αντιοξειδωτικού που δίνει την ίδια απόκριση όπως 1 mM Trolox.<sup>132</sup>

$$TEAC(\text{ABTS}) = \frac{(A_0 - A_f)_{\text{δείγμα}} - \text{τυφλό}}{(A_0 - A_f)_{1\text{mMTrolox}} - \text{τυφλό}}$$

### **ORAC** – Oxygen Radical Absorbance Capacity

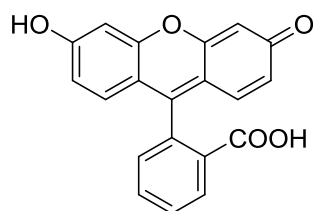
Η δοκιμασία ORAC αναπτύχθηκε αρχικά από τους Glazer και Ghiselli.<sup>137,138</sup> Η μέθοδος τελειοποιήθηκε και εφαρμόστηκε σε εκτεταμένες αναλύσεις εκατοντάδων τροφίμων από τον Prior και τους συνεργάτες του σε ερευνητικά εργαστήρια στο Υπουργείο Γεωργίας των Η.Π.Α.<sup>139,140,141,142,143</sup> και στο εμπόριο από τα εργαστήρια Brunswick (Wareham, MA, USA).

Η αντίδραση είναι απλή στην σύλληψη, αλλά πολύπλοκη στην πράξη. Οι ρίζες παράγονται με θέρμανση μιας ένωσης αζιδίου. Το αζίδιο αποσυντίθεται, ελευθερώνοντας αέριο άζωτο και αφήνοντας πίσω δύο ρίζες με επίκεντρο τον άνθρακα, τις  $\text{R}^\cdot$ . Με την παρουσία του οξυγόνου, η  $\text{R}^\cdot$  μετατρέπεται σχεδόν αμέσως σε δραστική υπεροξειδική ρίζα,  $\text{ROO}^\cdot$ , η οποία μπορεί είτε να επιτεθεί σε μόρια-στόχους που έχουν χρώμα ή φθορισμό, είτε να αντιδράσει με αντιοξειδωτικά (Σχήμα 20):<sup>132</sup>



**Σχήμα 20: Αντιδράσεις της μεθόδου ORAC.**

Ο ανταγωνισμός μεταξύ της αντίδρασης των στόχων και των αντιοξειδωτικών με το  $ROO^{\cdot}$  αποτελεί τη βάση της ανάλυσης. Η φλουορεσκεΐνη, ο πιο κοινός στόχος, είναι μια έντονα φθορίζουσα ένωση στην μητρική της μορφή, που όταν όμως δεσμεύεται από υπεροξειδικές ρίζες, ο φθορισμός της χάνεται (Σχήμα 21).<sup>132</sup> Ένα αντιοξειδωτικό επιβραδύνει την απώλεια φθορισμού με δέσμευση των  $ROO^{\cdot}$  μέσω μεταφοράς ατόμου υδρογόνου ή ριζική προσθήκη.



**Σχήμα 21: Δομή φλουορεσκεΐνης.**

Η αντίδραση παρακολουθείται από την καταγραφή του φθορισμού συναρτήσει του χρόνου.<sup>125</sup> Οι Cao και Prior<sup>144</sup> ποσοτικοποίησαν το επίπεδο της αντιοξειδωτικής προστασίας με μέτρηση της περιοχής κάτω από την καμπύλη (AUC) του δείγματος, που δοκιμάζεται, σε σύγκριση με εκείνη του τυφλού. Έτσι, αυτή η μέθοδος συνδυάζει, και την ποσοστιαία αναστολή και την διάρκεια αντίδρασης της  $ROO^{\cdot}$  με την αντιοξειδωτική ένωση, σε μια ενιαία ποσότητα. Σε αυτή τη δοκιμασία, η αντίδραση παρακολουθείται για παρατεταμένες περιόδους (> 30 λεπτά), απουσία και παρουσία αντιοξειδωτικών, και τα αποτελέσματα εκφράζονται ως μικρομοριακά (TR) ισοδύναμα Trolox (TE). Η ολοκληρωμένη καμπύλη απόκρισης λαμβάνεται με αφαίρεση της AUC του τυφλού από αυτή του δείγματος ( $AUC_{\text{δείγμα}} - AUC_{\text{τυφλό}}$ ). Η σχετική τιμή ORAC ενός δείγματος ( $\mu\text{M TE}$ ) υπολογίζεται από την σχέση:<sup>124</sup>

$$ORAC = \frac{(AUC_{\text{δείγμα}} - AUC_{\text{τυφλό}})}{(AUC_{TR} - AUC_{\text{τυφλό}})} * \frac{[TR]}{[\text{δείγμα}]}$$

## 2.5 Αντιοξειδωτική μέθοδος DPPH

### 2.5.1 Εισαγωγή

Η μέθοδος δέσμευσης ελευθέρων ριζών της 2,2-διφαινυλο-1-πικρυλοϋδραζύλο (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl, DPPH) ρίζας προσφέρει την πρώτη προσέγγιση για την αξιολόγηση της αντιοξειδωτικής δράσης μιας ένωσης, ενός εκχυλίσματος ή άλλων βιολογικών πηγών. Είναι η απλούστερη μέθοδος αντιοξειδωτικής δράσης, όπου η υποψήφια ένωση (ή το εκχύλισμα) αναμιγνύεται με διάλυμα DPPH και η απορρόφηση καταγράφεται μετά από ένα καθορισμένο χρονικό διάστημα ή καθ' όλη την διάρκεια της αντίδρασης. Ωστόσο, με την εξέλιξη των ενόργανων τεχνικών, η μέθοδος έχει υποστεί μέχρι σήμερα διάφορες τροποποιήσεις για να ανταπεξέλθει στις απαιτήσεις της εποχής, αν και η κεντρική ιδέα παραμένει ίδια σε όλες αυτές.<sup>145</sup>

Η μέθοδος αυτή αναπτύχθηκε από τον Blois το 1958 με στόχο να καθορίσει την αντιοξειδωτική δράση με τη χρήση μιας σταθερής ελεύθερης π-ρίζας, DPPH (C<sub>18</sub>H<sub>12</sub>N<sub>5</sub>O<sub>6</sub>, Mol. Wt. = 394.33). Η δοκιμασία βασίζεται στη μέτρηση της ικανότητας δέσμευσης των αντιοξειδωτικών προς την ρίζα αυτή. Το ασύζευκτο ηλεκτρόνιο του ατόμου αζώτου του DPPH μετατρέπεται, με λήψη ενός ατόμου υδρογόνου από τα αντιοξειδωτικά, στην αντίστοιχη υδραζίνη (Σχήμα 22):<sup>146</sup>

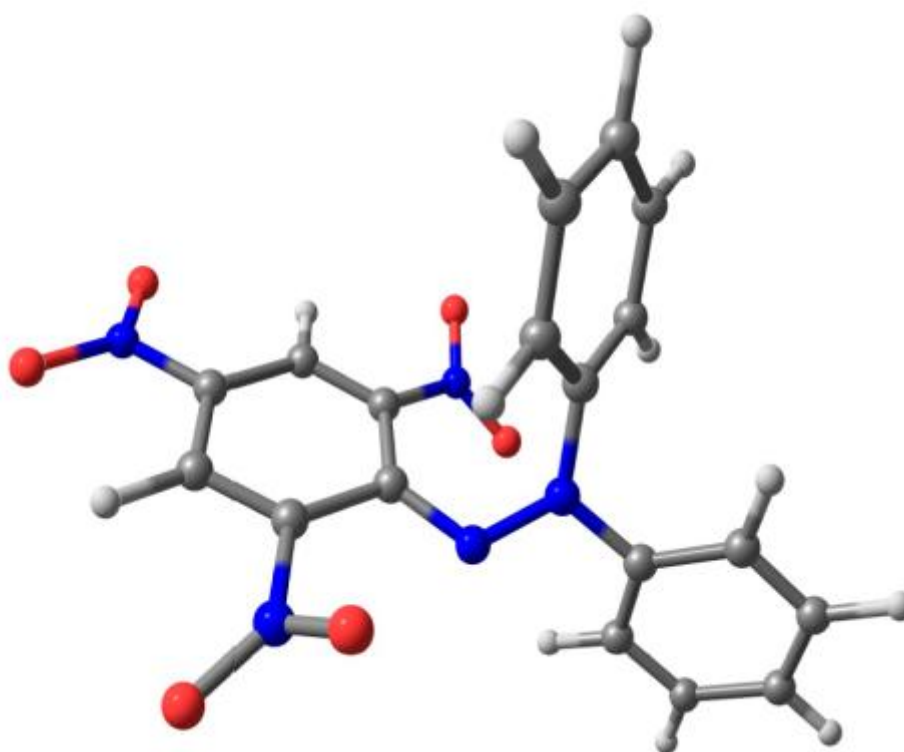


**Διφαινυλοπικρυλοϋδραζύλο ρίζα (ελεύθερη ρίζα)    Διφαινυλοπικρυλοϋδραζίνη (μη ριζική ένωση)**

**Σχήμα 22: Η ελεύθερη ρίζα DPPH και η μη ριζική υδραζίνη της.**

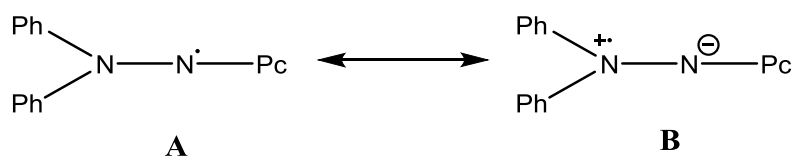
## 2.5.2 Η χημεία της ρίζας DPPH

Το DPPH πλησιάζει τα 100 χρόνια από την ανακάλυψή του (1922) από τους Goldschmidt και Renn. Πρόκειται για μια έγχρωμη και ιδιαίτερα σταθερή ρίζα. Γενικά, οι υδραζύλο ρίζες ( $R_2NNR'$ ) δεν είναι σταθερές.<sup>147</sup> Η σταθερότητα της ρίζας DPPH οφείλεται κυρίως στην στεreoχημική παρεμπόδιση<sup>148,149</sup> γύρω από το άτομο του δισθενούς N (Εικόνα 1) και σε μικρότερο βαθμό, στην επίδραση «push-pull» (ή captodative επίδραση)<sup>150</sup> που ασκείται από την διφαινυλάμινο ομάδα (δότης ηλεκτρονίων) και την πίκρυλο ομάδα (δέκτης ηλεκτρονίων) στο δισθενές N.



Εικόνα 1: Δομή της ρίζας DPPH. Τα κόκκινα, μπλε και γκρι χρώματα αντιπροσωπεύουν τα οξυγόνα, άζωτα και ανθρακοάτομα, αντίστοιχα.

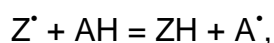
Αυτή η επίδραση σταθεροποιεί την δομή **B** (Σχήμα 23):



Σχήμα 23: Δομές συντονισμού της ρίζας DPPH.

Μετρήσεις EPR έχουν δείξει ότι οι πυκνότητες ιδιοστροφορμής στα δύο υδραζύλο άτομα N είναι μεγάλες και ουσιαστικά ίσες.<sup>148</sup> Έτσι, οι δύο δομές **A** και **B** συμβάλλουν ουσιαστικά ισοδύναμα στην κατανομή της ιδιοστροφορμής. Οι επιπτώσεις του διαλύτη στην κατανομή ιδιοστροφορμής είναι πολύ περιορισμένες.<sup>151</sup>

Το DPPH χαρακτηρίζεται ως μια σταθερή ελεύθερη ρίζα λόγω του απεντοπισμού του ελεύθερου ηλεκτρονίου του πάνω στο μόριο ως σύνολο, έτσι ώστε το μόριο δεν διμερίζεται, όπως οι περισσότερες ρίζες. Ο απεντοπισμός παρέχει επίσης το βαθύ μωβ χρώμα,<sup>145</sup> με απορρόφηση που εξαρτάται από τον διαλύτη, αν και κατά μέσο όρο μετράται στα 515 περίπου nm. Η μείωση της συγκέντρωσης της ρίζας με μεταφορά ατόμου υδρογόνου από μία ένωση που είναι δότης ατόμων H (αντιοξειδωτικό) και με τον σχηματισμό της υδραζίνης DPPH-H, προκαλεί την αλλαγή του μωβ χρώματος του διαλύματος σε υποκίτρινο.<sup>147</sup> Λαμβάνει χώρα, δηλαδή, η παρακάτω κύρια αντίδραση (AH=δότης ατόμου υδρογόνου και Z<sup>•</sup> = ρίζα DPPH):



όπου ZH είναι η μη ριζική μορφή του DPPH και A<sup>•</sup> είναι η ελεύθερη ρίζα που παράγεται στο πρώτο βήμα. Η ρίζα A<sup>•</sup> υποβάλλεται σε περαιτέρω αντιδράσεις που ελέγχουν τη συνολική στοιχειομετρία.<sup>145</sup>

Η ρίζα DPPH αντιδρά επιλεκτικά με ρίζες και δότες ατόμων H σε διαφορετικά σημεία αντίδρασης. Αν και οι ρίζες συνήθως προσβάλλουν τους φαινολικούς δακτυλίους (ή τον πικρυλικό δακτύλιο), οι δότες ατόμων H αντιδρούν με το δισθενές άτομο N. Ο περιορισμένος χώρος γύρω από το N αποτρέπει την προσθήκη δυσκίνητων ριζών σε αυτή την θέση. Οι δότες ατόμων H μπορούν να πλησιάσουν το N και μπορούν να απελευθερώσουν το άτομο H μόνο με το σχηματισμό της υδραζίνης DPPH-H (Σχήμα 22).<sup>147</sup>

### 2.5.3 Πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα της μεθόδου DPPH

Η μέθοδος DPPH είναι μία ταχεία, απλή και φθηνή μέθοδος, που χρησιμοποιείται ευρέως για την μέτρηση της ικανότητας των ενώσεων να δρουν ως παγιδευτές ελευθέρων ριζών ή δότες ατόμων υδρογόνου, και για την αξιολόγηση της αντιοξειδωτικής δράσης των τροφίμων. Μπορεί επίσης να χρησιμοποιηθεί για την ποσοτικοποίηση των αντιοξειδωτικών σε πολύπλοκα

βιολογικά συστήματα, καθώς και για στερεά και για υγρά δείγματα. Αυτή η μέθοδος είναι εύκολη και μπορεί να μετρήσει την ολική αντιοξειδωτική ικανότητα<sup>152</sup> και την δυνατότητα δέσμευσης ελευθέρων ριζών των φρούτων και των χημικών ενώσεων.<sup>153</sup>

Η μέθοδος DPPH είναι η μοναδική μέθοδος που μπορεί να πραγματοποιήσει την αντίδραση της ρίζας με το δείγμα σε διάλυμα μεθανόλης/νερού, το οποίο διευκολύνει την εκχύλιση των αντιοξειδωτικών ενώσεων από το δείγμα. Αντιοξειδωτικές αναλύσεις με άλλες μεθόδους μπορεί να περιορίζονται σε ενώσεις που είναι διαλυτές μόνο σε επιλεγμένους διαλύτες.<sup>145</sup> Το πλεονέκτημα της μεθόδου είναι ότι το DPPH αφήνεται να αντιδράσει με το σύνολο του δείγματος και δίνεται επαρκής χρόνος για να επιτραπεί στα μόρια DPPH να αντιδρούν αργά ακόμα και με αδύναμα αντιοξειδωτικά.<sup>152</sup> Η μέθοδος DPPH μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την εξέταση τόσο υδρόφιλων, όσο και λιπόφιλων αντιοξειδωτικών.<sup>125</sup>

Η δοκιμασία DPPH θεωρείται μια έγκυρη, ακριβής, εύκολη και οικονομική μέθοδος για την αξιολόγηση της δυνατότητας παγίδευσης ριζών, δεδομένου ότι η ριζική ένωση είναι σταθερή. Η ερευνητική ομάδα του Sanchez-Moreno<sup>154,155,156</sup> πρότεινε το 1998 μια νέα μεθοδολογία για την αξιολόγηση της αντιοξειδωτικής δράσης στην μέθοδο του DPPH. Θεώρησε ότι η αντιοξειδωτική δράση δεν επηρεάζεται **μόνο** από την συγκέντρωση του αντιοξειδωτικού, αλλά **και** από τον χρόνο της αντίδρασης δέσμευσης της ρίζας για να φτάσει στο πλατώ του χρόνου.

Επίσης, η αντιοξειδωτική δράση μετράται σε θερμοκρασία περιβάλλοντος, έτσι ώστε ο κίνδυνος θερμικής αποικοδόμησης των μορίων, που δοκιμάζονται, να εξαλείφεται.<sup>157</sup>

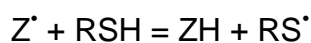
Παρόλα αυτά η μέθοδος έχει κάποια μειονεκτήματα. Καταρχήν, η ρίζα DPPH αλληλεπιδρά με άλλες ρίζες και η καμπύλη απόκρισης-χρόνου για την επίτευξη της σταθερής κατάστασης, δεν είναι γραμμική για τις διαφορετικές αναλογίες αντιοξειδωτικών/DPPH.<sup>154,158</sup> Επιπλέον, το DPPH είναι ευαίσθητο σε ορισμένες βάσεις Lewis και τύπους διαλυτών, καθώς και στο οξυγόνο.<sup>159</sup> Επίσης, είναι ελάχιστα διαλυτό σε άπολους διαλύτες, ενώ σε μια ποικιλία οργανικών διαλυτών δείχνει αξιοσημείωτη διαλυτότητα. Στο νερό, η



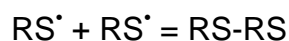
διαλυτότητά του σε θερμοκρασία περιβάλλοντος είναι πρακτικά μηδενική.<sup>147</sup> Εκτός απ' αυτά, η απορρόφηση του DPPH σε μεθανόλη και ακετόνη μειώνεται στο φως.<sup>160</sup> Τέλος, η μέθοδος DPPH δεν είναι χρήσιμη για την μέτρηση της αντιοξειδωτικής δράσης του πλάσματος, διότι οι πρωτεΐνες καταβυθίζονται στο αλκοολικό μέσο αντίδρασης, το οποίο και προτιμάται στην μέθοδο αυτή.<sup>145</sup>

#### 2.5.4 Πρωτότυπη Μέθοδος

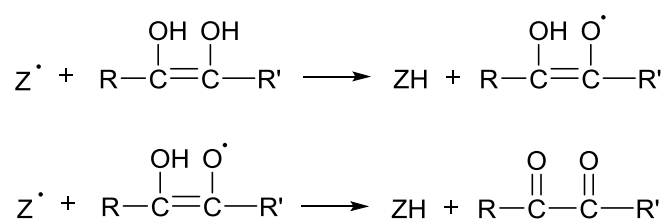
Η μέθοδος DPPH εισήχθη από τον Blois το 1958, χρησιμοποιώντας την κυστεΐνη ως αντιοξειδωτικό μοντέλο. Αν η ρίζα DPPH είναι το Z' και το μόριο της κυστεΐνης το RSH, η αρχική αντίδραση είναι:



Η ελεύθερη ρίζα RS', στην συνέχεια, αντιδρά με ένα άλλο μόριο, που παράγεται από μια παράλληλη αντίδραση της παραπάνω:



Η αντίδραση οδηγεί, έτσι, στην παρατηρούμενη αναγωγή δύο μορίων DPPH από δύο μόρια κυστεΐνης, δηλαδή πρόκειται για στοιχειομετρία 1:1. Ωστόσο, εάν το μόριο έχει δύο γειτονικά εσωτερικά συνδεδεμένες θέσεις αφαίρεσης υδρογόνου (π.χ. ασκορβικό οξύ), τότε μπορεί να γίνει μια περαιτέρω αντίδραση αφαίρεσης υδρογόνου μετά την πρώτη (Σχήμα 24):



**Σχήμα 24:** Αντιδράσεις DPPH με μόρια που έχουν δύο ομάδες υδροξυλίου.

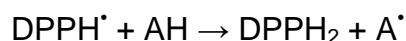
Αυτή η πορεία αντίδρασης οδηγεί σε στοιχειομετρία 2:1 για το DPPH και τις ενώσεις τύπου ασκορβικού οξέος.<sup>145</sup>

#### 2.5.5 Μηχανισμός της αντίδρασης με το DPPH

Διάφορες χημικές ενώσεις αντιδρούν με το DPPH με βάση τον μηχανισμό HAT, αν και δεν μπορεί να αποκλειστεί ο μηχανισμός ET, ειδικά σε διαλύτες που ιονίζουν τις φαινόλες, καθώς και σε αλκαλικά pH. Στην πραγματικότητα,

συνήθως στις αντιδράσεις με DPPH, λαμβάνει χώρα μία μίξη των μηχανισμών HAT και ET.

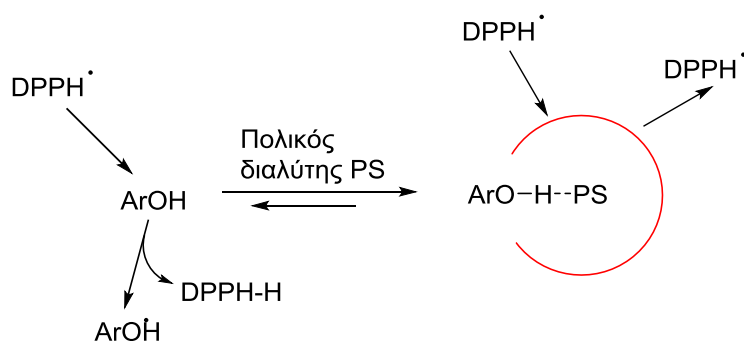
Όταν ένα αντιοξειδωτικό προστίθεται σε διάλυμα DPPH, πραγματοποιείται η εξής αντίδραση (όπου AH = αντιοξειδωτικό):<sup>124</sup>



Γενικά, η αντίδραση προχωράει σχετικά γρήγορα μόνο όταν ικανοποιούνται τρεις από τους επόμενους περιορισμούς: (α) ο δεσμός AH είναι σχετικά ασθενής (χαμηλή ενθαλπία διάσπασης δεσμού, BDE), (β) η ρίζα A<sup>•</sup> σταθεροποιείται με συντονισμό και (γ) το A είναι ετεροάτομο (O, N, S).<sup>147</sup>

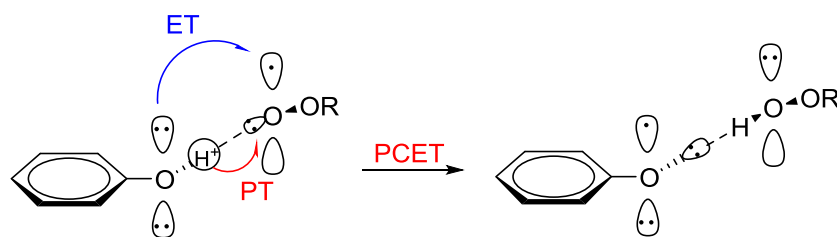
Υπάρχουν ισχυρές εξαρτήσεις διαλύτη και pH στις μικτής λειτουργίας (HAT και ET) αντιδράσεις DPPH. Σε διαλύτες που ιονίζουν τις φαινόλες, το ποσοστό του ET, κατά κύριο λόγο, ελέγχεται από το σχηματισμό φαινολικού ανιόντος με συνακόλουθη αύξηση του pH.<sup>124</sup> Στους πολικούς διαλύτες, ο μηχανισμός HAT ουσιαστικά παρεμποδίζεται λόγω της δυσκολίας μεταφοράς ενός ατόμου μιας διαμοριακά δεσμευμένης φαινόλης (δηλαδή, ArO-H...PS).<sup>161</sup> Οι διαλύτες που σχηματίζουν ισχυρούς δεσμούς H, εμποδίζουν τον μηχανισμό HAT.<sup>162</sup>

Οι φαινόλες σχηματίζουν συμπλόκα μέσω δεσμών H με τους πολικούς διαλύτες, ArOH-PS, στα οποία το άτομο H γίνεται απροσπέλαστο λόγω της παρουσίας δύο ογκωδών ετεροατόμων γύρω του. Λόγω αυτής της στερεοχημικής παρεμπόδισης, οι ελεύθερες ρίζες δεν μπορούν να αντιδράσουν με τα δεσμευμένα μόρια και αντιδρούν μόνο με τα ελεύθερα κλάσματα ArOH (Σχήμα 25):<sup>147</sup>



**Σχήμα 25:** Στους πολικούς διαλύτες, οι ελεύθερες ρίζες μπορούν να αποσπαστούν ένα άτομο υδρογόνου μόνο από τα ελεύθερα κλάσματα ArOH.

Επιπλέον, ο σχηματισμός ενός δεσμού H, στο σύμπλεγμα προ-αντίδρασης, με την συμμετοχή των ArOH και ενός μονήρους ζεύγους της ρίζας ROO<sup>•</sup> (ArO-H ...: ÖOR) δημιουργεί μια ασυνήθιστη ανταλλαγή ατόμου H (Σχήμα 26):



**Σχήμα 26: Μηχανισμός PCET στην αντίδραση μιας πολυφαινόλης με μία υπεροξειδική ρίζα.**

Σε αυτό το σύμπλοκο, στην πραγματικότητα, μόνο ο πυρήνας (πρωτόνιο) του ατόμου H κινείται προς την ρίζα, αφήνοντας πίσω του το δεσμικό ηλεκτρόνιο. Η κίνηση του πρωτονίου διεγείρει μια ταυτόχρονη μεταφορά ηλεκτρονίων από το μονήρες ζεύγος του ArOH προς το SOMO της ρίζας, αποδίδοντας το τελικό σύμπλεγμα (ArO<sup>-</sup>: ... H-ÖOR) σε ένα μόνο βήμα.<sup>147</sup> Ο μηχανισμός αυτός είναι γνωστός ως «proton-coupled electron-transfer» (PCET) γιατί συμβαίνει ένα μόνο στάδιο για την μεταφορά ενός e<sup>-</sup> και ενός H<sup>+</sup> από τον δότη (πολυφαινόλη) στον δέκτη (ρίζα) χωρίς τον σχηματισμό ιόντων.<sup>163</sup> Πολυφαινόλες με ηλεκτρονιακά πλούσιους υποκαταστάτες είναι ισχυροί δότες ατόμων H και μπορούν να δεσμεύσουν γρήγορα ρίζες μέσω του μηχανισμού PCET.

Εναλλακτικοί μηχανισμοί περιλαμβάνουν τον μηχανισμό ET, ακολουθούμενο από τον HAT σε διακριτά στάδια με τον σχηματισμό υψηλών ενεργειακά ενδιαμέσων.<sup>147</sup> Οι αντιδράσεις DPPH με μηχανισμό ET είναι πολύ γρήγορες, ενώ αυτές με μηχανισμό HAT είναι πιο αργές.<sup>164</sup>

Το 2004 ο Foti<sup>165</sup> και οι συνεργάτες του κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι στις αντιδράσεις DPPH<sup>•</sup> + ArOH που διεξάγονται σε μεθανόλη ή αιθανόλη, το στάδιο που καθορίζει την ταχύτητα αποτελείται από έναν γρήγορο μηχανισμό ET από τα φαινοξειδικά ανιόντα στο DPPH, αφήνοντας την πολύ αργή μεταφορά H<sup>•</sup> από τα ουδέτερα ArOH στα μόρια DPPH σε πολύ αργό ρυθμό λόγω του ισχυρού χαρακτήρα του διαλύτη για τον σχηματισμό δεσμών H.

Οξέα και βάσεις (που μπορεί να εισάγονται από διάφορες πηγές) μπορούν επίσης να επηρεάσουν την ταχύτητα, διότι η αύξηση του pH αυξάνει δραματικά την ταχύτητα αντίδρασης με την συνέργεια του ιονισμού της φαινόλης, ενώ τα οξέα Brønsted επιβραδύνουν σημαντικά την αντίδραση. Γι' αυτό οι αντιδράσεις DPPH συνιστάται να διεξάγονται σε μεθανόλη ή υδατικά μίγματα μεθανόλης επειδή η μεθανόλη είναι η αλκοόλη που στηρίζει καλύτερα τον ιονισμό της φαινόλης (και κατ' επέκταση τον μηχανισμό ET της οξειδωσης των φαινολών).<sup>124</sup>

### 2.5.6 Μεθοδολογία μέτρησης

Η μέθοδος DPPH εφαρμόζεται συνήθως με την παρακάτω διαδικασία: Διάλυμα DPPH (1.5 mL) σε μεθανόλη αναμιγνύεται με διάλυμα του δείγματος πολυφαινόλης (20  $\mu$ L) σε διάφορες συγκεντρώσεις. Στην συνέχεια, καταγράφονται οι τιμές της απορρόφησης καθ' όλη την διάρκεια της αντίδρασης (μέχρι να φτάσει σε σταθερή κατάσταση) σε σταθερό μήκος κύματος 516 nm. Κατά την μείωση της απορρόφησης, το χρώμα του διαλύματος μειώνεται.<sup>121</sup>

Υπάρχουν κάποια στοιχεία στη μέθοδο που απαιτούν ιδιαίτερη προσοχή:

- Προτιμάται η χρήση φθηνών πλαστικών κυψελιδών «μιας χρήσεως», οι οποίες δεν καταστρέφονται από μεθανόλη ή αιθανόλη, για την δοκιμασία.<sup>157</sup>
- Η μέθοδος λειτουργεί εξίσου καλά με μεθανόλη ή αιθανόλη. Ωστόσο, η χρήση άλλων συστημάτων διαλυτών, όπως και σκέτα εκχυλίσματα σε νερό ή ακετόνη, φαίνεται να δίνουν χαμηλότερες τιμές απορρόφησης.<sup>166</sup>
- Το σύστημα θα πρέπει να διατηρείται σε ένα pH που κυμαίνεται από 5.0 έως 6.5.<sup>167</sup>
- Η αρχική συγκέντρωση DPPH θα πρέπει να δίνει τιμές απορρόφησης μικρότερες από 1.0 (50 έως 100  $\mu$ M).<sup>145</sup>
- Ένας χρόνος αντίδρασης των 30 λεπτών ακολουθήθηκε από τον Kim και τους συνεργάτες του.<sup>168</sup> Ωστόσο, μικρότερος χρόνος αντίδρασης 5 και 10 λεπτών έχει επίσης αναφερθεί.<sup>169,170</sup> Καθώς η ταχύτητα της αντίδρασης ποικίλλει ευρέως μεταξύ των υποστρωμάτων,<sup>157</sup> η

καλύτερη πρακτική είναι να ακολουθηθεί η αντίδραση μέχρι την ολοκλήρωση («πλατώ χρόνου»)<sup>171,172</sup>

- Το διάλυμα του DPPH πρέπει κατά την αποθήκευση του να φυλλάγεται στην κατάψυξη και να μην έρχεται σε επαφή με το φως, καθώς η απορρόφηση του επηρεάζεται.

### **2.5.7 Επεξεργασία αποτελεσμάτων της μεθόδου**

Οι Brand-Williams<sup>158</sup> το 1995 και Bondet<sup>157</sup> το 1997 χρησιμοποίησαν τον όρο «EC<sub>50</sub>» (αποτελεσματική συγκέντρωση) (ή μερικές φορές IC<sub>50</sub>, συγκέντρωση αναστολής<sup>147</sup>) για την ερμηνεία των αποτελεσμάτων από την μέθοδο DPPH. Αυτός ορίζεται ως η συγκέντρωση του υποστρώματος που προκαλεί μείωση κατά 50% της αρχικής συγκέντρωσης του DPPH.

Στην παράμετρο αυτή, όσο ισχυρότερη είναι η αντιοξειδωτική δράση, τόσο μικρότερη είναι η τιμή της.<sup>145</sup> Όμως, η αντιοξειδωτική δράση είναι εξαρτώμενη και από τον χρόνο και η επίδραση αυτή μπορεί να ποικίλλει ανάμεσα στις ενώσεις. Συνήθως, αν αυξηθεί ο χρόνος αντίδρασης μπορεί να βελτιωθεί η αξιολόγηση μιας ένωσης και έτσι το τεστ μπορεί να προσαρμοστεί, και ένα ασθενές αντιοξειδωτικό να φαίνεται ως ισχυρό. Γενικά, αντιδράσεις μικρής διάρκειας είναι καλύτερες.<sup>173</sup> Η τιμή EC<sub>50</sub> δεν είναι κινητικός παράγοντας, παρά μια συγκέντρωση και γι'αυτό δεν μπορεί να εκφράσει πλήρως την αντιοξειδωτική δράση μιας ένωσης, γιατί η ικανότητα αυτή πρέπει να αντιπροσωπεύεται και από έναν κινητικό παράγοντα, όπως πρότεινε ο Foti το 2015.<sup>147</sup>

Το 1995 ο Brand-Williams<sup>158</sup> και οι συνεργάτες του χρησιμοποίησαν τον όρο «αντιοξειδωτική ισχύς» (antioxidant power, ARP), ο οποίος είναι ο αντίστροφος του EC<sub>50</sub>. Ως εκ τούτου, όσο μεγαλύτερη είναι η ARP, τόσο πιο αποτελεσματικό είναι το αντιοξειδωτικό.

### **2.5.8 Αντιδράσεις DPPH-πολυφαινολών και διαλύτες**

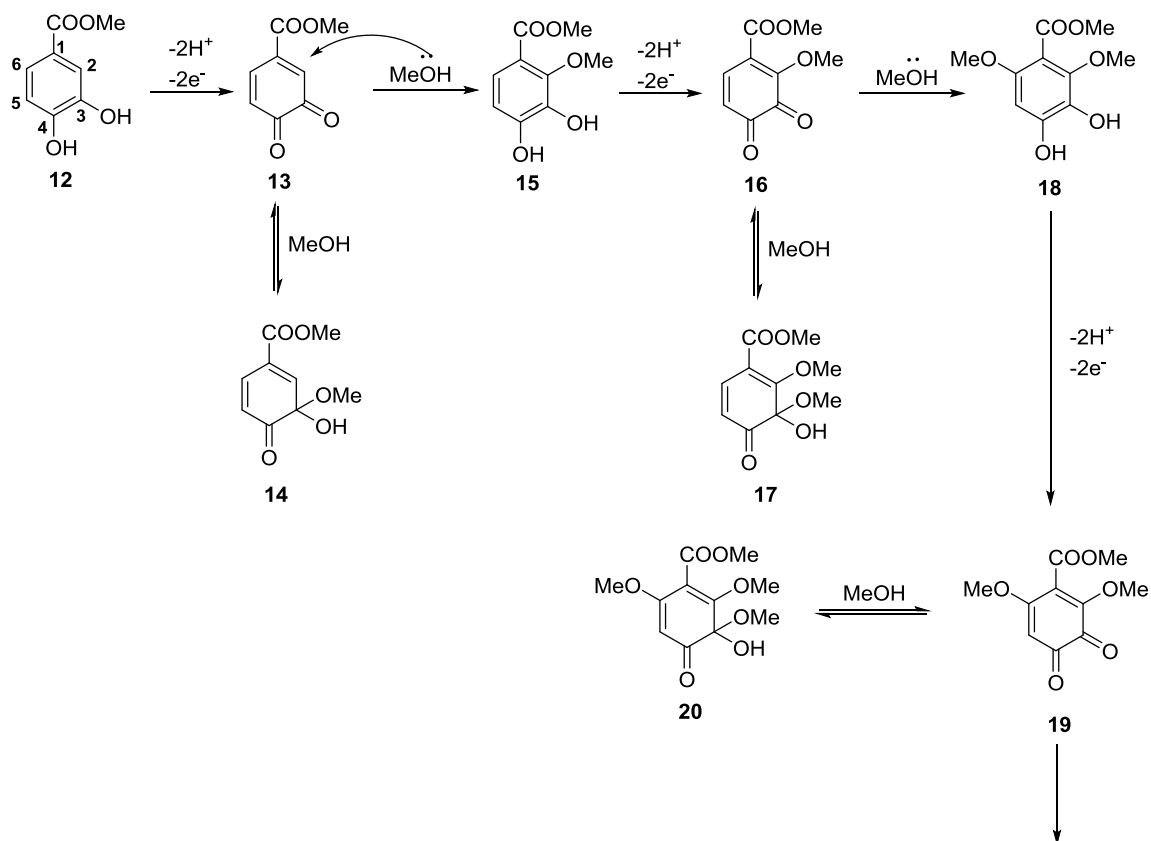
Μελέτες έχουν δείξει ότι ο μηχανισμός της αντιοξειδωτικής δράσης των πολυφαινολών διαφέρει όταν πρόκειται για αλκοολικούς και μη αλκοολικούς διαλύτες. Συγκεκριμένα, σε ακετόνη ή ακετονιτρίλιο, τα πολυφαινολικά οξέα (με μία μονάδα κατεχόλης) και οι εστέρες τους παγιδεύουν 2 ισοδύναμα ρίζας

για να δώσουν τις αντίστοιχες ο-κινόνες. Αντίθετα, σε αλκοολικούς διαλύτες, αντιδρούν ταχέως με περίπου 6 ισοδύναμα ρίζας.<sup>174</sup>

#### 2.5.8.1 Αλκοολικοί διαλύτες

Σε αλκοολικούς διαλύτες, τα πολυφαινολικά οξέα και οι εστέρες τους (με μία μονάδα κατεχόλης) αντιδρούν ταχέως με περίπου 5 ισοδύναμα ρίζας, με ταυτόχρονη μετατροπή στα αντίστοιχα παράγωγα ο-κινόνης, 3-ημιακετάλης<sup>175</sup> και προϊόντα προσθήκης της αλκοόλης στον C(2) (Σχήμα 27).<sup>174,176</sup> Προτάθηκε ότι η υψηλότερη αντιοξειδωτική δράση των πολυφαινολών στους αλκοολικούς διαλύτες, σε σύγκριση με εκείνη στους μη αλκοολικούς, οφείλεται στην αναγέννηση μιας αντίστοιχης δομής κατεχόλης μέσω μιας πυρηνόφιλης προσθήκης ενός μορίου αλκοόλης σε μια ενδιάμεση ο-κινόνη.<sup>176</sup> Επιπλέον, βρέθηκε ότι οι κατεχόλες που διαθέτουν ισχυρούς υποκαταστάτες που έλκουν ηλεκτρόνια σε ρ-θέση (εδώ στον C(1)) παρουσιάζουν υψηλή ικανότητα δέσμευσης της ρίζας DPPH σε αλκοολικούς διαλύτες, αφού υποκαταστάτες που έλκουν ηλεκτρόνια ενισχύουν την ηλεκτρονιοφιλία των ο-κινονών και ως εκ τούτου διευκολύνεται η πυρηνόφιλη προσθήκη ενός μορίου αλκοόλης σε ένα μόριο ο-κινόνης.<sup>177</sup>

Στην συνέχεια παρουσιάζεται η αλληλουχία των αντιδράσεων του μεθυλεστέρα του πρωτοκατεχοϊκού οξέος:



**Σχήμα 27: Μηχανισμοί δέσμευσης της ρίζας DPPH σε μεθανόλη για τον μεθυλεστέρα του πρωτοκατεχοϊκού οξέος.**

Ο μεθυλοπρωτοκατεχοϊκός εστέρας **12** δεσμεύει περίπου 6 ισοδύναμα DPPH σε MeOH.<sup>176</sup> Προηγουμένως, αναφέρθηκε ότι η ένωση **12** δεσμεύει 2 ισοδύναμα για να δώσει την αντίστοιχη ο-κινόνη **13** και ημιακετάλη **14**<sup>175</sup> και η επακόλουθη πυρηνόφιλη προσβολή ενός μορίου MeOH (προσθήκη Michael) στον C(2) της **13** παράγει την ένωση **15**, η οποία δεσμεύει επιπλέον 2 ισοδύναμα ρίζας για να δώσει την ο-κινόνη **16** και την ημιακετάλη **17**.<sup>176</sup> Ωστόσο, λαμβάνοντας υπόψη ότι η **12** απομακρύνει περισσότερα από 4 ισοδύναμα DPPH, οι **16** και **17** πρέπει να υποβληθούν σε περαιτέρω οξείδωση, με αποτέλεσμα τον σχηματισμό τελικά των ενώσεων **19** και **20**. Οι ενώσεις **19** και **20** είναι πιο σταθερές από τις μητρικές **13** και **14**, οπότε περαιτέρω πυρηνόφιλη προσθήκη MeOH στην **19** πιθανότατα δεν θα συμβεί. Συνοπτικά, δηλαδή, η ένωση **12** χρειάζεται 6 ισοδύναμα ρίζας για να σχηματίσει την **19**, οπότε μία δεύτερη προσθήκη αλκοόλης στην ένωση **16** για να παραχθεί η **18** μπορεί να είναι περιορισμένη. Επιπλέον, αφού η **18**

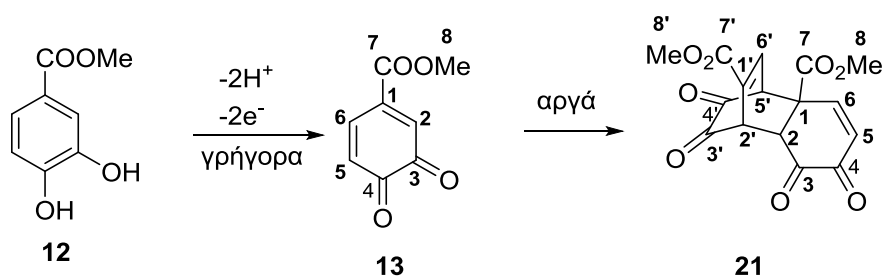
δεσμεύει μόνο 2 ισοδύναμα, η πυρηνόφιλη προσθήκη στην **19** πιθανότατα δεν θα πραγματοποιηθεί.<sup>174</sup>

Ο λόγος που προτιμάται η προσθήκη Michael της αλκοόλης στον C(2) της ένωσης **12**, είναι ότι αυτός ο άνθρακας έχει την μεγαλύτερη πυκνότητα ηλεκτρονίων LUMO.<sup>178</sup> Για τον ίδιο, επίσης, λόγο η δεύτερη πυρηνόφιλη προσθήκη γίνεται στον C(6).

Οι επιπλέον αυτές αντιδράσεις που λαμβάνουν χώρα στα αλκοολικά διαλύματα πολυφαινολικών ενώσεων, συνεισφέρουν στην αυξημένη αντιοξειδωτική δράση των ενώσεων αυτών.<sup>174</sup>

### 2.5.8.2 Μη αλκοολικοί διαλύτες

Στην περίπτωση των μη αλκοολικών διαλυτών (ακετόνη), έχει παρατηρηθεί ότι η ένωση **12** μετατρέπεται γρήγορα στην ένωση **13**,<sup>179</sup> η οποία στην συνέχεια διμερίζεται δίνοντας την ένωση **21** (Σχήμα 28):



Σχήμα 28: Αντιδράσεις του μεθυλεστέρα του πρωτοκατεχοϊκού οξέος και της ρίζας DPPH σε διάλυμα ακετόνης.

