



ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ

ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ

ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ

ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ ΚΑΙ ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ ΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΟΥ

ΔΙΑΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΟ ΔΙΑΤΜΗΜΑΤΙΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ

«ΟΡΓΑΝΙΚΗ ΣΥΝΘΕΣΗ ΚΑΙ ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΣΤΗ ΧΗΜΙΚΗ ΒΙΟΜΗΧΑΝΙΑ»

ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ ΔΙΠΛΩΜΑΤΟΣ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ

ΣΥΝΘΕΣΗ ΠΑΡΑΓΩΓΩΝ ΦΑΙΝΟΛΙΚΩΝ ΟΞΕΩΝ ΩΣ

ΑΝΑΣΤΟΛΕΩΝ ΤΟΥ ΕΝΖΥΜΟΥ ΟΥΡΕΑΣΗ

ΔΑΛΙΑΝΗ ΘΕΟΧΑΡΗ

ΧΗΜΙΚΟΣ

ΑΘΗΝΑ

ΙΟΥΝΙΟΣ 2018

ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ ΔΙΠΛΩΜΑΤΟΣ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ

**ΣΥΝΘΕΣΗ ΠΑΡΑΓΩΓΩΝ ΦΑΙΝΟΛΙΚΩΝ ΟΞΕΩΝ ΩΣ
ΑΝΑΣΤΟΛΕΩΝ ΤΟΥ ΕΝΖΥΜΟΥ ΟΥΡΕΑΣΗ**

ΔΑΛΙΑΝΗ ΘΕΟΧΑΡΗ

A.M.: 161501

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ:

Βασιλείου Σταματία, Επίκουρος Καθηγήτρια ΕΚΠΑ

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Βασιλείου Σταματία, Επίκουρος Καθηγήτρια ΕΚΠΑ

Μουτεβελή-Μηνακάκη Παναγιώτα, Καθηγήτρια ΕΚΠΑ

Κόκοτος Χριστόφορος, Επίκουρος Καθηγητής ΕΚΠΑ

ΗΜΕΡΟΜΗΝΙΑ ΕΞΕΤΑΣΗΣ 22/06/2018

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Στην παρούσα εργασία μελετάται το ένζυμο της ουρεάσης που απομονώνεται από το βακτήριο *Sporosarcina pasteurii*. Αναλύεται η δομή του, το ενεργό του κέντρο, ο μηχανισμός της καταλυτικής δράσης του και ο ρόλος που διαδραματίζουν οι ουρεάσες στη γεωργία και την ιατρική. Στη συνέχεια αναφέρονται και μελετώνται ορισμένες κατηγορίες ενώσεων που δρουν ως αναστολείς της ουρεάσης. Στο τελευταίο μέρος της εργασίας περιγράφεται η σύνθεση νέων φαινολικών ενώσεων, οι οποίες είναι πιθανόν να δρουν ως αναστολείς της ουρεάσης και παρουσιάζεται η μελέτη της ανασταλτικής τους δράσης. Τέλος, αναφέρεται η ταυτοποίηση των ενώσεων που συντέθηκαν με φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (NMR ^1H και ^{13}C) και φασματομετρία μάζας (MS).

ΘΕΜΑΤΙΚΗ ΠΕΡΙΟΧΗ: Σύνθεση φαινολικών παραγώγων

ΛΕΞΕΙΣ ΚΛΕΙΔΙΑ: Ουρεάση, *Sporosarcina pasteurii*, αναστολείς, φαινόλες

ABSTRACT

In the present thesis, the urease enzyme isolated from the bacterium *Sporosarcina pasteurii*, is examined. Its structure, its active site and its catalytic mechanism are analyzed, followed by a literature review of the ureases' role in agriculture and medicine and also, the categories of inhibitors and their possible action. Then, the synthesis of new phenolic derivatives as inhibitors of urease, together with a study of their inhibitory action are presented. Finally, the identification of these molecules is being described by using nuclear magnetic resonance (^1H and ^{13}C NMR) and mass spectrometry (MS).

SUBJECT AREA: Synthesis of phenolic derivatives

KEYWORDS: Urease, *Sporosarcina pasteurii*, inhibitors, phenols

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Για την ανάθεση του θέματος, την καθοδήγηση, την υποστήριξη και τις πολύτιμες συμβουλές καθ' όλη τη διάρκεια διεκπεραίωση της παρούσας διπλωματικής εργασίας, θα ήθελα να ευχαριστήσω την επιβλέπουσα καθηγήτριά μου κα. Βασιλείου Σταματία.

Επιπλέον, θα ήθελα να ευχαριστήσω τα υπόλοιπα μέλη της τριμελούς μου επιτροπής, τη Καθηγήτρια κ. Μουτεβελή-Μηνακάκη Παναγιώτα και τον Επίκουρο Καθηγητή κ. Κόκοτο Χριστόφορο για τις υποδείξεις και τις συμβουλές τους που συντέλεσαν στην τελική διαμόρφωση της παρούσας εργασίας.

Ευχαριστώ θερμά επίσης τον Αναπληρωτή Καθηγητή κ. Łukasz Berlicki από το Τμήμα Βιοοργανικής Χημείας του Πανεπιστημίου Wrocław στην Πολωνία για τα βιολογικά πειράματα που πραγματοποιήθηκαν στο εργαστήριό του, καθώς και για τις συμβουλές του κατά τη διάρκεια των πειραμάτων.

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, καθώς και τη συνάδελφο υποψήφια διδάκτορα Παγώνη Κατερίνα για το ευχάριστο κλίμα και την άψογη συνεργασία μας στο εργαστήριο.

Τέλος, ιδιαίτερες ευχαριστίες θα ήθελα να εκφράσω στην οικογένειά μου που με στήριξε όλα τα χρόνια των σπουδών μου, καθώς και στους φίλους μου και ιδιαίτερα στην αδελφική μου φίλη Αναστασία, που βρίσκονται δίπλα μου και με στηρίζουν.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΡΟΛΟΓΟΣ	18
1. ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1	20
1.1 Εισαγωγή.....	20
1.2 Δομικά χαρακτηριστικά των ουρεασών	23
1.3 Το ενεργό κέντρο της ουρεάσης.....	30
1.4 Καταλυτικός μηχανισμός υδρόλυσης της ουρίας από την SPU	32
1.5 Λειτουργίες στις οποίες εμπλέκονται οι ουρεάσες	34
1.5.1 Φυτικές ουρεάσες.....	35
1.5.2 Ουρεολυτικά βακτήρια παθογόνα για ανθρώπους και ζώα.....	36
1.5.3 Όξινες ουρεάσες.....	37
1.5.4 Ουρεάσες και ορυκτοποίηση	38
1.6 Μη ενζυμικές ιδιότητες της ουρεάσης.....	39
2. ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2	42
2.1 Αναστολείς Ενζύμων	42
2.2 Αναστολείς Ουρεασών.....	47
3. ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3	80
4. ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4	84
4.1 Συνθετική πορεία φαινολικών εστέρων – Μέθοδος Α.....	84
4.2 Συνθετική πορεία φαινολικών εστέρων – Μέθοδος Β.....	92
4.3 Συνθετική πορεία φαινολικών εστέρων – Μέθοδος Γ	98
4.4 Συνθετική πορεία φαινολικών αμιδίων – Μέθοδος Δ	104
4.5 Συνθετική πορεία φαινολικών αμιδίων – Μέθοδος Ε	111
4.6 Συνθετική πορεία παραγώγων τριαζολίου – Μέθοδος Ζ	117
4.7 Συνθετική πορεία παραγώγων τριαζολίου – Μέθοδος Η	125

5. ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5	132
6. ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6	140
6.1 Γενικό Πειραματικό Μέρος	140
6.1.1 Αντιδραστήρια, διαλύτες.....	140
6.1.2 Χρωματογραφική ανάλυση.....	140
6.1.3 Ταυτοποίηση/Χαρακτηρισμός ενώσεων	141
6.2 Γενικό συνθετικό μέρος.....	141
6.2.1 Γενική μέθοδος εστεροποίησης – Μέθοδος Α.....	141
6.2.2 Γενική μέθοδος εστεροποίησης – Μέθοδος Β.....	142
6.2.3 Γενική μέθοδος εστεροποίησης – Μέθοδος Γ	142
6.2.4 Γενική μέθοδος σύνθεσης αμιδίων – Μέθοδος Δ	143
6.2.5 Γενική μέθοδος σύνθεσης αμιδίων – Μέθοδος Ε	143
6.2.6 Γενική μέθοδος σύνθεσης παραγώγων τριαζολίου – Μέθοδος Ζ.....	144
6.2.7 Γενική μέθοδος σύνθεσης παραγώγων τριαζολίου – Μέθοδος Η	144
6.3 Σύνθεση και χαρακτηρισμός χημικών ενώσεων	145
7. ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ – ΑΡΚΤΙΚΟΛΕΞΑ – ΑΚΡΩΝΥΜΙΑ.....	176
8. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	178

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΣΧΗΜΑΤΩΝ

Σχήμα 1: Ενζυμική υδρόλυση της ουρίας.....	21
Σχήμα 2: Διαδικασία ενεργοποίησης ουρεασών. ^[47]	28
Σχήμα 3: Σχηματική παρουσίαση της νέας πρότασης για ενεργοποίηση της ουρεάσης. Το Ni (II) απεικονίζεται ως πράσινη σφαίρα. ^[47]	30
Σχήμα 4: Καταλυτικός μηχανισμός ενζυμικής υδρόλυσης της ουρίας από την SPU. ^[15]	34
Σχήμα 5: Καταλυτικός καταβολισμός της αργινίνης από την αργινάση.....	36
Σχήμα 6: Καθίζηση των ανθρακικών αλάτων με τη δράση των ουρεασών.	39
Σχήμα 7: Σύγκριση ενός αναστολέα (I) που αλληλεπιδρά με ένα ένζυμο (E) υπό (a) μη ομοιοπολικό και (b) ομοιοπολικό δεσμό ^[117]	43
Σχήμα 8: Παραδείγματα ενώσεων αναστολέων βασισμένων στο μηχανισμό.	47
Σχήμα 9: Φωσφοροδιαμιδικός εστέρας 75 ως ανάλογο μεταβατικής κατάστασης της υδρόλυσης της ουρίας και δομή της ένωσης 76 . ^[17]	68
Σχήμα 10: Η πρόσδεση της ένωσης 93 στο ενεργό κέντρο του ενζύμου και η δομή της ένωσης 93.	70
Σχήμα 11: Αντίδραση της ένωσης 96 με την κυστεΐνη του ενεργού κέντρου της ουρεάσης <i>Citrullus vulgaris</i>	72
Σχήμα 12: Δομή της ένωσης 97 και τρόπος δέσμευσης της στην SPU.	73
Σχήμα 13: Γράφημα της δραστηριότητας της SPU σε σχέση με το χρόνο επώασης σε διαφορετικές συγκεντρώσεις κατεχόλης. ^[227]	74
Σχήμα 14: Προτεινόμενη αντίδραση για την απενεργοποίηση της SPU με OSQ που οδηγεί στο σχηματισμό του INT1 (ριζικό ενδιάμεσο), με βάση τους κβαντομηχανικούς υπολογισμούς. ^[230]	75
Σχήμα 15: Προτεινόμενος μηχανισμός αδρανοποίησης της ουρεάσης με κατεχόλη. ^[230]	77
Σχήμα 16: Γενική μέθοδος παρασκευής εστέρων- Μέθοδος A.	84

Σχήμα 17: Μηχανισμός εστεροποίησης της Μεθόδου Α.....	87
Σχήμα 18: Φάσμα ^1H NMR της ένωσης 110 σε δευτεριωμένο χλωροφόρμιο.....	90
Σχήμα 19: Φάσμα ^{13}C NMR της ένωσης 110 σε δευτεριωμένο χλωροφόρμιο.....	91
Σχήμα 20: Φάσμα μάζας της ένωσης 110	92
Σχήμα 21: Γενική μέθοδος παρασκευής εστέρων- Μέθοδος Β.....	92
Σχήμα 22: Μηχανισμός εστεροποίησης της Μεθόδου Β.....	94
Σχήμα 23: Φάσμα ^1H NMR της ένωσης 123 σε δευτεριωμένο χλωροφόρμιο.....	96
Σχήμα 24: Φάσμα ^{13}C NMR της ένωσης 123 σε δευτεριωμένο χλωροφόρμιο.....	97
Σχήμα 25: Φάσμα μάζας της ένωσης 123	98
Σχήμα 26: Γενική μέθοδος σύνθεσης εστέρων- Μέθοδος Γ.....	99
Σχήμα 27: Σύνθεση εστέρα με τη μέθοδο των μικτών ανυδριτών.....	100
Σχήμα 28: Μηχανισμός σύνθεσης εστέρων της Μεθόδου Γ.....	101
Σχήμα 29: Φάσμα ^1H NMR της ένωσης 129 σε δευτεριωμένο διμεθυλοσουλφοξείδιο.....	102
Σχήμα 30: Φάσμα ^{13}C NMR της ένωσης 129 σε δευτεριωμένο διμεθυλοσουλφοξείδιο.....	103
Σχήμα 31: Φάσμα μάζας της ένωσης 129	104
Σχήμα 32: Γενική μέθοδος σύνθεσης αμιδίων- Μέθοδος Δ.....	104
Σχήμα 33: Μηχανισμός σύνθεσης αμιδίων της Μεθόδου Δ.....	107
Σχήμα 34: Φάσμα ^1H NMR της ένωσης 142 σε δευτεριωμένο διμεθυλοσουλφοξείδιο.....	109
Σχήμα 35: Φάσμα ^{13}C NMR της ένωσης 142 σε δευτεριωμένο διμεθυλοσουλφοξείδιο.....	110
Σχήμα 36: Φάσμα μάζας της ένωσης 142	111
Σχήμα 37: Γενική μέθοδος σύνθεσης αμιδίων- Μέθοδος Ε.....	111
Σχήμα 38: Μηχανισμός σύνθεσης αμιδίων της Μεθόδου Ε.....	113
Σχήμα 39: Φάσμα ^1H NMR της ένωσης 149 σε δευτεριωμένη ακετόνη.....	115

Σχήμα 40: Φάσμα ^{13}C NMR της ένωσης 149 σε δευτεριωμένο διμεθυλοσουλφοξείδιο.	116
Σχήμα 41: Φάσμα μάζας της ένωσης 149	117
Σχήμα 42: Γενική μέθοδος σύνθεσης παραγώγων τριαζολίου - Μέθοδος Z	117
Σχήμα 43: Μηχανισμός σύνθεσης παραγώγων αζιδίου.	120
Σχήμα 44: Μηχανισμός σύνθεσης παραγώγων τριαζολίου της Μεθόδου Z.	121
Σχήμα 45: Φάσμα ^1H NMR της ένωσης 155 σε δευτεριωμένο χλωροφόρμιο.	123
Σχήμα 46: Φάσμα ^{13}C NMR της ένωσης 155 σε δευτεριωμένο χλωροφόρμιο.	124
Σχήμα 47: Φάσμα μάζας της ένωσης 155	125
Σχήμα 48: Γενική μέθοδος σύνθεσης παραγώγων τριαζολίου - Μέθοδος H.	125
Σχήμα 49: Πιθανός μηχανισμός σύνθεσης παραγώγων τριαζολίου μέσω της Μεθόδου H.	127
Σχήμα 50: Φάσμα ^1H NMR της ένωσης 158 σε δευτεριωμένο διμεθυλοσουλφοξείδιο.	129
Σχήμα 51: Φάσμα ^{13}C NMR της ένωσης 158 σε δευτεριωμένο διμεθυλοσουλφοξείδιο.	130
Σχήμα 52: Φάσμα μάζας της ένωσης 158	131

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΕΙΚΟΝΩΝ

Εικόνα 1: Δομές φορμαμιδίου, ακεταμιδίου, <i>N</i> -μεθυλουρίας, <i>N</i> -υδροξυουρίας, <i>N,N'</i> -διυδροξυουρίας, σεμικαρβαζιδίου, θειουρίας και διαφόρων εστέρων και αμιδίων του φωσφορικού οξέος.	22
Εικόνα 2: Η τεταρτοταγής δομή των KAU, HPU και JBU. ^[21]	24
Εικόνα 3: Η τεταρτοταγής δομή της SPU: οι α, β και γ υπομονάδες ενός (αβγ) τριμερούς αναπαρίστανται ως κόκκινες, κίτρινες και μπλε ταινίες αντίστοιχα, ενώ οι θέσεις των ιόντων Ni (Ni ²⁺) στις ενεργές περιοχές αναπαρίστανται ως πράσινες σφαίρες. ^[17]	25
Εικόνα 4: Α: Η ανοιχτή διαμόρφωση του ευέλικτου πτερυγίου της SPU και Β: η κλειστή διαμόρφωση. Τα ιόντα Ni (Ni ²⁺) εμφανίζονται ως πράσινες σφαίρες ενώ τα άλλα άτομα χρωματίζονται σύμφωνα με τον τύπο του ατόμου. Διακρίνονται τα αμινοξέα αCys322 και αHis323. ^[27]	26
Εικόνα 5: Κρυσταλλικές δομές των UreF (αριστερά), UreDF (κέντρο) και UreDFG (δεξιά). Οι αλυσίδες UreD, UreF και UreG είναι χρωματισμένες με ανοιχτό μπλε, ανοιχτό πράσινο και σκούρο κόκκινο, αντίστοιχα. ^[47]	28
Εικόνα 6: Κρυσταλλικές δομές UreE από <i>Sporosarcina pasteurii</i> (αριστερά), <i>Klebsiella aerogenes</i> (κέντρο) και <i>Helicobacter pylori</i> (δεξιά). ^[47]	29
Εικόνα 7: Παρουσιάζεται το ενεργό κέντρο της ουρεάσης από <i>Sporosarcina pasteurii</i> . Τα ιόντα του νικελίου απεικονίζονται ως πράσινες σφαίρες. Οι δεσμοί υδρογόνου αποτυπώνονται ως λεπτές κυανές γραμμές. Εμφανίζονται μόνο επιλεγμένα αμινοξέα. ^[15]	32
Εικόνα 8: Δομές πουρινών (αδενίνη, γουανίνη) και ουριδινών (ακυλουρία, αλλοξάνη).	36
Εικόνα 9: Κρυσταλλική δομή του ενεργού κέντρου της SPU σε σύμπλεξη με BME. Εμφανίζονται μόνο επιλεγμένα αμινοξέα. ^[15]	48
Εικόνα 10: Δομή της 2-μερκαπτοαιθανόλης 19	48
Εικόνα 11: Κρυσταλλική δομή του ενεργού κέντρου της SPU σε σύμπλεξη με θειώδες. Εμφανίζονται μόνο επιλεγμένα αμινοξέα. ^[15]	49

Εικόνα 12: Παράγωγα του υδροξαμικού οξέος ως αναστολείς της ουρεάσης 20-29	50
Εικόνα 13: Κρυσταλλική δομή του ενεργού κέντρου της SPU σε σύμπλεξη με υδροξαμικό οξύ (AHA). Εμφανίζονται μόνο επιλεγμένα αμινοξέα. ^[15]	51
Εικόνα 14: Δομή του βορικού οξέος 30 και άλλων βορονικών οξέων 31-34	52
Εικόνα 15: Κρυσταλλική δομή του ενεργού κέντρου της SPU σε σύμπλεξη με βορικό οξύ. Εμφανίζονται μόνο επιλεγμένα αμινοξέα. ^[15]	52
Εικόνα 16: Δομή του κιτρικού οξέος 35	53
Εικόνα 17: Κρυσταλλική δομή του ενεργού κέντρου της SPU σε σύμπλεξη με κιτρικό οξύ. Εμφανίζονται μόνο επιλεγμένα αμινοξέα. ^[15]	53
Εικόνα 18: Κρυσταλλική δομή του ενεργού κέντρου της SPU σε σύμπλεξη με ιόν φθορίου. Εμφανίζονται μόνο επιλεγμένα αμινοξέα. ^[15]	55
Εικόνα 19: Κρυσταλλική δομή του ενεργού κέντρου της SPU σε σύμπλεξη με (A) π-βενζοκινόνη και (B) 2,5-διυδροξυ-βενζοσουλφονικό παράγωγο. Εμφανίζονται μόνο επιλεγμένα αμινοξέα. ^[15]	57
Εικόνα 20: Δομή των 1,4-βενζοκινόνης 36 , τετραχλωρο-1,4-βενζοκινόνης 37 , 2,5-διμεθυλο-1,4-βενζοκινόνης 38 και 1,4-ναφθοκινόνης 39	57
Εικόνα 21: Δομή των αντιβιοτικών <i>Levofloxacin</i> 40 και <i>Ciprofloxacin</i> 41	58
Εικόνα 22: Δομή των ενώσεων 42 και 43	59
Εικόνα 23: Δομές φλαβονοειδών. Η ένωση (44) αποτελεί τη βασική σκελετική δομή των φλαβονοειδών.....	59
Εικόνα 24: Δομές της (+)-κατεχίνης 46 και της επιγαλλοκατεχίνης του γαλλικού εστέρα 47	60
Εικόνα 25: Δομές των ενώσεων 48-50	60
Εικόνα 26: Δομές των ενώσεων 51-54	61
Εικόνα 27: Δομή των ενώσεων 55-59	62
Εικόνα 28: Διαμόρφωση της παλμιτίνης 56 στο ενεργό κέντρο της ουρεάσης του <i>H. Pylori</i>	63
Εικόνα 29: Δομή των ενώσεων 60-63	64

Εικόνα 30: Δομή της ομεπραζόλης 64 , της λανσοπραζόλης 65 και της ραμπεπραζόλης 66	64
Εικόνα 31: Δομή της ένωσης 67	65
Εικόνα 32: Δομή των ενώσεων 68-70	65
Εικόνα 33: Δομή των ενώσεων 71-73	66
Εικόνα 34: Απεικονίζεται ο τρόπος σύνδεσης της ένωσης 73 με την ουρεάση από <i>S. Pasteurii</i>	67
Εικόνα 35: Δομή της ένωσης 74	67
Εικόνα 36: Δομή των ενώσεων 77-81	68
Εικόνα 37: Δομή <i>P</i> -μεθυλο-φωσφινικών και θειοφωσφινικών αναστολέων 82- 87	69
Εικόνα 38: Δομή των <i>P</i> -υδροξυμεθυλο-φωσφινικών αναστολέων 88-92	69
Εικόνα 39: Δομή των ενώσεων 94 και 95	71
Εικόνα 40: Τρόπος σύνδεσης της ένωσης 95 στο ενεργό κέντρο του ενζύμου.....	72
Εικόνα 41: Κρυσταλλική δομή του ενεργού κέντρου της SPU σε σύμπλεξη με κατεχόλη. Εμφανίζονται μόνο επιλεγμένα αμινοξέα. ^[15]	78
Εικόνα 42: Δομή του ισχυρότερου πολυφαινολικού αναστολέα από την έρευνα του Xiao.....	78
Εικόνα 43: Δομή του καφεϊκού οξέος, του φερουλικού οξέος, του 3,4- διυδροξυφαινυλοξικού οξέος και του γαλλικού οξέος αντίστοιχα.	80
Εικόνα 44: Οι χημικές δομές των εστέρων που συντέθηκαν στα πλαίσια της παρούσας εργασίας.....	81
Εικόνα 45: Οι δομές των αλκοολών και των αλκυλαλογονιδίων που χρησιμοποιήθηκαν για τη σύνθεση των εστέρων.	81
Εικόνα 46: Οι χημικές δομές των αμιδίων που συντέθηκαν στα πλαίσια της παρούσας εργασίας.....	82
Εικόνα 47: Οι δομές των αμινών που χρησιμοποιήθηκαν για τη σύνθεση των αμιδίων.....	82

Εικόνα 48: Οι χημικές δομές των παραγώγων τριαζολίου που συντέθηκαν στα πλαίσια της παρούσας εργασίας.....	82
Εικόνα 49: Δομή του καφεϊκού οξέος, του φερουλικού οξέος, του 3,4-διυδροξυφαινυλοξικού οξέος και του γαλλικού οξέος αντίστοιχα.	84
Εικόνα 50: Εστέρες που παρασκευάστηκαν με τη Μέθοδο Α.....	85
Εικόνα 51: Εστέρες που παρασκευάστηκαν με τη Μέθοδο Β.....	93
Εικόνα 52: Εστέρας που παρασκευάστηκε με τη Μέθοδο Γ.....	99
Εικόνα 53: Αμίδια που παρασκευάστηκαν με τη Μέθοδο Δ.....	105
Εικόνα 54: Αμίδιο που παρασκευάστηκε με τη Μέθοδο Ε.....	112
Εικόνα 55: Παράγωγα τριαζολίου που παρασκευάστηκαν με τη Μέθοδο Ζ.....	118
Εικόνα 56: Παράγωγα τριαζολίου που παρασκευάστηκαν με τη Μέθοδο Η.....	126

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ

Πίνακας 1: Οι εστέρες που παρασκευάστηκαν με τη Μέθοδο Α και οι αποδόσεις της.	87
Πίνακας 2: Οι εστέρες που παρασκευάστηκαν με τη Μέθοδο Β και οι αποδόσεις της.	94
Πίνακας 3: Ο εστέρας που παρασκευάστηκε με τη Μέθοδο Γ και η απόδοση του.....	101
Πίνακας 4: Τα αμύδια που παρασκευάστηκαν με τη Μέθοδο Δ και οι αποδόσεις τους.....	108
Πίνακας 5: Το αμύδιο που παρασκευάστηκε με τη Μέθοδο Ε και η απόδοση του.....	114
Πίνακας 6: Τα παράγωγα τριαζολίου που παρασκευάστηκαν με τη Μέθοδο Ζ και οι αποδόσεις τους.	122
Πίνακας 7: Τα παράγωγα τριαζολίου που παρασκευάστηκαν με τη Μέθοδο Η και οι αποδόσεις τους.	128
Πίνακας 8: Αποτελέσματα βιολογικών δοκιμών για τα αρχικά οξέα και τους εστέρες που συντέθηκαν.	132
Πίνακας 9: Αποτελέσματα βιολογικών δοκιμών για τα αμύδια που συντέθηκαν.	136
Πίνακας 10: Αποτελέσματα βιολογικών δοκιμών για τα παράγωγα τριαζολίου που συντέθηκαν.	138

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 Οργανική Σύνθεση και τις Εφαρμογές στη Χημική Βιομηχανία από τον Φεβρουάριο του 2017 έως τον Μάιο του 2018 υπό την επίβλεψη της Επίκουρης Καθηγήτριας Βασιλείου Σταματίας.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1

Η ΟΥΡΕΑΣΗ

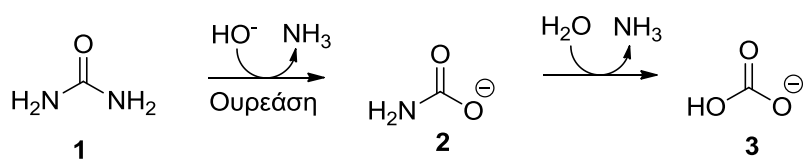
1.1 Εισαγωγή

Η ουρεάση (αμινοϋδρολάση της ουρίας, E.C. 3.5.1.5) είναι ένα σημαντικό νικελίου-εξαρτώμενο ένζυμο, το οποίο βρίσκεται σε φυτά, φύκη, μύκητες και σε προκαρυωτικούς οργανισμούς. ^{[1], [2]} Η ουρεάση εμπεριέχεται στον κύκλο αζώτου, καταλύοντας την υδρολυτική αποσύνθεση της ουρίας. ^{[3], [4]} Η κατάλυση με ουρεάση προκαλεί συνολική αύξηση του pH, γεγονός που συμβάλλει αρνητικά στην ανθρώπινη υγεία και στη γεωργία, όπως αναφέρεται παρακάτω. ^{[2], [5]}

Στην διάρκεια του 20^{ου} αιώνα, δύο ερευνητικές εργασίες κατέδειξαν δύο σημαντικά στοιχεία για την ουρεάση, που αποτελούν ορόσημα στην επιστήμη της βιοχημείας. Συγκεκριμένα, το 1926 ο James Sumner απομόνωσε από το φυτό *Canavalia ensiformis* ένα ένζυμο, το οποίο κρυσταλλώθηκε και όπως ο ίδιος ανέφερε: «κατέχει σε εξαιρετικό βαθμό τη δυνατότητα να αποσυνθέτει την ουρία σε ανθρακικό αμμώνιο», αποδεικνύοντας έτσι για πρώτη φορά ότι τα ένζυμα είναι πρωτεΐνες. ^[6] Αυτή η ανακάλυψη οδήγησε στο να απονεμηθεί το βραβείο Νόμπελ Χημείας στον Sumner το 1946. Το άλλο στοιχείο ανακαλύφθηκε το 1975, όταν οι Zerner, Dixon και οι συνεργάτες τους απέδειξαν ότι συμμετέχει το νικέλιο στην καταλυτική δραστηριότητα της ουρέασης του ίδιου φυτού, δίνοντας το πρώτο παράδειγμα της βιολογικής αναγκαιότητας αυτού του μετάλλου ως συμπαραγοντα ενζύμων. ^[7] Έκτοτε, έχουν διερευνηθεί εκτενώς ουρεάσες από διάφορες πηγές. Έχουν αποκτηθεί λεπτομερείς πληροφορίες σχετικά με την εμφάνισή τους και τους ρόλους τους στη φύση.

Η ουρεάση καταλύει την υδρόλυση της ουρίας, η οποία λαμβάνει χώρα σε δύο στάδια: στο πρώτο, αυστηρά ενζυμικό, πραγματοποιείται η υδρόλυση της ουρίας για να παραχθεί αμμωνία και καρβαμικό ανιόν, το οποίο στη συνέχεια (δεύτερο στάδιο) μετατρέπεται αυθόρμητα σε υδατικό περιβάλλον σε ένα δεύτερο μόριο αμμωνίας και όξινο ανθρακικό άλας (Σχήμα 1). Η καταλυόμενη αντίδραση πραγματοποιείται με ταχύτητα 3×10^{15} φορές μεγαλύτερη σε σχέση

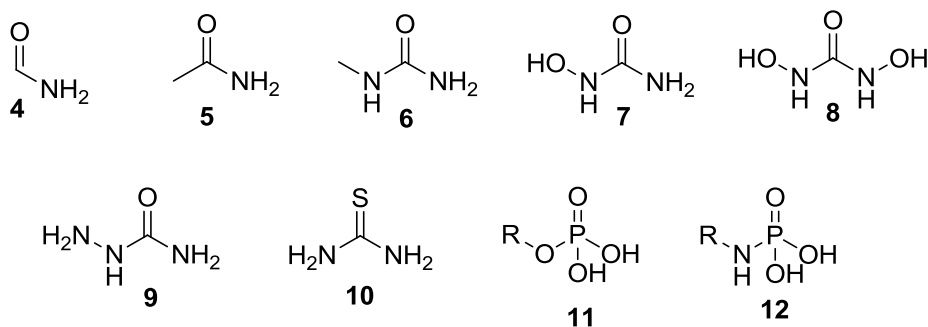
με την αντίστοιχη μη καταλυόμενη αντίδραση, καθιστώντας έτσι την ουρεάση ως την πιο γνωστή αποτελεσματική υδρολάση. ^[3] Η αποδοτικότητα του ενζύμου αυτού αποδίδεται στην παρουσία δυο ιόντων νικελίου (Ni^{2+}) στο ενεργό κέντρο του ενζύμου. ^[8]



Σχήμα 1: Ενζυμική υδρόλυση της ουρίας.

Η αντίδραση ακολουθεί μια τυπική κινητική συμπεριφορά Michaelis-Menten, με τιμές K_M στην περιοχή 0.2-32 mM και σε μεγάλο βαθμό ανεξάρτητη από το pH. Αντίθετα, το k_{cat} και κατά συνέπεια το k_{cat}/K_M εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από το pH. Η ουρεάση είναι ενεργή στην περιοχή pH με τιμές 5.0-9.0. Σε αντίθεση με την πλειονότητα, υπάρχει μια υποομάδα ουρεασών που έχει βέλτιστο pH στην περιοχή 2.0-4.5. ^[9]

Η ουρεάση όμως δεν καταλύει μόνο την υδρόλυση της ουρίας. Αντίθετα καταλύει και άλλες υδρολύσεις, όπως για παράδειγμα την υδρόλυση του φορμαμιδίου, του ακεταμιδίου, της *N*-μεθυλουρίας, της *N*-υδροξυουρίας, της *N,N'*-διυδροξυουρίας, του σεμικαρβαζιδίου, της θειουρίας καθώς και διαφόρων εστέρων και αμιδίων του φωσφορικού οξέος (Εικόνα 1). ^[10] Οι τιμές k_{cat} για αυτά τα υποστρώματα είναι μικρότερες περίπου 2-3 τάξεις μεγέθους από αυτές που παρατηρήθηκαν για την ουρία. ^[9]



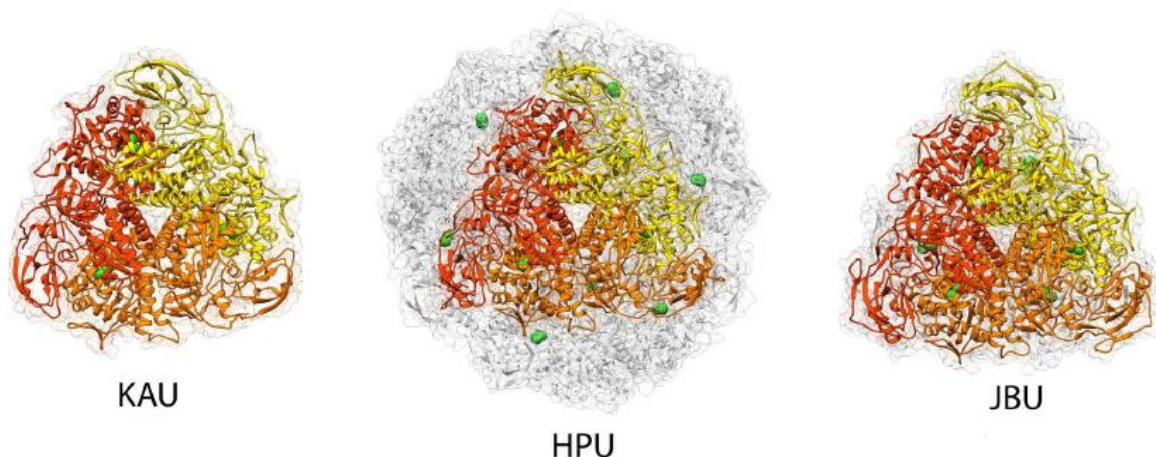
Εικόνα 1: Δομές φορμαμιδίου, ακεταμιδίου, *N*-μεθυλουρίας, *N*-υδροξουρίας, *N,N'*-διυδροξουρίας, σεμικαρβαζιδίου, θειουρίας και διαφόρων εστέρων και αμιδίων του φωσφορικού οξέος.

Όπως αναφέρθηκε παραπάνω, η καταλυτική υδρόλυση της ουρίας από την ουρεάση προκαλεί αύξηση του pH, γεγονός που προκαλεί αρνητικές συνέπειες τόσο στον ανθρώπινο οργανισμό, όσο και στη γεωργία. Αναλυτικότερα, οι βακτηριακές ουρεάσες αποτελούν σημαντικούς ιογενείς παράγοντες, που εμπλέκονται στην παθογένεση πολλών κλινικών καταστάσεων, όπως το ηπατικό κώμα, η πνευμονοφρίτιδα, η ουρολιθίαση και το πεπτικό έλκος.^{[2], [11]} Όσον αφορά τον τομέα της γεωργίας, τα ουρεολυτικά βακτήρια είναι διαδεδομένα σε χώματα που λιπαίνονται με ουρία ως πηγή αζώτου. Η μετατροπή του οργανικού αζώτου σε αμμώνιο επιταχύνεται από την παρουσία της ουρεάσης στο έδαφος. Η ταχεία αντίδραση της ουρίας μπορεί να οδηγήσει στη μείωση της γονιμότητας του εδάφους. Επιπλέον, η απελευθέρωση της αμμωνίας μπορεί να είναι τοξική για τα φυτά, ενώ η αύξηση της αλκαλικότητας του εδάφους μετά την υδρόλυση της ουρίας, προκαλεί βλάβη στα φυτά, προκαλώντας σημαντικές περιβαλλοντικές και οικονομικές επιπτώσεις.^{[12], [13], [14]}

Συνεπώς, είναι απαραίτητο να ελεγχθεί αυστηρότερα η δραστηριότητα της ουρεάσης προκειμένου να αντιμετωπιστούν οι επιβλαβείς συνέπειες στην ανθρώπινη υγεία, στη γεωργία αλλά και στο περιβάλλον. Για τον λόγο αυτό, η ουρεάση ως ένζυμο προκαλεί το ερευνητικό ενδιαφέρον για το σχεδιασμό, τη σύνθεση και τη μελέτη νέων ενώσεων, οι οποίες πρόκειται να έχουν τη δυνατότητα να αναστέλλουν τη δράση της.

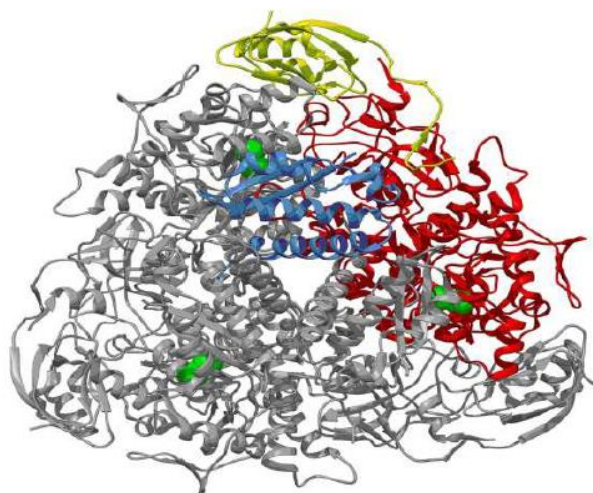
1.2 Δομικά χαρακτηριστικά των ουρεασών

Μέχρι σήμερα έχει μελετηθεί και αναλυθεί η δομή διαφόρων ουρεασών. Σε αυτές περιλαμβάνονται μεταξύ άλλων οι ουρεάσες βακτηρίων, όπως τα *Klebsiella aerogenes* (KAU) και *Helicobacter pylori* (HPU) και ουρεάσες φυτών, όπως του *Canavalia ensiformis* (jack bean, JBU, φασολιά) και του *Cajanus cajan* (pigeon pea, PPU, μπιζέλι) (Εικόνα 2). Ο συνολικός αριθμός γνωστών δομών ουρεάσεων ανέρχεται στις 49. Απ' αυτές, οι 44 αντιστοιχούν σε ουρεάσες βακτηρίων, οι 4 σε ουρεάσες από φασόλια και η 1 από μπιζέλι (*Cajanus cajan*).^[15] Η τεταρτοταγής δομή των περισσότερων βακτηριακών ουρεασών, μεταξύ αυτών και του *Klebsiella aerogenes* (KAU), αποτελείται από ένα τριμερές τριμερών $(\alpha\beta\gamma)_3$, όπου α, β και γ είναι τρεις διαφορετικές υπομονάδες και α η υπομονάδα που εμπεριέχει το ενεργό κέντρο του ενζύμου.^{[16], [17]} Σε άλλες βακτηριακές ουρεάσες, η τεταρτοταγής δομή αποτελείται από μόνο δύο υπομονάδες για να σχηματίσουν $(\alpha\beta)_3$ τριμερή, όπου η α υπομονάδα είναι ανάλογη με την αντίστοιχη α υπομονάδα του *Klebsiella aerogenes* (KAU) και η β υπομονάδα είναι πεπτίδιο που προκύπτει από την συγχώνευση των αντίστοιχων β και γ υπομονάδων που βρέθηκαν στο *Klebsiella aerogenes* (KAU). Για παράδειγμα, βρέθηκε ότι στο βακτήριο *Helicobacter pylori* (HPU) τέσσερα τριμερή διμερών σχηματίζουν μία τετραεδρική δομή $((\alpha\beta)_3)_4$ με δώδεκα συνολικά ενεργά κέντρα ανά μονάδα ενεργού ενζύμου.^{[18], [19]} Η τεταρτοταγής δομή των φυτικών ουρεασών αποτελείται από ένα διμερές ομοτριμερών $(\alpha_3)_2$, όπου η υπομονάδα α προέρχεται από τη συγχώνευση των αντίστοιχων α, β και γ υπομονάδων που βρίσκονται στα βακτήρια.^[20]



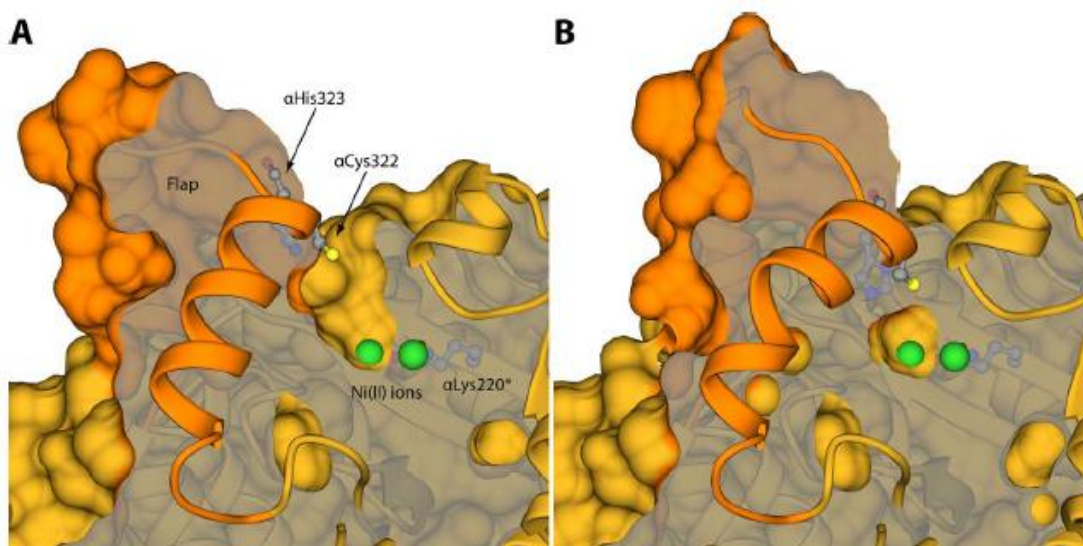
Εικόνα 2: Η τεταρτοταγής δομή των KAU, HPU και JBU. ^[21]

Στην παρούσα εργασία, μελετάται η ουρεάση που απομονώνεται από το βακτήριο *Sporosarcina pasteurii* (SPU, προηγουμένως γνωστό ως *Bacillus pasteurii*), ^[22] ένα διαδεδομένο βακτήριο του εδάφους. ^[15] Η δομή αυτής της ουρεάσης έχει προσδιοριστεί με την υψηλότερη, μέχρι στιγμής, ανάλυση (1.58 Å), με αποτέλεσμα οι δομικές παράμετροι να έχουν υπολογιστεί με μεγάλη ακρίβεια (Εικόνα 3). ^[23] Στην τεταρτοταγή του δομή, το ένζυμο αποτελείται από ένα τριπλό συμμετρικό (αβγ)₃ μοτίβο. ^[16] Το ενεργό κέντρο του ενζύμου βρίσκεται στην υπομονάδα α, με αποτέλεσμα να υπάρχουν τρία ενεργά κέντρα ανά ένζυμο. Η υπομονάδα α έχει μοριακό βάρος 61.4 kDa, η υπομονάδα β 14.0 kDa και η υπομονάδα γ 11.1 kDa. ^[17] Η δευτεροταγής και τριτοταγής δομή του ενζύμου είναι παραπλήσιες. Οι υπομονάδες α αποτελούνται από ένα (αβ)₈ β-βαρέλι και μία περιοχή με διαμόρφωση β-πτυχωτού φύλλου. Οι υπομονάδες β εντοπίζονται στην εξωτερική επιφάνεια του τριμερούς και αποτελούνται κυρίως από πολυάριθμα β-πτυχωτά φύλλα, ενώ οι υπομονάδες γ αποτελούνται από περιοχές που έχουν τη διαμόρφωση τόσο α-έλικας, όσο και β-πτυχωτού φύλλου και έχουν τη μορφή ενός σάντουιτς που αποτελείται από δύο στρώματα αβ. ^[24]



Εικόνα 3: Η τεταρτοταγής δομή της SPU: οι α, β και γ υπομονάδες ενός (αβγ) τριμερούς αναπαρίστανται ως κόκκινες, κίτρινες και μπλε ταινίες αντίστοιχα, ενώ οι θέσεις των ιόντων Ni (Ni^{2+}) στις ενεργές περιοχές αναπαρίστανται ως πράσινες σφαίρες. ^[17]

Ένα σημαντικό δομικό χαρακτηριστικό όλων των ουρεασών είναι η παρουσία ενός μοτίβου α-έλικας-στροφής-α-έλικας στην α-υπομονάδα που πλαισιώνει τη σχισμή της ενεργού κέντρου. Αυτό δίνει στην υπομονάδα μεγαλύτερη κινητικότητα σε σχέση με το υπόλοιπο ένζυμο. ^[25] Η αλληλουχία αμινοξέων αυτού του μοτίβου είναι εξαιρετικά διαδομένη μεταξύ ουρεασών από διαφορετικές πηγές. Η ευελιξία της υπομονάδας α θεωρείται ότι παίζει κυρίαρχο ρόλο στη διαμοριακή αναγνώριση μεταξύ του αποενζύμου και της UreD, που μαζί με τις UreF, UreG και UreE σχηματίζουν ένα υπερσύμπλοκο, που είναι απαραίτητο για την ενσωμάτωση των ιόντων Ni^{2+} στο ενεργό κέντρο και κατ' επέκταση για την ενεργοποίηση του ενζύμου. ^{[26], [27]} Επιπλέον, αυτό το μοτίβο μπορεί να βρίσκεται σε **ανοιχτή** ή **κλειστή** διαμόρφωση και θεωρείται ότι είναι σημαντικό στη σύνδεση του υποστρώματος και στην απομάκρυνση των προϊόντων από και προς το ενεργό κέντρο αντίστοιχα κατά τη διάρκεια της κατάλυσης. Σε αυτό συμμετέχουν τα αμινοξέα **αCys322** και **αHis323** (Εικόνα 4).



Εικόνα 4: A: Η ανοιχτή διαμόρφωση του ευέλικτου πτερυγίου της SPU και B: η κλειστή διαμόρφωση. Τα ιόντα Ni (Ni^{2+}) εμφανίζονται ως πράσινες σφαίρες ενώ τα άλλα άτομα χρωματίζονται σύμφωνα με τον τύπο του ατόμου. Διακρίνονται τα αμινοξέα αCys322 και αHis323 .^[27]

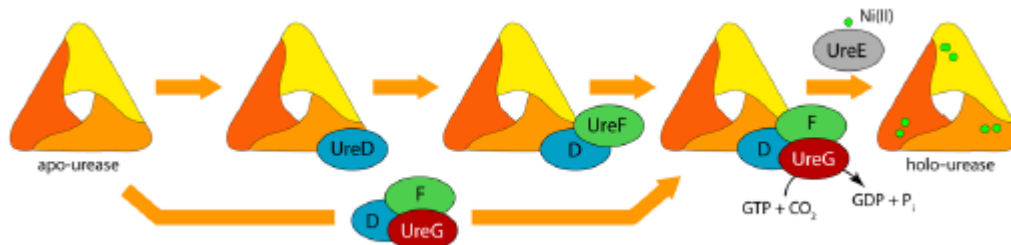
Η ουρεάση αρχικά παράγεται με τη μορφή του αποενζύμου και δεν έχει ιόντα νικελίου και ενζυμική δραστηριότητα.^[23] Εν συνεχεία, το αποένζυμο υφίσταται κάποιες τροποποιήσεις και τελικά μετατρέπεται στο ενεργό ένζυμο μέσω μιας σειράς αντιδράσεων, όπως είναι η πρόσληψη CO_2 για την καρβαμυλίωση της λυσίνης (δηλαδή αντικατάσταση των δραστικών υδρογόνων των ομάδων $-\text{NH}_2$ με την ομάδα $\text{CH}_3\text{NHCOO}^-$), η υδρόλυση του GTP και η μεταφορά των ιόντων νικελίου (Ni^{2+}) στην ενεργό περιοχή (Σχήμα 2). Οι παραπάνω διαδικασίες, καθώς επίσης και η εκλεκτικότητα του ενεργού κέντρου για τα ιόντα νικελίου, ρυθμίζονται από κυτταρικές διεργασίες σε μετα-μεταφραστικό επίπεδο και περιλαμβάνουν τη συμμετοχή πρωτεϊνών-συνοδών, των UreD (ονομάζεται UreH στο *H. Pylori*), UreF, UreG και UreE.^{[23], [28]}

Υπάρχουν δύο κατηγορίες γονιδίων ουρεάσης, οι οποίες χωρίζονται στα δομικά γονίδια και στα βοηθητικά γονίδια. Τα δομικά γονίδια είναι τα: ureA, ureB, ureC και ο ρόλος τους είναι η κωδικοποίηση των δομικών υπομονάδων του αποενζύμου. Το βοηθητικά γονίδια είναι τα: ureD, ureF, ureG, ureE και είναι υπεύθυνα για τη συγκρότηση της καταλυτικής θέσης.^{[23], [28]} Το σύνολο των βοηθητικών γονιδίων βρίσκεται σε διακόσιους δεκατρείς (213) γνωστούς

ουρεολυτικούς οργανισμούς. Το ureE απουσιάζει σε τριάντα επτά (37) οργανισμούς. Δεκατρία (13) γονιδιώματα έχουν έλλειψη ureD, πέντε (5) δεν περιέχουν ureG και μόνο ένα (1) δεν έχει ureF. Επιπροσθέτως, έξι (6) οργανισμοί δεν έχουν τόσο ureE, όσο και ureF, ενώ ένας (1) άλλος στερείται των ureF και ureD. Τέσσερα (4) γονιδιώματα στερούνται του συνόλου ureF, ureG και ureD, ενώ μόνο σε τέσσερις (4) περιπτώσεις δεν υπάρχει γνωστή πρωτεΐνη-συνοδός. Μεταξύ αυτών, το *Sporosarcina pasteurii* είναι σε θέση να ενεργοποιήσει την ουρεάση, ανεξάρτητα από την παρουσία πρωτεϊνών-συνοδών.^[29]

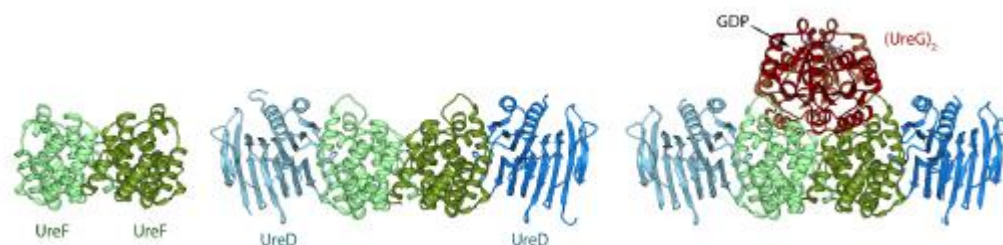
Αρχικά, η UreD είναι η πρώτη πρωτεΐνη που συνδέεται με το αποένζυμο, επιφέροντάς του διαμορφωτικές αλλαγές.^{[30], [31]} Είναι επίσης πιθανό να διευκολύνει την εισαγωγή του νικελίου στο ενεργό κέντρο.^[32] Ωστόσο λίγα στοιχεία είναι γνωστά για τη δομή και τη λειτουργία της πρωτεΐνης αυτής. Η έλλειψη πληροφοριών είναι αποτέλεσμα της μεγάλης δυσδιαλυτότητάς της, όταν απομονώνεται σε φυσικές συνθήκες. Στη συνέχεια η UreF, με απευθείας αλληλεπίδραση με την UreD, συνδέεται με το σύμπλοκο ουρεάσης-UreD.^[30] Η πρωτεΐνη αυτή θεωρείται ότι συνεισφέρει στη διαδικασία υδρόλυσης του GTP δρώντας σαν GTPάση.^[33] Στο σημείο αυτό υπενθυμίζεται ότι η υδρόλυση του GTP αποτελεί το ενεργειακό νόμισμα για τη βιοσύνθεση των πρωτεϊνών. Η UreG είναι υπεύθυνη για τη σύνδεση της υδρόλυσης του GTP με τη διαδικασία ενεργοποίησης της ουρεάσης και θεωρείται ότι καταλύει, παρουσία CO₂, την καρβαμυλίωση της λυσίνης της ενεργού περιοχής της ουρεάσης.^{[34], [35]} Διαφορετικά, μπορεί να θεωρηθεί πως ένα υπεрсύμπλοκο (UreDFG), που αποτελείται από UreD:UreF:UreG είναι δυνατόν να οδηγήσει στην υδρόλυση του GTP και στην καρβαμυλίωση της λυσίνης.^{[23], [28]} Οι πρωτεΐνες UreG έχουν απομονωθεί και χαρακτηριστεί από τους *K. Aerogenes*,^[36] *B. Pasteurii*,^[37] *M. Tuberculosis*,^[38] και *H. Pylori*.^[39] Η UreG μπορεί να διατηρήσει την ενζυμική δραστηριότητα λόγω της ακαμψίας της στο περιβάλλον του ενεργού κέντρου^[40] και είναι ικανή να διμεριστεί κατά τη δέσμευση του Zn(II).^{[39], [41]} *In vivo* μελέτες σε αναλύσεις δύο υβριδίων ζυμομύκητα,^{[42], [43]} καθώς και *in vitro* φασματοσκοπία NMR,^[44] έδειξαν άμεση αλληλεπίδραση μεταξύ UreE και UreG από το *Helicobacter pylori*. Η *in vitro* αλληλεπίδραση μεταξύ UreE και UreG έχει παρατηρηθεί επίσης στο

Sporosarcina pasteurii.^[45] Τέλος, η παρουσία της UreE στο σύμπλοκο ωρίμανσης της ουρεάσης διευκολύνει την ενεργοποίηση του ενζύμου, γεγονός που υποδηλώνει ότι η UreE είναι η συνοδός-πρωτεΐνη που είναι υπεύθυνη για την μεταφορά των ιόντων Ni^{2+} στο ενεργό κέντρο.^[46]



Σχήμα 2: Διαδικασία ενεργοποίησης ουρεασών.^[47]

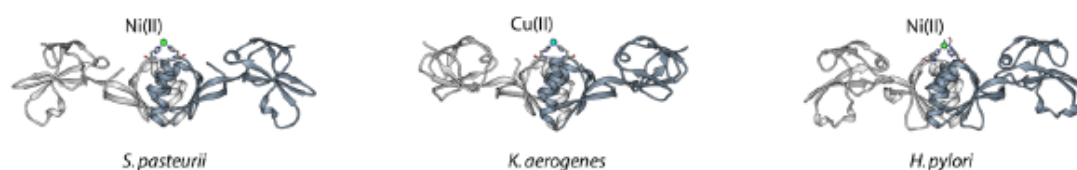
Παρόλο που η δομή της ουρεάσης που συνδέεται με οποιαδήποτε από τις βοηθητικές πρωτεΐνες δεν είναι ακόμη διαθέσιμη, η κρυσταλλική δομή του ομοδιμερούς $(\text{UreF})_2$ ^[48] και η δομή των $(\text{UreDF})_2$ και $(\text{UreDFG})_2$ ^[49] αναφέρθηκαν πρόσφατα ως σύμπλοκα από το *Helicobacter Pylori*. Η κρυσταλλική δομή του συμπλέγματος $(\text{UreDFG})_2$ περιέχει δύο αντίγραφα καθενός από τα UreF, UreD και UreG, σχηματίζοντας ένα διμερές ετεροτριμερών (Εικόνα 5).



Εικόνα 5: Κρυσταλλικές δομές των UreF (αριστερά), UreDF (κέντρο) και UreDFG (δεξιά). Οι αλυσίδες UreD, UreF και UreG είναι χρωματισμένες με ανοιχτό μπλε, ανοιχτό πράσινο και σκούρο κόκκινο, αντίστοιχα.^[47]

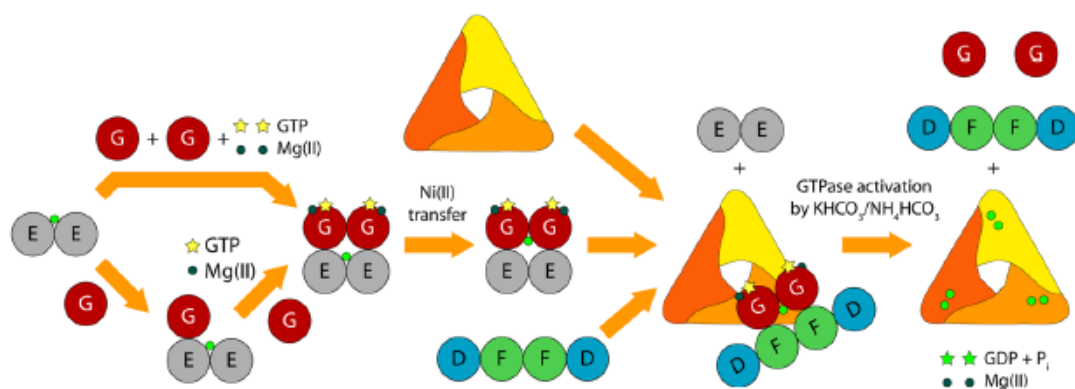
Δομικές πληροφορίες για τις πρωτεΐνες UreE από διάφορα βακτήρια προέρχονται από πολυάριθμες κρυσταλλογραφικές μελέτες UreE από *Sporosarcina pasteurii*,^{[50], [51]} *Klebsiella Aerogenes*^[52] και *Helicobacter Pylori*^{[53], [54]} και παρουσιάζουν παρόμοια πτυχή με το συμμετρικό ομοδιμερές, όπου

κάθε μονομερές αποτελείται από δύο περιοχές που συνδέονται με εύκαμπτους συνδέτες (Εικόνα 6).^[55]



Εικόνα 6: Κρυσταλλικές δομές UreE από *Sporosarcina pasteurii* (αριστερά), *Klebsiella aerogenes* (κέντρο) και *Helicobacter pylori* (δεξιά).^[47]

Το σύνολο των δομικών πληροφοριών από κρυσταλλογραφία, φασματοσκοπία UV-VIS και πειράματα σκέδασης του φωτός έγιναν αιτία για να προταθεί πρόσφατα ένας νέος μηχανισμός για τη βιοσύνθεση της δραστηκής ουρεάσης. Στη νέα αυτή πρόταση, το διμερές UreE, που είναι δεσμευμένο με Ni (II), δεσμεύει δύο μονομερή απο-UreG, διευκολύνοντας την πρόσληψη GTP από την UreG παρουσία ιόντων Mg (II). Η δέσμευση της UreG στην UreE μπορεί, κατ' αρχήν, να συμβεί είτε σε ένα μόνο στάδιο είτε σε μία πορεία πολλαπλών σταδίων. Στο σύμπλεγμα (UreEG)₂, το ιόν Ni (II) στη συνέχεια μεταφέρεται από το διμερές (UreE)₂ στο διμερές (UreG)₂. Έπειτα, το προ-σχηματισμένο διμερές (UreDF)₂ ανταγωνίζεται με το (UreE)₂ για το σύμπλοκο (UreG)₂:Ni(II) για να σχηματίσει την απο-ουρεάση: (UreDFG)₂:Ni(II). Τέλος, πραγματοποιείται η υδρόλυση GTP από την UreG, που καταλύεται από KHCO₃/NH₄HCO₃ για να ολοκληρωθεί η εισαγωγή του νικελίου στην απο-ουρεάση (Σχήμα 3).



Σχήμα 3: Σχηματική παρουσίαση της νέας πρότασης για ενεργοποίηση της ουρεάσης. Το Ni (II) απεικονίζεται ως πράσινη σφαίρα. ^[47]

1.3 Το ενεργό κέντρο της ουρεάσης

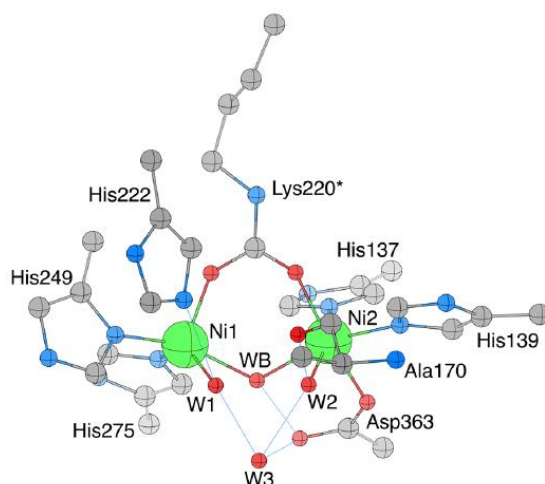
Στην ουρεάση του βακτηρίου *Sporosarcina pasteurii*, κάθε υπομονάδα α φέρει ένα ενεργό κέντρο που χαρακτηρίζεται από την παρουσία ενός διπυρηνικού κέντρου νικελίου. ^[17] Κάθε ενεργό κέντρο απέχει από το άλλο κατά 51Å. Τα δύο μεταλλικά ιόντα (Ni^{2+}) απέχουν 3.5-3.7 Å, είναι γεφυρωμένα με τα άτομα οξυγόνου της καρβοξυλικής ομάδας μιας καρβαμυλιωμένης λυσίνης (Lys220) και δεσμεύονται με δύο ιστιδίνες καθώς και μέσω ενός ιόντος υδροξειδίου (WB). Κοντά στο ανιόν υδροξειδίου (WB), βρίσκεται άλλο ένα μόριο νερού (W3). Το Ni1 συνδέεται επιπροσθέτως με ένα μόριο νερού (W1), καθώς και με τις δύο ιστιδίνες (His249 και την His275). Το Ni2 ενώνεται με την His137, την His139, με το καρβοξυλικό οξυγόνο ενός ασπαραγινικού οξέος (Asp363) και με ένα μόριο νερού (W2). Η σταθεροποίηση που παρατηρείται μεταξύ των ιόντων νικελίου (Ni^{2+}) και των μορίων του διαλύτη στο ενεργό κέντρο, οφείλεται στον μεγάλο αριθμό δεσμών υδρογόνου. Συγκεκριμένα, το W1 απέχει 2.9 Å από την His222, η οποία είναι πρωτονιωμένη και δρα ως δότης δεσμού υδρογόνου, όπως προκύπτει από την αλληλεπίδραση της His222 με την πεπτιδική αμινομάδα του Asp224 (στα 2,9 Å). Αντίθετα, το W2 σχηματίζει ισχυρό δεσμό υδρογόνου με την Ala170 (στα 2,9 Å), που ενεργεί ως δέκτης δεσμού υδρογόνου. Οι αποστάσεις μεταξύ WB, W1 και W2 είναι μικρότερες (2.1-2.2 Å) σε σύγκριση με τη συνηθισμένη απόσταση των ατόμων σε κανονικό οκταεδρικό ιόν $[\text{Ni}(\text{H}_2\text{O})_6]^{2+}$, που αντιστοιχεί περίπου σε 2.9 Å. ^[56]

Αυτή η διάταξη προσδιορίζει τη γεωμετρία των Ni1 και Ni2. Συγκεκριμένα, για το Ni1 προκύπτει η γεωμετρία της τετραγωνικής πυραμίδας, ενώ για το Ni2 προκύπτει οκταεδρική γεωμετρία. Τα W1, W2, W3 και WB σχηματίζουν μία κοιλότητα με τετραεδρική γεωμετρία σχεδιασμένη να σταθεροποιεί τη μεταβατική κατάσταση ή/και το ενδιάμεσο (Εικόνα 7).

Η τιμή pK_a για το σύμπλοκο $[Ni(H_2O)]^{2+}$ είναι ίση με 10.6.^[57] Επομένως, τα δύο μόρια νερού W(1) και W(2) είναι ουδέτερα μόρια.^[17] Η βέλτιστη τιμή pH για τη δράση της ουρεάσης είναι 8.0. Το εκτιμώμενο pK_a για την αποπρωτονίωση του WB είναι περίπου 9.0-10.0, γεγονός που υποδηλώνει πως σε pH=8.0, το WB βρίσκεται υπό τη μορφή ανιόντος υδροξειδίου.^[57]

Η παρουσία του νικελίου στην ουρεάση ως συμπαραγοντας του ενζύμου έχει προκαλέσει ενδιαφέρον μετά την ανακάλυψή του.^[7] Η ανάλυση του μηχανισμού κατάλυσης του ενζύμου θα μπορούσε να βοηθήσει στην εξήγηση της απαίτησης της ουρεάσης σε ιόντα Ni^{2+} σε σχέση με τα περισσότερο κοινά, λιγότερο τοξικά και με συμπληρωμένη τη στοιβάδα σθένους (d^{10}) ιόντα Zn^{2+} , που βρίσκονται συνήθως σε υδρολυτικά ένζυμα. Είναι γνωστό πως το κατιόν Zn^{2+} έχει μεγάλη πυκνότητα θετικού φορτίου, γεγονός που το καθιστά ικανό να δρα ως οξύ Lewis, πολώνοντας τα υποστρώματα και προετοιμάζοντάς τα για την πυρηνόφιλη προσβολή από το ανιόν υδροξειδίου. Ωστόσο, αυτές οι ιδιότητες χαρακτηρίζουν και το Ni^{2+} . Η διαφορά έγκειται στο γεγονός ότι το Ni^{2+} έχει μια μερικώς κατειλημμένη d^8 ηλεκτρονιακή διαμόρφωση που επάγει στερεοηλεκτρονικές παρεμποδίσεις, κάτι που δεν υπάρχει στην περίπτωση των ιόντων Zn^{2+} . Αυτή η ιδιότητα θα μπορούσε να αξιοποιηθεί από τα ιόντα Ni^{2+} ώστε να οδηγηθούν τα δύο υποστρώματα (η ουρία και το νερό) στη βέλτιστη χωρική τοπολογία που απαιτείται για την κατάλυση. Επιπλέον, το Ni^{2+} έχει μεγαλύτερη συγγένεια προς αζωτούχους προσδέτες σε σχέση με τον Zn^{2+} ,^[58] με αποτέλεσμα να βελτιώνεται η σταθεροποίηση της δέσμευσης της αμινομάδας της ουρίας. Τέλος, τα ιόντα νικελίου (Ni^{2+}) έχουν πολλαπλές διαθέσιμες θέσεις δέσμευσης λόγω της προτίμησής τους για μια οκταεδρική σφαίρα συναρμογής (σε αντίθεση με τα ιόντα ψευδαργύρου (Zn^{2+}) που προτιμούν κυρίως την τετραεδρική γεωμετρία^[59]), διευκολύνοντας έτσι τόσο την πρόσδεση της ουρίας, όσο και την σταθεροποίηση του μεταλλικού ιόντος μέσω πολλαπλών θέσεων πρόσδεσης με τα αμινοξέα του ενζύμου.^[15] Αξίζει

να αναφερθεί πως έγιναν προσπάθειες υποκατάστασης των ιόντων νικελίου (Ni^{2+}) με άλλα ιόντα, όπως Co^{2+} και Mn^{2+} . Παρατηρήθηκε όμως πως κατά την απομάκρυνση των δύο ιόντων νικελίου (Ni^{2+}), προκλήθηκε μη αναστρέψιμη απενεργοποίηση της πρωτεΐνης. [4]



Εικόνα 7: Παρουσιάζεται το ενεργό κέντρο της ουρεάσης από *Sporosarcina pasteurii*.

Τα ιόντα του νικελίου απεικονίζονται ως πράσινες σφαίρες. Οι δεσμοί υδρογόνου αποτυπώνονται ως λεπτές κυανές γραμμές. Εμφανίζονται μόνο επιλεγμένα αμινοξέα.

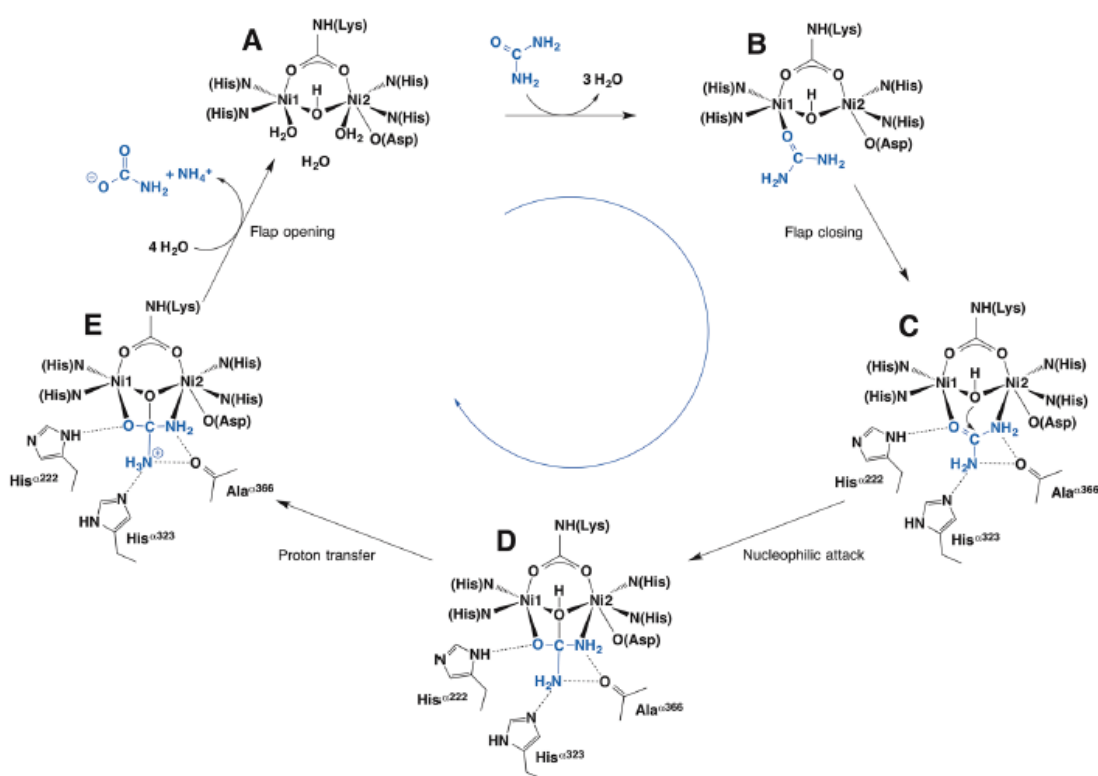
[15]

1.4 Καταλυτικός μηχανισμός υδρόλυσης της ουρίας από την SPU

Ο καταλυτικός μηχανισμός υδρόλυσης της ουρίας βασίζεται στη δομή του ενεργού κέντρου. [15] Ενώ το ευέλικτο περύγιο της SPU βρίσκεται υπό την ανοιχτή διαμόρφωση (Εικόνα 4A και Σχήμα 4A), η ουρία εισέρχεται στο ενεργό κέντρο και η ενυδατωμένη ενεργός περιοχή μετατρέπεται σε ένα ενδιάμεσο, στο οποίο η ουρία έχει αντικαταστήσει τα τρία (3) μόρια νερού που συνδέονταν με τα ιόντα Ni (Ni^{2+}) (Σχήμα 4B). Συγκεκριμένα, η ουρία συνδέεται μέσω του καρβονυλικού της οξυγόνου με το πιο ηλεκτρονιόφιλο και ακόρεστο, από άποψη συναρμογής, Ni1, ενώ ταυτόχρονα απομακρύνονται τα τρία μόρια νερού από το ενεργό κέντρο, λόγω στερεοχημικής παρεμπόδισης. Ο δεσμός υδρογόνου μεταξύ του καρβονυλικού ατόμου οξυγόνου της ουρίας και του πρωτονίου της ιμινομάδας της His222 είναι υπεύθυνος για τη σταθεροποίηση σε αυτή τη θέση του μορίου της ουρίας. Το κλείσιμο του ευέλικτου περυγίου της SPU διευκολύνεται από τη σύμπλεξη της αμινομάδας της ουρίας με το

Ni²⁺. Οι δεσμοί υδρογόνου μεταξύ του καρβονυλικού οξυγόνου της ουρίας (ως δέκτης δεσμού υδρογόνου) και της αμινομάδας (ως δότης δεσμού υδρογόνου) σταθεροποιούν αυτήν την αλληλεπίδραση και κατευθύνουν το υπόστρωμα σε κατάλληλο προσανατολισμό, ενώ ταυτόχρονα διευκολύνεται η διαδικασία της υδρόλυσης (Σχήμα 4C). Η ουρία είναι ένας ασθενής χηλικός προσδέτης εξαιτίας της ασθενούς βασικότητας (κατά Lewis) των αμινομάδων της. Ωστόσο, ο σχηματισμός ισχυρών δεσμών υδρογόνου των αμινομάδων της με το καρβονυλικό άτομο οξυγόνου της, ενισχύει τη βασικότητα των αμινομάδων της και διευκολύνει την αλληλεπίδραση του αμιδικού ατόμου του αζώτου με το Ni²⁺. Η πυρηνόφιλη προσβολή του υδροξειδίου, που γεφυρώνει τα δύο ιόντα Ni²⁺ και έχει κατεύθυνση σχεδόν κάθετη στο επίπεδο του μορίου προς τον καρβονυλικό άνθρακα της ουρίας και έχει sp² υβριδισμό, σχηματίζει μια τετραεδρική μεταβατική κατάσταση που περιέχει ένα άνθρακα με sp³ υβριδισμό (Σχήμα 4D). Η σύνδεση της ουρίας ως γέφυρα είναι η πλέον αποτελεσματική μέθοδος για να καταστήσει το άτομο του καρβονυλικού της άνθρακα ηλεκτρονιακά φτωχό και ως εκ τούτου επιρρεπές σε πυρηνόφιλη προσβολή από το ανιόν υδροξειδίου. Το κλείσιμο της κοιλότητας θεωρείται επίσης υπεύθυνο για τη σταθεροποίηση της καταλυτικής μεταβατικής κατάστασης μέσω σχηματισμού πολλαπλών δεσμών υδρογόνου με τα αμινοξέα της ενεργού περιοχής. Η πυρηνόφιλη προσβολή στο μόριο της ουρίας που είναι συνδεδεμένο με το Ni²⁺ ουσιαστικά τροποποιεί την ηλεκτρονική δομή του υποστρώματος και τελικά αυξάνει την τιμή pK_a του ατόμου αζώτου της ουρίας που δε συμμετέχει σε δεσμό με ιόν νικελίου (Ni²⁺).^[60] Επιπλέον, μετά τον σχηματισμό του τετραεδρικού ενδιάμεσου, το ανιόν υδροξειδίου, τμήμα πλέον του διαμινο- (υδροξυ)μεθοξειδίου, έχει πολύ χαμηλή τιμή pK_a και μπορεί συνεπώς να μεταφέρει το πρωτόνιό του στην αμινομάδα της ουρίας που δε συνδέεται με το ιόν νικελίου, σχηματίζοντας ένα δεσμό C-NH₃⁺ (Σχήμα 4D).^[17] Ταυτόχρονα, καθώς κλείνει το άνοιγμα του ενεργού κέντρου, ο ιμιδαζολικός δακτύλιος της His323 μετακινείται πλησιέστερα στην ενεργό περιοχή και σταθεροποιεί τη δημιουργία του δεσμού C-NH₃⁺ (Σχήμα 4E).^[17] Ακόμα, τα στοιχεία υποδεικνύουν ότι η Cys322 που βρίσκεται στο πτερύγιο που πλαισιώνει τη σχισμή του ενεργού κέντρου εμπλέκεται με κάποιο τρόπο στην κατάλυση, πιθανώς τοποθετώντας άλλα βασικά αμινοξέα που βρίσκονται στο ευκίνητο πτερύγιο του ενεργού κέντρου

ή στην ενεργό περιοχή στην καταλληλότερη για την κατάλυση διαμόρφωση. Επομένως, το γεφυρωμένο υδροξείδιο δρα ως πυρηνόφιλο και ως οξύ, ενώ η His323 σταθεροποιεί το θετικό φορτίο που αναπτύσσεται στην μεταβατική κατάσταση. Ο σχηματισμός του δεσμού C-NH₃⁺ μετά τη μεταφορά του πρωτονίου και η σταθεροποίησή του από την καταλυτική ιστιδίνη προκαλεί τη διάσπαση του δεσμού C-N, ακολουθούμενη από απελευθέρωση αμμωνίας.^[60] Το καρβαμικό ανιόν που προκύπτει αντιδρά αυθόρμητα με το νερό και μετατρέπεται σε ένα επιπλέον μόριο αμμωνίας και διττανθρακικά ανιόντα. Το άνοιγμα της κοιλότητας διευκολύνει την απελευθέρωση των προϊόντων, ενώ επιτρέπει επίσης την ενυδάτωση της ενεργού περιοχής με την είσοδο μορίων νερού, με το ένζυμο να είναι έτοιμο για έναν καινούριο καταλυτικό κύκλο.



Σχήμα 4: Καταλυτικός μηχανισμός ενζυμικής υδρόλυσης της ουρίας από την SPU.^[15]

1.5 Λειτουργίες στις οποίες εμπλέκονται οι ουρεάσες

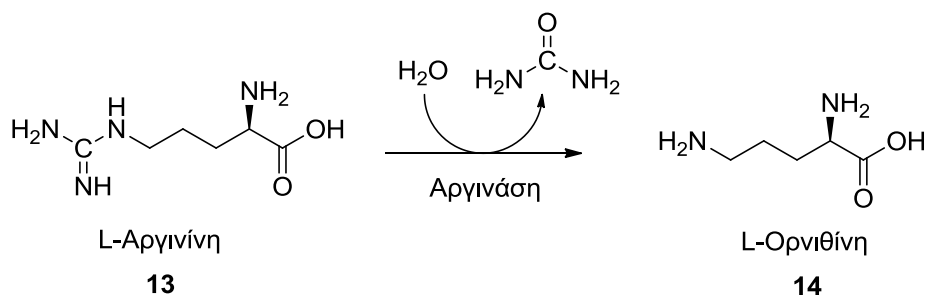
Η ουρεάση είναι ευρέως διαδεδομένη στη φύση.^{[1], [2], [61]} Βρίσκεται σε φυτά, φύκη, μύκητες, προκαρυωτικούς οργανισμούς, καθώς επίσης και στο έδαφος.^{[1], [2]} Το υπόστρωμα του ενζύμου, η ουρία είναι άμεσα διαθέσιμη. Η παρουσία

της οφείλεται κυρίως στην αποικοδόμηση των αζωτούχων ενώσεων νεκρών οργανισμών,^[62] στην απέκκριση ούρων από τα ζώα, καθώς και στη ευρεία της χρήση ως λίπασμα. Έτσι, οι ουρεάσες παίζουν σημαντικό ρόλο στο συνολικό μεταβολισμό του αζώτου στη φύση.

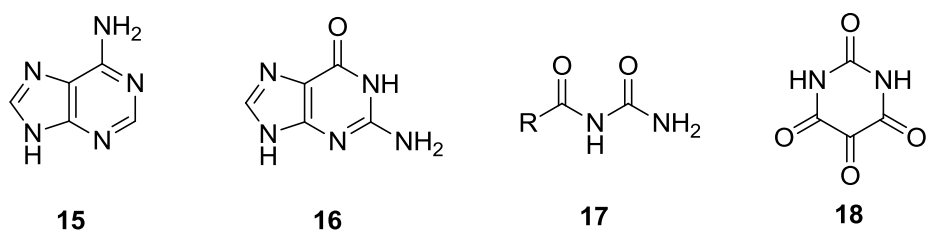
1.5.1 Φυτικές ουρεάσες

Η ουρεάση είναι ένα ένζυμο που στα φυτά καταλύει τη διάσπαση της ουρίας για αφομοίωσή της από τα φυτικά κύτταρα.^{[62], [63]} Χωρίς να έχει διευκρινιστεί ακόμα πλήρως, φαίνεται πως τα ανώτερα φυτά διαθέτουν ποικίλα συστήματα, τόσο ενεργητικής, όσο και παθητικής μεταφοράς της ουρίας, που τους επιτρέπουν να βελτιστοποιούν τις ανάγκες σε άζωτο, ανάλογα με τη μορφή του αζώτου που είναι διαθέσιμη από το εξωτερικό περιβάλλον ή συντίθεται στο εσωτερικό τους. Από το εξωτερικό περιβάλλον, τα φυτά αφομοιώνουν την ουρία μέσω των ριζών τους, γεγονός που έχει αξιοποιηθεί στη λίπανση με λιπάσματα ουρίας, αλλά κυρίως ως αμμωνία, λόγω της υδρόλυσης της ουρίας από τις ουρεάσες που εντοπίζονται στα εδάφη. Η ταχεία αντίδραση της ουρίας μπορεί να οδηγήσει στη μείωση της γονιμότητας του εδάφους. Επιπλέον, η απελευθέρωση της αμμωνίας μπορεί να είναι τοξική για τα φυτά, ενώ η αύξηση της αλκαλικότητας του εδάφους μετά την υδρόλυση της ουρίας, προκαλεί βλάβη στα φυτά, προκαλώντας σημαντικές περιβαλλοντικές και οικονομικές επιπτώσεις.^{[12], [13], [14]} Είναι επομένως απαραίτητη η μελέτη των μηχανισμών που σχετίζονται με τις ανάγκες των φυτών σε ουρία, ώστε να αναπτυχθούν ισορροπημένες στρατηγικές λίπανσης με λιπάσματα ουρίας για καλύτερη και βιωσιμότερη αγροτική παραγωγή.

Από την άλλη μεριά, στα φυτικά κύτταρα, η ουρεάση συμμετέχει στο μεταβολισμό των αζωτούχων ενώσεων.^{[5], [62], [63]} Στο εσωτερικό των φυτικών κυττάρων, η ουρία είναι ένα σημαντικό ενδιάμεσο που προκύπτει από δύο διαφορετικές μεταβολικές πορείες: τον καταλυτικό καταβολισμό της αργινίνης από την αργινάση^[64] (Σχήμα 5) και την αποικοδόμηση των πουρινών και των ουριδινών (Εικόνα 8).^{[61], [64], [65], [66]}



Σχήμα 5: Καταλυτικός καταβολισμός της αργινίνης από την αργινάση



Εικόνα 8: Δομές πουρινών (αδενίνη, γουανίνη) και ουριδινών (ακυλουρία, αλλοξάνη).

Δεδομένου ότι μεταβολίζεται ταχύτατα, δεν συσσωρεύεται στα κύτταρα, ωστόσο περιστασιακά μπορεί να αποτελέσει πηγή αζώτου. Έχει επίσης προταθεί ότι οι ουρεάσες αποτελούν μία ασπίδα άμυνας των φυτών εναντίον διαφόρων παθογόνων λόγω της παραγωγής αμμωνίας.^[67] Τελευταίες έρευνες φανερώνουν ότι εκτός από την ουρεολυτική τους δραστηριότητα, οι ουρεάσες είναι εντομοκτόνα^{[68], [69]} και έχουν αντιμυκητιακή^{[70], [71]} δράση, γεγονός που υποδηλώνει τη σημασία τους στο αμυντικό σύστημα των φυτών.

1.5.2 Ουρεολυτικά βακτήρια παθογόνα για ανθρώπους και ζώα

Μεταξύ των πολυάριθμων ουρεολυτικών βακτηρίων, ιδιαίτερο ενδιαφέρον εμφανίζουν αυτά που είναι παθογόνα για τους ανθρώπους και τα ζώα. Η παθογένεια αυτή οφείλεται στις επιπτώσεις από την καταλυτική υδρόλυση της ουρίας. Συγκεκριμένα, παρατηρείται αύξηση του pH (πάνω από ~9.2) και τοξικότητα εξαιτίας της παραγωγής αμμωνίας και άλλων παραγώγων της.^[72] Η ουρία αποτελεί το κύριο προϊόν των καταβολικών διεργασιών των αζωτούχων ενώσεων στα περισσότερα χερσαία ζώα. Παράγεται στο ήπαρ και μεταφέρεται στους νεφρούς μέσω της κυκλοφορίας του αίματος. Τέλος,

εκκρίνεται στα ούρα. Τα ανθρώπινα ούρα περιέχουν περίπου 0.4-0.5 M ουρία.^[73] Επιπλέον, το 20-25% της συνολικής ουρίας που παράγεται, υπολογίζεται πως παραμένει στο γαστρεντερικό σωλήνα, με τη συγκέντρωσή της στο στομάχι να είναι περίπου 1.7-3.4 mM. Συνεπώς, η ουρία είναι άμεσα διαθέσιμη στα ουρεολυτικά βακτήρια, καθιστώντας έτσι το γαστρεντερικό και ουροποιητικό σύστημα τις πιο κοινές περιοχές μόλυνσεων από ουρεολυτικά βακτήρια στους ανθρώπους.^{[72], [74]}

Το βακτήριο *Helicobacter pylori* είναι το κύριο ουρεολυτικό βακτήριο που προσβάλλει τον εντερικό σωλήνα.^{[72], [74], [75], [76]} Το βακτήριο αυτό εντοπίζεται κυρίως στην εσωτερική βλεννογόνο επιφάνεια του στομάχου, όπου η αύξηση του pH του ισχυρά όξινου περιβάλλοντος, λόγω της δράσης της ουρεάσης, επιτρέπει στο βακτήριο, του οποίου η ανάπτυξη απαιτεί pH 6-8, να αντιστέκεται στις αντίξοες συνθήκες. Ταυτόχρονα, επιφέρει βλάβες στον ξενιστή ιστό προκαλώντας έτσι γαστρίτιδα και γαστροδωδεκαδακτυλικά έλκη.^[77] Οι επιβλαβείς παράγοντες είναι η αμμωνία και η χλωραμίνη. Η αμμωνία έχει αποδειχθεί ότι έχει άμεση κυτταροτοξική επίδραση στα γαστρικά επιθηλιακά κύτταρα, ενώ η χλωραμίνη μπορεί να προκαλέσει μεταλλαξιογόνο καταστροφή του DNA, όπου στην περίπτωση χρόνιας μόλυνσης από το *Helicobacter pylori* θεωρείται ότι συνεισφέρει στην ανάπτυξη καρκίνου του στομάχου. Εκτός από τις γαστρικές επιπλοκές, η μόλυνση στον εντερικό σωλήνα μπορεί να προκαλέσει και ηπατικό κώμα.

Το *Proteus mirabilis* είναι ένα ουρεολυτικό βακτήριο που προσβάλλει τον άνθρωπο και τα ζώα,^[78] προκαλώντας σχηματισμό νεφρικής πέτρας, πυελονεφρίτιδα, εγκεφαλοπάθεια και ηπατικό κώμα.^{[2], [11]} Άλλοι θανατηφόροι ουρεολυτικοί μικροοργανισμοί, που είναι ικανοί να μολύνουν τον ανθρώπινο οργανισμό, είναι το *Mycobacterium tuberculosis*,^[79] το *Yersinia enterocolitica*^[80] και το *Cryptococcus neoformans*.^[81]

1.5.3 Όξινες ουρεάσες

Οι όξινες ουρεάσες αποτελούν μία διακριτή υποομάδα μέσα στην οικογένεια των ουρεασών. Το χαρακτηριστικό τους είναι ότι, σε αντίθεση με τις συνηθισμένες ουρεάσες που εμφανίζουν βέλτιστη δραστηριότητα κοντά σε

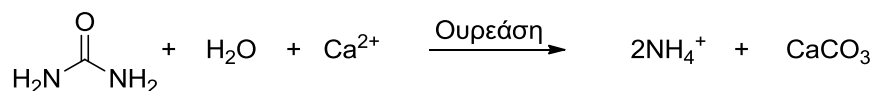
ουδέτερες τιμές pH, οι όξινες ουρεάσες εμφανίζουν το βέλτιστο pH τους στην περιοχή 2-4.5. Οι όξινες ουρεάσες παράγονται κυρίως από βακτήρια του εντερικού σωλήνα (*Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Escherichia*, *Morganella* και *Bifidobacterium*),^{[82], [83], [84], [85], [86], [87]} καθώς και από βακτήρια του εδάφους (*Arthrobacter mobilis*),^[88] ενώ αξιοσημείωτο είναι το γεγονός ότι δεν έχει εξηγηθεί έως σήμερα το πώς βακτήρια που αναπτύσσονται στον πεπτικό σωλήνα, του οποίου το pH είναι ουδέτερο, παράγουν όξινες ουρεάσες. Όπως οι ουδέτερες ουρεάσες, έτσι και οι όξινες είναι ένζυμα που περιέχουν ιόντα Ni^{2+} με παραπλήσιες τιμές K_M , αλλά η δραστητικότητά τους είναι κατά κύριο λόγο χαμηλότερη.

Οι όξινες ουρεάσες και συγκεκριμένα αυτές που προέρχονται από το βακτήριο *Lactobacillus sp.* είναι σήμερα εμπορικώς διαθέσιμες και χρησιμοποιούνται για την απομάκρυνση της ουρίας από αλκοολούχα ποτά.^{[83], [84], [85], [86], [87], [88], [89]} Αυτό γίνεται για να αποφευχθεί ο σχηματισμός του καρβαμιδικού αιθυλίου, που θεωρείται καρκινογόνο, από την αντίδραση μεταξύ της ουρίας και της αιθανόλης που λαμβάνει χώρα κατά την παραγωγή και συντήρηση των αλκοολούχων ποτών. Στο όξινο pH των αλκοολούχων ποτών (π.χ. το pH του κρασιού είναι 3.2),^[87] σε αντίθεση με τις βασικές ουρεάσες, οι όξινες ουρεάσες πληρούν τις απαιτήσεις για αυτή τη διαδικασία.

1.5.4 Ουρεάσες και ορυκτοποίηση

Άλλη μία ενδιαφέρουσα λειτουργία των ουρεασών στη φύση είναι να προάγουν το σχηματισμό ανθρακικού ασβεστίου (CaCO_3).^[90] Η υδρόλυση της ουρίας θεωρείται, μαζί με τη φωτοσύνθεση και την αναγωγή των θειικών αλάτων, ως ένα μονοπάτι για τη μικροβιακά επαγόμενη καθίζηση CaCO_3 που πραγματοποιείται συχνά σε διάφορα φυσικά περιβάλλοντα, όπως τα χώματα, τα γεωλογικά ιζήματα και τα φυσικά ύδατα (Σχήμα 6).^{[90], [91], [92]} Αν και δεν έχει τελείως εξακριβωθεί, ο ρόλος των βακτηρίων στη διαδικασία αυτή θεωρείται τριπλός: (α) αυξάνουν την αλκαλικότητα του περιβάλλοντος που ευνοεί την καθίζηση του CaCO_3 , (β) αυξάνουν τη διαλυτότητα του ανόργανου άνθρακα και (γ) λειτουργούν ως πυρήνες κρυστάλλωσης. Με την αύξηση του pH και παρέχοντας ιόντα CO_3^{2-} , η υδρόλυση της ουρίας παρουσία ιόντων

Ca^{2+} οδηγεί στην καθίζηση ανθρακικών αλάτων σε ποικίλους κρυσταλλικούς σχηματισμούς, σύμφωνα με την ακόλουθη αντίδραση: ^{[91], [92]}



Σχήμα 6: Καθίζηση των ανθρακικών αλάτων με τη δράση των ουρεασών.

Ως εξέλιξη της κατανόησης των διαδικασιών ασβεστοποίησης στη φύση, εάν αυτές πραγματοποιηθούν με βιομιμητικό τρόπο, μπορούν δυνητικά να προσφέρουν σε καινοτόμες βιοτεχνολογικές εφαρμογές. ^[93] Σε αυτές περιλαμβάνονται η κατασκευή προηγμένων υλικών από ανθρακικά, ^{[94], [95], [96]} ο καθαρισμός των αποβλήτων αλλά και φυσικών νερών από την περίσσεια των διαλυτών ιόντων Ca^{2+} ^[97] και του ραδιοϊσοτόπου $^{90}\text{Sr}^{2+}$, ^[98] καθώς και η χρήση τους ως μικροβιακά στεγανοποιητικά υλικά για τη συγκόλληση επιφανειακών ρωγμών και σχισμών σε κτίρια ^{[99], [100], [101]} και την αποκατάσταση ιστορικών κτιρίων. ^[102] Σε κάθε περίπτωση που απαιτείται ο έλεγχος της δραστηριότητας των ουρεασών (ιατρική, αγροτικός τομέας, περιβάλλον) για την αντιμετώπιση των επιβλαβών τους αποτελεσμάτων, η χρήση αναστολέων του ενζύμου κρίνεται επιβεβλημένη.

1.6 Μη ενζυμικές ιδιότητες της ουρεάσης

Πέρα από τις γνωστές ενζυμικές δράσεις, έχουν βρεθεί και μη ενζυμικές βιολογικές ιδιότητες των ουρεασών. ^[103] Γενικά, έχει αποδειχθεί ότι οι φυτικές και μικροβιακές ουρεάσες είναι τοξικές έναντι σε νηματώδεις μύκητες και σε ζυμομύκητες μέσω ενός μηχανισμού που περιλαμβάνει τη διαπερατότητα του κυτταρικού τοιχώματος και/ή της μεμβράνης και στη συνέχεια πλασμόλυση, δηλαδή έξοδο του νερού από το εσωτερικό του κυττάρου που παρατηρείται για την εξισορρόπηση της ωσμωτικής πίεσης, όταν αυτό τοποθετείται σε υπέρτονα διαλύματα. ^{[71], [104]} Επιπλέον, οι φυτικές και ορισμένες βακτηριακές ουρεάσες είναι ισχυρά εντομοκτόνα, εμφανίζουν νευροτοξικότητα (αφού είναι τοξικές για το νευρικό ιστό) και επηρεάζουν άλλες φυσιολογικές λειτουργίες,

όπως τη διούρηση (δηλαδή την έκκριση και διέλευση μεγάλων ποσοτήτων ούρων), τη μυϊκή συστολή και την ανοσία. ^{[105], [106], [107], [108]} Οι τοξικές επιδράσεις των ουρεασών έχουν χαρακτηριστεί με *in vivo* πειράματα (δηλαδή με πειράματα που λαμβάνουν χώρα μέσα σε έναν έμβιο οργανισμό) και *in vitro* (δηλαδή με πειράματα που λαμβάνουν χώρα σε δοκιμαστικό σωλήνα ή γενικότερα σε αυστηρά ελεγχόμενες συνθήκες έξω από τους ζωντανούς οργανισμούς) μελέτες που αποδεικνύουν ότι δεν σχετίζονται με την ενζυμική δραστικότητα. ^{[109], [110], [111], [112]} Μελέτες που διεξήχθησαν σε κυανατοξίνη (*CNTX*), έδειξαν ότι η τοξικότητα έναντι των εντόμων προέρχεται, τουλάχιστον εν μέρει, από ένα μικρό πεπτίδιο (*percanatox*) που απελευθερώνεται από την προσλαμβανόμενη ουρεάση μετά την υδρόλυση της από πεπτικά ένζυμα που ομοιάζουν με την καθεψίνη. ^{[113], [114]} Ανασυνδυασμένα ανάλογα αυτών των πεπτιδίων, ονομαζόμενα *Jaburetox* και *Soyuretox* στην περίπτωση των *CNTX* και *SBU*, αντίστοιχα, παρουσιάζουν επίσης αντιμυκητιακή δράση και δρουν ως εντομοκτόνα. ^{[103], [115]} Το *Jaburetox* έχει πρόσφατα αποδειχθεί πως είναι ένα πολυπεπτίδιο, το οποίο πιθανώς αυξάνει τα διακριτά στοιχεία της δευτεροταγούς δομής του κατά την αλληλεπίδραση με την κυτταρική μεμβράνη. ^[116]

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2

ΑΝΑΣΤΟΛΕΙΣ

2.1 Αναστολείς Ενζύμων

Η αναστολή ενός ενζύμου αποτελεί μια προσέγγιση για τη ρύθμιση χημικών αντιδράσεων που συμβαίνουν σε μια παθολογική κατάσταση. Κάθε ένωση που αναστέλλει τη δραστικότητα ενός ενζύμου ονομάζεται αναστολέας του ενζύμου και μπορεί να αποτελέσει ένα φάρμακο. Πολλά φάρμακα δρουν αναστέλλοντας ένα ένζυμο. Η αναστολή ενός ενζύμου έχει ως αποτέλεσμα το υπόστρωμα του ενζύμου να μην μετατρέπεται προς προϊόντα με αποτέλεσμα να ελέγχονται τα μεταβολικά προϊόντα της δραστικότητας του ενζύμου. Η επιλογή ενός ενζύμου ως στόχου για την ανάπτυξη φαρμάκων απαιτεί την καλή κατανόηση της βιοχημείας της παθολογικής κατάστασης.

Οι αναστολείς ενζύμων μπορεί να χωρισθούν σε δύο γενικές κατηγορίες: τους **αντιστρεπτούς** (reversible) και τους **μη αντιστρεπτούς** (irreversible) αναστολείς.

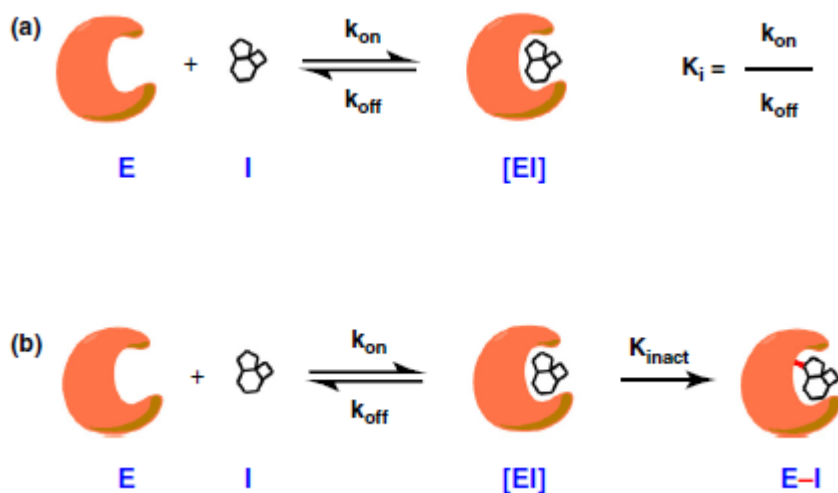
Οι αντιστρεπτοί αναστολείς προκαλούν αντιστρεπτή αναστολή της ενζυμικής δραστικότητας και συνήθως προσδένονται στο ένζυμο μη δεσμικά δια μέσου δεσμών υδρογόνου, ηλεκτροστατικών δυνάμεων, δυνάμεων van der Waals. Είναι δυνατόν αντιστρεπτοί αναστολείς να προσδένονται δια μέσου ασθενών δεσμών, αλλά αυτό δεν αποτελεί κανόνα. Στην περίπτωση των αντιστρεπτών αναστολέων ισχύει η ακόλουθη ισορροπία:



Οι μη αντιστρεπτοί αναστολείς προσδένονται στο ένζυμο σχηματίζοντας ισχυρούς δεσμούς και εμποδίζοντας την εκδήλωση της ενζυμικής δραστικότητας για παρατεταμένη χρονική περίοδο. Σε μερικές περιπτώσεις είναι δυνατό μη δεσμικές αλληλεπιδράσεις να είναι τόσο δυνατές ώστε να παρατηρείται μη αντιστρεπτή αναστολή. Για τους μη αντιστρεπτούς αναστολείς ισχύει:



Στο παρακάτω σχήμα (Σχήμα 7) φαίνεται η αλληλεπίδραση ενός αναστολέα με ένα ένζυμο, είτε με μη ομοιοπολικό δεσμό (a), είτε με ομοιοπολικό δεσμό (b).



Σχήμα 7: Σύγκριση ενός αναστολέα (I) που αλληλεπιδρά με ένα ένζυμο (E) υπό (a) μη ομοιοπολικό και (b) ομοιοπολικό δεσμό ^[17]

Η σταθερά $K_i = k_{\text{on}}/k_{\text{off}}$ μετρά την ικανότητα ενός μη ομοιοπολικού αναστολέα να αλληλεπιδρά με τον στόχο E και ο λόγος K_{inact}/K_i περιγράφει την ικανότητα ενός ομοιοπολικού μη αντιστρεπτού αναστολέα να αλληλεπιδρά και να εξουδετερώνει τον στόχο (Σχήμα 7).

Όσο μικρότερη η τιμή K_i , τόσο ισχυρότερος ο μη ομοιοπολικός αναστολέας και όσο μεγαλύτερη τιμή K_{inact}/K_i , τόσο ισχυρότερος ο ομοιοπολικός αναστολέας.

Και στις δύο περιπτώσεις, των αντιστρεπτών ή μη αντιστρεπτών αναστολέων, δεν είναι απαραίτητο ο αναστολέας να δρα αλληλεπιδρώντας με το ενεργό κέντρο του ενζύμου.

Οι **αντιστρεπτοί** αναστολείς μπορούν να ταξινομηθούν γενικά σε τρεις κατηγορίες: **ανταγωνιστικοί** (competitive), **μη ανταγωνιστικοί** (non-competitive) και **συναγωνιστικοί** (uncompetitive).

Οι ανταγωνιστικοί αναστολείς προσδένονται κατά αντιστρεπτό τρόπο στο ενεργό κέντρο του ενζύμου, δηλαδή, στο ίδιο σημείο που προσδένεται και το φυσικό υπόστρωμα εμποδίζοντας την πρόσδεση του υποστρώματος. Εφόσον

υπόστρωμα και αναστολέας ανταγωνίζονται για πρόσδεση στο ίδιο ενεργό κέντρο, είναι φυσικό ότι πιθανώς να έχουν παρόμοια δομή. Αυτό το γεγονός αποτελεί και μια ορθολογική προσέγγιση για τον σχεδιασμό ενός φαρμάκου.

Κατ' αναλογία με τον τρόπο δραστηριότητας ενός υποστρώματος, ένας αναστολέας (I) μπορεί να σχηματίσει ένα σύμπλοκο με ένα ένζυμο (E). Η σταθερά ισορροπίας K_i (k_{off}/k_{on}) είναι η σταθερά αστάθειας για τη διάσπαση του συμπλόκου EI. Γενικά μια τέτοια ισορροπία είναι πολύ γρήγορη, αλλά υπάρχουν και περιπτώσεις που μπορεί να είναι αργή.

Μη ανταγωνιστικοί αναστολείς είναι οι αναστολείς που μπορεί να προσδεθούν σε ένα ένζυμο και σε άλλη θέση εκτός από το ενεργό κέντρο του, σε μια αλλοστερική θέση. Σε τέτοια περίπτωση δεν επηρεάζεται άμεσα η πρόσδεση του υποστρώματος στο ενεργό κέντρο. Θεωρείται ότι προκαλούνται διαμορφωτικές αλλαγές στο ένζυμο μετά την πρόσδεση του αναστολέα, οι οποίες έχουν ως αποτέλεσμα να εμποδίζουν την κατάλληλη πρόσδεση του υποστρώματος στο ενεργό κέντρο. Σε αυτή την περίπτωση η δομή του αναστολέα δεν αναμένεται να είναι παρόμοια προς τη δομή του υποστρώματος και η δομή του υποστρώματος δεν μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως σημείο εκκίνησης σχεδιασμού του αναστολέα. Δεν είναι δυνατόν επομένως να σχεδιασθούν μη ανταγωνιστικοί αναστολείς, εκτός αν είναι γνωστό κάτι για την αλλοστερική θέση.

Οι συναγωνιστικοί αναστολείς θεωρείται ότι σχηματίζουν σύμπλοκο με το σύμπλοκο ενζύμου-υποστρώματος, εμποδίζοντας έτσι τη μετατροπή του υποστρώματος προς προϊόντα.

Οι μη αντιστρεπτοί αναστολείς συνήθως σχηματίζουν ισχυρούς δεσμούς με το ένζυμο και ειδικότερα με ένα αμινοξύ του ενεργού κέντρου του ενζύμου. Μπορεί όμως να σχηματίζουν και ισχυρές μη δεσμικές αλληλεπιδράσεις. Στην περίπτωση των μη αντιστρεπτών αναστολέων δεν φαίνεται να υπάρχει η ανάγκη χορήγησης επιπλέον ποσότητας αναστολέα όταν το ένζυμο έχει ανασταλεί, γιατί το σύμπλοκο ενζύμου-αναστολέα δεν διασπάται και το ένζυμο παραμένει ανενεργό. Αυτό όμως δεν σημαίνει ότι μια και μόνο δόση μη αντιστρεπτού αναστολέα είναι επαρκής. Το ένζυμο επανακτά τη φυσιολογική του λειτουργία γιατί ο οργανισμός παράγει επιπλέον ποσότητα ενζύμου για να

υπερπηδήσει την αναστολή που προκάλεσε ο μη αντιστρεπτός αναστολέας. Σε αρκετές περιπτώσεις είναι ασφαλέστερο να σχεδιάζονται αντιστρεπτοί αναστολείς, η δραστικότητα των οποίων μπορεί να ρυθμισθεί κατά καλύτερο τρόπο διακόπτοντας τη χορήγησή τους. Οι **μη αντιστρεπτοί αναστολείς** μπορεί να χωρισθούν σε δύο κατηγορίες: **αναστολείς κατευθυνόμενοι στο ενεργό κέντρο** (active site directed inhibitors) και **αναστολείς βασισμένοι στο μηχανισμό** (mechanism-based inhibitors or suicide inhibitors).