Φασματοσκοπικές μελέτες έδειξαν ότι η ένωση **21** αποτελεί ένα παράγωγο Diels-Alder της **13**.<sup>180</sup> Η σχετική στερεοχημεία της προσθήκης Diels-Alder εικάζεται ότι είναι exo.<sup>181</sup>

Πρέπει να τονιστεί ότι η διάρκεια ζωής της ένωσης **13** σε ακετόνη είναι αρκετά μεγάλη και γι' αυτό μπορεί να πραγματοποιηθεί ο διμερισμός. Όταν ο διαλύτης είναι μεθανόλη, η ένωση **13** αντιδρά εξαιρετικά γρήγορα για να δώσει περαιτέρω οξειδωτικές αντιδράσεις, οπότε η προσθήκη Diels-Alder δεν προλαβαίνει να λάβει χώρα.<sup>182</sup> Αυτό συμβαίνει γιατί η **13** (Σχήμα 27) παρουσιάζει μεγάλη δραστηριότητα για την πυρηνόφιλη προσβολή από το μόριο της αλκοόλης, οπότε προτιμάται από τον διμερισμό.<sup>180</sup>



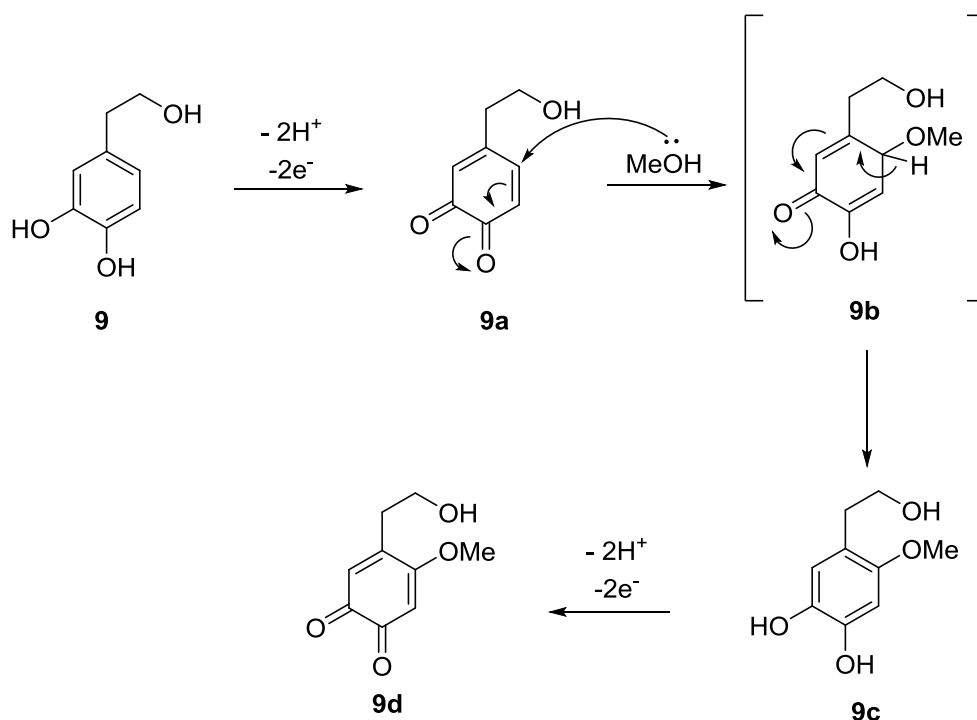
### 2.5.9 Επεξεργασία αποτελεσμάτων αντιοξειδωτικής δράσης πολυφαινολικών οξέων με τη μέθοδο DPPH

Όπως αναφέρθηκε πιο πάνω, το ποσοστό της αντιοξειδωτικής δράσης υπολογίζεται εύκολα από την μείωση της απορρόφησης, όμως εξαρτάται από τον χρόνο και την συγκέντρωση του αντιοξειδωτικού. Από την άλλη, η ημι-μέγιστη αποτελεσματική συγκέντρωση ( $EC_{50}$ ), που συχνά εκφράζεται ως  $g_{\text{αντιοξειδωτικού}}/kg_{\text{DPPH}}$ , συνήθως υπολογίζεται όταν το σύστημα φτάνει σε μία σταθερή κατάσταση και αντιπροσωπεύει το ποσοστό του αντιοξειδωτικού που απαιτείται για να αποσβέσει το αρχικό μισό ποσοστό του DPPH. Αυτή η παράμετρος ποσοτικοποιεί την συνολική ικανότητα δέσμευσης ριζών, αλλά δεν δίνει πληροφορίες σχετικά με την κινητική της διαδικασίας αυτής.<sup>183</sup>

Γι' αυτό, το 1998 ο Sanchez-Moreno και οι συνεργάτες του<sup>154</sup> εισήγαγαν την τιμή  $T_{EC_{50}}$ , η οποία είναι ο χρόνος που απαιτείται για να φτάσει την σταθερή κατάσταση, και την «αντιοξειδωτική αποδοτικότητα» (antioxidant efficacy, AE) ως συνδυασμό των  $EC_{50}$  και  $T_{EC_{50}}$ . Η AE ενός αντιοξειδωτικού ορίζεται από την σχέση:  $AE = 1 / (EC_{50} * T_{50})$ .

Το 2015 κατά την μελέτη της αντιοξειδωτικής δράσης παραγώγων πολυφαινολικών ενώσεων που φέρουν μονάδες κατεχόλης παρατηρήθηκε ότι, μία εξαιρετικά γρήγορη αρχική αντίδραση ακολουθείται από μία πολύ πιο αργή μείωση της απορρόφησης. Για να φτάσει η αντίδραση την σταθερή κατάσταση συνήθως χρειάστηκαν 60 λεπτά ή και περισσότερα, ενώ ο προσδιορισμός του ακριβή χρόνου  $T_{EC_{50}}$  αποδείχτηκε δύσκολος λόγω της πολύ αργής μεταβολής της απορρόφησης. Πρέπει να σημειωθεί ότι η πρώτη αντίδραση πραγματοποιούνταν πολύ γρήγορα (περίπου μετά από 2-3 λεπτά), ενώ για την δεύτερη η απορρόφηση μετρήθηκε μέχρι και για 2 ώρες.<sup>183</sup>

Ο Tassano και οι συνεργάτες του το 2015 υπέθεσαν ότι κατά την αντίδραση της υδροξυτυροσόλης **9** με την ρίζα DPPH πραγματοποιείται ο εξής πιθανός μηχανισμός για την δεύτερη αργή αντίδραση (Σχήμα 29):



**Σχήμα 29: Πιθανός μηχανισμός της δεύτερης αργής αντίδρασης της υδροξυτυροσόλης με το DPPH.**

Στον πιθανό μηχανισμό ύστερα από την γρήγορη οξείδωση (πρώτη αντίδραση) της κατεχόλης προς την *o*-βενζοκινόνη **9a**, η **9a** μπορεί να υποβληθεί σε μια προσθήκη Michael (δεύτερη αργή αντίδραση) από τα μόρια του διαλύτη (MeOH) και να αναγεννηθεί έτσι η μονάδα κατεχόλης στην ένωση **9c**, η οποία οξειδώνεται περαιτέρω από το DPPH προς την ένωση **9d**. Η ερευνητική ομάδα του Tassano επιβεβαίωσε μάλιστα τον σχηματισμό των ενώσεων **9a** και **9d**, μελετώντας την αντίδραση της **9** με DPPH σε διαλύτη μεθανόλη και αναλύοντας το μίγμα της αντίδρασης με φασματοσκοπία  $^1\text{H}$  NMR. Στο φάσμα  $^1\text{H}$  NMR του crude της αντίδρασης παρατηρήθηκαν εκτός από τις κορυφές των πρωτονίων του DPPH και οι κορυφές λόγω της χημικής μετατόπισης των πρωτονίων των ενώσεων **9a** και **9d**.<sup>183</sup>

Έτσι σύμφωνα με αυτή τη μελέτη, μια πιο αντιπροσωπευτική μέθοδος της αντιοξειδωτικής δράσης των πολυφαινολών που φέρουν μονάδες κατεχόλης θα πρέπει να περιλαμβάνει τις εξής παραμέτρους:

- MR = μοριακή αναλογία φαινολικής ένωσης/DPPH
- $t_1$  = τέλος της αρχικής γρήγορης αντίδρασης
- $t_2$  = τέλος της δεύτερης αργής αντίδρασης (σταθερή κατάσταση)

- $RSA = \text{ικανότητα δέσμευσης ρίζας} = [(A_{\text{τυφλού}} - A_{(t_1 \text{ ή } t_2)}) / A_{\text{τυφλού}}] * 100$
- $StR = \text{στοιχειομετρική αναλογία} = \frac{n\text{mol}_{DPPH\text{καταναλωμένα}}}{n\text{mol}_{\text{αντιοξειδωτικού\_που\_υπάρχουν}}} = \%RSA / (MR * 100)$
- $EC_{50}$ : υπολογίζεται, κάνοντας το διάγραμμα των %RSA στους χρόνους  $t_2$  των εκάστοτε συγκεντρώσεων με τις αντίστοιχες συγκεντρώσεις τους, έτσι ώστε να σχηματιστεί όσο το δυνατόν πιο ευθεία γραμμή. Έπειτα, από την εξίσωση της ευθείας, υπολογίζεται η συγκέντρωση, όπου %RSA = 50.

Δεδομένου ότι οι ενώσεις της παρούσας εργασίας φέρουν επίσης μία ή δύο μονάδες κατεχόλης, κρίθηκε σκόπιμο να ακολουθηθεί η ίδια μεθοδολογία και μέτρηση παραμέτρων.

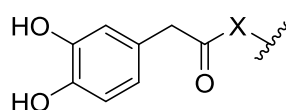
## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3

### ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Το 3,4-διυδροξυφαινυλοξικό οξύ (DOPAC) είναι ένα φαινολικό οξύ, το οποίο παρουσιάζει ποικίλες βιολογικές δράσεις, συμπεριλαμβανομένης και της αντιοξειδωτικής. Καθώς, όμως, πρόκειται για μια ιδιαίτερα πολική ένωση, παρουσιάζει μειωμένη διαλυτότητα σε λιπιδικό περιβάλλον, όπως για παράδειγμα στις κυτταρικές μεμβράνες, οπότε αδυνατεί να δράσει ως αποτελεσματικός αντιοξειδωτικός παράγοντας στις λιπιδικές διπλοστιβάδες.

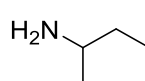
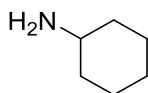
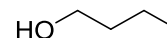
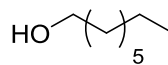
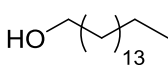
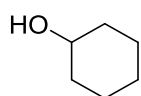
Σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν η σύνθεση παραγώγων του DOPAC, τα οποία θα διατηρούσαν μεν την καλή αντιοξειδωτική δράση της μητρικής ένωσης, αλλά θα χαρακτηρίζονταν και από βελτιστοποιημένες φυσικοχημικές ιδιότητες, όπως αυξημένη λιποφιλικότητα και μειωμένη πολικότητα.

- Πρώτος στόχος ήταν η σύνθεση παραγώγων του DOPAC και συγκεκριμένα εστέρων και αμιδίων, χρησιμοποιώντας ποικίλες αλκοόλες και αμίνες:



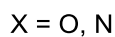
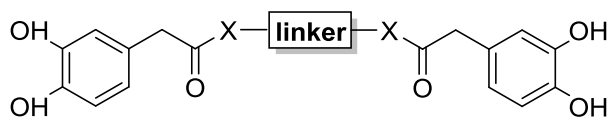
X = O, N

Οι αλκοόλες και οι αμίνες που χρησιμοποιήθηκαν ήταν:

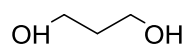
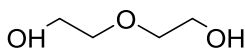
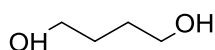


Επίσης, ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσίασε η ιδέα, να συζευκτούν δύο μόρια του οξέος DOPAC σε ένα μόριο μέσω ενός συνδέσμου (linker), καθώς δύο μονάδες κατεχόλης πιθανότατα να παρουσίαζαν καλύτερη αντιοξειδωτική δράση. Ως σύνδεσμοι θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν διαφορετικής φύσης ενώσεις με χαρακτηριστικές ομάδες που έλκουν ηλεκτρονικό νέφος και διαφορετικά μήκη αλυσιδών.

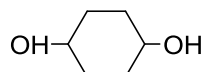
- Δεύτερος στόχος, λοιπόν, ήταν η σύνθεση των ενώσεων:



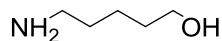
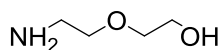
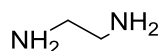
Σαν σύνδεσμοι χρησιμοποιήθηκαν οι ενώσεις:



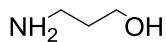
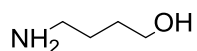
**Διόλες:**



**Διαμίνες:**



**Αμινοαλκοόλες:**



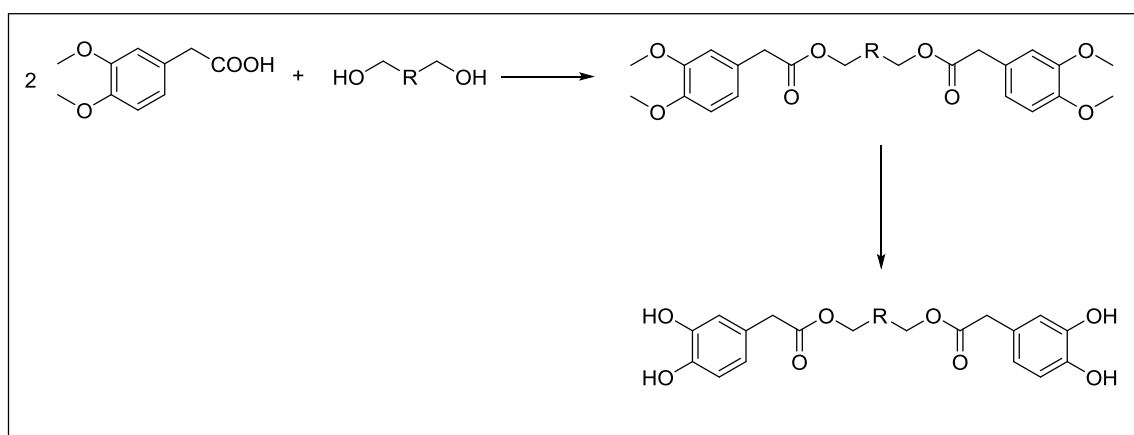
Τελευταίος στόχος ήταν η μελέτη της αντιοξειδωτικής δράσης των ενώσεων που χρησιμοποιήθηκαν και η εξαγωγή συμπερασμάτων για την επίδραση των διαφόρων παραγόντων σε αυτή.

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4

### ΣΥΝΘΕΣΗ ΠΟΛΥΦΑΙΝΟΛΙΚΩΝ ΠΑΡΑΓΩΓΩΝ

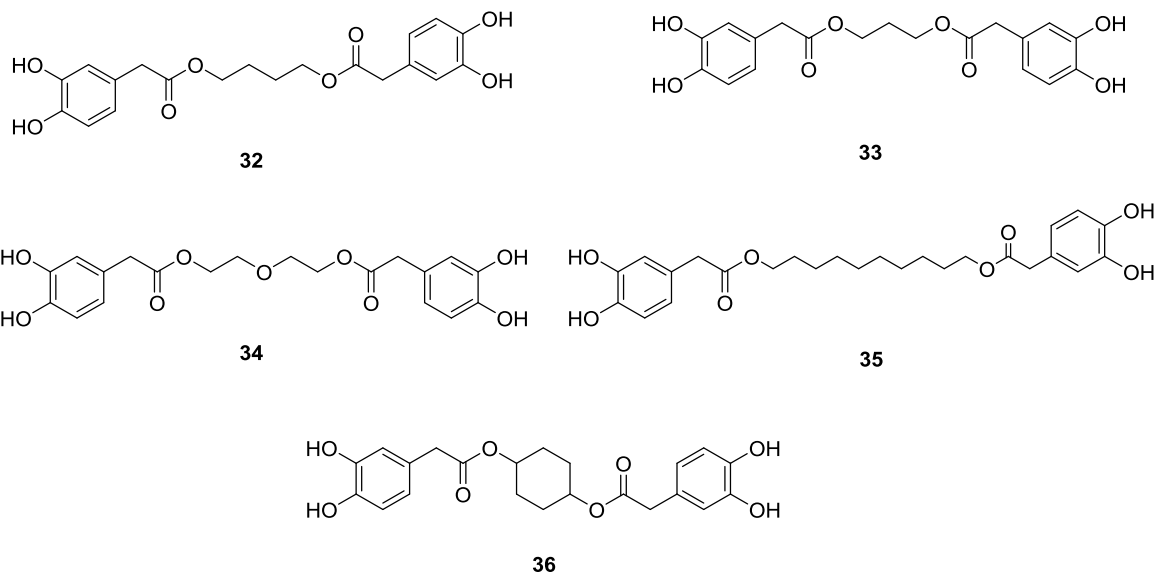
Στην παρούσα εργασία συντέθηκαν πολυφαινολικοί μονοεστέρες και διεστέρες, μονοαμίδια και διαμίδια και αμιδικοί εστέρες. Το βασικό υπόστρωμα σε όλες τις συνθετικές πορείες για την σύνθεση των παραπάνω ενώσεων ήταν το 3,4-διυδροξυφαινυλοξικό οξύ.

#### 4.1 Συνθετική πορεία πολυφαινολικών διεστέρων



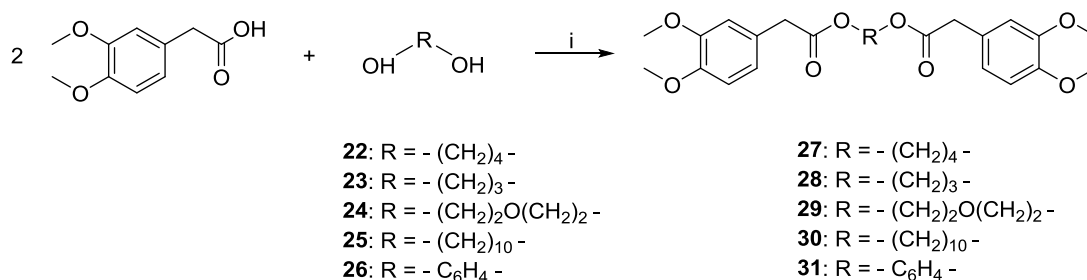
Σχήμα 30: Γενική μέθοδος παρασκευής διεστέρων.

Οι ενώσεις που παρασκευάστηκαν με αυτήν την μέθοδο (Σχήμα 30) είναι οι εξής (Σχήμα 31):



**Σχήμα 31: Διεστέρες που παρασκευάστηκαν.**

Αρχικά, πραγματοποιείται εστεροποίηση με μια αντίδραση διπλής υποκατάστασης των διολών **22**, **23**, **24**, **25**, **26** από το προστατευμένο οξύ, 3,4-διμεθοξυφαινυλοξικό οξύ, σύμφωνα με την μέθοδο σύζευξης με EDC.HCl,<sup>184</sup> υδροχλωρικό N'-αιθυλοκαρβοδιιμίδιο με χρήση του καταλύτη DMAP 10%,<sup>185</sup> 4-(N,N-διμεθυλαμινο)πυριδίνη και προκύπτουν οι προστατευμένοι διεστέρες **27**, **28**, **29**, **30**, **31** (Σχήμα 32):



**i. EDC.HCl, DMAP 10%, ξηρό CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, r.t., 24h.**

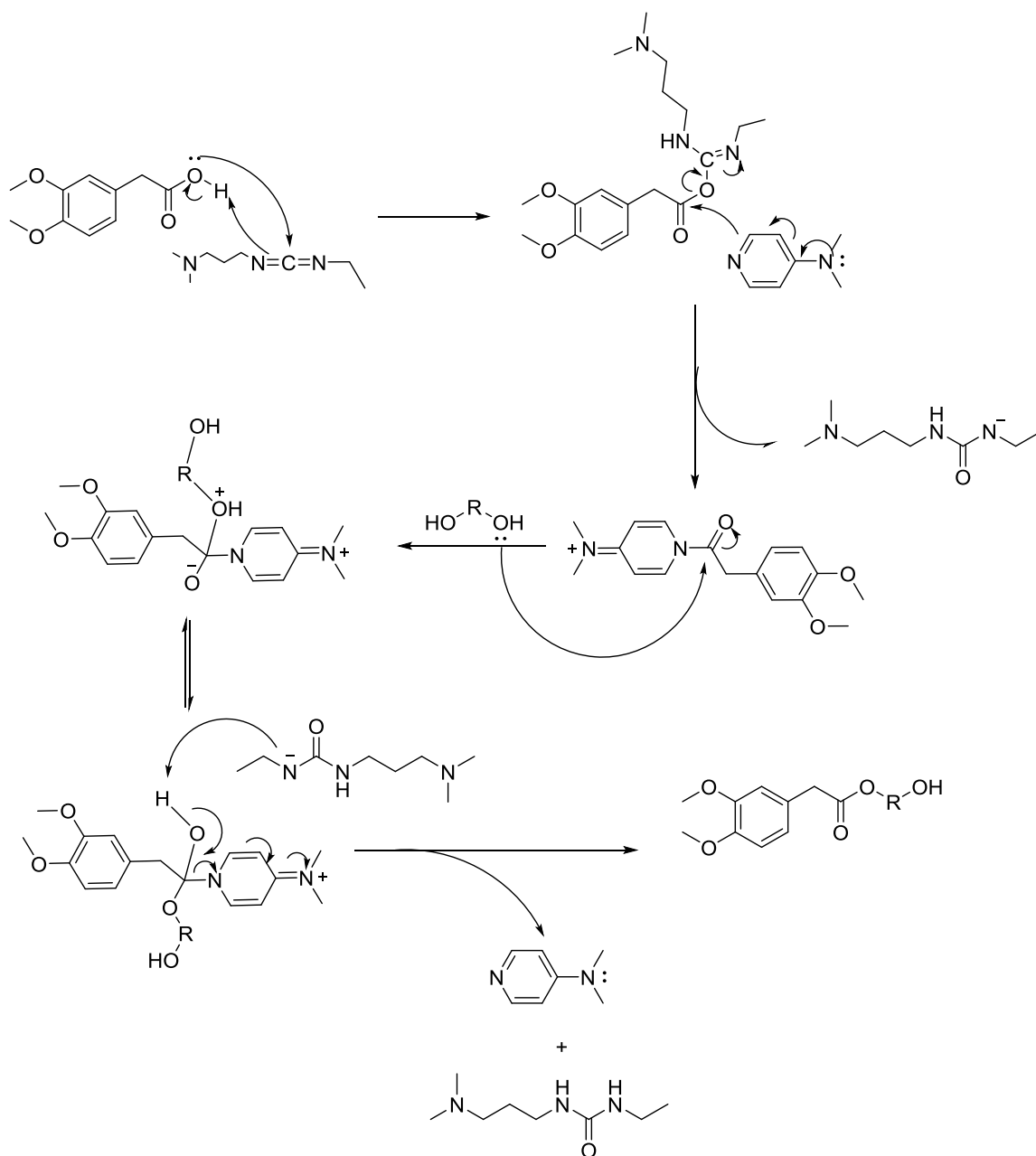
**Σχήμα 32: Γενική αντίδραση εστεροποίησης διολών με το 3,4-διμεθοξυφαινυλοξικό οξύ.**

Στις αντιδράσεις εστεροποίησης προτιμάται ως αντιδραστήριο σύζευξης το EDC.HCl, διότι όντας υδατοδιαλυτό καθιστά εξαιρετικά εύκολη την απομάκρυνση τόσο του ίδιου, όσο και της παραγόμενης ουρίας που προκύπτει από την αντίδραση (Σχήμα 33), μόνο με μια εκχύλιση με υδατικό διάλυμα κατά τον καθαρισμό του μίγματος της αντίδρασης. Πρέπει, επίσης, να σημειωθεί ότι η προσθήκη του πρέπει να γίνει στους 0 °C.

Το DMAP είναι ένα εξαιρετικός καταλύτης για τις αντιδράσεις εστεροποίησης, ο οποίος δύναται επίσης να απομακρυνθεί πολύ εύκολα από το μίγμα της αντίδρασης με εκχύλιση με όξινο αντιδραστήριο (π.χ. HCl 0.6 N).

Στον πιθανό μηχανισμό της αντίδρασης θεωρείται ότι ο καταλύτης DMAP λειτουργεί σαν άκυλο αντιδραστήριο μεταφοράς.<sup>185</sup> Επειδή η αλκοόλη είναι λιγότερο πυρηνόφιλη από το DMAP και η αντίδραση μεταξύ μιας αλκοόλης και του ενδιάμεσου της Ο-ακυλο ισουρίας που παράγεται από το οξύ και το EDC είναι αρκετά αργή, με την συμμετοχή του DMAP αυτό το βήμα μπορεί να επιταχυνθεί. Στην συνέχεια φαίνεται πως γίνεται η πρώτη υποκατάσταση του οξέος στην διόλη. Η δεύτερη υποκατάσταση μπορεί να γίνει με τον ίδιο τρόπο:

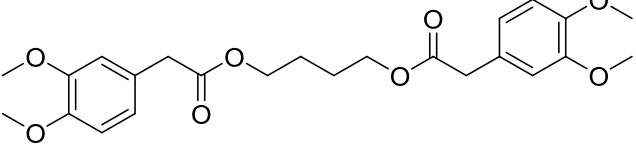
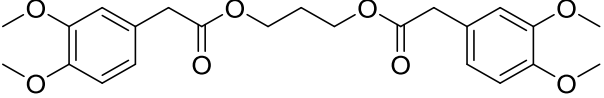
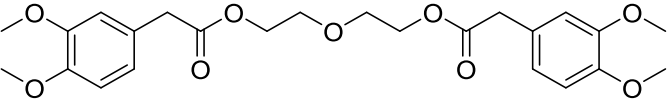
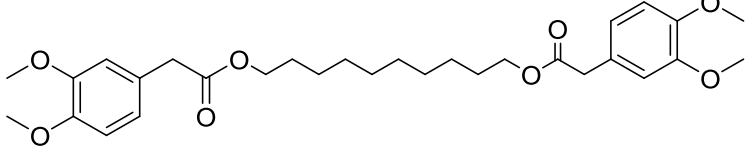
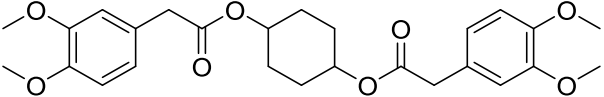




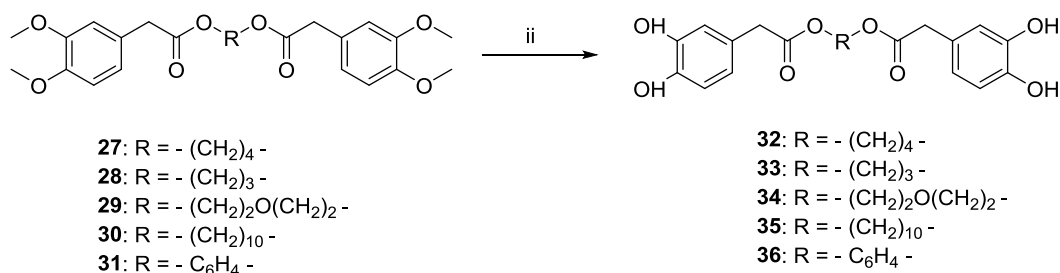
**Σχήμα 33: Πιθανός μηχανισμός της εστεροποίησης της διόλης με το 3,4-διμεθοξυφαινυλοξικό οξύ.**

Η ποσότητα του οξέος που δεν αντέδρασε απομακρύνεται από το μίγμα κατά τον καθαρισμό του, με εκχύλιση με βασικό διάλυμα (NaHCO<sub>3</sub>), ενώ πραγματοποιούνται επίσης εκχυλίσεις με HCl και νερό για την απομάκρυνση του καταλύτη, του αντιδραστήριου σύζευξης και της παραγώμενης ουρίας. Τέλος, το προϊόν της αντίδρασης παραλαμβάνεται με χρωματογραφία στήλης χρησιμοποιώντας κατάλληλο σύστημα έκλουσης. Οι αποδόσεις των διεστέρων που συντέθηκαν παρουσιάζονται στον Πίνακα 6:

Πίνακας 6: Οι προστατευμένοι διεστέρες που παρασκευάστηκαν και οι αποδόσεις τους.

Προστατευμένος Διεστέρας	Απόδοση
 <p style="text-align: center;"><b>27</b></p>	88%
 <p style="text-align: center;"><b>28</b></p>	37%
 <p style="text-align: center;"><b>29</b></p>	97%
 <p style="text-align: center;"><b>30</b></p>	92%
 <p style="text-align: center;"><b>31</b></p>	84%

Οι μεθόξυ ομάδες των παραγώγων **27**, **28**, **29**, **30**, **31** στην συνέχεια αποπροστατεύτηκαν με χρήση του αντιδραστήριου  $\text{BF}_3 \cdot \text{SMe}_2$ , σύμπλοκο τριφθορίδιου του βορίου με διμεθυλοθειοαιθέρα (boron trifluoride-methyl sulfide complex), οπότε και προκύπτουν οι απροστάτευτοι διεστέρες **32**, **33**, **34**, **35** και **36** (Σχήμα 34):



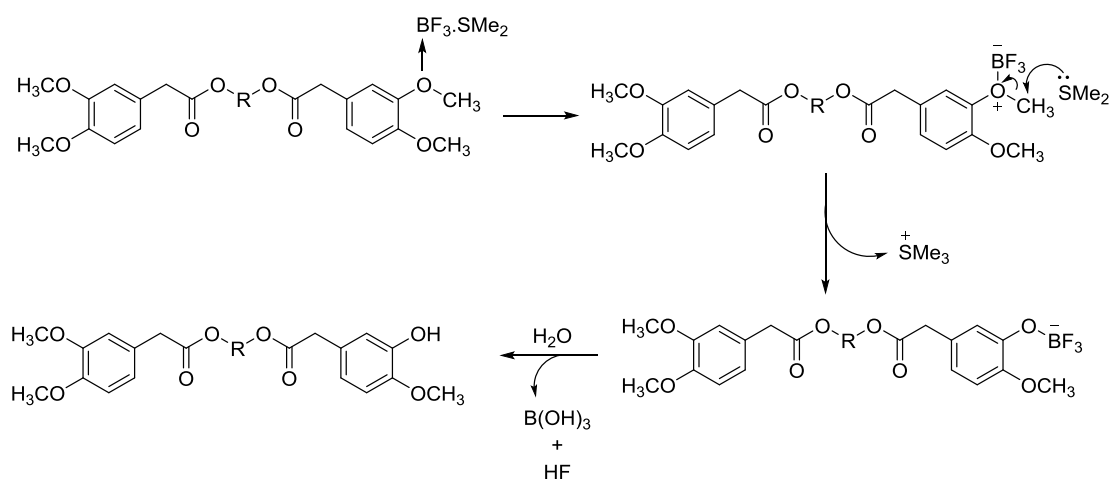
ii. BF<sub>3</sub>.SMe<sub>2</sub>, ξηρό CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, r.t., 24h.

**Σχήμα 34:** Γενική αντίδραση αποπροστασίας των φαινολικών υδροξυλίων.

Συνήθως, για τις αντιδράσεις αποπροστασίας των υδροξυλίων των φαινολών χρησιμοποιείται το τριβρωμιούχο βόριο BBr<sub>3</sub> (boron tribromide), ενώ οι αναφορές για χρήση του BF<sub>3</sub>.SMe<sub>2</sub> είναι ελάχιστες.<sup>186,187,188</sup> Σε αυτές τις αντιδράσεις δεν χρησιμοποιήθηκε το BBr<sub>3</sub>, καθώς πρόκειται για ένα εξαιρετικά δραστικό αντιδραστήριο, το οποίο απαιτεί ιδιαίτερες προφυλάξεις (-78°C, αδρανή ατμόσφαιρα) και χρησιμοποιείται συνήθως για την αποπροστασία ενώσεων που δεν έχουν άλλες δραστικές ομάδες.

Γι' αυτό, προτιμήθηκε το BF<sub>3</sub>.SMe<sub>2</sub>, που είναι πιο ήπιο αντιδραστήριο. Το αντιδραστήριο πρέπει να βρίσκεται σε μεγάλη περίσσεια (για κάθε μεθόξυ ομάδα απαιτούνται 10 ισοδύναμα) και η προσθήκη του απαιτεί το μίγμα της αντίδρασης να είναι στους 0°C. Επιπλέον, μετά το πέρας της αντίδρασης απαιτείται η προσθήκη νερού ή μεθανόλης στο μίγμα για να καταστραφεί η περίσσεια.

Στον πιθανό μηχανισμό της αποπροστασίας, αρχικά το τριφθοριούχο βόριο του συμπλόκου του αντιδραστηρίου θα δράσει ως οξύ κατά Lewis προσβάλλοντας το οξυγόνο της μεθόξυ ομάδας. Ως αποτέλεσμα θα ενεργοποιηθεί ο αιθέρας και η πυρηνόφιλη προσβολή του μεθυλίου της μεθόξυ ομάδας από το διμεθυλοσουλφίδιο θα γίνει πιο εύκολη (Σχήμα 35):

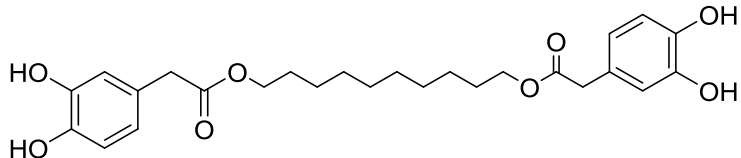
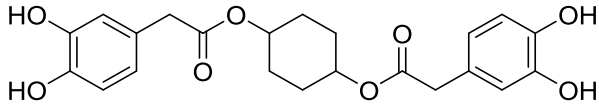


**Σχήμα 35:** Πιθανός μηχανισμός αποπροστασίας των φαινολικών υδροξυλίων.

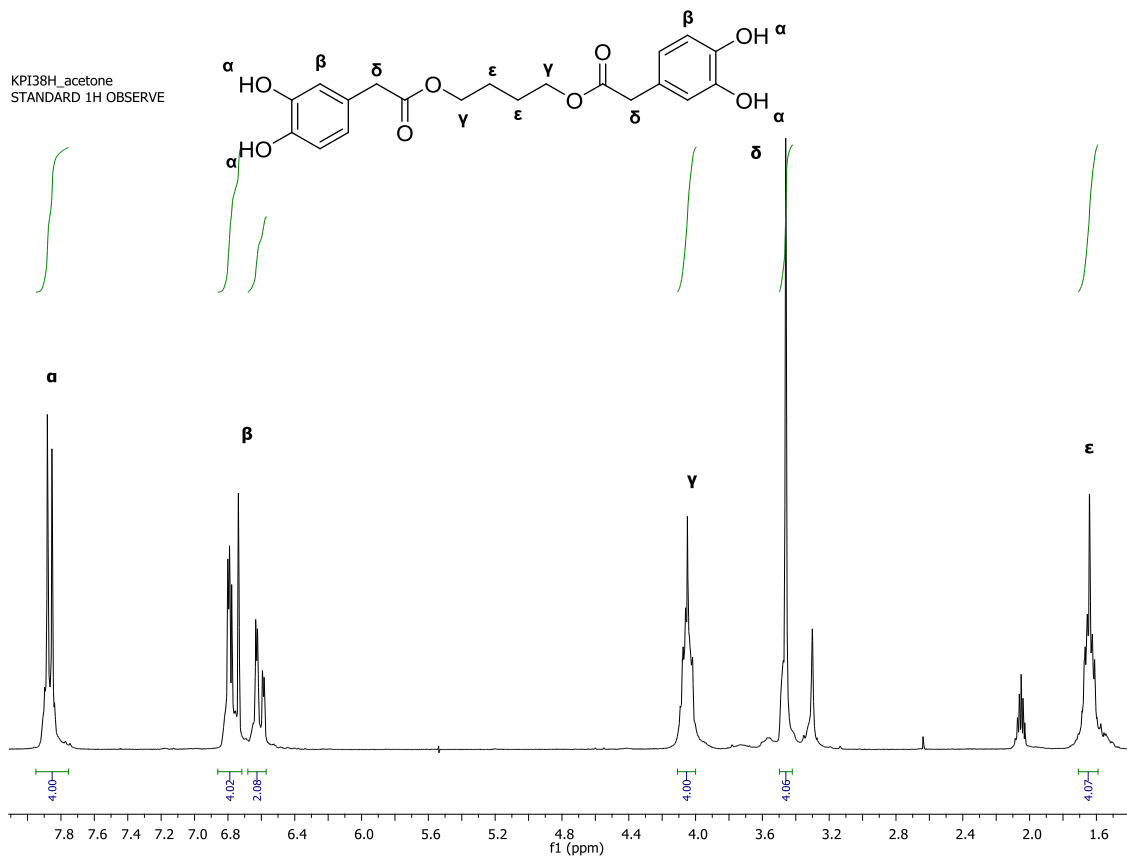
Μετά το πέρας της αντίδρασης, στο μίγμα προστίθεται περίπου 1 mL MeOH ή H<sub>2</sub>O για να σταματήσει η αντίδραση και να καταστραφεί η περίσσεια του αντιδραστήριου. Στην συνέχεια πραγματοποιείται εκχύλιση με κορεσμένο διάλυμα NaCl, καθώς το τελικό προϊόν είναι σχετικά υδατοδιαλυτό. Τελικά, οι αποπροστατευμένοι διεστέρες παραλαμβάνονται με χρωματογραφία στήλης με τις αποδόσεις που φαίνονται στον Πίνακα 7:

**Πίνακας 7:** Οι διεστέρες που παρασκευάστηκαν και οι αποδόσεις τους.

Αποπροστατευμένος Διεστέρας	Απόδοση
<p style="text-align: center;"><b>32</b></p>	46%
<p style="text-align: center;"><b>33</b></p>	16%
<p style="text-align: center;"><b>34</b></p>	23%

 <p style="text-align: center;"><b>35</b></p>	69%
 <p style="text-align: center;"><b>36</b></p>	18%

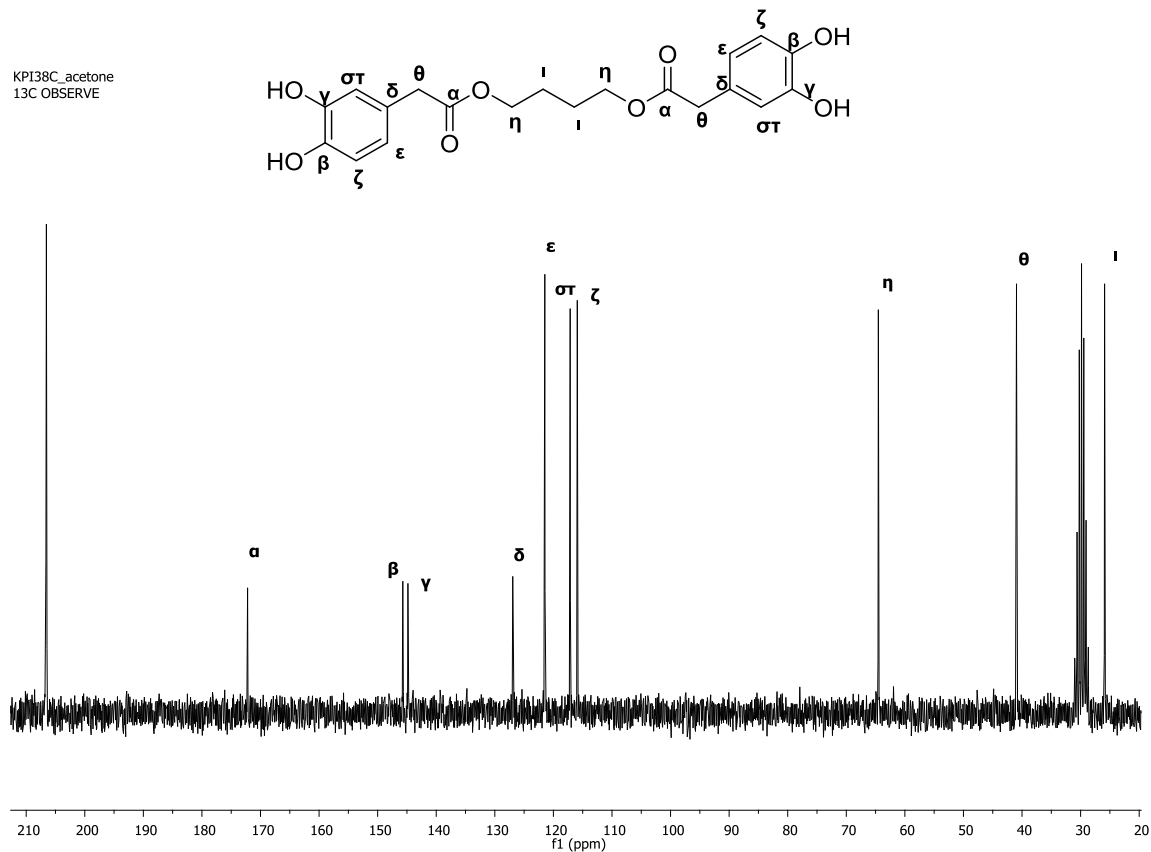
Στα επόμενα σχήματα, παρατίθενται τα φάσματα  $^1\text{H}$  και  $^{13}\text{C}$  πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού του τελικού προϊόντος **32**. Σύμφωνα με το φάσμα  $^1\text{H}$  NMR (Σχήμα 36) στην περιοχή των 7.93-7.78 ppm εμφανίζεται μια πολλαπλή κορυφή που οφείλεται στα 4 πρωτόνια ( $\alpha$ ) των φαινολικών υδροξυλίων, ενώ στα 6.78-6.61 ppm συντονίζονται τα αρωματικά πρωτόνια ( $\beta$ ) του μορίου ως δύο πολλαπλές κορυφές. Στα 4.09-4.00 ppm παρατηρούνται τα μεθυλένια ( $\gamma$ ) με μια πολλαπλή κορυφή και στα 3.46 ppm συντονίζονται τα  $\alpha$ -καρβονυλικά πρωτόνια ( $\delta$ ) της ένωσης ως μια απλή κορυφή. Τέλος, τα ενδιάμεσα πρωτόνια ( $\epsilon$ ) της αλειφατικής αλυσίδας εντοπίζονται από τα 1.74 έως τα 1.53 ppm ως μια πολλαπλή κορυφή.



**Σχήμα 36: Φάσμα  $^1\text{H}$  NMR της ένωσης 32 σε δευτεριωμένη ακετόνη.**

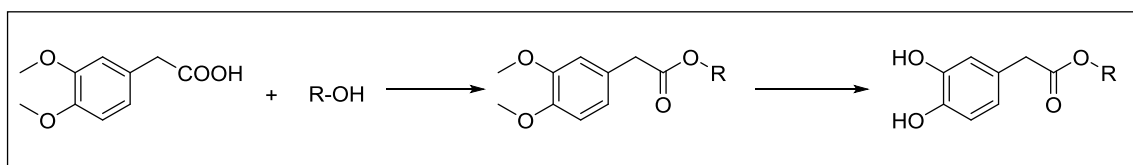
Συνεχίζοντας με το φάσμα  $^{13}\text{C}$  NMR της ίδιας ένωσης, που δίνεται στο Σχήμα 37, παρατηρούμε στα 172.2 ppm τις χημικές μετατοπίσεις των ανθράκων των δύο καρβονυλίων (**α**). Στα 145.7-115.9 ppm εμφανίζονται τα σήματα των ανθράκων του αρωματικού δακτυλίου, ενώ στα 64.5 ppm συντονίζονται οι εστερικοί άνθρακες (**η**). Οι α-άνθρακες του καρβονυλίου (**θ**) μετατοπίζονται στα 40.9 ppm και οι άνθρακες (**ι**) της αλειφατικής αλυσίδας στα 25.9 ppm.

KPI38C\_acetone  
13C OBSERVE



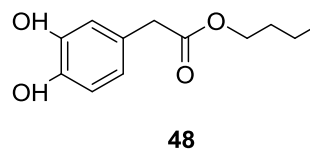
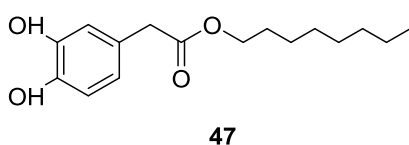
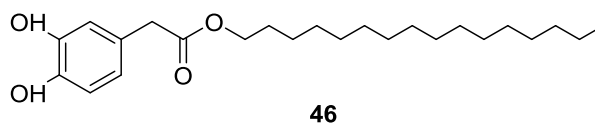
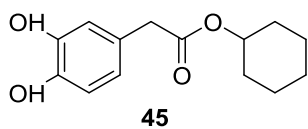
Σχήμα 37: Φάσμα  $^{13}\text{C}$  NMR της ένωσης 32 σε δευτεριωμένη ακετόνη.

## 4.2 Συνθετική πορεία πολυφαινολικών μονοεστέρων



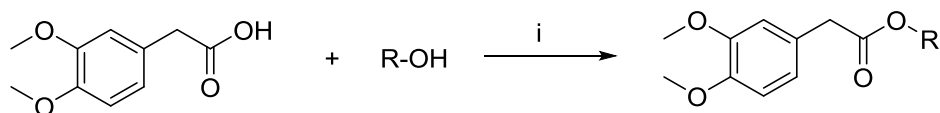
Σχήμα 38: Γενική συνθετική πορεία μονοεστέρων.

Οι ενώσεις που συντέθηκαν με αυτή την μέθοδο (Σχήμα 38) είναι οι ακόλουθες (Σχήμα 39):



Σχήμα 39: Μονοεστέρες που παρασκευάστηκαν.

Χρησιμοποιώντας ως πρώτη ύλη το 3,4-διμεθοξυφαινυλοξικό οξύ και τις αλκοόλες **37**, **38**, **39**, **40** πραγματοποιήθηκε μια αντίδραση εστεροποίησης με χρήση του συζευκτικού αντιδραστήριου EDC.HCl και με καταλύτη DMAP, οπότε και σχηματίζονται οι προστατευμένοι μονοεστέρες **41**, **42**, **43**, **44** (Σχήμα 40):



**37:** R = - C<sub>6</sub>H<sub>11</sub>

**38:** R = - (CH<sub>2</sub>)<sub>15</sub>CH<sub>3</sub>

**39:** R = - (CH<sub>2</sub>)<sub>7</sub>CH<sub>3</sub>

**40:** R = - (CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>CH<sub>3</sub>

**41:** R = - C<sub>6</sub>H<sub>11</sub>

**42:** R = - (CH<sub>2</sub>)<sub>15</sub>CH<sub>3</sub>

**43:** R = - (CH<sub>2</sub>)<sub>7</sub>CH<sub>3</sub>

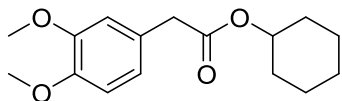
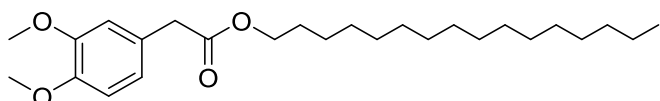
**44:** R = - (CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>CH<sub>3</sub>

**i. EDC.HCl, DMAP 10%, ξηρό CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, r.t., 24h.**

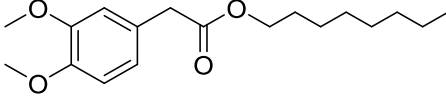
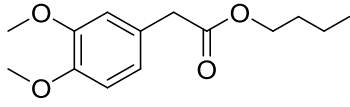
**Σχήμα 40:** Γενική αντίδραση σύζευξης της αλκοόλης με το 3,4-διμεθοξυφαινυλοξικό οξύ.

Ο μηχανισμός εστεροποίησης είναι ίδιος με αυτόν που παρουσιάστηκε στο Σχήμα 33, ενώ και η διαδικασία παραλαβής των προϊόντων είναι ίδια με αυτή των προστατευμένων διεστέρων. Οι αποδόσεις των ενώσεων που συντέθηκαν παρουσιάζονται στον Πίνακα 8 που ακολουθεί:

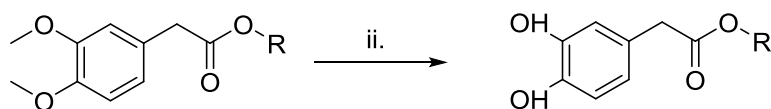
**Πίνακας 8:** Οι προστατευμένοι μονοεστέρες που παρασκευάστηκαν και οι αποδόσεις τους.

Προστατευμένος Μονοεστέρας	Απόδοση
 <p style="text-align: center;"><b>41</b></p>	68%
 <p style="text-align: center;"><b>42</b></p>	78%



 <b>43</b>	60%
 <b>44</b>	91%

Ακολουθεί στην συνέχεια η αντίδραση αποπροστασίας των δύο υδροξυλίων της φαινολικής ομάδας των μονοεστέρων με χρήση του αντιδραστήριου  $\text{BF}_3 \cdot \text{SMe}_2$  για να παραλάβουμε τα τελικά προϊόντα **45**, **46**, **47**, **48** (Σχήμα 41):



**41:** R = -  $\text{C}_6\text{H}_{11}$   
**42:** R = -  $(\text{CH}_2)_{15}\text{CH}_3$   
**43:** R = -  $(\text{CH}_2)_7\text{CH}_3$   
**44:** R = -  $(\text{CH}_2)_3\text{CH}_3$

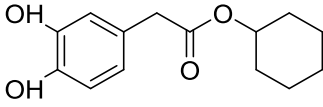
**45:** R = -  $\text{C}_6\text{H}_{11}$   
**46:** R = -  $(\text{CH}_2)_{15}\text{CH}_3$   
**47:** R = -  $(\text{CH}_2)_7\text{CH}_3$   
**48:** R = -  $(\text{CH}_2)_3\text{CH}_3$

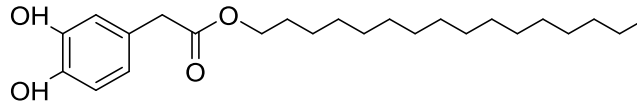
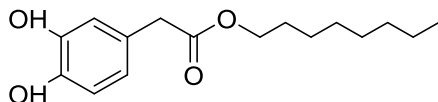
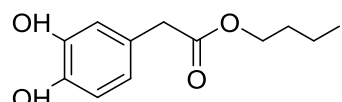
ii.  $\text{BF}_3 \cdot \text{SMe}_2$ , ξηρό  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , r.t., 24h.

Σχήμα 41: Γενική αντίδραση αποπροστασίας των μονοεστέρων.

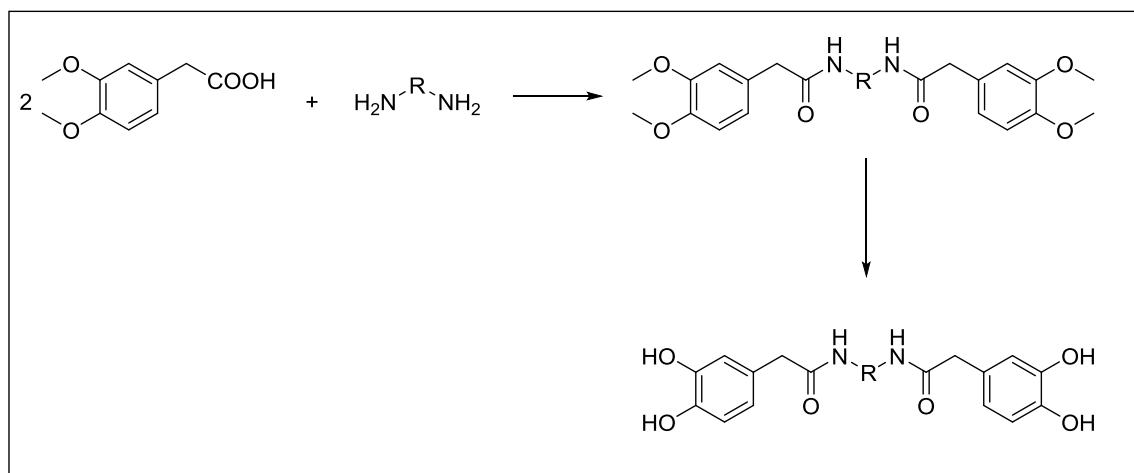
Ο μηχανισμός αποπροστασίας είναι ίδιος με αυτόν των διεστέρων, ενώ ακολουθείται και η ίδια διαδικασία για την παραλαβή των τελικών ελεύθερων προϊόντων. Στον επόμενο πίνακα αναφέρονται οι μονοεστέρες που σχηματίστηκαν και οι αντίστοιχες αποδόσεις τους (Πίνακας 9):

Πίνακας 9: Οι μονοεστέρες που παρασκευάστηκαν και οι αποδόσεις τους.

Αποπροστατευμένος Μονοεστέρας	Απόδοση
 <b>45</b>	52%

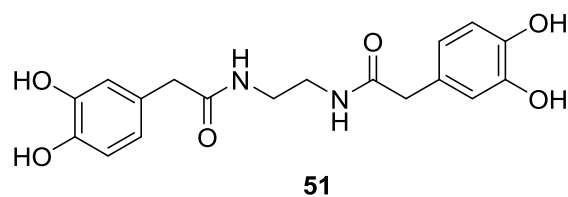
 <p style="text-align: center;"><b>46</b></p>	75%
 <p style="text-align: center;"><b>47</b></p>	75%
 <p style="text-align: center;"><b>48</b></p>	84%

### 4.3 Συνθετική πορεία πολυφαινολικού διαμιδίου



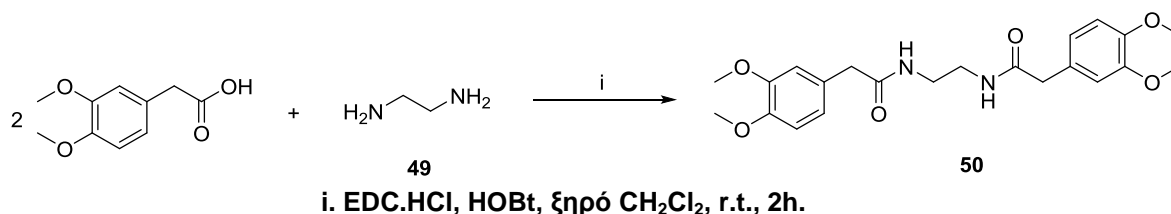
Σχήμα 42: Γενική συνθετική πορεία παρασκευής των διαμιδίων.

Με την μέθοδο αυτή (Σχήμα 42) παρασκευάστηκε το διαμίδιο **51** (Σχήμα 43):



Σχήμα 43: Το διαμίδιο που παρασκευάστηκε.

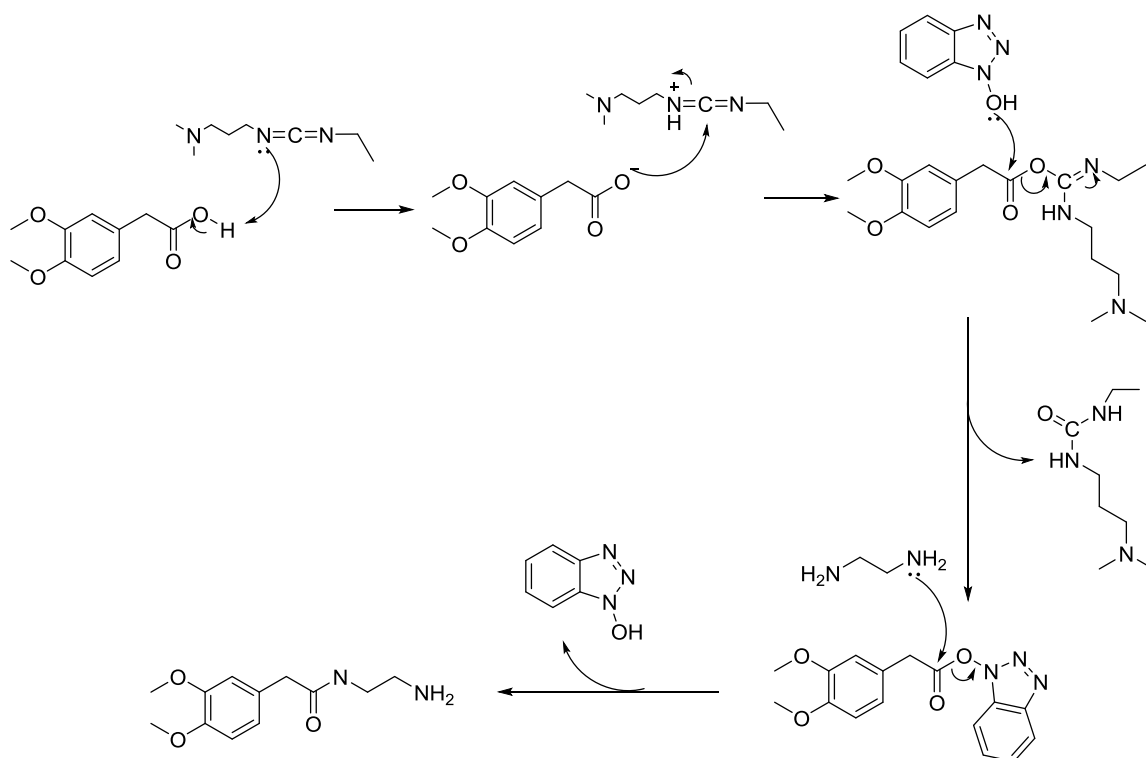
Χρησιμοποιώντας ως πρώτη ύλη το 3,4-διμεθοξυφαιτυλοξικό οξύ και την διαμίνη **49**, πραγματοποιείται μια αντίδραση σύζευξης με χρήση του EDC.HCl ως συζευκτικό αντιδραστήριο παρουσία του 1-υδροξυβενζοτριαζολίου, HOBT<sup>189</sup>. Σχηματίστηκε έτσι το διαμίδιο **50** (Σχήμα 44):



**Σχήμα 44:** Αντίδραση σύζευξης της αιθυλοδιαμίνης με το 3,4-διμεθοξυφαιτυλοξικό οξύ.

Το HOBT είναι ένα αντιδραστήριο που χρησιμοποιείται κατά κύριο λόγο σε αντιδράσεις σχηματισμού αμιδικού δεσμού, καθώς προσφέρει στην αντίδραση μεγάλη ταχύτητα και πολύ υψηλές αποδόσεις. Συνήθως, χρησιμοποιείται ένυδρο HOBT, γιατί το άνυδρο είναι εκρηκτικό. Επίσης, απομακρύνεται εύκολα από το μίγμα της αντίδρασης με εκχύλιση με υδατικό διάλυμα.

Ο πιθανός μηχανισμός της αντίδρασης περιλαμβάνει την απόσπαση αρχικά του υδρογόνου του καρβοξυλίου του αντιδρώντος οξέος από το EDC.HCl, για να μπορέσει στην συνέχεια το HOBT να σχηματίσει τον ενεργό εστέρα που θα αντιδράσει με την αμίνη (Σχήμα 45). Γι'αυτό τον λόγο, λοιπόν, το καθοριστικό βήμα της αντίδρασης είναι η αντίδραση μεταξύ του οξέος και του EDC.HCl για να σχηματιστεί η O-ακυλισουρία. Το ενεργό ενδιάμεσο αντιδρά στην συνέχεια με το HOBT, οπότε και σχηματίζεται ο ενεργός εστέρας που στην συνέχεια θα αντιδράσει με την διαμίνη:<sup>189</sup>



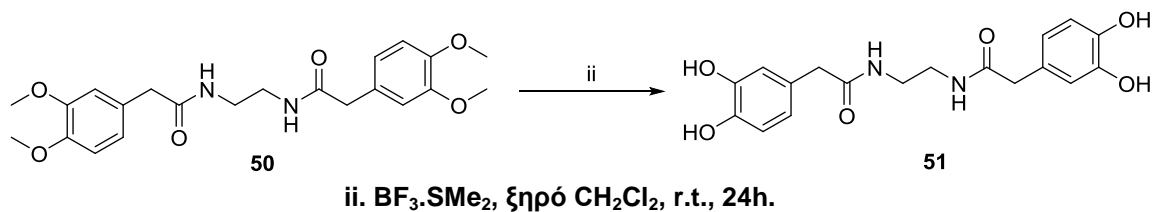
**Σχήμα 45:** Πιθανός μηχανισμός σύζευξης του 3,4-διμεθοξυφαινυλοξικού οξέος με την αιθυλοδιαμίνη.

Για την παραλαβή του προστατευμένου διαμιδίου πραγματοποιήθηκε εκχύλιση με κορεσμένο διάλυμα NaCl και με χρωματογραφία στήλης παραλήφθηκε το τελικό προϊόν σε απόδοση που φαίνεται στον Πίνακα 10:

**Πίνακας 10:** Η απόδοση του προστατευμένου διαμιδίου που παρασκευάστηκε.

Προστατευμένο Διαμίδιο	Απόδοση
<p style="text-align: center;"><b>50</b></p>	80%

Επόμενο βήμα για την σύνθεση του τελικού προϊόντος **51** είναι η αποπροστασία της ένωσης **50**. Και σε αυτή την πορεία χρησιμοποιείται το αντιδραστήριο  $\text{BF}_3 \cdot \text{SMe}_2$  (Σχήμα 46):



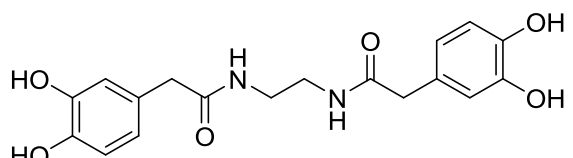
**Σχήμα 46:** Αντίδραση αποπροστασίας του διαμιδίου **50**.

Ιδιαίτερη προσοχή απαιτείται στην διάλυση του προστατευμένου διαμιδίου στο ξηρό  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , καθώς πρόκειται για ένα εξαιρετικά δυσδιάλυτο μόριο. Αν η ποσότητα του διαμιδίου **50** δεν διαλυθεί πλήρως τότε η απόδοση της αντίδρασης είναι αρκετά μειωμένη.

Μετά το πέρας της αντίδρασης προστίθεται νερό για την καταστροφή της περίσσειας του αντιδραστήριου και ακολουθεί καθαρισμός με χρωματογραφία στήλης ανάστροφης φάσης εξαιτίας της μεγάλης πολικότητας της ένωσης **51**.

Το τελικό προϊόν **51** παραλήφθηκε σε απόδοση 21% (Πίνακας 11):

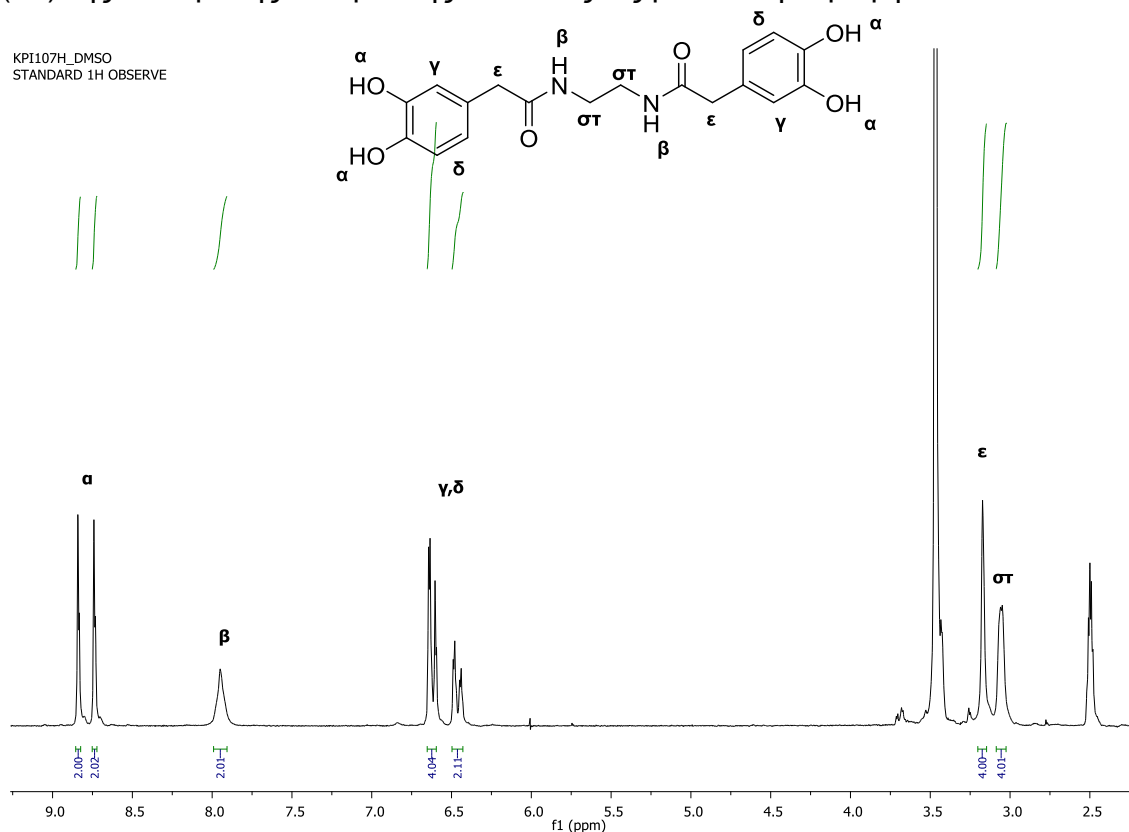
**Πίνακας 11:** Η απόδοση του διαμιδίου που παρασκευάστηκε.

Αποπροστατευμένο Διαμίδιο	Απόδοση
 <b>51</b>	21%

Η χαμηλή απόδοση, εν μέρει, οφείλεται στη δυσκολία χειρισμού του προϊόντος λόγω μεγάλης δυσδιαλυτότητας.

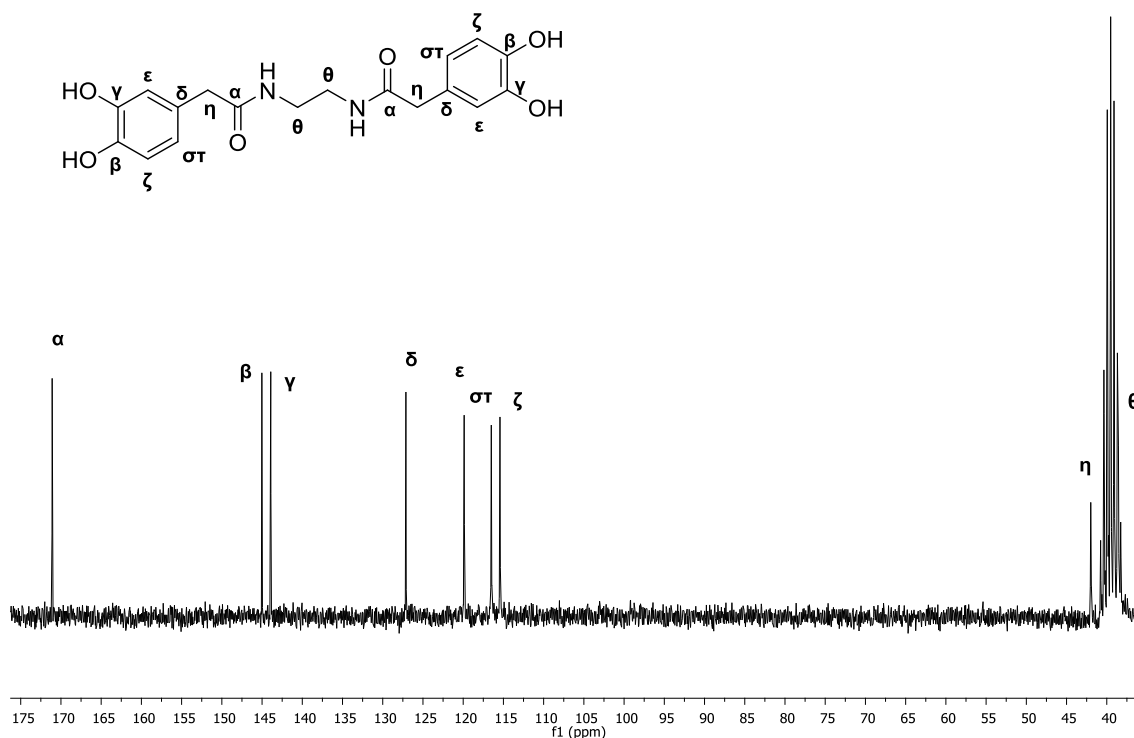
Παρακάτω, δίνονται τα φάσματα  $^1\text{H}$  και  $^{13}\text{C}$  πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού του τελικού προϊόντος **51**. Στο φάσμα  $^1\text{H}$  του Σχήματος 47 παρατηρούνται δύο διπλές κορυφές στα 8.84 και 8.74 ppm, όπου συντονίζονται τα τέσσερα πρωτόνια ( $\alpha$ ) των φαινολικών υδροξυλίων της ένωσης. Η ευρεία απλή κορυφή που εμφανίζεται στα 7.95 ppm οφείλεται στα δύο αμιδικά πρωτόνια ( $\beta$ ), ενώ τα αρωματικά πρωτόνια ( $\gamma$ ,  $\delta$ ) συντονίζονται στα 6.62 και 6.46 ppm ως διπλές διπλών κορυφές. Στα 3.17 ppm εμφανίζεται

η χημική μετατόπιση των α-πρωτονίων ( $\epsilon$ ) του καρβονυλίου ως μια απλή κορυφή και στα 3.05 ppm παρατηρούνται οι μετατοπίσεις των μεθυλενίων ( $\sigma\tau$ ) της ενδιάμεσης αλειφατικής αλυσίδας ως μία διπλή κορυφή.



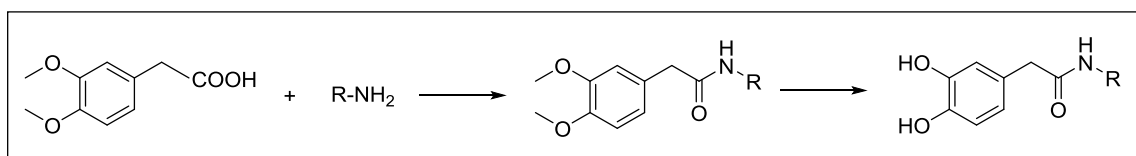
Σχήμα 47: Φάσμα  $^1\text{H}$  NMR της ένωσης 51 σε δευτεριωμένο DMSO.

Στο φάσμα  $^{13}\text{C}$  NMR της ίδια ένωσης (Σχήμα 48), παρατηρούμε στα 171.1 ppm το σήμα της χημικής μετατόπισης των καρβονυλικών ανθράκων ( $\alpha$ ) και από τα 145.0 έως τα 115.4 ppm μετατοπίζονται οι αρωματικοί άνθρακες ( $\beta$ - $\sigma\tau$ ). Οι α-καρβονυλικοί άνθρακες ( $\eta$ ) συντονίζονται στα 42.0 ppm, ενώ στα 38.6 ppm εμφανίζεται το σήμα της χημικής μετατόπισης των ανθράκων ( $\theta$ ) της ενδιάμεσης αλειφατικής αλυσίδας.



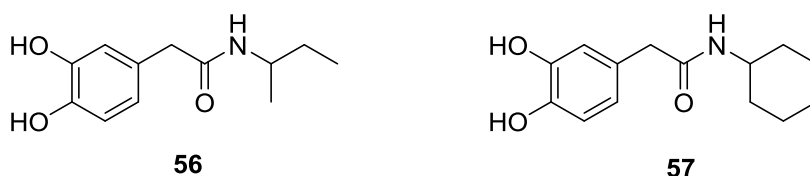
Σχήμα 48: Φάσμα  $^{13}\text{C}$  NMR της ένωσης 51 σε δευτεριωμένο DMSO.

#### 4.4 Συνθετική πορεία πολυφαινολικών μονοαμιδίων



Σχήμα 49: Γενική συνθετική πορεία παρασκευής μονοαμιδίων.

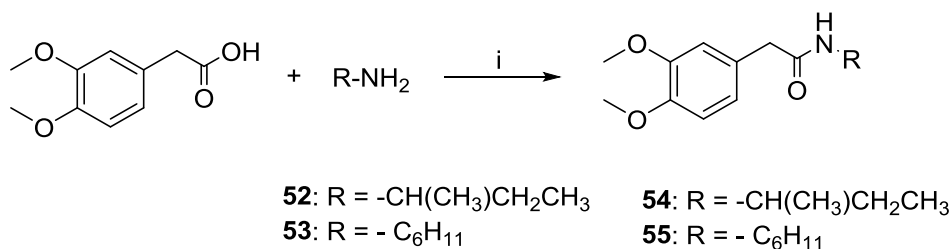
Με αυτόν τον τρόπο (Σχήμα 49) συντέθηκαν τα ακόλουθα μονοαμίδια (Σχήμα 50):



Σχήμα 50: Μονοαμίδια που παρασκευάστηκαν.

Το πρώτο στάδιο της σύνθεσης περιλαμβάνει την σύζευξη του 3,4-διμεθοξυφαινοξικού οξέος με τις αμίνες **52**, **53** με την μέθοδο του EDC.HCl

παρουσία HOBt. Έτσι, προέκυψαν τα προστατευμένα μονοαμίδια **54**, **55** (Σχήμα 51):



i. EDC.HCl, HOBt, ξηρό CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, r.t., 2h.

**Σχήμα 51:** Γενική αντίδραση σύζευξης των αμινών και του 3,4-διμεθοξυφαινολοξικού οξέος.

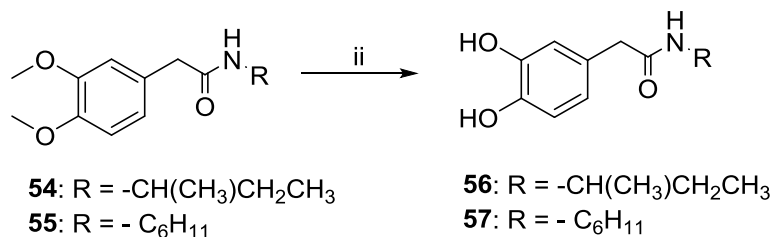
Η κατεργασία των προϊόντων **54**, **55** περιλαμβάνει εκχυλίσεις με κορεσμένο διάλυμα NaCl και χρωματογραφία στήλης με τις εξής αποδόσεις (Πίνακας 12):

**Πίνακας 12:** Τα προστατευμένα μονοαμίδια που παρασκευάστηκαν και οι αποδόσεις τους.

Προστατευμένο Μονοαμίδιο	Απόδοση
 <b>54</b>	85%
 <b>55</b>	99%

Στο δεύτερο στάδιο πραγματοποιείται η αποπροστασία των φαινολικών υδροξυλίων των ενώσεων **54**, **55** με χρήση του αντιδραστήριου BF<sub>3</sub>.SMe<sub>2</sub>, οπότε και παραλαμβάνουμε τα τελικά προϊόντα **56**, **57** (Σχήμα 52):





ii. BF<sub>3</sub>·SMe<sub>2</sub>, ξηρό CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, r.t., 24h.

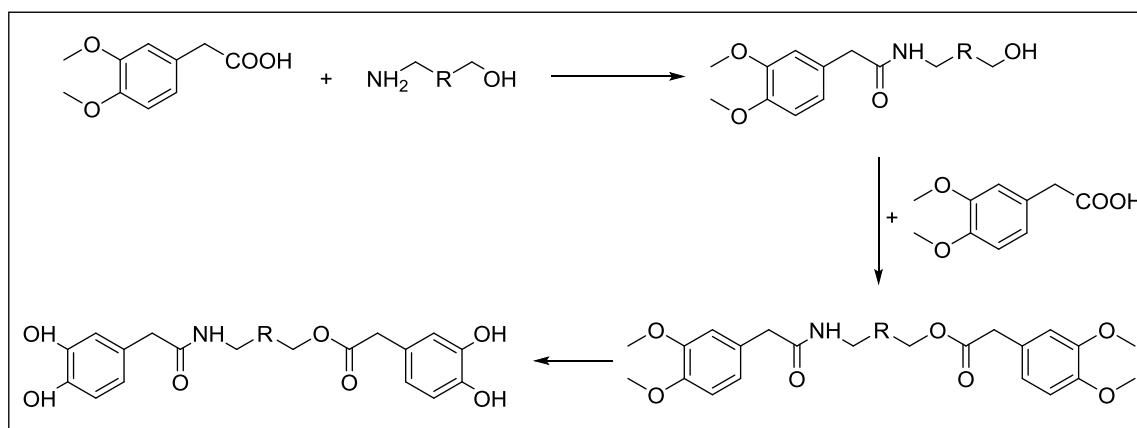
Σχήμα 52: Γενική αντίδραση αποπροστασίας των μονοαμιδίων.

Με παρόμοια κατεργασία όπως και στο τελικό στάδιο του διαμιδίου **51** παραλαμβάνονται τα επιθυμητά αμίδια με αποδόσεις (Πίνακας 13):

Πίνακας 13: Τα μονοαμίδια που παρασκευάστηκαν και οι αποδόσεις τους.

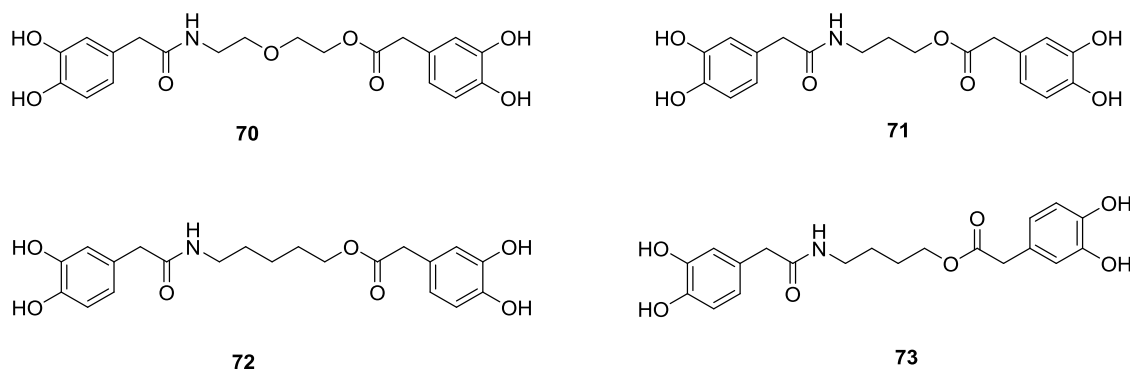
Αποπροστατευμένο Μονοαμίδιο	Απόδοση
<p><b>56</b></p>	99%
<p><b>57</b></p>	95%

#### 4.5 Συνθετική πορεία πολυφαινολικών αμιδικών εστέρων



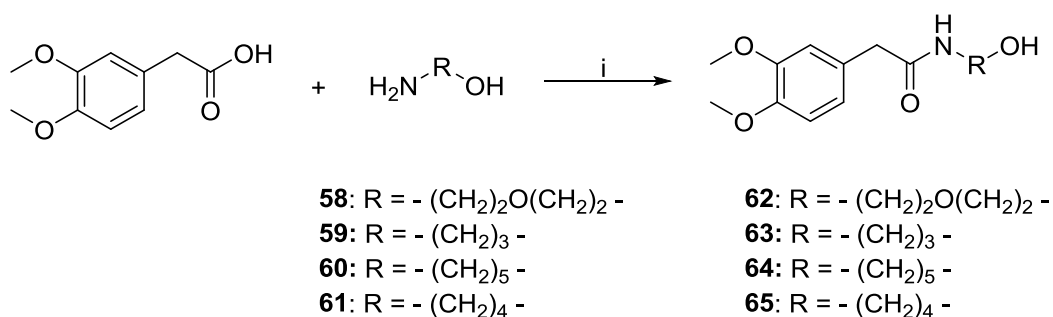
Σχήμα 53: Γενική συνθετική πορεία παρασκευής αμιδικών εστέρων.

Με αυτή την μέθοδο (Σχήμα 53) παρασκευάστηκαν οι ενώσεις (Σχήμα 54):



**Σχήμα 54: Αμιδικοί εστέρες που παρασκευάστηκαν.**

Στο πρώτο στάδιο της συνθετικής αυτής πορείας, οι αμινοαλκοόλες **58**, **59**, **60**, **61** συζεύγγονται με το 3,4-διμεθοξυφαινυλοξικό οξύ παρουσία του συζευκτικού EDC.HCl και HOBT. Έτσι, προκύπτουν οι συζευγμένες αλκοόλες **62**, **63**, **64**, **65** (Σχήμα 55):



**i. EDC.HCl, HOBT, ξηρό CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, r.t., 2h.**

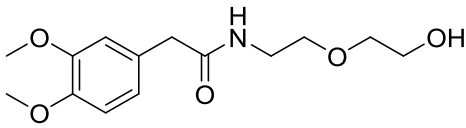
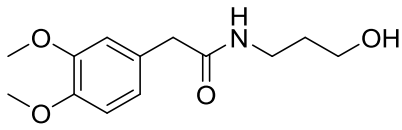
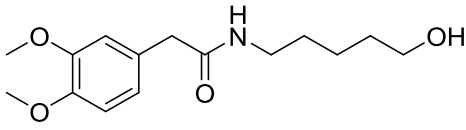
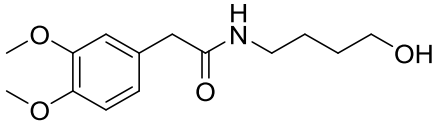
**Σχήμα 55: Γενική αντίδραση σύζευξης των αμινοαλκοολών και του 3,4-διμεθοξυφαινυλοξικού οξέος.**

Το μόριο της αμινοαλκοόλης περιέχει δύο δραστικές χαρακτηριστικές ομάδες, οι οποίες μπορούν να δράσουν ανταγωνιστικά η μία με την άλλη, σχηματίζοντας έτσι στο διάλυμα της αντίδρασης δύο πιθανές ενώσεις. Η μία ένωση αφορά το επιθυμητό προϊόν της αντίδρασης και η άλλη την αμίνη που θα προκύψει, αν η αμινοαλκοόλη συζευχθεί με το οξύ από το υδροξυλικό της άκρο. Ωστόσο, η αμινομάδα είναι καλύτερο πυρηνόφιλο από την αλκοόλη, οπότε είναι εφικτή η αποκλειστική αντίδραση σύζευξης του οξέος με την αμίνη.

Ένας επιπλέον κίνδυνος που υπάρχει σε αυτήν την αντίδραση, είναι ο σχηματισμός του διυποκατεστημένου μορίου της αμινοαλκοόλης από δύο μόρια οξέος. Δηλαδή, η άμεση παρασκευή του αμιδικού εστέρα, ο οποίος όμως δεν θα παραλαμβάνονταν καθαρός. Κάτι τέτοιο παρατηρήθηκε αρχικά, αλλά ελαχιστοποιήθηκε αυξάνοντας την αραιώση της αντίδρασης.

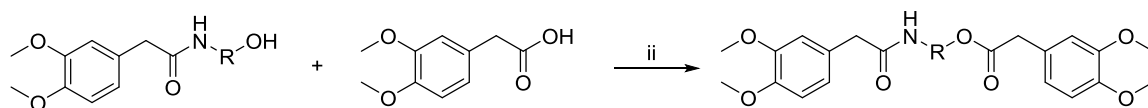
Για την κατεργασία του μίγματος πραγματοποιείται εκχύλιση με κορεσμένο διάλυμα NaCl. Με χρωματογραφία στήλης παραλαμβάνονται τα επιθυμητά προϊόντα στις εξής αποδόσεις (Πίνακας 14):

**Πίνακας 14: Οι συζευγμένες αλκοόλες που παρασκευάστηκαν και οι αποδόσεις τους.**

Συζευγμένη Αλκοόλη	Απόδοση
 <p style="text-align: center;"><b>62</b></p>	89%
 <p style="text-align: center;"><b>63</b></p>	76%
 <p style="text-align: center;"><b>64</b></p>	66%
 <p style="text-align: center;"><b>65</b></p>	98%

Στην συνέχεια, για το δεύτερο στάδιο της σύνθεσης, οι αλκοόλες **62**, **63**, **64**, **65** συζεύγνυνται με το 3,4-διμεθοξυφαινυλοξικό οξύ μέσω μιας αντίδρασης εστεροποίησης με χρήση του συζευκτικού αντιδραστήριου EDC.HCl και του

καταλύτη DMAP. Ως αποτέλεσμα, συντέθηκαν οι προστατευμένοι αμιδικοί εστέρες **66**, **67**, **68**, **69** (Σχήμα 56):



**62:** R = - (CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>O(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub> -

**63:** R = - (CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub> -

**64:** R = - (CH<sub>2</sub>)<sub>5</sub> -

**65:** R = - (CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub> -

**66:** R = - (CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>O(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub> -

**67:** R = - (CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub> -

**68:** R = - (CH<sub>2</sub>)<sub>5</sub> -

**69:** R = - (CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub> -

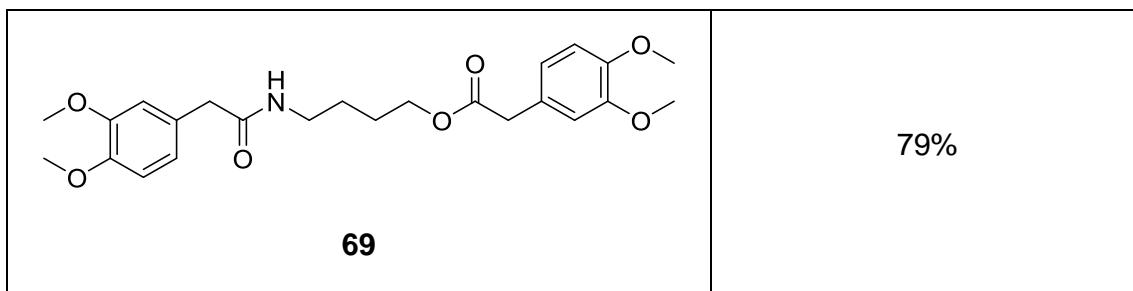
i. EDC.HCl, DMAP 10%, ξηρό CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, r.t., 24h.

**Σχήμα 56:** Γενική αντίδραση εστεροποίησης συζευγμένων αλκοολών και του 3,4-διμεθοξυφαινυλοξικού οξέος.

Η κατεργασία της αντίδρασης περιλαμβάνει εκχυλίσεις τόσο με όξινο, όσο και με βασικό διάλυμα. Με χρωματογραφία στήλης παραλαμβάνουμε τα προϊόντα σε αρκετά καλές αποδόσεις (Πίνακας 15):

**Πίνακας 15:** Οι προστατευμένοι αμιδικοί εστέρες που παρασκευάστηκαν και οι αποδόσεις τους.

Προστατευμένος Αμιδικός Εστέρας	Απόδοση
<p style="text-align: center;"><b>66</b></p>	84%
<p style="text-align: center;"><b>67</b></p>	81%
<p style="text-align: center;"><b>68</b></p>	83%



Στο τελευταίο στάδιο της συνθετικής πορείας, πραγματοποιείται η αποπροστασία των φαινολικών υδροξυλίων με χρήση του αντιδραστήριου  $\text{BF}_3 \cdot \text{SMe}_2$ . Έτσι, προκύπτουν οι ενώσεις **70**, **71**, **72** και **73** (Σχήμα 57):



**66:** R = -  $(\text{CH}_2)_2\text{O}(\text{CH}_2)_2$  -

**67:** R = -  $(\text{CH}_2)_3$  -

**68:** R = -  $(\text{CH}_2)_5$  -

**69:** R = -  $(\text{CH}_2)_4$  -

**70:** R = -  $(\text{CH}_2)_2\text{O}(\text{CH}_2)_2$  -

**71:** R = -  $(\text{CH}_2)_3$  -

**72:** R = -  $(\text{CH}_2)_5$  -

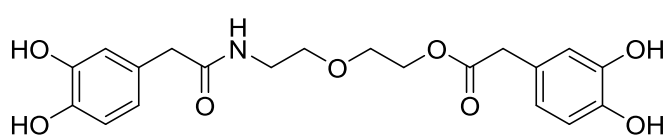
**73:** R = -  $(\text{CH}_2)_4$  -

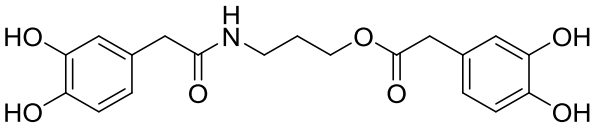
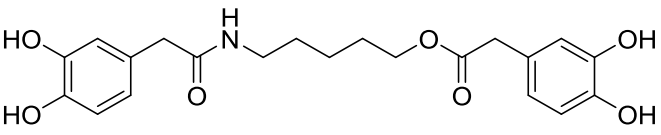
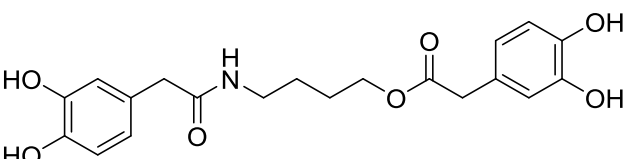
iii.  $\text{BF}_3 \cdot \text{SMe}_2$ , ξηρό  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , r.t., 24h.