Οι αναστολείς που κατευθύνονται στο ενεργό κέντρο είναι ενώσεις που προσδένονται στο ενεργό κέντρο του ενζύμου ή κοντά στο ενεργό κέντρο του ενζύμου, σχηματίζοντας ισχυρό δεσμό με λειτουργικές ομάδες που βρίσκονται είτε στο ενεργό κέντρο είτε κοντά στο ενεργό κέντρο. Τέτοιες λειτουργικές ομάδες είναι συνήθως πυρηνόφιλες ομάδες που υπάρχουν στις πλευρικές αλυσίδες των αμινοξέων του ενεργού κέντρου. Οι αναστολείς περιέχουν ηλεκτρονιόφιλες ομάδες και δρουν γενικά δια μέσου μηχανισμών ακυλίωσης ή αλκυλίωσης. Ένα υδροξύλιο, μια σουλφυδρυλομάδα, μια αμινομάδα ή ένα καρβοξύλιο του ενζύμου μπορεί να αντιδράσουν με ποικιλία ομάδων δημιουργώντας ένα σταθερό παράγωγο.

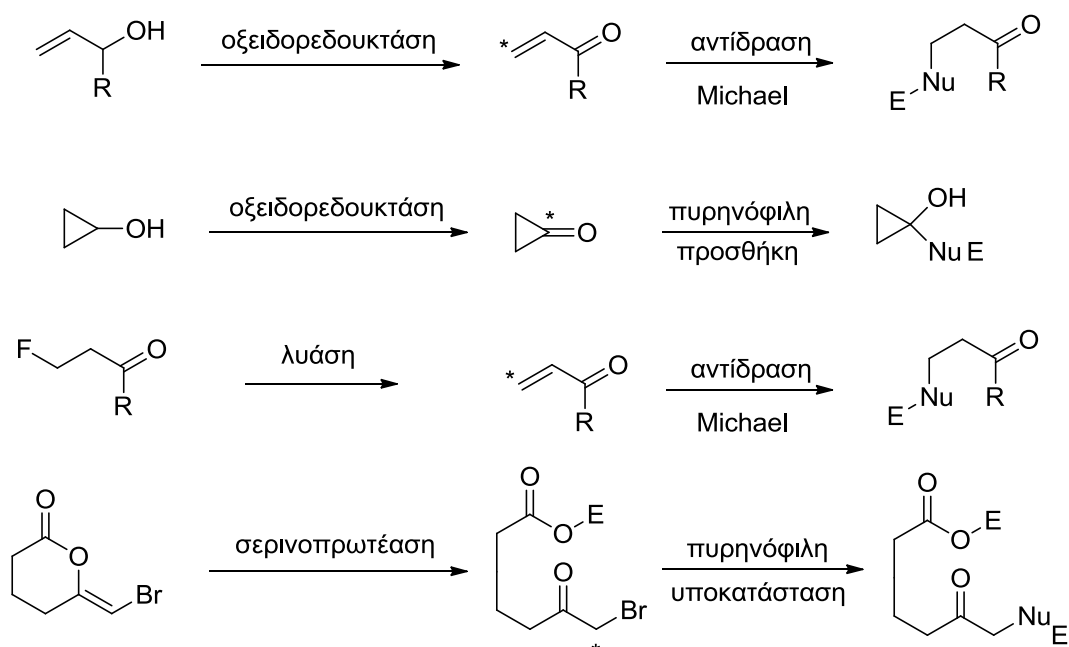
Οι αναστολείς που κατευθύνονται στο ενεργό κέντρο περιέχουν μια δραστική ομάδα με συνέπεια να μπορεί να αντιδράσουν όχι μόνο με το ενεργό κέντρο του ενζύμου που στοχεύουν, αλλά και με πολλές άλλες πυρηνόφιλες θέσεις που υπάρχουν σε άλλα ένζυμα, ή και γενικότερα σε άλλα βιομόρια. Επομένως, τέτοιου είδους αναστολείς αναμένεται να παρουσιάζουν μεγάλη τοξικότητα και δεν φαίνεται να είναι τόσο χρήσιμοι στο σχεδιασμό φαρμάκων όσο άλλοι τύποι αναστολέων. Το κλειδί για τον επιτυχή σχεδιασμό ενός αναστολέα κατευθυνόμενου στο ενεργό κέντρο είναι η εκλεκτικότητα στην πρόσδεσή του στο ένζυμο. Θα πρέπει να τονισθεί ότι υπάρχουν αρκετά φάρμακα που χρησιμοποιούνται επιτυχώς κλινικά και που ανήκουν σε αυτή την κατηγορία αναστολέων. Τα περισσότερα όμως από αυτά δεν αναπτύχθηκαν με βάση τη δομή του υποστρώματος. Πρώτα ανακαλύφθηκε η δραστικότητα και η χρήση τους και στη συνέχεια ανακαλύφθηκε ο τρόπος της δραστικότητάς τους. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί η ασπιρίνη.

Οι αναστολείς που βασίζονται στο μηχανισμό είναι μη δραστικές ενώσεις που παρουσιάζουν δομική ομοιότητα προς το φυσικό υπόστρωμα του ενζύμου (ή

και προς το προϊόν της ενζυμικής δραστηριότητας). Ένας τέτοιος αναστολέας προσδένεται στο ενεργό κέντρο, όπου το ένζυμο δια μέσου του καταλυτικού μηχανισμού του τον μετατρέπει προς προϊόν με πολύ δραστική ομάδα. Το προϊόν αυτό αντιδρά μη αντιστρεπτά σχηματίζοντας δεσμό και σταθερό σύμπλοκο ενζύμου-αναστολέα. Δεν είναι απαραίτητο το ενεργό προϊόν που παράγεται από την ενζυμική δραστηριότητα να αντιδράσει με δραστική ομάδα του ενεργού κέντρου του ενζύμου. Σε αντίθεση προς τους αναστολείς που βασίζονται στο μηχανισμό, χαρακτηρίζονται αρχικά από μη δραστηριότητα.

Το ένζυμο απαιτείται να καταλύσει μια αντίδραση, ώστε να μετατρέψει τον αρχικά ανενεργό αναστολέα στην ενεργό μορφή του. Εφόσον ο αναστολέας μπορεί να ενεργοποιηθεί από ένα συγκεκριμένο ένζυμο αναμένεται να παρουσιάζει εξειδικευμένη δραστηριότητα και συνεπώς χαμηλότερο βαθμό τοξικότητας. Στην ιδανική περίπτωση μόνο το στοχευόμενο ένζυμο είναι ικανό να καταλύσει την κατάλληλη μετατροπή του αναστολέα στην ενεργό μορφή ώστε να αδρανοποιήσει το ένζυμο.

Ποικίλες ενώσεις έχουν εξετασθεί ως αναστολείς βασισμένοι στο μηχανισμό. Οι ενώσεις αυτές δρουν ως πηγές ηλεκτρονιόφιλων ομάδων που μπορεί να δράσουν μόνο αν η δομή τους είναι τέτοια ώστε να αποτελέσουν υπόστρωμα για το ένζυμο. Τέσσερα χαρακτηριστικά παραδείγματα αναφέρονται παρακάτω (Σχήμα 8). Στα δύο πρώτα από αυτά, τα ηλεκτρονιόφιλα κέντρα του αναστολέα δημιουργούνται μετά από αντίδραση οξειδωσης που καταλύεται από οξειδοοξειδοκτάση. Στο τρίτο λαμβάνει χώρα αντίδραση απόσπασης καταλυόμενη από λυάση, ενώ στο τέταρτο συμβαίνει υδρόλυση καταλυόμενη από σερινοπρωτεάση.



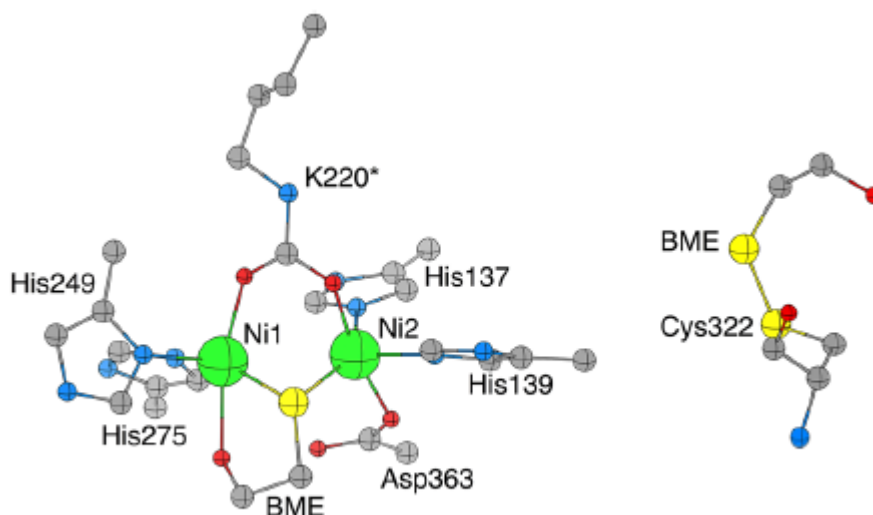
Σχήμα 8: Παραδείγματα ενώσεων αναστολέων βασισμένων στο μηχανισμό.

2.2 Αναστολείς Ουρεασών

Οι αναστολείς της ουρεάσης διακρίνονται σε δύο μεγάλες κατηγορίες: δομικά ανάλογα του υποστρώματος και αναστολείς που δρουν επί του μηχανισμού. Δοκιμάστηκαν αρκετές κατηγορίες ενώσεων προκειμένου να εξετασθεί η αποτελεσματικότητά τους από ιατρικής άποψης για τον άνθρωπο και τα ζώα, αλλά και στο τομέα της γεωργίας, καθώς και στην προστασία του περιβάλλοντος. [2], [9], [11], [15], [118], [119] Παρακάτω αναλύονται δεκατέσσερις (14) κατηγορίες αναστολέων.

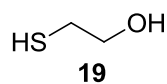
2.2.1 Ενώσεις Θείου

Μεταξύ των ενώσεων θείου που δρουν ως αναστολείς ουρεασών, οι θειόλες αντιπροσωπεύουν μία κατηγορία ιστορικής σημασίας, αφού έχουν χρησιμοποιηθεί για τον δομικό χαρακτηρισμό του ενεργού κέντρου των φυτικών ουρεασών. [120], [121] Οι θειόλες αναστέλλουν την ουρεάση με ένα ανταγωνιστικό μηχανισμό στην ανιονική τους μορφή RS^- . Εφαρμογή ακτίνων Χ στο σύμπλεγμα SPU:BME (Εικόνα 9) [122], [123] έδειξε τον τρόπο που πραγματοποιείται η αναστολή της ουρεάσης από θειόλες.



Εικόνα 9: Κρυσταλλική δομή του ενεργού κέντρου της SPU σε σύμπλεξη με BME. Εμφανίζονται μόνο επιλεγμένα αμινοξέα.^[15]

Η δομή της 2-μερκαπτοαιθανόλης (BME) **19** φαίνεται στην Εικόνα 10.

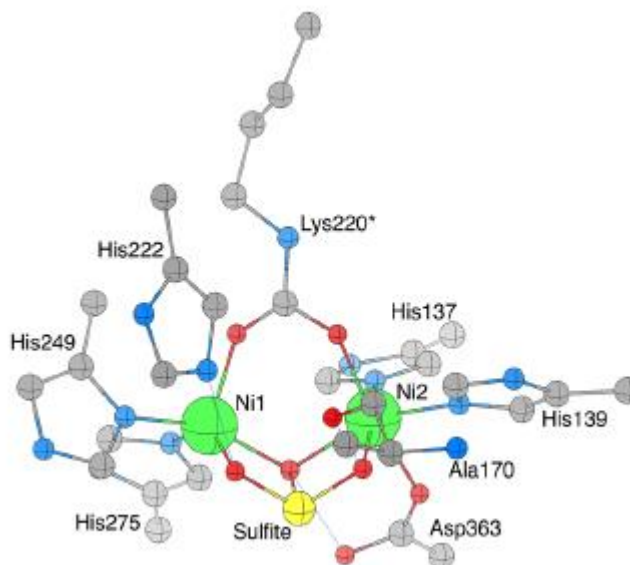


Εικόνα 10: Δομή της 2-μερκαπτοαιθανόλης **19.**

Η θειολική ομάδα της BME γεφυρώνει τα δύο ιόντα Ni (II) και ταυτόχρονα η υδροξυλομάδα αλληλεπιδρά με το Ni1. Επιπροσθέτως, ένα δεύτερο μόριο BME σχηματίζει δισουλφιδικό δεσμό με την Cys322 που ανήκει στο κινητό περύγιο. Ο σχηματισμός ενός δεσμού υδρογόνου μεταξύ της ομάδας α-υδροξυλίου που ανήκει στη BME και του καρβονυλικού ατόμου οξυγόνου της Ala366 μειώνει την ευκαμψία του περυγίου, εμποδίζοντας την είσοδο στο ενεργό κέντρο λόγω στερεοχημικής παρεμπόδισης.

Εκτός από τις θειόλες, το θειώδες άλας είναι μια ένωση θείου που δρα ως ανταγωνιστικός αναστολέας ουρεάσης^{[124], [125]} καθώς και σε ορισμένες περιπτώσεις ως σταθεροποιητής του συμπλόκου Ni (II)-ουρεάσης.^[10] Οι βιοχημικές μελέτες που πραγματοποιήθηκαν στην SPU έδειξαν ότι η αναστολή εξαρτάται από το pH και μάλιστα στην περιοχή 6.5-8.0. Συγκεκριμένα, η αναστολή μειώνεται καθώς αυξάνεται το pH και καθίσταται

αμελητέα σε pH 8.0. Ο τρόπος σύνδεσης του θειώδους στην SPU απεικονίζεται μέσω της δομής μέσω ακτίνων Χ του συμπλόκου SPU: θειώδους (Εικόνα 11).^[126]



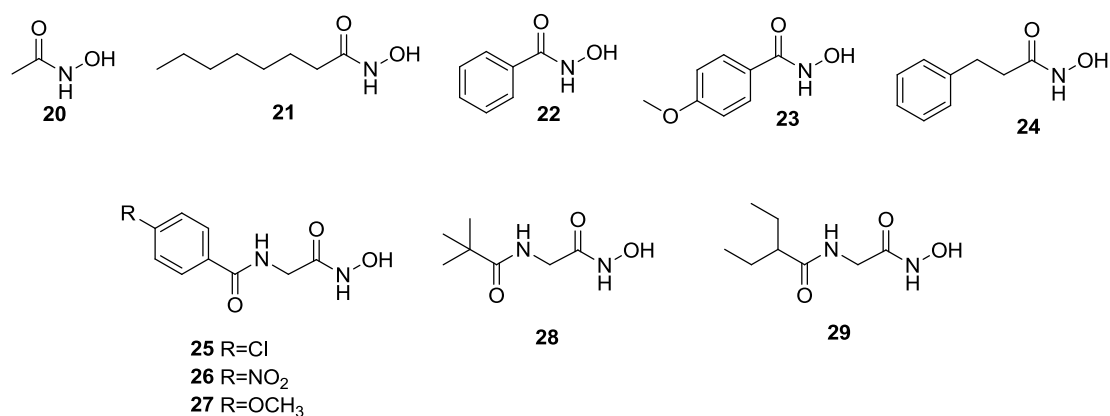
Εικόνα 11: Κρυσταλλική δομή του ενεργού κέντρου της SPU σε σύμπλεξη με θειώδες. Εμφανίζονται μόνο επιλεγμένα αμινοξέα.^[15]

Ο αναστολέας δεσμεύει τα δύο ιόντα Ni (II) του ενεργού κέντρου χρησιμοποιώντας δύο άτομα οξυγόνου, οπότε προκύπτει Ni1-O(1) και Ni2-O(2), αντίστοιχα, ενώ το τρίτο οξυγόνο γεφυρώνει τα δύο ιόντα Ni (II). Επομένως, ο αναστολέας αντικαθιστά τα μόρια νερού που δεσμεύονταν στο Ni1 και στο Ni2 στη φυσική μορφή του ενζύμου. Η αλληλεπίδραση του συμπλόκου SPU:θειώδους άλατος σταθεροποιείται επίσης από ένα δίκτυο δεσμών υδρογόνου μεταξύ του θειώδους και των αμινοξέων που περιβάλλουν την κοιλότητα του ενεργού κέντρου. Συγκεκριμένα, το οξυγόνο του θειώδους O(1) σχηματίζει έναν δεσμό υδρογόνου με το υδρογόνο της His222 με μήκος 2.65 Å, ενώ δύο μόρια νερού σχηματίζουν δεσμούς οξυγόνου με το O(1) με μήκος 3.19 και 3.21 Å. Το θειώδες οξυγόνο O(2) απέχει 2.78 Å από το καρβόνυλιο της Ala170, υποδεικνύοντας έναν πιθανό δεσμό υδρογόνου στον οποίο το θειώδες οξυγόνο O(2) θα μπορούσε να πρωτονιωθεί. Τέλος, το γεφυρωτικό οξυγόνο (B) απέχει 2.48 Å από το αμινοξύ Asp363 υποδεικνύοντας ότι τα δύο αυτά άτομα θα μπορούσαν να μοιράζονται ένα άτομο υδρογόνου μέσω ενός δεσμού υδρογόνου.

Συμπερασματικά, η εξαρτώμενη από το pH συμπεριφορά της αναστολής, καθώς επίσης και το δίκτυο δεσμών υδρογόνου που περιγράφηκε περιληπτικά, αποκλείουν την περίπτωση ο αναστολέας να δρα με τη μορφή του διανιόντος SO_3^{2-} , καταλήγοντας στο συμπέρασμα πως ο αναστολέας δρα ως υδρογονοθειώδες ανιόν (HSO_3^-).^[125]

2.2.2 Υδροξαμικά οξέα

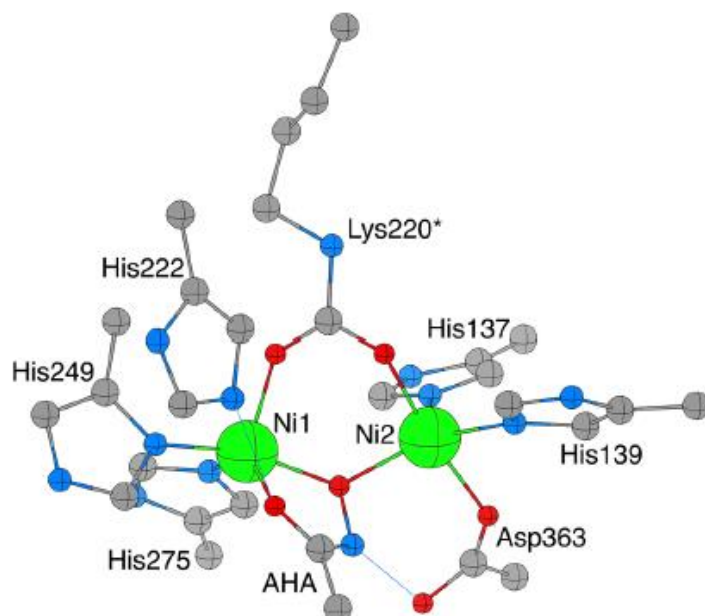
Τα υδροξαμικά οξέα δρουν ως αναστολείς ουρεάσης^{[127], [128], [129]} αξιοποιώντας τις μεταλλοσυμπλεκτικές τους ιδιότητες τους.^[130] Μεταξύ αυτών των οξέων, το ακετούδροξαμικό οξύ (AHA) **20** είναι το πιο μελετημένο παράγωγο και δρα ως αναστολέας βραδείας δέσμευσης για φυτικές, βακτηριακές και μυκητιακές ουρεάσες. Παρακάτω φαίνονται διάφορα αλειφατικά, *m*- και *p*- υποκατεστημένα βενζο- και αρυλο-αλκυλο-υδροξαμικά οξέα (Εικόνα 12). Από αυτά οι αναστολείς **20-27** εμφανίζουν τιμές IC_{50} της τάξης των mM.^{[128], [131], [132], [133]}



Εικόνα 12: Παράγωγα του υδροξαμικού οξέος ως αναστολείς της ουρεάσης 20-29.

Πληροφορίες από την κρυσταλλογραφία ακτίνων Χ συμπλόκων ουρεασών και AHA, ελήφθησαν τόσο για την SPU,^[134] όσο και για τις HPU^[18] και KAU.^[135] Σε όλες τις περιπτώσεις, το AHA αλληλεπιδρά με το δύο ιόντα Ni (II) του ενεργού κέντρου (Εικόνα 13). Το υδροξαμικό άτομο οξυγόνου γεφυρώνει τα δύο ιόντα Ni (II), ενώ το καρβονυλικό οξυγόνο του AHA συνδέεται με το άτομο νικελίου Ni1 με παρόμοιο τρόπο, όπως παρατηρήθηκε για το BME (Εικόνα 9). Η αλληλεπίδραση του συμπλόκου SPU-AHA σταθεροποιείται με δεσμούς

υδρογόνου. Συγκεκριμένα, σχηματίζονται δύο δεσμοί υδρογόνου μεταξύ του καρβονυλικού ατόμου Ο του ΑΗΑ και του Η της His222 και μεταξύ του υδρογόνου της αμινομάδας του ΑΗΑ και του οξυγόνου του Asp363.

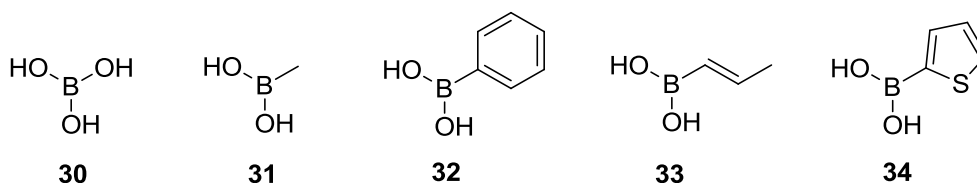


Εικόνα 13: Κρυσταλλική δομή του ενεργού κέντρου της SPU σε σύμπλεξη με υδροξαμικό οξύ (ΑΗΑ). Εμφανίζονται μόνο επιλεγμένα αμινοξέα. [15]

Το ακετούδροξαμικό οξύ (**20**) χρησιμοποιήθηκε για λοιμώξεις του ουροποιητικού συστήματος, ^[136], ^[137] αν και εμφάνισε παρενέργειες. Συγκεκριμένα, παρατηρήθηκαν τερατογενέσεις ^[138] και ψυχονευρολογικές και μυϊκές διαταραχές. ^[137] Παρ' ολ' αυτά, εγκρίθηκε από τον FDA το 1983 και κυκλοφόρησε με την εμπορική ονομασία *Lithostat* στην Αμερική και *Uronefrex* στην Ευρώπη. Μεταγενέστερα, μελετήθηκαν υδροξαμικά αμινοξέα, καθώς και *N*-υποκατεστημένα παράγωγά τους και κατοχυρώθηκαν με δίπλωμα ευρεσιτεχνίας πολλοί τέτοιοι αναστολείς για τη θεραπεία της ουρολιθίασης και της πυελονεφρίτιδας (ενώσεις **25-27**). ^[139] Τα περισσότερα όμως *N*-αροϋλογλυκίνο-υδροξαμικά οξέα αποδείχθηκαν μεταλλαξιογόνα. ^[140] Οι ενώσεις **28** και **29**, καθώς και άλλα αντίστοιχα αλειφατικά παράγωγα έδειξαν παρόμοια δραστηριότητα *in vitro* και *in vivo*, ωστόσο ήταν περισσότερο ασφαλή ως προς τις παρενέργειες. ^[141]

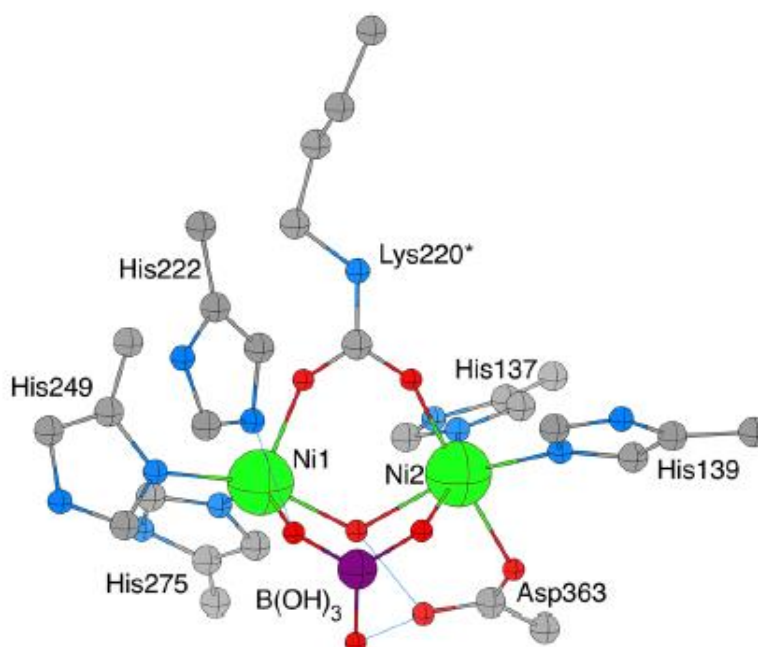
2.2.3 Βορικό και Βορονικό οξύ

Το βορικό **30** και τα βορονικά οξέα είναι ανταγωνιστικοί αναστολείς των φυτικών και βακτηριακών ουρεασών (Εικόνα 14).^[9] Η κρυσταλλική δομή του συμπλόκου SPU-βορικού οξέος έδειξε ότι ο αναστολέας γεφυρώνει τα ιόντα Ni (II) με δύο άτομα οξυγόνου, μετατοπίζοντας τα τρία μόρια νερού και αφήνοντας στη θέση τους το υδροξείδιο γεφύρωσης.^[142]



Εικόνα 14: Δομή του βορικού οξέος **30** και άλλων βορονικών οξέων **31-34**

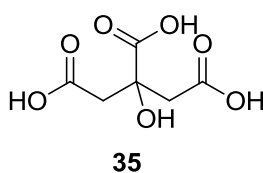
Το τρίτο άτομο οξυγόνου του αναστολέα βρίσκεται μακριά από το μεταλλικό κέντρο. Μια λεπτομερής ανάλυση του δικτύου δεσμών υδρογόνου έδειξε ότι η ο αναστολέας δρα ως ουδέτερο μόριο B(OH)₃ (Εικόνα 15).^{[127], [143], [144]}



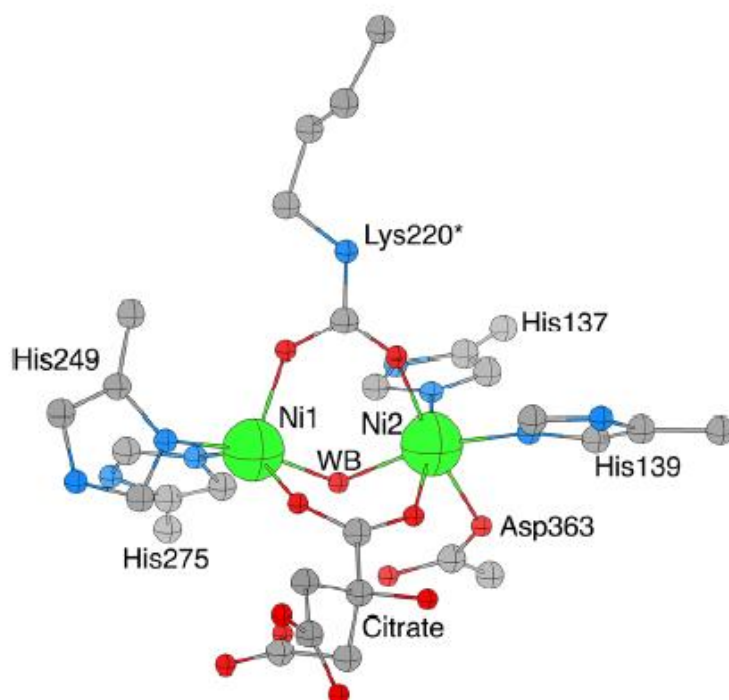
Εικόνα 15: Κρυσταλλική δομή του ενεργού κέντρου της SPU σε σύμπλεξη με βορικό οξύ. Εμφανίζονται μόνο επιλεγμένα αμινοξέα.^[15]

2.2.4 Κιτρικό οξύ

Το κιτρικό οξύ **35** είναι ένας ασθενής αναστολέας της ουρεάσης σε συγκεντρώσεις υψηλότερες από 800 mM, ενώ σε χαμηλότερες συγκεντρώσεις (100-600 mM) δεν υφίσταται αναστολή (Εικόνα 16).^[25] Η δομή του συμπλόκου μεταξύ του κιτρικού οξέος και της SPU δείχνει την παρουσία μιας καρβοξυλικής ομάδας που συνδέεται με τα ιόντα του νικελίου στο ενεργό κέντρο, σχηματίζοντας αρκετούς δεσμούς υδρογόνου που σχηματίζονται μεταξύ των πολικών ομάδων του αναστολέα και των αμινοξέων (Εικόνα 17). Οι δεσμοί υδρογόνου υποθετικά είναι υπεύθυνοι για την σταθεροποίηση της αλληλεπίδρασης, η οποία, λαμβάνοντας υπόψη την κακή ικανότητα αναστολής του κιτρικού οξέος, είναι σχετικά ασθενής.^[25]



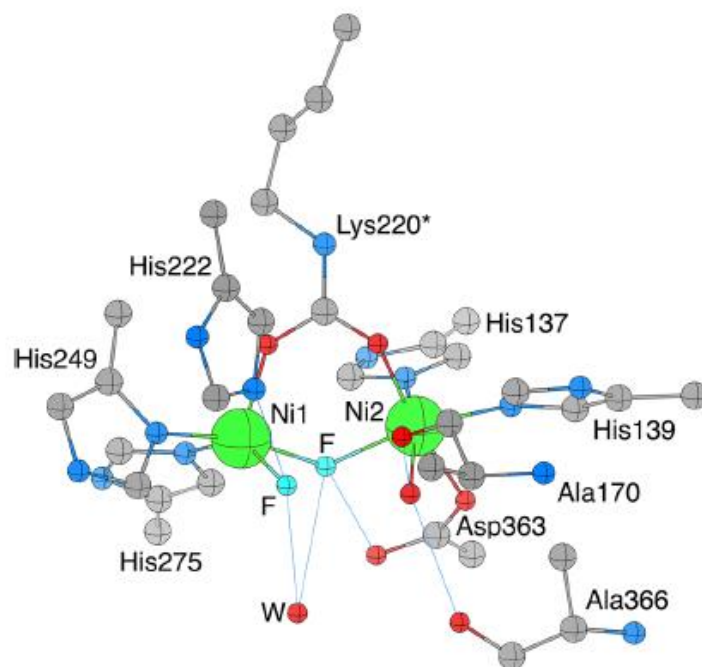
Εικόνα 16: Δομή του κιτρικού οξέος 35.



Εικόνα 17: Κρυσταλλική δομή του ενεργού κέντρου της SPU σε σύμπλεξη με κιτρικό οξύ. Εμφανίζονται μόνο επιλεγμένα αμινοξέα.^[15]

2.2.5 Ιόντα φθορίου

Το ιόν φθορίου έχει μελετηθεί εκτενώς ως αναστολέας της ουρεάσης.^{[145], [146], [147]} Βιοχημικές μελέτες που πραγματοποιήθηκαν στην SPU έδειξαν ότι το ιόν φθορίου εκτελεί τον ανασταλτικό του ρόλο μέσω ενός πολύπλοκου μηχανισμού.^[24] Ειδικότερα, το ιόν φθορίου έχει μια μικτή ανταγωνιστική και μη ανταγωνιστική αναστολή. Η ανασταλτική δράση εξαρτάται από το pH. Συγκεκριμένα, στην περιοχή pH 6.5-8.0, η μη ανταγωνιστική δράση του αναστολέα γίνεται ισχυρότερη σε υψηλότερο pH, ενώ η ανταγωνιστική αναστολή αυξάνεται σε χαμηλότερο pH. Το αποτέλεσμα της λεπτομερούς ανάλυσης υποδεικνύει ότι ένα ιόν φθορίου συνδέεται με το Ni1 του ενεργού κέντρου, ενώ ένα άλλο ιόν φθορίου αντικαθιστά το υδροξείδιο που στο φυσικό ένζυμο δρα ως γέφυρα. Με τον τρόπο αυτό, η μικτή αναστολή του φθορίου ερμηνεύεται ως εξής: Το ιόν φθορίου που δεσμεύεται με το Ni1 ανταγωνίζεται την εισερχόμενη ουρία (πιο αποτελεσματική η δέσμευση καθώς αυξάνει το pH, λόγω της αύξησης της συγκέντρωσης του ανιόντος φθορίου), ενώ το γεφυρωμένο ιόν φθορίου αντικαθιστά το υδροξείδιο γεφύρωσης (πιο αποτελεσματική η αντικατάσταση καθώς το pH μειώνεται, γεγονός που οδηγεί σε πρωτονίωση του τελευταίου, οπότε το καθιστά πιο επιρρεπές στην υποκατάσταση), εμποδίζοντας το να πραγματοποιήσει την πυρηνόφιλη προσβολή στο υπόστρωμα της ουρίας (Εικόνα 18).



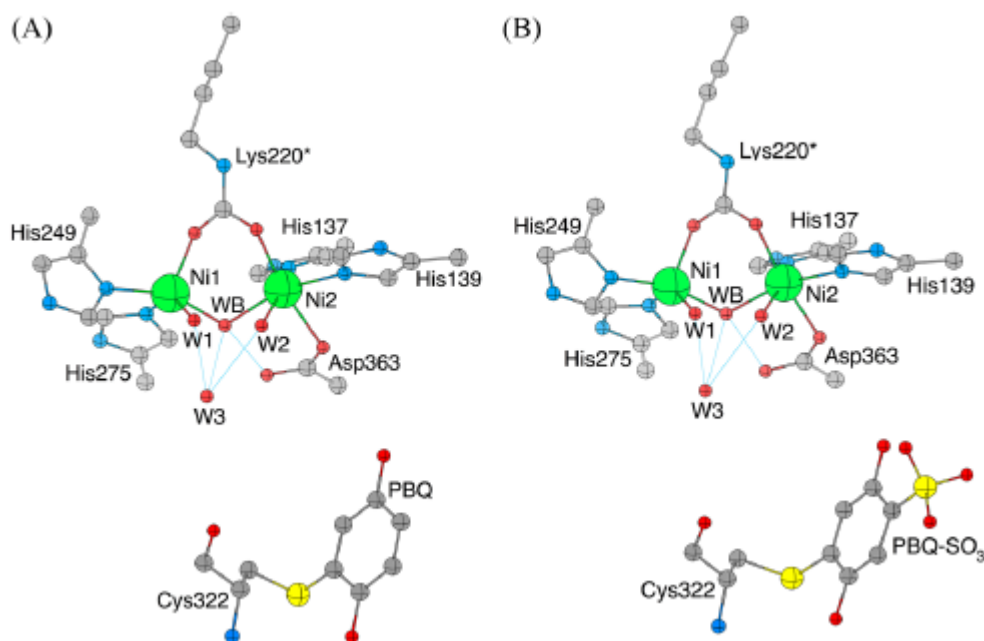
Εικόνα 18: Κρυσταλλική δομή του ενεργού κέντρου της SPU σε σύμπλεξη με ιόν φθορίου. Εμφανίζονται μόνο επιλεγμένα αμινοξέα. ^[15]

2.2.6 Βαρέα μέταλλα

Αν και τα δομικά στοιχεία σχετικά με τις αλληλεπιδράσεις ιόντων ουρίας-μετάλλου δεν είναι ακόμη διαθέσιμα, οι βιοχημικές πληροφορίες παρέχουν το συμπέρασμα ότι τα μεταλλικά ιόντα δρουν ως αναστολείς βραδείας δέσμευσης της ουρεάσης, με τα ιόντα Hg (II), Ag (I) και Cu (II) να περιγράφονται ως τα ισχυρότερα. ^[9] Ο Cu (II) και πιθανώς ο Ag (I) μπορούν να αντιδράσουν με λειτουργικές ομάδες που περιέχουν άζωτο και οξυγόνο, συμβάλλοντας σε μια φαινομενική διαδικασία απενεργοποίησης των πρωτεϊνών. ^{[148], [149]} Οι ενώσεις βισμούθιου (Bi) αντιπροσωπεύουν μια κατηγορία ενώσεων με βαρέα μέταλλα που χρησιμοποιούνται ευρέως ως βακτηριοκτόνα στην θεραπεία του πεπτικού έλκους και σε λοιμώξεις. ^{[150], [151], [152]} Αν και ο λεπτομερής χαρακτηρισμός της βακτηριοκτόνου δράσης δεν έχει διευκρινιστεί, έχει αποδειχθεί ότι τα ιόντα Bi (III) απενεργοποιούν τη δράση της ουρεάσης μέσω μιας αλληλεπίδρασης με τη θειολική ομάδα της κυστεΐνης, συμβάλλοντας έτσι στην αναστολή της ουρεάσης από το βισμούθιο. ^[153]

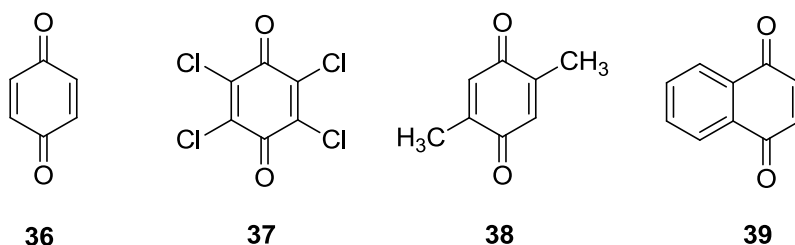
2.2.7 Κινόνες

Οι κινόνες είναι μια ευρέως εμφανιζόμενη κατηγορία ενώσεων στη φύση. Έχουν υψηλό δυναμικό οξειδωσης, είναι γνωστές για την βακτηριοκτόνα και μυκητιακή τους δράση,^[154] καθώς και για την ικανότητά τους να αδρανοποιούν τις πρωτεΐνες.^{[155], [156]} Η δράση τους ως αναστολείς της ουρεάσης σχετίζεται με την ισχυρή τους αλληλεπίδραση με τη σουλφυδρυλομάδα της κυστεΐνης του ενεργού κέντρου του ενζύμου.^[157] Ο Bremner και οι συνεργάτες του, τη δεκαετία του 1970, απέδειξαν την ανασταλτική δράση των *π*-βενζοκινονών (PBQ) στις φυτικές ουρεάσες και ανέφεραν την ένωση 1,4-βενζοκινόνη (μία *π*-βενζοκινόνη) ως τον πιο ελπιδοφόρο αναστολέα για την ουρεάση.^{[158], [159], [160]} Οι κινητικές μελέτες των ανασταλτικών ιδιοτήτων των πολυαλογονωμένων βενζο- και ναφθοκινονών επί της ουρεάσης περιγράφηκαν στο πρόσφατο παρελθόν από τους Ashiralieva και Kleiner.^{[161], [162]} Στην Εικόνα 19 φαίνεται το ενεργό κέντρο της SPU που απενεργοποιείται από δύο διαφορετικές κινόνες: (Α) την *π*-βενζοκινόνη και (Β) το 2,5-διυδροξυ-βενζοσουλφονικό παράγωγο. Παρατηρείται ο σχηματισμός ενός ομοιοπολικού δεσμού μεταξύ ενός ατόμου άνθρακα του δακτυλίου της *π*-βενζοκινόνης και του ατόμου S του αμινοξέος της Cys322 που βρίσκεται στο κινητό πτερύγιο της ουρεάσης. Το άτομο οξυγόνου της *π*-βενζοκινόνης, στη θέση μέτα- ως προς την ομάδαθειόλης, σχηματίζει ένα δεσμό υδρογόνου με ένα μόριο νερού στα 2.85 Å.



Εικόνα 19: Κρυσταλλική δομή του ενεργού κέντρου της SPU σε σύμπλεξη με (Α) *π*-βενζοκινόνη και (Β) 2,5-διυδροξυ-βενζοσουλφονικό παράγωγο. Εμφανίζονται μόνο επιλεγμένα αμινοξέα.^[15]

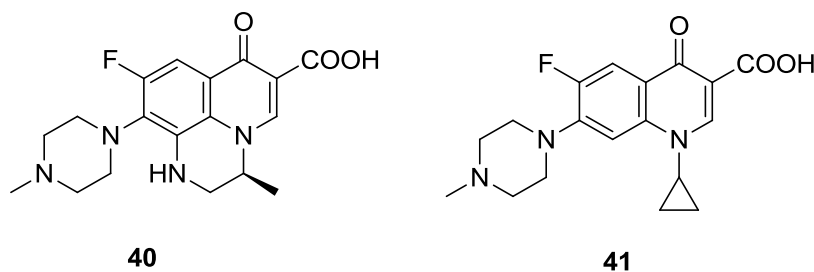
Η φύση του αλογόνου δεν επηρεάζει τη δράση των αναστολέων, ενώ η αντικατάστασή του από μία ομάδα όπως το -OH, -CN, αλκοξυ-ομάδα ή αλκύλιο οδήγησε σε μείωση της συγγένειας σε σχέση με τις μη υποκατεστημένες κινόνες. Δοκιμάστηκαν διάφορες ενώσεις ως προς την αναστολή της ουρεάσης των βακτηρίων *H. pylori*, *P. mirabilis* και *K. oxytoca*. Χαρακτηριστικά παραδείγματα αποτελούν οι ενώσεις **36-39** (Εικόνα 20).^[156]



Εικόνα 20: Δομή των 1,4-βενζοκινόνης **36**, τετραχλωρο-1,4-βενζοκινόνης **37**, 2,5-διμεθυλο-1,4-βενζοκινόνης **38** και 1,4-ναφθοκινόνης **39**.

2.2.8 Κινολόνες

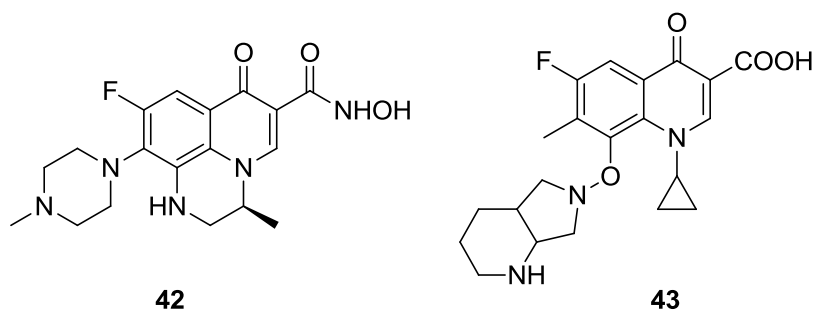
Τα αντιβιοτικά κινολόνης αποτελούν μια σημαντική κατηγορία ενός μεγάλου συνόλου συνθετικών αντιβακτηριακών ενώσεων, τα οποία σήμερα είναι τα πιο επιτυχημένα κλινικά συνθετικά αντιβακτηριακά φάρμακα.^[163] Είναι υπεύθυνα για την αναστολή της σύνθεσης του DNA. Σχεδόν όλα τα αντιβιοτικά κινολόνης είναι φθοροκινολόνες. Δύο αντιπροσωπευτικά αντιβιοτικά κινολόνης είναι το *Levofloxacin* **40** και το *Ciprofloxacin* **41** (Εικόνα 21),^{[164], [165]} καθώς και τα ανάλογα τους.^[166] Οι ενώσεις αυτές φαίνεται να αποτελούν αρκετά ελπιδοφόρους αναστολείς των ενζύμων *Helicobacter pylori* και *Proteus mirabilis*. Σύμφωνα με τη μοριακή μοντελοποίηση, η καρβοξυλική ομάδα αλληλεπιδρά με τα ιόντα νικελίου του ενεργού κέντρου. Ωστόσο, δεν αποκλείεται να υπάρχει ομοιοπολική σύνδεση με την ενζυμική κυστεΐνη, όπως άλλωστε παρατηρείται και στις απλές κινόνες.^[156]



Εικόνα 21: Δομή των αντιβιοτικών *Levofloxacin* **40** και *Ciprofloxacin* **41**.

Όπως έχει αναφερθεί παραπάνω, το ακετούδροξαμικό οξύ (*Lithostat* **20**) είναι ένα φάρμακο, το οποίο χρησιμοποιείται σε ασθενείς με χρόνιες λοιμώξεις του ουροποιητικού συστήματος, κατά τη διάρκεια των οποίων διασπάται η ουρία, προκειμένου να αποφευχθεί η υπερβολική συσσώρευση αμμωνίας στα ούρα.^[118] Επομένως, δεν προκαλεί έκπληξη το γεγονός ότι με την τροποποίηση της καρβοξυλικής ομάδας των φθοροκινολονών σε υδροξαμικό οξύ **42** και σε αμίδιο, λαμβάνεται μια ενδιαφέρουσα κατηγορία αναστολέων για το ένζυμο της ουρεάσης.^[167]

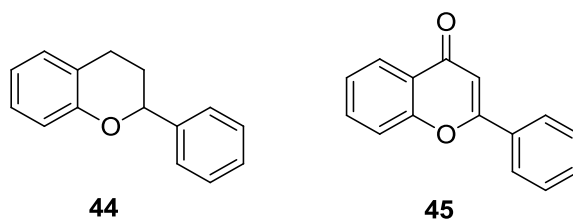
Πρόσφατα, αποδείχθηκε ότι η ένωση **43** αποτελεί έναν εξαιρετικό αναστολέα ουρεάσης και μάλιστα είναι πιο ισχυρός, ακόμα και από το ίδιο το αντιβιοτικό (Εικόνα 22).^[168]



Εικόνα 22: Δομή των ενώσεων 42 και 43.

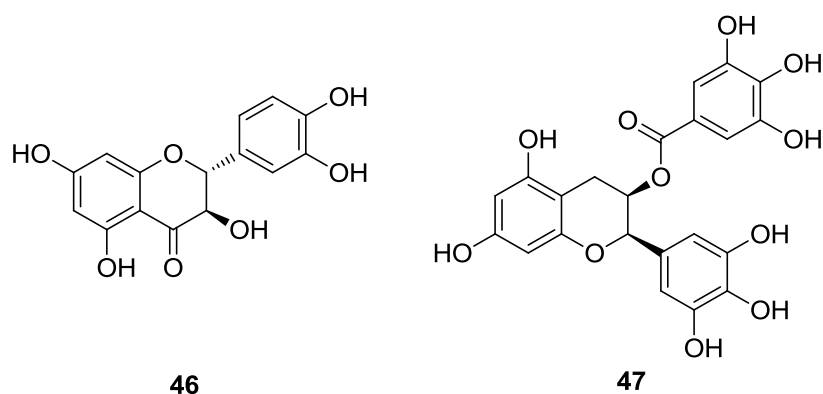
2.2.9 Φλαβονοειδή

Σε πρόσφατες μελέτες, εξετάστηκε η ανασταλτική δράση αρκετών φλαβονοειδών έναντι της HPU, αποκαλύπτοντας ότι οι δύο ορθο-υδροξυλομάδες ήταν απαραίτητες για την ανασταλτική δράση των φλαβονοειδών (Εικόνα 23).^{[169], [170], [171]}



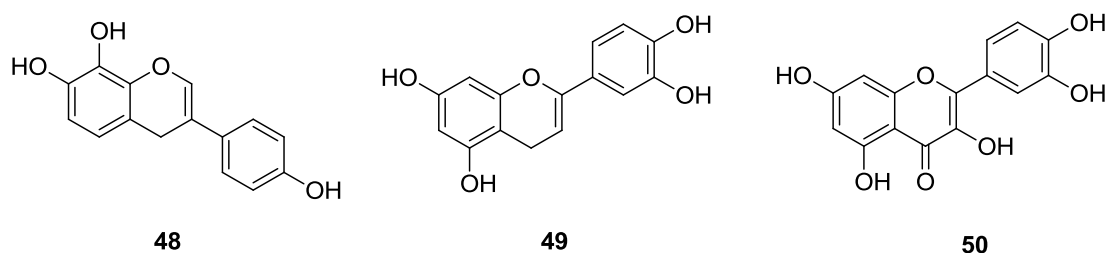
Εικόνα 23: Δομές φλαβονοειδών. Η ένωση (44) αποτελεί τη βασική σκελετική δομή των φλαβονοειδών.

Τα εκχυλίσματα διαφόρων φυτών, συμπεριλαμβανομένου του πράσινου τσαγιού και των βακκινίων, έχουν συχνά χρησιμοποιηθεί για τη θεραπεία της γαστρίτιδας ή των λοιμώξεων του ουροποιητικού συστήματος. Αυτή η επίδραση πιστεύεται ότι προκύπτει από τη δράση της (+)-κατεχίνης **46** και της (-)-επιγαλλοκατεχίνης του γαλλικού εστέρα **47** ως αναστολείς της ουρεάσης (Εικόνα 24).^[172] Επίσης, τα φλαβονοειδή που απομονώνονται από άλλα φυτά: *Daphne retusa*, *Pistacia atlantica* και βαμβάκι φαίνεται να είναι αναστολείς ουρεάσης από φασόλια (JBU).^{[173], [174], [175]}



Εικόνα 24: Δομές της (+)-κατεχίνης 46 και της επιγαλλοκατεχίνης του γαλλικού εστέρα 47.

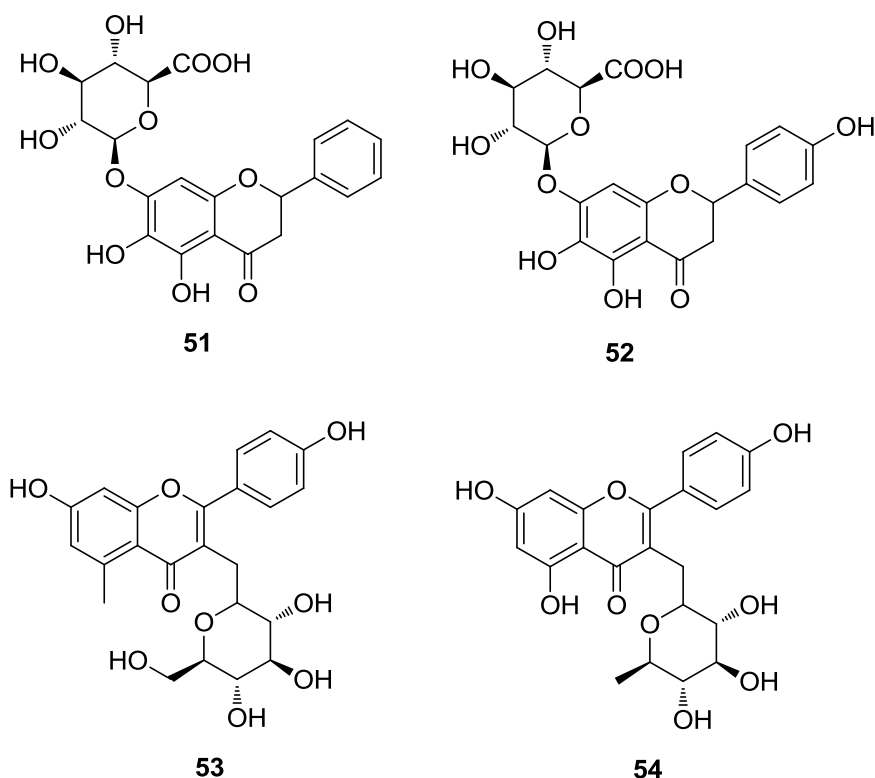
Με βάση τα παραπάνω δεδομένα, κρίθηκε απαραίτητο να αναλυθεί περαιτέρω η ανασταλτική δράση των φλαβονοειδών. Έτσι, έντεκα (11) φυσικές και δεκαεννέα (19) συνθετικές ενώσεις ελέχθησαν ως προς την ανασταλτική τους δράση έναντι της ουρεάσης HPU.^[171] Οι συνθετικές ενώσεις **48** και **49** φαίνεται να είναι ασθενείς αναστολείς του ενζύμου, ενώ η ένωση **50** είναι ο πιο δραστήσιος αναστολέας μεταξύ αυτών που μελετήθηκαν (Εικόνα 25).^[176]



Εικόνα 25: Δομές των ενώσεων 48-50.