**Σχήμα 57:** Γενική αντίδραση αποπροστασίας των φαινολικών υδροξυλίων των αμιδικών εστέρων.

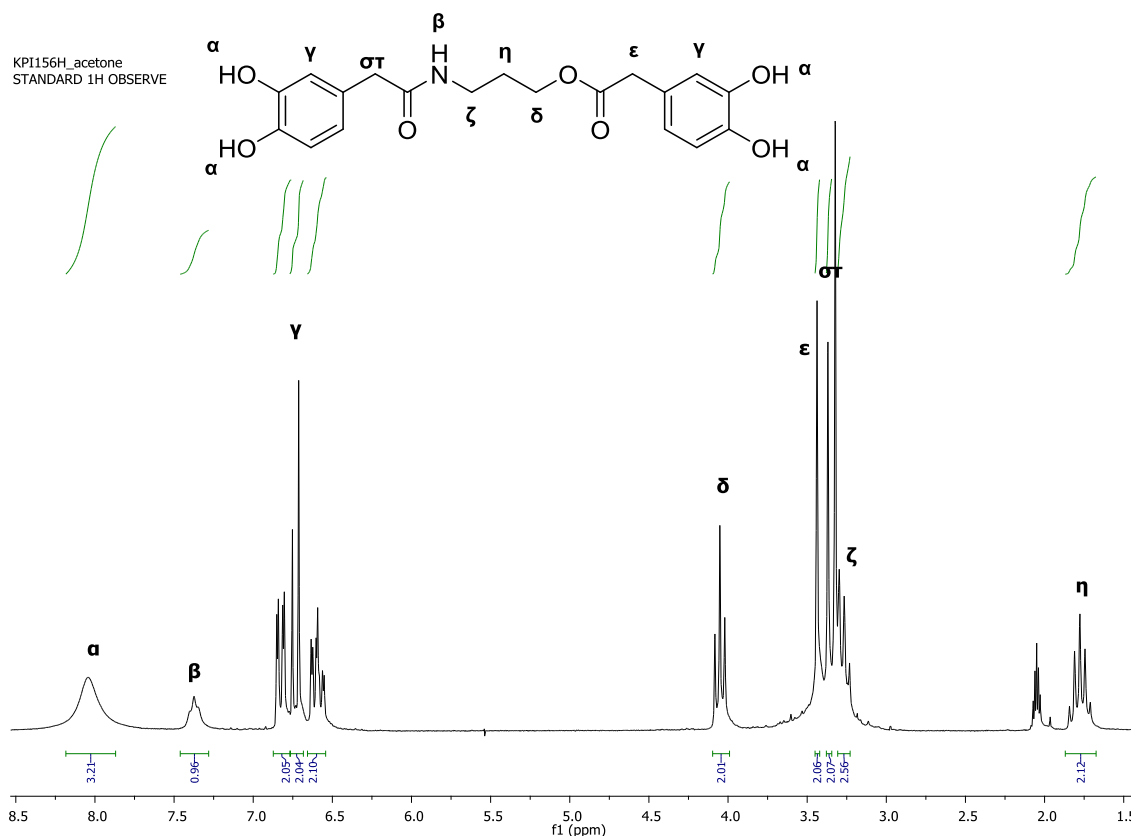
Μετά το πέρας της αντίδρασης προστίθεται στο μίγμα περίπου 1 mL MeOH για να καταστραφεί το  $\text{BF}_3 \cdot \text{SMe}_2$ . Η παραλαβή των τελικών προϊόντων πραγματοποιείται με εκχύλιση με κορεσμένο διάλυμα NaCl και χρωματογραφία στήλης. Τα τελικά προϊόντα παραλαμβάνονται στις εξής αποδόσεις (Πίνακας 16):

**Πίνακας 16:** Οι αμιδικοί εστέρες που παρασκευάστηκαν και οι αποδόσεις τους.

Αποπροστατευμένος Αμιδικός Εστέρας	Απόδοση
 <p><b>70</b></p>	71%

 <p style="text-align: center;"><b>71</b></p>	73%
 <p style="text-align: center;"><b>72</b></p>	46%
 <p style="text-align: center;"><b>73</b></p>	48%

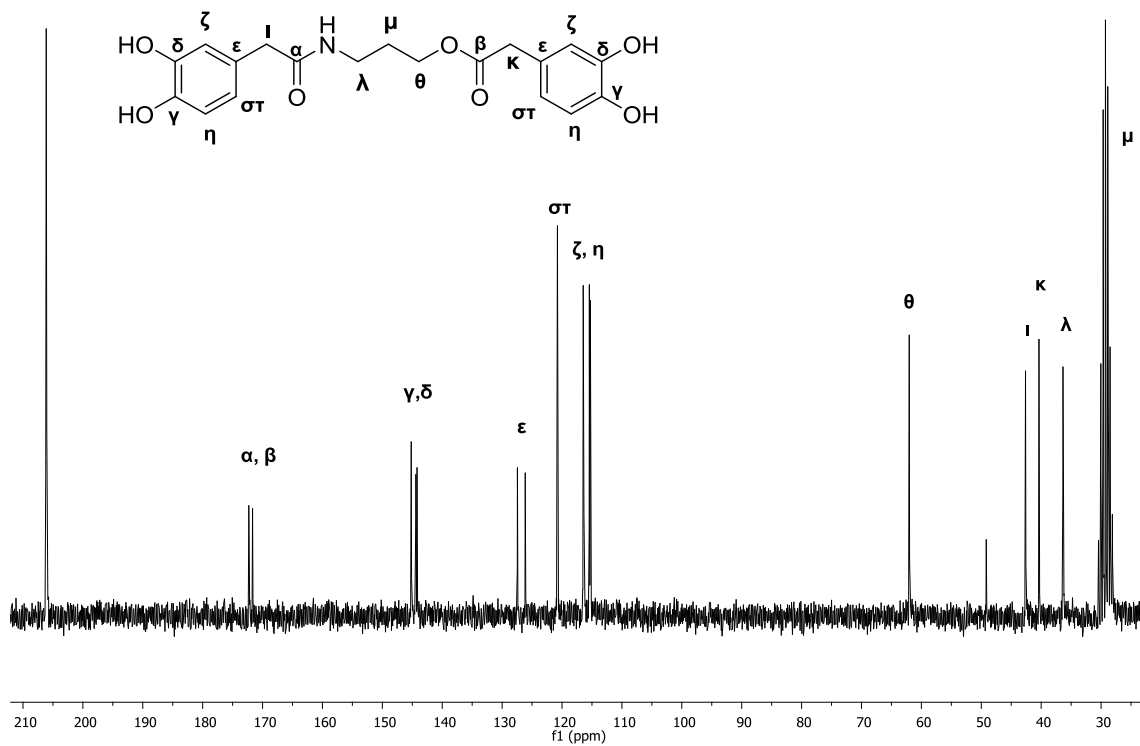
Στην συνέχεια παρατίθενται τα φάσματα  $^1\text{H}$  και  $^{13}\text{C}$  πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού του τελικού προϊόντος **71**. Με βάση το φάσμα  $^1\text{H}$  NMR της ένωσης (Σχήμα 58), παρατηρούμε μια ευρεία απλή κορυφή στα 8.04 ppm, η οποία οφείλεται στα τέσσερα φαινολικά υδροξύλια (**α**) και μία επίσης απλή κορυφή στα 7.37 ppm λόγω της χημικής μετατόπισης του αμιδικού πρωτονίου (**β**). Στα 6.83-6.59 ppm συντονίζονται τα αρωματικά πρωτόνια (**γ**) της ένωσης ως πολλαπλές κορυφές. Η τριπλή κορυφή στα 4.05 ppm οφείλεται στην χημική μετατόπιση των εστερικών πρωτονίων (**δ**), ενώ η απλή κορυφή στα 3.44 ppm οφείλεται στα α-πρωτόνια του καρβονυλίου του εστερικού δεσμού (**ε**). Τα α-πρωτόνια του καρβονυλίου του αμιδικού δεσμού συντονίζονται στα 3.37 ppm ως μία απλή κορυφή. Η διπλή κορυφή που παρατηρούμε στα 3.25 ppm οφείλεται στα μεθυλένια (**ζ**) που βρίσκονται δίπλα στον αμιδικό δεσμό, ενώ η πολλαπλή κορυφή από τα 1.85 έως τα 1.68 ppm οφείλεται στα πρωτόνια της ενδιάμεσης αλειφατικής αλυσίδας (**η**).



Σχήμα 58: Φάσμα <sup>1</sup>H NMR της ένωσης 71 σε δευτεριωμένη ακετόνη.

Στο Σχήμα 59 παρουσιάζεται το φάσμα <sup>13</sup>C NMR της ίδιας ένωσης, όπου στα 172.3 και στα 171.7 ppm παρατηρούμε τις χημικές μετατοπίσεις των καρβονυλικών ανθράκων ( $\alpha$ ,  $\beta$ ). Στην περιοχή από τα 145.8 έως τα 115.3 ppm συντονίζονται οι αρωματικοί άνθρακες της ένωσης 71. Ο εστερικός άνθρακας ( $\nu$ ) συντονίζεται στα 62.0 ppm, ενώ οι α-άνθρακες του αμιδικού και του εστερικού δεσμού ( $\xi$ ,  $\omicron$ ) στα 42.6 και 40.4 ppm. Τέλος, η κορυφή που παρατηρούμε στα 36.4 ppm οφείλεται στον άνθρακα που είναι δίπλα στον αμιδικό δεσμό ( $\pi$ ) και η κορυφή στα 28.8 ppm στον ενδιάμεσο άνθρακα της αλειφατικής αλυσίδας ( $\rho$ ).

KPI156C\_acetone  
13C OBSERVE



Σχήμα 59: Φάσμα  $^{13}\text{C}$  NMR της ένωσης 71 σε δευτεριωμένη ακετόνη.



## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5

### ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ

Οι ενώσεις που συντέθηκαν μελετήθηκαν στο Εργαστήριο Οργανικής Χημείας του Τμήματος Χημείας του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών ως προς την αντιοξειδωτική τους δράση με βάση την αντιοξειδωτική μέθοδο DPPH.

#### 5.1 Πειραματική διαδικασία

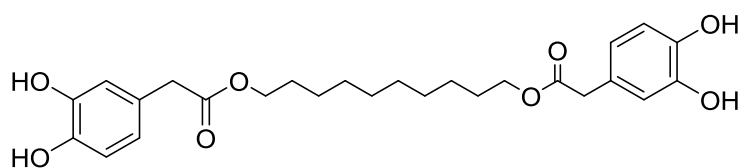
Κατά την έναρξη της πειραματικής διαδικασίας παρασκευάζεται το διάλυμα του DPPH, το οποίο αποτελεί και το μητρικό διάλυμα που χρησιμοποιείται σε όλες τις μελέτες των ενώσεων. Ζυγίζονται 3.3 mg στερεού και διαλύονται σε 100 mL MeOH, μέσα σε ογκομετρική φιάλη των 100 mL (διάλυμα DPPH συγκέντρωσης 83.7  $\mu\text{M}$ ). Είναι καλό η ουσία να διαλυθεί πρώτα σε ένα ποτήρι και μετά να προστεθεί στην φιάλη, καθώς οι κόκκοι του DPPH διαλύονται σχετικά δύσκολα και πρέπει να είμαστε σίγουροι για την πλήρη διάλυση του αντιδραστηρίου κατά την αραίωση του σε μεθανόλη. Αφού παρασκευαστεί το διάλυμα, η ογκομετρική φιάλη καλύπτεται με αλουμινόχαρτο και φυλάσσεται στην κατάψυξη.

Στη συνέχεια, παρασκευάζονται διαλύματα διαφόρων συγκεντρώσεων της ουσίας που θα μελετηθεί, συνήθως των 750, 500, 375, 300, 250, 175, 125 και 62.5  $\mu\text{M}$ . Τα διαλύματα των ενώσεων είναι καλό, επίσης, να φυλάγονται στην κατάψυξη σε σκουρόχρωμα φιαλίδια, καθώς οι πολυφαινολικές ενώσεις είναι ιδιαίτερα ευαίσθητες.

Όπως αναφέρθηκε στο Κεφάλαιο 4, στην μελέτη του DPPH ουσιαστικά καταγράφεται η μείωση της απορρόφησης του διαλύματος του DPPH εξαιτίας του αντιοξειδωτικού με τον χρόνο. Η απορρόφηση μετράται σε όργανο UV το οποίο εκπέμπει σταθερό μήκος κύματος  $\lambda_{\text{max}} = 516 \text{ nm}$  για δύο συνεχόμενες ώρες, ενώ η κυβελίδα βρίσκεται συνεχώς μέσα στο όργανο. Για την μέθοδο, χρησιμοποιούνται κυβελίδες που είναι ανθεκτικές στην μεθανόλη.

Πριν από κάθε συνεχόμενη μέτρηση της μείωσης του DPPH κατά την αντίδρασή του με μια ένωση, μετράται η απορρόφηση του τυφλού διαλύματος του DPPH (1.5 mL στην κυψελίδα), καθώς είναι απαραίτητη για τους υπολογισμούς. Για την μέτρηση της αντιοξειδωτικής δράσης μιας ένωσης, στην κυψελίδα προστίθονται πάντα 1.5 mL διαλύματος DPPH και 20  $\mu$ L της ουσίας που μελετάται με πιπέτα ακριβείας.

Για την περιγραφή της πειραματικής διαδικασίας και της επεξεργασίας των αποτελεσμάτων, θα ακολουθήσουμε τη μελέτη της αντιοξειδωτικής δράσης της ένωσης **35** (Σχήμα 60):



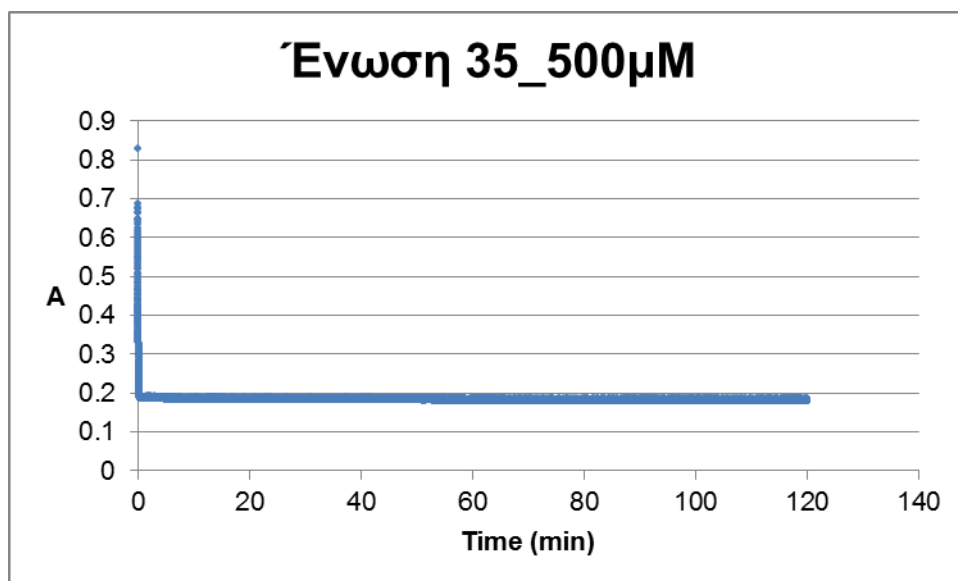
35

Σχήμα 60: Δομή της ένωσης 35.

Αρχικά μελετάται η δράση της ένωσης στην συγκέντρωση των 500  $\mu$ M. Όπως αναφέρθηκε και πιο πάνω, πρώτα από όλα μετράται η απορρόφηση του τυφλού διαλύματος. Στην συγκεκριμένη περίπτωση βρέθηκε ότι η απορρόφηση ήταν 0.8256.

Έπειτα, καταγράφεται συνεχόμενα η απορρόφηση του μίγματος DPPH-ουσίας στα 516 nm. Με αυτόν τον τρόπο καταγράφονται συνεχόμενα οι μετρήσεις της απορρόφησης του μίγματος ανά 10 δευτερόλεπτα για συνολικό διάστημα δύο ωρών (ή μέχρι να ευθυγραμμιστεί η καμπύλη της απορρόφησης σε σχέση με το χρόνο).

Για τη συγκέντρωση των 500  $\mu$ M η καμπύλη απορρόφησης (A)-χρόνου (t) ήταν (Σχήμα 61):



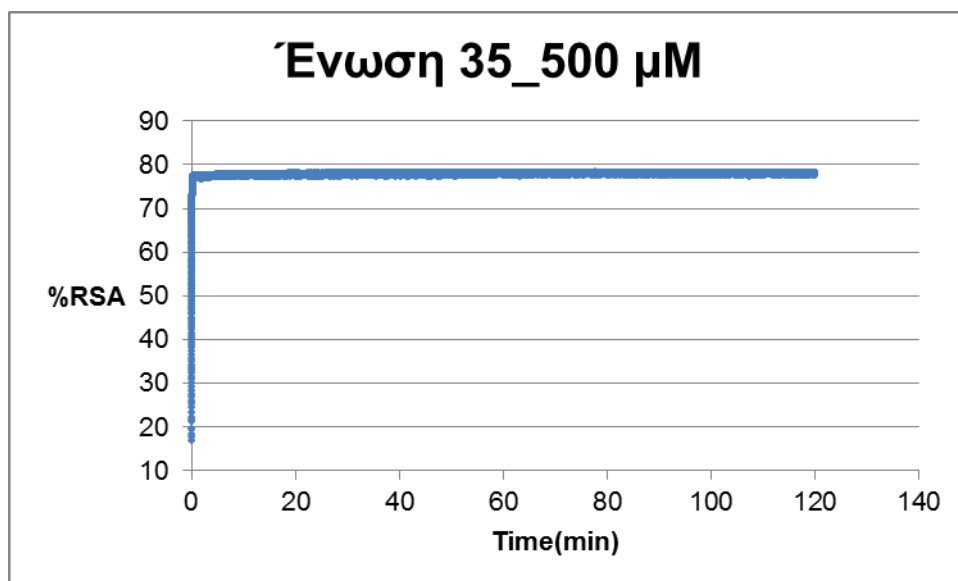
Σχήμα 61: Διάγραμμα απορρόφησης-χρόνου του μίγματος DPPH-διαλύματος συγκέντρωσης 500 μM της ένωσης 35.

Όπως παρατηρούμε, η καμπύλη έχει ευθυγραμμιστεί από πολύ νωρίς (0.3 λεπτά), οπότε θα μπορούσε να είχε σταματήσει από τότε η καταγραφή των απορροφήσεων.

Μετά το τέλος της αντίδρασης, λαμβάνονται όλες οι τιμές της απορρόφησης ανά 10 δευτερόλεπτα, δηλαδή, για διάστημα 2 ωρών, καταγράφονται 72004 τιμές απορρόφησης. Από τις τιμές αυτές και με την τιμή της απορρόφησης του τυφλού διαλύματος υπολογίζουμε τις τιμές ανάσχεσης (%RSA) για την κάθε χρονική στιγμή, από τον τύπο:

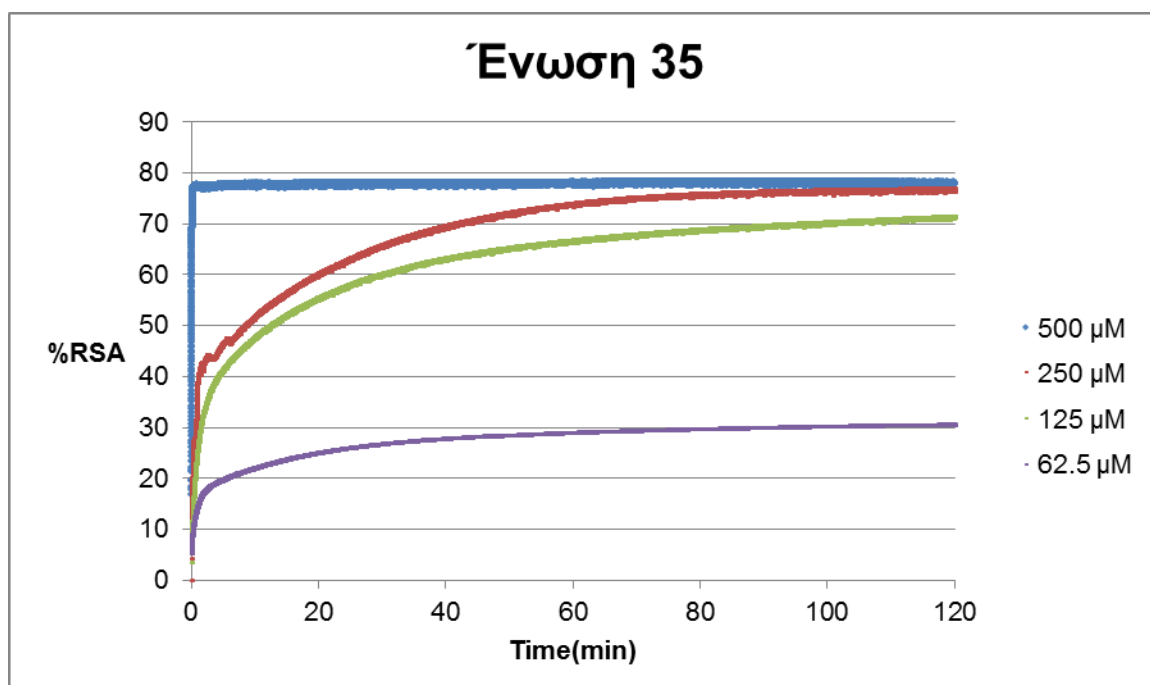
$$\%RSA = \frac{(A_{\text{τυφλίου}} - A_t)}{A_{\text{τυφλίου}}} * 100$$

Έτσι, υπολογίζουμε όλες τις τιμές ανάσχεσης (72004 τιμές) κατά την διάρκεια της αντίδρασης και μπορούμε πλέον να κατασκευάσουμε το διάγραμμα %RSA-χρόνου για το διάλυμα συγκέντρωσης 500 μM της **35** (Σχήμα 62):



**Σχήμα 62: Διάγραμμα %RSA-χρόνου του μίγματος DPPH-διαλύματος συγκέντρωσης 500 μM για την ένωση 35.**

Με τον ίδιο τρόπο υπολογίζονται οι τιμές ανάσχεσης ανά 10 δευτερόλεπτα για διάστημα 2 ωρών για τα διαλύματα της 35 με συγκεντρώσεις 250, 125 και 62.5 μM. Οι καμπύλες %RSA-χρόνου των συγκεντρώσεων αυτών παρουσιάζονται σε ένα κοινό διάγραμμα στη συνέχεια (Σχήμα 63):



**Σχήμα 63: Διάγραμμα %RSA-χρόνου του μίγματος DPPH και των διαλυμάτων συγκέντρωσης 500, 250, 125 και 62.5 μM για την ένωση 35.**

Από το διάγραμμα διαπιστώνουμε ότι στην συγκέντρωση 250  $\mu\text{M}$  του διαλύματος ουσίας, η καμπύλη αρχίζει να ευθυγραμμίζεται στα 60 λεπτά, ενώ για τις συγκεντρώσεις των 125 και 62.5  $\mu\text{M}$  στα 120 και 110 λεπτά αντίστοιχα. Αυτοί οι χρόνοι αποτελούν τους χρόνους  $t_2$  των αντιδράσεων (Κεφάλαιο 2.5.9) και είναι η χρονική στιγμή, όπου ολοκληρώνεται η δεύτερη αργή αντίδραση των πολυφαινολικών ενώσεων με την ρίζα DPPH. Οι %RSA που αντιστοιχούν σε αυτούς τους χρόνους, αποτελούν τις μέγιστες τιμές ανάσχεσης που μπορεί να έχει η συγκεκριμένη ουσία στην συγκεκριμένη συγκέντρωση.

Στο Κεφάλαιο 2, είχε αναφερθεί όμως και η πραγματοποίηση μιας πρώτης πολύ γρήγορης αντίδρασης που λαμβάνει χώρα κατά την αλληλεπίδραση του DPPH με μία πολυφαινολική ένωση. Η αντίδραση αυτή, καταγράφεται στα διαγράμματα ανάσχεσης-χρόνου των διαλυμάτων, ως η πολύ απότομη αλλαγή της καμπύλης που συμβαίνει στα αρχικά λεπτά της καταγραφής της απορρόφησης. Ο χρόνος που γίνεται η αντίδραση αυτή, αναφέρεται ως χρόνος  $t_1$ . Παρατηρώντας, το συνολικό διάγραμμα %RSA-χρόνου της ένωσης **35**, διαπιστώνουμε ότι οι τιμές  $t_1$  και  $t_2$  της κάθε συγκέντρωσης είναι (Πίνακας 17):

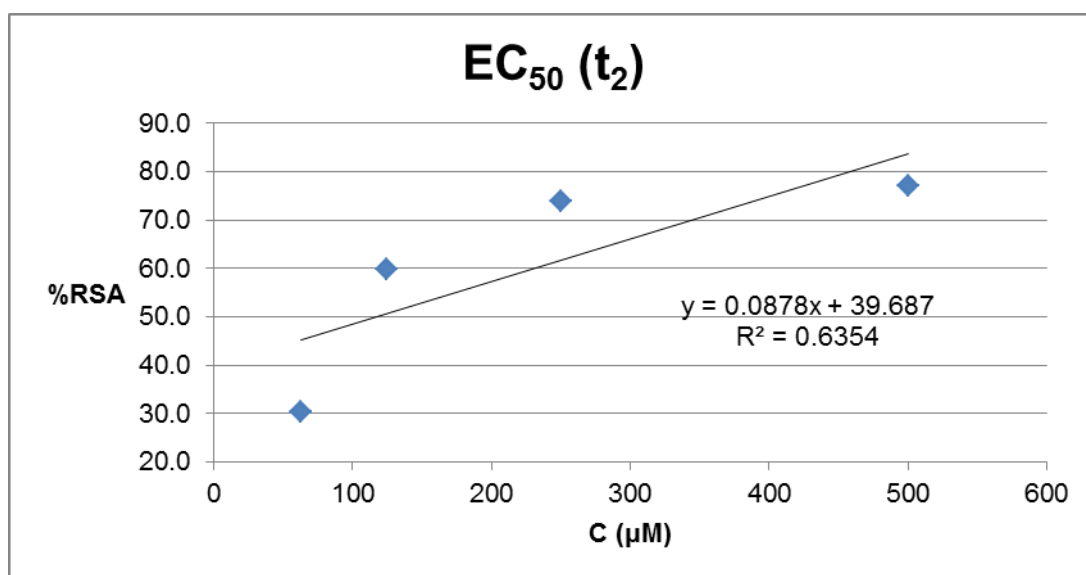
**Πίνακας 17: Οι χρόνοι  $t_1$  και  $t_2$  για τις διάφορες συγκεντρώσεις των διαλυμάτων με την ένωση 35.**

<b>Συγκέντρωση, C (<math>\mu\text{M}</math>)</b>	<b><math>t_1</math> (λεπτά)</b>	<b><math>t_2</math> (λεπτά)</b>
500	0.3	0.3
250	1.6	60
125	1.3	120
62.5	0.7	110

Παρατηρούμε ότι ο χρόνος  $t_1$  και ο χρόνος  $t_2$  της συγκέντρωσης των 500  $\mu\text{M}$  είναι ο ίδιος, δηλαδή είτε και οι δύο αντιδράσεις πραγματοποιούνται πολύ γρήγορα για αυτή την συγκέντρωση και οι χρόνοι συμπίπτουν, είτε πραγματοποιείται μόνο η μία αντίδραση.

Επίσης, διαπιστώνουμε ότι όσο μικραίνει η συγκέντρωση, η %RSA του DPPH μειώνεται. Συμπεραίνουμε, λοιπόν, ότι οι ουσίες που θα παρουσιάζουν μεγάλη τιμή %RSA και σε μικρές συγκεντρώσεις, πιθανότατα θα είναι ισχυρά αντιοξειδωτικά.

Για τον υπολογισμό της τιμής  $EC_{50}$ , δημιουργείται το διάγραμμα των μέγιστων %RSA (δηλαδή στον χρόνο  $t_2$ ), για την κάθε συγκέντρωση ουσίας, με τις αντίστοιχες συγκεντρώσεις (Σχήμα 64). Η καμπύλη αυτή απαιτεί πάντα τη ύπαρξη τουλάχιστον τριών σημείων:



Σχήμα 64: Διάγραμμα %RSA-C για την ένωση **35** για τον υπολογισμό του  $EC_{50}$ .

Εφαρμόζοντας την μέθοδο των ελαχίστων τετραγώνων υπολογίζεται η εξίσωση της ευθείας των τιμών ( $y = 0.0878x + 39.687$ ), όπου  $y = \%RSA$  και  $x = C$ . Αν όπου  $y$  βάλουμε την τιμή 50, τότε θα βρούμε την συγκέντρωση  $x$  που απαιτείται για να ανασταλεί η δράση του DPPH κατά 50% (δηλαδή το  $EC_{50}$  της ένωσης). Ως αποτέλεσμα, λοιπόν, προκύπτει ότι η ένωση **35** έχει  $EC_{50} = 117 \mu M$ .

Την τιμή  $EC_{50}$  μπορούμε και να την υπολογίσουμε ως τα ηmol της ένωσης **35** που απαιτούνται για 50% αναστολή προς τα μmol DPPH που τοποθετήθηκαν από την αρχή στην αντίδραση. Ο υπολογισμός αυτός γίνεται ως εξής:

Από την συγκέντρωση του  $EC_{50} = 117 \mu M$ , εξαγάγουμε το συμπέρασμα ότι απαιτείται διάλυμα της ένωσης **35** που θα περιέχει 117 μmol ουσίας σε 1000 mL MeOH (ορισμός της ποσότητας μM) για 50% ανασχεση του DPPH. Σε

κάθε κυψελίδα όμως, τοποθετούνται 20  $\mu\text{L}$  διαλύματος ουσίας. Με υπολογισμό, λοιπόν, σε κάθε κυψελίδα τοποθετούνται 2.35  $\text{nmol}$  ουσίας. Επίσης, σε κάθε κυψελίδα τοποθετείται 1.5  $\text{mL}$  διαλύματος DPPH συγκέντρωσης 83.7  $\mu\text{M}$ , δηλαδή σε κάθε κυψελίδα προστίθενται 0.125  $\mu\text{mol}$  DPPH. Με διαίρεση των  $\text{nmol}$  ουσίας που απαιτούνται για να ανασταλεί το DPPH κατά 50% και των  $\mu\text{mol}$  DPPH που υπάρχουν από την αρχή στην κυψελίδα, προκύπτει η τιμή  $\text{EC}_{50} = 19 \text{ nmol}_{35}/\mu\text{mol}_{\text{DPPH}}$  για την ένωση **35**.

Επιπροσθέτως, για τη μελέτη της αντιοξειδωτικής δράσης κάθε ουσίας, σύμφωνα με την μελέτη που παρουσιάστηκε το 2015,<sup>183</sup> είναι σημαντικό να υπολογίσουμε και τις εξής τιμές (Κεφάλαιο 2.5.9):

- MR = μοριακή αναλογία φαινολικής ένωσης/DPPH σε κάθε κυψελίδα για την κάθε συγκέντρωση.
- StR = η στοιχειομετρική αναλογία των  $\text{nmol}$  του DPPH που καταναλώθηκαν προς τα  $\text{nmol}$  ουσίας που έχουν παραμείνει στην αντίδραση. Η τιμή αυτή υπολογίζεται από τον τύπο:

$$\text{StR} = \frac{\% \text{RSA}}{\text{MR} * 100}$$

Με αυτόν τον τρόπο μπορούμε να έχουμε για την ένωση **35** τους παρακάτω συγκεντρωτικούς πίνακες που περιγράφουν πλήρως την αντιοξειδωτική της δράση συναρτήσει και του **χρόνου** της αντίδρασης με το DPPH και της **συγκέντρωσης** της ουσίας (Πίνακες 18 και 19):

**Πίνακας 18: Παράμετροι MR,  $t_1$ ,  $t_2$ , %RSA<sub>1</sub>, %RSA<sub>2</sub>, StR<sub>1</sub> και StR<sub>2</sub> για τις διάφορες συγκεντρώσεις της ένωσης 35.**

C( $\mu\text{M}$ )	MR	$t_1(\text{min})$	$t_2(\text{min})$	%RSA <sub>1</sub>	%RSA <sub>2</sub>	StR <sub>1</sub>	StR <sub>2</sub>
<b>500</b>	0.08	0.3	0.3	77.0	77.0	9.6	9.6
<b>250</b>	0.04	1.6	60	42.6	73.9	10.7	18.5
<b>125</b>	0.02	1.3	120	17.2	59.8	8.6	29.9
<b>62.5</b>	0.01	0.7	110	14.5	30.4	14.5	30.4

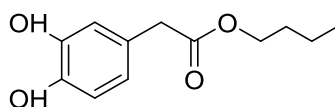
Πίνακας 19: Το EC<sub>50</sub> της ένωσης 35 σε mM και σε nmol<sub>35</sub>/μmol<sub>DPPH</sub>.

EC <sub>50</sub> (μM)	EC <sub>50</sub> (nmol <sub>35</sub> /μmol <sub>DPPH</sub> )
117	19

Στη συνέχεια παρουσιάζονται ενδεικτικά οι καμπύλες %RSA-χρόνου που προέκυψαν από την αντιοξειδωτική μελέτη για τη δράση κάποιων ενώσεων. Παρουσιάζεται ένα παράδειγμα από κάθε τύπο ένωσης (μονοεστέρας, διαμίδιο, αμίδιο, αμιδικός εστέρας), καθώς και το διάγραμμα από την μελέτη της αντιοξειδωτικής δράσης του μητρικού 3,4-διυδροξυφαιτυλοξικού οξέος.

### Μονοεστέρας

Παρουσιάζεται το διάγραμμα από τις καμπύλες %RSA-χρόνου της ένωσης **48** (Σχήμα 65):

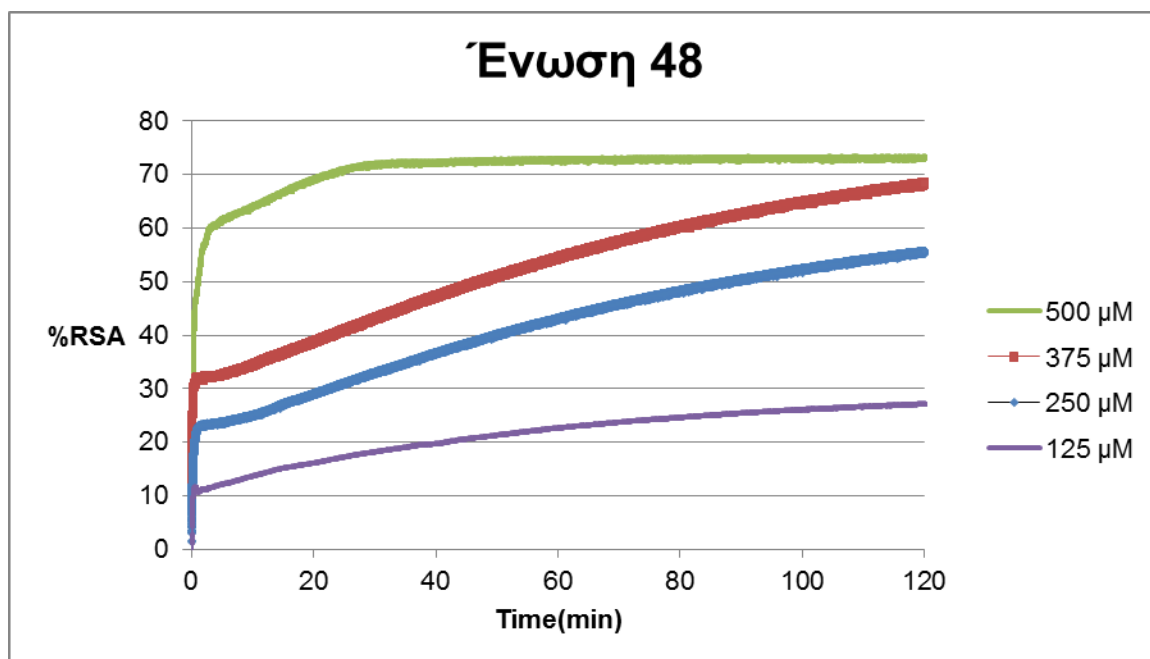


48

Σχήμα 65: Δομή της ένωσης 48.

Τα διαγράμματα αυτής της ένωση είναι (Σχήμα 66):





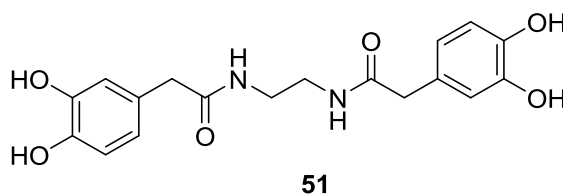
**Σχήμα 66: Διάγραμμα %RSA-χρόνου του μίγματος DPPH και των διαλυμάτων συγκέντρωσης 500, 375, 250 και 125  $\mu\text{M}$  για την ένωση 48.**

Όπως βλέπουμε στο παραπάνω διάγραμμα στη συγκέντρωση των 500  $\mu\text{M}$ , η ένωση αργεί, σε σχέση με την ένωση **35**, να φτάσει στο πλατώ του χρόνου, όπου η απορρόφηση μένει σταθερή. Επίσης, οι καμπύλες των μικρότερων συγκεντρώσεων (375, 250 και 125  $\mu\text{M}$ ) δεν κατάφεραν να ευθυγραμμιστούν στο χρονικό διάστημα των δύο ωρών. Καταλήγουμε, έτσι στο συμπέρασμα ότι η ένωση δεν παρουσιάζει τόσο ισχυρή αντιοξειδωτική δράση σε χαμηλότερες συγκεντρώσεις.

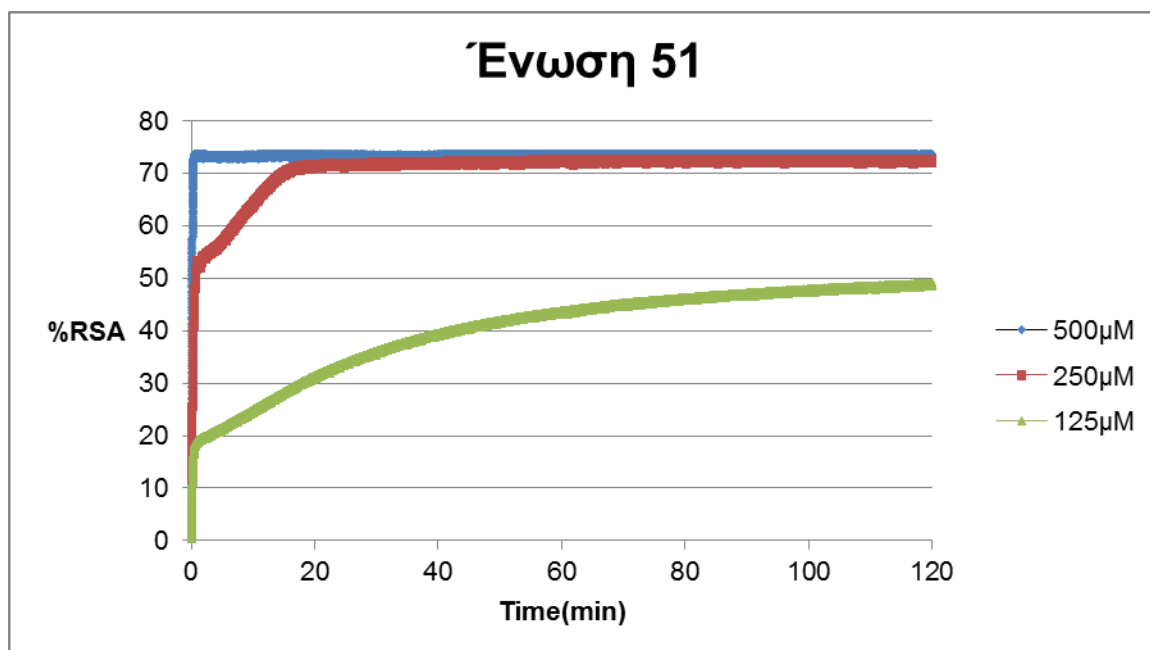
Το  $\text{EC}_{50}$  της ένωσης είναι 263  $\mu\text{M}$ , μεγαλύτερο της ένωσης του διεστερά, κάτι που είναι λογικό, καθώς ο διεστέρας περιέχει τέσσερα φαινολικά υδροξύλια στο μόριό του, ενώ ο μονοεστέρας δύο.

### Διαμίδιο

Τα αντίστοιχα διαγράμματα που προέκυψαν για το διαμίδιο **51** που παρασκευάστηκε (Σχήμα 67) είναι τα εξής (Σχήμα 68):



**Σχήμα 67: Δομή της ένωσης 51.**

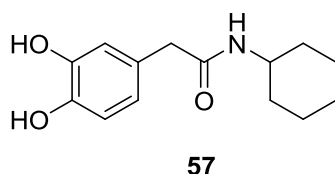


**Σχήμα 68: Διάγραμμα %RSA-χρόνου του μίγματος DPPH και των διαλυμάτων συγκέντρωσης 500, 250 και 125 μM για την ένωση 51.**

Στο παραπάνω διάγραμμα παρατηρούμε ότι και σε αυτήν την ένωση, όπως και στην ένωση **35**, στην συγκέντρωση των 500 μM η απορρόφηση σταθεροποιείται εξαιρετικά γρήγορα (κι εδώ στα 0.3 λεπτά). Επιπλέον για το διαμίδιο **51**, βλέπουμε ότι και η καμπύλη της συγκέντρωσης των 250 μM φτάνει αρκετά γρήγορα σε πλατώ (στα 16 λεπτά) και με αρκετά υψηλή μέγιστη ανάσχεση, ενώ ακόμα και η καμπύλη της συγκέντρωσης των 125 μM, αν και δεν καταφέρνει να ευθυγραμμιστεί στις 2 ώρες, εντούτοις παρουσιάζει αρκετά μεγάλη μέγιστη ανάσχεση. Το EC<sub>50</sub> της ένωσης **51** υπολογίστηκε 39 μM, μικρότερο από αυτό του διστέρα.