Το *Radix Scutellariae*, γνωστό ως "*Huang-Qin*" στα κινέζικα, προέρχεται από την αποξηραμένη ρίζα της *Scutellaria baicalensis*. Οι κύριες βιοδραστικές ενώσεις του είναι η βαϊκαλίνη **51** και η σκουτελαρίνη **52**. Η βαϊκαλίνη βρέθηκε ότι είναι ένας ανταγωνιστικός, βραδείας δέσμευσης και εξαρτώμενος από τη συγκέντρωση αναστολέας της ουρεάσης από φασόλια (JBU) και των ουρεάσεων του *H. pylori*.^{[177], [178], [179]} Ο καμφερολ-3-O- α -D-γλυκοπυρανοζίτης **53** και ο καμφερολ-3-O- α -L-ραμνοπυρανοζίτης **54** που απομονώθηκαν από

τους καρπούς του *Syzygium alternifolium* εμφάνισαν την ισχυρότερη ανασταλτική δράση έναντι του ενζύμου *H. pylori* (Εικόνα 26).^[180]

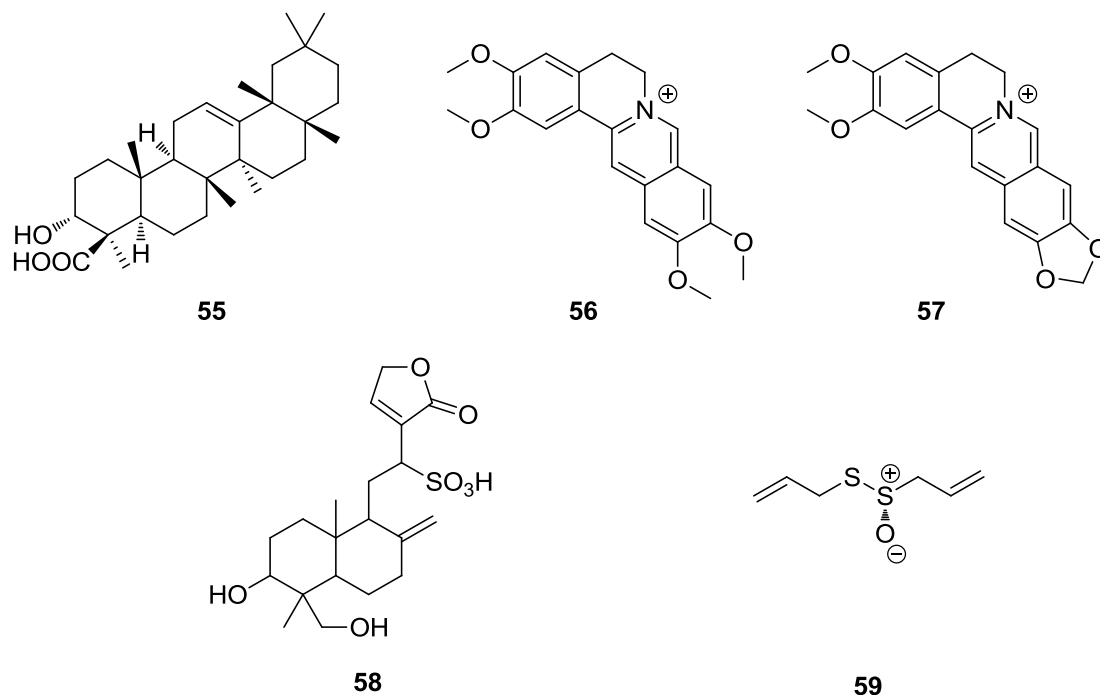


Εικόνα 26: Δομές των ενώσεων 51-54.

2.2.10 Άλλα φυσικά προϊόντα

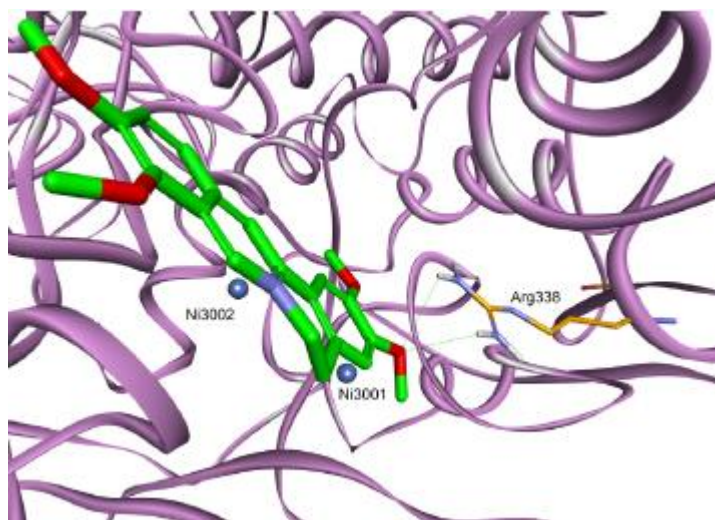
Τα φυσικά προϊόντα (κυρίως δευτερογενείς μεταβολίτες) είναι η πιο επιτυχημένη πηγή δυνητικών φαρμάκων μέχρι στιγμής. Τα τελευταία χρόνια υπάρχουν αρκετές μελέτες σχετικά με τη δράση φυτικών εκχυλισμάτων^{[181], [182], [183]} και απομονωμένων φυσικών ενώσεων^{[184], [185]} προς το ένζυμο της ουρεάσης. Αντιπροσωπευτικά παραδείγματα φυσικών προϊόντων που πρόσφατα προσδιορίστηκε η ανασταλτική τους δράση είναι το βοσελενικό οξύ **55** που απομονώθηκε από το αφρικανικό φυτό *Boswellia carteri*,^[186] η παλματίνη **56** και η επιβερβερίνη **57** από το φυτό *Coptis chinensis*,^{[187], [188], [189]} το οποίο είναι ένα φυτό που χρησιμοποιείται παραδοσιακά στη Κίνα για τη θεραπεία των γαστρεντερικών νόσων, το ανδρογραφολίδιο **58**, η κύρια διτερπενοειδής λακτόνη που απομονώνεται από το κινέζικο φαρμακευτικό φυτό *Andrographis aniculata*^[190] και ένα δημοφιλές αντιβιοτικό από την

οργανοθειική ένωση αλλισίνη **59** που περιέχεται στο σκόρδο (Εικόνα 27).^[191]
^[192]



Εικόνα 27: Δομή των ενώσεων 55-59.

Η πρόσδεση της παλμιτίνης στην ουρεάση από το φασόλι (JBU) και το *H. Pylori* έδειξε ότι αυτό το αλκαλοειδές συμπληρώνει επαρκώς τα δραστικά τμήματα αυτών των ουρεασών, σταθεροποιώντας το μοτίβο α-έλικας-στροφής-α-έλικας πάνω από την κοιλότητα του ενεργού κέντρου (Εικόνα 28). Αυτό εμποδίζει το κλείσιμο του περυγίου του ενεργού κέντρου της ουρεάσης γεγονός που έχει ως αποτέλεσμα την αναστολή της δραστηριότητάς της.



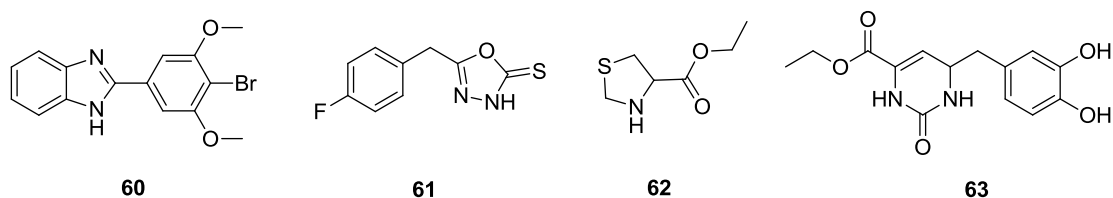
Εικόνα 28: Διαμόρφωση της παλμιτίνης 56 στο ενεργό κέντρο της ουρεάσης του *H. Pylori*.

Τέλος, αξίζει να σημειωθεί ότι υπάρχουν μελέτες για την επίδραση διαφόρων μελιών, ^[193], ^[194], ^[195] κλάσματα μελιού ^[196] και ο συνδυασμός τους με φυτικά εκχυλίσματα ^[197] ως προς τη δραστηριότητα της HPU. Τα αποτελέσματα των ερευνών δείχνουν ότι η τακτική κατανάλωση αυτών των μελιών μπορεί να αποτρέψει τα γαστρικά έλκη.

2.2.11 Ετεροκυκλικές ενώσεις

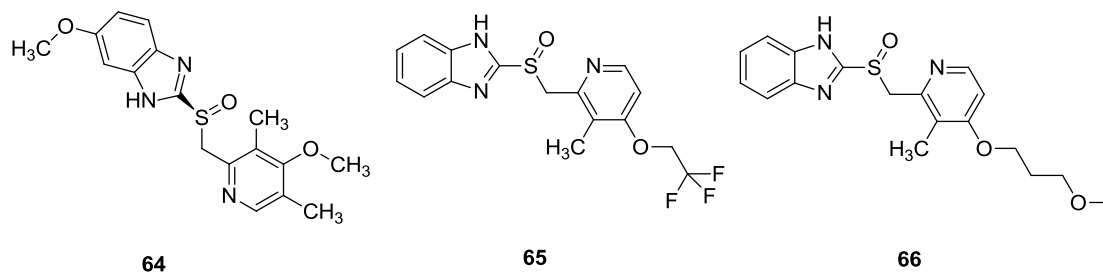
Σύμφωνα με πρόσφατες μελέτες, οι ετεροκυκλικοί δακτύλιοι φαίνεται να είναι αναστολείς της ουρεάσης του φασολιού (JBU) και της HPU. Όπως υποδεικνύεται από τη μοριακή μοντελοποίηση, οι ετεροκυκλικοί δακτύλιοι μπορούν να δεσμεύονται εντός του ενεργού κέντρου του ενζύμου και η δραστηριότητά τους προκύπτει από την αλληλεπίδραση της πλευρικής αλυσίδας της κυστεΐνης ή της μεθειονίνης με τα π αρωματικά ηλεκτρόνια του μορίου.

Στην Εικόνα 29 φαίνονται τα πιο αντιπροσωπευτικά μόρια με ετεροκυκλικό δακτύλιο που παρουσιάζουν ανασταλτική δράση. Συγκεκριμένα, είναι το βενζιμιδαζόλιο **60**, ^[198] το οξαδιαζόλιο **61**, ^[199] ο θειαζολιδινο-4-καρβοξυλικός αιθυλεστέρας **62** ^[200] και η διϋδροπυριδόνη **63** ^[201], ^[202] (Εικόνα 29).



Εικόνα 29: Δομή των ενώσεων 60-63.

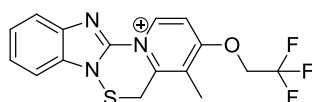
Τα βενζιμιδαζόλια συνιστούν μία κατηγορία χημικών ενώσεων που έχει μελετηθεί ευρέως στη φαρμακολογία ως αναστολείς αντλιών πρωτονίου που αδρανοποιούν μη αντιστρεπτά το ενζυμικό σύστημα της (H^+, K^+) -ΑΤΡάσης. Εξαιτίας της ισχυρής γαστρικής αντιεκκριτικής τους δράσης, τα βενζιμιδαζόλια (ομεπραζόλη **64**, λανσοπραζόλη **65** και ραμπεπραζόλη **66**) έχουν χρησιμοποιηθεί για τη θεραπεία και την πρόληψη του γαστροδωδεκαδακτυλικού και πεπτικού έλκους και της γαστροοισοφαγικής παλινδρόμησης (Εικόνα 30).^[203]



Εικόνα 30: Δομή της ομεπραζόλης 64, της λανσοπραζόλης 65 και της ραμπεπραζόλης 66.

Μία από τις πρώτες αναφορές που περιγράφουν τη χρήση της ομεπραζόλης **64** και των αναλόγων της για την αναστολή της ουρεάσης δημοσιεύτηκε από τον Kühler και τους συνεργάτες του.^[204] Οι ανασταλτικές τους ιδιότητες οφείλονται, όπως περιγράφηκε, στη μορφή του σουλφенаμιδίου που έχει τη δυνατότητα να αλληλεπιδρά με το μεταλλικό κέντρο και τις κυστεΐνες της ουρεάσης και οδηγεί σε στερεοχημική παρεμπόδιση του ενεργού κέντρου του ενζύμου.

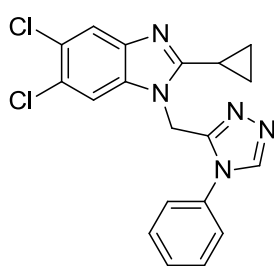
Ο ίδιος τρόπος δράσης προτάθηκε για τη λανσοπραζόλη **65** και το ενεργοποιημένο ανάλογό της **67** που συντέθηκαν από την Takeda Chemicals (Εικόνα 31). Αναφέρθηκαν σε μία ιαπωνική πατέντα ως αναστολείς της ουρεάσης του *H. pylori* με τιμές IC_{50} 4.6 και 8.0 μ M αντίστοιχα.^{[205], [206]} Η ραμπεπραζόλη (ένωση **67**) επίσης έδειξε ανασταλτική δράση έναντι της ουρεάσης του *H. pylori* (IC_{50} =0.29 μ M).^[207]



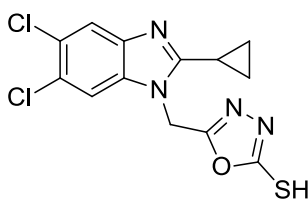
67

Εικόνα 31: Δομή της ένωσης 67.

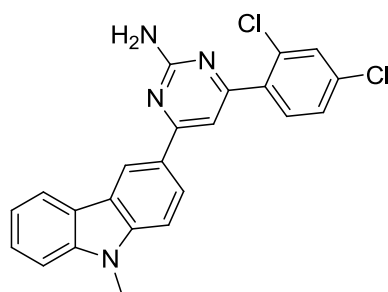
Επίσης, τα θειοδιαζόλια θεωρήθηκαν αναστολείς της ουρεάσης του *H. Pylori*, χωρίς να έχουν διεξαχθεί ενζυμικές μελέτες. Αυτή η παραδοχή προήλθε από την αντιβακτηριακή τους δράση έναντι αυτού του ενζύμου.^[208] Ο συνδυασμός δύο ανασταλτικών παραγόντων, δηλαδή βενζιμιδαζόλης με τριαζόλη (ένωση **68**) ή οξαδιαζόλη (ένωση **69**),^[209] καθώς και αμινοπυριδίνης με καρβαζόλη (ένωση **70**)^[210] δεν οδήγησε σε αύξηση της ανασταλτικής δραστηριότητας (Εικόνα 32).



68



69

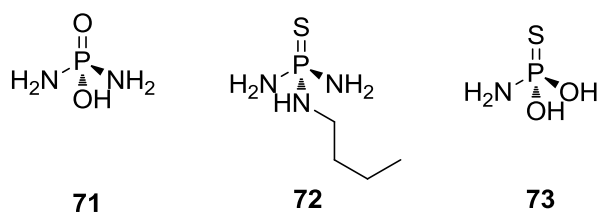


70

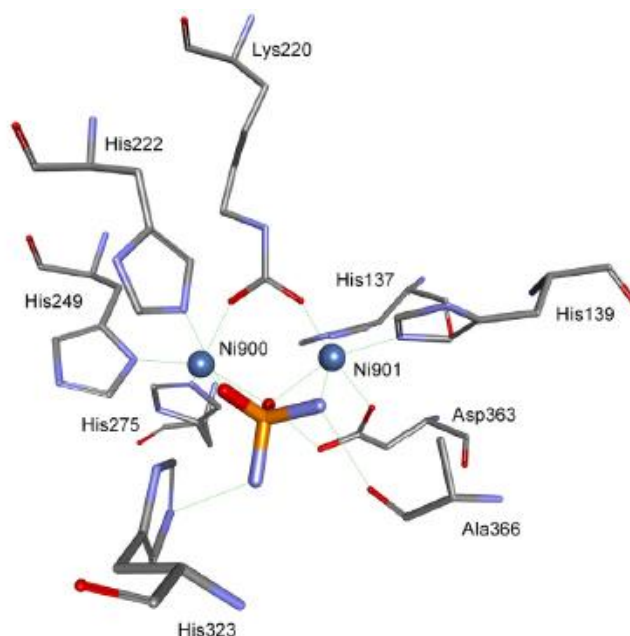
Εικόνα 32: Δομή των ενώσεων 68-70.

2.2.12 Οργανοφωσφορικές ενώσεις

Η ανταγωνιστική αναστολή της ουρεάσης από φωσφορικές ενώσεις περιγράφηκε αρχικά το 1934 ^[211] και μελετήθηκε εντατικά μέχρι το 2001, οπότε προσδιορίστηκε με κρυσταλλογραφία ο τρόπος πρόσδεσης της ουρεάσης από το *S. pasteurii*. ^[212] Είναι σχετικά ασθενείς αναστολείς, ενώ τα αμίδιά τους (φωσφοραμίδια) κατατάσσονται μεταξύ των πιο δραστικών αναστολέων, γεγονός που εξηγείται από την κρυσταλλική δομή του συμπλόκου της ουρεάσης *S. pasteurii* με το διαμιδοφωσφορικό οξύ **71**. ^[134] Δεδομένου ότι τα φωσφοραμίδια είναι σχετικά φθηνές ενώσεις, χρησιμοποιήθηκαν ως μέσα για τη μείωση των απωλειών την αμμωνίας στα λιπάσματα που υπάρχει ουρεάση. Για το λόγο αυτό, το 2017 συντέθηκε με καινούρια μέθοδο ο αναστολέας *N*-(βουτυλο)θειοφωσφορικό τριαμίδιο (*NBPT*) **72**. ^{[213], [214]} Ο αναστολέας αυτός μετά από τη σύνδεση με το ένζυμο, υδρολύεται, δίνοντας μονοαμιδοθειοφωσφορικό οξύ **73** (Εικόνα 33), το οποίο συνδέεται με τα δύο ιόντα νικελίου στο ενεργό κέντρο (Εικόνα 34).

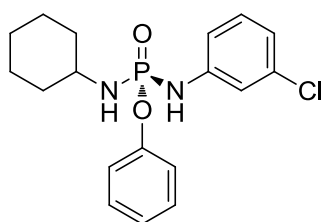


Εικόνα 33: Δομή των ενώσεων 71-73.



Εικόνα 34: Απεικονίζεται ο τρόπος σύνδεσης της ένωσης **73** με την ουρεάση από *S. pasteurii*.

Οι αναλύσεις των σχέσεων μεταξύ της δομής και της δραστηριότητας υποδεικνύουν πως η παρουσία μιας κυκλοεξυλαμίνης στην ένωση **74** αποτελεί σημαντικό παράγοντα για ενισχυμένη δραστηριότητα του αναστολέα (Εικόνα 35).^[215]

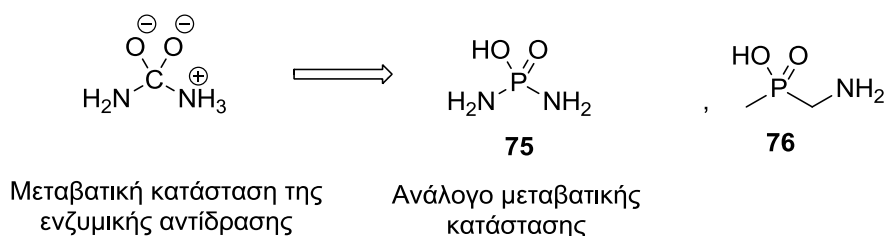


74

Εικόνα 35: Δομή της ένωσης **74**.

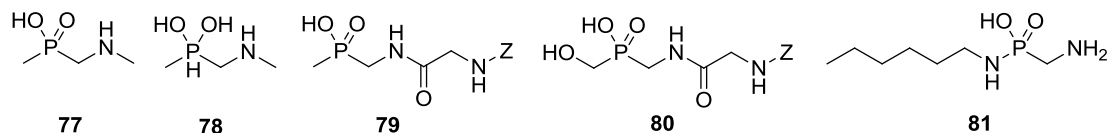
Δυστυχώς, ο φωσφοραμιδικός δεσμός P-N δεν είναι σταθερός σε υδατικά διαλύματα, γεγονός που περιορίζει τις περαιτέρω εφαρμογές τους. Στο Εργαστήριο Οργανικής Χημείας του τμήματος Χημείας του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών, παρασκευάστηκαν ενώσεις που περιέχουν έναν δεσμό άνθρακα-φωσφόρου (φωσφονικά και φωσφινικά παράγωγα) ως εναλλακτική λύση για να ξεπεραστεί η δυσκολία που υπήρχε

στα υδατικά διαλύματα φωσφοραμιδικών ενώσεων. ^[216] Οι διαμιδικοί και τριαμιδικοί εστέρες του φωσφορικού οξέος αποτελούν την πιο χαρακτηριστική κατηγορία αναστολέων ουρεάσης, καθώς εμφανίζουν την υψηλότερη δραστηριότητα. ^{[129], [217]} Θεωρώντας ότι το φωσφοροδιαμίδιο **75** έχει παρόμοια τετραεδρική γεωμετρία μεταβατικής κατάστασης της ενζυμικής αντίδρασης υδρόλυσης της ουρίας, το αμινομεθυλο-(*P*-μεθυλο) φωσφινικό οξύ **76** θεωρήθηκε λογικό να δράσει ως αναστολέας (Σχήμα 9).



Σχήμα 9: Φωσφοροδιαμιδικός εστέρας **75** ως ανάλογο μεταβατικής κατάστασης της υδρόλυσης της ουρίας και δομή της ένωσης **76**. ^[17]

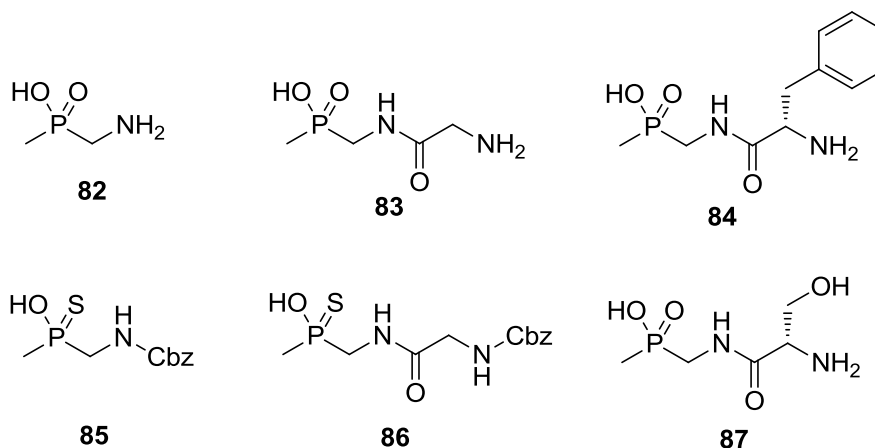
Με στόχο την περαιτέρω βελτιστοποίηση της ανασταλτικής δράσης, επιχειρήθηκε η *N*-μεθυλίωση στην ένωση **76**, γεγονός που οδήγησε στην ένωση **77** και αύξησε την ανασταλτική της δράση κατά 20 φορές. Με περαιτέρω τροποποιήσεις της δομής της ένωσης **76** προέκυψαν οι αναστολείς **78-81**, οι οποίοι είναι πολύ ισχυροί αναστολείς του ενζύμου (Εικόνα 36). ^{[218], [219], [220], [221]}



Εικόνα 36: Δομή των ενώσεων **77-81**.

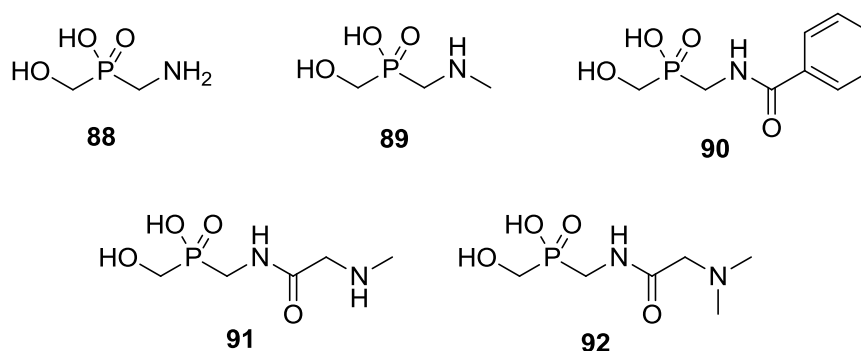
Επιπλέον, συντέθηκε μια σειρά παραγώγων *P*-μεθυλο-φωσφινικών οξέων και θειοφωσφινικών οξέων **82-87**, των οποίων η ανασταλτική δράση δοκιμάστηκε έναντι των βακτηρίων *Bacillus pasteurii* και *Proteus vulgaris* (Εικόνα 37). Την

ισχυρότερη αναστολή είχε η ένωση **86**, με $K_i=0.17 \mu\text{M}$ έναντι του *B. pasteurii* και $K_i=0.45 \mu\text{M}$ έναντι του *P. vulgaris*.



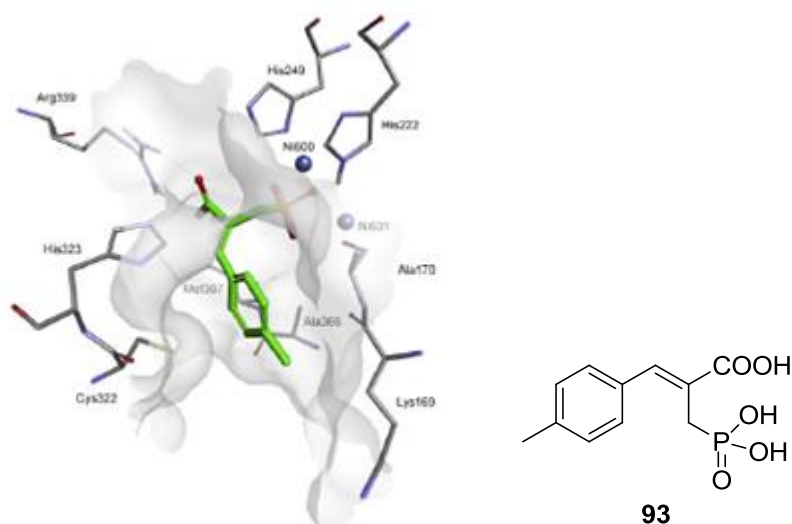
Εικόνα 37: Δομή *P*-μεθυλο-φωσφινικών και θειοφωσφινικών αναστολέων 82-87.

Σε εξέλιξη της προηγούμενης έρευνας, με τη βοήθεια υπολογιστικών τεχνικών βελτιστοποιήθηκαν οι δομές των αμινοφωσφινικών οξέων, τροποποιώντας τόσο το *N*- όσο και το *P*-τελικό άκρο τους και συντέθηκαν νέοι αναστολείς ισχυρότεροι αλλά και σταθερότεροι στην υδρόλυση (Ενώσεις **88-92**).^[218] Η εισαγωγή της *P*-υδροξυμεθυλο-ομάδας στο μόριο είχε ως αποτέλεσμα την αύξηση της ανασταλτικής δραστηριότητας έναντι των ουρεασών των βακτηρίων *Bacillus pasteurii* και *Proteus vulgaris*, σε σχέση με τα αντίστοιχα *P*-μεθυλο-παράγωγα.^[216] Η ένωση **89** αποτελεί τον πιο ισχυρό αναστολέα με τιμές $K_i=0.36 \mu\text{M}$ έναντι της ουρεάσης του *P. vulgaris* και $K_i=0.43 \mu\text{M}$ έναντι της ουρεάσης του *B. pasteurii* (Εικόνα 38).



Εικόνα 38: Δομή των *P*-υδροξυμεθυλο-φωσφινικών αναστολέων 88-92.

Με βάση τα αποτελέσματα που παρουσιάζονται σε μια μελέτη που περιγράφει την κρυσταλλική δομή της ουρεάσης *S. pasteurii* που έχει συμπλοκοποιηθεί με κιτρικό άλας, το 2017, σχεδιάσθηκαν και συντέθηκαν νέα φωσφονικά παράγωγα. Ένα από αυτά τα παράγωγα είναι το α -φωσφονομεθυλο- π -μεθυλοκινναμωμικό οξύ **93**, ένας από τους πιο ισχυρούς οργανοφωσφορικούς αναστολείς.^[222] Η μοριακή μοντελοποίηση έδειξε ότι οποιαδήποτε τροποποίηση της δομής της ένωσης **93** θα είχε ως αποτέλεσμα τη μειωμένη δραστηριότητα του αναστολέα (Σχήμα 10).



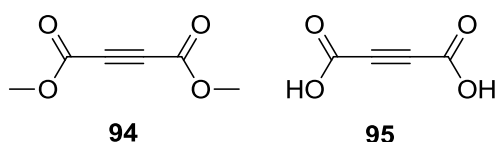
Σχήμα 10: Η πρόσδεση της ένωσης **93** στο ενεργό κέντρο του ενζύμου και η δομή της ένωσης **93**.

2.2.13 Αναστολείς που συνδέονται ομοιοπολικά

Αυτοί οι αναστολείς είναι ενώσεις σχεδιασμένες να συνδέονται ομοιοπολικά με ένα ειδικό μόριο-στόχο και έτσι να καταστέλλουν τη βιολογική λειτουργία του. Κατέχουν σημαντικό πλεονέκτημα που προκύπτει από την ισχυρή δέσμευση στο μόριο-στόχο, γεγονός που αποδίδει μεγαλύτερη ισχύ και διάρκεια δράσης και υπάρχει απαίτηση για μικρότερη ποσότητα δόσης. Ωστόσο, λόγω των μειονεκτημάτων τους, δεν υπήρχε μεγάλο ερευνητικό ενδιαφέρον για τη σύνθεση τέτοιων αναστολέων. Στα μειονεκτήματά τους συγκαταλέγεται η τοξικότητα, η ανοσογονικότητα (που είναι η ικανότητα ενός μορίου να επάγει ειδική ανοσιακή απάντηση) και τα προβλήματα που σχετίζονται με την

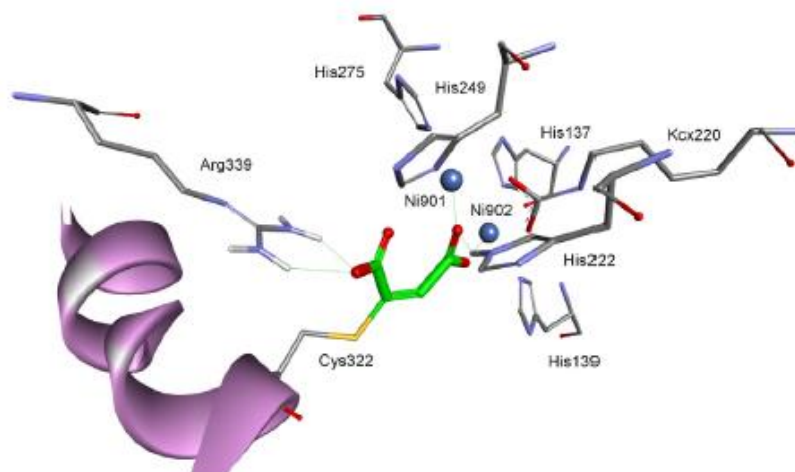
αποικοδόμηση πρωτεϊνών που έχουν ανασταλεί. Επομένως, δεν προκαλεί έκπληξη το γεγονός ότι τέτοιου είδους αναστολείς της ουρεάσης έχουν μελετηθεί ελάχιστα.

Καλοί υποψήφιοι για τέτοιου είδους αναστολείς είναι οι δέκτες Michael. Έτσι, το 2017, σαράντα σχετικά απλά μόρια που περιείχαν λειτουργικές ομάδες διαφόρων γεωμετριών (ισομερή *E* και *Z*) υποκατεστημένων διπλών δεσμών ή που περιείχαν τριπλούς δεσμούς ή αλλένια εξετάστηκαν για τις ανασταλτικές τους δραστηριότητες έναντι ουρεάσης της *S. pasteurii*. Αυτό οδήγησε σε διάφορες ενώσεις που εμφανίζουν ισχύ σε μM .^[223] Αποδείχθηκε πως οι ενώσεις που είχαν ανασταλτική δράση περιείχαν ομάδες καρβονυλίου (κετόνες, καρβοξυλικά οξέα, εστέρες) και οι ενώσεις **94** και **95** είχαν τη μεγαλύτερη ανασταλτική δράση (Εικόνα 39).



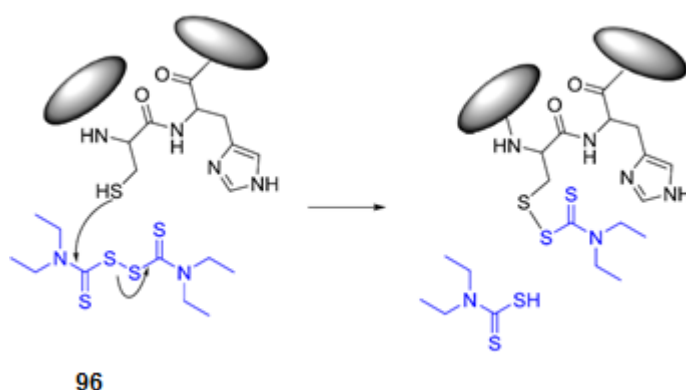
Εικόνα 39: Δομή των ενώσεων 94 και 95.

Όπως φαίνεται από τη μοριακή μοντελοποίηση, ο τρόπος σύνδεσης της ένωσης **95** εμπεριέχει τόσο το σχηματισμό ενός ομοιοπολικού δεσμού με το αμινοξύ της κυστεΐνης, όσο και αλληλεπιδράσεις με δύο ιόντα νικελίου (Εικόνα 40). Ένας τέτοιος τρόπος σύνδεσης φαίνεται να προάγει την εκλεκτικότητα των αναστολέων προς αυτό το ένζυμο.



Εικόνα 40: Τρόπος σύνδεσης της ένωσης 95 στο ενεργό κέντρο του ενζύμου.

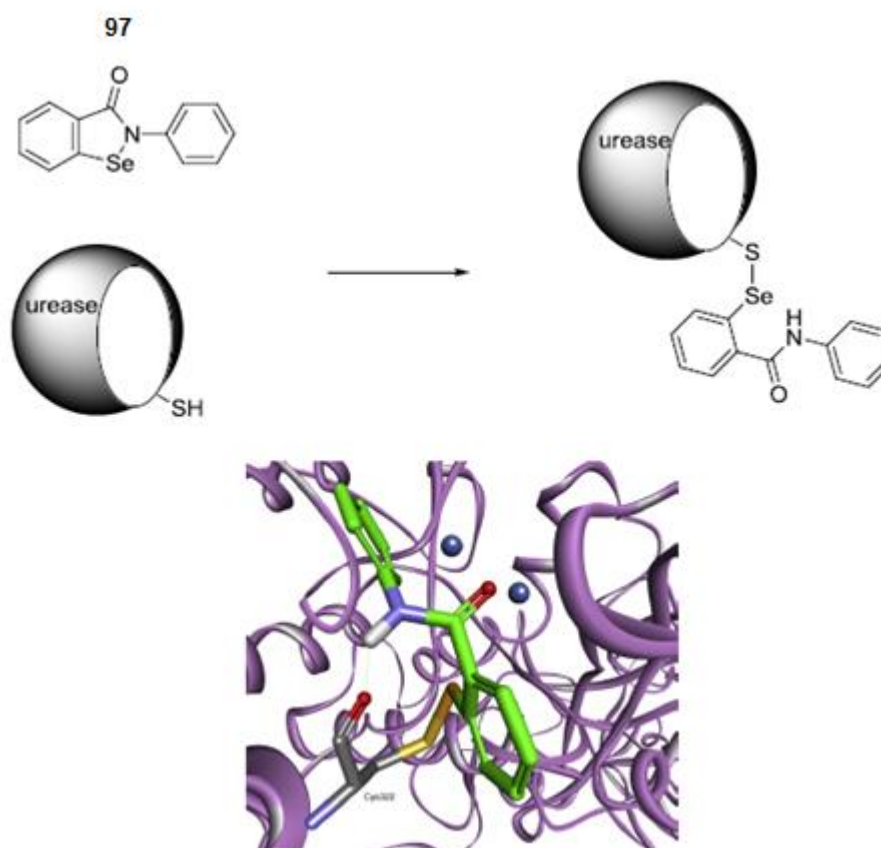
Ένα άλλο παράδειγμα ομοιοπολικού αναστολέα ουρεάσης είναι το *Disulfiram* **96**, ένα φάρμακο που χρησιμοποιείται για τη θεραπεία του χρόνιου αλκοολισμού με αναστολή της αφυδρογονάσης της ακεταλδεϋδης. Τα κινητικά πειράματα υποδεικνύουν ότι η ένωση **96** καρβαμυλιώνει την Cys695 του ενεργού κέντρου της ουρεάσης *Citrullus vulgaris* με παρόμοιο τρόπο όπως και η αφυδρογονάση (Σχήμα 11).^[224]



Σχήμα 11: Αντίδραση της ένωσης 96 με την κυστεΐνη του ενεργού κέντρου της ουρεάσης *Citrullus vulgaris*.

Επίσης, το 2016 αποδείχθηκε ότι οργανοσεληνιακές ενώσεις δρουν ως αναστολείς των ουρεασών *E. Pylori* και *S. pasteurii*,^[225] δεσμεύοντας την Cys322. Η πιο δραστική ένωση είναι η ένωση **97**, που μελετήθηκε για τη δράση της ως φάρμακο έναντι της απώλειας της ακοής, του εγκεφαλικού επεισοδίου και της διπολικής διαταραχής, καθώς έχει αντιφλεγμονώδη και

αντιοξειδωτική δράση. Η μοριακή μοντελοποίηση έδειξε την δέσμευση τόσο από την συμπλοκοποίηση του ιόντος νικελίου από το καρβονυλικό άτομο του μορίου, όσο και από το σχηματισμό ομοιοπολικού δεσμού θείου-σεληνίου με την Cys322 (Σχήμα 12).



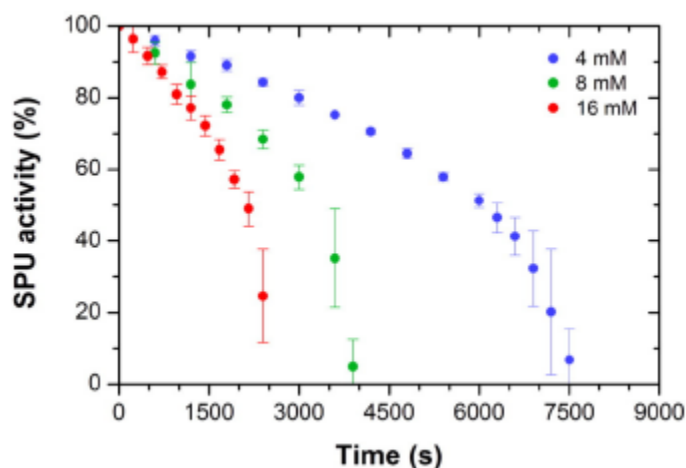
Σχήμα 12: Δομή της ένωσης 97 και τρόπος δέσμευσης της στην SPU.

2.2.14 Πολυφαινόλες

Οι πολυφαινόλες είναι φυσικές ενώσεις που γενικά αναγνωρίζονται ως ευεργετικές για την ανθρώπινη υγεία λόγω των αντιοξειδωτικών τους ιδιοτήτων. Είναι βιοδιαθέσιμες σε φαρμακευτικά και εδάδιμα φυτά. Σε κάποιες μελέτες, έχει αναφερθεί η ανασταλτική δράση πολυφαινολών έναντι της HPU. [169], [170], [171]

Επιπλέον, μερικές πολυφαινόλες που απομονώθηκαν από το πράσινο τσάι αποδείχθηκε πρόσφατα πως μπορούν να δράσουν ως αναστολείς της HPU. [226] Η αναστολή της ουρεάσης *Sporosarcina pasteurii* [123], [126], [227] από κατεχόλη **98** μελετήθηκε το 2017 από τον Ciurli και τους συνεργάτες του. [227]

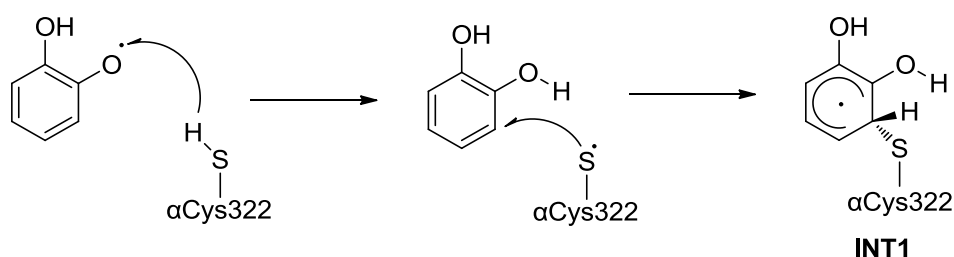
Σε αυτήν τη μελέτη στηρίχθηκε κατά κύριο λόγο η παρούσα εργασία. Με επώαση του ενζύμου της ουρεάσης με διαφορετικές συγκεντρώσεις της κατεχόλης, σε αυξανόμενη χρονική περίοδο, απουσία του υποστρώματος, παρακολουθείται η δραστηριότητα με φασματοφωτομετρική ανάλυση. Τα δεδομένα στο Σχήμα 13 δείχνουν μια καθυστέρηση στην αρχική φάση του πειράματος. Στη συνέχεια, η διαδικασία επιταχύνεται, καθώς αυξάνεται η συγκέντρωση της κατεχόλης, γεγονός που φανερώνει την πλήρη αναστολή του ενζύμου. Αυτή η συμπεριφορά είναι χαρακτηριστική για **μη αντιστρεπτούς ενζυμικούς αναστολείς**, οι οποίοι είναι γνωστό ότι σχηματίζουν σταθερούς **ομοιοπολικούς** δεσμούς μεταξύ του αναστολέα και λειτουργικών ομάδων του ενζύμου.^[228] Αναλυτικότερα, κατά τη διάρκεια αυτής της διαδικασίας, η κατεχόλη μετατρέπεται σε μια άλλη ένωση, η οποία δρα ως πραγματικός αναστολέας του ενζύμου. Άλλωστε, είναι γνωστό ότι η κατεχόλη υφίσταται οξείδωση σε ουδέτερα υδατικά διαλύματα, όταν εκτίθεται στον ατμοσφαιρικό αέρα.^{[229], [230]} Μάλιστα η ανάγκη για μοριακό οξυγόνο επιβεβαιώθηκε από την παντελή απενεργοποίηση της SPU, όταν το παραπάνω πείραμα διεξήχθη σε ελεγχόμενες από μοριακό οξυγόνο συνθήκες.



Σχήμα 13: Γράφημα της δραστηριότητας της SPU σε σχέση με το χρόνο επώασης σε διαφορετικές συγκεντρώσεις κατεχόλης.^[227]

Η λεπτομερής ανάλυση των μοριακών τροχιακών της OSQ (99) έδειξε ότι η μεγαλύτερη ηλεκτρονιακή πυκνότητα είναι εντοπισμένη στο άτομο O₂, υποδηλώνοντας ότι η αντίδραση θα μπορούσε να συμβεί σε δύο στάδια

(Σχήμα 14): ^[231], ^[232] i) στο πρώτο στάδιο, το H της θειόλης της Cys322 μεταφέρεται στο O2 της OSQ προκειμένου να σχηματιστεί ένα μόριο κατεχόλης και μια μεθυλοσουλφανυλική ρίζα (MeS•) και ii) στο δεύτερο στάδιο το άτομο S της Cys322 αλληλεπιδρά με το C3 της κατεχόλης, σχηματίζοντας έναν ομοιοπολικό δεσμό, για να προκύψουν τα προϊόντα της αντίδρασης.



Σχήμα 14: Προτεινόμενη αντίδραση για την απενεργοποίηση της SPU με OSQ που οδηγεί στο σχηματισμό του INT1 (ριζικό ενδιάμεσο), με βάση τους κβαντομηχανικούς υπολογισμούς. [230]

Η απενεργοποίηση της ουρεάσης με κατεχόλη περιλαμβάνει ένα σύνολο αντιδράσεων που απεικονίζονται στο Σχήμα 15. Η ρίζα OSQ μπορεί να παραχθεί με οξείδωση της κατεχόλης με διαλυμένο O₂ μέσω του σχηματισμού υπεροξειδίου (αντίδραση 1) και με αντίδραση της κατεχόλης και της ορθο-βενζοκινόνης OBQ (**100**) (αντίδραση 2). Η δραστική μορφή ουρεάσης (JBU_{act} στην περίπτωση της JBU) αντιδρά τότε με την OSQ για να παραχθεί το αδρανές ένζυμο (JBU_{inh}) σύμφωνα με τον μηχανισμό αντίδρασης που βασίζεται σε κβαντομηχανικούς υπολογισμούς (αντίδραση 3). Στην τελική αντίδραση 4 παράγεται ορθο-βενζοκινόνη με οξείδωση της ρίζας OSQ με διαλυμένο O₂. Αυτό το μοντέλο περιλαμβάνει έναν αριθμό μεταβλητών, ένας από τους οποίους είναι η συγκέντρωση διαλυμένου οξυγόνου ([O₂]). Λαμβάνοντας υπόψη ότι τα πειράματα διεξήχθησαν χρησιμοποιώντας δοχεία ανοιχτά στον αέρα και δεδομένης της σχετικά μεγάλης χρονικής διάρκειας της απενεργοποίησης του ενζύμου (χιλιάδες δευτερόλεπτα), υποτίθεται ότι η συγκέντρωση οξυγόνου είναι σταθερή κατά τη διάρκεια των αντιδράσεων και ίση με την αρχική συγκέντρωση στη θερμοκρασία που πραγματοποιήθηκαν τα πειράματα, δηλαδή [O₂]≈[O₂]₀ = 0.2 mM. ^[233] Στην εξίσωση (1), τα k_{app1} και k_{app2} είναι συναρτήσεις των κινητικών σταθερών k_1 , k_2 , k_3 και k_4 στο Σχήμα 15,

καθώς και της αρχικής συγκέντρωσης της κατεχόλης, $[CAT]_0$, όπως υποδεικνύεται στην εξίσωση (2) και στην εξίσωση (3), οι οποίες προέκυψαν από τη λύση του συστήματος των διαφορικών εξισώσεων με την εφαρμογή της σειράς Taylor. ^[234]

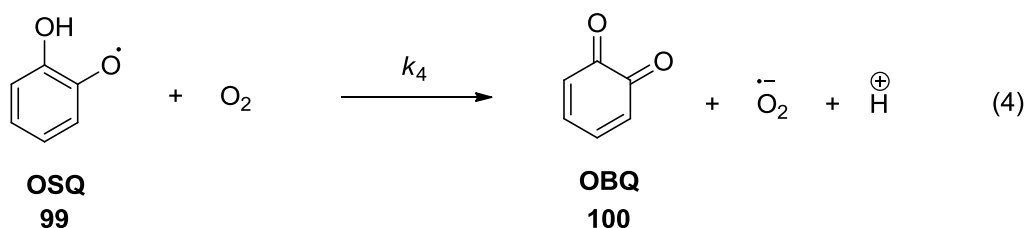
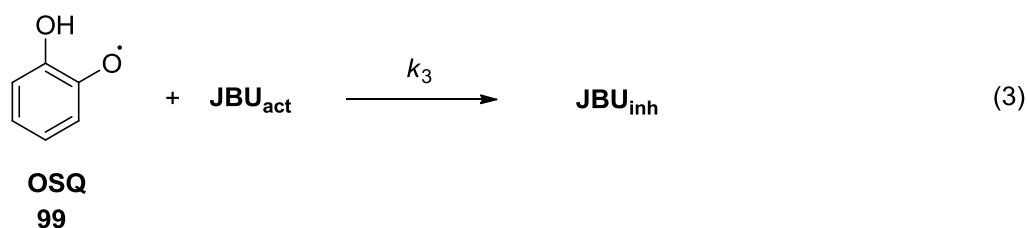
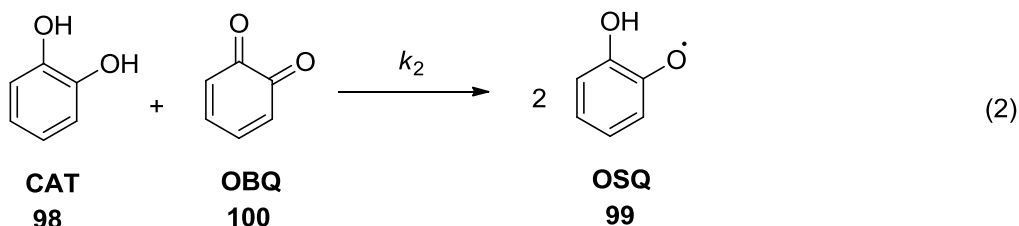
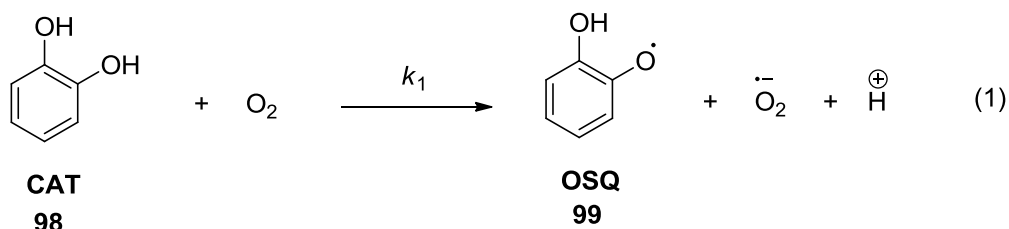
$$[JBU_{act}] = [JBU_{act}]_0 \exp (- k_{app1}t - k_{app2}t^2) \quad (1)$$

όπου:

$$k_{app1} = (k_1 k_3 [CAT]_0) / k_4 \quad (2)$$

$$k_{app2} = [2 k_1 k_3 ([CAT]_0)^2] / k_4 - (k_1^2 k_3 [CAT]_0 [O_2]_0) / k_4 \quad (3)$$

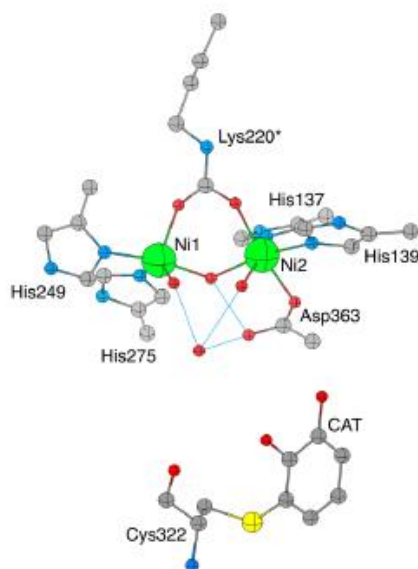
Τα δεδομένα που ελήφθησαν για την JBU σε τέσσερις διαφορετικές αρχικές συγκεντρώσεις κατεχόλης, χρησιμοποιώντας αυτό το μοντέλο έδωσαν τις ακόλουθες τιμές: $k_1 = 0,9 \pm 0,1 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, $k_2 = 49 \pm 4 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ και $k_3 / k_4 = 29 \pm 4$. Η πολύ μεγαλύτερη τιμή του k_2 σε σύγκριση με το k_1 είναι αποτέλεσμα της αυτοκαταλυτικής διεργασίας, ενώ η τιμή του λόγου k_3 / k_4 είναι σημαντικά μεγάλη, υποδηλώνοντας ότι η αντίδραση συνεχίζεται μέχρι την πλήρη κατανάλωση του ενεργού ενζύμου.



Σχήμα 15: Προτεινόμενος μηχανισμός αδρανοποίησης της ουρεάσης με κατεχόλη. ^[230]

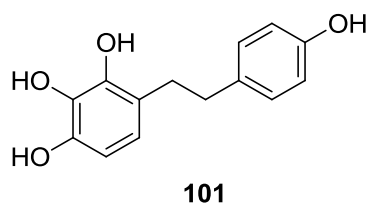
Οι ορθο-βενζοκινόνες μπορούν να αντιδράσουν με λειτουργικές ομάδες πρωτεϊνών, όπως είναι οι θειόλες και οι αμίνες. ^[235] Επιπλέον, οι πολυφαινόλες μπορούν να αλληλεπιδράσουν με μέταλλα μετάπτωσης ώστε να προκύψουν σύμπλοκα κατεχόλης-μετάλλου. ^[236] Η πρόσφατα κρυσταλλική δομή της SPU που αναστέλλεται από τη κατεχόλη έδειξε πως ο αναστολέας συνδέεται με **ομοιοπολικό δεσμό** με το άτομο S της **Cys322**, με παρόμοιο τρόπο όπως αναφέρθηκε παραπάνω για την παρα-βενζοκινόνη (Εικόνα 41). ^[230] Επιπλέον, υπάρχει ένα δίκτυο δεσμών υδρογόνου. Συγκεκριμένα, τα WA και WB δεσμεύονται με το O1 της κατεχόλης, όπου οι δεσμοί O-O απέχουν 2.52 και 3.05 Å, αντίστοιχα, ενώ το WB απέχει από το O1 και το O2 της

κατεχόλης 3.14 και 2.54 Å αντίστοιχα. Το WA σχηματίζει επίσης δύο δεσμούς υδρογόνου με τα άτομα οξυγόνου των αμινοξέων Lys169 και Leu365.



Εικόνα 41: Κρυσταλλική δομή του ενεργού κέντρου της SPU σε σύμπλεξη με κατεχόλη. Εμφανίζονται μόνο επιλεγμένα αμινοξέα.^[15]

Παράγωγα του γαλλικού οξέος ως αναστολέων ουρεάσης αναφέρθηκαν το 2007 από τον Χiao και τους συνεργάτες του. Συγκεκριμένα, μελέτησαν την ανασταλτική δράση 20 διαφορετικών παραγώγων.^[169] Οι βιολογικές δοκιμές διεξήχθησαν στην ουρεάση του βακτηρίου *H. pylori* και ανέδειξαν τη σημασία των υδροξυλίων των αρωματικών δακτυλίων. Η ένωση **101** περιγράφηκε ως ο ισχυρότερος αναστολέας με τιμή $IC_{50}=30 \pm 0.8 \mu M$ (Εικόνα 42).

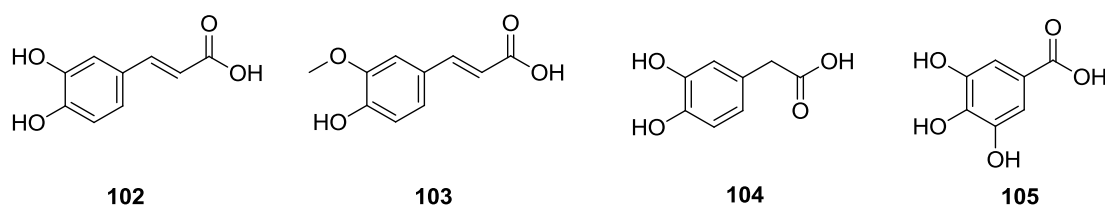


Εικόνα 42: Δομή του ισχυρότερου πολυφαινολικού αναστολέα από την έρευνα του Χiao.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3

ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

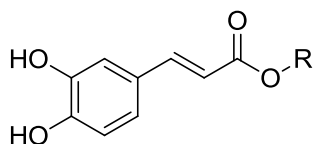
Στόχος της παρούσας εργασίας ήταν η σύνθεση παραγώγων φαινολικών οξέων ως υποψήφιων αναστολέων έναντι της ουρεάσης του βακτηρίου *Sporosarcina pasteurii*. Συγκεκριμένα, επιλέχθηκαν τα φαινολικά οξέα: (*E*)-3-(3,4-διυδροξυφαινυλο)ακρυλικό οξύ (καφεϊκό οξύ) **102**, το (*E*)-3-(4-υδροξυ-3-μεθοξυφαινυλο)ακρυλικό οξύ (φερουλικό οξύ) **103**, το 3,4-διυδροξυφαινυλοξικό οξύ **104** και το 3,4,5-τριυδροξυβενζοϊκό οξύ (γαλλικό οξύ) **105** (Εικόνα 43).



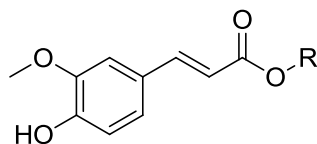
Εικόνα 43: Δομή του καφεϊκού οξέος, του φερουλικού οξέος, του 3,4-διυδροξυφαινυλοξικού οξέος και του γαλλικού οξέος αντίστοιχα.

Δύο από τα φαινολικά οξέα επιλέχθηκαν ώστε να φέρουν μία μονάδα κατεχόλης (**102** και **104**) και άλλα δύο (**103** και **105**) να μην φέρουν μονάδα κατεχόλης, ώστε να διαπιστωθεί η αναγκαιότητα της μονάδας αυτής, σύμφωνα με τη μελέτη του Ciurli και των συνεργατών του το 2017. ^[227] Επίσης, το ένα από τα δύο φαινολικά οξέα με μονάδα κατεχόλης επιλέχθηκε να περιέχει διπλό δεσμό (**102**), ο οποίος επάγει μειωμένη δυνατότητα περιστροφής, ώστε να μελετηθεί και αυτός ο παράγοντας.

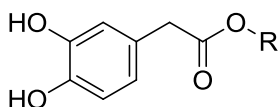
- Πρώτος στόχος ήταν η σύνθεση των εστέρων χρησιμοποιώντας ποικίλες αλκοόλες και αλκυλαλογονίδια (Εικόνα 44).



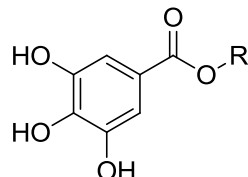
- 106** R=PhCH₂CH₂
117 R=Propargyl
121 R=4-Fluorophenethyl
125 R=4-Nitrophenethyl



- 107** R=PhCH₂CH₂
118 R=Propargyl
122 R=4-Fluorophenethyl
126 R=4-Nitrophenethyl



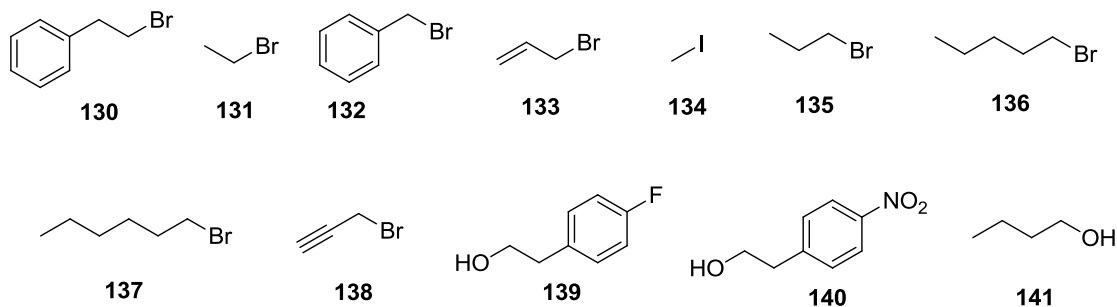
- 108** R=PhCH₂CH₂
110 R=Et
111 R=Bn
112 R=Allyl
113 R=Me
114 R=CH₃CH₂CH₂
115 R=CH₃(CH₂)₄
116 R=CH₃(CH₂)₅
119 R=Propargyl
123 R=4-Fluorophenethyl
127 R=4-Nitrophenethyl
129 R=CH₃(CH₂)₃



- 109** R=PhCH₂CH₂
120 R=Propargyl
124 R=4-Fluorophenethyl
128 R=4-Nitrophenethyl

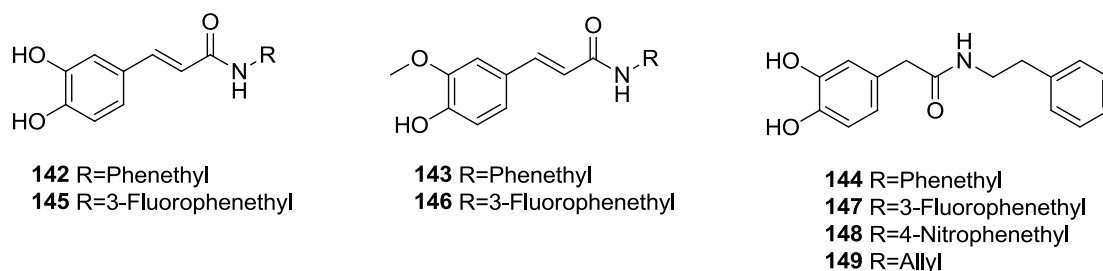
Εικόνα 44: Οι χημικές δομές των εστέρων που συντέθηκαν στα πλαίσια της παρούσας εργασίας.

Οι αλκοόλες και τα αλκυλαλογονίδια που χρησιμοποιήθηκαν ήταν τα εξής (Εικόνα 45):



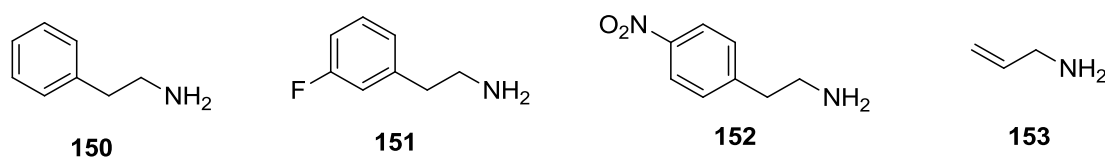
Εικόνα 45: Οι δομές των αλκοολών και των αλκυλαλογονιδίων που χρησιμοποιήθηκαν για τη σύνθεση των εστέρων.

- Δεύτερος στόχος ήταν η σύνθεση αμιδίων χρησιμοποιώντας ποικίλες αμίνες (Εικόνα 46).



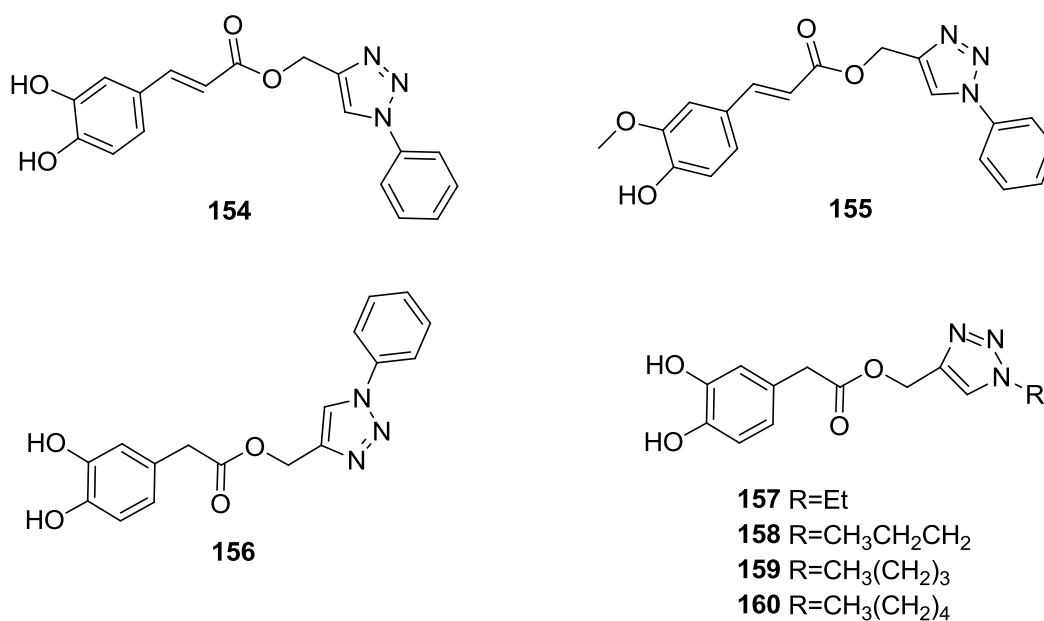
Εικόνα 46: Οι χημικές δομές των αμιδίων που συντέθηκαν στα πλαίσια της παρούσας εργασίας.

Οι αμίνες που χρησιμοποιήθηκαν ήταν (Εικόνα 47):



Εικόνα 47: Οι δομές των αμινών που χρησιμοποιήθηκαν για τη σύνθεση των αμιδίων.

- Τελευταίος στόχος ήταν η σύνθεση παραγώγων τριαζολίου (Εικόνα 48).

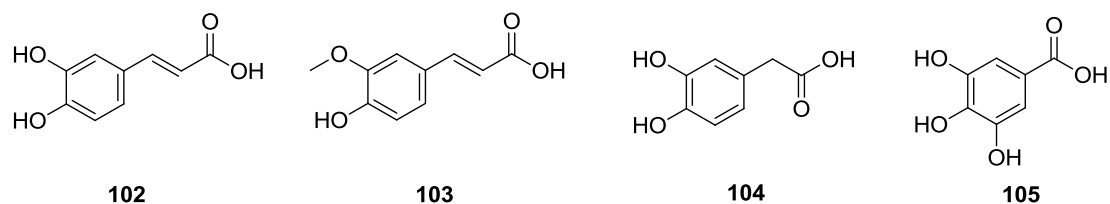


Εικόνα 48: Οι χημικές δομές των παραγώγων τριαζολίου που συντέθηκαν στα πλαίσια της παρούσας εργασίας.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4

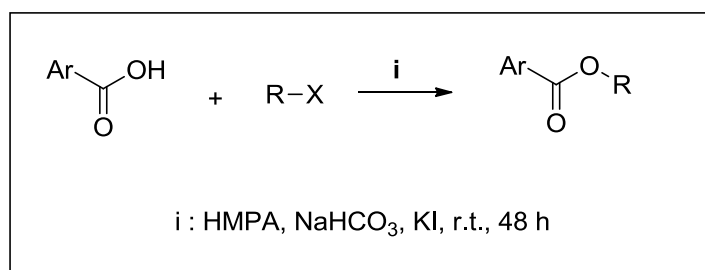
ΣΥΝΘΕΣΗ ΦΑΙΝΟΛΙΚΩΝ ΠΑΡΑΓΩΓΩΝ

Στην παρούσα εργασία συντέθηκαν φαινολικοί εστέρες, αμίδια, καθώς και παράγωγα τριαζολίου ως υποψήφιοι αναστολείς του ενζύμου ουρεάση. Τα φαινολικά οξέα που χρησιμοποιήθηκαν είναι: το (*E*)-3-(3,4-διυδροξυφαινυλο)ακρυλικό οξύ (καφεϊκό οξύ) **102**, το (*E*)-3-(4-υδρόξυ-3-μεθοξυφαινυλο)ακρυλικό οξύ (φερουλικό οξύ) **103**, το 3,4-διυδροξυφαινυλοξικό οξύ **104** και το 3,4,5-τριυδροξυβενζοϊκό οξύ (γαλλικό οξύ) **105** (Εικόνα 49).



Εικόνα 49: Δομή του καφεϊκού οξέος, του φερουλικού οξέος, του 3,4-διυδροξυφαινυλοξικού οξέος και του γαλλικού οξέος αντίστοιχα.

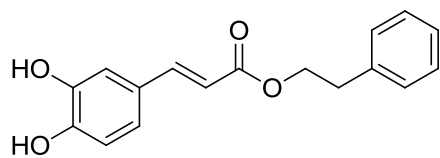
4.1 Συνθετική πορεία φαινολικών εστέρων – Μέθοδος Α



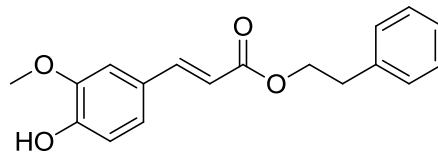
Σχήμα 16: Γενική μέθοδος παρασκευής εστέρων- Μέθοδος Α.

Χρησιμοποιώντας ως πρώτη ύλη τα φαινολικά οξέα (**102-105**) και αλογονίδια πραγματοποιείται μια αντίδραση εστεροποίησης, χρησιμοποιώντας ως βάση NaHCO₃. Τα αντιδραστήρια διαλύονται σε εξαμεθυλοφωσφοραμίδιο (HMPA).

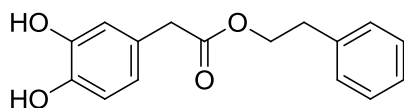
Επιπλέον, γίνεται χρήση καταλυτικής ποσότητας KI. Οι εστέρες που παρασκευάστηκαν με αυτήν τη μέθοδο (Σχήμα 16) είναι οι εξής (Εικόνα 50):



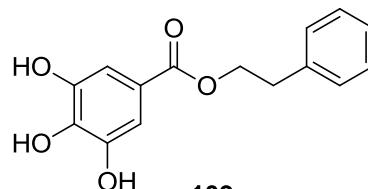
106



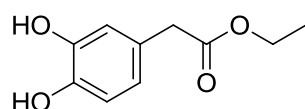
107



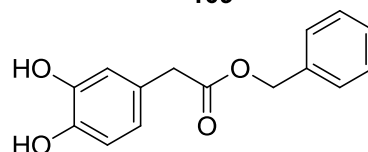
108



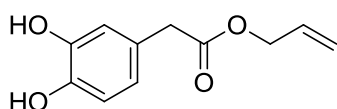
109



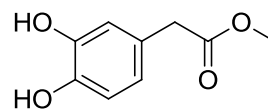
110



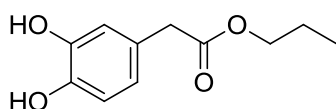
111



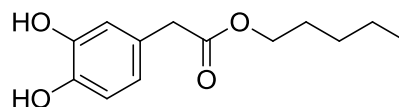
112



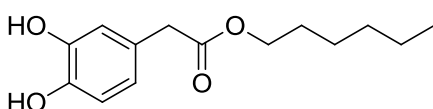
113



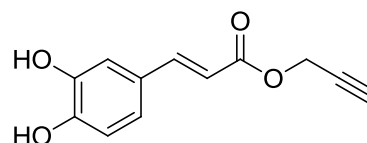
114



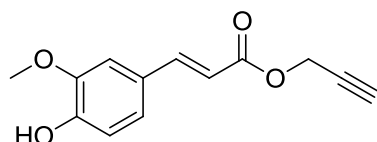
115



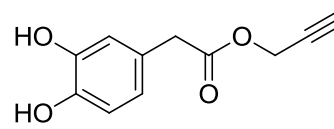
116



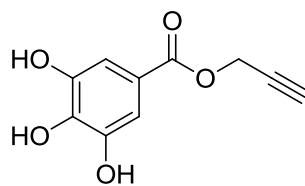
117



118



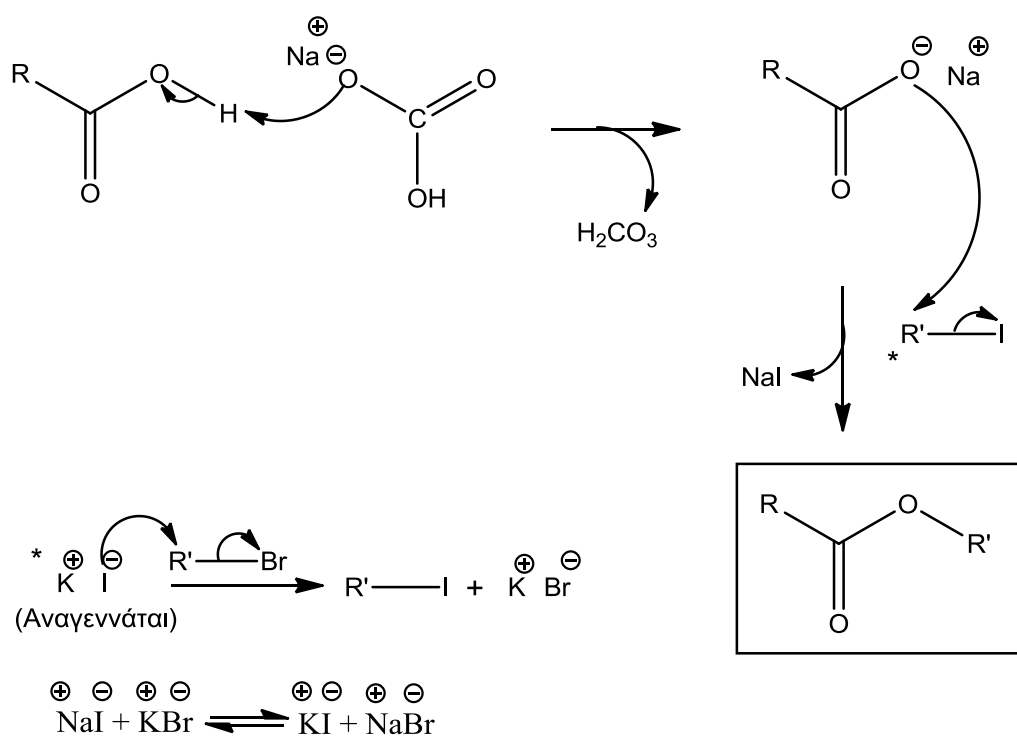
119



120

Εικόνα 50: Εστέρες που παρασκευάστηκαν με τη Μέθοδο Α.

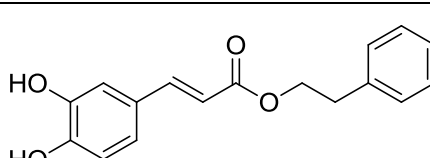
Η αντίδραση ακολουθεί έναν S_N2 μηχανισμό (είναι σύγχρονη αντίδραση, δηλαδή λαμβάνει χώρα σε ένα και μοναδικό στάδιο, με τους δεσμούς να διασπώνται και να σχηματίζονται ταυτόχρονα). Αρχικά, η βάση αποσπά το πρωτόνιο του καρβοξυλίου του αντιδρώντος οξέος προς σχηματισμό του καρβοξυλικού ανιόντος, το οποίο πρόκειται να δράσει ως πυρηνόφιλο. Πραγματοποιείται μια αντίδραση ανταλλαγής αλογόνου, καθώς το ιωδίδιο είναι πολύ καλό πυρηνόφιλο και καλύτερη αποχωρούσα ομάδα σε σχέση με το βρωμίδιο. Καθώς κατεβαίνουμε κατά μήκος της στήλης του περιοδικού πίνακα, τα άτομα γίνονται μεγαλύτερα, με τα περισσότερα ηλεκτρόνια να βρίσκονται σε μεγαλύτερη απόσταση από τον πυρήνα. Τα ηλεκτρόνια συγκρατούνται χαλαρότερα και το άτομο είναι περισσότερο πολώσιμο, δηλαδή τα ηλεκτρόνιά του μπορούν να κινηθούν ευκολότερα ένα θετικό φορτίο, με αποτέλεσμα τη δημιουργία ισχυρότερων δεσμών στη μεταβατική κατάσταση. Η αυξανόμενη κινητικότητα των ηλεκτρονίων, ενισχύει την ικανότητα του ατόμου να σχηματίζει δεσμούς σε σχετικά μεγάλη απόσταση. Έτσι, χρησιμοποιείται καταλυτική ποσότητα ιωδιδίου του καλίου, προκειμένου το ιόν του ιωδίου να προσβάλλει την αλκυλομάδα του αλκυλοβρωμιδίου. Στη συνέχεια, το πυρηνόφιλο ιόν του καρβοξυλίου προσβάλλει τον ηλεκτρονιόφιλο άνθρακα της αλκυλομάδας του σχηματιζόμενου αλκυλοϊωδιδίου, αναγκάζοντας το ανιόν του ιωδιδίου να απομακρυνθεί (το ιωδίδιο είναι καλή αποχωρούσα ομάδα), με αποτέλεσμα να παράγονται οι επιθυμητοί εστέρες (Σχήμα 17).

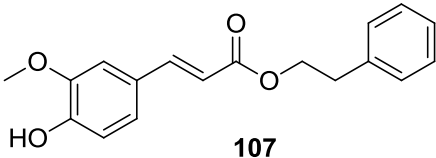
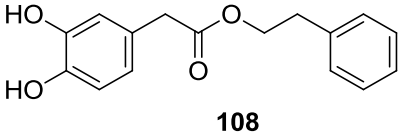
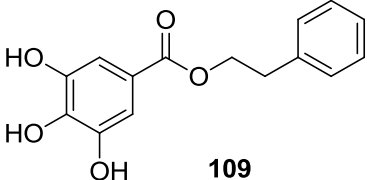
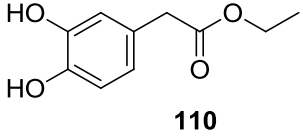
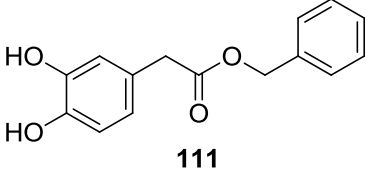
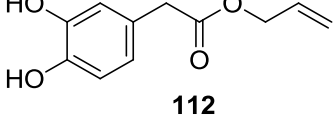
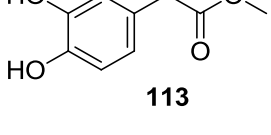
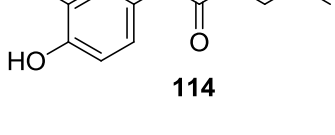


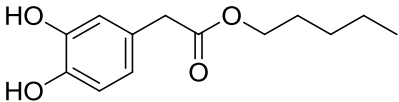
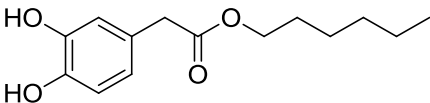
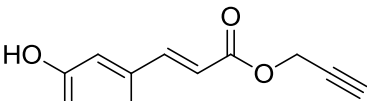
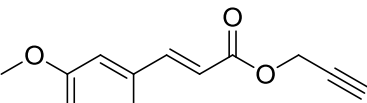
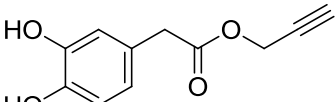
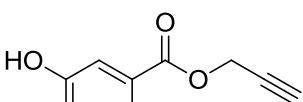
Σχήμα 17: Μηχανισμός εστεροποίησης της Μεθόδου Α.

Τα ανόργανα αντιδραστήρια απομακρύνονται από το μίγμα με εκχύλιση με διάλυμα HCl 0.5 N και κορεσμένο διάλυμα NaCl. Το προϊόν της αντίδρασης παραλαμβάνεται με χρωματογραφία στήλης, χρησιμοποιώντας κατάλληλο σύστημα. Οι αποδόσεις των εστέρων που συντέθηκαν με τη Μέθοδο Α, παρουσιάζονται στον Πίνακα 1:

Πίνακας 1: Οι εστέρες που παρασκευάστηκαν με τη Μέθοδο Α και οι αποδόσεις της.

Εστέρας	Απόδοση
 <p style="text-align: center;">106</p>	86%

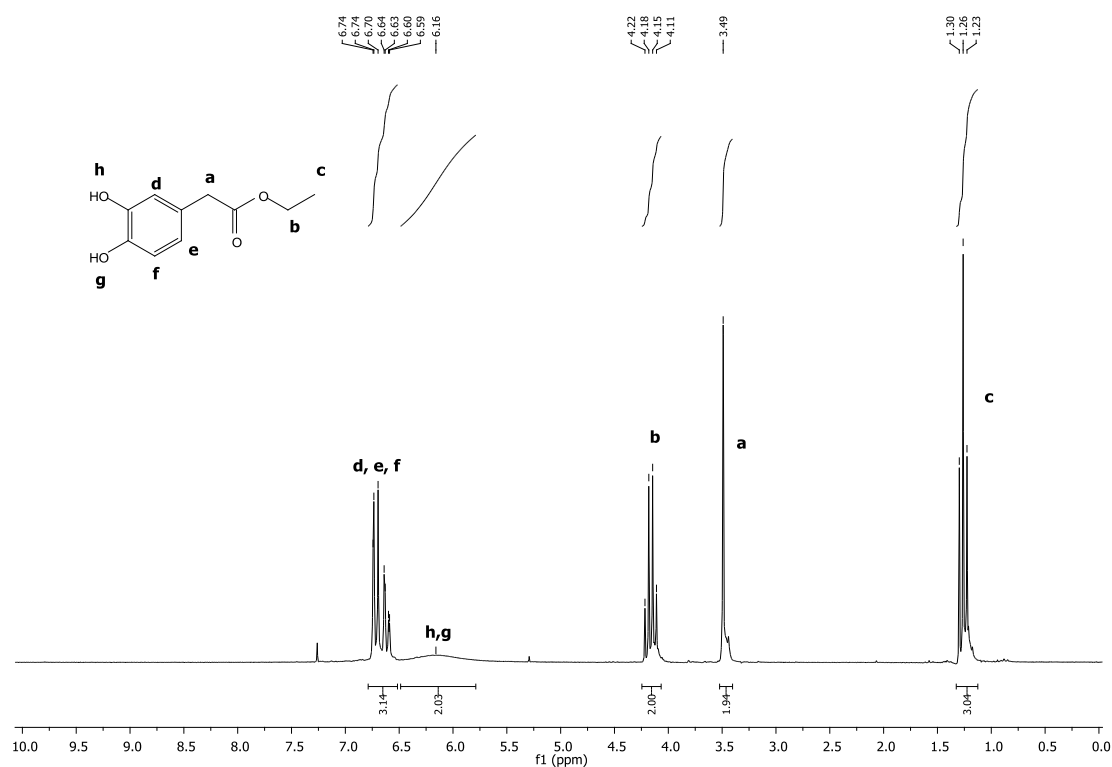
 <p>107</p>	76%
 <p>108</p>	96%
 <p>109</p>	46%
 <p>110</p>	81%
 <p>111</p>	88%
 <p>112</p>	97%
 <p>113</p>	92%
 <p>114</p>	92%

 <p style="text-align: center;">115</p>	93%
 <p style="text-align: center;">116</p>	89%
 <p style="text-align: center;">117</p>	47%
 <p style="text-align: center;">118</p>	91%
 <p style="text-align: center;">119</p>	88%
 <p style="text-align: center;">120</p>	27%

Στα επόμενα σχήματα, παρατίθενται τα φάσματα ^1H και ^{13}C πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού της ένωσης **110**, καθώς και το φάσμα μάζας.

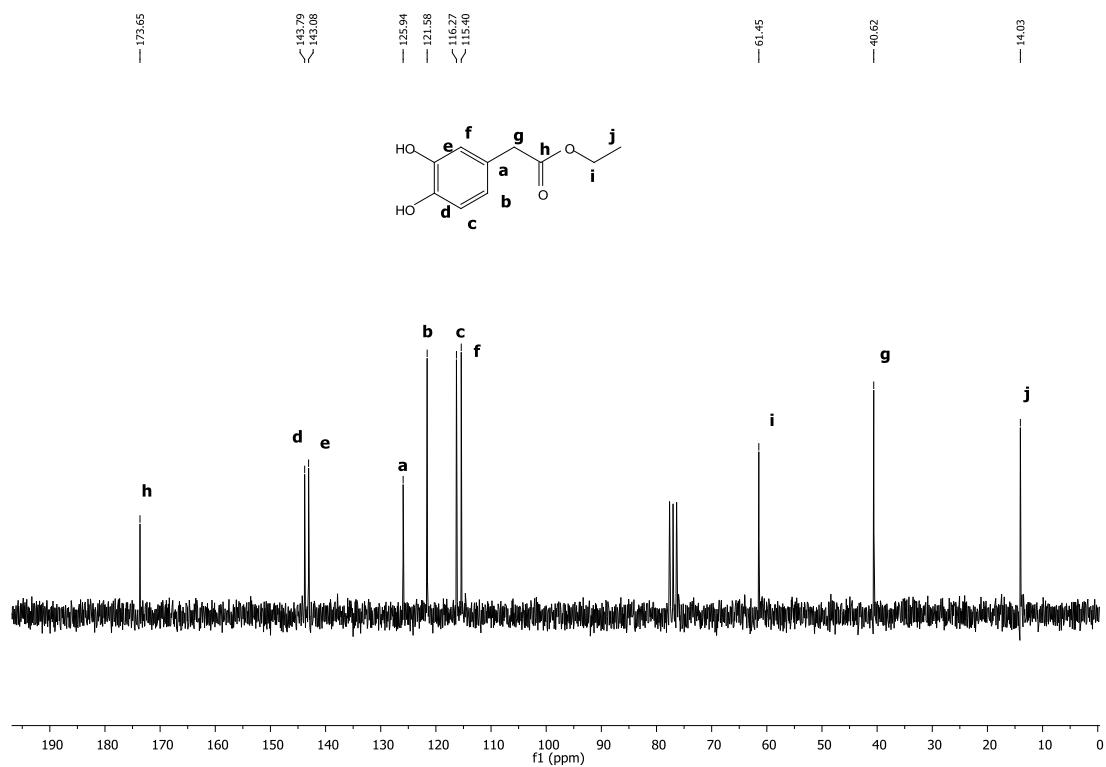
Σύμφωνα με το φάσμα ^1H NMR (Σχήμα 18), στην περιοχή των 6.74-6.59 ppm εμφανίζεται μια πολλαπλή κορυφή που οφείλεται στα 3 αρωματικά πρωτόνια (**d**, **e**, **f**), ενώ στα 6.16 ppm συντονίζονται τα 2 πρωτόνια (**h**, **g**) των φαινολικών υδροξυλίων του μορίου ως μια ευρεία κορυφή. Στα 4.16 ppm παρατηρείται το μεθυλένιο (**b**) με μια τετραπλή κορυφή και στα 3.49 ppm

συντονίζονται τα α -καρβονυλικά πρωτόνια (**a**) της ένωσης ως μια απλή κορυφή. Τέλος, το μεθύλιο (**c**) εμφανίζεται στα 1.26 ppm ως μια τριπλή κορυφή.



Σχήμα 18: Φάσμα ^1H NMR της ένωσης **110** σε δευτεριωμένο χλωροφόρμιο.

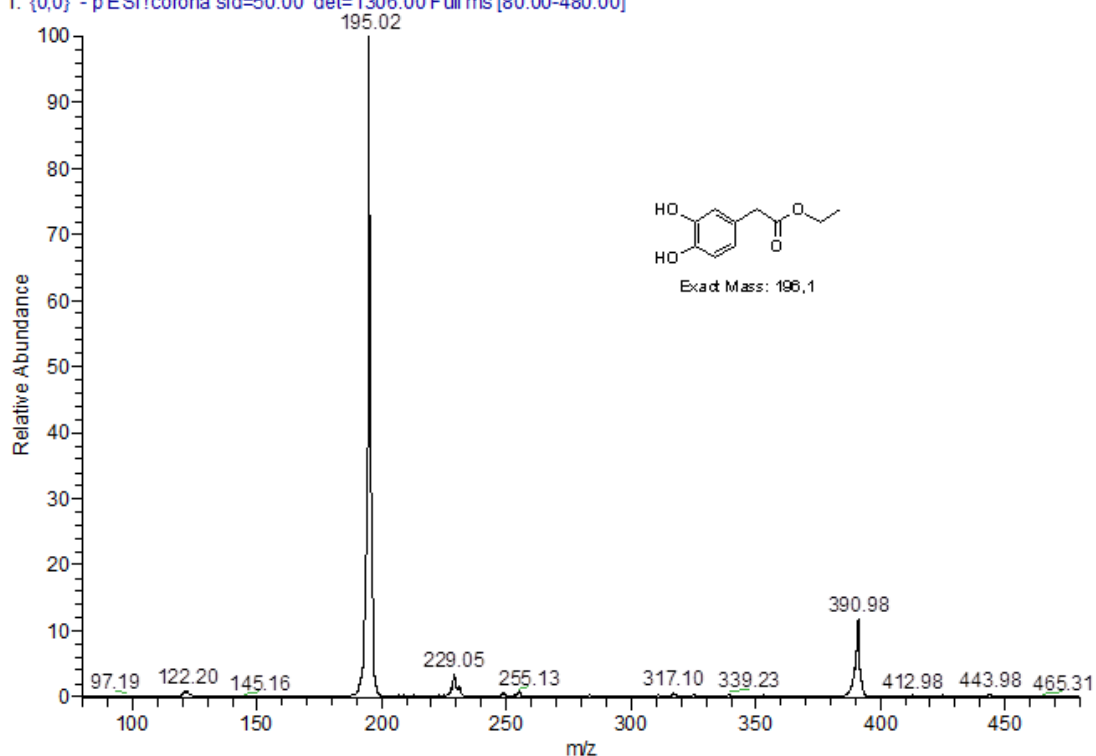
Συνεχίζοντας με το φάσμα ^{13}C NMR της ένωσης **110**, που δίνεται στο Σχήμα 19, παρατηρούμε στα 173.7 ppm της χημικές μετατοπίσεις του καρβονυλικού άνθρακα (**h**). Στα 143.8-115.4 ppm εμφανίζονται τα σήματα των ανθράκων του αρωματικού δακτυλίου, ενώ στα 61.5 ppm συντονίζεται ο άνθρακας του μεθυλενίου (**i**). Ο α -άνθρακας του καρβονυλίου (**g**) μετατοπίζονται στα 40.6 ppm και ο άνθρακας (**j**) του μεθυλίου στα 14.0 ppm.



Σχήμα 19: Φάσμα ¹³C NMR της ένωσης 110 σε δευτεριωμένο χλωροφόρμιο.

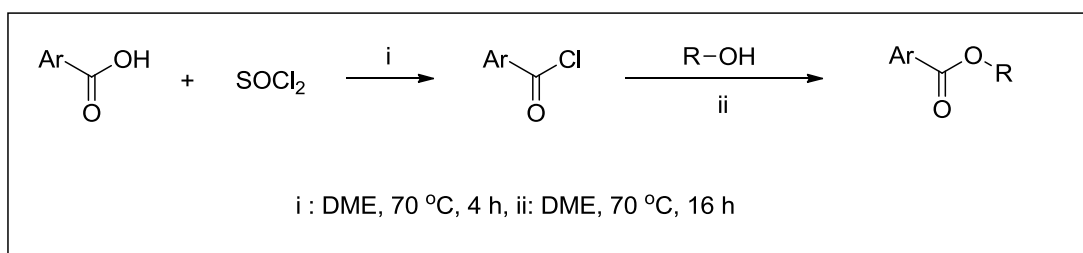
Σύμφωνα με το φάσμα μάζας (Σχήμα 20) της ένωσης **110**, παρατηρείται η βασική κορυφή που έχει $m/z = 195.02$, η οποία αντιστοιχεί στο μοριακό ιόν της ένωσης με μοριακό τύπο $C_{10}H_{11}O_4^-$ $[M-H]^-$. Επιπλέον, η κορυφή που έχει $m/z = 390.98$ αντιστοιχεί στο διμερές $C_{20}H_{23}O_8^-$ $[2M-H]^-$.

TDI-29 ESI 50 #1-19 RT: 0.00-0.61 AV: 19 NL: 1.09E6
T: {0,0} - p ESI!corona sid=50.00 det=1306.00 Full ms [80.00-480.00]



Σχήμα 20: Φάσμα μάζας της ένωσης 110.

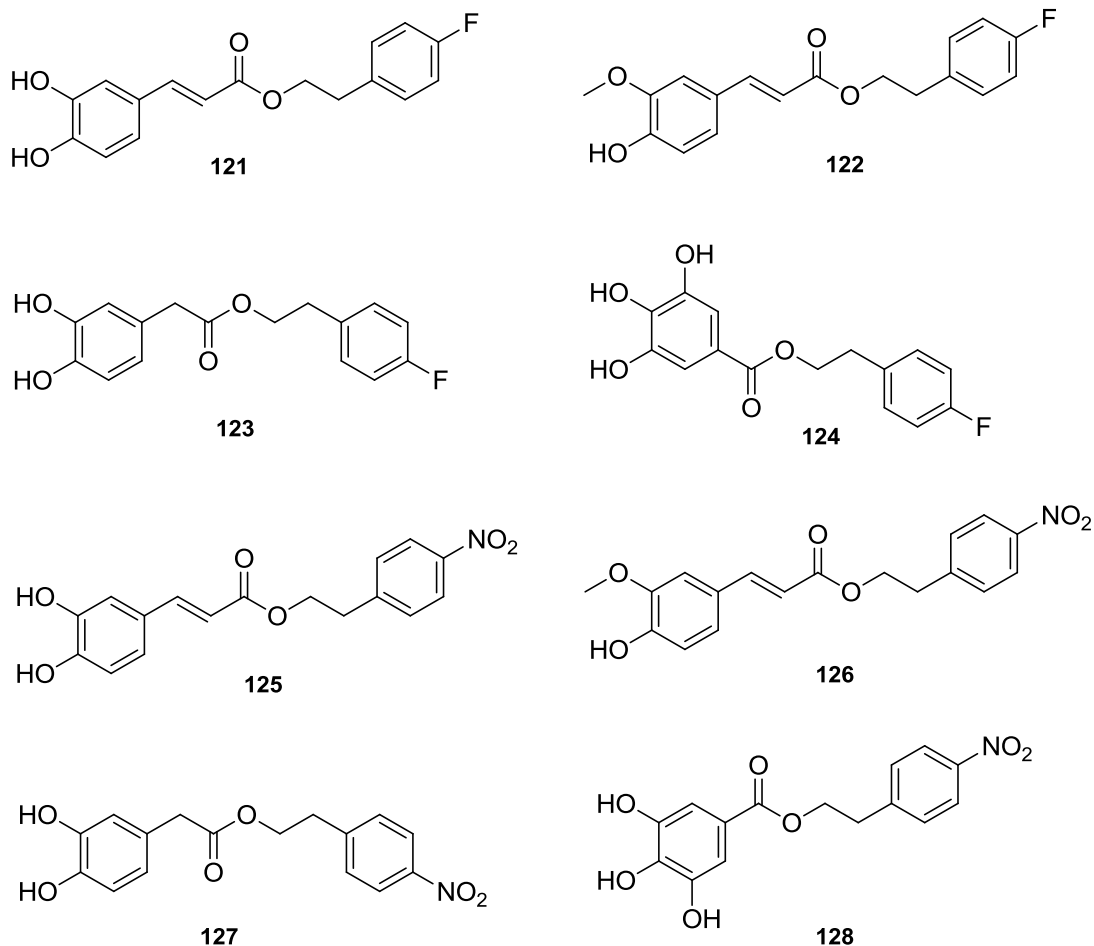
4.2 Συνθετική πορεία φαινολικών εστέρων – Μέθοδος Β



Σχήμα 21: Γενική μέθοδος παρασκευής εστέρων- Μέθοδος Β.

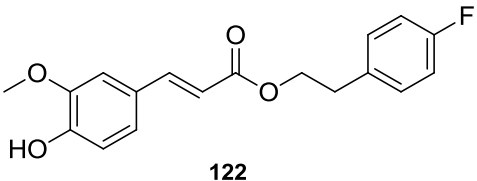
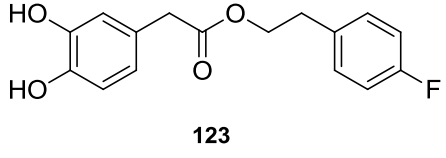
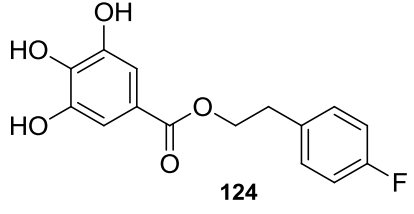
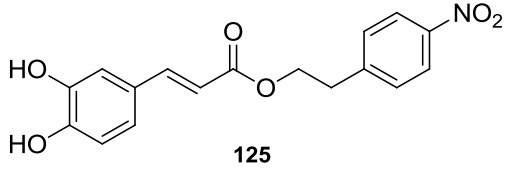
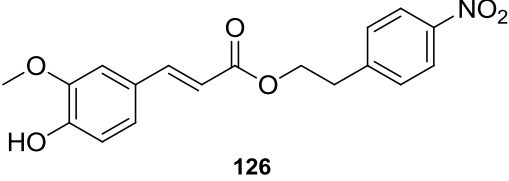
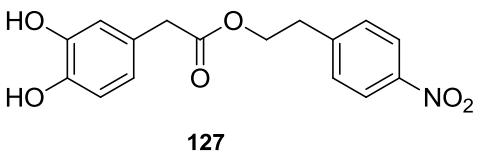
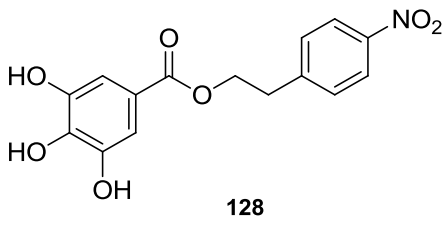
Χρησιμοποιώντας ως πρώτη ύλη τα φαινολικά οξέα (**102-105**) και το θειονυλοχλωρίδιο (SOCl_2) σε κατάλληλες συνθήκες σχηματίζονται τα ακυλοχλωρίδια, τα οποία με προσθήκη αλκοολών έδωσαν τα επιθυμητά προϊόντα, τους εστέρες.

Οι εστέρες που παρασκευάστηκαν με αυτήν τη μέθοδο (Σχήμα 21) είναι οι εξής (Εικόνα 51):



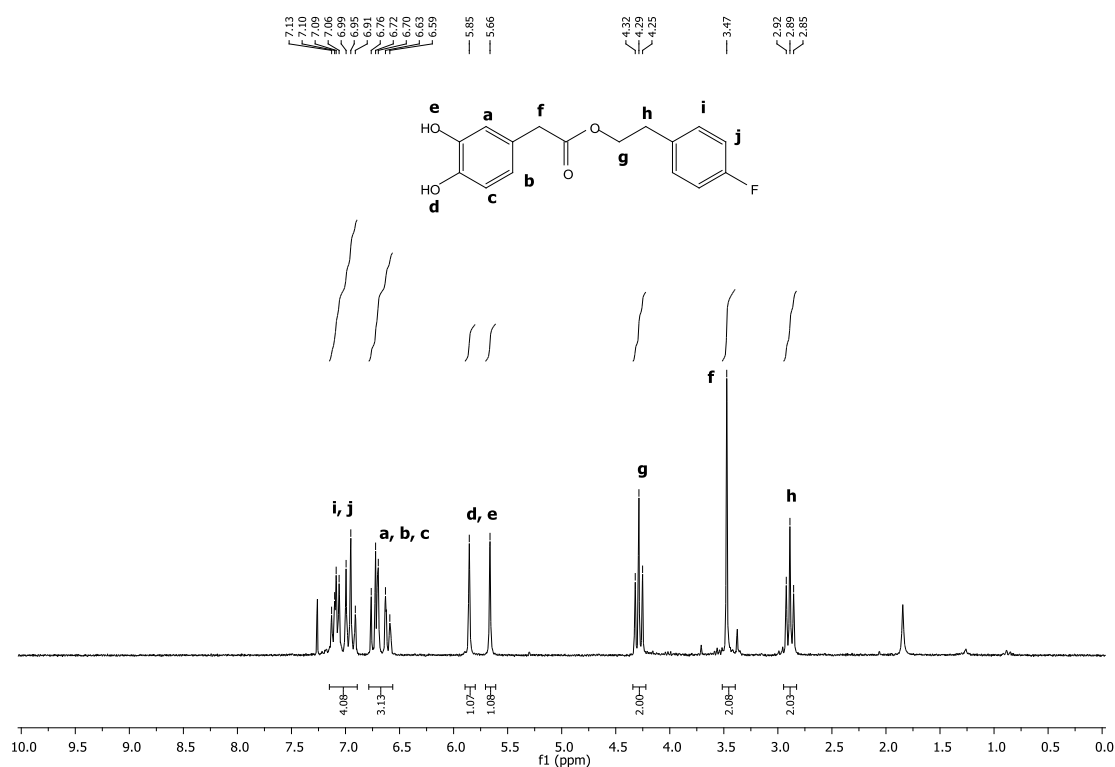
Εικόνα 51: Εστέρες που παρασκευάστηκαν με τη Μέθοδο Β.

Στον μηχανισμό (Σχήμα 22), το καρβονυλικό οξυγόνο του οξέος προσβάλλει το θείο, αντικαθιστώντας το χλωρίδιο μέσω του μηχανισμού που μοιάζει με μία εκδοχή της πυρηνόφιλης ακυλο-υποκατάστασης, με θείο. Το προϊόν είναι ένας δραστικός χλωροθειώδης ανυδρίτης. Στη συνέχεια, ο δραστικός ανυδρίτης υφίσταται πυρηνόφιλη ακυλο-υποκατάσταση από το ιόν χλωριδίου και δίνει το χλωρίδιο του οξέος. Το χλωρίδιο του οξέος αντιδρά με αλκοόλη και δίνει εστέρα, μέσω πυρηνόφιλης ακυλο-υποκατάστασης με το μηχανισμό προσθήκης-απόσπασης, όπως αναφέρθηκε προηγουμένως. Η προσβολή από την αλκοόλη στην ηλεκτρονιόφιλη καρβονυλική ομάδα, δίνει ένα τετραεδρικό ενδιάμεσο. Με απώλεια χλωριδίου και αποπρωτονίωση παράγεται ο επιθυμητός εστέρας.

 <p style="text-align: center;">122</p>	31%
 <p style="text-align: center;">123</p>	30%
 <p style="text-align: center;">124</p>	46%
 <p style="text-align: center;">125</p>	48%
 <p style="text-align: center;">126</p>	30%
 <p style="text-align: center;">127</p>	41%
 <p style="text-align: center;">128</p>	46%

Στα επόμενα σχήματα, παρατίθενται τα φάσματα ^1H και ^{13}C πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού της ένωσης **123**.

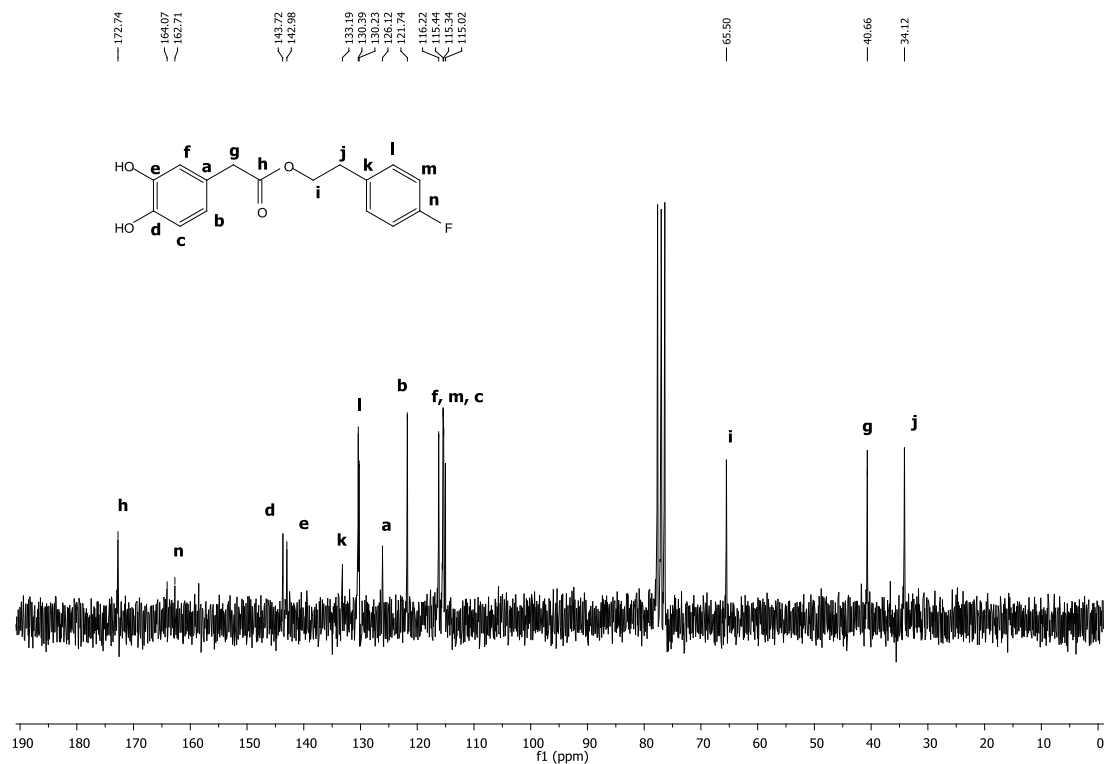
Σύμφωνα με το φάσμα ^1H NMR της ένωσης **123** (Σχήμα 23), στην περιοχή των 7.13-6.59 ppm εμφανίζεται μια πολλαπλή κορυφή που οφείλεται στα 7 αρωματικά πρωτόνια (**a**, **b**, **c**, **i**, **j**) των δύο βενζολικών δακτυλίων. Στα 5.85 και στα 5.66 ppm συντονίζονται τα 2 πρωτόνια (**d**, **e**) των φαινολικών υδροξυλίων του μορίου ως δύο οξείες κορυφές. Στα 4.30 ppm παρατηρείται το μεθυλένιο (**g**) με μια τριπλή κορυφή και στα 3.47 ppm συντονίζονται τα α -καρβονυλικά πρωτόνια (**f**) της ένωσης ως μια απλή κορυφή. Τέλος, το άλλο μεθυλένιο (**h**) εμφανίζεται στα 2.90 ppm ως μια τριπλή κορυφή.