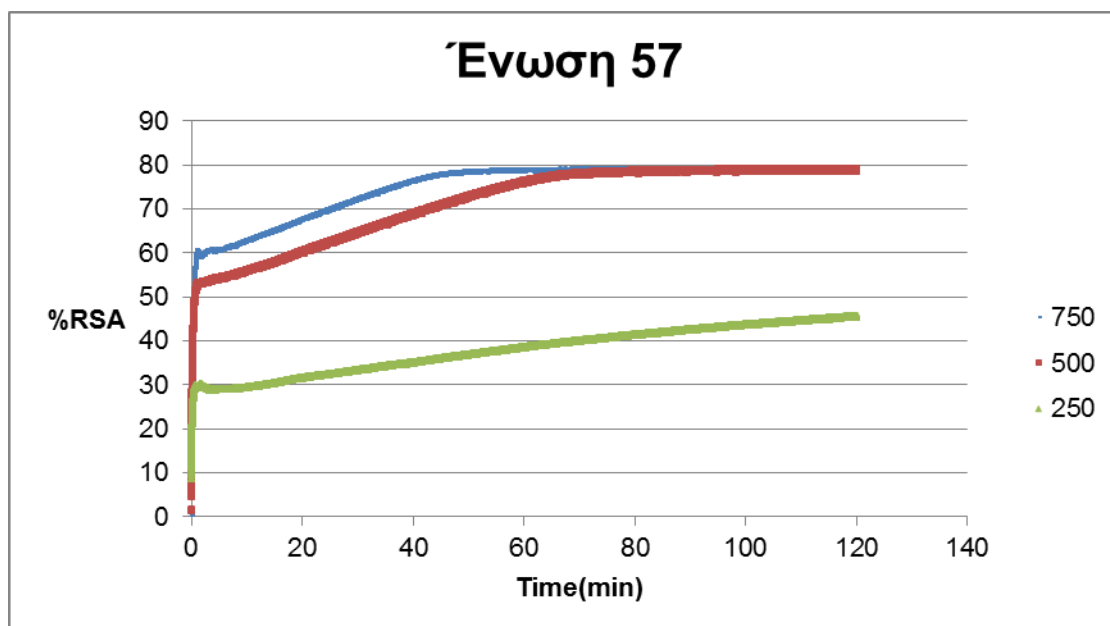
### Μονοαμίδιο

Το επόμενο διάγραμμα που παρουσιάζεται είναι της ένωσης **57** (Σχήμα 69):



**Σχήμα 69: Δομή της ένωσης 57.**

Το συνολικό διάγραμμα των καμπυλών όλων των συγκεντρώσεων του μονοαμιδίου **57** που μελετήθηκαν, είναι το εξής (Σχήμα 70):

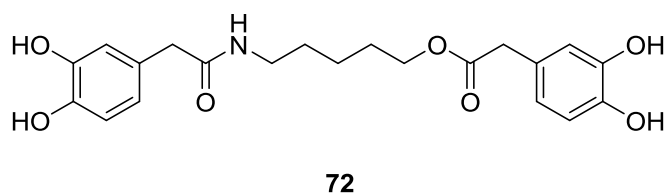


**Σχήμα 70: Διάγραμμα %RSA-χρόνου του μίγματος DPPH και των διαλυμάτων συγκέντρωσης 750, 500 και 250  $\mu\text{M}$  για την ένωση 57.**

Παρατηρούμε στο παραπάνω διάγραμμα ότι οι μέγιστες ανασχέςεις, τόσο της συγκέντρωσης των 750  $\mu\text{M}$ , όσο και των 500  $\mu\text{M}$ , αν και φτάνουν στην ίδια τιμή, ο χρόνος που απαιτείται είναι αρκετά μεγάλος (50 και 68 λεπτά αντίστοιχα). Το  $\text{EC}_{50}$  της ένωσης **57** υπολογίστηκε ότι είναι 239  $\mu\text{M}$ .

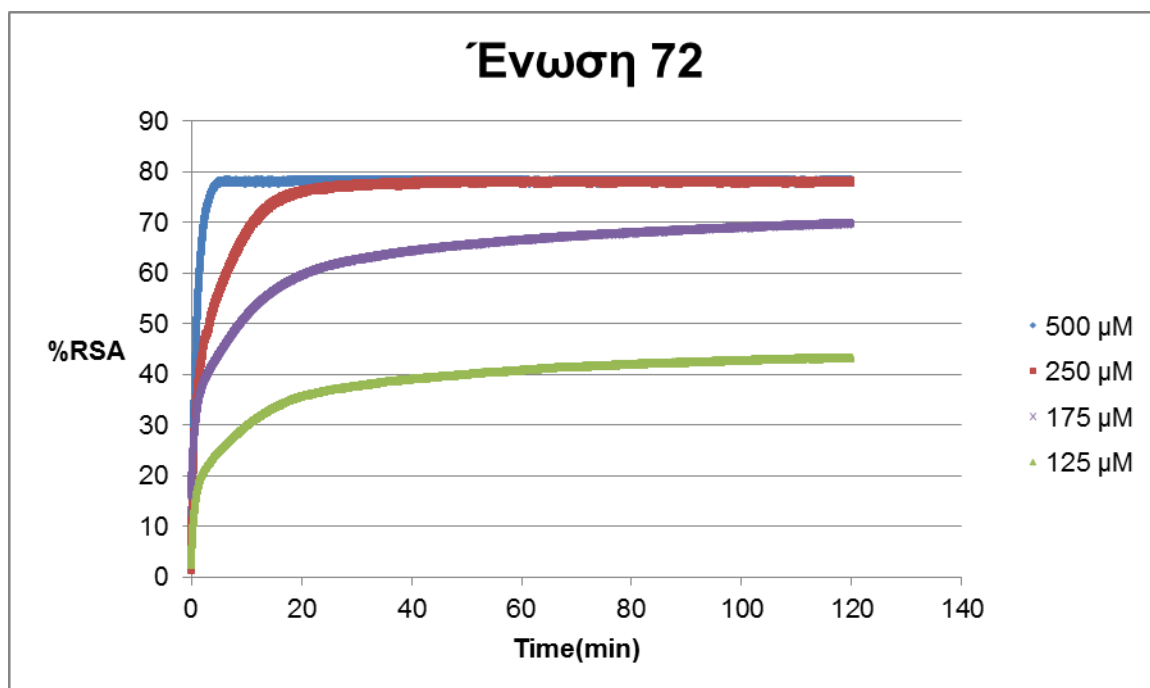
### Αμιδικός εστέρας

Παρουσιάζεται ένα διάγραμμα από αμιδικό εστέρα και συγκεκριμένα την ένωση **72** (Σχήμα 71):



**Σχήμα 71: Δομή της ένωσης 72.**

Το διάγραμμα %RSA-χρόνου για τις διάφορες συγκεντρώσεις που δοκιμάστηκαν για την συγκεκριμένη ένωση είναι (Σχήμα 72):



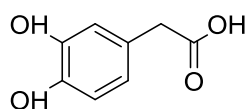
**Σχήμα 72: Διάγραμμα %RSA-χρόνου του μίγματος DPPH και των διαλυμάτων συγκέντρωσης 500, 250, 175 και 125 μM για την ένωση 72.**

Στην συγκεκριμένη ένωση παρατηρούμε ότι όλες οι μέγιστες ανασχές της κάθε συγκέντρωσης είναι αρκετά υψηλές, ακόμα και της συγκέντρωσης των 125 μM, και μάλιστα όλες σχεδόν έχουν φτάσει σε σημείο ευθυγράμμισης. Επίσης, οι χρόνοι, στους οποίους φτάνουν στο πλατώ είναι μικροί για τις δύο μεγαλύτερες συγκεντρώσεις (5 λεπτά για την συγκέντρωση των 500 μM και 21 λεπτά για αυτήν των 250 μM).

Το  $EC_{50}$  για την ένωση **72** υπολογίστηκε ότι είναι 17 μM. Παρατηρούμε ότι το  $EC_{50}$  του αμιδικού εστέρα **72** είναι μικρότερο από αυτό του διεστέρα **35** και των μονοϋποκατεστημένων παραγώγων **48** και **57**. Το  $EC_{50}$  της ένωσης αυτής όμως είναι μικρότερο και από αυτό του διαμιδίου **51**.

### 3,4-διυδροξυφαιτυλοξικό οξύ

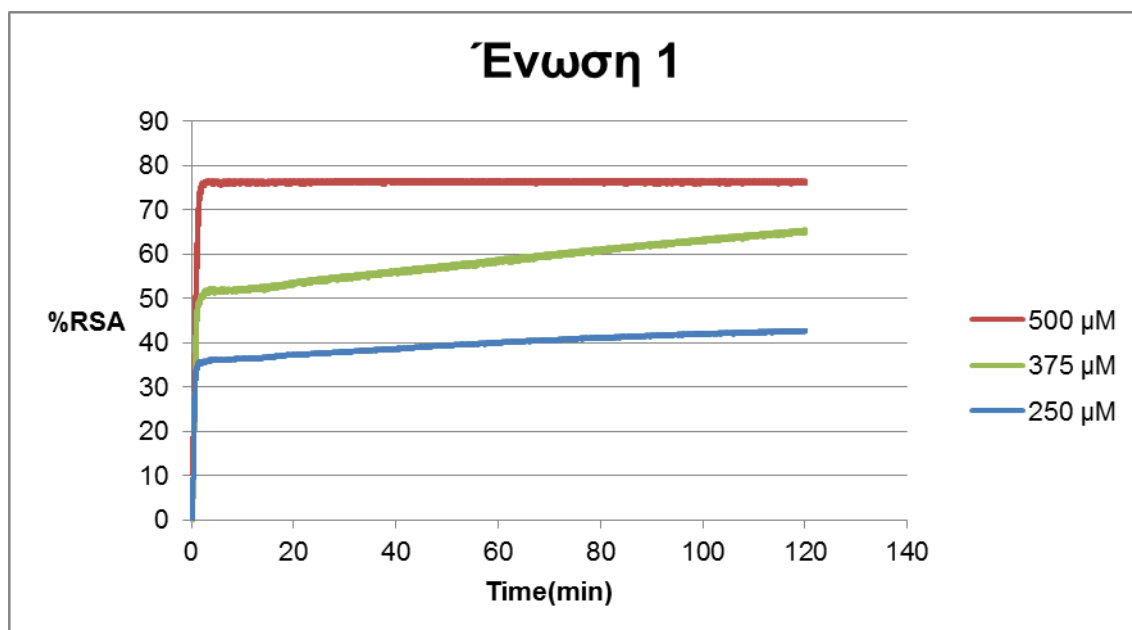
Τέλος, μελετήθηκε και η αντιοξειδωτική δράση του μητρικού οξέος DOPAC, το οποίο είναι εμπορικά διαθέσιμο (Σχήμα 73):



1

**Σχήμα 73: Δομή της ένωσης 1.**

Το διάγραμμα με τις καμπύλες %RSA-χρόνου για τα διαλύματα της ένωσης 1 στις διάφορες συγκεντρώσεις είναι (Σχήμα 74):



Σχήμα 74: Διάγραμμα %RSA-χρόνου του μίγματος DPPH και των διαλυμάτων συγκέντρωσης 500, 375 και 250  $\mu\text{M}$  για την ένωση 1.

Στο παραπάνω διάγραμμα παρατηρούμε ότι στην συγκέντρωση των 500  $\mu\text{M}$ , η καμπύλη ευθυγραμμίζεται πολύ απότομα, οπότε στην πραγματικότητα οι χρόνοι  $t_1$  και  $t_2$  συμπίπτουν. Το  $\text{EC}_{50}$  της ένωσης 1 υπολογίστηκε ότι είναι 290  $\mu\text{M}$ , μεγαλύτερο δηλαδή από τις ενώσεις που μελετήσαμε μέχρι τώρα.

## 5.2 Συνολικά αποτελέσματα αντιοξειδωτικής δράσης

Εφαρμόζοντας την παραπάνω διαδικασία, τα αποτελέσματα από την μελέτη της αντιοξειδωτικής δράσης για όλα τα τελικά προϊόντα που συντέθηκαν, καθώς και για την ένωση 1, παρουσιάζονται στον πίνακα (Πίνακας 20):

Πίνακας 20: Οι παράμετροι MR,  $t_1(\text{min})$ ,  $t_2(\text{min})$ , %RSA<sub>1</sub>, %RSA<sub>2</sub>, StR<sub>1</sub> και StR<sub>2</sub> για τις διάφορες συγκεντρώσεις όλων των ενώσεων που μελετήθηκαν ως προς την αντιοξειδωτική τους δράση.

Ένωση	C( $\mu\text{M}$ )	MR	$t_1(\text{min})$	$t_2(\text{min})$	%RSA <sub>1</sub>	%RSA <sub>2</sub>	StR <sub>1</sub>	StR <sub>2</sub>
32	375	0.06	8.5	8.5	76.4	76.4	12.7	12.7
	250	0.04	2.5	120	36.2	68.2	9.0	17.0

	125	0.02	2	120	14.9	33.4	7.5	16.7
<b>33</b>	500	0.08	25	25	76.7	76.7	9.6	9.6
	375	0.06	10	120	52.4	64.1	8.7	10.7
	250	0.04	6	120	32.4	42.3	8.1	10.6
	125	0.02	1	15	21.8	25.5	10.9	12.7
<b>34</b>	375	0.06	20	20	78.3	78.3	13.1	13.1
	250	0.04	3	80	38.0	75.5	9.5	18.9
	175	0.03	2	120	29.0	57.6	10.3	20.6
	125	0.02	1.6	25	18.5	26.3	9.2	13.1
<b>35</b>	500	0.08	0.3	0.3	77.0	77.0	9.6	9.6
	250	0.04	1.6	60	42.6	73.9	10.7	18.5
	125	0.02	1.3	120	17.2	59.8	8.6	29.9
	62.5	0.01	0.7	110	14.5	30.4	14.5	30.4
<b>36</b>	500	0.08	6	43	52.7	78.5	6.6	9.8
	375	0.06	1.5	30	52.6	72.9	8.8	12.1
	125	0.02	1.2	120	6.3	42.1	3.2	21.0
<b>45</b>	500	0.08	7	60	47.3	77.4	5.9	9.7
	375	0.06	5	120	32.9	65.4	5.5	10.9
	250	0.04	3	87	16.1	32.5	4.0	8.1
<b>46</b>	500	0.08	1.66	85	35.1	79.0	4.4	9.9
	375	0.06	0.7	83	34.5	73.1	5.8	12.2

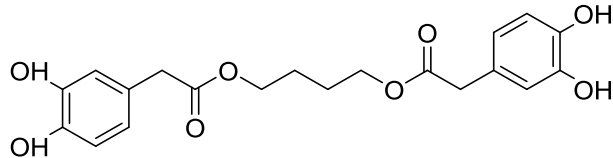
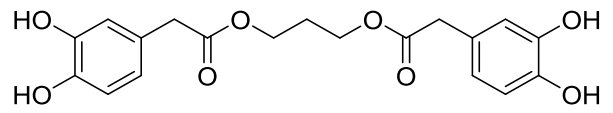
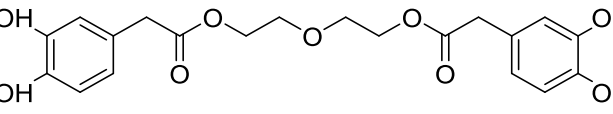
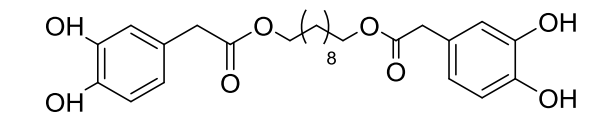
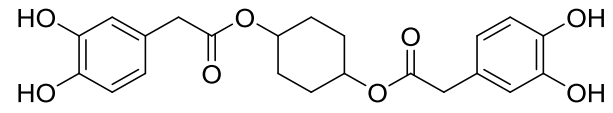
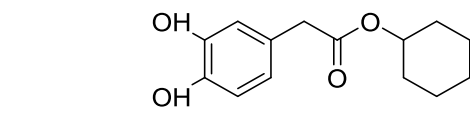
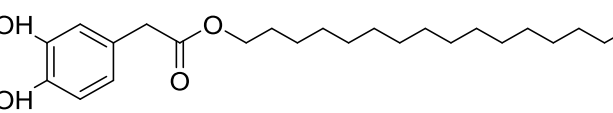
	250	0.04	0.49	120	17.5	38.7	4.4	9.7
<b>47</b>	500	0.08	1.6	46	44.9	72.3	5.6	9.0
	375	0.06	0.6	70	35.1	71.6	5.8	11.9
	250	0.04	0.3	120	23.0	65.3	5.7	16.3
	125	0.02	0.5	120	4.4	25.4	2.2	12.7
<b>48</b>	500	0.08	2	33	56.7	72.3	7.1	9.0
	375	0.06	0.3	120	34.4	68.4	5.7	11.4
	250	0.04	0.5	120	20.2	55.7	5.1	13.9
	125	0.02	0.2	120	9.8	27.2	4.9	13.6
<b>51</b>	500	0.08	<b>0.3</b>	<b>0.3</b>	72.2	72.2	9.0	9.0
	250	0.04	<b>0.22</b>	<b>16</b>	29.3	70.8	7.3	17.7
	125	0.02	<b>0.4</b>	<b>113</b>	16.7	48.6	8.4	24.3
<b>56</b>	750	0.12	1.66	45	59.5	76.0	5.0	6.3
	500	0.08	0.6	120	46.2	78.3	5.8	9.8
	375	0.06	0.5	120	44.1	72.6	7.3	12.1
	300	0.048	0.45	120	11.7	37.0	2.4	7.7
	250	0.04	0.2	120	21.7	31.7	5.4	7.9
	125	0.02	0.15	60	19.6	25.1	9.8	12.6
<b>57</b>	750	0.12	1.66	50	59.3	78.6	4.9	6.6
	500	0.08	1	68	52.9	77.8	6.6	9.7
	250	0.04	0.6	120	29.1	45.5	7.3	11.4

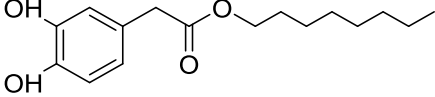
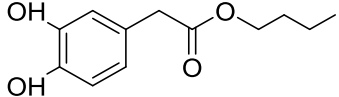
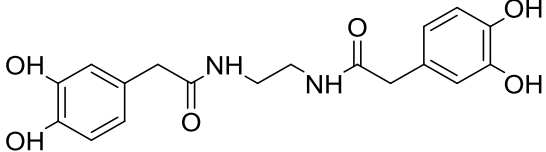
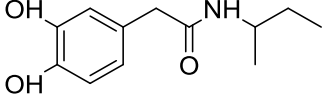
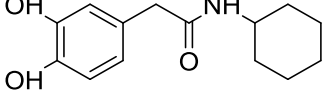
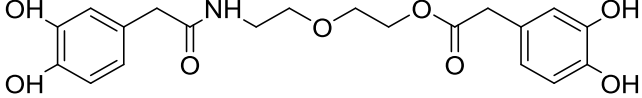
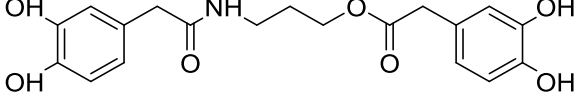
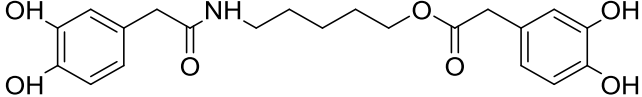
<b>70</b>	500	0.08	3.7	3.7	80.0	80.0	10.0	10.0
	250	0.04	3	70	40.7	60.8	10.2	15.2
	125	0.02	1	100	27.9	49.4	13.9	24.7
<b>71</b>	500	0.08	3	3	80.5	80.5	10.1	10.1
	250	0.04	2.6	56	39.8	76.1	9.9	19.0
	125	0.02	1	88	26.6	45.1	13.3	22.6
<b>72</b>	500	0.08	<b>5</b>	<b>5</b>	78.1	78.1	9.8	9.8
	250	0.04	<b>1.6</b>	<b>21</b>	41.6	76.2	10.4	19.1
	175	0.028	<b>1.3</b>	<b>95</b>	34.7	68.8	12.4	24.6
	125	0.02	<b>1.4</b>	<b>120</b>	18.7	43.2	9.3	21.6
<b>73</b>	500	0.08	4.5	4.5	79.4	79.4	9.9	9.9
	375	0.06	4	4	74.1	74.1	12.3	12.3
	125	0.02	1	66	22.3	38.1	11.1	19.1
<b>1</b>	500	0.08	3	3	76.3	76.3	9.5	9.5
	375	0.06	1.66	120	49.8	65.2	8.3	10.9
	250	0.04	0.8	120	33.4	42.8	8.4	10.7

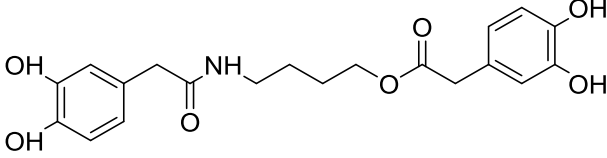
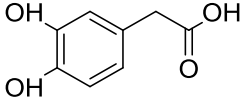
Στον επόμενο πίνακα παρουσιάζονται οι τιμές EC<sub>50</sub> των ενώσεων (Πίνακας 21):



Πίνακας 21: Τιμές  $EC_{50}$  των ενώσεων που μελετήθηκαν ως προς την αντιοξειδωτική τους δράση σε  $\mu M$  και  $nmol_{ουσίας}/\mu mol_{DPPH}$ .

Δομή	$EC_{50}$ ( $\mu M$ )	$EC_{50}$ ( $nmol_{ουσίας}/\mu mol_{DPPH}$ )
 <p style="text-align: center;"><b>32</b></p>	195	31
 <p style="text-align: center;"><b>33</b></p>	297	48
 <p style="text-align: center;"><b>34</b></p>	181	29
 <p style="text-align: center;"><b>35</b></p>	117	19
 <p style="text-align: center;"><b>36</b></p>	190	30
 <p style="text-align: center;"><b>45</b></p>	328	52
 <p style="text-align: center;"><b>46</b></p>	291	46

 <p style="text-align: center;"><b>47</b></p>	239	38
 <p style="text-align: center;"><b>48</b></p>	263	42
 <p style="text-align: center;"><b>51</b></p>	<b>39</b>	<b>6</b>
 <p style="text-align: center;"><b>56</b></p>	347	55
 <p style="text-align: center;"><b>57</b></p>	239	38
 <p style="text-align: center;"><b>70</b></p>	125	20
 <p style="text-align: center;"><b>71</b></p>	73	11
 <p style="text-align: center;"><b>72</b></p>	<b>17</b>	<b>3</b>

 <p style="text-align: center;"><b>73</b></p>	239	38
 <p style="text-align: center;"><b>1</b></p>	290	46

Όπως, παρατηρούμε την καλύτερη αντιοξειδωτική δράση έχουν οι ενώσεις **51** και **72**, τόσο ως προς τον **χρόνο** της αντίδρασης με το DPPH, όσο και ως προς την **συγκέντρωση** της ουσίας.

### 5.3 Φυσικοχημικές ιδιότητες των ενώσεων που παρασκευάστηκαν

Σημαντικό ρόλο για την πιθανή περαιτέρω εφαρμογή των πολυφαινολικών ενώσεων παίζουν και οι φυσικοχημικές ιδιότητές τους. Οι ιδιότητες αυτές είναι:

- clogP: πρόκειται για τον συντελεστή κατανομής οκτανόλης-νερού, ο οποίος χρησιμοποιείται ως μέτρο της μοριακής υδροφοβικότητας. Η υδροφοβικότητα επηρεάζει την απορρόφηση της ένωσης, την βιοδιαθεσιμότητα, τις υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις ένωσης-υποδοχέα, τον μεταβολισμό των ενώσεων, όπως επίσης και την τοξικότητά τους.
- nON: αριθμός ατόμων που μπορούν να δεχτούν δεσμούς υδρογόνου.
- nOHNH: αριθμός ατόμων που μπορούν να δώσουν δεσμούς υδρογόνου.
- nrotb: ο αριθμός των δεσμών που μπορούν να περιστραφούν στις ενώσεις, ο οποίος αντιστοιχεί στην δυνατότητα των μορίων να προσδεθούν στους υποδοχείς και στην βιοδιαθεσιμότητά τους.
- TPSA: η μοριακή περιοχή πολικής επιφάνειας είναι μια πολύ χρήσιμη παράμετρος για την πρόβλεψη των ιδιοτήτων της μεταφοράς μιας ένωσης. Η πολική επιφάνεια ορίζεται ως το άθροισμα των επιφανειών των πολικών ατόμων (συνήθως οξυγόνα, άζωτα) σε ένα μόριο.<sup>190</sup>
- M.W.: μοριακό βάρος ένωσης

Σύμφωνα με τον κανόνα του Lipinsky («Κανόνας των 5»), μία ένωση για να είναι αξιόλογη από άποψη βιοδιαθεσιμότητας και για να μπορεί να θεωρηθεί πιθανό κατάλληλο φάρμακο πρέπει να έχει:<sup>191</sup>

- $\text{clogP} \leq 5$  (αλλά όχι και μικρότερο του 1)
- $\text{M.W.} \leq 500$
- $\text{nON} \leq 10$
- $\text{nNHOH} \leq 5$

ενώ  $\text{TPSA} \leq 140 \text{ \AA}^{192}$  και  $\text{nrotb} \leq 10$ .

Στον παρακάτω πίνακα παρουσιάζονται οι ιδιότητες αυτές, όπως υπολογίστηκαν με την χρήση του λογισμικού *Molinspiration* (Πίνακας 22):

**Πίνακας 22: Οι φυσικοχημικές ιδιότητες  $\text{clogP}$ ,  $\text{nON}$ ,  $\text{nOHNH}$ ,  $\text{nrotb}$ ,  $\text{TPSA}$  και  $\text{M.W.}$  των ενώσεων που μελετήθηκαν ως προς την αντιοξειδωτική τους δράση.**

Ένωση	$\text{clogP}$	$\text{nON}$	$\text{nOHNH}$	$\text{nrotb}$	$\text{TPSA}$	$\text{M.W.}$
<b>32</b>	2.25	8	4	11	133	390
<b>33</b>	1.98	8	4	10	133	376
<b>34</b>	1.32	9	4	12	143	406
<b>35</b>	5.28	8	4	17	133	474
<b>36</b>	2.63	8	4	8	133	416
<b>45</b>	2.92	4	2	4	67	250
<b>46</b>	8.41	4	2	18	67	392
<b>47</b>	4.47	4	2	10	67	280
<b>48</b>	2.45	4	2	6	67	224
<b>51</b>	0.20	8	6	7	139	360
<b>56</b>	1.46	4	3	4	69	223

<b>57</b>	2.16	4	3	3	69	249
<b>70</b>	0.75	9	5	11	145	405
<b>71</b>	1.22	8	5	9	136	375
<b>72</b>	2.00	8	5	11	136	403
<b>73</b>	1.49	8	5	10	136	389
<b>1</b>	0.39	4	3	2	78	168

Τα δεδομένα που παρουσιάζονται παραπάνω υποδηλώνουν ότι κάποιες από τις ενώσεις που παρασκευάστηκαν είναι πάνω από τα όρια του κανόνα του Lipinsky για τις ιδιότητες των χημικών ενώσεων.

Παρατηρούμε ότι η αρχική ένωση **1** έχει  $\text{clogP} = 0.39$  και με εξαίρεση τις ενώσεις **51** και **70**, οι οποίες έχουν επίσης χαμηλές τιμές (0.20 και 0.75 αντίστοιχα), όλες οι άλλες ενώσεις που συντέθηκαν έχουν βελτιωμένη λιποφιλικότητα. Η ένωση **46** αντίθετα έχει αρκετά υψηλή τιμή (8.41) λόγω της 16-μελούς αλειφατικής αλυσίδας της και η ένωση **35** έχει τιμή  $\text{clogP}$  που ξεπερνά ελάχιστα το ανώτατο όριο (5.28) εξαιτίας της 10-μελούς ενδιάμεσης αλειφατικής της αλυσίδας.

Καμία ένωση δεν ξεπερνάει το όριο για το μοριακό βάρος, που πρέπει να είναι μικρότερο από 500.

Όλες οι ενώσεις περιέχουν στο μόριο τους λιγότερο από 10 άτομα που μπορούν να δεχτούν δεσμούς υδρογόνου,  $n\text{ON}$  (δηλαδή άτομα O και N), που είναι το ανώτερο όριο σε μία ένωση. Επίσης, όλες οι ενώσεις έχουν μέχρι 5 άτομα υδρογόνου που μπορούν να δώσουν δεσμούς υδρογόνου,  $n\text{NHOH}$ , εκτός του διαμιδίου **51** που έχει 6 τέτοια υδρογόνα.

Επιπλέον, οι περισσότερες ενώσεις που παρασκευάστηκαν είναι κάτω από το όριο των 140 Å για την TPSA. Μόνο οι ενώσεις **34** και **70**, που περιέχουν στις ενδιάμεσες αλειφατικές τους αλυσίδες κι έναν αιθερικό δεσμό, είναι πάνω από αυτό το όριο.

Τέλος, στον πίνακα παρουσιάζεται και ο αριθμός των δεσμών που μπορούν να περιστραφούν στις ενώσεις. Οι ενώσεις **32**, **34**, **35**, **46**, **70** και **72**

βρίσκονται πάνω από το όριο ( $n_{rotb} \leq 10$ ), καθώς είναι οι ενώσεις με τις μεγαλύτερες αλειφατικές αλυσίδες.

Συνοπτικά, σε γενικές γραμμές όλες οι ενώσεις ακολουθούν τον κανόνα των 5 του Lipinsky, εκτός από κάποιες εξαιρέσεις. Οι ενώσεις με την μεγαλύτερη απόκλιση από τον κανόνα είναι οι **34**, **35**, **51** και **70**.

#### 5.4 Συμπεράσματα

Από την μελέτη ως προς την αντιοξειδωτική δράση των ενώσεων που συντέθηκαν καταλήξαμε στα εξής συμπεράσματα:

1. Οι ενώσεις **72** και **51** παρουσίασαν την ισχυρότερη αντιοξειδωτική δράση ( $EC_{50} = 17$  και  $39 \mu M$ , αντίστοιχα) σε μικρό χρονικό διάστημα από την έναρξη της αντίδρασης.
2. Η αντιοξειδωτική δράση εξαρτάται από την παρουσία και τον αριθμό των κατεχολών και των υδροξυλικών ομάδων που υπάρχουν στις ενώσεις, καθώς και από τον αριθμό ομάδων που είναι δότες ηλεκτρονίων.<sup>193</sup> Όλες οι ενώσεις που περιέχουν στο μόριο τους δύο μονάδες κατεχόλης παρουσιάζουν μεγαλύτερη αντιοξειδωτική δράση από τα μονοϋποκατεστημένα παράγωγα, μονοαμίδια και μονοεστέρες, με μία μονάδα κατεχόλης. Εξαιρεση αποτελεί ο διεστέρας **33**.
3. Με εξαίρεση τις ενώσεις **33**, **45**, **46** και **56** όλες οι υπόλοιπες παρουσίασαν βελτιωμένη αντιοξειδωτική δράση σε σχέση με το μητρικό 3,4-διυδροξυφαιτυλοξικό οξύ, ενώ έχουν και καλύτερες φυσικοχημικές ιδιότητες.
4. Οι ενώσεις που έχουν στο μόριο τους πιο ηλεκτρονιοελκτικές ομάδες (π.χ. αμίδια) σε σχέση με άλλες που έχουν λιγότερο ηλεκτρονιοελκτικές (π.χ. εστέρες) παρουσιάζουν ισχυρότερη αντιοξειδωτική δράση.
5. Τέλος, παρατηρούμε το φαινόμενο cut-off της αντιοξειδωτικής δράσης μιας ένωσης σε σχέση με την λιποφιλικότητα της. Ενώσεις με αυξημένη λιποφιλικότητα,<sup>194,195</sup> βελτιώνουν την αντιοξειδωτική δράση, καθώς κατέχουν καλύτερη θέση στην μεσόφαση της λιπιδικής/υδατικής φάσης όπου λαμβάνει χώρα η οξειδωση.<sup>196</sup> Η αύξηση της λιποφιλικότητας δεν είναι πάντα ωφέλιμη.<sup>197</sup> Συνήθως, η αντιοξειδωτική δράση μιας ένωσης αυξάνεται, όσο αυξάνεται η αλκυλική αλυσίδα της, μέχρι όμως ένα

ορισμένο σημείο, το οποίο λέγεται κρίσιμο μήκος αλυσίδας και δεν είναι συγκεκριμένο, αλλά εξαρτάται από την εκάστοτε ένωση. Το φαινόμενο αυτό ονομάζεται cut-off επίδραση.<sup>198</sup> Για παράδειγμα, βλέπουμε ότι η ένωση **47** με μια 8-μελή ανθρακική αλυσίδα, έχει καλύτερη δράση από την **48** που έχει μια 4-μελή. Θα υπέθετε δηλαδή κανείς ότι με την αύξηση της λιποφιλικότητας, αυξάνεται συνεχώς και η αντιοξειδωτική δράση. Όμως, τελικά κάτι τέτοιο δεν ισχύει και ενώ θα περιμέναμε η ένωση **46** με την μεγαλύτερη λιποφιλικότητα (16-μελής αλυσίδα) να παρουσίαζε ισχυρότερη δράση από την **47**, εντούτοις συμβαίνει το αντίθετο.

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6

### ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ – ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΙ ΕΝΩΣΕΩΝ

#### 6.1 Γενικό Πειραματικό Μέρος

##### 6.1.1 Αντιδραστήρια, διαλύτες

Τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν για την παρασκευή των ενώσεων που περιγράφονται στην παρούσα εργασία ήταν εμπορικώς διαθέσιμα προϊόντα των εταιριών Aldrich, Merck, Fluka και Alfa-Aesar. Η καθαρότητα των αντιδραστηρίων ήταν 99% και άνω και χρησιμοποιήθηκαν χωρίς περαιτέρω καθαρισμό. Οι διαλύτες ήταν υψηλής καθαρότητας (99%) των εταιριών Labscan και Merck. Το  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  που χρησιμοποιήθηκε ως διαλύτης στις αντιδράσεις είχε ως σταθεροποιητή αμυλένιο. Στις περιπτώσεις που απαιτήθηκε η χρήση ξηρών διαλυτών, οι εμπορικά διαθέσιμοι διαλύτες υπέστησαν περαιτέρω επεξεργασία: το  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  φυλάχθηκε πάνω από μοριακά κόσκινα.

##### 6.1.2 Χρωματογραφική ανάλυση

Για τον έλεγχο της πορείας των αντιδράσεων χρησιμοποιήθηκε η τεχνική της χρωματογραφίας λεπτής στιβάδας (Thin Layer Chromatography, TLC). Χρησιμοποιήθηκαν πλάκες αλουμινίου, πάχους 0.25 mm, επιστρωμένες με silica gel και φθορίζον υλικό που απορροφά στα 254 nm (Silica gel 60 F254) της εταιρίας Merck. Ο χρωματογραφικός χαρακτηρισμός των ενώσεων πραγματοποιήθηκε με τη μέτρηση του συντελεστή ανάσχεσης ( $R_f$ ) σε διάφορα συστήματα ανάπτυξης. Για την εμφάνιση των χρωματογραφιών χρησιμοποιήθηκε λάμπα υπεριώδους ακτινοβολίας (254 nm). Οι ενώσεις που συντέθηκαν καθαρίστηκαν με χρωματογραφία στήλης. Η έκλουση πραγματοποιήθηκε είτε με τη δύναμη της βαρύτητας (στήλη gravity) είτε με εφαρμογή πίεσης (στήλη flash). Στις στήλες gravity χρησιμοποιήθηκε ως υλικό πλήρωσης Silica gel 60 (0.063-0.200 mm) της εταιρίας Merck, ενώ η πλήρωση των στηλών flash πραγματοποιήθηκε με Silica gel RP-18 (0.040-0.063 mm) της ίδιας εταιρίας. Τα συστήματα έκλουσης που χρησιμοποιήθηκαν είναι διαφορετικά για κάθε ένωση και αναφέρονται στις πειραματικές μεθόδους.



### 6.1.3 Ταυτοποίηση/Χαρακτηρισμός ενώσεων

**Φασματοσκοπία μάζας (MASS):** Το όργανο φασματοσκοπίας μαζών ThermoFinnigan Surveyor MSQ του Εργαστηρίου Οργανικής Χημείας χρησιμοποιήθηκε για τη λήψη φασμάτων μάζας με τη μέθοδο ESI (ElectroSpray Ionization, ιονισμός μέσω ηλεκτροψεκασμού).

**Φασματοσκοπία Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού (NMR):** Οι ενώσεις που παρασκευάστηκαν, ταυτοποιήθηκαν και χαρακτηρίστηκαν με  $^1\text{H}$  και  $^{13}\text{C}$  φασματοσκοπία NMR. Το όργανο που διαθέτει το Εργαστήριο Οργανικής Χημείας είναι τύπου Mercury 200 MHz Varian. Η συχνότητα συντονισμού NMR για τα φάσματα  $^1\text{H}$  ήταν στα 200 MHz και για τα φάσματα  $^{13}\text{C}$  στα 50 MHz. Τα φάσματα  $^{13}\text{C}$  είναι πλήρως αποσυζευγμένα από πρωτόνιο. Οι δευτεριωμένοι διαλύτες που χρησιμοποιήθηκαν ήταν  $\text{CDCl}_3$ ,  $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$  και  $\text{d}_6$ -DMSO των εταιριών Euriso-top. Οι χημικές μετατοπίσεις ( $\delta$ ) εκφράζονται σε ppm. Οι τιμές των χημικών μετατοπίσεων του πρωτονιωμένου συστατικού που υπάρχει στους δευτεριωμένους διαλύτες ορίστηκαν μέσω βιβλιογραφίας και είναι οι εξής για τα φάσματα  $^1\text{H}$ : α.  $\text{CDCl}_3$  (7.27 ppm, χημική μετατόπιση πρόσμιξης  $\text{CHCl}_3$ ), β.  $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$  (2.05 ppm) γ.  $\text{d}_6$ -DMSO (2.50 ppm, μέσος όρος των χημικών μετατοπίσεων όλων των πρωτονιωμένων μορφών της  $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$ ). Ομοίως, για τα φάσματα  $^{13}\text{C}$ : α.  $\text{CDCl}_3$ : 77.00 ppm, β.  $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$ : 29.84 ppm, γ.  $\text{d}_6$ -DMSO: 39.52 ppm.

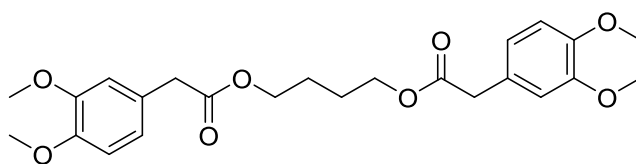
## 6.2 Συνθετικές μέθοδοι/χαρακτηρισμοί ενώσεων

### 6.2.1 Γενική μέθοδος εστεροποίησης για την παρασκευή διεστέρων/μονοεστέρων

Σε σφαιρική φιάλη προστίθενται το 3,4-διμεθοξυφαινυλοξικό οξύ (1.00 mmol),  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (10 mL), διόλη (0.39 mmol) για την παρασκευή διεστέρων ή αλκοόλη (1.00 mmol) για την παρασκευή μονοεστέρων, και DMAP 10% (0.01 g, 0.1 mmol). Το διάλυμα ψύχεται στους  $0^\circ\text{C}$  και προστίθεται το EDC.HCl (0.19 g, 1.00 mmol). Το μίγμα αναδεύεται στους  $0^\circ\text{C}$  για περίπου 30 λεπτά και έπειτα σε θερμοκρασία δωματίου για 24h. Στην συνέχεια το μίγμα της αντίδρασης μεταφέρεται ποσοτικά σε διαχωριστική χοάνη, όπου αραιώνεται με  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (15 mL). Ακολουθούν κατά σειρά οι εξής εκχυλίσεις της οργανικής φάσης με διάλυμα HCl 0.6 N (10 mL),  $\text{H}_2\text{O}$  (10 mL), διάλυμα  $\text{NaHCO}_3$  5% (10 mL),  $\text{H}_2\text{O}$

(10 mL) και κορεσμένο διάλυμα NaCl (10 mL). Η οργανική φάση συλλέγεται, ξηραίνεται με  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , ελέγχεται με TLC σε σύστημα ανάπτυξης  $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$  9.5:0.5 και συμπυκνώνεται. Το τελικό προϊόν παραλαμβάνεται καθαρό με χρωματογραφία στήλης σε σύστημα έκλουσης  $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$  9.5:0.5.

### Βουτανο-1,4-διυλο δι(2-(3,4-διμεθοξυφαινυλο)οξικός εστέρας) (27)



$\text{C}_{24}\text{H}_{30}\text{O}_8$   
Mol. Wt.: 446.50

Η παραπάνω ένωση παρασκευάστηκε σύμφωνα με την μέθοδο εστεροποίησης για την παρασκευή διεστέρα από την 1,4-βουτανοδιόλη **22** (0.05 g, 0.51 mmol) και το 3,4-διμεθοξυφαινυλοξικό οξύ. Καθαρίστηκε με χρωματογραφία στήλης σε σύστημα έκλουσης  $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$  9.5:0.5 και το επιθυμητό προϊόν παραλήφθηκε με την μορφή λευκού στερεού.

$\alpha = 88\%$  (0.18 g)

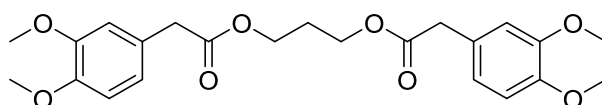
$R_f = (\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH} 9.5:0.5) = 0.63$

$^1\text{H NMR}$  (200 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  6.78 (s, 6H), 4.06 (s, 4H), 3.83 (d,  $J = 2.7$  Hz, 12H), 3.52 (s, 4H), 1.64 (s, 4H).

$^{13}\text{C NMR}$  (50 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  171.6, 148.6, 147.9, 126.2, 121.2, 112.1, 110.9, 64.0, 55.6, 55.6, 40.7, 25.0.

MS (ESI)  $m/z$  υπολογίζεται για  $\text{C}_{24}\text{H}_{34}\text{NO}_8^+$   $[\text{M}+\text{NH}_4]^+$  464.2, βρέθηκε 464.2.

### Προπано-1,3-διυλο δι(2-(3,4-διμεθοξυφαινυλο)οξικός εστέρας) (28)



$\text{C}_{23}\text{H}_{28}\text{O}_8$   
Mol. Wt.: 432.47

Η ένωση **28** παρασκευάστηκε σύμφωνα με την γενική μέθοδο εστεροποίησης για την παρασκευή διεστέρα από την 1,3-προπανοδιόλη **23** (0.04 g, 0.51 mmol) και το 3,4-διμεθοξυφαινυλοξικό οξύ. Καθαρίστηκε με χρωματογραφία στήλης σε σύστημα έκλουσης CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH 9.5:0.5 και το επιθυμητό προϊόν παραλήφθηκε με την μορφή κίτρινου λαδιού.