Σχήμα 23: Φάσμα ^1H NMR της ένωσης **123 σε δευτεριωμένο χλωροφόρμιο.**

Συνεχίζοντας με το φάσμα ^{13}C NMR της ένωσης **123**, που δίνεται στο Σχήμα 24, παρατηρούμε στα 172.7 ppm της χημικές μετατοπίσεις του καρβονυλικού άνθρακα (**h**). Στα 164.1-115.0 ppm εμφανίζονται τα σήματα των ανθράκων των αρωματικών δακτυλίων (**n**, **d**, **e**, **k**, **l**, **a**, **b**, **f**, **m**, **c**), ενώ στα 65.5 ppm συντονίζεται ο άνθρακας του μεθυλενίου (**i**). Ο α -άνθρακας του καρβονυλίου

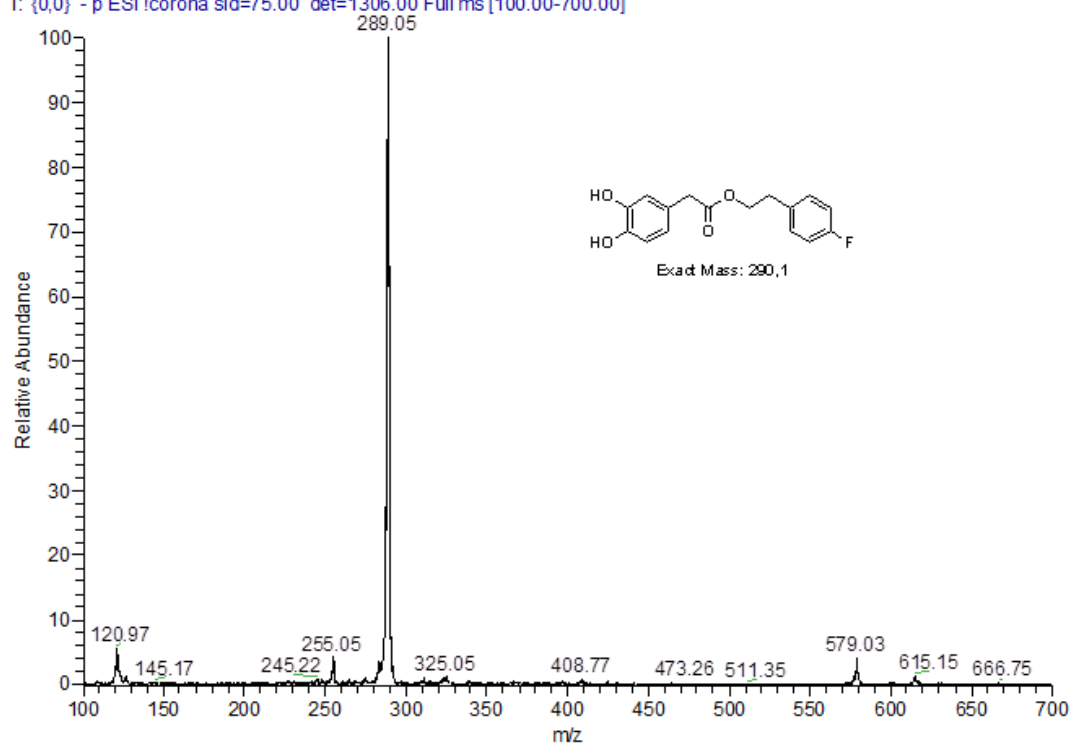
(g) μετατοπίζονται στα 40.7 ppm και ο άνθρακας (j) του μεθυλενίου στα 34.1 ppm.



Σχήμα 24: Φάσμα ^{13}C NMR της ένωσης 123 σε δευτεριωμένο χλωροφόρμιο.

Σύμφωνα με το φάσμα μάζας (Σχήμα 25) της ένωσης **123**, παρατηρείται η βασική κορυφή που έχει $m/z = 289.05$, η οποία αντιστοιχεί στο μοριακό ιόν της ένωσης με μοριακό τύπο $\text{C}_{16}\text{H}_{14}\text{FO}_4^-$ $[\text{M}-\text{H}]^-$.

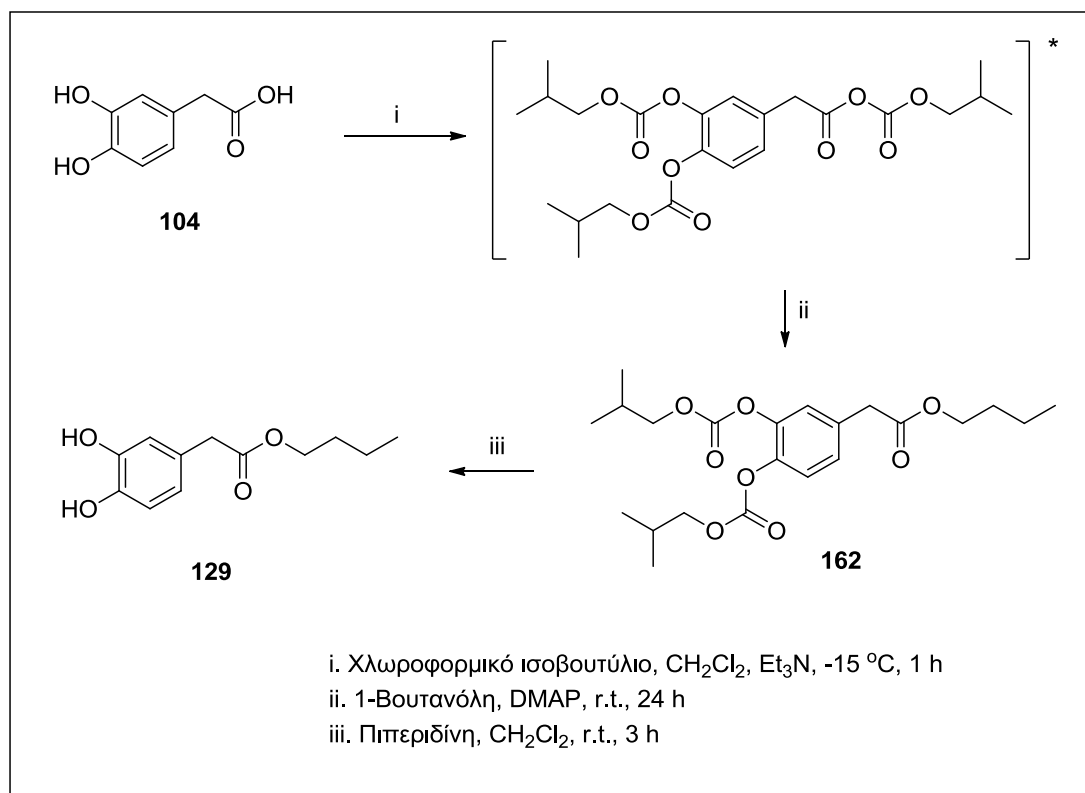
TDI-18 ESI 75 #1-14 RT: 0.00-0.44 AV: 14 NL: 5.58E5
T: {0,0} - p ESI Icorona sid=75.00 det=1306.00 Full ms [100.00-700.00]



Σχήμα 25: Φάσμα μάζας της ένωσης 123.

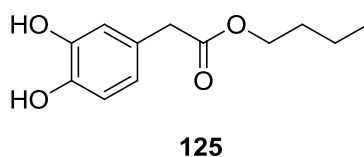
4.3 Συνθετική πορεία φαινολικών εστέρων – Μέθοδος Γ

Μια εναλλακτική πορεία για τη σύνθεση εστέρων που δοκιμάστηκε, ήταν η μέθοδος των μικτών ανυδριτών.



Σχήμα 26: Γενική μέθοδος σύνθεσης εστέρων- Μέθοδος Γ.

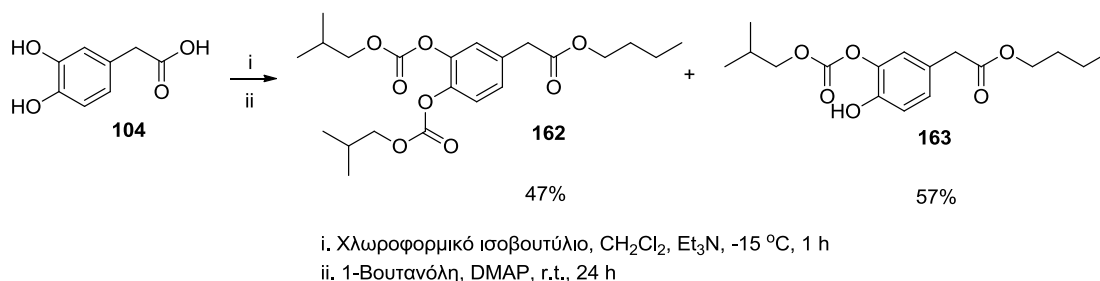
Χρησιμοποιώντας ως πρώτη ύλη το 3,4-διυδροξυφαινουλοξικό οξύ (**104**) και το χλωροφορμικό ισοβουτύλιο, πραγματοποιείται μια αντίδραση δημιουργίας ένας μικτού ανυδρίτη, όπου με προσθήκη 1-βουτανόλης παράγεται ο επιθυμητός εστέρας. Παρατηρήθηκε όμως ο σχηματισμός του εστέρα που έχει προστατευμένα τα δύο φαινολικά υδροξύλια (**162**). Το προϊόν αυτό ταυτοποιήθηκε με φασματοσκοπία NMR και MS. Με χρήση πιπεριδίνης παραλαμβάνεται ο επιθυμητός εστέρας (**124**). Ο εστέρας που παρασκευάστηκε με αυτή τη μέθοδο (Σχήμα 26) είναι ο εξής (Εικόνα 52):



Εικόνα 52: Εστέρας που παρασκευάστηκε με τη Μέθοδο Γ.

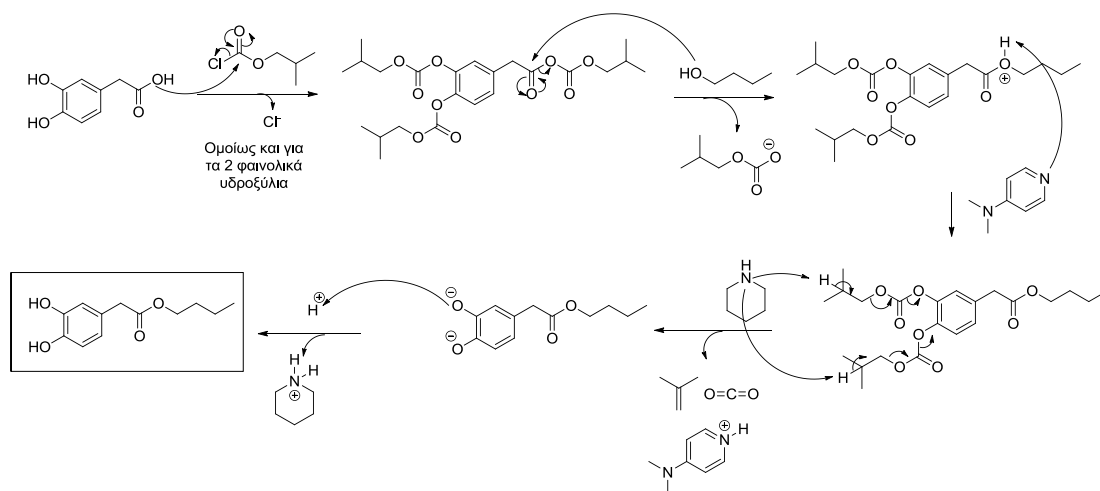
Το χλωροφορμικό ισοβουτύλιο είναι ένα άχρωμο υγρό, αδιάλυτο στο νερό. Είναι πολύ διαβρωτικό και πολύ τοξικό.

Κατά την αντίδραση, εκτός από την ένωση **162**, παρήχθη και η ένωση **163**. Όλοι οι εστέρες (**129**, **162**, **163**) απομονώθηκαν και χαρακτηρίστηκαν (Σχήμα 27).



Σχήμα 27: Σύνθεση εστέρα με τη μέθοδο των μικτών ανυδριτών.

Σύμφωνα με το μηχανισμό της αντίδρασης (Σχήμα 28), αρχικά πραγματοποιείται η προσβολή στο καρβονύλιο του χλωροφορμικού ισοβουτυλίου, οπότε και προστατεύονται όλες οι ομάδες. Στη συνέχεια, το οξυγόνο της αλκοόλης προσβάλλει το καρβονύλιο, με αποτέλεσμα να απομακρύνεται η προστασία του καρβοξυλικού οξέος. Έπειτα, η 4-διμεθυλαμινο πυριδίνη αποσπά το πρωτόνιο. Με προσθήκη πιπεριδίνης στη συνέχεια, πραγματοποιείται μια β-απόσπαση του υδρογόνου, με αποτέλεσμα να συντίθεται ο εστέρας με αποπρωτονιωμένες τις δύο υδροξυλομάδες. Με όξινη κατεργασία, πρωτονιώνονται και σχηματίζεται ο επιθυμητός εστέρας.



Σχήμα 28: Μηχανισμός σύνθεσης εστέρων της Μεθόδου Γ.

Τα ανόργανα αντιδραστήρια, απομακρύνονται από το μίγμα με εκχύλιση με διάλυμα HCl 0.5 N. Το προϊόν της αντίδρασης παραλαμβάνεται με χρωματογραφία στήλης, χρησιμοποιώντας κατάλληλο σύστημα έκλουσης. Η απόδοση του εστέρα που συντέθηκε με τη Μέθοδο Γ, παρουσιάζεται στον Πίνακα 3:

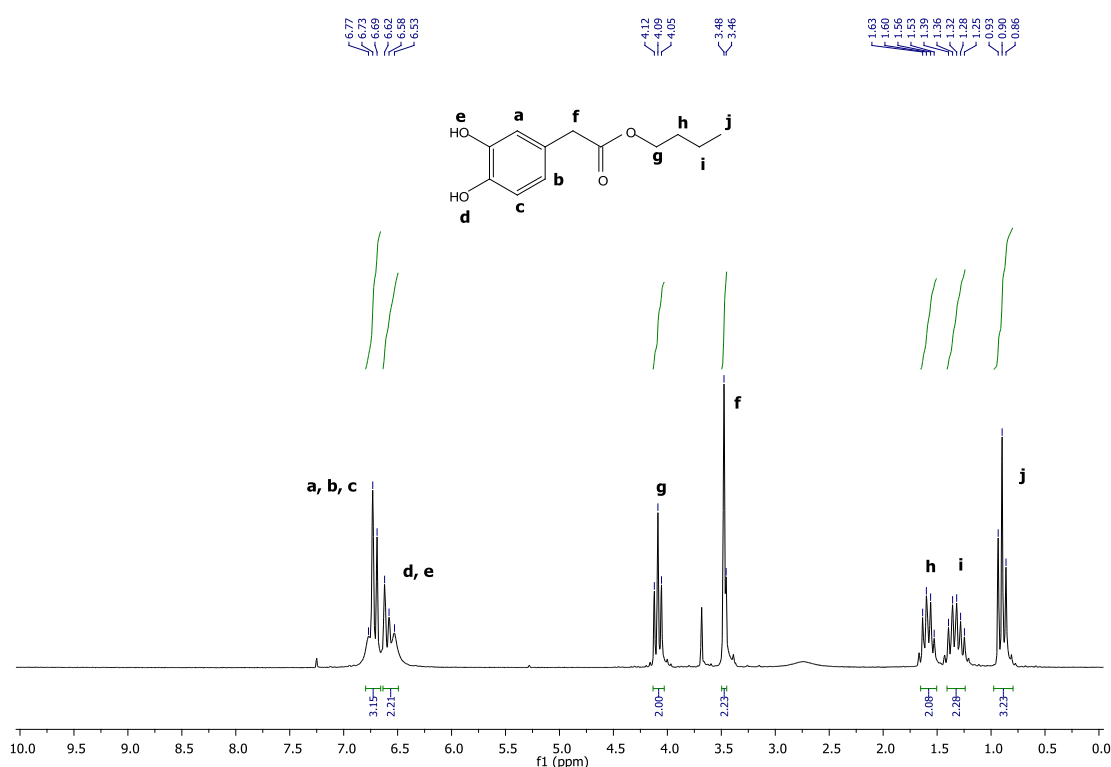
Πίνακας 3: Ο εστέρας που παρασκευάστηκε με τη Μέθοδο Γ και η απόδοσή του.

Εστέρας	Απόδοση
<p style="text-align: center;">129</p>	50%

Στα επόμενα σχήματα, παρατίθενται τα φάσματα ^1H και ^{13}C πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού της ένωσης **129**.

Σύμφωνα με το φάσμα ^1H NMR της ένωσης **129** (Σχήμα 29), στα 6.74 ppm εμφανίζονται μια πολλαπλή κορυφή που αντιστοιχεί στα τρία αρωματικά πρωτόνια (**a**, **b**, **c**). Στην περιοχή των 6.62-6.53 ppm εμφανίζεται μια πολλαπλή κορυφή που αντιστοιχεί στα δύο πρωτόνια των φαινολικών

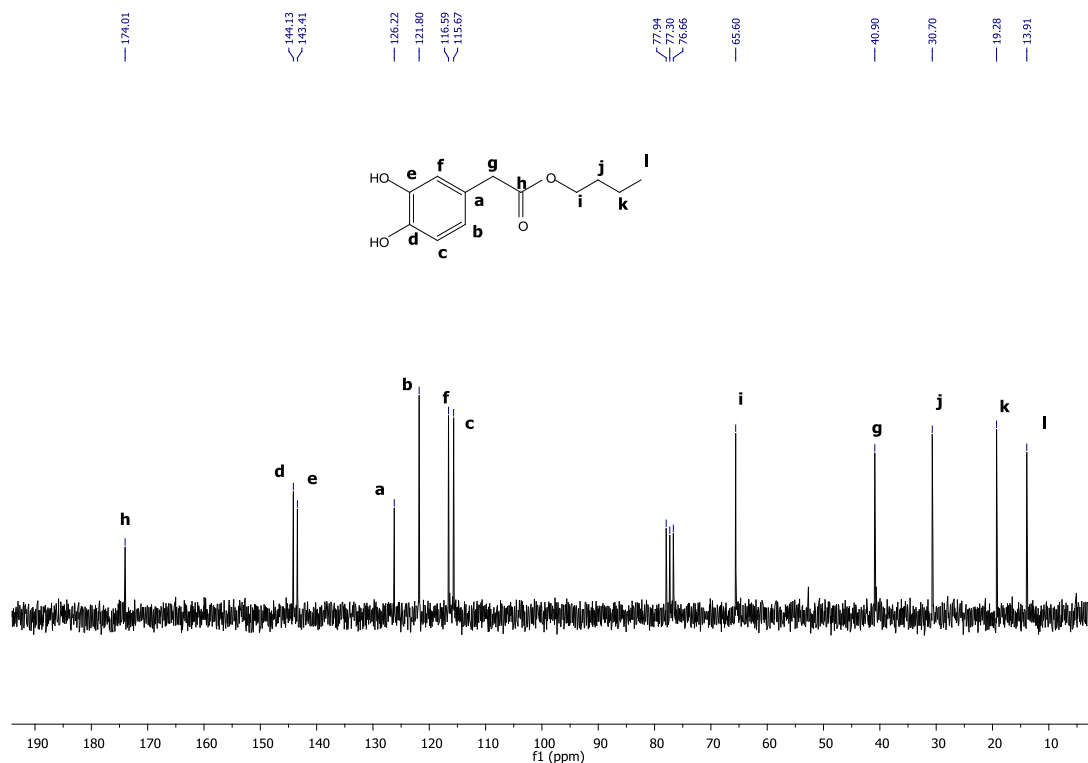
υδροξυλίων (**d**, **e**). Στην περιοχή 4.12-4.05 ppm εμφανίζεται μια τριπλή κορυφή που αντιστοιχεί στα δύο πρωτόνια του μεθυλενίου (**g**). Στα 3.48 ppm παρατηρούνται τα α -καρβονυλικά πρωτόνια (**f**) ως μια απλή κορυφή. Στην περιοχή 1.63-1.53 ppm εμφανίζεται μια πολλαπλή κορυφή που αντιστοιχεί στα 2 πρωτόνια του μεθυλενίου (**h**), ενώ στην περιοχή 1.39-1.25 ppm εμφανίζεται μια πολλαπλή κορυφή που αντιστοιχεί στα 2 πρωτόνια του μεθυλενίου (**i**). Τέλος, στα 0.91 ppm εμφανίζεται μια τριπλή κορυφή που αντιστοιχεί στα 3 πρωτόνια του μεθυλίου (**j**).



Σχήμα 29: Φάσμα ^1H NMR της ένωσης 129 σε δευτεριωμένο διμεθυλοσουλφοξείδιο.

Συνεχίζοντας με το φάσμα ^{13}C NMR της ίδιας ένωσης, που δίνεται στο Σχήμα 30, παρατηρούμε στα 174.0 ppm τη χημική μετατόπιση του καρβονυλικού άνθρακα (**h**). Στα 144.1 και στα 143.4 ppm εμφανίζονται οι φαινολικοί άνθρακες, ενώ Στην περιοχή 126.2-115.7 εμφανίζονται οι τέσσερις άνθρακες του αρωματικού δακτυλίου (**a**, **b**, **c**, **f**). Ο άνθρακας του ενός μεθυλενίου (**i**) μετατοπίζεται στα 65.6 ppm, ο άνθρακας του ενός μεθυλενίου (**g**) μετατοπίζεται στα 40.9 ppm, ο άνθρακας του ενός μεθυλενίου (**j**)

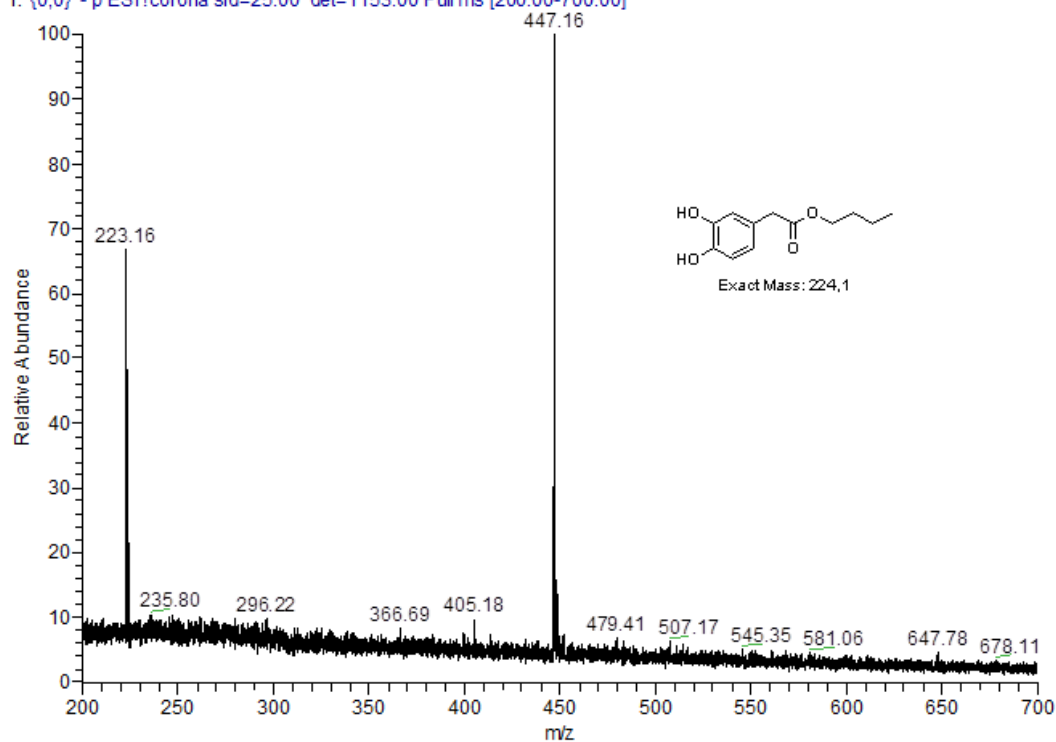
μετατοπίζεται στα 30.7 ppm, ο άνθρακας του ενός μεθυλενίου (**k**) μετατοπίζεται στα 19.3 ppm, ο άνθρακας του μεθυλίου (**l**) στα 13.9 ppm.



Σχήμα 30: Φάσμα ^{13}C NMR της ένωσης **129** σε δευτεριωμένο διμεθυλοσουλφοξείδιο.

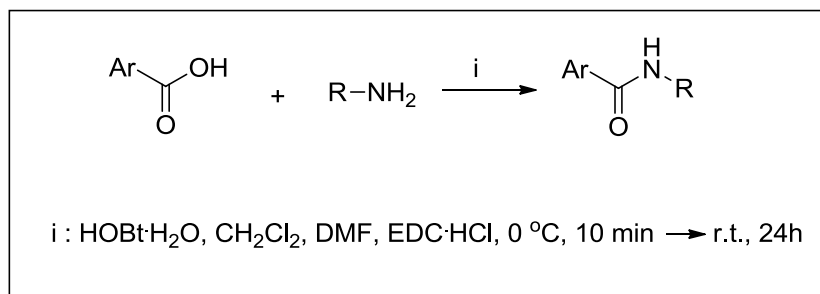
Σύμφωνα με το φάσμα μάζας (Σχήμα 31) της ένωσης **129**, παρατηρείται η κορυφή που έχει $m/z = 223.16$, η οποία αντιστοιχεί στο μοριακό ιόν της ένωσης με μοριακό τύπο $\text{C}_{12}\text{H}_{15}\text{O}_4^-$ $[\text{M}-\text{H}]^-$. Επιπλέον, η βασική κορυφή που έχει $m/z = 447.16$ αντιστοιχεί στο διμερές $\text{C}_{24}\text{H}_{31}\text{O}_8^-$ $[2\text{M}-\text{H}]^-$.

KPI105 ESI 25 #1-6 RT: 0.00-0.17 AV: 6 NL: 8.55E3
T: {0,0} - p ESI!corona sid=25.00 det=1153.00 Full ms [200.00-700.00]



Σχήμα 31: Φάσμα μάζας της ένωσης 129.

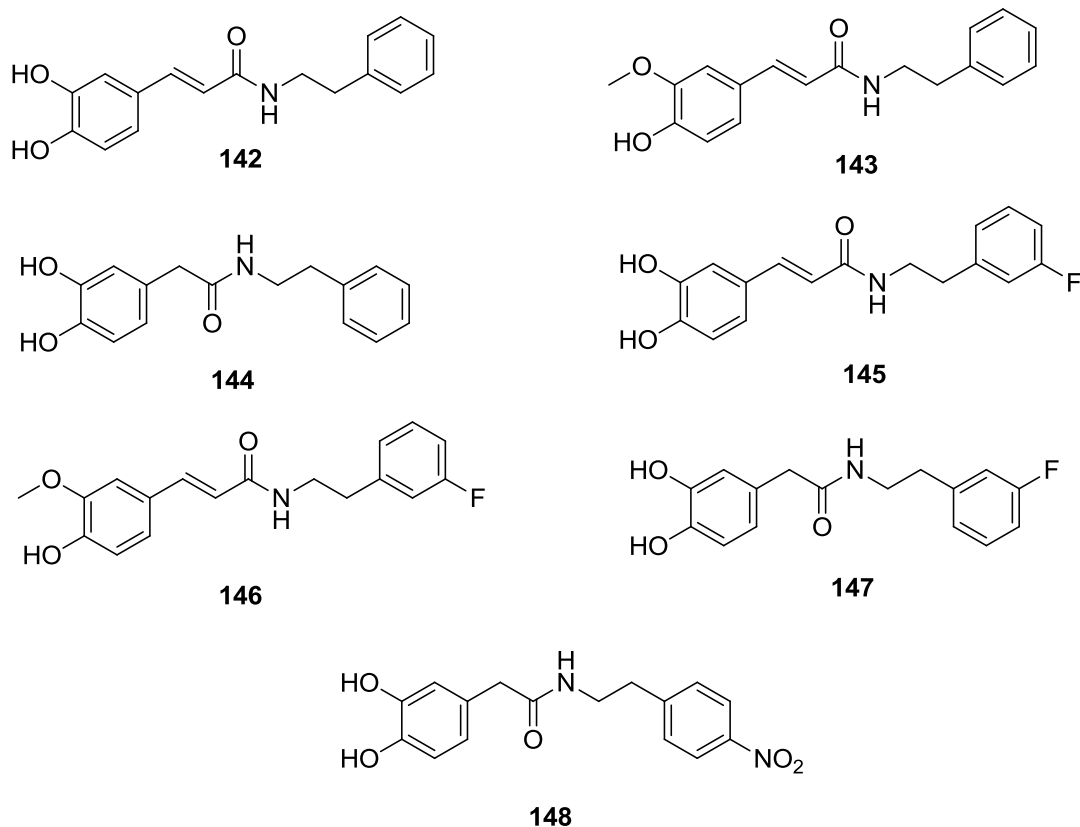
4.4 Συνθετική πορεία φαινολικών αμιδίων – Μέθοδος Δ



Σχήμα 32: Γενική μέθοδος σύνθεσης αμιδίων- Μέθοδος Δ.

Χρησιμοποιώντας ως πρώτη ύλη τα φαινολικά οξέα (**102-105**) και αμίνες, πραγματοποιείται μια αντίδραση σύζευξης με χρήση του EDC·HCl ως συζευκτικό αντιδραστήριο, παρουσία του 1-υδροξυβενζοτριζολίου,

HOBT·H₂O, προς σχηματισμό αμιδίων. Τα αμίδια που παρασκευάστηκαν με αυτήν τη μέθοδο (Σχήμα 32) είναι τα εξής (Εικόνα 53):

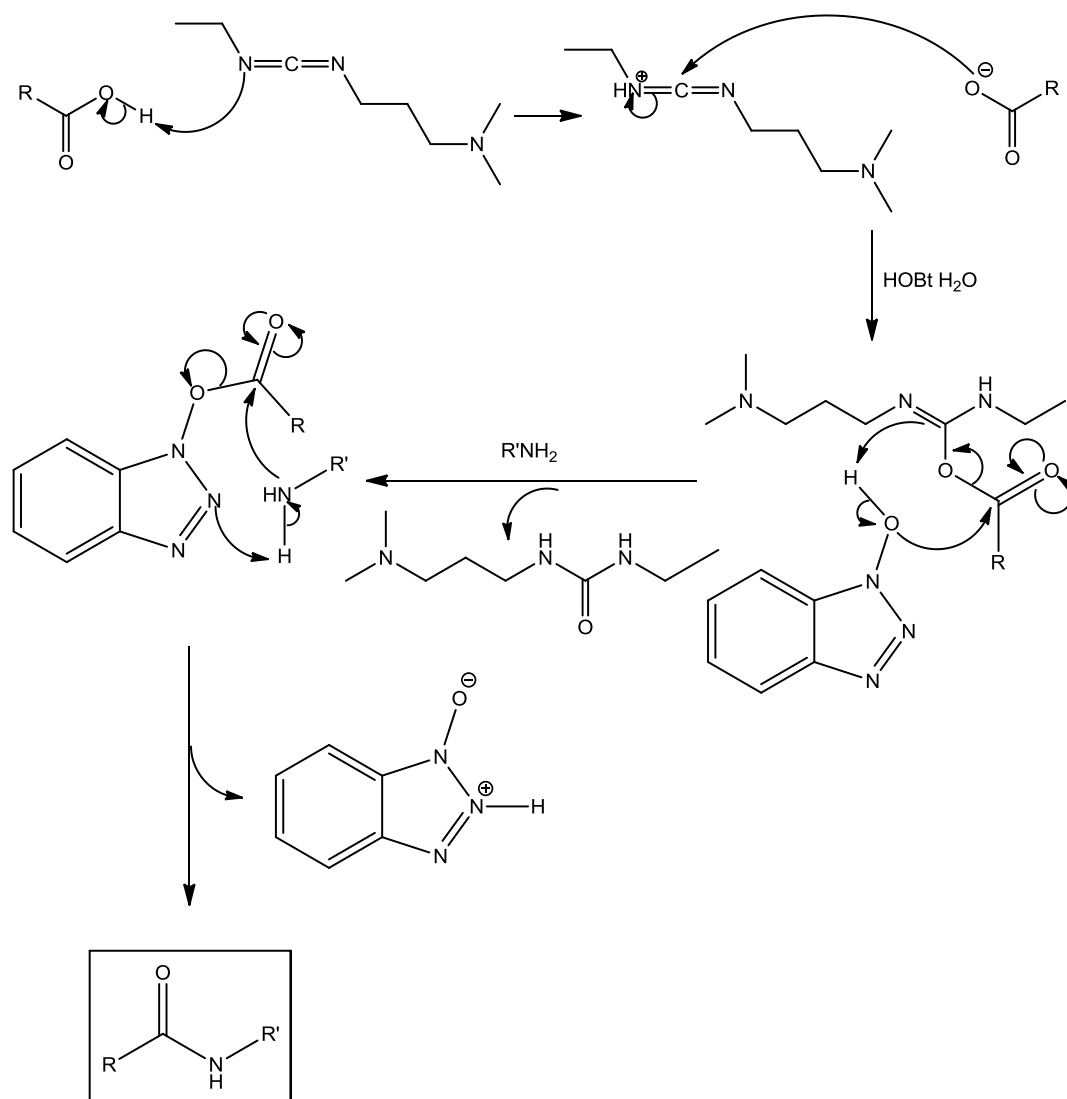


Εικόνα 53: Αμίδια που παρασκευάστηκαν με τη Μέθοδο Δ.

Το HOBT είναι ένα αντιδραστήριο που προτιμάται κατά κύριο λόγο σε αντιδράσεις σχηματισμού αμιδικού δεσμού, καθώς προσφέρει στην αντίδραση μεγάλη ταχύτητα, πολύ υψηλές αποδόσεις και ελαχιστοποιεί τη ρακεμίσωση. Συνήθως, χρησιμοποιείται ένυδρο HOBT, γιατί το άνυδρο είναι εκρηκτικό. Επίσης, απομακρύνεται εύκολα από το μίγμα της αντίδρασης με εκχύλιση με όξινο διάλυμα. Όπως φαίνεται και στο μηχανισμό (Σχήμα 35), το HOBT·H₂O χρησιμοποιείται για την σύνθεση ενεργοποιημένων εστέρων, οι οποίοι είναι αδιάλυτοι και αντιδρούν με αμίνες σε θερμοκρασία περιβάλλοντος για να παραχθούν αμίδια.

Ως αντιδραστήριο σύζευξης χρησιμοποιείται το EDC·HCl, το οποίο είναι υδατοδιαλυτό. Το γεγονός αυτό, καθιστά εξαιρετικά εύκολη την απομάκρυνση τόσο του ίδιου, όσο και της παραγόμενης ουρίας που προκύπτει από την αντίδραση (Σχήμα 35). Γενικά, χρησιμοποιείται ως παράγοντας ενεργοποίησης του καρβοξυλίου για σύζευξη με πρωτοταγείς αμίνες προς σχηματισμό αμιδίων. Η απομάκρυνση γίνεται εφικτή 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.

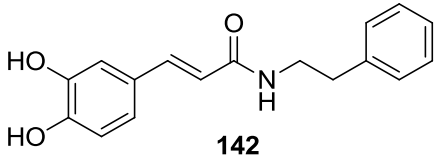
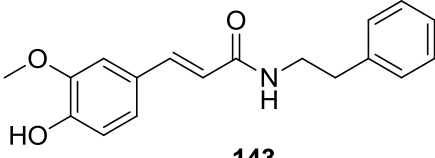
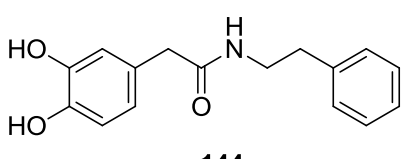
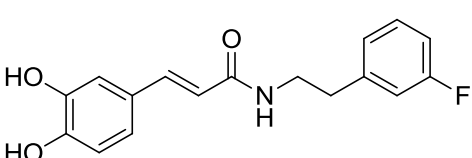
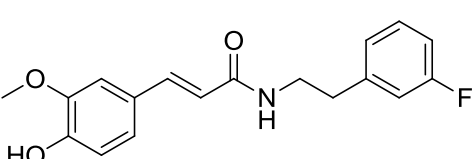
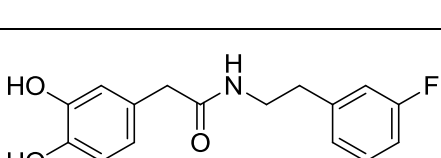
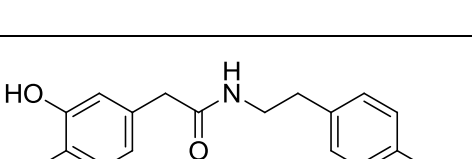
Ο μηχανισμός της αντίδρασης περιλαμβάνει την απόσπαση αρχικά του υδρογόνου του καρβοξυλίου του αντιδρώντος οξέος από το EDC·HCl, για να μπορέσει στην συνέχεια το HOBT·H₂O να σχηματίσει τον ενεργό εστέρα που θα αντιδράσει με την αμίνη (Σχήμα 33), για να σχηματιστεί το επιθυμητό αμίδιο. Η κινητήρια δύναμη αυτών των αντιδράσεων είναι ο σχηματισμός του θερμοδυναμικά πολύ σταθερού μορίου της N,N'-διαλκυλουρίας που παράγεται σαν παραπροϊόν.



Σχήμα 33: Μηχανισμός σύνθεσης αμιδίων της Μεθόδου Δ.

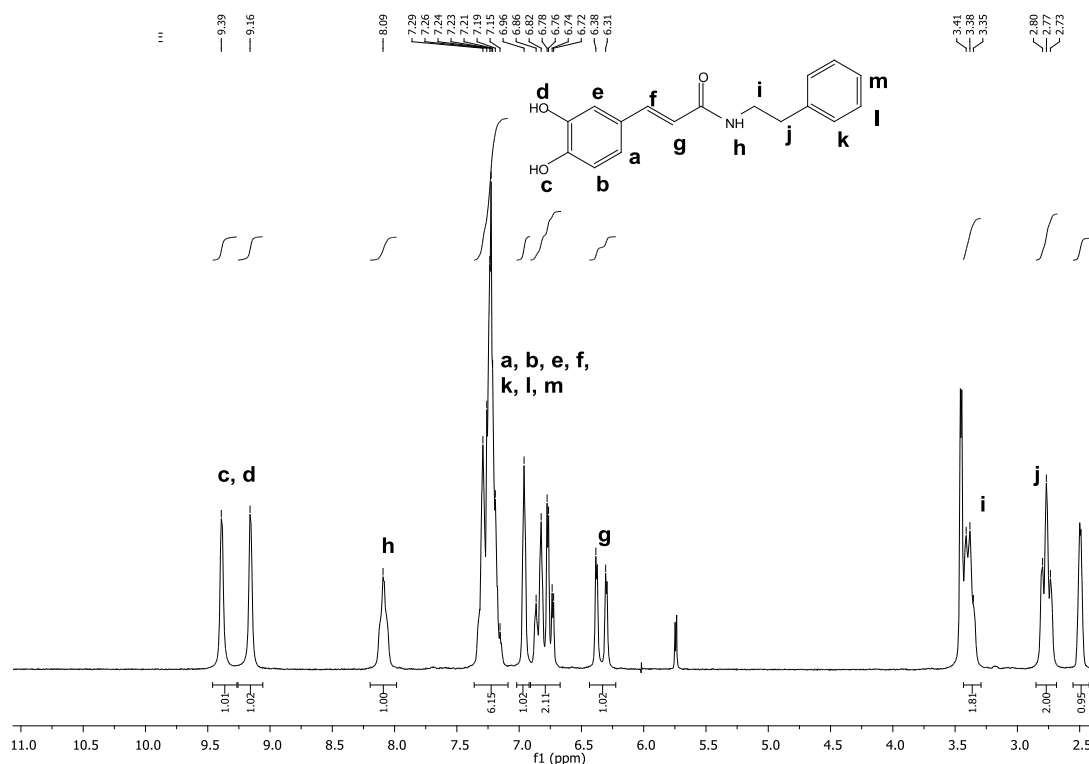
Τα ανόργανα αντιδραστήρια, απομακρύνονται από το μίγμα με εκχύλιση με διάλυμα HCl $0.5\ N$, H_2O και κορεσμένο διάλυμα $NaCl$. Το προϊόν της αντίδρασης παραλαμβάνεται με χρωματογραφία στήλης, χρησιμοποιώντας κατάλληλο σύστημα έκλουσης. Οι αποδόσεις των αμιδίων που συντέθηκαν με τη Μέθοδο Δ, παρουσιάζονται στον Πίνακα 4:

Πίνακας 4: Τα αμίδια που παρασκευάστηκαν με τη Μέθοδο Δ και οι αποδόσεις τους.

Αμίδιο	Απόδοση
 142	78%
 143	94%
 144	75%
 145	64%
 146	93%
 147	60%
 148	76%

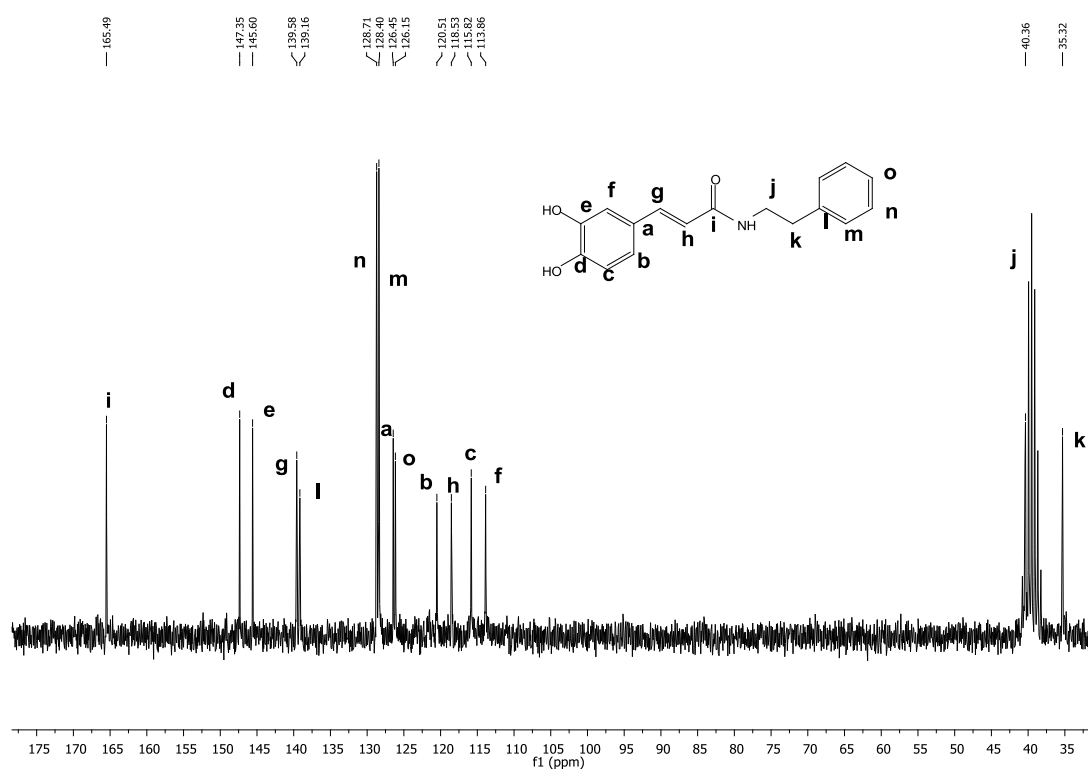
Στα επόμενα σχήματα, παρατίθενται τα φάσματα ^1H και ^{13}C πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού της ένωσης **142**.

Σύμφωνα με το φάσμα ^1H NMR της ένωσης **142** (Σχήμα 34), στα 9.39 ppm και στα 9.16 ppm εμφανίζονται τα 2 πρωτόνια (**c**, **d**) των φαινολικών υδροξυλίων του μορίου ως δύο οξείες κορυφές, ενώ στα 8.09 ppm εμφανίζεται το αμιδικό πρωτόνιο (**h**). Στην περιοχή των 7.29-6.72 ppm εμφανίζονται δύο πολλαπλές κορυφές και μία οξεία κορυφή που οφείλονται στα 8 αρωματικά πρωτόνια (**a**, **b**, **e**, **k**, **l**, **m**) των δύο αρωματικών δακτυλίων, καθώς και στο 1 β -καρβονυλικό πρωτόνιο (**f**) του διπλού δεσμού. Στα 6.34 ppm παρατηρείται το α -καρβονυλικό πρωτόνιο του άλλου άνθρακα που συμμετέχει στο διπλό δεσμό (**g**) με μια διπλή κορυφή και στα 3.41-3.35 ppm συντονίζονται τα δύο πρωτόνια του μεθυλενίου (**i**) της ένωσης ως μια τριπλή κορυφή. Τέλος, τα δύο πρωτόνια του άλλου μεθυλενίου (**j**) της ένωσης εμφανίζονται στα 2.77 ppm ως μια τριπλή κορυφή.



Σχήμα 34: Φάσμα ^1H NMR της ένωσης **142** σε δευτεριωμένο διμεθυλοσουλφοξείδιο.

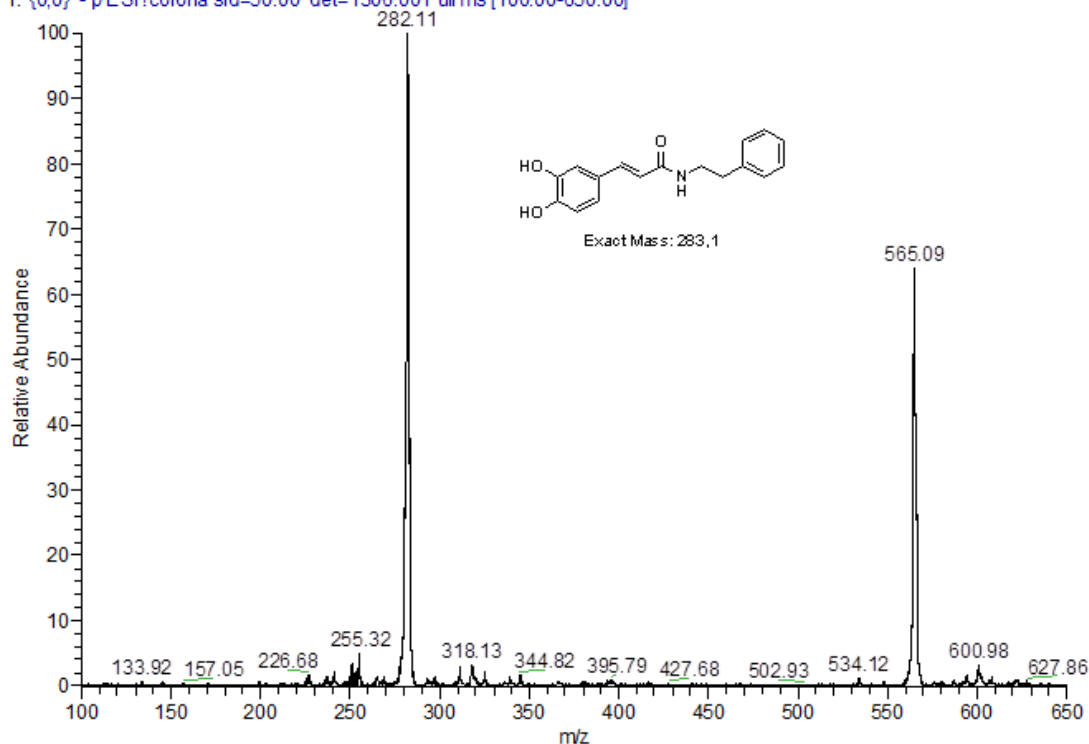
Συνεχίζοντας με το φάσμα ^{13}C NMR της ίδιας ένωσης, που δίνεται στο Σχήμα 35, παρατηρούμε στα 165.5 ppm τις χημικές μετατοπίσεις του καρβονυλικού άνθρακα (i). Στην περιοχή 147.4-113.9 εμφανίζονται οι δέκα άνθρακες των αρωματικών δακτυλίων, καθώς και οι δύο άνθρακες του διπλού δεσμού (a, b, c, d, e, f, g, h, l, m, n, o). Ο άνθρακας του ενός μεθυλενίου (j) μετατοπίζεται στα 40.4 ppm και ο άνθρακας του άλλου μεθυλενίου (k) στα 35.3 ppm.



Σχήμα 35: Φάσμα ^{13}C NMR της ένωσης 142 σε δευτεριωμένο διμεθυλοσουλφοξείδιο.

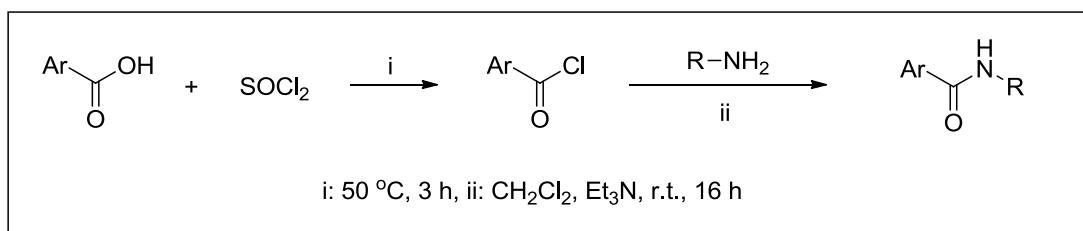
Σύμφωνα με το φάσμα μάζας (Σχήμα 36) της ένωσης **142**, παρατηρείται η βασική κορυφή που έχει $m/z = 282.11$, η οποία αντιστοιχεί στο μοριακό ιόν της ένωσης με μοριακό τύπο $\text{C}_{17}\text{H}_{16}\text{NO}_3^-$ $[\text{M}-\text{H}]^-$. Επιπλέον, η κορυφή που έχει $m/z = 565.09$ αντιστοιχεί στο διμερές $\text{C}_{34}\text{H}_{33}\text{N}_2\text{O}_6^-$ $[2\text{M}-\text{H}]^-$.

TDI-5 ESI 50 #1-13 RT: 0.00-0.41 AV: 13 SB: 2 0.00-0.03 NL: 3.49E5
T: {0,0} - p ESI!corona sid=50.00 det=1306.00 Full ms [100.00-650.00]



Σχήμα 36: Φάσμα μάζας της ένωσης 142.

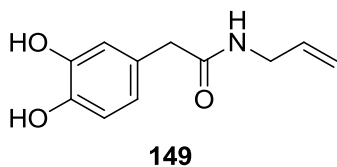
4.5 Συνθετική πορεία φαινολικών αμιδίων – Μέθοδος E



Σχήμα 37: Γενική μέθοδος σύνθεσης αμιδίων- Μέθοδος E.

Χρησιμοποιώντας ως πρώτη ύλη το 3,4-διυδροξυφαινυλοξικό οξύ (**104**) και το θειονυλοχλωρίδιο, παράγεται ακυλοχλωρίδιο, το οποίο στη συνέχεια αντιδρά με αμίνες και παράγεται το επιθυμητό αμίδιο.

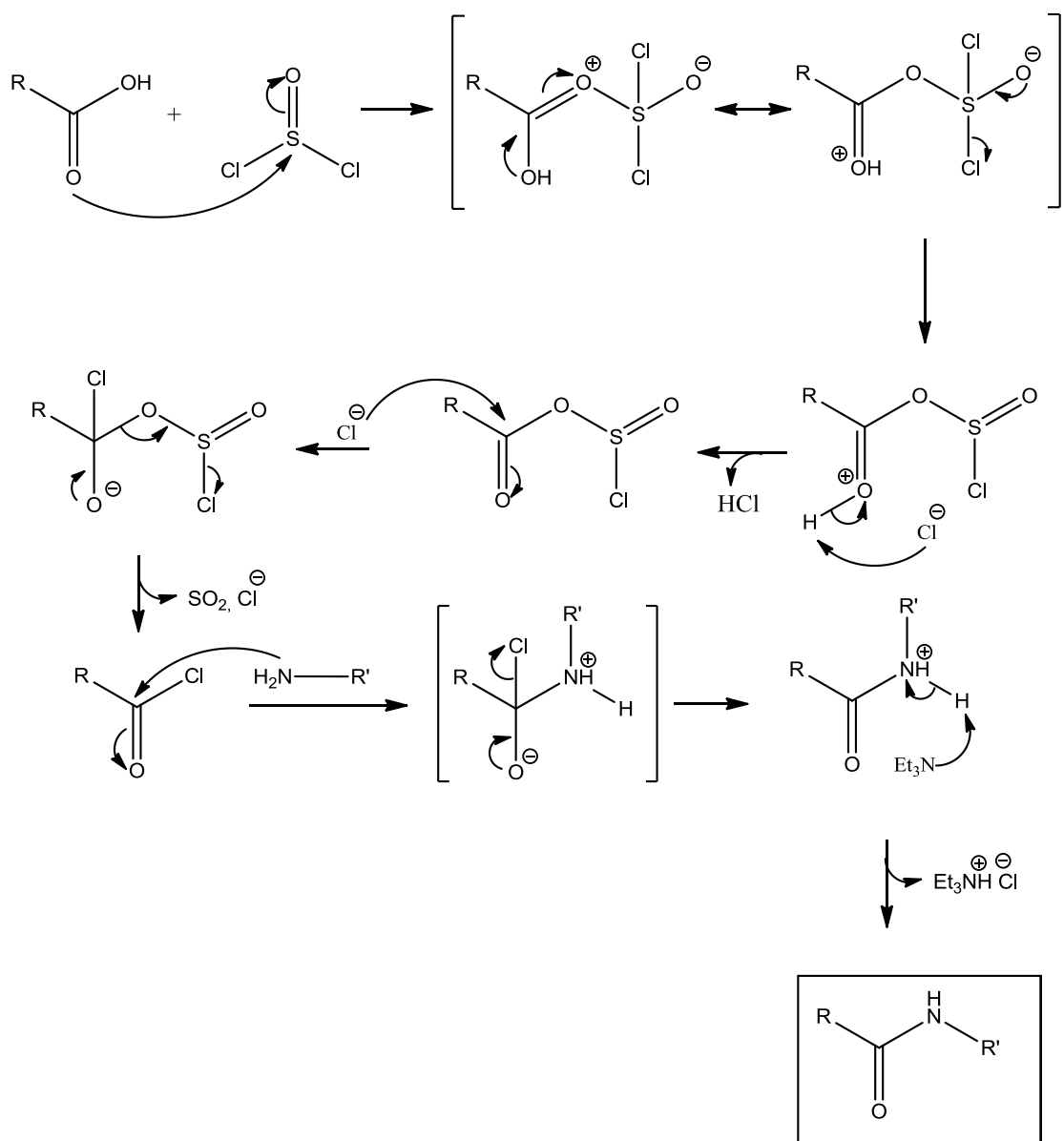
Το αμίδιο που παρασκευάστηκε με αυτήν τη μέθοδο (Σχήμα 37) είναι το εξής (Εικόνα 54):



Εικόνα 54: Αμίδιο που παρασκευάστηκε με τη Μέθοδο Ε.

Έγινε προσπάθεια σύνθεσης του αμιδίου σύμφωνα με την Μέθοδο Δ, όμως δυστυχώς αυτό δεν κατέστη δυνατό, καθώς δεν συντέθηκε το επιθυμητό αμίδιο.

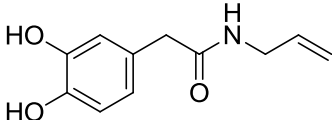
Σχετικά με τον πιθανό μηχανισμό της αντίδρασης (Σχήμα 38), αφού σχηματιστεί το ακυλοχλωρίδιο (σύνθεση που έχει περιγραφεί στην συνθετική πορεία εστέρων μέσω της Μεθόδου Β), αντιδρά με αμίνες και δίνει αμίδια, μέσω του μηχανισμού προσθήκης-απόσπασης της πυρηνόφιλης άκυλο-υποκατάστασης. Ένα καρβοξυλικό οξύ μετατρέπεται αποτελεσματικά σε αμίδιο, μετά από σχηματισμό του χλωριδίου του οξέος, το οποίο αντιδρά με αμίνη και δίνει το αμίδιο. Για την αποτροπή της πρωτονίωσης της αμίνης από το HCl, συχνά προστίθεται μία βάση, όπως για παράδειγμα η Et₃N.



Σχήμα 38: Μηχανισμός σύνθεσης αμιδίων της Μεθόδου Ε.

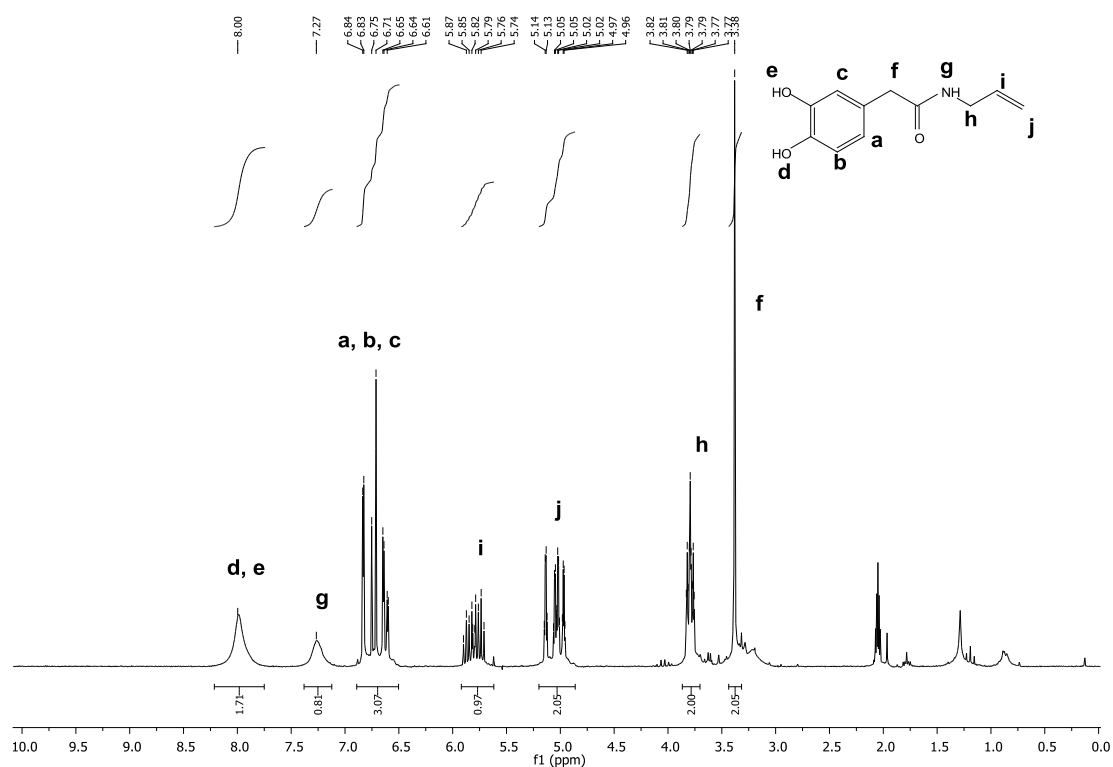
Η περίσσεια SOCl_2 που δεν αντέδρασε, απομακρύνεται με συμπύκνωση του μίγματος υπό ελαττωμένη πίεση. Το προϊόν της αντίδρασης παραλαμβάνεται με χρωματογραφία στήλης, χρησιμοποιώντας κατάλληλο σύστημα έκλουσης. Η απόδοση του αμιδίου που συντέθηκε με τη Μέθοδο Ε παρουσιάζεται στον Πίνακα 5:

Πίνακας 5: Το αμίδιο που παρασκευάστηκε με τη Μέθοδο Ε και η απόδοσή του.

Αμίδιο	Απόδοση
 <p style="text-align: center;">149</p>	79%

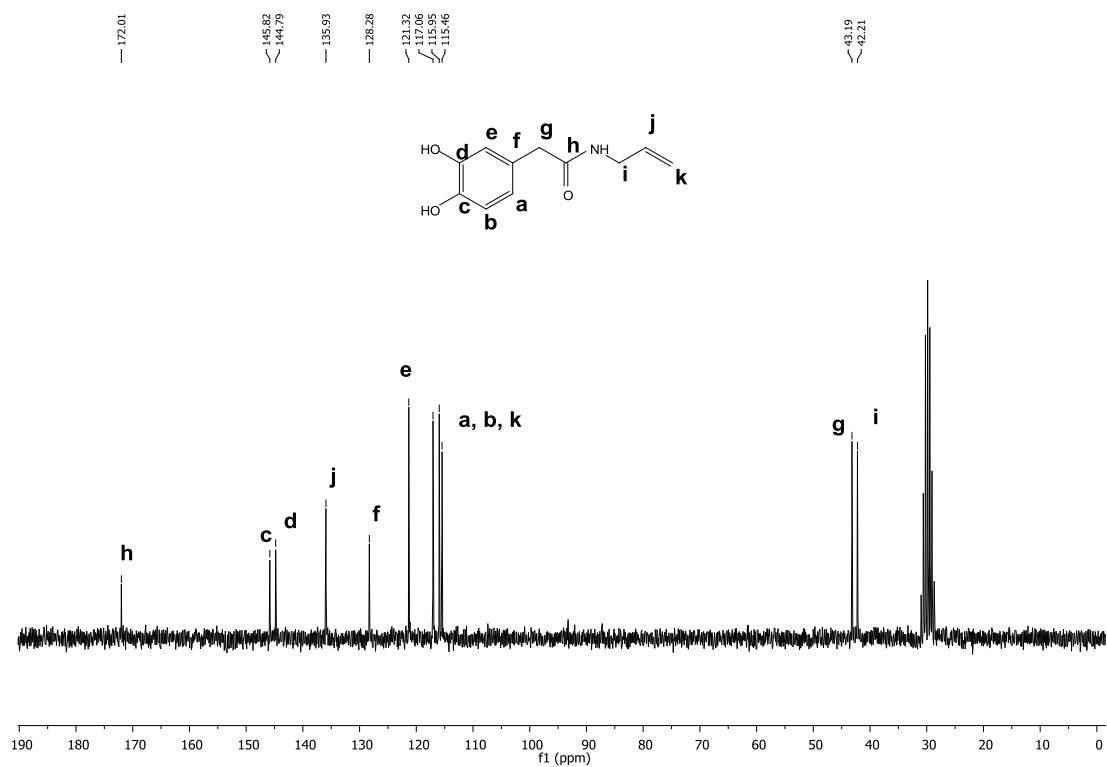
Στα επόμενα σχήματα, παρατίθενται τα φάσματα ^1H και ^{13}C πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού της ένωσης **149**.

Σύμφωνα με το φάσμα ^1H NMR της ένωσης **149** (Σχήμα 39), στα 7.99 ppm εμφανίζονται τα 2 πρωτόνια (**d**, **e**) των φαινολικών υδροξυλίων του μορίου ως μία ευρεία κορυφή, ενώ στα 7.27 ppm εμφανίζεται το αμιδικό πρωτόνιο (**g**). Στην περιοχή των 6.84-6.61 ppm εμφανίζεται μια πολλαπλή κορυφή που οφείλονται στα 3 αρωματικά πρωτόνια (**a**, **b**, **c**) των δύο αρωματικών δακτυλίων. Στα 5.87-5.74 ppm παρατηρείται το ένα πρωτόνιο του ενός άνθρακα που συμμετέχει στο διπλό δεσμό (**i**) με μια πολλαπλή κορυφή και στα 5.14-4.96 ppm συντονίζονται δύο πρωτόνια του άλλου άνθρακα που συμμετέχει στο διπλό δεσμό (**j**). Στα 3.79 ppm εμφανίζεται μια τριπλή κορυφή που αντιστοιχεί στα πρωτόνια του μεθυλενίου δίπλα στον αμιδικό δεσμό (**h**). Τέλος, τα α -καρβονυλικά πρωτόνια (**f**) της ένωσης εμφανίζονται στα 3.38 ppm ως μια απλή κορυφή.



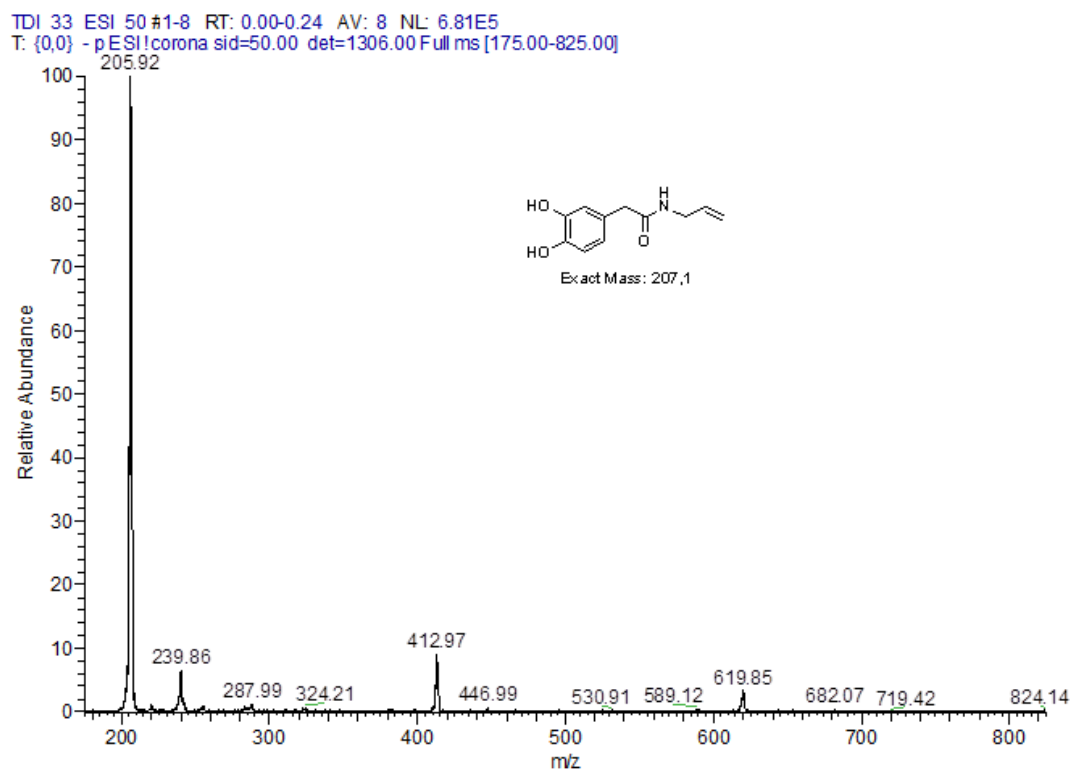
Σχήμα 39: Φάσμα ^1H NMR της ένωσης 149 σε δευτεριωμένη ακετόνη.

Συνεχίζοντας με το φάσμα ^{13}C NMR της ίδιας ένωσης, που δίνεται στο Σχήμα 40, παρατηρούμε στα 172.0 ppm τη χημική μετατόπιση του καρβονυλικού άνθρακα (**h**). Στα 145.8 και 144.8 ppm εμφανίζονται οι δύο αρωματικοί άνθρακες που συνδέονται με υδροξυλομάδες (**c**, **d**). Στην περιοχή 135.9-115.5 ppm εμφανίζονται οι υπόλοιποι τέσσερις άνθρακες των αρωματικών δακτυλίων, καθώς και οι δύο άνθρακες του διπλού δεσμού (**j**, **f**, **e**, **a**, **b**, **k**). Ο α-άνθρακας του καρβονυλίου (**g**) μετατοπίζεται στα 43.2 ppm και ο άνθρακας του μεθυλενίου δίπλα στον αμιδικό δεσμό (**i**) στα 42.4 ppm.



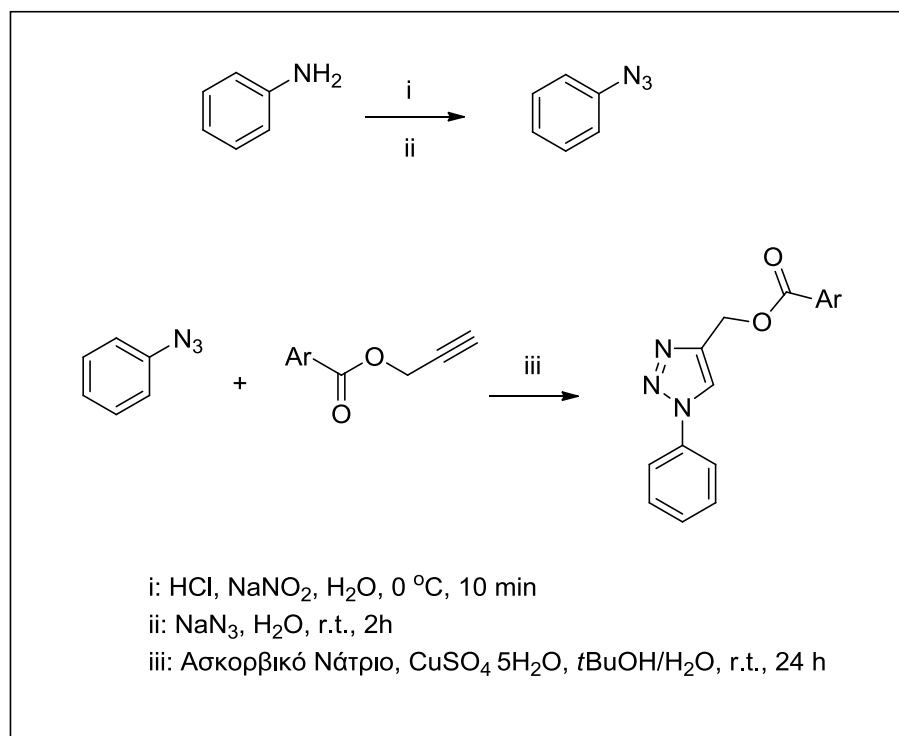
Σχήμα 40: Φάσμα ^{13}C NMR της ένωσης 149 σε δευτεριωμένο διμεθυλοσουλφοξείδιο.

Σύμφωνα με το φάσμα μάζας (Σχήμα 41) της ένωσης **149**, παρατηρείται η βασική κορυφή που έχει $m/z = 205.92$, η οποία αντιστοιχεί στο μοριακό ιόν της ένωσης με μοριακό τύπο $\text{C}_{11}\text{H}_{12}\text{NO}_3^-$ $[\text{M}-\text{H}]^-$. Επιπλέον, η κορυφή που έχει $m/z = 412.97$ αντιστοιχεί στο διμερές $\text{C}_{22}\text{H}_{25}\text{N}_2\text{O}_6^-$ $[2\text{M}-\text{H}]^-$.



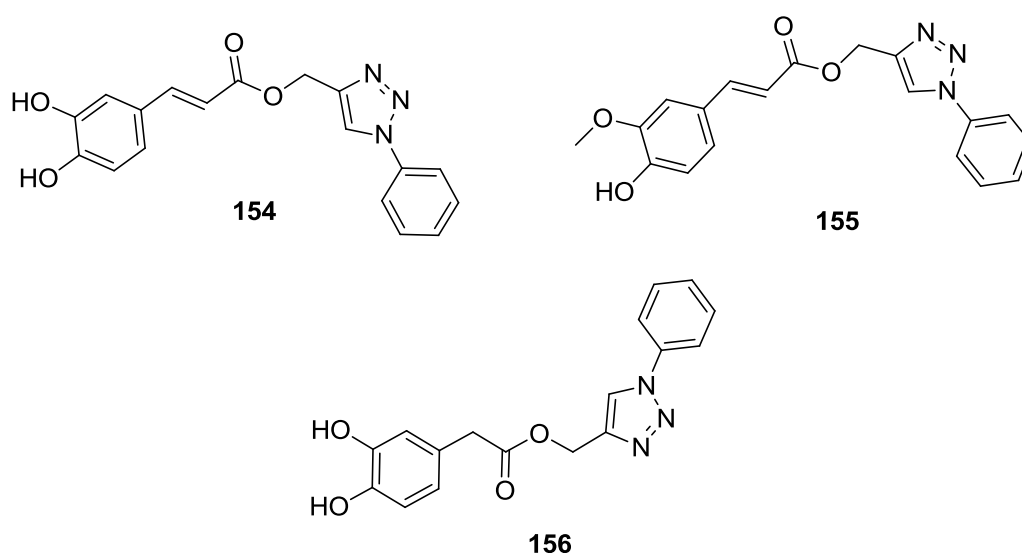
Σχήμα 41: Φάσμα μάζας της ένωσης 149.

4.6 Συνθετική πορεία παραγώγων τριαζολίου – Μέθοδος Z



Σχήμα 42: Γενική μέθοδος σύνθεσης παραγώγων τριαζολίου - Μέθοδος Z

Αρχικά, αντιδρά η ανιλίνη με HCl και NaNO₂/H₂O στους 0 °C για 10 min. Στη συνέχεια προστίθεται NaN₃/H₂O σε r.t. και το μίγμα της αντίδρασης αναδεύεται για 2h προς σχηματισμό του φαίνυλο αζιδίου. Τέλος, πραγματοποιείται αντίδραση μεταξύ των προπάργυλο εστέρων (**117-120**) (η σύνθεση τους έχει περιγραφεί στη Μέθοδο Α) και του φαίνυλο αζιδίου, με χρήση ασκορβικού νατρίου, CuSO₄·5H₂O σε *t*-BuOH/H₂O σε θερμοκρασία δωματίου για 24 h και παραλαμβάνονται τα επιθυμητά παράγωγα τριαζολίου (Εικόνα 55), όπως φαίνεται στο Σχήμα 42.



Εικόνα 55: Παράγωγα τριαζολίου που παρασκευάστηκαν με τη Μέθοδο Ζ.

Σχετικά με το μηχανισμό της αντίδρασης (Σχήμα 43), αρχικά παράγεται το νιτρώδες οξύ *in situ* (στο μίγμα της αντίδρασης), το οποίο είναι ασταθές, με ανάμιξη νιτρώδους νατρίου (NaNO₂) με υδροχλωρικό οξύ. Σε όξινο διάλυμα, το νιτρώδες οξύ μπορεί να πρωτονιωθεί και να αποσπαστεί νερό, σχηματίζοντας ένα ιόν νιτρωδωνίου. Το ιόν νιτρωδωνίου δρα ως δραστικό ενδιάμεσο στις περισσότερες αντιδράσεις των αμινών με το νιτρώδες οξύ. Στη συνέχεια, η αμίνη προσβάλλει το ιόν νιτρωδωνίου και σχηματίζεται το διαζωνιακό κατιόν. Η διαδικασία αυτή ονομάζεται διαζώτωση των αμινών. Τα διαζωνιακά άλατα είναι τα πιο χρήσιμα προϊόντα που λαμβάνονται από τις αντιδράσεις των αμινών με το νιτρώδες οξύ. Ο μηχανισμός σχηματισμού των διαζωνιακών αλάτων ξεκινά με πυρηνόφιλη προσβολή στο ιόν νιτρωδωνίου

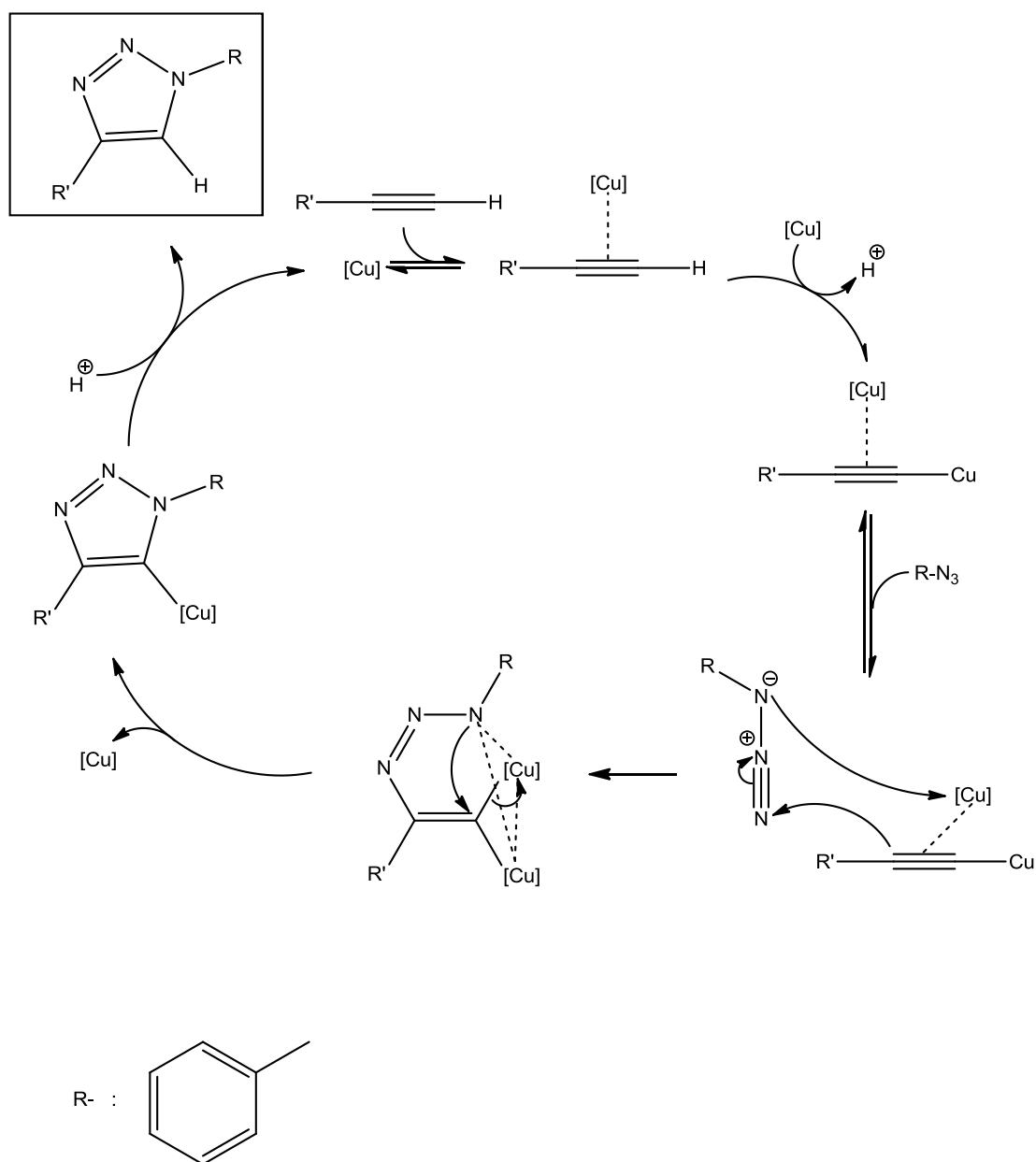
και σχηματισμό *N*-νιτροζαμίνης. Στη συνέχεια, πρωτονιώνεται το οξυγόνο και ένα μόριο H_2O αποσπά το πρωτόνιο του αζώτου. Έπειτα, με πρωτονίωση της υδροξυλομάδας και απώλεια νερού, λαμβάνεται το διαζωνιακό ιόν, το οποίο είναι ασταθές. Κατά τη διάσπασή του, δίνει αέριο άζωτο (N_2) και καρβοκατιόν. Το NaN_3 , ως πυρηνόφιλο αντιδραστήριο, προσβάλλει το καρβοκατιόν, με αποτέλεσμα να παράγεται το επιθυμητό αζίδιο.

Ένας πολύ χρήσιμος και γενικός τρόπος σύνθεσης πενταμελών δακτυλίων με δύο ή περισσότερα ετεροάτομα είναι οι αντιδράσεις 1,3-διπολικής κυκλοπροσθήκης. Η αντίδραση λαμβάνει χώρα ανάμεσα σε ένα δίπολο και ένα διπολόφιλο. Το δίπολο αντιδραστήριο μπορεί να έχει από ένα έως τρία ετεροάτομα. Μερικές φορές είναι σταθερό, ενώ άλλες φορές σχηματίζεται μέσα στο διάλυμα της αντίδρασης (*in situ*) από κατάλληλες σταθερές πρόδρομες ενώσεις. Ο όρος δίπολο προκύπτει από το γεγονός ότι δεν μπορεί να γραφούν γι' αυτά δομές χωρίς ύπαρξη φορτίων. Ένα αντιπροσωπευτικό δίπολο είναι το αζίδιο (R-N=N=N). Παρ' όλο που έχει γραφεί ως 1,2-δίπολο, η ένωση αυτή αντιδρά ως 1,3-δίπολο και μπορεί να γραφεί με ανάλογες δομές συντονισμού. Το διπολόφιλο αντιδραστήριο εδώ είναι ένωση με ακόρεστη ομάδα, $\text{C}\equiv\text{C}$.

Ο ενεργός καταλύτης Cu (I) μπορεί να παραχθεί από άλατα Cu (I) ή άλατα Cu (II) χρησιμοποιώντας ασκορβικό νάτριο ως αναγωγικό παράγοντα. Η προσθήκη μικρής περίσσειας ασκορβικού νατρίου αποτρέπει το σχηματισμό οξειδωτικών προϊόντων ομοιοπολικής σύνδεσης.

Σχετικά με το μηχανισμό της αντίδρασης (Σχήμα 44), αρχικά σχηματίζεται το ακετυλίδιο του χαλκού, το οποίο είναι ενωμένο μέσω μιας π αλληλεπίδρασης με ένα άλλο άτομο χαλκού. Στη συνέχεια, το σύστημα συναρμόζεται, «συμπλοκοποιείται» με το αζίδιο και σχηματίζεται ένας εξαμελής δακτύλιος. Στον δακτύλιο αυτό, το δεύτερο άτομο χαλκού λειτουργεί σαν υποκαταστάτης δότης ηλεκτρονίων, ώστε να σταθεροποιείται το σύστημα. Ακολουθεί συρρίκνωση του 6μελους δακτυλίου σε έναν 5μελή δακτύλιο τύπου σύμπλοκο τριαζολίου-χαλκού. Τέλος, στο όξινο περιβάλλον απελευθερώνεται το τριαζόλιο, αναγεννάται ο χαλκός και ξεκινά ένα καινούριος καταλυτικός κύκλος.

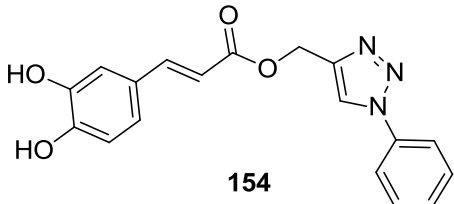
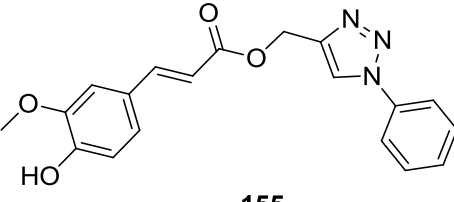
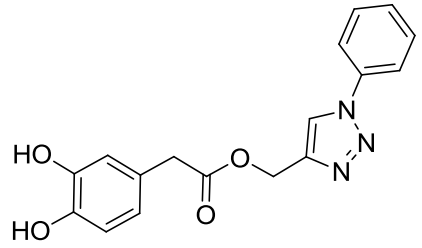




Σχήμα 44: Μηχανισμός σύνθεσης παραγώγων τριαζολίου της Μεθόδου Z.

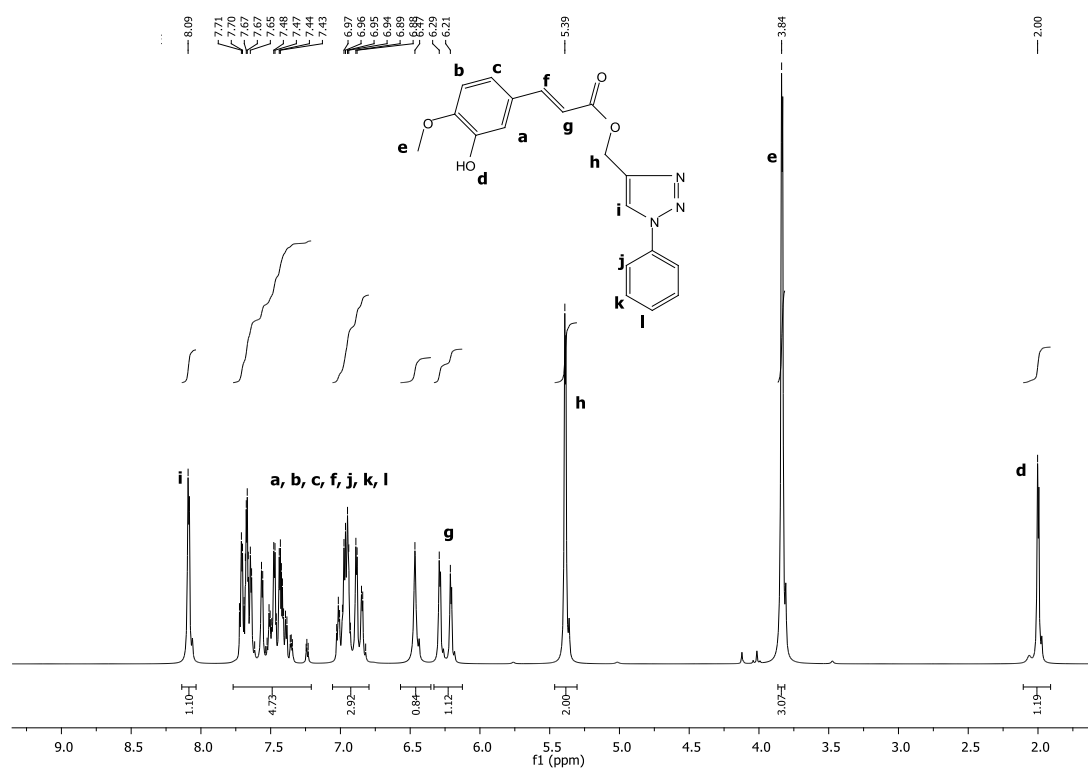
Τα ανόργανα αντιδραστήρια απομακρύνονται από το μίγμα με εκχύλιση με H_2O . Το τελικό προϊόν των αντιδράσεων παραλαμβάνεται με χρωματογραφία στήλης, χρησιμοποιώντας κατάλληλο σύστημα έκλουσης. Οι αποδόσεις των παραγώγων τριαζολίων που συντέθηκαν με τη Μέθοδο Z, παρουσιάζονται στον Πίνακα 6:

Πίνακας 6: Τα παράγωγα τριαζολίου που παρασκευάστηκαν με τη Μέθοδο Z και οι αποδόσεις τους.

Παράγωγο τριαζολίου	Απόδοση
 <p style="text-align: center;">154</p>	84%
 <p style="text-align: center;">155</p>	83%
 <p style="text-align: center;">156</p>	91%

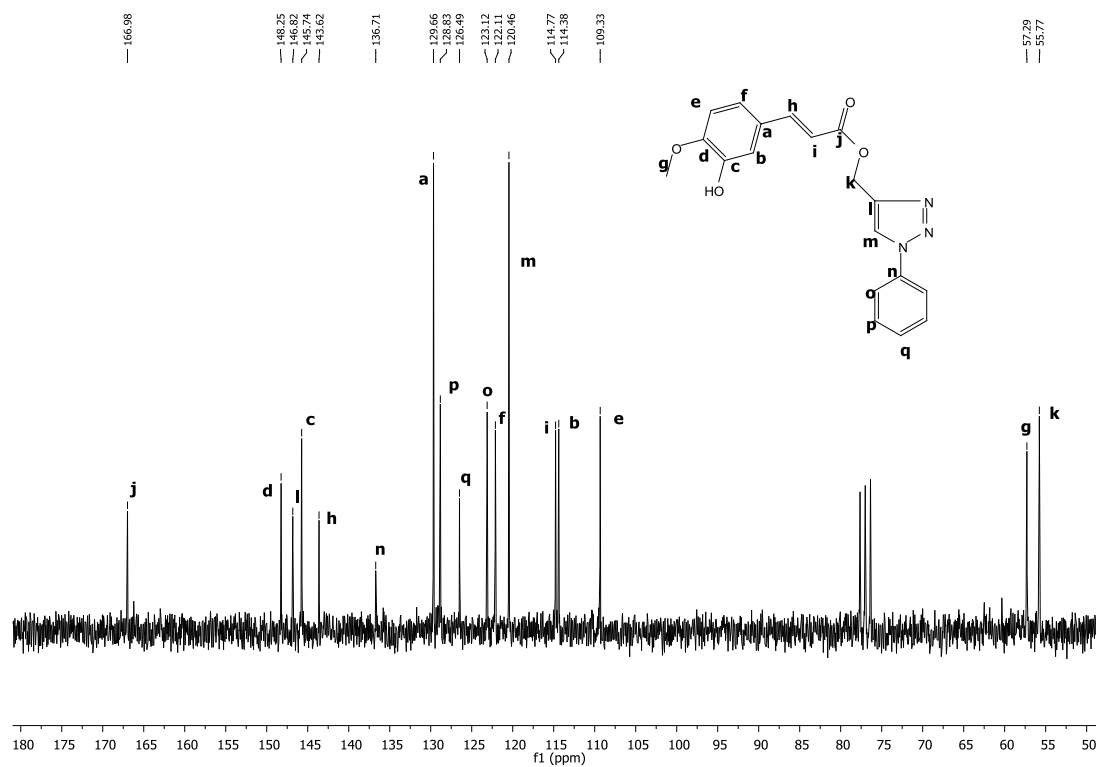
Στα επόμενα σχήματα, παρατίθενται τα φάσματα ^1H και ^{13}C πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού της ένωσης **155**.

Σύμφωνα με το φάσμα ^1H NMR (Σχήμα 45), στα 8.09 ppm εμφανίζεται ως απλή κορυφή το ένα πρωτόνιο (i) του τριαζολίου, ενώ στην περιοχή 7.71-6.47 ppm συντονίζονται τα οκτώ αρωματικά πρωτόνια (a, b, c, j, k, l), καθώς και το ένα πρωτόνιο του άνθρακα που συμμετέχει στο διπλό δεσμό (f) και δίνουν πολλαπλές κορυφές. Στα 6.25 ppm εμφανίζεται ως διπλή κορυφή το πρωτόνιο του άλλου άνθρακα που συμμετέχει στο διπλό δεσμό (g). Στα 5.39 ppm εμφανίζεται ως απλή οξεία κορυφή τα δύο πρωτόνια του μεθυλενίου (h), ενώ στα 3.84 ppm συντονίζονται τα τρία πρωτόνια του μεθυλίου (e), δίνοντας μια απλή οξεία κορυφή. Τέλος, στα 2.00 ppm εμφανίζεται το ένα πρωτόνιο του φαινολικού υδροξυλίου (d) ως μια απλή οξεία κορυφή.



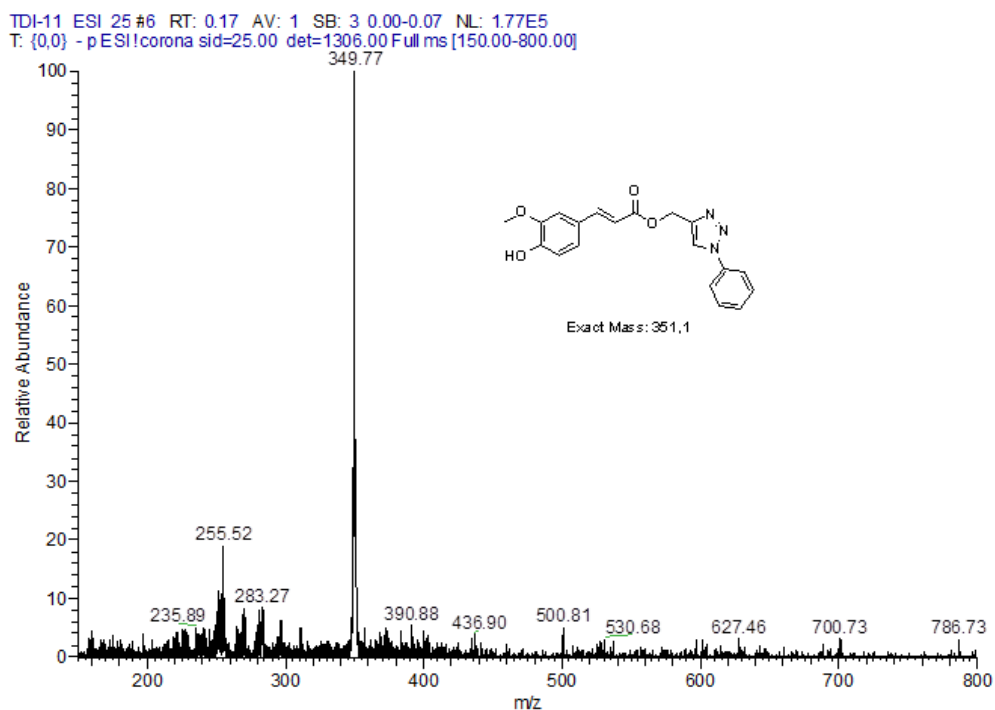
Σχήμα 45: Φάσμα ¹H NMR της ένωσης 155 σε δευτεριωμένο χλωροφόρμιο.

Συνεχίζοντας με το φάσμα ¹³C NMR της ίδιας ένωσης, που δίνεται στο Σχήμα 46, παρατηρούμε στα 167.0 ppm τη χημική μετατόπιση του καρβονυλικού άνθρακα (**j**). Στην περιοχή 148.3-109.3 εμφανίζονται οι δεκατέσσερις αρωματικοί άνθρακες (**a, b, c, d, e, f, l, m, n, o, p, q**), καθώς και οι δύο άνθρακες του διπλού δεσμού (**h, i**). Ο άνθρακας του μεθυλίου (**g**) μετατοπίζεται στα 57.8 ppm και ο άνθρακας του μεθυλενίου (**k**) στα 55.8 ppm.



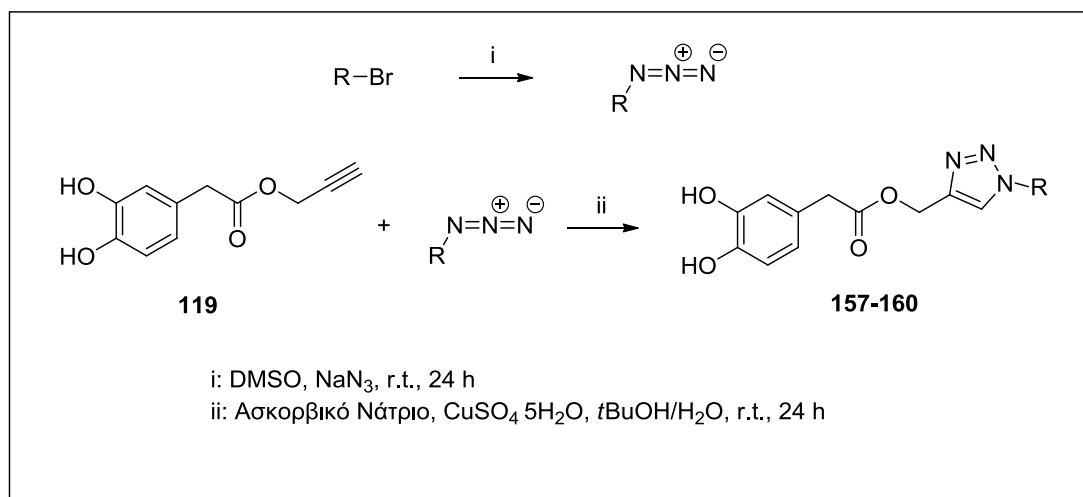
Σχήμα 46: Φάσμα ¹³C NMR της ένωσης 155 σε δευτεριωμένο χλωροφόρμιο.

Σύμφωνα με το φάσμα μάζας (Σχήμα 47) της ένωσης **155**, παρατηρείται η βασική κορυφή που έχει $m/z = 349.77$, η οποία αντιστοιχεί στο μοριακό ιόν της ένωσης με μοριακό τύπο $C_{19}H_{16}N_3O_4^-$ $[M-H]^-$.



Σχήμα 47: Φάσμα μάζας της ένωσης 155.

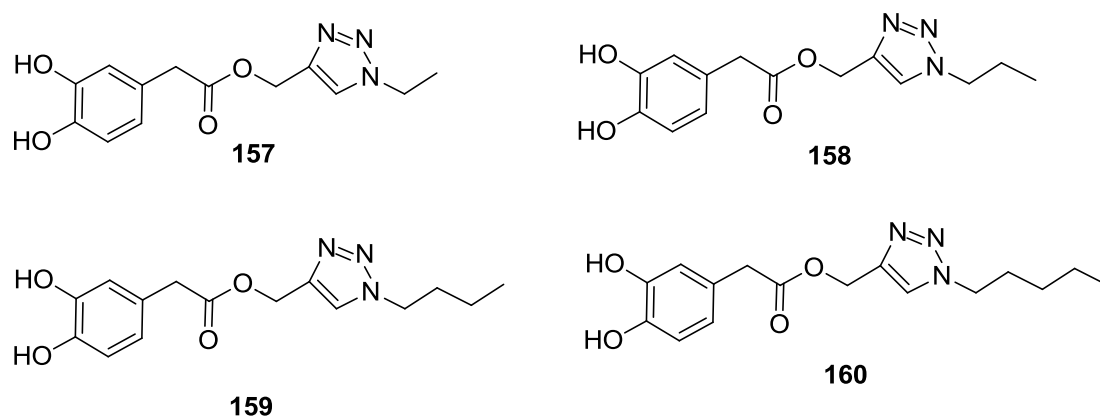
4.7 Συνθετική πορεία παραγώγων τριαζολίου – Μέθοδος Η



Σχήμα 48: Γενική μέθοδος σύνθεσης παραγώγων τριαζολίου - Μέθοδος Η.

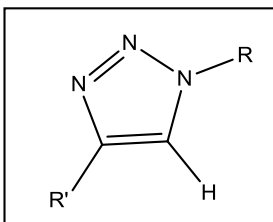
Αρχικά, μετατρέπονται τα βρωμίδια σε αζίδια με χρήση NaN₃ σε διμεθυλοσουλφοξείδιο (DMSO). Στη συνέχεια, πραγματοποιείται αντίδραση μεταξύ των αζιδίων και του προπάργυλο εστέρα (προπ-2-υν-1-υλο 2-(3,4-διυδροξυφαινυλο)οξικό εστέρα) **119**, η σύνθεση του οποίου έχει περιγραφεί

στην Μέθοδο Α, προς σχηματισμό των επιθυμητών παραγώγων τριαζολίου. Τα παράγωγα τριαζολίου που παρασκευάστηκαν με αυτήν τη μέθοδο (Σχήμα 48) είναι τα εξής (Εικόνα 56):



Εικόνα 56: Παράγωγα τριαζολίου που παρασκευάστηκαν με τη Μέθοδο Η.

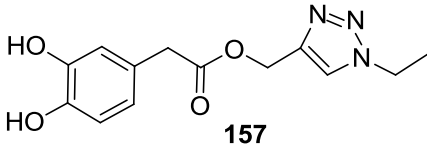
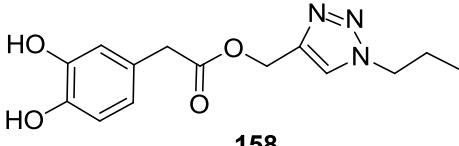
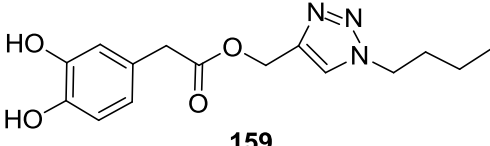
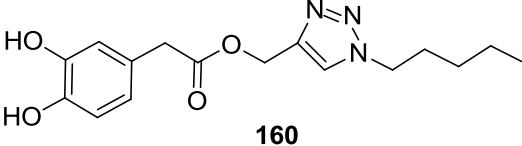
Σχετικά με το πιθανό μηχανισμό (Σχήμα 49), αρχικά το αζίδιο από το NaN_3 , ως πυρηνόφιλο, προσβάλλει την αλκυλομάδα του αλκυλοβρωμιδίου και το βρώμιο απομακρύνεται ως καλή αποχωρούσα ομάδα, με αποτέλεσμα να παράγεται το επιθυμητό αζίδιο, το οποίο συμμετέχει περαιτέρω στην πορεία της αντίδρασης.



127

σύστημα έκλουσης. Οι αποδόσεις των παραγώγων τριαζολίου που συντέθηκαν με τη Μέθοδο Η, παρουσιάζονται στον Πίνακα 7:

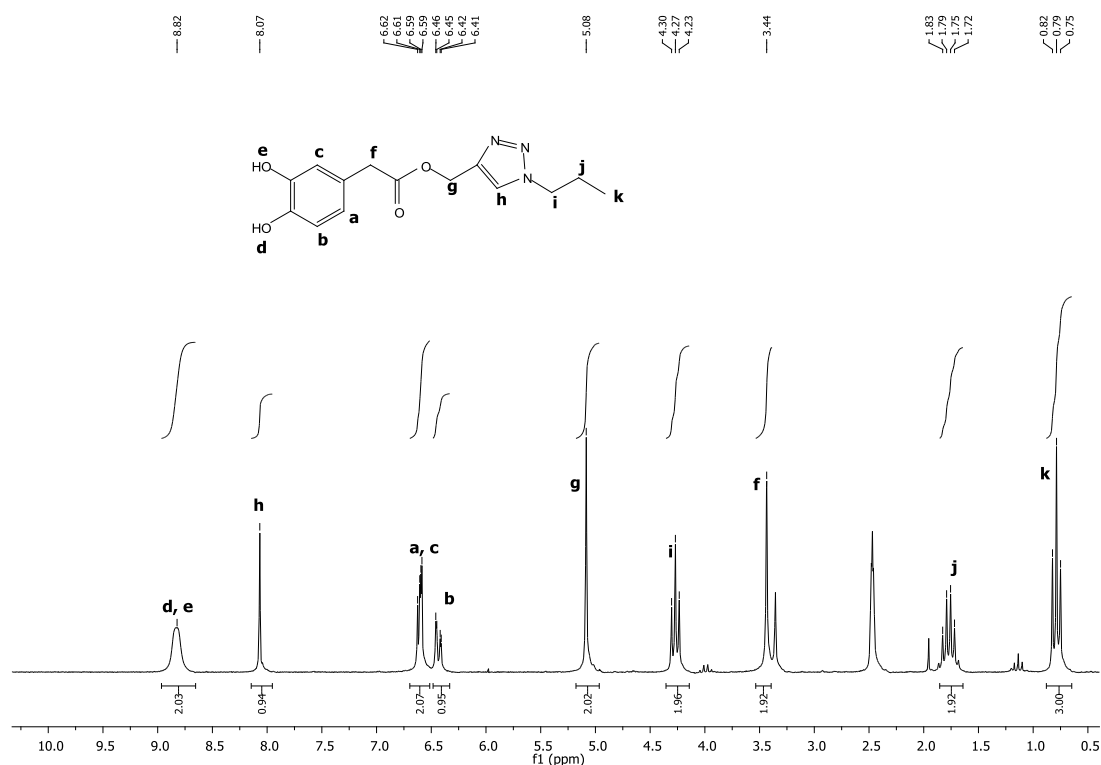
Πίνακας 7: Τα παράγωγα τριαζολίου που παρασκευάστηκαν με τη Μέθοδο Η και οι αποδόσεις τους.

Παράγωγο τριαζολίου	Απόδοση
 157	51%
 158	37%
 159	30%
 160	67%

Στα επόμενα σχήματα, παρατίθενται τα φάσματα ^1H και ^{13}C πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού της ένωσης **158**.