$\alpha$  = 37% (0.08 g)

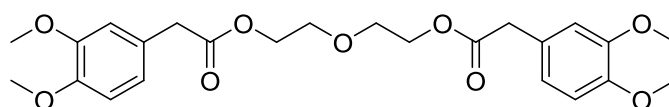
$R_f$  = (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH 9.5:0.5) = 0.76

<sup>1</sup>H NMR (200 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  6.78 (s, 6H), 4.12 (t,  $J$  = 6.3 Hz, 4H), 3.83 (dd,  $J$  = 2.6, 0.9 Hz, 12H), 3.52 (s, 4H), 2.00 – 1.86 (m, 2H).

<sup>13</sup>C NMR (50 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  171.5, 148.7, 147.9, 126.1, 121.2, 112.1, 110.9, 61.1, 55.7, 55.6, 40.6, 27.7.

MS (ESI)  $m/z$  υπολογίζεται για C<sub>23</sub>H<sub>32</sub>NO<sub>8</sub><sup>+</sup> [M+NH<sub>4</sub>]<sup>+</sup> 450.2, βρέθηκε 450.3.

#### Οξυδι(αιθανο-2,1-διυλο) δι(2-(3,4-διμεθοξυφαινυλο)οξικός εστέρας) (**29**)



C<sub>24</sub>H<sub>30</sub>O<sub>9</sub>  
Mol. Wt.: 462.49

Η παραπάνω ένωση παρασκευάστηκε σύμφωνα με την μέθοδο εστεροποίησης για την παρασκευή διεστέρα από την διαιθυλενογλυκόλη **24** (0.05 g, 0.51 mmol) και το 3,4-διμεθοξυφαινυλοξικό οξύ. Καθαρίστηκε με χρωματογραφία στήλης σε σύστημα έκλουσης CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH 9.5:0.5 και το επιθυμητό προϊόν παραλήφθηκε με την μορφή κίτρινου λαδιού.

$\alpha$  = 97% (0.23 g)

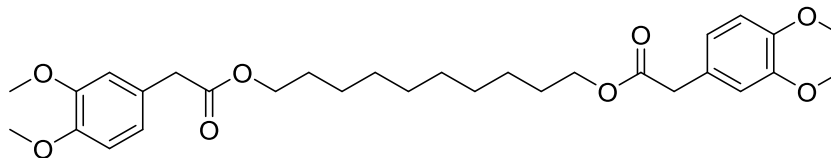
$R_f$  = (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH 9.5:0.5) = 0.83

<sup>1</sup>H NMR (200 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  6.75 (d,  $J$  = 3.0 Hz, 6H), 4.16 (dd,  $J$  = 5.2, 4.1 Hz, 4H), 3.79 (dd,  $J$  = 4.9, 1.1 Hz, 12H), 3.58 (dd,  $J$  = 5.3, 4.1 Hz, 4H), 3.52 (s, 4H).

<sup>13</sup>C NMR (50 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  171.4, 148.5, 147.7, 125.9, 121.1, 112.0, 110.8, 68.6, 63.5, 55.5, 55.5, 40.3.

MS (ESI)  $m/z$  υπολογίζεται για  $C_{24}H_{34}NO_9^+$   $[M+NH_4]^+$  480.2, βρέθηκε 480.2.

### Δεκανο-1,10-διυλο δι(2-(3,4-διμεθοξυφαινυλο)οξικός εστέρας) (30)



$C_{30}H_{42}O_8$   
Mol. Wt.: 530.66

Η ένωση **30** παρασκευάστηκε σύμφωνα με την γενική μέθοδο εστεροποίησης για την παρασκευή διεστέρα από την 1,10-δεκανοδιόλη **25** (0.09 g, 0.51 mmol) και το 3,4-διμεθοξυφαινυλοξικό οξύ. Καθαρίστηκε με χρωματογραφία στήλης σε σύστημα έκλουσης  $CH_2Cl_2/MeOH$  9.5:0.5 και το επιθυμητό προϊόν παραλήφθηκε με την μορφή λευκού στερεού.

$\alpha = 92\%$  (0.25 g)

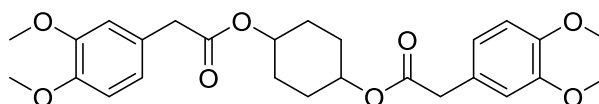
$R_f = (CH_2Cl_2/MeOH\ 9.5:0.5) = 0.89$

$^1H$  NMR (200 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$  6.73 (d,  $J = 4.4$  Hz, 6H), 3.99 (t,  $J = 6.6$  Hz, 4H), 3.81 – 3.71 (m, 12H), 3.46 (s, 4H), 1.51 (d,  $J = 5.9$  Hz, 4H), 1.18 (s, 12H).

$^{13}C$  NMR (50 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$  171.4, 148.4, 147.6, 126.2, 120.9, 111.9, 110.6, 64.4, 55.3, 55.3, 40.5, 28.9, 28.7, 28.1, 25.4.

MS (ESI)  $m/z$  υπολογίζεται για  $C_{30}H_{46}NO_8^+$   $[M+NH_4]^+$  548.3, βρέθηκε 548.3.

### Κυκλοεξανο-1,4-διυλο δι(2-(3,4-διμεθοξυφαινυλο)οξικός εστέρας) (31)



$C_{26}H_{32}O_8$   
Mol. Wt.: 472.53

Η παραπάνω ένωση παρασκευάστηκε σύμφωνα με την γενική μέθοδο εστεροποίησης για την παρασκευή διεστέρα από την 1,10-δεκανοδιόλη **26** (0.06 g, 0.51 mmol) και το 3,4-διμεθοξυφαινυλοξικό οξύ. Καθαρίστηκε με

χρωματογραφία στήλης σε σύστημα έκλουσης CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH 9.5:0.5 και το επιθυμητό προϊόν παραλήφθηκε με την μορφή λευκού στερεού.

$\alpha$  = 84% (0.20 g)

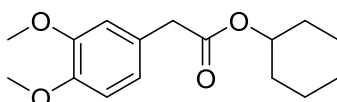
$R_f$  = (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH 9.5:0.5) = 0.86

<sup>1</sup>H NMR (200 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  6.79 (dd,  $J$  = 3.8, 2.8 Hz, 6H), 4.80 (s, 2H), 3.84 (t,  $J$  = 2.8 Hz, 12H), 3.51 (d,  $J$  = 5.2 Hz, 4H), 1.65 (ddd,  $J$  = 28.7, 21.5, 5.3 Hz, 8H).

<sup>13</sup>C NMR (50 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  170.8, 148.4, 147.6, 126.1, 120.9, 111.8, 110.6, 70.6, 55.4, 55.4, 40.8, 27.1, 26.8.

MS (ESI)  $m/z$  υπολογίζεται για C<sub>26</sub>H<sub>36</sub>NO<sub>8</sub><sup>+</sup> [M+NH<sub>4</sub>]<sup>+</sup> 490.2, βρέθηκε 490.2.

#### Κυκλοεξυλο 2-(3,4-διμεθοξυφαινυλο)οξικός εστέρας (41)



C<sub>16</sub>H<sub>22</sub>O<sub>4</sub>  
Mol. Wt.: 278.35

Η ένωση **41** παρασκευάστηκε σύμφωνα με την γενική μέθοδο εστεροποίησης για την παρασκευή μονοεστέρα από την κυκλοεξανόλη **37** (0.05 g, 0.51 mmol) και το 3,4-διμεθοξυφαινυλοξικό οξύ. Καθαρίστηκε με χρωματογραφία στήλης σε σύστημα έκλουσης CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH 9.5:0.5 και το επιθυμητό προϊόν παραλήφθηκε με την μορφή υποκίτρινου λαδιού.

$\alpha$  = 68% (0.09 g)

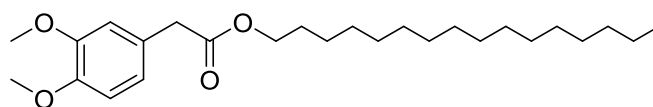
$R_f$  = (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH 9.5:0.5) = 0.79

<sup>1</sup>H NMR (200 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  6.81 (d,  $J$  = 4.3 Hz, 3H), 4.75 (s, 1H), 3.85 (dd,  $J$  = 2.7, 1.4 Hz, 6H), 3.52 (s, 2H), 1.71 (dd,  $J$  = 14.6, 8.6 Hz, 4H), 1.57 – 1.16 (m, 6H).

<sup>13</sup>C NMR (50 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  171.2, 148.6, 147.8, 126.7, 121.2, 112.1, 110.9, 72.9, 55.7, 55.7, 41.2, 31.4, 25.2, 23.5.

MS (ESI)  $m/z$  υπολογίζεται για C<sub>16</sub>H<sub>26</sub>NO<sub>4</sub><sup>+</sup> [M+NH<sub>4</sub>]<sup>+</sup> 296.2, βρέθηκε 296.4.

### Δεκαεξαλο 2-(3,4-διμεθοξυφαινυλο)οξικός εστέρας (42)



C<sub>26</sub>H<sub>44</sub>O<sub>4</sub>  
Mol. Wt.: 420.63

Η ένωση **42** παρασκευάστηκε σύμφωνα με την γενική μέθοδο εστεροποίησης για την παρασκευή μονοεστέρων από την δεκαεξανόλη **38** (0.12 g, 0.51 mmol) και το 3,4-διμεθοξυφαινυλοξικό οξύ. Καθαρίστηκε με χρωματογραφία στήλης με σύστημα έκλουσης CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH 9.5:0.5 και το επιθυμητό προϊόν παραλήφθηκε ως λευκό στερεό.

$\alpha$  = 78% (0.17 g)

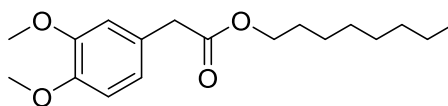
R<sub>f</sub> = (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH 9.5:0.5) = 0.88

<sup>1</sup>H NMR (200 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 6.78 (d, *J* = 3.9 Hz, 3H), 4.04 (td, *J* = 6.6, 1.6 Hz, 2H), 3.82 (dd, *J* = 3.7, 1.9 Hz, 6H), 3.50 (d, *J* = 1.6 Hz, 2H), 1.55 (d, *J* = 6.3 Hz, 2H), 1.22 (s, 26H), 0.84 (dd, *J* = 6.6, 4.8 Hz, 3H).

<sup>13</sup>C NMR (50 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 171.6, 148.6, 147.8, 126.4, 121.1, 112.1, 110.8, 64.7, 55.6, 55.5, 40.8, 31.7, 29.5, 29.5, 29.4, 29.3, 29.2, 29.0, 28.4, 25.7, 22.5, 13.9.

MS (ESI) *m/z* υπολογίζεται για C<sub>26</sub>H<sub>48</sub>NO<sub>4</sub><sup>+</sup>[M+NH<sub>4</sub>]<sup>+</sup> 438.4, βρέθηκε 438.3.

### Οκτυλο 2-(3,4-διμεθοξυφαινυλο)οξικός εστέρας (43)



C<sub>18</sub>H<sub>28</sub>O<sub>4</sub>  
Mol. Wt.: 308.42

Η παραπάνω ένωση παρασκευάστηκε σύμφωνα με την γενική μέθοδο εστεροποίησης για την παρασκευή μονοεστέρων από την *n*-οκτανόλη **39** (0.07 g, 0.51 mmol) και το 3,4-διμεθοξυφαινυλοξικό οξύ. Καθαρίστηκε με χρωματογραφία στήλης με σύστημα CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH 9.5:0.5 και το επιθυμητό προϊόν παραλήφθηκε ως άχρωμο λάδι.

$\alpha = 60\%$  (0.09 g)

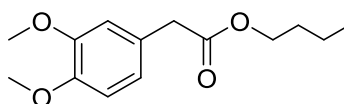
$R_f = (\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH } 9.5:0.5) = 0.89$

$^1\text{H NMR}$  (200 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  6.81 (s, 3H), 4.07 (td,  $J = 6.7, 2.1$  Hz, 2H), 3.88 – 3.83 (m, 6H), 3.54 (d,  $J = 1.9$  Hz, 2H), 1.68 – 1.53 (m, 2H), 1.25 (s, 10H), 0.86 (dd,  $J = 6.6, 4.6$  Hz, 3H).

$^{13}\text{C NMR}$  (50 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  171.9, 148.8, 148.0, 126.6, 121.3, 112.2, 111.0, 65.0, 55.8, 55.7, 40.9, 31.7, 29.1, 28.5, 25.8, 22.6, 14.1.

MS (ESI)  $m/z$  υπολογίζεται για  $\text{C}_{18}\text{H}_{32}\text{NO}_4^+[\text{M}+\text{NH}_4]^+$  326.2, βρέθηκε 326.1.

### Βουτυλο 2-(3,4-διμεθοξυφαινυλο)οξικός εστέρας (44)



$\text{C}_{14}\text{H}_{20}\text{O}_4$   
Mol. Wt.: 252.31

Η ένωση **44** παρασκευάστηκε σύμφωνα με την γενική μέθοδο εστεροποίησης για την παρασκευή μονοεστέρων από την 1-βουτανόλη **40** (0.04 g, 0.51 mmol) και το 3,4-διμεθοξυφαινυλοξικό οξύ. Καθαρίστηκε με χρωματογραφία στήλης με σύστημα έκλουσης  $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH } 9.5:0.5$  και το επιθυμητό προϊόν παραλήφθηκε ως άχρωμο λάδι.

$\alpha = 91\%$  (0.12 g)

$R_f = (\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH } 9.5:0.5) = 0.84$

$^1\text{H NMR}$  (200 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  6.78 (d,  $J = 2.1$  Hz, 3H), 4.06 (td,  $J = 6.6, 2.1$  Hz, 2H), 3.83 (dd,  $J = 3.1, 2.2$  Hz, 6H), 3.52 (d,  $J = 2.0$  Hz, 2H), 1.65 – 1.48 (m, 2H), 1.41 – 1.22 (m, 2H), 0.94 – 0.83 (m, 3H).

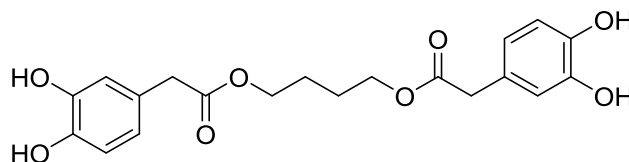
$^{13}\text{C NMR}$  (50 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  171.8, 148.7, 147.9, 126.5, 121.2, 112.1, 110.9, 64.5, 55.7, 55.6, 40.8, 30.5, 18.9, 13.5.

MS (ESI)  $m/z$  υπολογίζεται για  $\text{C}_{14}\text{H}_{24}\text{NO}_4^+[\text{M}+\text{NH}_4]^+$  270.2, βρέθηκε 270.2.

## 6.2.2 Γενική μέθοδος αποπροστασίας των φαινολικών υδροξυλίων των διεστέρων/μονοεστέρων

Σε σφαιρική φιάλη διαλύεται ο διεστέρας (1.00 mmol) σε  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (5 mL) και το μίγμα ψύχεται στους  $0^\circ\text{C}$  και πραγματοποιείται η προσθήκη του αντιδραστήριου  $\text{BF}_3 \cdot \text{SMe}_2$  (5.20 g, 40 mmol). Αν πρόκειται για μονοεστέρα (1.00 mmol), η ποσότητα του  $\text{BF}_3 \cdot \text{SMe}_2$  είναι 2.60 g, δηλαδή 20 mmol. Η αντίδραση παραμένει υπό ψύξη και συνεχή ανάδευση για περίπου 20 λεπτά και στην συνέχεια σε θερμοκρασία δωματίου για 24h. Έπειτα η αντίδραση τερματίζεται με προσθήκη  $\text{MeOH}$  (1 mL) υπό ψύξη. Το μίγμα παραμένει στους  $0^\circ\text{C}$  για περίπου 10 λεπτά και ακολούθως συμπυκνώνεται. Το μίγμα αραιώνεται με  $\text{AcOEt}$  (20 mL) και μεταφέρεται ποσοτικά σε διαχωριστική χοάνη. Η οργανική στιβάδα εκχυλίζεται με κορεσμένο διάλυμα  $\text{NaCl}$  και στην συνέχεια ξηραίνεται με  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ . Ακολούθως, ελέγχεται με TLC σε σύστημα ανάπτυξης  $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$  8:2 και συμπυκνώνεται. Το τελικό προϊόν παραλαμβάνεται με χρωματογραφία στήλης σε σύστημα έκλουσης  $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$  9:1.

### Βουτανο-1,4-διυλο δι(2-(3,4-διυδροξυφαινυλο)οξικός εστέρας) (32)



$\text{C}_{20}\text{H}_{22}\text{O}_8$   
Mol. Wt.: 390.39

Η παραπάνω ένωση παρασκευάστηκε σύμφωνα με την γενική μέθοδο αποπροστασίας των φαινολικών υδροξυλίων των διεστέρων από την ένωση **27** (0.13 g, 0.29 mmol). Καθαρίστηκε με χρωματογραφία στήλης σε σύστημα  $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$  9:1 και το επιθυμητό προϊόν παραλήφθηκε ως λευκό στερεό.

$\alpha = 46\%$  (0.05 g)

$R_f = (\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$  8:2) = 0.64

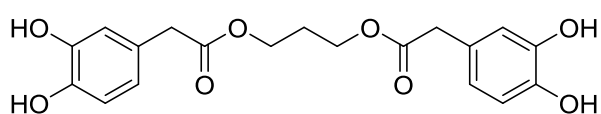


$^1\text{H}$  NMR (200 MHz,  $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$ )  $\delta$  7.93 – 7.78 (m, 4H), 6.84 – 6.71 (m, 4H), 6.61 (dd,  $J = 8.1, 2.1$  Hz, 2H), 4.09 – 4.00 (m, 4H), 3.46 (s, 4H), 1.74 – 1.53 (m, 4H).

$^{13}\text{C}$  NMR (50 MHz,  $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$ )  $\delta$  172.2, 145.7, 144.8, 126.9, 121.5, 117.1, 115.9, 64.5, 40.9, 25.9.

MS (ESI)  $m/z$  υπολογίζεται για  $\text{C}_{20}\text{H}_{21}\text{O}_8^-$   $[\text{M}-\text{H}]^-$  389.1, βρέθηκε 389.2.

### Προπανο-1,3-διυλο δι(2-(3,4-διυδροξυφαινυλο)οξικός εστέρας) (33)



$\text{C}_{19}\text{H}_{20}\text{O}_8$   
Mol. Wt.: 376.36

Η ένωση **33** παρασκευάστηκε σύμφωνα με την γενική μέθοδο αποπροστασίας των φαινολικών υδροξυλίων των διεστέρων από την ένωση **28** (0.08 g, 0.19 mmol). Καθαρίστηκε με χρωματογραφία στήλης σε σύστημα  $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$  9:1 και το επιθυμητό προϊόν παραλήφθηκε ως άχρωμο στερεό.

$\alpha = 16\%$  (0.01 g)

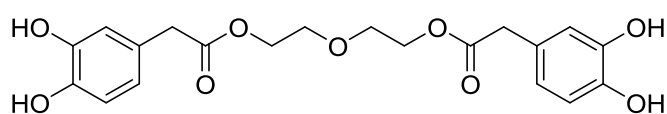
$R_f = (\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH} \text{ 8:2}) = 0.59$

$^1\text{H}$  NMR (200 MHz,  $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$ )  $\delta$  7.90 (d,  $J = 7.9$  Hz, 4H), 6.77 (dd,  $J = 8.1, 5.1$  Hz, 4H), 6.60 (dd,  $J = 8.0, 2.1$  Hz, 2H), 4.10 (t,  $J = 6.4$  Hz, 4H), 3.46 (s, 4H), 1.97 – 1.86 (m, 4H).

$^{13}\text{C}$  NMR (50 MHz,  $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$ )  $\delta$  172.5, 145.8, 144.9, 126.8, 121.4, 117.2, 116.0, 61.8, 40.9, 28.8.

MS (ESI)  $m/z$  υπολογίζεται για  $\text{C}_{19}\text{H}_{19}\text{O}_8^-$   $[\text{M}-\text{H}]^-$  375.1, βρέθηκε 375.1.

### Οξυδι(αιθανο-2,1-διυλο) δι(2-(3,4-διυδροξυφαινυλο)οξικός εστέρας) (34)



$\text{C}_{20}\text{H}_{22}\text{O}_9$   
Mol. Wt.: 406.39

Η παραπάνω ένωση παρασκευάστηκε σύμφωνα με την γενική μέθοδο αποπροστασίας των φαινολικών υδροξυλίων των διεστέρων από την ένωση **29** (0.17 g, 0.37 mmol). Καθαρίστηκε με χρωματογραφία στήλης σε σύστημα CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH 9:1 και το επιθυμητό προϊόν παραλήφθηκε ως άχρωμο κολλώδες στερεό.

$\alpha$ =23% (0.03 g)

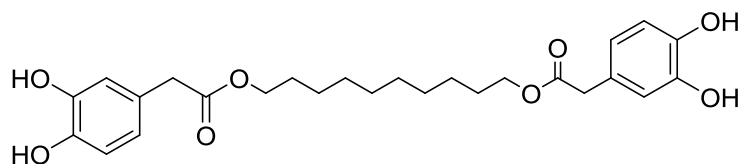
$R_f$  = (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH 8:2) = 0.67

<sup>1</sup>H NMR (200 MHz, (CD<sub>3</sub>)<sub>2</sub>CO)  $\delta$  8.08 – 7.76 (m, 4H), 6.88 – 6.68 (m, 4H), 6.61 (dd,  $J$  = 8.0, 2.0 Hz, 2H), 4.17 (dd,  $J$  = 9.6, 5.0 Hz, 4H), 3.63 (dd,  $J$  = 5.6, 4.0 Hz, 4H), 3.48 (s, 4H).

<sup>13</sup>C NMR (50 MHz, (CD<sub>3</sub>)<sub>2</sub>CO)  $\delta$  172.2, 145.7, 144.8, 126.8, 121.5, 117.2, 115.9, 69.5, 64.4, 40.8.

MS (ESI)  $m/z$  υπολογίζεται για C<sub>20</sub>H<sub>21</sub>O<sub>9</sub><sup>-</sup> [M-H]<sup>-</sup> 405.1, βρέθηκε 405.1.

### Δεκανο-1,10-διυλο δι(2-(3,4-διυδροξυφαινυλο)οξικός εστέρας) (**35**)



C<sub>26</sub>H<sub>34</sub>O<sub>8</sub>  
Mol. Wt.: 474.55

Η ένωση **35** παρασκευάστηκε σύμφωνα με την γενική μέθοδο αποπροστασίας των φαινολικών υδροξυλίων των διεστέρων από την ένωση **30** (0.21 g, 0.39 mmol). Καθαρίστηκε με χρωματογραφία στήλης σε σύστημα CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH 9:1 και το επιθυμητό προϊόν παραλήφθηκε ως λευκό στερεό.

$\alpha$  = 69% (0.18 g)

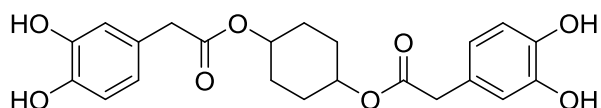
$R_f$  = (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH 8:2) = 0.64

<sup>1</sup>H NMR (200 MHz, (CD<sub>3</sub>)<sub>2</sub>CO)  $\delta$  7.81 (s, 4H), 6.75 (dd,  $J$  = 8.1, 5.0 Hz, 4H), 6.58 (dd,  $J$  = 8.0, 1.6 Hz, 2H), 4.00 (t,  $J$  = 6.5 Hz, 4H), 3.42 (s, 4H), 1.53 (d,  $J$  = 6.4 Hz, 4H), 1.23 (s, 12H).

$^{13}\text{C}$  NMR (50 MHz,  $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$ )  $\delta$  172.2, 145.7, 144.7, 127.0, 121.4, 117.1, 115.9, 65.0, 41.0, 30.2, 29.3, 26.5.

MS (ESI)  $m/z$  υπολογίζεται για  $\text{C}_{26}\text{H}_{33}\text{O}_8^-$   $[\text{M}-\text{H}]^-$  473.2, βρέθηκε 473.4.

### Κυκλοεξανο-1,4-διυλο δι(2-(3,4-διυδροξυφαινυλο)οξικός εστέρας) (36)



$\text{C}_{22}\text{H}_{24}\text{O}_8$   
Mol. Wt.: 416.43

Η παραπάνω ένωση παρασκευάστηκε σύμφωνα με την γενική μέθοδο αποπροστασίας των φαινολικών υδροξυλίων των διεστέρων από την ένωση **31** (0.16 g, 0.34 mmol). Καθαρίστηκε με χρωματογραφία στήλης σε σύστημα  $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$  9:1 και το επιθυμητό προϊόν παραλήφθηκε ως λευκό κολλώδες στερεό.

$\alpha$  = 18% (0.02 g)

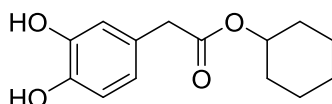
$R_f$  = ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$  8:2) = 0.61

$^1\text{H}$  NMR (200 MHz,  $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$ )  $\delta$  7.91 (dd,  $J$  = 19.0, 13.1 Hz, 4H), 6.83 – 6.70 (m, 4H), 6.66 – 6.54 (m, 2H), 4.75 (s, 2H), 3.45 (d,  $J$  = 4.8 Hz, 4H), 1.87 (d,  $J$  = 7.5 Hz, 2H), 1.68 (s, 2H), 1.51 (d,  $J$  = 5.4 Hz, 4H).

$^{13}\text{C}$  NMR (50 MHz,  $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$ )  $\delta$  171.6, 145.8, 144.9, 127.0, 121.4, 117.0, 115.9, 71.3, 41.3, 28.0.

MS (ESI)  $m/z$  υπολογίζεται για  $\text{C}_{22}\text{H}_{23}\text{O}_8^-$   $[\text{M}-\text{H}]^-$  415.1, βρέθηκε 415.2.

### Κυκλοεξυλο 2-(3,4-διυδροξυφαινυλο)οξικός εστέρας (45)



$\text{C}_{14}\text{H}_{18}\text{O}_4$   
Mol. Wt.: 250.29

Ο εστέρας **45** παρασκευάστηκε σύμφωνα με την γενική μέθοδο αποπροστασίας των φαινολικών υδροξυλίων των μονοεστέρων από την

ένωση **41** (0.09 g, 0.31 mmol). Καθαρίστηκε με χρωματογραφία στήλης σε σύστημα CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH 9:1 και το επιθυμητό προϊόν παραλήφθηκε ως άχρωμο λάδι.

$\alpha$  = 52% (0.04 g)

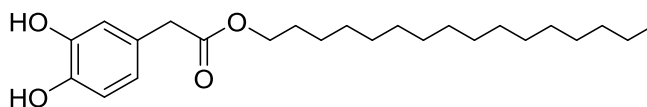
$R_f$  = (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH 9:1) = 0.52

<sup>1</sup>H NMR (200 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  6.79 – 6.59 (m, 3H), 6.25 (br s, 2H), 4.77 (dd,  $J$  = 8.4, 4.6 Hz, 1H), 3.48 (s, 2H), 1.77 (dd,  $J$  = 25.7, 7.1 Hz, 4H), 1.57 – 1.23 (m, 6H).

<sup>13</sup>C NMR (50 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  173.1, 143.8, 143.1, 126.2, 121.5, 116.2, 115.3, 73.9, 41.0, 31.4, 25.2, 23.6.

MS (ESI)  $m/z$  υπολογίζεται για C<sub>14</sub>H<sub>17</sub>O<sub>4</sub><sup>-</sup> [M-H]<sup>-</sup> 249.1, βρέθηκε 249.1.

#### Δεκαεξυλο 2-(3,4-διυδροξυφαινυλο)οξικός εστέρας (**46**)



C<sub>24</sub>H<sub>40</sub>O<sub>4</sub>  
Mol. Wt.: 392.58

Ο εστέρας **46** παρασκευάστηκε σύμφωνα με την γενική μέθοδο αποπροστασίας των φαινολικών υδροξυλίων των μονοεστέρων από την ένωση **42** (0.08 g, 0.19 mmol). Καθαρίστηκε με χρωματογραφία στήλης σε σύστημα CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH 9:1 και το επιθυμητό προϊόν παραλήφθηκε ως λευκό στερεό.

$\alpha$  = 75% (0.06 g)

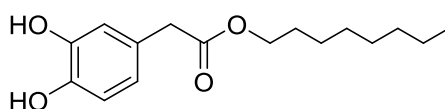
$R_f$  = (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH 9:1) = 0.67

<sup>1</sup>H NMR (200 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  6.76 – 6.68 (m, 2H), 6.67 – 6.59 (m, 1H), 6.28 (br s, 1H), 5.96 (br s, 1H), 4.10 (t,  $J$  = 6.7 Hz, 2H), 3.50 (s, 2H), 1.61 (d,  $J$  = 6.5 Hz, 2H), 1.26 (s, 26H), 0.87 (dd,  $J$  = 6.5, 5.0 Hz, 3H).

<sup>13</sup>C NMR (50 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  173.6, 143.8, 143.1, 126.0, 121.6, 116.2, 115.3, 65.6, 40.7, 31.9, 29.7, 29.6, 29.5, 29.4, 29.2, 28.5, 25.8, 22.7, 14.1.

MS (ESI)  $m/z$  υπολογίζεται για C<sub>24</sub>H<sub>39</sub>O<sub>4</sub><sup>-</sup> [M-H]<sup>-</sup> 391.3, βρέθηκε 391.3.

### Οκτυλο 2-(3,4-διυδροξυφαινυλο)οξικός εστέρας (47)



$C_{16}H_{24}O_4$   
Mol. Wt.: 280.36

Η παραπάνω ένωση παρασκευάστηκε σύμφωνα με την γενική μέθοδο αποπροστασίας των φαινολικών υδροξυλίων των μονοεστέρων από την ένωση **43** (0.10 g, 0.31 mmol). Καθαρίστηκε με χρωματογραφία στήλης σε σύστημα  $CH_2Cl_2/MeOH$  9:1 και το επιθυμητό προϊόν παραλήφθηκε ως άχρωμο λάδι.

$\alpha = 75\%$  (0.06 g)

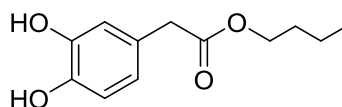
$R_f = (CH_2Cl_2/MeOH\ 9:1) = 0.72$

$^1H$  NMR (200 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$  6.76 – 6.56 (m, 3H), 6.50 (s, 1H), 6.21 (s, 1H), 4.16 – 4.03 (m, 2H), 3.50 (s, 2H), 1.61 (d,  $J = 6.7$  Hz, 2H), 1.27 (s, 10H), 0.88 (t,  $J = 5.8$  Hz, 3H).

$^{13}C$  NMR (50 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$  173.7, 143.8, 143.1, 125.9, 121.6, 116.2, 115.3, 65.6, 40.7, 31.7, 29.1, 28.4, 25.8, 22.6, 14.1.

MS (ESI)  $m/z$  υπολογίζεται για  $C_{16}H_{23}O_4^-$   $[M-H]^-$  279.2, βρέθηκε 279.3.

### Βουτυλο 2-(3,4-διυδροξυφαινυλο)οξικός εστέρας (48)



$C_{12}H_{16}O_4$   
Mol. Wt.: 224.26

Η ένωση **48** παρασκευάστηκε σύμφωνα με την γενική μέθοδο αποπροστασίας των φαινολικών υδροξυλίων των μονοεστέρων από την ένωση **44** (0.12 g, 0.47 mmol). Καθαρίστηκε με χρωματογραφία στήλης σε σύστημα  $CH_2Cl_2/MeOH$  9:1 και το επιθυμητό προϊόν παραλήφθηκε ως άχρωμο λάδι.

$\alpha = 84\%$  (0.09 g)

$R_f = (\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH } 9:1) = 0.83$

$^1\text{H NMR}$  (200 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  6.74 (t,  $J = 8.0$  Hz, 3H), 6.66 – 6.46 (m, 2H), 4.21 – 3.98 (m, 2H), 3.48 (d,  $J = 4.0$  Hz, 2H), 1.69 – 1.49 (m, 2H), 1.46 – 1.21 (m, 2H), 0.91 (t,  $J = 7.3$  Hz, 3H).

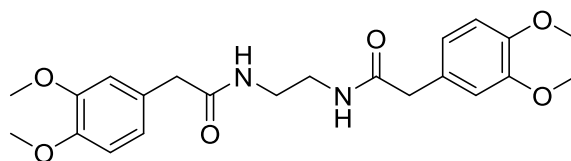
$^{13}\text{C NMR}$  (50 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  173.7, 143.8, 143.1, 125.9, 121.5, 116.3, 115.4, 65.3, 40.6, 30.4, 19.0, 13.6.

MS (ESI)  $m/z$  υπολογίζεται για  $\text{C}_{12}\text{H}_{15}\text{O}_4^-$   $[\text{M}-\text{H}]^-$  223.1, βρέθηκε 223.2.

### 6.2.3 Γενική μέθοδος παρασκευής διαμιδίων/μονοαμιδίων

Σε σφαιρική φιάλη προστίθενται το 3,4-διμεθοξυφαινυλοξικό οξύ (1.00 mmol),  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (5 mL), διαμίνη (0.50 mmol) αν πρόκειται για παρασκευή διαμιδίου ή αμίνη (1.00 mmol) για παρασκευή μονοαμιδίου, και  $\text{HOBt}\cdot\text{H}_2\text{O}$  (0.13 g, 1.00 mmol) και το μίγμα αναδεύεται και ψύχεται για να γίνει η προσθήκη του  $\text{EDC}\cdot\text{HCl}$  (0.19 g, 1.00 mmol). Η αντίδραση παραμένει στους  $0^\circ\text{C}$  για 30 λεπτά και έπειτα σε θερμοκρασία δωματίου για 2h. Στην περίπτωση που το μίγμα αποκτήσει θερμοκρασία δωματίου και παρόλα αυτά δεν διαλύονται τα στερεά, προστίθεται εκ νέου ποσότητα  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (5 mL). Στην συνέχεια το μίγμα της αντίδρασης μεταφέρεται ποσοτικά σε διαχωριστική χοάνη και αραιώνεται με  $\text{AcOEt}$  (20 mL). Έπειτα, η οργανική φάση εκχυλίζεται δύο φορές με  $\text{H}_2\text{O}$  (5 mL) και μία με κορεσμένο διάλυμα  $\text{NaCl}$  (5 mL). Η οργανική στιβάδα ξηραίνεται με  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  και ελέγχεται με TLC σε σύστημα ανάπτυξης  $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH } 9:1$ . Ακολουθεί χρωματογραφία στήλης σε σύστημα  $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH } 9:1$  για την παραλαβή του προϊόντος.

### ***N,N'*-(αιθανο-1,2-διυλο)δι(2-(3,4-διμεθοξυφαινυλο)ακεταμίδιο) (50)**



$\text{C}_{22}\text{H}_{28}\text{N}_2\text{O}_6$   
Mol. Wt.: 416.47

Η παραπάνω ένωση παρασκευάστηκε σύμφωνα με την γενική μέθοδο παρασκευής διαμιδίων από την αιθυλοδιαμίνη **49** (0.03 g, 0.51 mmol) και το 3,4-διμεθοξυφαινυλοξικό οξύ. Καθαρίστηκε με χρωματογραφία στήλης με σύστημα CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH 9:1 και το τελικό προϊόν παραλήφθηκε ως λευκό στερεό.

$\alpha = 80\%$  (0.17 g)

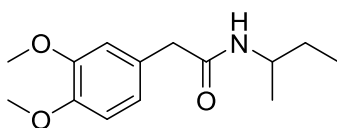
$R_f = (\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH } 9:1) = 0.69$

<sup>1</sup>H NMR (200 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  6.84 – 6.68 (m, 6H), 6.13 (br s, 2H), 3.84 (d,  $J = 1.3$  Hz, 12H), 3.41 (s, 4H), 3.26 (s, 4H).

<sup>13</sup>C NMR (50 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  172.5, 149.3, 148.4, 127.2, 121.6, 112.5, 111.5, 56.0, 43.3, 39.9.

MS (ESI)  $m/z$  υπολογίζεται για C<sub>22</sub>H<sub>27</sub>N<sub>2</sub>O<sub>6</sub><sup>-</sup> [M-H]<sup>-</sup> 415.2, βρέθηκε 415.3.

#### ***N*-(*sec*-βουτυλο)-2-(3,4-διμεθοξυφαινυλο)ακεταμίδιο (**54**)**



C<sub>14</sub>H<sub>21</sub>NO<sub>3</sub>  
Mol. Wt.: 251.33

Η ένωση **54** παρασκευάστηκε σύμφωνα με την γενική μέθοδο παρασκευής μονοαμιδίων από την *sec*-βουτυλαμίνη **52** (0.07 g, 1.02 mmol) και το 3,4-διμεθοξυφαινυλοξικό οξύ. Καθαρίστηκε με χρωματογραφία στήλης με σύστημα έκλουσης CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH 9:1 και το επιθυμητό προϊόν παραλήφθηκε ως λευκό κρυσταλλικό στερεό.

$\alpha = 85\%$  (0.22 g)

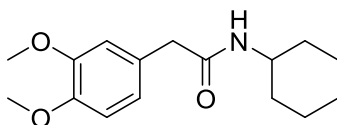
$R_f = (\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH } 9:1) = 0.72$

<sup>1</sup>H NMR (200 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  6.84 – 6.68 (m, 3H), 5.26 (br s, 1H), 3.92 – 3.73 (m, 7H), 3.45 (s, 2H), 1.33 (dtd,  $J = 14.0, 7.3, 3.4$  Hz, 2H), 0.98 (t,  $J = 6.1$  Hz, 3H), 0.77 (t,  $J = 7.4$  Hz, 3H).

$^{13}\text{C}$  NMR (50 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  170.5, 149.0, 148.0, 127.5, 121.4, 112.2, 111.3, 55.8, 46.5, 43.4, 29.4, 20.2, 10.2.

MS (ESI)  $m/z$  υπολογίζεται για  $\text{C}_{14}\text{H}_{22}\text{NO}_3^+[\text{M}+\text{H}]^+$  252.1, βρέθηκε 252.2.

#### **N-κυκλοεξυλο-2-(3,4-διμεθοξυφαινυλο)ακεταμίδιο (55)**



$\text{C}_{16}\text{H}_{23}\text{NO}_3$   
Mol. Wt.: 277.36

Η παραπάνω ένωση παρασκευάστηκε σύμφωνα με την γενική μέθοδο παρασκευής μονοαμιδίων από την κυκλοεξυλαμίνη **53** (0.10 g, 1.02 mmol) και το 3,4-διμεθοξυφαινυλοξικό οξύ. Καθαρίστηκε με χρωματογραφία στήλης με σύστημα έκλουσης  $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$  9:1 και το επιθυμητό προϊόν παραλήφθηκε ως λευκό στερεό.

$\alpha = 99\%$  (0.28 g)

$R_f = (\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH} 9:1) = 0.71$

$^1\text{H}$  NMR (200 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  6.61 (dd,  $J = 11.3, 4.3$  Hz, 3H), 6.02 (t,  $J = 9.4$  Hz, 1H), 3.71 – 3.59 (m, 6H), 3.59 – 3.47 (m, 1H), 3.26 (d,  $J = 11.7$  Hz, 2H), 1.64 (s, 2H), 1.42 (d,  $J = 10.3$  Hz, 3H), 1.21 – 0.78 (m, 5H).

$^{13}\text{C}$  NMR (50 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  170.0, 148.5, 147.5, 127.5, 120.9, 111.8, 110.8, 55.3, 55.3, 47.7, 42.7, 32.4, 25.0, 24.4.

MS (ESI)  $m/z$  υπολογίζεται για  $\text{C}_{16}\text{H}_{27}\text{N}_2\text{O}_3^+[\text{M}+\text{NH}_4]^+$  295.2, βρέθηκε 295.2.

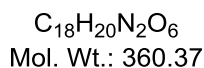
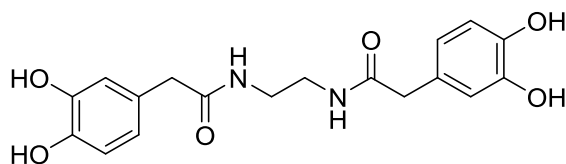
#### **6.2.4 Γενική μέθοδος αποπροστασίας των φαινολικών υδροξυλίων των διαμιδίων/μονοαμιδίων**

Σε σφαιρική φιάλη διαλύεται το διαμίδιο (1.00 mmol) σε  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (10 mL) και το μίγμα ψύχεται για να γίνει η προσθήκη του αντιδραστηρίου  $\text{BF}_3 \cdot \text{SMe}_2$  (5.20 g, 40 mmol) υπό ανάδευση. Αν πρόκειται για μονοαμίδιο (1.00 mmol), η ποσότητα του  $\text{BF}_3 \cdot \text{SMe}_2$  είναι 2.60 g, δηλαδή 20 mmol. Η αντίδραση



παραμένει υπό ψύξη για περίπου 20 λεπτά και έπειτα σε θερμοκρασία δωματίου για 24h. Κατόπιν προστίθεται H<sub>2</sub>O (1 mL) στους 0°C για να τερματιστεί η αντίδραση. Το μίγμα αφήνεται στην ηρεμία για περίπου 10 λεπτά και έπειτα συμπυκνώνεται. Η ουσία καθαρίζεται με χρωματογραφία στήλης ανάστροφης φάσης σε σύστημα έκλουσης CH<sub>3</sub>CN/H<sub>2</sub>O από 0:10 έως 9:1.

***N,N'*-(αιθανο-1,2-διυλο)δι(2-(3,4-διυδροξυφαινυλο)ακεταμίδιο) (51)**



Η παραπάνω ένωση παρασκευάστηκε σύμφωνα με την γενική μέθοδο αποπροστασίας των φαινολικών υδροξυλίων των διαμιδίων από την ένωση **50** (0.18 g, 0.41 mmol). Καθαρίστηκε με χρωματογραφία στήλης ανάστροφης φάσης σε σύστημα CH<sub>3</sub>CN/H<sub>2</sub>O από 0:10 έως 9:1 και το επιθυμητό προϊόν παραλήφθηκε ως διαφανές κρυσταλλικό στερεό.

$\alpha$  = 21% (0.03 g)

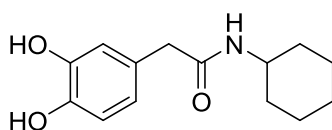
$R_f$  = (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH/AcOH 9:1:0.5) = 0.14

<sup>1</sup>H NMR (200 MHz, d<sub>6</sub>-DMSO)  $\delta$  8.84 (d,  $J$  = 1.8 Hz, 2H), 8.74 (d,  $J$  = 1.8 Hz, 2H), 7.95 (br s, 2H), 6.62 (dd,  $J$  = 8.1, 1.8 Hz, 4H), 6.46 (dd,  $J$  = 8.0, 1.9 Hz, 2H), 3.17 (s, 4H), 3.05 (d,  $J$  = 2.3 Hz, 4H).

<sup>13</sup>C NMR (50 MHz, d<sub>6</sub>-DMSO)  $\delta$  171.1, 145.0, 143.9, 127.1, 119.9, 116.5, 115.4, 42.0, 38.6.

MS (ESI)  $m/z$  υπολογίζεται για C<sub>18</sub>H<sub>19</sub>N<sub>2</sub>O<sub>6</sub><sup>-</sup> [M-H]<sup>-</sup> 359.1, βρέθηκε 359.2.

### ***N*-κυκλοεξυλο-2-(3,4-διυδροξυφαινυλο)ακεταμίδιο (57)**



C<sub>14</sub>H<sub>19</sub>NO<sub>3</sub>  
Mol. Wt.: 249.31

Το μονοαμίδιο **57** παρασκευάστηκε σύμφωνα με την γενική μέθοδο αποπροστασίας των φαινολικών υδροξυλίων των μονοαμιδίων από την ένωση **55** (0.07 g, 0.27 mmol). Καθαρίστηκε με χρωματογραφία στήλης σε σύστημα CH<sub>3</sub>CN/H<sub>2</sub>O από 0:10 έως 9:1 και το επιθυμητό προϊόν παραλήφθηκε ως λευκό στερεό.

$\alpha$  = 95% (0.06 g)

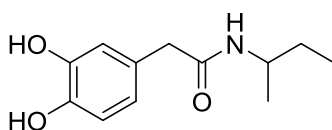
R<sub>f</sub> = (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH/AcOH 7:2:0.5) = 0.70

<sup>1</sup>H NMR (200 MHz, d<sub>6</sub>-DMSO) δ 8.79 (br s, 2H), 7.81 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H), 6.67 – 6.55 (m, 2H), 6.47 (dd, *J* = 8.0, 1.8 Hz, 1H), 3.46 (s, 1H), 3.17 (s, 2H), 1.78 – 1.45 (m, 5H), 1.21 (dd, *J* = 35.4, 12.1 Hz, 5H).

<sup>13</sup>C NMR (50 MHz, d<sub>6</sub>-DMSO) δ 169.8, 145.0, 143.8, 127.6, 119.7, 116.4, 115.4, 47.6, 42.0, 32.6, 25.4, 24.7.

MS (ESI) *m/z* υπολογίζεται για C<sub>14</sub>H<sub>20</sub>NO<sub>3</sub><sup>+</sup> [M+H]<sup>+</sup> 250.1, βρέθηκε 250.2.

### ***N*-(*sec*-βουτυλο)-2-(3,4-διυδροξυφαινυλο)ακεταμίδιο (56)**



C<sub>12</sub>H<sub>17</sub>NO<sub>3</sub>  
Mol. Wt.: 223.27

Η παραπάνω ένωση παρασκευάστηκε σύμφωνα με την γενική μέθοδο αποπροστασίας των φαινολικών υδροξυλίων των μονοαμιδίων από την ένωση **54** (0.07 g, 0.28 mmol). Καθαρίστηκε με χρωματογραφία στήλης σε σύστημα CH<sub>3</sub>CN/H<sub>2</sub>O από 0:10 έως 9:1 και το επιθυμητό προϊόν παραλήφθηκε ως λευκό στερεό.

$\alpha = 99\%$  (0.06 g)

$R_f = (\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}/\text{AcOH } 7:2:0.5) = 0.83$

$^1\text{H NMR}$  (200 MHz,  $d_6$ -DMSO)  $\delta$  8.78 (br s, 2H), 7.72 (d,  $J = 8.0$  Hz, 1H), 6.72 – 6.54 (m, 2H), 6.47 (d,  $J = 7.7$  Hz, 1H), 3.60 (d,  $J = 7.0$  Hz, 1H), 3.17 (s, 2H), 1.34 (dd,  $J = 14.2, 7.3$  Hz, 2H), 1.00 (dd,  $J = 6.6, 3.5$  Hz, 3H), 0.78 (td,  $J = 7.3, 3.2$  Hz, 3H).

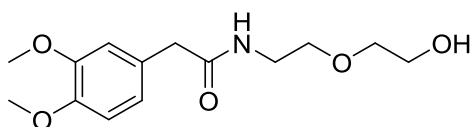
$^{13}\text{C NMR}$  (50 MHz,  $d_6$ -DMSO)  $\delta$  169.9, 144.9, 143.7, 127.5, 119.6, 116.3, 115.3, 45.6, 42.0, 29.0, 20.4, 10.6.

MS (ESI)  $m/z$  υπολογίζεται για  $\text{C}_{12}\text{H}_{16}\text{NO}_3^-$   $[\text{M}-\text{H}]^-$  222.1, βρέθηκε 222.1.

### 6.2.5 Γενική μέθοδος παρασκευής αμιδικών αλκοολών

Σε σφαιρική φιάλη διαλύεται η αμινοαλκοόλη (1.00 mmol) σε  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (8 mL), το 3,4-διμεθοξυφαινυλοξικό οξύ (1.00 mmol) και το HOBt. $\text{H}_2\text{O}$  (0.13 g, 1.00 mmol). Το μίγμα ψύχεται στους  $0^\circ\text{C}$  και προστίθεται το EDC.HCl (0.21 g, 1.10 mmol). Η αντίδραση παραμένει υπό ψύξη για 30 λεπτά και στην συνέχεια σε θερμοκρασία δωματίου για 2h. Έπειτα το μίγμα της αντίδρασης μεταφέρεται σε διαχωριστική χοάνη και αραιώνεται με  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (20 mL). Η στιβάδα του  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  εκπλένεται με κορεσμένο διάλυμα NaCl (8 mL) και οι δύο φάσεις διαχωρίζονται. Η οργανική στιβάδα ξηραίνεται με  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , ελέγχεται με TLC σε σύστημα ανάπτυξης  $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$  9:1 και συμπυκνώνεται. Τελικά το προϊόν παραλαμβάνεται με χρωματογραφία στήλης σε σύστημα έκλουσης  $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$  9:1.

### 2-(3,4-διυδροξυφαινυλο)-*N*-(2-(2-υδροξυαιθοξυ)αιθυλ)ακεταμίδιο (62)



$\text{C}_{14}\text{H}_{21}\text{NO}_5$   
Mol. Wt.: 283.32

Η ένωση **62** παρασκευάστηκε σύμφωνα με την γενική μέθοδο παρασκευής αμιδικών αλκοολών με σύζευξη της 2-(2-αμινοαιθοξυ)αιθανόλης **58** (0.05 g,

0.51 mmol) με το 3,4-διμεθοξυφαινυλοξικό οξύ. Καθαρίστηκε με χρωματογραφία στήλης σε σύστημα CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH 9:1 και το επιθυμητό προϊόν παραλήφθηκε ως άχρωμο λάδι.

$\alpha = 89\%$  (0.13 g)

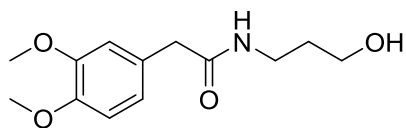
$R_f = (\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH } 9:1) = 0.5$

<sup>1</sup>H NMR (200 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  6.74 (d,  $J = 0.9$  Hz, 3H), 6.52 (br s, 1H), 3.79 (s, 6H), 3.64 – 3.55 (m, 2H), 3.44 (d,  $J = 7.6$  Hz, 5H), 3.34 (d,  $J = 5.8$  Hz, 3H), 3.07 (s, 1H).

<sup>13</sup>C NMR (50 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  171.8, 148.8, 147.9, 127.2, 121.2, 112.2, 111.1, 72.0, 69.5, 61.3, 55.7, 42.8, 39.2.

MS (ESI)  $m/z$  υπολογίζεται για C<sub>14</sub>H<sub>22</sub>NO<sub>5</sub><sup>+</sup>[M+H]<sup>+</sup> 284.1, βρέθηκε 284.1.

### 2-(3,4-διμεθοξυφαινυλο)-N-(3-υδροξυπροπυλο)ακεταμίδιο (63)



C<sub>13</sub>H<sub>19</sub>NO<sub>4</sub>  
Mol. Wt.: 253.30

Η παραπάνω ένωση παρασκευάστηκε σύμφωνα με την γενική μέθοδο παρασκευής αμιδικών αλκοολών με σύζευξη της 3-αμινο-1-προπανόλης **59** (0.04 g, 0.51 mmol) με το 3,4-διμεθοξυφαινυλοξικό οξύ. Καθαρίστηκε με χρωματογραφία στήλης σε σύστημα CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH 9:1 και το επιθυμητό προϊόν παραλήφθηκε ως διαφανές κρυσταλλικό λευκό στερεό.

$\alpha = 76\%$  (0.10 g)

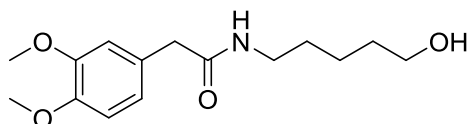
$R_f = (\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH } 9:1) = 0.56$

<sup>1</sup>H NMR (200 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  6.80 – 6.66 (m, 3H), 6.32 (br s, 1H), 3.79 (s, 6H), 3.53 – 3.39 (m, 5H), 3.28 (dd,  $J = 12.4, 6.2$  Hz, 2H), 1.55 (dt,  $J = 11.5, 5.8$  Hz, 2H).

<sup>13</sup>C NMR (50 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  172.6, 148.8, 147.9, 127.0, 121.3, 112.1, 111.2, 58.9, 55.6, 42.8, 36.2, 31.8.

MS (ESI)  $m/z$  υπολογίζεται για  $C_{13}H_{18}NO_4^- [M-H]^-$  252.1, βρέθηκε 252.2.

### 2-(3,4-διμεθοξυφαινυλο)-*N*-(5-υδροξυπεντυλο)ακεταμίδιο (64)



$C_{15}H_{23}NO_4$   
Mol. Wt.: 281.35

Η αλκοόλη **64** παρασκευάστηκε σύμφωνα με την γενική μέθοδο παρασκευής αμιδικών αλκοολών με σύζευξη της 5-αμινο-1-πεντανόλης **60** (0.10 g, 0.51 mmol) με το 3,4-διμεθοξυφαινυλοξικό οξύ. Καθαρίστηκε με χρωματογραφία στήλης σε σύστημα  $CH_2Cl_2/MeOH$  9:1 και το επιθυμητό προϊόν παραλήφθηκε ως άχρωμο λάδι.

$\alpha = 66\%$  (0.09 g)

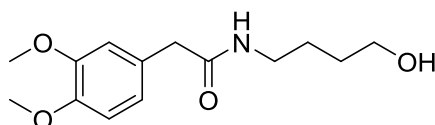
$R_f = (CH_2Cl_2/MeOH\ 9:1) = 0.49$

$^1H$  NMR (200 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$  6.82 – 6.66 (m, 3H), 5.89 (br s, 1H), 3.80 (s, 6H), 3.52 (t,  $J = 6.3$  Hz, 2H), 3.43 (s, 2H), 3.14 (dd,  $J = 12.8, 6.5$  Hz, 3H), 1.35 (ddt,  $J = 19.1, 15.7, 8.0$  Hz, 6H).

$^{13}C$  NMR (50 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$  171.6, 148.9, 147.9, 127.2, 121.4, 112.2, 111.2, 62.0, 55.7, 43.0, 39.3, 31.8, 28.9, 22.8.

MS (ESI)  $m/z$  υπολογίζεται για  $C_{15}H_{24}NO_4^+ [M+H]^+$  282.2, βρέθηκε 282.2.

### 2-(3,4-διμεθοξυφαινυλο)-*N*-(4-υδροξυβουτυλο)ακεταμίδιο (65)



$C_{14}H_{21}NO_4$   
Mol. Wt.: 267.32

Η παραπάνω ένωση παρασκευάστηκε σύμφωνα με την γενική μέθοδο παρασκευής αμιδικών αλκοολών με σύζευξη της 4-αμινο-1-βουτανόλης **61** (0.05 g, 0.51 mmol) με το 3,4-διμεθοξυφαινυλοξικό οξύ. Καθαρίστηκε με

χρωματογραφία στήλης σε σύστημα CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH 9:1 και το επιθυμητό προϊόν παραλήφθηκε ως λευκό κρυσταλλικό στερεό.

$\alpha$  = 98% (0.13 g)

$R_f$  = (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH 9:1) = 0.56

<sup>1</sup>H NMR (200 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  6.79 – 6.65 (m, 3H), 6.15 (br s, 1H), 3.79 (s, 6H), 3.51 (t,  $J$  = 5.9 Hz, 2H), 3.41 (s, 2H), 3.14 (d,  $J$  = 6.0 Hz, 3H), 1.43 (dd,  $J$  = 6.3, 3.0 Hz, 4H).

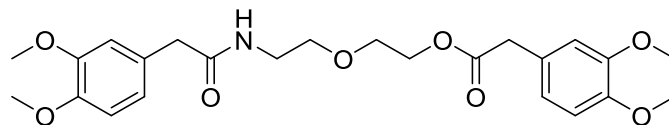
<sup>13</sup>C NMR (50 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  171.7, 148.8, 147.9, 127.2, 121.3, 112.2, 111.2, 61.6, 55.7, 42.9, 39.2, 29.4, 25.7.

MS (ESI)  $m/z$  υπολογίζεται για C<sub>14</sub>H<sub>20</sub>NO<sub>4</sub><sup>-</sup>[M-H]<sup>-</sup> 266.1, βρέθηκε 266.2.

### 6.2.6 Γενική μέθοδος παρασκευής αμιδικών εστέρων

Σε σφαιρική φιάλη διαλύεται η αμινοαλκοόλη (1.00 mmol) σε CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (10 mL) και στην συνέχεια προστίθενται το 3,4-διμεθοξυφαινυλοξικό οξύ (1.00 mmol) και DMAP 10% (0.01 g, 0.10 mmol). Το μίγμα ψύχεται και γίνεται προσθήκη EDC.HCl (0.19 g, 1.00 mmol). Η αντίδραση παραμένει για 30 λεπτά υπό ψύξη και έπειτα σε θερμοκρασία δωματίου για 24h. Στην συνέχεια το περιεχόμενο της φιάλης μεταφέρεται σε διαχωριστική χοάνη και αραιώνεται με CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (20 mL). Η οργανική στιβάδα εκπλένεται διαδοχικά κατά σειρά με διάλυμα NaHCO<sub>3</sub> 5% (4 mL), H<sub>2</sub>O (4 mL), διάλυμα HCl 0.6 N (4 mL), H<sub>2</sub>O (4 mL) και κορεσμένο διάλυμα NaCl (4 mL). Ακολουθεί ξήρανση της οργανικής φάσης με Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, έλεγχος της με TLC σε σύστημα ανάπτυξης CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH 9:1 και συμπύκνωση. Τέλος, με χρωματογραφία στήλης σε σύστημα CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH 9.5:0.5 παραλαμβάνεται ο αμιδικός εστέρας.

**2-(2-(2-(3,4-διμεθοξυφαινυλο)ακεταμιδο)αιθοξυ)αιθυλο 2-(3,4-διμεθοξυφαινυλο)οξικός εστέρας (66)**



$C_{24}H_{31}NO_8$   
Mol. Wt.: 461.51

Η ένωση **66** παρασκευάστηκε σύμφωνα με την γενική μέθοδο παρασκευής αμιδικών εστέρων με σύζευξη της αμιδικής αλκοόλης **62** (0.13 g, 0.45 mmol) με το 3,4-διμεθοξυφαινυλοξικό οξύ. Καθαρίστηκε με χρωματογραφία στήλης σε σύστημα  $CH_2Cl_2/MeOH$  9.5:0.5 και το επιθυμητό προϊόν παραλήφθηκε ως άχρωμο λάδι.

$\alpha = 84\%$  (0.17 g)

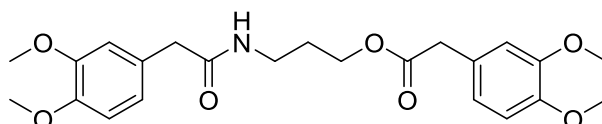
$R_f = (CH_2Cl_2/MeOH\ 9:1) = 0.69$

$^1H$  NMR (200 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$  6.80 – 6.67 (m, 6H), 5.93 (br s, 1H), 4.18 – 4.10 (m, 2H), 3.80 (d,  $J = 3.1$  Hz, 12H), 3.58 – 3.48 (m, 4H), 3.42 (d,  $J = 4.6$  Hz, 4H), 3.39 – 3.27 (m, 2H).

$^{13}C$  NMR (50 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$  171.6, 171.2, 148.9, 148.6, 147.9, 127.1, 126.0, 121.2, 121.2, 112.1, 111.1, 110.9, 69.4, 68.6, 63.5, 55.6, 43.0, 40.4, 39.1.

MS (ESI)  $m/z$  υπολογίζεται για  $C_{24}H_{32}NO_8^+[M+H]^+$  462.2, βρέθηκε 462.2.

**3-(2-(3,4-διμεθοξυφαινυλο)ακεταμιδο)προπυλο 2-(3,4-διμεθοξυφαινυλο)οξικός εστέρας (67)**



$C_{23}H_{29}NO_7$   
Mol. Wt.: 431.48

Η ένωση **67** παρασκευάστηκε σύμφωνα με την γενική μέθοδο παρασκευής αμιδικών εστέρων με σύζευξη της αμιδικής αλκοόλης **63** (0.11 g, 0.42 mmol) με το 3,4-διμεθοξυφαινυλοξικό οξύ. Καθαρίστηκε με χρωματογραφία στήλης

σε σύστημα CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH 9.5:0.5 και το επιθυμητό προϊόν παραλήφθηκε ως λευκό στερεό.

$\alpha = 81\%$  (0.15 g)

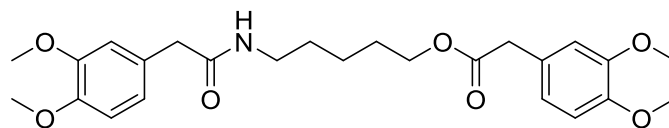
$R_f = (\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH } 9:1) = 0.63$

<sup>1</sup>H NMR (200 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  6.72 (d,  $J = 7.3$  Hz, 6H), 5.83 (br s, 1H), 4.02 (t,  $J = 6.1$  Hz, 2H), 3.80 (d,  $J = 2.3$  Hz, 12H), 3.44 (d,  $J = 6.3$  Hz, 4H), 3.19 (q,  $J = 6.4$  Hz, 2H), 1.72 (p,  $J = 6.4$  Hz, 2H).

<sup>13</sup>C NMR (50 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  171.8, 171.3, 148.9, 148.5, 147.9, 147.8, 127.0, 126.0, 121.2, 121.1, 112.0, 111.1, 110.8, 61.9, 55.6, 43.0, 40.5, 36.1, 28.3.

MS (ESI)  $m/z$  υπολογίζεται για C<sub>23</sub>H<sub>28</sub>NO<sub>7</sub><sup>-</sup>[M-H]<sup>-</sup> 430.2, βρέθηκε 430.3

**5-(2-(3,4-διμεθοξυφαινυλο)ακεταμιδο)πεντυλο 2-(3,4-διμεθοξυφαινυλο)οξικός εστέρας (68)**



C<sub>25</sub>H<sub>33</sub>NO<sub>7</sub>  
Mol. Wt.: 459.54

Η ένωση **68** παρασκευάστηκε σύμφωνα με την γενική μέθοδο παρασκευής αμιδικών εστέρων με σύζευξη της αμιδικής αλκοόλης **64** (0.10 g, 0.35 mmol) με το 3,4-διμεθοξυφαινυλοξικό οξύ. Καθαρίστηκε με χρωματογραφία στήλης σε σύστημα CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH 9.5:0.5 και το επιθυμητό προϊόν παραλήφθηκε ως άχρωμο λάδι.

$\alpha = 83\%$  (0.13 g)

$R_f = (\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH } 9:1) = 0.69$

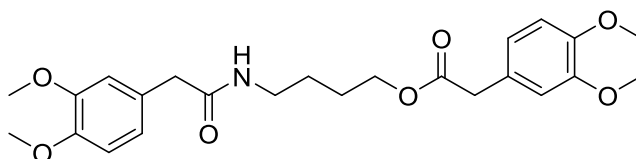
<sup>1</sup>H NMR (200 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  6.82 – 6.67 (m, 6H), 5.56 (br s, 1H), 4.00 (t,  $J = 6.6$  Hz, 2H), 3.82 (d,  $J = 2.9$  Hz, 12H), 3.47 (d,  $J = 8.9$  Hz, 4H), 3.13 (dd,  $J = 13.0, 6.7$  Hz, 2H), 1.56 (dt,  $J = 13.9, 6.8$  Hz, 2H), 1.37 (dd,  $J = 14.0, 7.3$  Hz, 2H), 1.29 – 1.16 (m, 2H).



$^{13}\text{C}$  NMR (50 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  171.8, 171.2, 148.9, 148.6, 148.0, 147.8, 127.1, 126.3, 121.4, 121.2, 112.1, 112.1, 111.2, 110.8, 64.4, 55.7, 43.2, 40.7, 39.2, 28.9, 28.0, 22.9.

MS (ESI)  $m/z$  υπολογίζεται για  $\text{C}_{25}\text{H}_{34}\text{NO}_7^+[\text{M}+\text{H}]^+$  460.2, βρέθηκε 460.3.

**4-(2-(3,4-διμεθοξυφαινυλο)ακεταμιδο)βουτυλο 2-(3,4-διμεθοξυφαινυλο)οξικός εστέρας (69)**



$\text{C}_{24}\text{H}_{31}\text{NO}_7$   
Mol. Wt.: 445.51

Η παραπάνω ένωση παρασκευάστηκε σύμφωνα με την γενική μέθοδο παρασκευής αμιδικών εστέρων με σύζευξη της αμιδικής αλκοόλης **65** (0.13 g, 0.50 mmol) με το 3,4-διμεθοξυφαινυλοξικό οξύ. Καθαρίστηκε με χρωματογραφία στήλης σε σύστημα  $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$  9.5:0.5 και το επιθυμητό προϊόν παραλήφθηκε ως άχρωμο λάδι.

$\alpha = 79\%$  (0.18 g)

$R_f = (\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH} 9:1) = 0.67$

$^1\text{H}$  NMR (200 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  6.74 (d,  $J = 4.5$  Hz, 6H), 5.61 (br s, 1H), 4.01 (t,  $J = 6.1$  Hz, 2H), 3.82 (s, 12H), 3.47 (d,  $J = 7.1$  Hz, 4H), 3.24 – 3.09 (m, 2H), 1.60 – 1.35 (m, 4H).

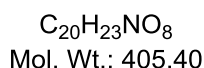
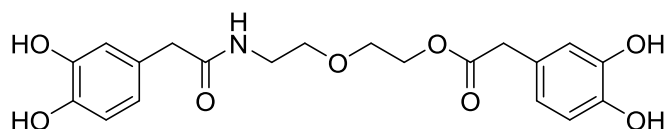
$^{13}\text{C}$  NMR (50 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  171.7, 171.2, 148.9, 148.5, 148.0, 147.8, 127.1, 126.2, 121.3, 121.1, 112.0, 111.1, 110.8, 64.1, 55.6, 43.1, 40.6, 38.9, 25.9, 25.7

MS (ESI)  $m/z$  υπολογίζεται για  $\text{C}_{24}\text{H}_{32}\text{NO}_7^+[\text{M}+\text{H}]^+$  446.2, βρέθηκε 446.2.

### 6.2.7 Γενική μέθοδος αποπροστασίας φαινολικών υδροξυλίων των αμιδικών εστέρων

Σε σφαιρική φιάλη διαλύεται ο αμιδικός εστέρας (1.00 mmol) σε  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (10 mL) και το μίγμα ψύχεται. Ακολουθεί η προσθήκη του αντιδραστήριου  $\text{BF}_3 \cdot \text{SMe}_2$  (5.20 g, 40 mmol). Η αντίδραση παραμένει υπό ψύξη για 30 λεπτά και έπειτα σε θερμοκρασία δωματίου για 24h. Στην συνέχεια προστίθεται υπό ψύξη MeOH (1 mL) και η αντίδραση αφήνεται έτσι σε ηρεμία για 10 λεπτά. Κατόπιν συμπυκνώνεται και το μίγμα αραιώνεται σε AcOEt (25 mL) και μεταφέρεται σε διαχωριστική χοάνη. Η οργανική στιβάδα εκχυλίζεται με κορεσμένο διάλυμα NaCl (10 mL) και ξηραίνεται με  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ . Έπειτα ελέγχεται με TLC σε σύστημα ανάπτυξης  $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$  8:2 και συμπυκνώνεται. Το τελικό προϊόν παραλαμβάνεται με χρωματογραφία στήλης σε σύστημα έκλουσης  $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$  9:1.

#### 2-(2-(2-(3,4-διυδροξυφαινυλο)ακεταμιδο)αιθοξυ)αιθυλο 2-(3,4-διυδροξυφαινυλο)οξικός εστέρας (70)



Η ένωση **70** παρασκευάστηκε σύμφωνα με την γενική μέθοδο αποπροστασίας των φαινολικών υδροξυλίων των αμιδικών εστέρων από την ένωση **66** (0.11 g, 0.24 mmol). Καθαρίστηκε με χρωματογραφία στήλης σε σύστημα  $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$  9:1 και το επιθυμητό προϊόν παραλήφθηκε ως άχρωμο λάδι.

$\alpha = 71\%$  (0.07 g)

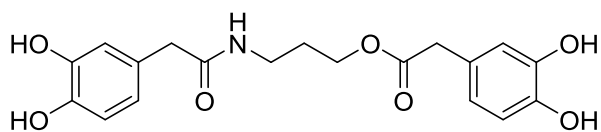
$R_f = (\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH} \text{ 8:2}) = 0.66$

$^1\text{H NMR}$  (200 MHz,  $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$ )  $\delta$  8.09 (br s, 4H), 7.35 (br s, 1H), 6.88 – 6.68 (m, 4H), 6.68 – 6.53 (m, 2H), 4.21 – 4.04 (m, 2H), 3.61 – 3.29 (m, 10H).

$^{13}\text{C}$  NMR (50 MHz,  $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$ )  $\delta$  172.9, 172.3, 145.8, 145.0, 144.8, 128.0, 126.6, 121.4, 121.3, 117.0, 117.0, 116.0, 115.8, 70.1, 69.3, 64.4, 43.1, 40.9, 40.0.

MS (ESI)  $m/z$  υπολογίζεται για  $\text{C}_{20}\text{H}_{22}\text{NO}_8^-$  [M-H] $^-$  404.1, βρέθηκε 404.2.

**3-(2-(3,4-διυδροξυφαινυλο)ακεταμιδο)προπυλο 2-(3,4-διυδροξυφαινυλο)οξικός εστέρας(71)**



$\text{C}_{19}\text{H}_{21}\text{NO}_7$   
Mol. Wt.: 375.38

Η παραπάνω ένωση παρασκευάστηκε σύμφωνα με την γενική μέθοδο αποπροστασίας των φαινολικών υδροξυλίων των αμιδικών εστέρων από την ένωση **67** (0.15 g, 0.34 mmol). Καθαρίστηκε με χρωματογραφία στήλης σε σύστημα  $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$  9:1 και το επιθυμητό προϊόν παραλήφθηκε ως άχρωμο λάδι.

$\alpha = 73\%$  (0.09 g)

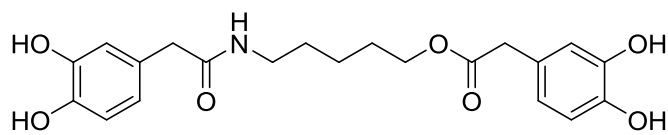
$R_f = (\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH} \text{ 8:2}) = 0.60$

$^1\text{H}$  NMR (200 MHz,  $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$ )  $\delta$  8.04 (br s, 4H), 7.37 (s, 1H), 6.83 (dd,  $J = 7.4, 2.0$  Hz, 2H), 6.73 (d,  $J = 8.0$  Hz, 2H), 6.59 (ddd,  $J = 8.2, 6.3, 2.1$  Hz, 2H), 4.05 (t,  $J = 6.2$  Hz, 2H), 3.44 (s, 2H), 3.37 (s, 2H), 3.30 – 3.22 (m, 2H), 1.85 – 1.68 (m, 2H).

$^{13}\text{C}$  NMR (50 MHz,  $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$ )  $\delta$  172.3, 171.7, 145.8, 145.7, 145.0, 144.8, 128.0, 126.7, 121.4, 121.3, 117.0, 116.9, 116.0, 115.3, 62.0, 42.6, 40.4, 36.4, 28.8.

MS (ESI)  $m/z$  υπολογίζεται για  $\text{C}_{19}\text{H}_{20}\text{NO}_7^-$  [M-H] $^-$  374.1, βρέθηκε 374.2.

**5-(2-(3,4-διδροξυφαινυλο)ακεταμιδο)πεντυλο 2-(3,4-διδροξυφαινυλο)οξικός εστέρας (72)**



$C_{21}H_{25}NO_7$   
Mol. Wt.: 403.43

Η ένωση **72** παρασκευάστηκε σύμφωνα με την γενική μέθοδο αποπροστασίας των φαινολικών υδροξυλίων των αμιδικών εστέρων από την ένωση **68** (0.13 g, 0.29 mmol). Καθαρίστηκε με χρωματογραφία στήλης σε σύστημα  $CH_2Cl_2/MeOH$  9:1 και το επιθυμητό προϊόν παραλήφθηκε ως άχρωμο λάδι.

$\alpha = 46\%$  (0.05 g)

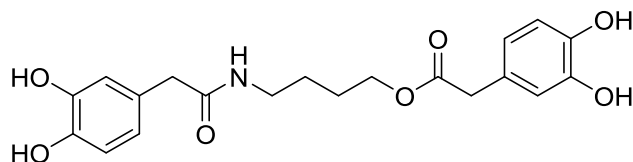
$R_f = (CH_2Cl_2/MeOH\ 8:2) = 0.65$

$^1H$  NMR (200 MHz,  $(CD_3)_2CO$ )  $\delta$  8.47 (s, 1H), 8.04 (s, 1H), 7.95 (s, 1H), 7.84 (s, 1H), 7.31 (br s, 1H), 6.77 (ddd,  $J = 13.3, 7.7, 1.5$  Hz, 4H), 6.69 – 6.53 (m, 2H), 4.00 (t,  $J = 6.3$  Hz, 2H), 3.43 (s, 2H), 3.36 (s, 2H), 3.17 (dd,  $J = 12.7, 6.6$  Hz, 2H), 1.64 – 1.23 (m, 6H).

$^{13}C$  NMR (50 MHz,  $(CD_3)_2CO$ )  $\delta$  172.7, 172.2, 145.8, 145.0, 144.8, 128.2, 126.9, 121.3, 121.3, 117.0, 116.9, 116.0, 115.8, 64.8, 43.2, 41.1, 39.9, 29.9, 28.9, 23.9.

MS (ESI)  $m/z$  υπολογίζεται για  $C_{21}H_{24}NO_7 [M-H]^-$  402.1, βρέθηκε 402.1.

**4-(2-(3,4-διδροξυφαινυλο)ακεταμιδο)βουτυλο 2-(3,4-διδροξυφαινυλο)οξικός εστέρας (73)**



$C_{20}H_{23}NO_7$   
Mol. Wt.: 389.40

Η παραπάνω ένωση παρασκευάστηκε σύμφωνα με την γενική μέθοδο αποπροστασίας των φαινολικών υδροξυλίων των αμιδικών εστέρων από την ένωση **69** (0.18 g, 0.40 mmol). Καθαρίστηκε με χρωματογραφία στήλης σε σύστημα CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH 9:1 και το επιθυμητό προϊόν παραλήφθηκε ως άχρωμο λάδι.

$\alpha = 48\%$  (0.07 g)

$R_f = (\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH } 8:2) = 0.58$

<sup>1</sup>H NMR (200 MHz, (CD<sub>3</sub>)<sub>2</sub>CO)  $\delta$  8.05 (br s, 4H), 7.36 (s, 1H), 6.85 – 6.66 (m, 4H), 6.60 (td, J = 8.0, 2.0 Hz, 2H), 4.02 (t, J = 5.8 Hz, 2H), 3.43 (s, 2H), 3.36 (s, 2H), 3.19 (q, J = 6.3 Hz, 2H), 1.56 (s, 4H).

<sup>13</sup>C NMR (50 MHz, (CD<sub>3</sub>)<sub>2</sub>CO)  $\delta$  172.8, 172.2, 145.8, 145.0, 144.8, 128.1, 126.8, 121.4, 121.3, 117.0, 116.9, 116.0, 115.8, 64.6, 43.2, 41.1, 39.7, 26.6.

MS (ESI) m/z υπολογίζεται για C<sub>20</sub>H<sub>22</sub>NO<sub>7</sub><sup>-</sup>[M-H]<sup>-</sup> 388.1, βρέθηκε 388.2.

## ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ – ΑΡΚΤΙΚΟΛΕΞΑ – ΑΚΡΩΝΥΜΙΑ

AcOEt	Οξικός αιθυλεστέρας
BBr <sub>3</sub>	Τριβρωμιούχο βόριο
BF <sub>3</sub> .SMe <sub>2</sub>	Τριφθοριούχο βόριο.διμεθυλοσουλφίδιο
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	Διχλωρομεθάνιο
CH <sub>3</sub> CN	Ακετονιτρίλιο
COMT	Κατεχολ-Ο-μεθυλ-τρανσφεράση
DHPAA	3,4-διυδροξυφαινυλοξικό οξύ
DMAP	4-(N,N-διμεθυλαμινο)πυριδίνη
DMSO	Διμεθυλοσουλφοξειδίο
DOPAC	3,4-διυδροξυφαινυλοξικό οξύ
DPPH	2-2-διφαινυλο-1-πικρυλοϋδραζύλο ρίζα
EDC.HCl	Υδροχλωρικό N'-αιθυλοκαρβοδιιμίδιο
HCl	Υδροχλωρικό οξύ
HOBt	1-υδροξυβενζοτριαζόλιο
HPAA	4-υδροξυφαινυλοξικό οξύ
HT	Υδροξυτυροσόλη
HVA	Ομοβανιλλικό οξύ
MAO	Μονοαμινο-οξειδάση
MeOH	Μεθανόλη
2-MT	3-μεθοξυτυραμίνη
NaCl	Χλωριούχο νάτριο
NaHCO <sub>3</sub>	Όξινο ανθρακικό νάτριο

## ΑΝΑΦΟΡΕΣ

---

- <sup>1</sup> A. Li, S. Li, Y. Zhang, X. Xu, Y. Chen, H. Li, Resources and Biological Activities of Natural Polyphenols, *Nutrients*, **2014**, *6*, 6020-6047.
- <sup>2</sup> A. A. Dayem, H. Y. Choi, G. Yang, K. Kim, S. K. Saha, S. Cho, The Anti-Cancer Effect of Polyphenols against Breast Cancer and Cancer Stem Cells: Molecular Mechanisms, *Nutrients*, **2016**, *8*, 581-617.
- <sup>3</sup> M. Afzal, A. Safer, M. Menon, Green tea polyphenols and their potential role in health and disease, *Inflammopharmacology*, **2015**, *23*, 151–161.
- <sup>4</sup> A. Crozier, I.B. Jaganath, M.N. Clifford, Dietary phenolics: chemistry, bioavailability and effects on health, *Nat. Prod. Rep.*, **2009**, *26*, 965–1096.
- <sup>5</sup> J. A. Vinson, X. Su, L. Zubik, P. Bose, Phenol antioxidant quantity and quality in foods: Fruits, *J. Agric. Food Chem.*, **2001**, *49*, 5315–5321.
- <sup>6</sup> A. Scalbert, G. Williamson, Dietary intake and bioavailability of polyphenols, *J. Nutr.*, **2000**, *130*, 2073S–2085S.
- <sup>7</sup> K. B. Pandey, S.I. Rizvi, Plant polyphenols as dietary antioxidants in human health and disease, *Oxidative Med. Cell. Longev.*, **2009**, *2*, 270–278.
- <sup>8</sup> N. Gang, S. M. Abdel-Aziz, A. Aeron, *Microbes in Food and Health*, 1<sup>st</sup> ed., Springer, Switzerland, 2016.
- <sup>9</sup> Van Sumere, C. *Methods in Plant Biochemistry: Plant Phenolics*, 1<sup>st</sup> ed., Academic Press: San Diego, CA, USA, 1989, 29–73.
- <sup>10</sup> M. Fantini, M. Benvenuto, L. Masuelli, G.V. Frajese, I. Tresoldi, A. Modesti, R. Bei, *In vitro* and *in vivo* antitumoral effects of combinations of polyphenols, or polyphenols and anticancer drugs: Perspectives on cancer treatment, *Int. J. Mol. Sci.*, **2015**, *16*, 9236–9282.
- <sup>11</sup> R. K. Lall, D.N. Syed, V.M. Adhami, M.I. Khan, H. Mukhtar, Dietary polyphenols in prevention and treatment of prostate cancer, *Int. J. Mol. Sci.*, **2015**, *16*, 3350–3376.
- <sup>12</sup> W. Vermeir, R. Nicholson, *Phenolic Compounds Biochemistry*, 1st ed., Springer: Dordrecht, The Netherlands, 2006, 1–34.

- 
- <sup>13</sup> S. Ramos, Effects of dietary flavonoids on apoptotic pathways related to cancer chemoprevention, *J. Nutr. Biochem.*, **2007**, *18*, 427–442.
- <sup>14</sup> O. Parisi, F. Puoci, D. Restuccia, G. Farina, F. Iemma, N. Picci, Polyphenols and their formulations: Different strategies to overcome the drawbacks associated with their poor stability and bioavailability, *Polyphen. Hum. Health Dis.*, **2014**, *4*, 29–45.
- <sup>15</sup> C. S. Yang, M. J. Lee, L. Chen, G. Y. Yang, Polyphenols as inhibitors of carcinogenesis, *Environ. Health Perspect*, **1997**, *105*, 971-976.
- <sup>16</sup> J. W. Erdman, D. Balentine, L. Arab, G. Beecher, J. T. Dwyer, J. Folts, J. Harnly, P. Hollman, C.L. Keen, G. Mazza, Flavonoids and heart health: Proceedings of the ILSI North America Flavonoids Workshop, May 31–June 1, 2005, Washington, DC. *J. Nutr.*, **2007**, *137*, 718S–737S.
- <sup>17</sup> G. Maru, G. Kumar, S. Ghantasala, P. Tajpara, *Polyphenol-Mediated in Vivo Cellular Responses during Carcinogenesis Polyphenols in Human Health and Disease*, Academic Press: Cambridge, MA, USA, 2014.
- <sup>18</sup> I. Jaganath, A. Crozier, L. Poquet, M. Clifford, G. Williamson, *Plant Phenolics and Human Health*, John Wiley & Sons, Inc.: Hoboken, NJ, USA, 2010, 1–89.
- <sup>19</sup> K. Ramawat, J. Merillon, *Natural Products, Phytochemistry, Botany and Metabolism of Alkaloids, Phenolics and Terpenes*, 1<sup>st</sup> ed., Springer: Heidelberg, Germany, 2013, 1541–2662.
- <sup>20</sup> J. Marais, B. Deavours, R. Dixon, D. Ferreira, *The Science of Flavonoids*, 1<sup>st</sup> ed., Springer: Columbus, OH, USA, 2006, 1–46.
- <sup>21</sup> D. Caridi, V. C. Trenerry, S. Rochfort, Profiling and quantifying quercetin glucosides in onion (*Allium cepa* L.) varieties using capillary zone electrophoresis and high performance liquid chromatography, *Food Chem.*, **2007**, *105*, 691–699.
- <sup>22</sup> J. B. Baruah, *Chemistry of Phenolic Compounds: State of the art*, 1<sup>st</sup> ed., Nova Science Publishers, Inc.: New York, 2011.



- 
- <sup>23</sup> M. Kalinowska, A. Bielawska, H. Lewandowska-Siwkiewicz, W. Priebe, W. Lewandowski, Apples: Content of phenolic compounds vs. Variety, part of apple and cultivation model, extraction of phenolic compounds, biological properties, *Plant Physiol. Biochem.*, **2014**, *84*, 169–188.
- <sup>24</sup> T. P. Kondratyuk, J. M. Pezzuto, Natural product polyphenols of relevance to human health, *Pharm. Biol.*, **2004**, *42*, 46–63.
- <sup>25</sup> P. Vitaglione, A. Napolitano, V. Fogliano, Cereal dietary fibre: A natural functional ingredient to deliver phenolic compounds into the gut, *Trends Food Sci. Technol.*, **2008**, *19*, 451-463.
- <sup>26</sup> V. Fogliano, M. L. Corollaro, P. Vitaglione, A. Napolitano, R. Ferracane, F. Travaglia, M. Arlorio, A. Costabile, A. Klinder, G. Gibson, *In vitro* bioaccessibility and gut biotransformation of polyphenols present in the water-insoluble cocoa fraction, *Med. Nutr. Food Res.*, **2011**, *55*, S44–S55.
- <sup>27</sup> A. Gomez-Rico, M. D. Salvador, M. La Greca, G. Fregapane, Phenolic and volatile compounds of extra virgin olive oil (*Olea europaea* L. Cv. Cornicabra) with regard to fruit ripening and irrigation management, *J. Agric. Food Chem.*, **2006**, *54*, 7130–7136.
- <sup>28</sup> M. Bouaziz, M. Chamkha, S. Sayadi, Comparative study on phenolic content and antioxidant activity during maturation of the olive cultivar Chemlali from Tunisia, *J. Agric. Food Chem.*, **2004**, *52*, 5476–5481.
- <sup>29</sup> S. Molino, M. Dossena, D. Buonocore, F. Ferrari, L. Venturini, G. Ricevuti, M. Verri, Polyphenols in dementia: From molecular basis to clinical trials, *Life Sci.*, **2016**, *161*, 69-77.
- <sup>30</sup> M. Singh, M. Arseneault, T. Sanderson, V. Murthy, C. Ramassamy, Challenges for research on polyphenols from foods in Alzheimer's disease: bioavailability, metabolism, and cellular and molecular mechanisms, *J. Agric. Food Chem.*, **2008**, *56*, 4855–4873.
- <sup>31</sup> M. D. Pandareesh, R. B. Mythri, M. M. S. Bharath, Bioavailability of dietary polyphenols: factors contributing to their clinical application in CNS diseases, *Neurochem. Int.*, **2015**, *89*, 198–208.

- 
- <sup>32</sup> C. Manach, A. Scalbert, C. Morand, C. Rémésy, L. Jiménez, Polyphenols: food sources and bioavailability, *Am. J. Clin. Nutr.*, **2004**, *79*, 727–747.
- <sup>33</sup> J. P. E. Spencer, Metabolism of tea flavonoids in the gastrointestinal tract, *J. Nutr.*, **2003**, *133*, 3255S–3261S.
- <sup>34</sup> S. Barnes, J. Prasain, T. D'Alessandro, A. Arabshahi, N. Botting, M. A. Lila, The metabolism and analysis of isoflavones and other dietary polyphenols in foods and biological systems, *Food Funct.*, **2011**, *2*, 235–244.
- <sup>35</sup> C. Manach, G. Williamson, C. Morand, A. Scalbert, C. Rémésy, Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans. I. Review of 97 bioavailability studies, *Am. J. Clin. Nutr.*, **2005**, *81*, 230S–242S.
- <sup>36</sup> M. Daglia, Polyphenols as antimicrobial agents, *Biotechnology*, **2012**, *23*, 174-181.
- <sup>37</sup> A. N. Kong, R. Yu, C. Chen, S. Mandlekar, T. Primiano, Signal transduction events elicited by natural products: role of MAPK and caspase pathways in homeostatic response and induction of apoptosis, *Arch. Pharm. Res.*, **2000**, *23*, 1-16.
- <sup>38</sup> J. P. Spencer, C. Rice-Evans, R.J. Williams, Modulation of prosurvival Akt/protein kinase B and ER K1/2 signaling cascades by quercetin and its *in vivo* metabolites underlie their action on neuronal viability, *J. Biol. Chem.*, **2003**, *278*, 34783-34793.
- <sup>39</sup> S. Wiseman, T. Mulder, A. Rietveld, Tea flavonoids: bioavailability *in vivo* and effects on cell signaling pathways *in vitro*, *Antioxid. Redox Signal*, **2001**, *3*, 1009-1021.
- <sup>40</sup> A. Scalbert, I. T. Johnson, M. Saltmarsh, Polyphenols: Antioxidants and beyond, *Am. J. Clin. Nutr.*, **2005**, *81*, 215S–217S.
- <sup>41</sup> M. J. Rodríguez-Vaquero, P. A. Aredes Fernández, M. C. Manca de Nadra, A. M. Strasser de Saad, Phenolic compound combinations on *Escherichia coli* viability in a meat system, *J. Agric. Food Chem.*, **2010**, *58*, 6048-6052.

- 
- <sup>42</sup> P. Jayaraman, M. K. Sakharkar, C. S. Lim, T. H. Tang, K. R. Sakharkar, Activity and interactions of antibiotic and phytochemical combinations against *Pseudomonas aeruginosa in vitro*, *Int. J. Biol. Sci.*, **2010**, *6*, 556-568.
- <sup>43</sup> M. J. Saavedra, A. Borges, C. Dias, A. Aires, R. N. Bennett, E. S. Rosa, M. Simões, Antimicrobial activity of phenolics and glucosinolate hydrolysis products and their synergy with streptomycin against pathogenic bacteria, *Med. Chem.*, **2010**, *6*, 74-183.
- <sup>44</sup> F. Bray, J. S. Ren, E. Masuyer, J. Ferlay, Global estimates of cancer prevalence for 27 sites in the adult population in 2008, *Inter. J. Can.*, **2013**, *132*, 1133–1145.
- <sup>45</sup> J. Ferlay, H. R. Shin, F. Bray, D. Forman, C. Mathers, D. M. Parkin, Cancer incidence and mortality worldwide, IARC News 2008 v2.0, **2010**, 2013.
- <sup>46</sup> P. Kanavos, The rising burden of cancer in the developing world, *Annals Oncol.*, **2006**, *17*, 815–823.
- <sup>47</sup> R. Siegel, D. Naishadham, A. Jemal, Cancer Statistics, 2012, *CA: A Can. J. Clinic*, **2012**, *62*, 10–29.
- <sup>48</sup> F. M. F. Roleira, E. J. Tavares da Silva, C. L. Varela, S. C. Costa, T. Silva, J. Garrido, F. Borges, Plant derived and dietary phenolic antioxidants: Anticancer properties, *Food Chem.*, **2015**, *183*, 235-258.
- <sup>49</sup> X. He, R. H. Liu, Phytochemicals of apple peels: Isolation, structure elucidation, and their anti-proliferative and antioxidant activities, *J. Agric. Food Chem.*, **2008**, *56*, 9905–9910.
- <sup>50</sup> M. E. Delgado, A. I. Haza, N. Arranz, A. Garcia, P. Morales, Dietary polyphenols protect against N-nitrosamines and benzo(a)pyrene-induced DNA damage (strand breaks and oxidized purines/pyrimidines) in HepG2 human hepatoma cells, *Eur. J. Nutr.*, **2008**, *47*, 479–490.
- <sup>51</sup> Y. J. Zhang, N. P. Seeram, R. Lee, L. Feng, D. Heber, Isolation and identification of strawberry phenolics with antioxidant and human cancer cell anti proliferative properties, *J. Agric. Food Chem.*, **2008**, *56*, 670–675.

- 
- <sup>52</sup> H.-H. Ho, C.-S. Chang, W.-C. Ho, S.-Y. Liao, C.-H. Wu, C.-J. Wang, Antimetastasis effects of gallic acid on gastric cancer cells involves inhibition of NFkappa B activity and downregulation of PI3K/AKT/small GTPase signals, *Food Chem. Toxic.*, **2010**, *48*, 2508–2516.
- <sup>53</sup> R. Fabiani, P. Rosignoli, A. De Bartolomeo, R. Fuccelli, M. Servili, G. Morozzi, The production of hydrogen peroxide is not a common mechanism by which olive oil phenols induce apoptosis on HL60 cells, *Food Chem.*, **2011**, *125*, 1249–1255.
- <sup>54</sup> W. Luo, M. Zhao, B. Yang, J. Ren, G. Shen, G. Rao, Antioxidant and antiproliferative capacities of phenolics purified from *Phyllanthus emblica* L. fruit, *Food Chem.*, **2011**, *126*, 277–282.
- <sup>55</sup> Y. Kawai, Y. Matsui, H. Kondo, H. Morinaga, K. Uchida, N. Miyoshi, Galloylated catechins as potent inhibitors of hypochlorous acid-induced DNA damage, *Chem. Res. Toxic.*, **2008**, *21*, 1407–1414.
- <sup>56</sup> Z. Yang, S. Yang, B. J. Misner, R. Chiu, F. Liu, F. L. Meyskens, Nitric oxide initiates progression of human melanoma via a feedback loop mediated by apurinic/aprimidinic endonuclease-1/redox factor-1, which is inhibited by resveratrol, *Mol. Can. Ther.*, **2008**, *7*, 3751–3760.
- <sup>57</sup> L. P. Sun, A. L. Chen, H. C. Hung, Y. H. Chien, J. S. Huang, C. Y. Huang, Chrysin: A histone deacetylase 8 inhibitor with anticancer activity and a suitable candidate for the standardization of Chinese propolis, *J. Agric. Food Chem.*, **2012**, *60*, 11748–11758.
- <sup>58</sup> E. Pichichero, R. Cicconi, M. Mattei, M. G. Muzi, A. Canini, Acacia honey and chrysin reduce proliferation of melanoma cells through alterations in cell cycle progression, *Inter. J. Oncol.*, **2010**, *37*, 973–981.
- <sup>59</sup> H. M. Song, G. H. Park, H. J. Eo, J. B. Jeong, Naringenin-Mediated ATF3 Expression Contributes to Apoptosis in Human Colon Cancer, *Biomol. Ther.*, **2016**, *24*, 140–146.
- <sup>60</sup> D. Arul, P. Subramanian, Naringenin (citrus flavonone) induces growth inhibition, cell cycle arrest and apoptosis in human hepatocellular carcinoma cells, *Pathol. Oncol. Res.*, **2013**, *19*, 763–770.

- 
- <sup>61</sup> S. Kim, T. I. Park, Naringenin: A partial agonist on estrogen receptor in T47D-KBluc breast cancer cells, *Int. J. Clin. Exp. Med.*, **2013**, *6*, 890–899.
- <sup>62</sup> H. J. Park, Y. K. Jeon, D. H. You, M. J. Nam, Daidzein causes cytochrome c-mediated apoptosis via the Bcl-2 family in human hepatic cancer cells, *Food Chem. Toxicol.*, **2013**, *60*, 542–549.
- <sup>63</sup> P. J. Magee, P. Allsopp, A. Samaletdin, I. R. Rowland, Daidzein, R-(+)-equol and S-(−)-equol inhibit the invasion of MDA-MB-231 breast cancer cells potentially via the down-regulation of matrix metalloproteinase-2, *Eur. J. Nutr.*, **2014**, *53*, 345–350.
- <sup>64</sup> Y. Zhou, J. Zheng, Y. Li, D.-P. Xu, S. Li, Y.-M. Chen, H.-B. Li, Natural Polyphenols for Prevention and Treatment of Cancer, *Nutrients*, **2016**, *8*, 515.
- <sup>65</sup> C. Santangelo, R. Vari, B. Scazzocchio, R. Di Benedetto, C. Filesi, R. Masella, Polyphenols, intracellular signalling and inflammation. *Ann. Ist. Super. Sanita*, **2007**, *43*, 394–405.
- <sup>66</sup> V. A. Kostyuk, A. I. Potapovich, T. O. Suhan, C. de Luca, L. G. Korkina, Antioxidant and signal modulation properties of plant polyphenols in controlling vascular inflammation, *Eur. J. Pharmacol.*, **2011**, *658*, 248–256.
- <sup>67</sup> D. Vauzour, A. Rodriguez-Mateos, G. Corona, M. J. Oruna-Concha, J. P. E. Spencer, Polyphenols and human health: Prevention of disease and mechanisms of action, *Nutrients*, **2010**, *2*, 1106–1131.
- <sup>68</sup> M. H. Farzaei, R. Rahimi, M. Abdollahi, The role of dietary polyphenols in the management of inflammatory bowel disease, *Curr. Pharm. Biotechnol.*, **2015**, *16*, 196–210.
- <sup>69</sup> D. A. Martin, B. W. Bolling, A review of the efficacy of dietary polyphenols in experimental models of inflammatory bowel diseases, *Food Funct.*, **2015**, *6*, 1773–1786.
- <sup>70</sup> J. A. Vita, Polyphenols and cardiovascular disease: Effects on endothelial and platelet function, *Am. J. Clin. Nutr.*, **2005**, *81*, 292S–297S.
- <sup>71</sup> A. B. Santhakumar, A. R. Kundur, K. Fanning, M. Netzel, R. Stanley, I. Singh, Consumption of anthocyanin-rich queen garnet plum juice reduces

---

platelet activation related thrombogenesis in healthy volunteers, *J. Funct. Food.*, **2015**, *12*, 11–22.

<sup>72</sup> A.B. Santhakumar, A.C. Bulmer, I. Singh, A review of the mechanisms and effectiveness of dietary polyphenols in reducing oxidative stress and thrombotic risk, *J. Hum. Nutr. Diet.*, **2013**, *27*, 1–21.

<sup>73</sup> I. Singh, M. Mok, A. M. Christensen, A. H. Turner, J. A. Hawley, The effects of polyphenols in olive leaves on platelet function, *Nutr. Metab. Cardiovasc. Dis.*, **2008**, *18*, 127–132.

<sup>74</sup> S. M. Nadochiy, E. K. Redman, Mediterranean diet and cardioprotection: The role of nitrite, polyunsaturated fatty acids, and polyphenols, *Nutrition*, **2011**, *27*, 733–744.

<sup>75</sup> S. Khurana, K. Venkataraman, A. Hollingsworth, M. Piche, T. C. Tai, Polyphenols: benefits to the cardiovascular system in health and in ageing, *Nutrients*, **2013**, *5*, 3779–3827.

<sup>76</sup> S. M. Samuel, M. Thirunavukkarasu, S. V. Penumathsa, D. Paul, N. Maulik, Akt/FOXO3a/SIRT1-mediated cardioprotection by *n*-tyrosol against ischemic stress in rat *in vivo* model of myocardial infarction: Switching gears toward survival and longevity, *J. Agric. Food Chem.*, **2008**, *56*, 9692–9698.

<sup>77</sup> A. Scalbert, C. Manach, C. Morand, C. Rémésy, L. Jiménez, Dietary polyphenols and the prevention of diseases, *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, **2005**, *45*, 287–306.

<sup>78</sup> M. Kampmann, N. Riedel, Y. L. Mo, L. Beckers, R. Wichmann, Tyrosinase catalyzed production of 3,4-dihydroxyphenylacetic acid using immobilized mushroom (*Agaricus bisporus*) cells and *in situ* adsorption, *J. Mol. Cat. B: Enzym.*, **2016**, *123*, 113-121.

<sup>79</sup> E. Eldrup, S. E. Moller, J. Andreasen, N. J. Christensen, Effects of Ordinary Meals on Plasma Concentrations of 3,4-Dihydroxyphenylalanine, Dopamine Sulphate and 3,4- Dihydroxyphenylacetic Acid, *Clin. Sci. I*, **1997**, *92*, 423–430.

- 
- <sup>80</sup> M. Candito, A. M. Krstulovic, P. Chambon, Stability of 3,4-Dihydroxyphenylacetic Acid in Plasma Extracts Assayed by High-Performance Liquid Chromatography with Electrochemical Detection, *J. Chromatogr. B Biomed. Appl.*, **1995**, 669, 413–415.
- <sup>81</sup> M. Monagas, M. Urpi-Sarda, F. Sánchez-Patán, R. Llorach, I. Garrido, C. Gómez-Cordovés, C. Andres-Lacueva, B. Bartolomé, Insights into the metabolism and microbial biotransformation of dietary flavan-3-ols and the bioactivity of their metabolites, *Food Funct.*, **2010**, 1, 233–253.
- <sup>82</sup> A. J. Lopes Jesus, S. Jarmelo, R. Fausto, I. Reva, Conformational preferences of 3,4-dihydroxyphenylacetic acid (DOPAC), *Spectr. Ac. Par. A: Mol. Biomol. Spectr.*, **2015**, 140, 54-64.
- <sup>83</sup> M. E. Marín-Zamora, F. Rojas-Melgarejo, F. García-Cánovas, P. A. García-Ruiz, Production of *o*-diphenols by immobilized mushroom tyrosinase, *J. Biotechnol.*, **2009**, 139, 163–168.
- <sup>84</sup> M. Guazzaroni, C. Crestini, R. Saladino, Layer-by-Layer coated tyrosinase: An efficient and selective synthesis of catechols, *Bioorg. Med. Chem.*, 2012, 20, 157–166.
- <sup>85</sup> C. W. G. van Gelder, W. H. Flurkey, H. J. Wichers, Sequence and structural features of plant and fungal tyrosinases, *Phytochemistry*, **1997**, 45, 1309–1323.
- <sup>86</sup> R.C. Krueger, The Effect of Ascorbic Acid on the Enzymatic Oxidation of Monohydric and *o*-Dihydric Phenols, *J. Am. Chem. Soc.*, **1950**, 72, 5582–5587.
- <sup>87</sup> J. R. Ros, J. N. Rodríguez-López, F. García-Cánovas, Effect of L-ascorbic acid on the monophenolase activity of tyrosinase, *Biochem. J.*, **1993**, 295, 309–312.
- <sup>88</sup> G. G. Collins, M. Sandler, E. D. Williams, Multiple forms of human brain mitochondrial monoamine oxidase, *Nature*, **1970**, 225, 817–20.
- <sup>89</sup> A. M. O'Carroll, C. J. Fowler, J. P. Phillips, The deamination of dopamine by human brain monoamine oxidase. Specificity for the two enzyme forms in

---

seven brain regions, *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*, **1983**, 322, 198–202.

<sup>90</sup> A. R. Green, B. D. Mitchell, A. F. Tordoff, , Evidence for dopamine deamination by both type A and type B monoamine oxidase in rat brain *in vivo* and for the degree of inhibition of enzyme necessary for increased functional activity of dopamine and 5-hydroxytryptamine, *Br. J. Pharmacol*, **1977**, 60, 343–349.

<sup>91</sup> Y. Tang, S. Nakashima, S. Saiki, Y. Myoi, N. Abe, S. Kuwazuru, B. Zhu, H. Ashida, Y. Murata, Y. Nakamura, 3,4-Dihydroxyphenylacetic acid is a predominant biologically-active catabolite of quercetin glycosides, *Food Res. Int.*, **2016**, 89, 716-723.

<sup>92</sup> W. Mullen, J. M. Rouanet, C. Auger, P. L. Teissèdre, S. T. Caldwell, R. C. Hartley, A. Crozier, Bioavailability of [2-(14)C]quercetin-4'-glucoside in rats, *J. Agric. Food Chem.*, **2008**, 56, 12127–12137.

<sup>93</sup> F. Visioli, A. Poli, C. Galli, Antioxidant and other biological activities of phenols from olives and olive oil, *Med. Res. Rev.*, **2002**, 22, 65-75.

<sup>94</sup> I. Feki, N. Allouche, S. Sayadi, The use of polyphenolic extract, purified hydroxytyrosol and 3,4-dihydroxyphenylacetic acid from olive mill waste water for the stabilization of refined oils: a potential alternative to synthetic antioxidants, *Food Chem.*, **2005**, 93, 197-204.

<sup>95</sup> K. Papadopoulou, T. Triantis, E. Yannakopoulou, A. Nikokavoura, D. Dimotikali, Comparative studies on the antioxidant activity of aqueous extracts of olive oils and seed oils using chemiluminescence, *Anal. Chim. Acta.*, **2003**, 494, 41-47.

<sup>96</sup> P.-P. Liebgott, M. Labat, L. Casalot, A. Amouric, J. Lorquin, Bioconversion of tyrosol into hydroxytyrosol and 3,4-dihydroxyphenylacetic acid under hypersaline conditions by the new *Halomonas* sp. Strain HTB24, *FEMS Mic. Lett.*, **2007**, 276, 26-33.

<sup>97</sup> V. Raneva, I. Shimasaki, Y. Ishida, N. Ueta, E. Niki, Antioxidative Activity of 3,4-Dihydroxyphenylacetic Acid in Rat Plasma, *Lipids*, **2001**, 36, 1111-1116.



- 
- <sup>98</sup> Y. Nakamura, Y. Ohto, A. Murakami, H. Ohigashi, Superoxide scavenging activity of rosmarinic acid from *Perilla frutescens* Britton var. *acuta* f. *viridis*, *J. Agric. Food Chem.*, **1998**, *46*, 4545–4550.
- <sup>99</sup> T. Tsuda, K. Shiga, K. Ohshima, S. Kawakishi, T. Osawa, Inhibition of lipid peroxidation and the active oxygen radical scavenging effect of anthocyanin pigments isolated from *Phaseolus vulgaris* L., *Biochem. Pharm.*, **1996**, *52*, 1033–1039.
- <sup>100</sup> M. Monagas, N. Khan, C. Andrés-Lacueva, , M. Urpí-Sardá, M. Vázquez-Agell, R. M. Lamuela-Raventós, R. Estruch, Dihydroxylated phenolic acids derived from microbial metabolism reduce lipopolysaccharide-stimulated cytokine secretion by human peripheral blood mononuclear cells, *Brit. J. Nutr.*, **2009**, *102*, 201–206.
- <sup>101</sup> C. Carrasco-Pozo, M. Gotteland, R. L. Castillo, C. Chen, 3,4-dihydroxyphenylacetic acid, a microbiota-derived metabolite of quercetin, protects against pancreatic  $\beta$ -cells dysfunction induced by high cholesterol, *Exp. Cell Res.*, **2015**, *334*, 270–282.
- <sup>102</sup> C. Galli, F. Visioli, Antioxidant and Other Activities of Phenolics in Olives/Olive Oil, Typical Components of the Mediterranean Diet, *Lipids*, **1999**, *34*, S23–S26.
- <sup>103</sup> C. Manna, P. Galletti, V. Cucciolla, O. Moltedo, A. Leone, V. Zappia, The Protective Effect of the Olive Oil Polyphenol (3,4-Dihydroxyphenyl)-ethanol Counteracts Reactive Oxygen Metabolite-Induced Cytotoxicity in Caco-2 Cells, *J. Nutr.*, **1997**, *127*, 286–292.
- <sup>104</sup> M. Fito, M. I. Covas, R. M. Lamuela-Raventós, J. Vila, J. Torrents, C. de la Torre, J. Marrugat, Protective Effect of Olive Oil and Its Phenolic Compounds Against Low Density Lipoprotein Oxidation, *Lipids*, **2000**, *35*, 633–638.
- <sup>105</sup> C. Giovanni, E. Straface, D. Modesti, E. Coni, A. Cantafora, M. De Vincenzi, W. Malorni, R. Masella, Tyrosol, the Major Olive Oil Biophenol, Protects Against Oxidized- LDL-Induced Injury in Caco-2 Cells, *J. Nutr.*, **1999**, *129*, 1269–1277.

- 
- <sup>106</sup> S. A. Wiseman, J. N. N. J. Mathot, N. J. de Fouw, L. B. M. Tijburg, Dietary Nontocopherol Antioxidants Present in Extra Virgin Olive Oil Increase the Resistance of Low Density Lipoproteins to Oxidation in Rabbits, *Atherosclerosis*, **1996**, *120*, 15–23.
- <sup>107</sup> R. W. Owen, A. Giacosa, W. E. Hull, R. Haubner, B. Spiegelhalder, H. Bartsch, The Antioxidant/Anticancer Potential of Phenolic Compounds Isolated from Olive Oil, *Eur. J. Cancer*, **2000**, *36*, 1235–1247.
- <sup>108</sup> K. Gao, A. Xu, C. Krul, K. Venema, Y. Liu, Y. Niu, J. Lu, L. Bensoussan, N.P.Seeram, D. Heber, S.M. Henning, Of the major phenolic acids formed during human microbial fermentation of tea, citrus, and soy flavonoid supplements, only 3,4-dihydroxyphenylacetic acid has antiproliferative activity, *J. Nutr.*, **2006**, *136*, 52–57.
- <sup>109</sup> D. H. Kim, S. Y. Kim, S. Y. Park, M. J. Han, Metabolism of Quercitrin by Human Intestinal Bacteria and Its Relation to Some Biological Activities, *Biol. Pharm. Bull.*, **1999**, *22*, 749-751.
- <sup>110</sup> S. Skrbek, C. E. Rüfer, D. Marko, M. Esselen, Quercetin and its microbial degradation product 3,4-dihydroxyphenylacetic acid generate hydrogen peroxide modulating their stability under *in vitro* conditions, *J. Food Nutr. Res.*, **2009**, *48*, 129-140.
- <sup>111</sup> S. Singh, R. P. Singh, *In Vitro* Methods of Assay of Antioxidants: An Overview, *Food Rev. Int.*, **2008**, *24*, 392-415.
- <sup>112</sup> M. Namiki, Antioxidants/antimutagens in food, *Food Sci. Nutr.*, **1990**, *29*, 273-300.
- <sup>113</sup> B. Halliwell, J. M. C. Gutteridge, *Free Radicals in Biology and Medicine*, Oxford University Press: Oxford, 1985, 61–69.
- <sup>114</sup> W. A. Pryor, B. Frei, *Natural antioxidants in human health and disease*, Academic Press: London, 1994, 1–62.
- <sup>115</sup> B. Halliwell, J. M. C. Gutteridge, Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: an overview, *Brain. Inj.*, **1992**, *6*, 203–212.

- 
- <sup>116</sup> B. Halliwell, J. M. C. Gutteridge, C. E. Cross, Free radicals, antioxidants, and human disease: where are we now?, *J. Lab Clin. Med.*, **1992**, *119*, 598–620.
- <sup>117</sup> S. R. J. Maxwell, Prospects for the use of antioxidants therapies, *Drugs*, **1995**, *49*, 345–361.
- <sup>118</sup> E. C. Opara, Role of oxidative stress in the etiology of type-2 diabetes and the effect of antioxidant supplementation on glycemic control, *J. Investig. Med.*, **2004**, *52*, 19–23.
- <sup>119</sup> B. Halliwell, How to characterize a biological antioxidant, *Free Radical Res. Commun.*, **1990**, *9*, 1–32.
- <sup>120</sup> J. R. Chipault, *Antioxidants for use in foods, in Autoxidation and antioxidants*, Vol. 2, Lundberg, W.O. Ed., Interscience: New York, 1962, 477–542.
- <sup>121</sup> D. Huang, B. Ou, R. L. Prior, The Chemistry Behind Antioxidant Capacity Assays, *J. Agric. Food Chem.*, **2005**, *53*, 1841–1856.
- <sup>122</sup> R. Apak, M. Özyürek, K. Güçlü, E. Çapanoğlu, Antioxidant Activity/Capacity Measurement. 1. Classification, Physicochemical Principles, Mechanisms, and Electron Transfer (ET)-Based Assays, *J. Agric. Food Chem.*, **2016**, *64*, 997-1027.
- <sup>123</sup> R. Apak, K. Güçlü, B. Demirata, M. Özyürek, S. E. Çelik, B. Bektaşoğlu, K. I. Berker, D. Özyurt, Comparative evaluation of total antioxidant capacity assays applied to phenolic compounds, and the CUPRAC assay, *Molecules*, **2007**, *12*, 1496–1547.
- <sup>124</sup> R. Apak, M. Özyürek, K. Güçlü, E. Çapanoğlu, Antioxidant Activity/Capacity Measurement. 2. Hydrogen Atom Transfer (HAT)-Based, Mixed-Mode (Electron Transfer (ET))/(HAT), and Lipid Peroxidation Assays, *J. Agric. Food Chem.*, **2016**, *64*, 1028-1045.
- <sup>125</sup> R. L. Prior, X. Wu, K. Schaich, Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements, *J. Agric. Food Chem.*, **2005**, *53*, 4290–4302.

- 
- <sup>126</sup> H. Wang, G. Cao, R. L. Prior, Total antioxidant capacity of fruits, *J. Agric. Food Chem.*, **1996**, *44*, 701–705.
- <sup>127</sup> N. Pellegrini, P. Simonetti, C. Gardana, O. Brenna, P. G. Pietta, Polyphenol content and total antioxidant activity of *vini novelli* (Young red wines), *J. Agri. Food Chem.*, **2000**, *48*, 732–735.
- <sup>128</sup> G. W. Winston, F. Regoli, A. J. Jr. Dugas, J. H. Fong, K. A. Blanchard, A rapid gas chromatographic assay for determining oxyradical scavenging capacity of antioxidants and biological fluids, *Free Radical Biol. Med.*, **1998**, *24*, 480-493.
- <sup>129</sup> R. Cervellati, C. Renzulli, M. C. Guerra, E. Speroni, Evaluation of antioxidant activity of some natural polyphenolic compounds using the Briggs-Rauscher reaction method, *J. Agric. Food Chem.*, **2002**, *50*, 7504-7509.
- <sup>130</sup> S. Ashida, S. Okazaki, W. Tsuzuki, T. Suzuki, Chemiluminescent method for the evaluation of antioxidant activity using lipihydroperoxide-luminol, *Anal. Sci.*, **1991**, *7*, 93-96.
- <sup>131</sup> J. Chmura, J. Slawinski, Assay of antioxidants by the quenching of the anthracene-sensitized electrochemiluminescence. *J. Biolumin. Chemilumin.*, **1994**, *9*, 1-6.
- <sup>132</sup> K. M. Schaich, X. Tian, J. Xie, Hurdles and pitfalls in measuring antioxidant efficacy: A critical evaluation of ABTS, DPPH, and ORAC assays, *J. Fun. Foods*, **2015**, *14*, 111-125.
- <sup>133</sup> N. J. Miller, C. A. Rice-Evans, Factors influencing the antioxidant activity determined by the ABTS+ radical cation assay, *Free Radical Research*, **1997**, *26*, 195–199.
- <sup>134</sup> N. J. Miller, C. A. Rice-Evans, M. J. Davies, V. Gopinathan, A. Milner, A novel method for measuring antioxidant capacity and its application to monitoring the antioxidant status in premature neonates, *Clinical Science*, **1993**, *84*, 407–412.

- 
- <sup>135</sup> M. Strube, G. R. M. M. Haenen, H. van den Berg, A. Bast, Pitfalls in a method for assessment of total antioxidant capacity, *Free Rad. Res.*, **1997**, *26*, 515–521.
- <sup>136</sup> R. Re, N. Pellegrini, A. Proteggente, A. Pannala, M. Yang, C. A. Rice-Evans, Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolourization assay, *Free Rad. Bio. Med.*, **1999**, *26*, 1231–1237.
- <sup>137</sup> A. Ghiselli, M. Serafini, G. Maiani, E. Azzini, A. Ferro-Luzzi, A fluorescence-based method for measuring total plasma antioxidant capability, *Free Rad. Biol. Med.*, **1995**, *18*, 29–36.
- <sup>138</sup> A. N. Glazer, Phycoerythrin fluorescence-based assay for reactive oxygen species, *Methods. Enzymol.*, **1990**, *186*, 161–168.
- <sup>139</sup> G. Cao, E. Sofic, R. L. Prior, Antioxidant capacity of tea and common vegetables, *J. Agric. Food Chem.*, **1996**, *44*, 3426–3431.
- <sup>140</sup> D. Huang, B. Ou, M. Hampsch-Woodill, J. A. Flanagan, R. L. Prior, High-throughput assay of oxygen radical absorbance capacity (ORAC) using a multichannel liquid handling system coupled with a microplate fluorescence reader in 96-well format, *J. Agric. Food Chem.*, **2002**, *50*, 4437–4444.
- <sup>141</sup> B. Ou, M. Hampsch-Woodill, R. L. Prior, Development and validation of an improved oxygen radical absorbance capacity assay using fluorescein as the fluorescent probe, *J. Agric. Food Chem.*, **2001**, *49*, 4619–4626.
- <sup>142</sup> R. L. Prior, A. Hoang, L. Gu, X. Wu, M. Bacchiocca, L. Howard, M. Hampsch-Woodill, D. Huang, B. Ou, R. Jacob, Assays for hydrophilic and lipophilic antioxidant capacity (oxygen radical absorbance capacity (ORACFL) of plasma and other biological and food samples, *J. Agric. Food Chem.*, **2003**, *51*, 3273–3279.
- <sup>143</sup> X. Wu, G. R. Beecher, J. M. Holden, D. B. Haytowitz, S. E. Gebhardt, R. L. Prior, Lipophilic and hydrophilic antioxidant capacities of common foods in the United States, *J. Agric. Food Chem.*, **2004**, *52*, 4026–4037.
- <sup>144</sup> G. H. Cao, R. L. Prior, Measurement of oxygen radical absorbance capacity in biological samples, *Methods Enzymol.*, **1999**, *299*, 50–62.

- 
- <sup>145</sup> S. B. Kedare, R. P. Singh, Genesis and development of DPPH method of antioxidant assay, *J. Food Sci. Technol.*, **2011**, *48*, 412-422.
- <sup>146</sup> E. S. Contreras-Guzman, F. C. Strong, Determination of tocopherols (Vitamin E) by reduction of cupric ion, *JAOAC*, **1982**, *65*, 1215-1222.
- <sup>147</sup> M. C. Foti, The Use and Abuse of the DPPH<sup>•</sup> Radical, *J. Agric. Food Chem.*, **2015**, *40*, 8765-8776.
- <sup>148</sup> (α) J. X. Boucherle, B. Gillon, J. Maruani, J. Schweizer, Spin distribution in the diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) radical measured by neutron diffraction. *Mol. Phys.*, **1987**, *60*, 1121-1142., (β) D. E. Williams, Structure of 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl free radical, *J. Am. Chem. Soc.*, **1966**, *88*, 5665-5666., (γ) D. E. Williams, Crystal structure of 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl free radical, *J. Am. Chem. Soc.*, **1967**, *89*, 4280-4287.
- <sup>149</sup> M. C. Foti, C. Daquino, Kinetic and thermodynamic parameters for the equilibrium reactions of phenols with the DPPH<sup>•</sup> radical, *Chem. Commun.*, **2006**, 3252-3254.
- <sup>150</sup> (α) E. N. Hristea, I. C. Covaci-Cimpeanu, G. Ionita, P. Ionita, C. Draghici, M. T. Caproiu, M. Hillebrand, T. Constantinescu, A. T. Balaban, Reactions of 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) with two syringylic phenols or one aroxide derivative, *Eur. J. Org. Chem.*, **2009**, *2009*, 626-634. (β) M. B. Smith, J. March, *In March's Advanced Organic Chemistry*, 6th ed., Wiley: Hoboken, NJ, USA, 2007.
- <sup>151</sup> L. Valgimigli, K. U. Ingold, J. Lusztyk, Solvents effects on the reactivity and free spin distribution of 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl radicals, *J. Org. Chem.*, **1996**, *61*, 7947-7950.
- <sup>152</sup> A. Prakash, Antioxidant activity, *Med. Lab Anal. Prog.*, **2001**, *19*, 1-6.
- <sup>153</sup> J. M. Sendra, E. Sentandreu, J. L. Navarro, Reduction kinetics of the free stable radical 2, 2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH<sup>•</sup>) for determination of the antiradical activity of citrus juices, *Eur. Food Res. Technol.*, **2006**, *223*, 615-624.

- 
- <sup>154</sup> C. Sanchez-Moreno, J. A. Larrauri, F. Saura-Calixto, A procedure to measure the antiradical efficiency of polyphenols, *J. Sci. Food Agri.*, **1998**, *79*, 270–276.
- <sup>155</sup> C. Sanchez-Moreno, J. A. Larrauri, F. Saura-Calixto, Free radical scavenging capacity and inhibition of wines, grape juices and related polyphenolic constituents, *Food. Res. Int.*, **1999a**, *32*, 407–412.
- <sup>156</sup> C. Sanchez-Moreno, J. A. Larrauri, F. Saura-Calixto, Free radical scavenging capacity of selected red, rose and white wines, *J. Sci. Food Agric.*, **1999**, *79*, 1301–1304.
- <sup>157</sup> V. Bondet, W. Brand-Williams, C. Berset, Kinetics and mechanisms of antioxidant activity using the DPPH free radical method, *Leben. Wis. Technol. Food Sci. Technol.*, **1997**, *30*, 609-615.
- <sup>158</sup> W. Brand-Williams, M. E. Cuvelier, C. Berset, Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity, *Food Sci. Technol.*, **1995**, *28*, 25-30.
- <sup>159</sup> J. Ancerewicz, E. Miglavaca, P. A. Carrupt, B. Testa, F. Bree, R. Zinin, J. P. Tillement, P. Labidelle, S. D. Goyot, A. M. Chauvet-Monges, A. Crevent, A. Le Ridant, Structure property relationship of trimetadizine derivatives and model compounds as potential antioxidants, *Free Rad. Biol. Med.*, **1998**, *25*, 113-120
- <sup>160</sup> D. B. Min, Lipid oxidation of edible oil, In: Akoh K, Min DB (eds) *Food Lipids: Chemistry, Nutr. Biotech.*, Marcel Dekkar, New York, 1998, 283-296
- <sup>161</sup> G. Litwinienko, K. U. Ingold, Abnormal effects on hydrogen atom abstractions. 1. The reactions of phenols with 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH•) in alcohols, *J. Org. Chem.*, **2003**, *68*, 3433-3438.
- <sup>162</sup> P. A. MacFaul, K. U. Ingold, J. Luszyk, Kinetic solvent effects on hydrogen atom abstraction from phenol, aniline, and diphenylamine. The importance of hydrogen bonding on their radical-trapping (antioxidant) activities, *J. Org. Chem.*, **1996**, *61*, 1316-1321.
- <sup>163</sup> (α) M. H. V. Huynh, T. J. Meyer, Proton-coupled electron transfer, *Chem. Rev.*, **2007**, *107*, 5004-5064., (β) J. M. Mayer, D. A. Hrovat, J. L. Thomas, W.

---

T. Borden, Proton-coupled electron transfer versus hydrogen atom transfer in benzyl/toluene, methoxyl/methanol, and phenoxyl/phenol self-exchange reactions, *J. Am. Chem. Soc.*, **2002**, *124*, 11142-11147., (γ) J. J. Warren, J. M. Mayer, Moving protons and electrons in biomimetic systems, *Biochemistry*, **2015**, *54*, 1863-1878.

<sup>164</sup> J. Xie, K. M. Schaich, Re-evaluation of the 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl free radical (DPPH) assay for antioxidant activity, *J. Agric. Food Chem.*, **2014**, *62*, 4251-4260.

<sup>165</sup> M. C. Foti, C. Daquino, C. Geraci, Electron-transfer reaction of cinnamic acids and their methyl esters with the DPPH• radical in alcoholic solutions, *J. Org. Chem.*, **2004**, *69*, 2309–2314.

<sup>166</sup> J. T. Guo, H. L. Lee, S. H. Chiang, F. I. Lin, C. Y. Chang, Antioxidant properties of the extracts from different parts of broccoli in Taiwan, *J. Food Drug Anal.*, **2001**, *9*, 96-101.

<sup>167</sup> M. S. Blois, Antioxidant determinations by the use of a stable free radical, *Nature*, **1958**, *181*, 1199-1200.

<sup>168</sup> J. K. Kim, J. H. Noh, S. Lee, J. S. Choi, H. Suh, H. Y. Chung, Y. O. Song, W. C. Choi, The first total synthesis of 2, 3, 6-tribromo-4, 5-dihydroxybenzyl methyl ether (TDB) and its antioxidant activity, *Bull. Korean Chem. Soc.*, **2002**, *23*, 661-662.

<sup>169</sup> J. Lebeau, C. Furman, J. L. Bernier, P. Duriez, E. Teissier, N. Cotelle, Antioxidant properties of di-tert-butylhydroxylated flavonoids, *Free Radic. Biol. Med.*, **2000**, *29*, 900-912.

<sup>170</sup> K. Schwarz, G. Bertelsen, L. R. Nissen, P. T. Gardner, M. I. Heinonen, A. Hopia, T. Huynh-Ba, P. Lambelet, D. McPhail, L. H. Skibsted, L. Tijburg, Investigation of plant extracts for the protection of processed foods against lipid oxidation. Comparison of antioxidant assays based on radical scavenging, lipid oxidation and analysis of the principal antioxidant compounds, *Eur. Food Res. Technol.*, **2001**, *212*, 319–328.



- 
- <sup>171</sup> B. Yepez, M. Espinosa, S. Lopez, G. Bolanos, Producing antioxidant fractions from herbaceous matrices by supercritical fluid extraction, *Fluid Phase Equil.*, **2002**, *194*, 879–884.
- <sup>172</sup> Y. Lu, L. Y. Foo, Antioxidant and radical scavenging activities of polyphenols from apple pomace, *Food. Chem.*, **2000**, *68*, 81–85.
- <sup>173</sup> R. Amorati, L. Valgimigli, Advantages and limitations of common testing methods for antioxidants, *Free Radical Res.*, **2015**, *49*, 633-649.
- <sup>174</sup> S. Saito, H. Gao, J. Kawabata, DPPD (= 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl = 2,2-Diphenyl-1-(2,4,6-trinitrophenyl)hydrazyl) Radical-Scavenging Reaction of Protocatechuic Acid Esters (= 3,4-Dihydroxybenzoates) in Alcohols: Formation of Bis-alcohol Adduct, *Helvet. Chim. Acta*, **2006**, *89*, 821-831.
- <sup>175</sup> S. Saito, Y. Okamoto, J. Kawabata, T. Kasai, Quinone Hemiacetal Formation from Protocatechuic Acid during the DPPH Radical Scavenging Reaction, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **2003**, *67*, 1578-1579.
- <sup>176</sup> S. Saito, Y. Okamoto, J. Kawabata, Effects of Alcoholic Solvents on Abtiradical Abilities of Protocatechuic Acid and its Alkyl Esters, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **2004**, *68*, 1221-1227.
- <sup>177</sup> S. Saito, J. Kawabata, Effects of electron-withdrawing substituents on DPPH radical scavenging reactions of protocatechuic acid and its analogues in alcoholic solvents, *Tetrahedron*, **2005**, *61*, 8101-8108.
- <sup>178</sup> S. Saito, J. Kawabata, DPPH (= 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl) Radical-Scavenging Reaction of Protocatechuic Acid (= 3,4-Dihydroxybenzoic Acid): Difference in Reactivity between Acids and Their Esters, *Helvet. Chim. Acta*, **2006**, *89*, 1395-1407.
- <sup>179</sup> L. M. Sayre, D. V. Nadkarni, Direct conversion of phenols to o-quinones by copper (I) dioxygen. Questions regarding the monophenolase activity of tyrosinase mimics, *J. Am. Chem. Soc.*, **1994**, *116*, 3157-3158.
- <sup>180</sup> J. Kawabata, Y. Okamoto, A. Kodama, T. Makimoto, T. Kasai, Oxidative Dimers Produced from Protocatechuic and Gallic Esters in the DPPH Radical Scavenging Reaction, *J. Agric. Food Chem.*, **2002**, *50*, 5468-5471.

- 
- <sup>181</sup> K. S. Feldman, S. Quideau, H. M. Appel, Galloyl-derived orthoquinones as reactive partners in nucleophilic additions and Diels-Alder dimerizations: A novel route to the dehydrodigalloyl linker unit of agrimoniin-type ellagitannins, *J. Org. Chem.*, **1996**, *61*, 6656-6665.
- <sup>182</sup> T. Kimura, S. Yamamoto, I. Ogata, H. Miura, M. Hasegawa, Antioxidant ability of chicoric acid and its analogous compounds, *Chem. Abstr.*, **2000**, *132*, 222-322.
- <sup>183</sup> E. Tassano, A. Alama, A. Basso, G. Dondo, A. Galatini, R. Riva, L. Banfi, Conjugation of Hydroxytyrosol with Other Natural Phenolic Fragments: From Waste to Antioxidants and Antitumor Compounds, *Eur. J. Org. Chem.*, **2015**, 6710-6726.
- <sup>184</sup> M. Bodanszky, A. Bodanszky, *The Practice of Peptide Synthesis*, Springer, 1994.
- <sup>185</sup> Z. Wang, Steglich Catalyst, *Comprehensive Organic Name Reactions and Reagents*, **2010**, *597*, 2651-2655.
- <sup>186</sup> M. T. Konieczny, G. Maciejewski, W. Konieczny, Selectivity Adjustment in the Cleavage of Alkyl Phenyl and Methyl Phenyl Ethers with Boron Trifluoride-Methyl Sulfide Complex, *Synthesis*, **2005**, *10*, 1575-1577.
- <sup>187</sup> M. Koufaki, C. Kiziridi, F. Nikoloudaki, M. N. Alexis, Design and Synthesis of 1,2-dithiolane derivatives and evaluation of their neuroprotective activity, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2007**, *17*, 4223-4227.
- <sup>188</sup> R. Compton, S. Sheng, K. E. Carlson, N. A. Rebacz, I. Y. Lee, B. S. Katzenellenbogen, J. A. Katzenellenbogen, Pyrazolo[1,5-a]pyrimidines: Estrogen Receptor Ligands Possessing Estrogen Receptor  $\beta$  Antagonist Activity, *J. Med. Chem.*, **2004**, *47*, 5872-5893.
- <sup>189</sup> L. C. Chan, B. G. Cox, Kinetics of Amide Formation through Carbodiimide/N-Hydroxybenzotriazole (HOBt) Couplings, *J. Org. Chem.*, **2007**, *72*, 8863-8869.
- <sup>190</sup> <http://www.molinspiration.com/services/properties.html>.

- 
- <sup>191</sup> C. A. Lipinski, F. Lombardo, B. W. Dominy, P. J. Feeney, Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings, *Adv. Drug. Delivery Rev.*, **1997**, *23*, 4-25.
- <sup>192</sup> H. Pajouhesh, G. R. Lenz, Medicinal Chemical Properties of Successful Central Nervous System Drugs, *NeuroRx. Res.*, **2005**, *2*, 541-553.
- <sup>193</sup> L. M. LeBlanc, A. F. Paré, J. Jean-François, M. J. G. Hébert, M. E. Surette, M. Touaibia, Synthesis and Antiradical/Antioxidant Activities of Caffeic Acid Phenethyl Ester and Its Related Propionic, Acetic, and Benzoic Acid Analogues, *Molecules*, **2012**, *17*, 14637-14650.
- <sup>194</sup> M. C. Figueroa-Espinoza, P. Villeneuve, Phenolic acids enzymatic lipophilization., *J. Agric. Food Chem.*, **2005**, *53*, 2779–2787.
- <sup>195</sup> P. Villeneuve, Lipases in lipophilization reactions, *Biotechnol. Adv.*, **2007**, *25*, 515–536.
- <sup>196</sup> E. A. Decker, K. Warner, M. P. Richards, F. Shahidi, Measuring antioxidant effectiveness in food, *J. Agric. Food Chem.*, **2005**, *53*, 4303–4310.
- <sup>197</sup> L. J. López-Giraldo, M. Laguerre, J. Lecomte, M.-C. Figueroa-Espinoza, B. Baréa, J. Weiss, E. A. Decker, P. Villeneuve, Kinetic and Stoichiometry of the Reaction of Chlorogenic Acid and Its Alkyl Esters against DPPH Radical, *J. Agric. Food Chem.*, **2009**, *57*, 863-870.
- <sup>198</sup> M. Laguerre, C. Bayrasy, J. Lecomte, B. Chabi, E. A. Decker, C. Wrutniak-Cabello, G. Cabello, P. Villeneuve, How to boost antioxidants by lipophilization?, *Biochimie*, **2013**, *95*, 20-26.