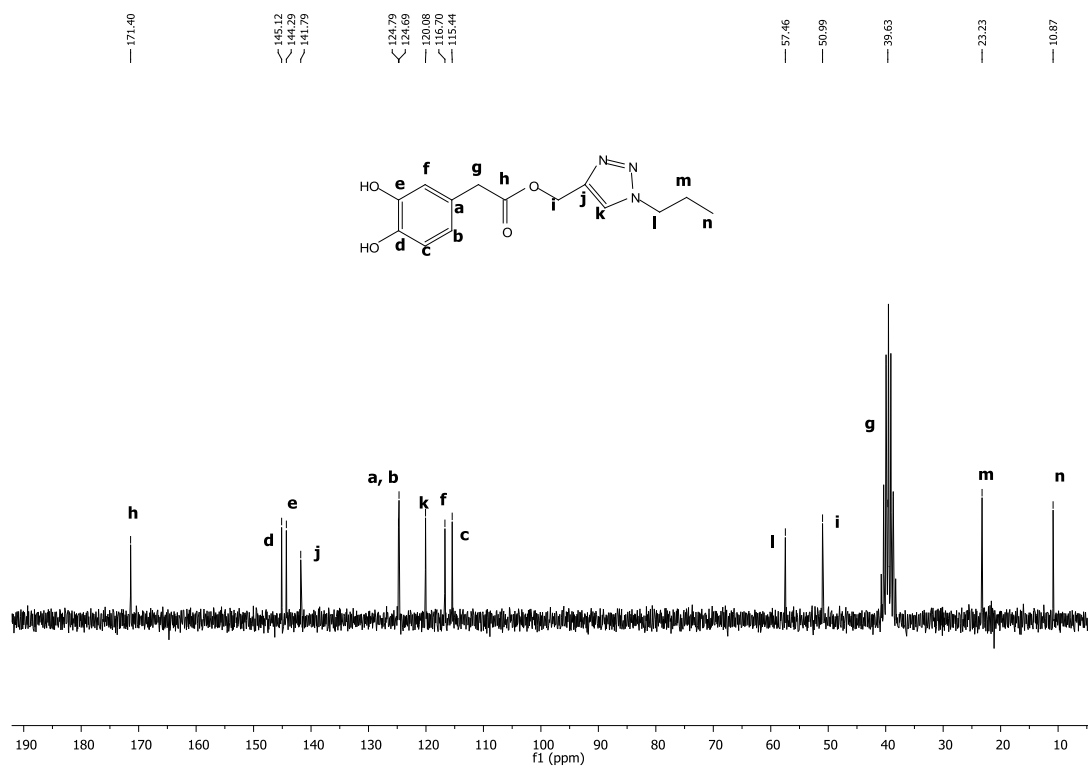
Σύμφωνα με το φάσμα ^1H NMR (Σχήμα 50), στα 8.82 ppm συντονίζονται τα δύο φαινολικά πρωτόνια (**d**, **e**) και δίνουν μια ευρεία κορυφή, ενώ στα 8.07 ppm εμφανίζεται το ένα πρωτόνιο του τριαζολίου (**h**) ως απλή κορυφή. Στην περιοχή 6.62-6.41 ppm συντονίζονται τα τρία αρωματικά πρωτόνια (**a**, **b**, **c**) και δίνουν πολλαπλές κορυφές. Στα 5.08 ppm εμφανίζονται ως απλή οξεία κορυφή τα δύο πρωτόνια του μεθυλενίου (**g**), ενώ στα 4.27 ppm συντονίζονται τα δύο πρωτόνια του μεθυλενίου (**i**), δίνοντας μια τριπλή κορυφή. Στα 3.44

ppm εμφανίζεται μια οξεία κορυφή που αντιστοιχεί στα α -καρβονυλικά πρωτόνια (**f**). Τέλος, στην περιοχή 1.83-1.72 ppm εμφανίζονται τα δύο πρωτόνια του άλλου μεθυλενίου της ένωσης ως μια πολλαπλή κορυφή και στα 0.79 ppm συντονίζονται τα τρία πρωτόνια του μεθυλίου (**k**), ως μια τριπλή κορυφή.



Σχήμα 50: Φάσμα ^1H NMR της ένωσης 158 σε δευτεριωμένο διμεθυλοσουλφοξείδιο.

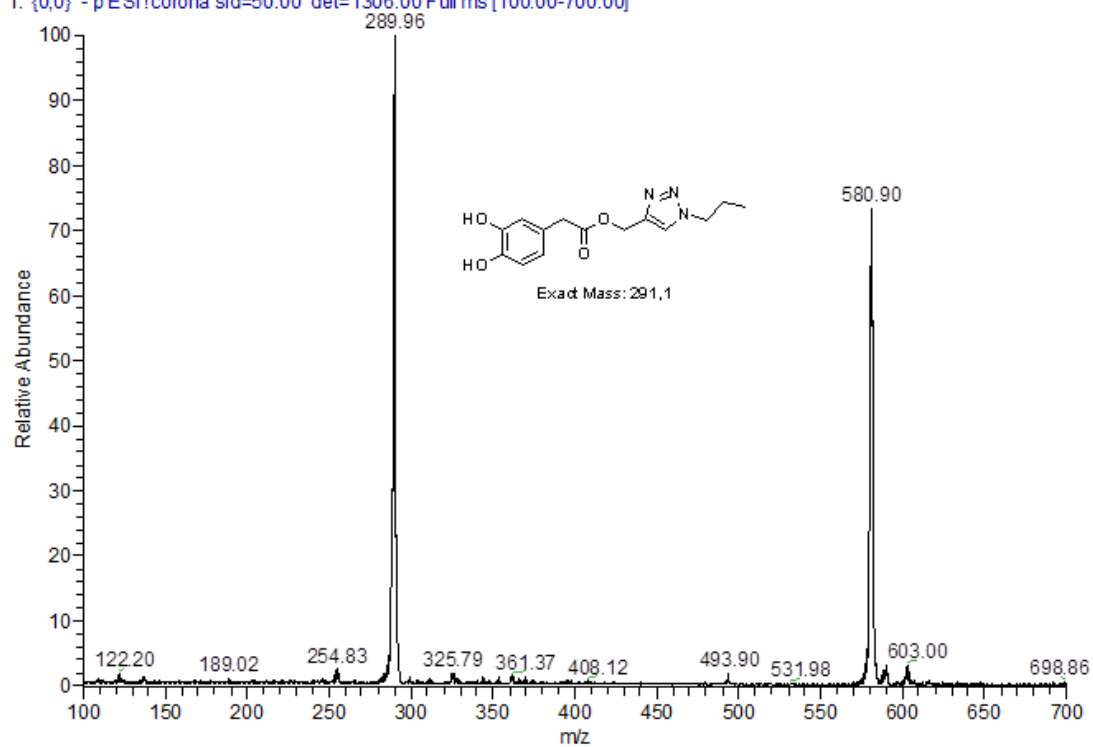
Συνεχίζοντας με το φάσμα ^{13}C NMR της ίδιας ένωσης, που δίνεται στο Σχήμα 51, παρατηρούμε στα 171.4 ppm τη χημική μετατόπιση του καρβονυλικού άνθρακα (**h**). Στην περιοχή 145.1-115.4 ppm εμφανίζονται οι οκτώ αρωματικοί άνθρακες (**a, b, c, d, e, f, j, k**). Ο άνθρακας του μεθυλενίου (**l**) συντονίζεται στα 57.5 ppm και ο άνθρακας του μεθυλενίου (**i**) στα 51.0 ppm. Στα 39.6 ppm εμφανίζεται ο α -καρβονυλικός άνθρακας (**g**), στα 23.3 ppm ο άνθρακας του μεθυλενίου (**m**), ενώ στα 10.9 ppm ο άνθρακας του μεθυλίου (**n**).



Σχήμα 51: Φάσμα ^{13}C NMR της ένωσης 158 σε δευτεριωμένο διμεθυλοσουλφοξείδιο.

Σύμφωνα με το φάσμα μάζας (Σχήμα 52) της ένωσης **158**, παρατηρείται η βασική κορυφή που έχει $m/z = 349.77$, η οποία αντιστοιχεί στο μοριακό ιόν της ένωσης με μοριακό τύπο $\text{C}_{14}\text{H}_{16}\text{N}_3\text{O}_4^-$ $[\text{M}-\text{H}]^-$. Επιπλέον, η κορυφή που έχει $m/z = 580.90$ αντιστοιχεί στο διμερές $\text{C}_{28}\text{H}_{33}\text{N}_6\text{O}_8^-$ $[2\text{M}-\text{H}]^-$.

TDI-41 ESI 50 #1-19 RT: 0.00-0.61 AV: 19 NL: 1.11E5
T: {0,0} - p ESI!corona sid=50.00 det=1306.00 Full ms [100.00-700.00]



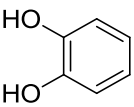
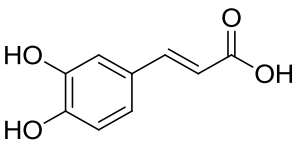
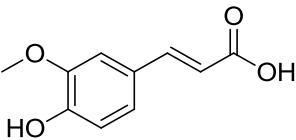
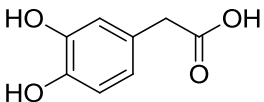
Σχήμα 52: Φάσμα μάζας της ένωσης 158.

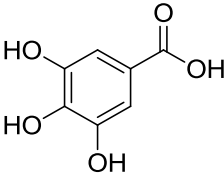
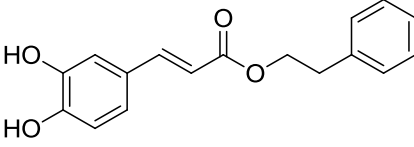
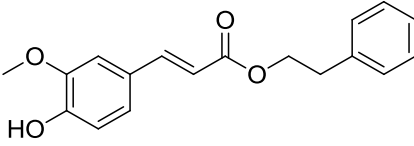
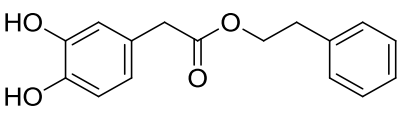
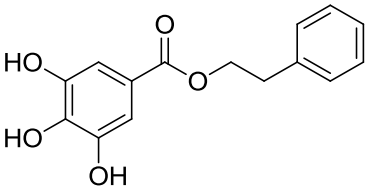
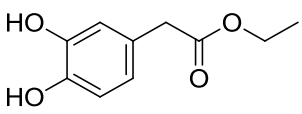
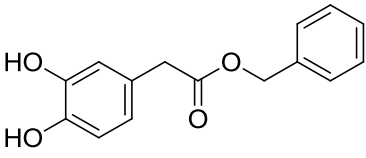
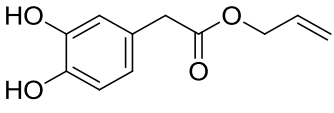
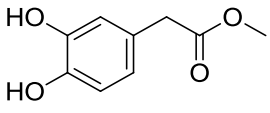
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5

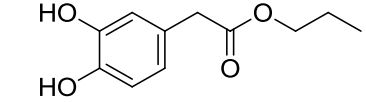
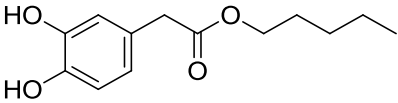
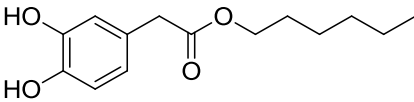
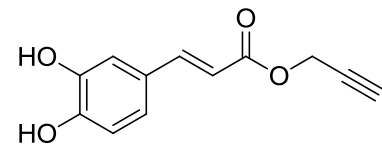
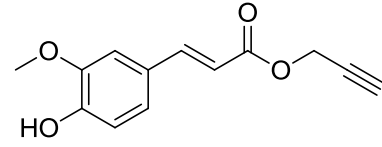
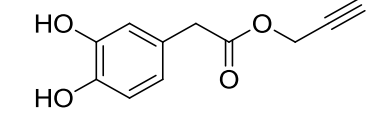
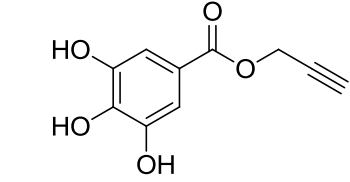
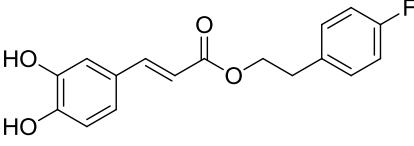
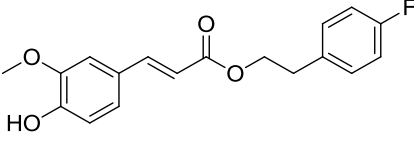
ΕΝΖΥΜΙΚΑ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

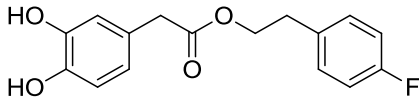
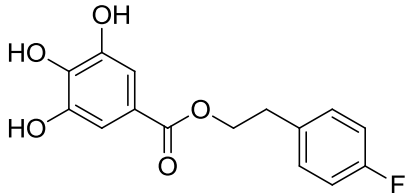
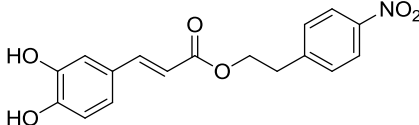
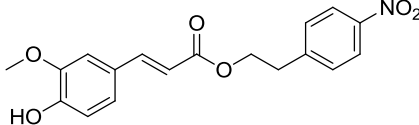
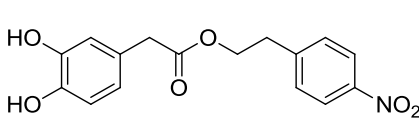
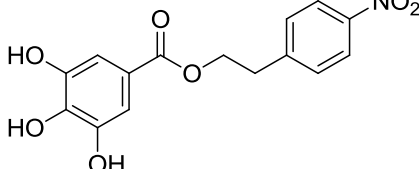
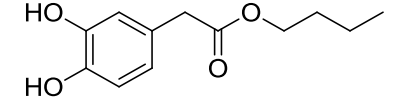
Οι ενώσεις που συντέθηκαν σύμφωνα με την πορεία αντιδράσεων που περιγράφηκε στο Κεφάλαιο 4, δοκιμάστηκαν ως προς την ανασταλτική τους δράση έναντι του ενζύμου της ουρεάσης του βακτηρίου *Sporosarcina pasteurii* σε βιολογικά πειράματα *in vitro* που πραγματοποιήθηκαν στο Τμήμα Βιοοργανικής Χημείας του Πανεπιστημίου Wrocław στην Πολωνία. Ως ένωση αναφοράς χρησιμοποιήθηκε η κατεχόλη. Στους Πίνακες 8-10 που ακολουθούν παρουσιάζονται οι χημικοί τύποι των ενώσεων που συντέθηκαν και οι τιμές IC_{50} και k_{inact}/K_i για κάθε μία από αυτές.

Πίνακας 8: Αποτελέσματα βιολογικών δοκιμών για τα αρχικά οξέα και τους εστέρες που συντέθηκαν.

	Συντακτικός Τύπος	IC_{50} [μM]		k_{inact} / K_i [$M^{-1}s^{-1}$]
		Χωρίς επώαση	Με επώαση	
98			7.403 ± 0.085	346.08 ± 16.193
157		Δεν εμφάνισε ανασταλτική δράση		
158		Δεν εμφάνισε ανασταλτική δράση		
159		766.183 ± 6.8190	240.456 ± 2.812	32.046 ± 2.456

160		(> 1 mM)	(> 1 mM)	
102		Δεν εμφάνισε ανασταλτική δράση		
103		Δεν εμφάνισε ανασταλτική δράση		
104		82.4724 ± 0.624	6.5403 ± 0.0485	243.348 ± 1.371
105		(> 1 mM)	972.557 ± 11.312	$K_i = 1105.6 \pm 17.58$
106			106.171 ± 1.27	56.28 ± 3.876
107			44.0864 ± 0.296	99.7 ± 6.88
108			47.12 ± 0.32	94.06 ± 35.32
109			158.232 ± 2.33	43.99 ± 0.958

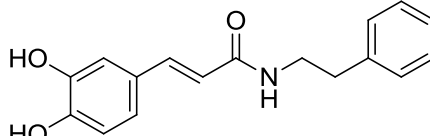
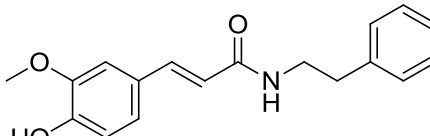
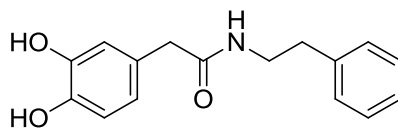
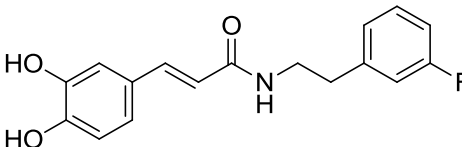
110			22.4911 ± 0.301	123.54 ± 9.76
111			25.6465 ± 0.315	101.28 ± 8.36
112			62.4485 ± 4.84	92.7 ± 6.45
113		Δεν εμφάνισε ανασταλτική δράση		
114		Δεν εμφάνισε ανασταλτική δράση		
115			0.518 ± 0.0044	1378.58 ± 26.101
116		Δεν εμφάνισε ανασταλτική δράση		
117		Δεν εμφάνισε ανασταλτική δράση		
118		Δεν εμφάνισε ανασταλτική δράση		

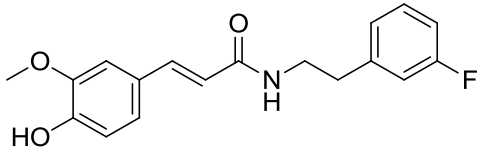
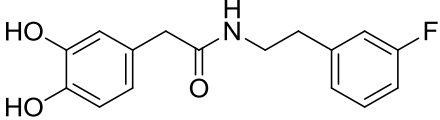
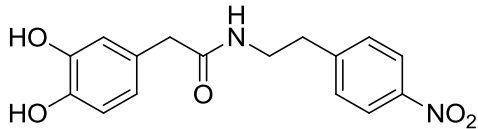
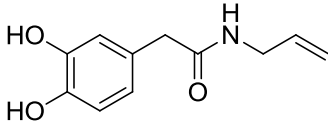
119			106.36 ± 1.097	46.83 ± 2.559
120		15.627 ± 0.242	205.815 ± 1.73	$K_i = 143.59 \pm 2.12$
121		Δεν εμφάνισε ανασταλτική δράση		
122		Δεν εμφάνισε ανασταλτική δράση		
123			7.85485 ± 0.089	379.17 ± 23.065
124		Δεν εμφάνισε ανασταλτική δράση		
125		6.6747 ± 0.0425	0.66996 ± 0.00531	571.28 ± 7.108

Από τα αποτελέσματα του παραπάνω πίνακα μπορούμε να εξάγουμε τα εξής συμπεράσματα σχετικά με την ανασταλτική δράση των εστέρων **102-125**:

- Οι ενώσεις **98**, **104-112**, **115**, **119**, **120**, **123** και **125** δρουν ως μη αντιστρεπτοί αναστολείς.
- Οι ενώσεις **105** και **120** δρουν ως μη ανταγωνιστικοί αναστολείς βραδείας δέσμευσης.
- Τη μεγαλύτερη ανασταλτική δράση παρουσιάζει ο εστέρας **115**.
- Ο εστέρας **125** εμφανίζει την αμέσως επόμενη σε ισχύ ανασταλτική δράση.

Πίνακας 9: Αποτελέσματα βιολογικών δοκιμών για τα αμίδια που συντέθηκαν.

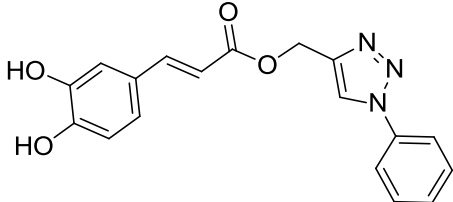
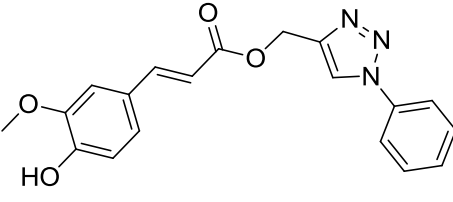
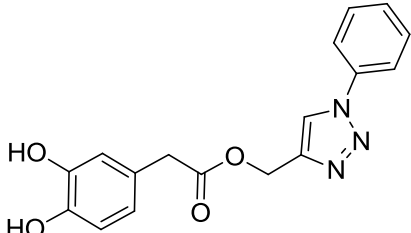
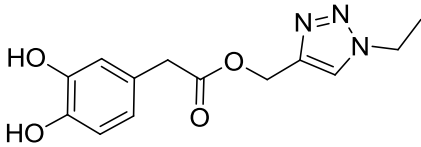
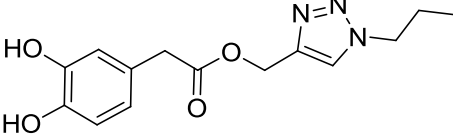
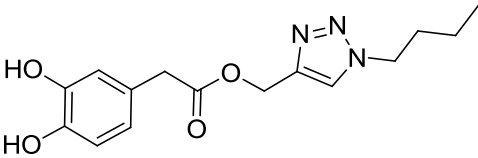
	Συντακτικός Τύπος	IC ₅₀ [μM]		k _{inact} / K _i [M ⁻¹ s ⁻¹]
		Χωρίς επώαση	Με επώαση	
138		Δεν εμφάνισε ανασταλτική δράση		
139		Δεν εμφάνισε ανασταλτική δράση		
140		192.213 ± 1.723	13.692 ± 0.0973	247.164 ± 1.688
141		Δεν εμφάνισε ανασταλτική δράση		

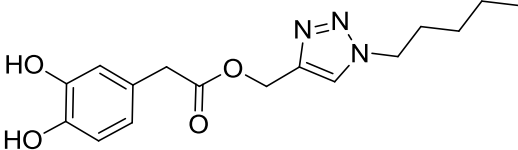
142		Δεν εμφάνισε ανασταλτική δράση		
143			666.964 ± 7.58	12.12 ± 0.885
144			296.476 ± 2.16	29.05 ± 1.768
145			89.1967 ± 0.94	76.43 ± 4.806

Από τα αποτελέσματα του παραπάνω πίνακα μπορούμε να εξάγουμε τα εξής συμπεράσματα σχετικά με την ανασταλτική δράση των αμιδίων **138-145**:

- Οι ενώσεις **140** και **143-145** δρουν ως μη αντιστρεπτοί αναστολείς.
- Τη μεγαλύτερη ανασταλτική δράση παρουσιάζει το αμίδιο **140**.
- Το αμίδιο **145** εμφανίζει την αμέσως επόμενη σε ισχύ ανασταλτική δράση.

Πίνακας 10: Αποτελέσματα βιολογικών δοκιμών για τα παράγωγα τριαζολίου που συντέθηκαν.

	Συντακτικός Τύπος	IC ₅₀ [μM]		k _{inact} / K _i [M ⁻¹ s ⁻¹]
		Χωρίς επώαση	Με επώαση	
150		Δεν εμφάνισε ανασταλτική δράση		
151		Δεν εμφάνισε ανασταλτική δράση		
152			73.060 ± 0.904	113.62 ± 5.087
153		Δεν έχουν ελεγχθεί ακόμα		
154		Δεν έχουν ελεγχθεί ακόμα		
155		Δεν έχουν ελεγχθεί ακόμα		

156		Δεν έχουν ελεγχθεί ακόμα
-----	---	--------------------------

Από τα αποτελέσματα του παραπάνω πίνακα μπορούμε να εξάγουμε τα εξής συμπεράσματα σχετικά με την ανασταλτική δράση των παραγώγων τριαζολίου **150-156**:

- Η ένωση **152** δρα ως μη αντιστρεπτός αναστολέας.
 - Το παράγωγο τριαζολίου **152** είναι το μοναδικό παράγωγο τριαζολίου που εμφανίζει ανασταλτική δράση.
- Συνολικά επιβεβαιώνεται η μελέτη του Ciurli και των συνεργατών του για την ανασταλτική –πιθανώς ομοιοπολικού τύπου- δράση παραγώγων κατεχόλης. Τα παράγωγα του 3,4-διυδροξυφαινυλοξικού οξέος, το οποίο φέρει μονάδα κατεχόλης, παρουσίασαν την καλύτερη δράση, με ισχυρότερο αναστολέα της παρούσας εργασίας τον εστέρα **115** με $K_{inact}/K_i = 1379$. Η ύπαρξη διπλού δεσμού, πιθανώς επάγει περιορισμό στη δυνατότητα περιστροφής με αποτέλεσμα τα παράγωγα του καφεϊκού οξέος να μην εμφανίζουν ανασταλτική δράση. Κυτταροτοξικές μελέτες και μελέτες κρυστάλλωσης των πιο ισχυρών αναστολέων της παρούσας εργασίας είναι σε εξέλιξη.

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 CH_2Cl_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, δηλαδή φυλάχθηκαν 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 F_{254}) 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 με τη δύναμη της βαρύτητας (στήλη gravity). Στις στήλες gravity χρησιμοποιήθηκε ως υλικό πλήρωσης Silica gel 60 (0.063-0.200 mm) της εταιρίας Merck. Τα συστήματα έκλουσης που χρησιμοποιήθηκαν είναι διαφορετικά για κάθε ένωση και αναφέρονται στις πειραματικές μεθόδους.

6.1.3 Ταυτοποίηση/Χαρακτηρισμός ενώσεων

Φασματομετρία μάζας (MASS): Τα φάσματα μάζας ελήφθησαν σε φασματόμετρο ThermoFinnigan Surveyor MSQ, που διαθέτει το Εργαστήριο Οργανικής Χημείας, με την τεχνική ESI (ElectroSpray Ionization, ιονισμός μέσω ηλεκτροψεκασμού) για την παραγωγή των ιόντων.

Φασματοσκοπία Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού (NMR): Οι ενώσεις, που παρασκευάστηκαν στη παρούσα εργασία, ταυτοποιήθηκαν και χαρακτηρίστηκαν με ^1H και ^{13}C φασματοσκοπία NMR. Τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν σε όργανο 200 MHz Varian Mercury, που διαθέτει το Εργαστήριο Οργανικής Χημείας. Η συχνότητα συντονισμού NMR για τα φάσματα ^1H ήταν στα 200 MHz και για τα φάσματα ^{13}C στα 50 MHz. Τα φάσματα ^{13}C είναι πλήρως αποσυζευγμένα από πρωτόνιο. Οι δευτεριωμένοι διαλύτες που χρησιμοποιήθηκαν ήταν CDCl_3 , CD_3OD , $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$ και d_6 -DMSO των εταιριών Aldrich και Acros Organics. Οι χημικές μετατοπίσεις (δ) εκφράζονται σε ppm, ενώ οι σταθερές σύζευξης (J) σε Hz. Η κλίμακα δ (ppm) στα φάσματα ^1H NMR είναι βαθμονομημένη σύμφωνα με τη χημική μετατόπιση του πρωτονιωμένου συστατικού που βρίσκεται ως πρόσμιξη στους δευτεριωμένους που χρησιμοποιήθηκαν. Οι τιμές αυτές ορίστηκαν μέσω βιβλιογραφικών δεδομένων και είναι: α. CDCl_3 : 7.27 ppm, (χημική μετατόπιση πρόσμιξης CHCl_3), β. CD_3OD : 3.31 ppm (ο μέσος όρος των χημικών μετατοπίσεων όλων των πιθανών πρωτονιωμένων μορφών της CD_3OD), γ. $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$: 2.05 ppm, δ. d_6 -DMSO: 2.50 ppm (ο μέσος όρος των χημικών μετατοπίσεων όλων των πρωτονιωμένων μορφών του $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$). Η κλίμακα δ (ppm) στα φάσματα ^{13}C NMR είναι βαθμονομημένη σύμφωνα με τη χημική μετατόπιση των δευτεριωμένων διαλυτών που χρησιμοποιήθηκαν. Οι τιμές αυτές ορίστηκαν μέσω βιβλιογραφικών δεδομένων και είναι: α. CDCl_3 : 77.0 ppm, β. CD_3OD : 49.0 ppm, γ. $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$: 29.84 ppm, δ. d_6 -DMSO: 39.5 ppm.

6.2 Γενικό συνθετικό μέρος

6.2.1 Γενική μέθοδος εστεροποίησης – Μέθοδος Α

Σε διάλυμα του οξέος (1.00 mmol) σε ξηρό HMPA (5.0 mL), προστίθεται υπό ανάδευση Na_2CO_3 (126 mg, 1.19 mmol) και το μίγμα αναδεύεται για 30 min σε

θερμοκρασία δωματίου. Στη συνέχεια, προστίθεται κατά σειρά το αλογονίδιο (1.20 mmol) και καταλυτική ποσότητα ιωδιδίου του καλίου. Το μίγμα της αντίδρασης αναδεύεται για 48 h σε θερμοκρασία δωματίου. Έπειτα, το μίγμα μεταφέρεται ποσοτικά σε διαχωριστική χοάνη, όπου αραιώνεται με AcOEt (30 mL) και η οργανική φάση εκπλένεται κατά σειρά με HCl 0.5 N (5 mL) και κορεσμένο διάλυμα NaCl (5 mL). Η οργανική φάση συλλέγεται, ξηραίνεται με Na₂SO₄, διηθείται και συμπυκνώνεται υπό ελαττωμένη πίεση. Το προϊόν παραλαμβάνεται καθαρό με χρωματογραφία στήλης και σύστημα έκλουσης όπως περιγράφεται στις πειραματικές πορείες που ακολουθούν για κάθε ένωση ξεχωριστά.

6.2.2 Γενική μέθοδος εστεροποίησης – Μέθοδος Β

Σε διάλυμα του οξέος (1.00 mmol) σε ξηρό DME (3.0 mL), προστίθεται υπό ανάδευση SOCl₂ (6.00 mmol). Το μίγμα θερμαίνεται στους 70 °C για 4 h και έπειτα συμπυκνώνεται υπό ελαττωμένη πίεση έως ότου απομακρυνθεί πλήρως η περίσσεια SOCl₂. Το ενδιάμεσο επαναδιαλύθηκε σε ξηρό DME (3.0 mL) και στο διάλυμα που προκύπτει προστίθεται η αλκοόλη (1.00 mmol). Το μίγμα θερμαίνεται στους 70 °C για 16 h και στη συνέχεια συμπυκνώνεται υπό ελαττωμένη πίεση. Το προϊόν παραλαμβάνεται καθαρό με χρωματογραφία στήλης και σύστημα έκλουσης όπως περιγράφεται στις πειραματικές πορείες που ακολουθούν για κάθε ένωση ξεχωριστά.

6.2.3 Γενική μέθοδος εστεροποίησης – Μέθοδος Γ

Σε διάλυμα του οξέος (1.00 mmol) σε ξηρό CH₂Cl₂ (2.6 mL), προστίθεται υπό ανάδευση το χλωροφορμικό ισουβουτύλιο (4.40 mmol, 423 μL) και η ξηρή Et₃N (0.6 mL). Το μείγμα αφήνεται στους -15 °C για 1 h. Στη συνέχεια, προστίθεται υπό ψύξη η αλκοόλη (2.10 mmol) και καταλυτική ποσότητα DMAP. Το μείγμα αφήνεται σε θερμοκρασία δωματίου για 24 h. Έπειτα, το μίγμα μεταφέρεται ποσοτικά σε διαχωριστική χοάνη, όπου αραιώνεται με CH₂Cl₂ (50 mL) και η οργανική φάση εκπλένεται με HCl 0.5 N (5 mL). Η οργανική φάση συλλέγεται, ξηραίνεται με Na₂SO₄, διηθείται και συμπυκνώνεται υπό ελαττωμένη πίεση. Το προϊόν παραλαμβάνεται καθαρό με χρωματογραφία στήλης και σύστημα έκλουσης όπως περιγράφεται στις πειραματικές πορείες που ακολουθούν για κάθε ένωση ξεχωριστά.

Στη συνέχεια, πραγματοποιείται αντίδραση αποπροστασίας του εστέρα. Σε σφαιρική φιάλη που περιέχει τον προστατευμένο εστέρα (1.00 mmol) σε ξηρό CH_2Cl_2 (4.4 mL), προστίθεται υπό ανάδευση στους 0 °C η πιπεριδίνη (35.00 mmol). Το μείγμα αφήνεται σε θερμοκρασία δωματίου για 3 h. Το μίγμα μεταφέρεται ποσοτικά σε διαχωριστική χοάνη, όπου αραιώνεται με CH_2Cl_2 (50 mL) και η οργανική φάση εκπλένεται με HCl 0.5 N (5 mL). Η οργανική φάση συλλέγεται, ξηραίνεται με Na_2SO_4 , διηθείται και συμπυκνώνεται υπό ελαττωμένη πίεση. Το προϊόν παραλαμβάνεται καθαρό με χρωματογραφία στήλης και σύστημα έκλουσης όπως περιγράφεται στις πειραματικές πορείες που ακολουθούν για κάθε ένωση ξεχωριστά.

6.2.4 Γενική μέθοδος σύνθεσης αμιδίων – Μέθοδος Δ

Σε σφαιρική φιάλη προστίθενται κατά σειρά το οξύ (1.00 mmol), αμίνη (1.00 mmol), $\text{HOBT} \cdot \text{H}_2\text{O}$ (1.00 mmol), ξηρό CH_2Cl_2 (5.0 mL) και σταγόνες ξηρό DMF, όπου κρίνεται απαραίτητο για να υπάρχει διαυγές διάλυμα και το μίγμα ψύχεται στους 0 °C. Στη συνέχεια, προστίθεται $\text{EDC} \cdot \text{HCl}$ (1.00 mmol) και το μίγμα αναδεύεται στους 0 °C για 10 min και έπειτα σε θερμοκρασία δωματίου για 24 h. Το μίγμα μεταφέρεται ποσοτικά σε διαχωριστική χοάνη, όπου αραιώνεται με AcOEt (50 mL) και η οργανική φάση εκπλένεται κατά σειρά με HCl 0.5 N (5 mL), H_2O (5 mL) και κορεσμένο διάλυμα NaCl (5 mL). Η οργανική φάση συλλέγεται, ξηραίνεται με Na_2SO_4 , διηθείται και συμπυκνώνεται υπό ελαττωμένη πίεση. Το προϊόν παραλαμβάνεται καθαρό με χρωματογραφία στήλης και σύστημα έκλουσης όπως περιγράφεται στις πειραματικές πορείες που ακολουθούν για κάθε ένωση ξεχωριστά.

6.2.5 Γενική μέθοδος σύνθεσης αμιδίων – Μέθοδος Ε

Το οξύ (1.00 mmol) διαλύεται σε SOCl_2 (2.0 mL) και το μίγμα αναδεύεται στους 50 °C για 3 h. Το διάλυμα συμπυκνώνεται και το υπόλειμμα διαλύεται σε ξηρό CH_2Cl_2 (3.0 mL). Έπειτα, προστίθεται το διάλυμα της αμίνης (1.0 mmol) και Et_3N (2.00 mmol, 289 μL) σε ξηρό CH_2Cl_2 (2.0 mL). Το μίγμα αφήνεται σε θερμοκρασία δωματίου για 16 h και συμπυκνώνεται υπό ελαττωμένη πίεση. Το προϊόν παραλαμβάνεται καθαρό με χρωματογραφία

στήλης και σύστημα έκλουσης όπως περιγράφεται στις πειραματικές πορείες που ακολουθούν για κάθε ένωση ξεχωριστά.

6.2.6 Γενική μέθοδος σύνθεσης παραγώγων τριαζολίου – Μέθοδος Z

Ποσότητα ανιλίνης (1.00 mmol) διαλύεται υπό ψύξη σε H₂O (0.5 mL) και στη συνέχεια προστίθεται πυκνό HCl (0.3 mL) και NaNO₂ (1.10 mmol, 75.89 mg) σε H₂O (0.3 mL). Το μίγμα αφήνεται στους 0 °C για 10 min. Έπειτα, διάλυμα NaN₃ (2.00 mmol, 130 mg) σε H₂O (0.3 mL) προστίθεται στο μίγμα της αντίδρασης στους 0 °C και συνεχίζεται η ανάδευση σε θερμοκρασία δωματίου για 2 h. Το μίγμα εκχυλίζεται με Et₂O και ακολουθεί έκπλυση με H₂O μέχρι το pH να γίνει ουδέτερο. Η οργανική φάση συλλέγεται, ξηραίνεται με Na₂SO₄ και συμπυκνώνεται υπό ελαττωμένη πίεση (η θερμοκρασία στο υδρόλουτρο πρέπει να είναι μικρότερη από 25 °C) προκειμένου να παραληφθεί το αζίδιο, που χρησιμοποιήθηκε στη συνέχεια χωρίς περαιτέρω καθαρισμό.

Σε διάλυμα του προπάργυλο εστέρα (1.00 mmol) σε *t*-BuOH: H₂O = 1:1 (3.2 mL) προστίθεται κατά σειρά ασκορβικό νάτριο (0.25 mmol, 49.53 mg) και CuSO₄·5H₂O (0.0125 mmol, 3.12 mg) σε θερμοκρασία δωματίου. Στο παραπάνω μίγμα προστίθεται το αζίδιο που παρασκευάστηκε (0.12 mmol) και το μίγμα αναδεύεται σε θερμοκρασία δωματίου για 24 h. Έπειτα, μεταφέρεται ποσοτικά σε διαχωριστική χοάνη, όπου αραιώνεται με AcOEt (50 mL) και η οργανική φάση εκπλένεται με H₂O (5 mL). Η οργανική φάση συλλέγεται, ξηραίνεται με Na₂SO₄, διηθείται και συμπυκνώνεται υπό ελαττωμένη πίεση. Το προϊόν παραλαμβάνεται καθαρό με χρωματογραφία στήλης και σύστημα έκλουσης όπως περιγράφεται στις πειραματικές πορείες που ακολουθούν για κάθε ένωση ξεχωριστά.

6.2.7 Γενική μέθοδος σύνθεσης παραγώγων τριαζολίου – Μέθοδος H

Σε διάλυμα βρωμιδίου (1.60 mmol) σε ξηρό DMSO (5.0 mL), προστίθεται NaN₃ (1.3 mmol, 84.50 mg) και το μίγμα αναδεύεται σε θερμοκρασία δωματίου για 24 h. Στη συνέχεια, προστίθεται κατά σειρά προπάργυλο εστέρας (1.00 mmol), CuSO₄·5H₂O (0.25 mmol, 62.42 mg), ασκορβικό νάτριο (0.16 mmol, 31.70 mg) και H₂O (5.0 mL) και το διάλυμα αναδεύεται σε θερμοκρασία δωματίου για 24 h. Έπειτα, το διάλυμα μεταφέρεται ποσοτικά σε διαχωριστική χοάνη, όπου αραιώνεται με AcOEt (30 mL) και η οργανική φάση

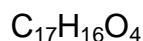
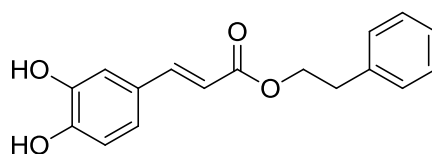
εκπλένεται κατά σειρά με HCl 0.5 N (5 mL), H₂O (5 mL) και κορεσμένο διάλυμα NaCl (5 ml). Η οργανική φάση συλλέγεται, ξηραίνεται με Na₂SO₄, διηθείται και συμπυκνώνεται υπό ελαττωμένη πίεση. Το προϊόν παραλαμβάνεται καθαρό με χρωματογραφία στήλης και σύστημα έκλουσης όπως περιγράφεται στις πειραματικές πορείες που ακολουθούν για κάθε ένωση ξεχωριστά.

6.3 Σύνθεση και χαρακτηρισμός χημικών ενώσεων

Οι ενώσεις που συντέθηκαν με τη Μέθοδο Α είναι:

(E)-φαιναιθυλεστέρας του 3-(3,4-διυδροξυφαινυλο)ακρυλικού οξέος (106)

[237], [238]



Mol. Wt.: 284.307

Η παραπάνω ένωση παρασκευάστηκε σύμφωνα με τη γενική μέθοδο εστεροποίησης Α από το (2-βρωμοαιθυλο)βενζόλιο **(130)** (0.163 mL, 1.2 mmol) και το καφεϊκό οξύ ((E)-3-(3,4-διυδροξυφαινυλο)ακρυλικό οξύ) **(102)**. Το προϊόν καθαρίστηκε με χρωματογραφία στήλης και σύστημα έκλουσης PE/AcOEt = 1:1 και παραλήφθηκε ως υποκίτρινο λάδι.

α = 76% (0.245g)

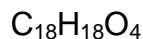
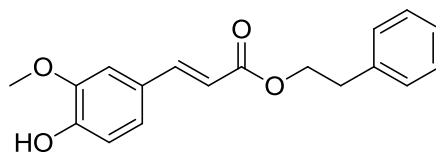
R_f = (PE/AcOEt 1:1) = 0.53

¹H NMR (200MHz, d₆-DMSO) δ 9.42 (br s, 2H, 2x(OH)), 7.47 (d, J = 15.9 Hz, 1H, Ph-CH), 7.28-6.76 (m, 8H, Αρωματικά Πρωτόνια), 6.25 (d, J = 15.9 Hz, 1H, CH-COO), 4.31 (t, J = 6.7 Hz, 2H, COO-CH₂), 2.94 (t, J = 6.7 Hz, 2H, CH₂-Ph).

¹³C NMR (50 MHz, d₆-DMSO) δ 166.6 (COO), 148.6, 145.7, 145.3, 138.2, 129.0, 128.5, 126.5, 125.6, 121.5, 115.8, 114.9, 113.9, 64.4, 34.6.

MS (ESI) m/z υπολογίζεται για C₁₇H₁₅O₄⁻ [M-H]⁻ 283.1, βρέθηκε 283.1.

**(E)-φαιναιθυλεστέρας του 3-(4-υδροξυ-3-μεθοξυφαινυλο)ακρυλικού οξέος
(107) ^{[239], [240]}**



Mol. Wt.: 298.333

Η ένωση παρασκευάστηκε σύμφωνα με τη γενική μέθοδο εστεροποίησης Α από το (2-βρωμοαιθυλο)βενζόλιο **(130)** (0.163 mL, 1.2 mmol) και το φερουλικό οξύ ((E)-3-(4-υδροξυ-3-μεθοξυφαινυλο)ακρυλικό οξύ) **(103)**. Το προϊόν καθαρίστηκε με χρωματογραφία στήλης και σύστημα έκλουσης PE/AcOEt = 7:3 και παραλήφθηκε ως υποκίτρινο λάδι.

α = 76% (0.227 g)

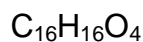
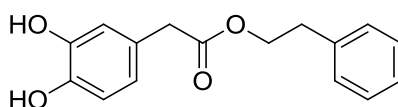
R_f = (PE/AcOEt 7:3) = 0.54

^1H NMR (200 MHz, CDCl_3) δ 7.60 (d, J = 15.9 Hz, 1H, Ph-CH), 7.32-6.89 (m, 8H, Αρωματικά Πρωτόνια), 6.27 (d, J = 15.9 Hz, 1H, CH-COO), 5.98 (s, 1H, OH), 4.42 (t, J = 7.0 Hz, 2H, COO-CH₂), 3.90 (s, 3H, CH₃), 3.01 (t, J = 7.0 Hz, 2H, CH₂-Ph).

^{13}C NMR (50 MHz, CDCl_3) δ 167.2 (COO), 147.9, 146.7, 144.9, 137.9, 128.9, 128.5, 126.9, 126.5, 123.1, 115.3, 114.7, 109.2, 64.8, 55.9, 35.2.

MS (ESI) m/z υπολογίζεται για $\text{C}_{18}\text{H}_{17}\text{O}_4^-$ [M-H]⁻ 297.1, βρέθηκε 297.1.

Φαιναιθυλεστέρας του 2-(3,4-διυδροξυφαινυλο)οξικού οξέος (108) ^[241]



Mol. Wt.: 272.296

Η ένωση παρασκευάστηκε σύμφωνα με τη γενική μέθοδο εστεροποίησης Α από το (2-βρωμοαιθυλο)βενζόλιο **(130)** (0.163 mL, 1.2 mmol) και το 3,4-

διυδροξυφαινυλοξικό οξύ (**104**). Το προϊόν καθαρίστηκε με χρωματογραφία στήλης και σύστημα έκλουσης PE/AcOEt = 1:1 και παραλήφθηκε ως άχρωμο λάδι.

α = 96% (0.261g)

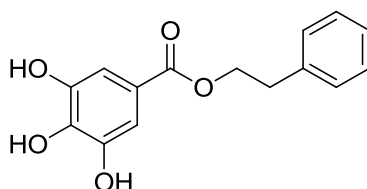
R_f = (PE/AcOEt 1:1) = 0.63

^1H NMR (200 MHz, CDCl_3) δ 7.34-7.14 (m, 5H, Αρωματικά Πρωτόνια), 6.72-6.56 (m, 3H, Αρωματικά Πρωτόνια), 6.28 (br s, 1H, OH), 6.15 (br s, 1H, OH), 4.32 (t, J = 7.0 Hz, 2H, COO-CH_2), 3.47 (s, 2H, CH-COO), 2.92 (t, J = 7.0 Hz, 2H, $\text{CH}_2\text{-Ph}$).

^{13}C NMR (50 MHz, CDCl_3) δ 173.3 (COO), 143.7, 143.1, 137.5, 128.9, 128.5, 126.5, 125.9, 121.7, 116.3, 115.4, 65.8, 40.6, 34.9.

MS (ESI) m/z υπολογίζεται για $\text{C}_{16}\text{H}_{15}\text{O}_4^-$ $[\text{M-H}]^-$ 271.1, βρέθηκε 271.1.

Φαιναιθυλεστέρας του 3,4,5-τριυδροξυβενζοϊκού οξέος (**109**)



$\text{C}_{15}\text{H}_{14}\text{O}_5$

Mol. Wt.: 274.269

Η ένωση παρασκευάστηκε σύμφωνα με τη γενική μέθοδο εστεροποίησης Α από το (2-βρωμοαιθυλο)βενζόλιο (**130**) (0.163 mL, 1.2 mmol) και το γαλλικό οξύ (3,4,5-τριυδροξυβενζοϊκό οξύ) (**105**). Το προϊόν καθαρίστηκε με χρωματογραφία στήλης και σύστημα έκλουσης PE/AcOEt = 5:7 και παραλήφθηκε ως λευκό στερεό.

α = 36% (0.099 g)

R_f = (PE/AcOEt 5:7) = 0.46

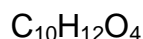
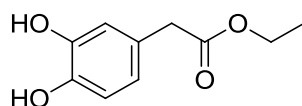
^1H NMR (200 MHz, $\text{d}_6\text{-DMSO}$) δ 9.30 (br s, 2H, $2\times(\mu\text{-OH})$), 8.99 (br s, 1H, $\pi\text{-OH}$), 7.32-7.19 (m, 5H, Αρωματικά Πρωτόνια), 6.93 (s, 2H, Αρωματικά

Πρωτόνια), 4.36 (t, $J = 6.7$ Hz, 2H, COO-CH₂), 2.98 (t, $J = 6.7$ Hz, 2H, CH₂-Ph).

¹³C NMR (50 MHz, d₆-DMSO) δ 163.4 (COO), 143.2, 136.1, 135.9, 126.6, 126.0, 124.0, 117.0, 106.1, 62.3, 32.2.

MS (ESI) m/z υπολογίζεται για C₁₅H₁₃O₅⁻ [M-H]⁻ 273.1, βρέθηκε 273.0.

Αιθυλεστέρας του 2-(3,4-διυδροξυφαινυλο)οξικού οξέος (110) ^{[242], [243]}



Mol. Wt.: 196.200

Η ένωση παρασκευάστηκε σύμφωνα με τη γενική μέθοδο εστεροποίησης Α από το βρωμοαιθάνιο (**131**) (0.089 mL, 1.2 mmol) και το 3,4-διυδροξυφαινυλοξικό οξύ (**104**). Το προϊόν καθαρίστηκε με χρωματογραφία στήλης και σύστημα έκλουσης PE/AcOEt = 1:1 και παραλήφθηκε ως υποκίτρινο λάδι.

$\alpha = 81\%$ (0.159 g)

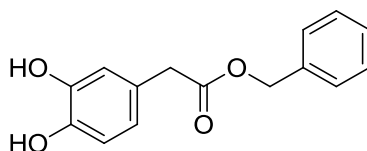
$R_f = (\text{PE/AcOEt } 1:1) = 0.56$

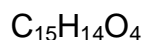
¹H NMR (200 MHz, CDCl₃) δ 6.74-6.59 (m, 3H, Αρωματικά Πρωτόνια), 6.16 (br s, 2H, 2x(OH)), 4.16 (q, $J = 7.1$ Hz, 2H, COO-CH₂), 3.49 (s, 2H, Ph-CH₂), 1.26 (t, $J = 7.1$ Hz, 3H, CH₃).

¹³C NMR (50 MHz, CDCl₃) δ 173.7 (COO), 143.8, 143.1, 125.9, 121.6, 116.3, 115.4, 61.5, 40.6, 14.0.

MS (ESI) m/z υπολογίζεται για C₁₀H₁₁O₄⁻ [M-H]⁻ 195.1, βρέθηκε 195.0.

Βενζυλεστέρας του 2-(3,4-διυδροξυφαινυλο)οξικού οξέος (111) ^[244]





Mol. Wt.: 258.269

Η ένωση παρασκευάστηκε σύμφωνα με τη γενική μέθοδο εστεροποίησης Α από το βενζυλοβρωμίδιο **(132)** (0.143 mL, 1.2 mmol) και το 3,4-διυδροξυφαινυλοξικό οξύ **(104)**. Το προϊόν καθαρίστηκε με χρωματογραφία στήλης και σύστημα έκλουσης PE/AcOEt = 1:1 και παραλήφθηκε ως λευκό στερεό.

α = 78% (0.201 g)

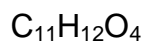
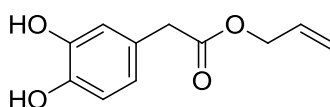
R_f = (PE/AcOEt 1:1) = 0.59

^1H NMR (200 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$) δ 7.90 (s, 1H, (OH)), 7.87 (s, 1H, (OH)), 7.36-7.22 (m, 5H, Αρωματικά Πρωτόνια), 6.84-6.61 (m, 3H, Αρωματικά Πρωτόνια), 5.11 (s, 2H, COO-CH_2), 3.54 (s, 2H, $\text{CH}_2\text{-COO}$).

^{13}C NMR (50 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$) δ 172.0 (COO), 145.7, 144.9, 137.4, 129.2, 128.8, 128.6, 126.8, 121.5, 117.2, 115.9, 66.6, 40.9.

MS (ESI) m/z υπολογίζεται για $\text{C}_{15}\text{H}_{18}\text{NO}_4^+$ $[\text{M}+\text{NH}_4]^+$ 276.1, βρέθηκε 276.0.

Αλλυλεστέρας του 2-(3,4-διυδροξυφαινυλο)οξικού οξέος **(112)** ^[242]



Mol. Wt.: 208.211

Η ένωση παρασκευάστηκε σύμφωνα με τη γενική μέθοδο εστεροποίησης Α από το αλλυλοβρωμίδιο **(133)** (0.104 mL, 1.2 mmol) και το 3,4-διυδροξυφαινυλοξικό οξύ **(104)**. Το προϊόν καθαρίστηκε με χρωματογραφία στήλης και σύστημα έκλουσης PE/AcOEt = 1:1 και παραλήφθηκε ως λευκό στερεό.

α = 97% (0.202 g)

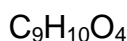
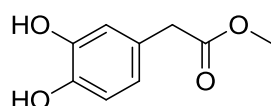
R_f = (PE/AcOEt 1:1) = 0.60

^1H NMR (200 MHz, CDCl_3) δ 6.72-6.58 (m, 3H, Αρωματικά Πρωτόνια), 6.18 (s, 2H, 2x(OH)), 5.96-5.79 (m, 1H, CH), 5.32-5.19 (m, 2H, $=\text{CH}_2$), 4.61-4.57 (m, 2H, COO-CH_2), 3.51 (s, 2H, Ph-CH_2).

^{13}C NMR (50 MHz, CDCl_3) δ 173.2 (COO), 143.8, 143.1, 131.5, 125.8, 121.7, 118.7, 116.4, 115.4, 65.9, 40.5.

MS (ESI) m/z υπολογίζεται για $\text{C}_{11}\text{H}_{11}\text{O}_4^-$ $[\text{M-H}]^-$ 207.1, βρέθηκε 207.1.

Μεθυλεστέρας του 2-(3,4-διυδροξυφαινυλο)οξικού οξέος (113) ^{[245], [246]}



Mol. Wt.: 182.173

Η ένωση παρασκευάστηκε σύμφωνα με τη γενική μέθοδο εστεροποίησης Α από το μεθυλοϊωδίδιο (**134**) (0.078 mL, 1.2 mmol) και το 3,4-διυδροξυφαινυλοξικό οξύ (**104**). Το προϊόν καθαρίστηκε με χρωματογραφία στήλης και σύστημα έκλουσης $\text{PE/AcOEt} = 1:1$ και παραλήφθηκε ως άχρωμο λάδι.

$\alpha = 92\%$ (0.168 g)

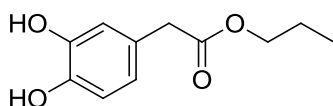
$R_f = (\text{PE/AcOEt } 1:1) = 0.56$

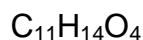
^1H NMR (200 MHz, CDCl_3) δ 6.79-6.53 (m, 3H, Αρωματικά Πρωτόνια), 5.95 (br s, 2H, 2x(OH)), 3.70 (s, 3H, CH_3), 3.50 (s, 2H, CH_2).

^{13}C NMR (50 MHz, CDCl_3) δ 174.1 (COO), 143.7, 143.4, 125.8, 121.6, 116.3, 115.5, 52.5, 40.3.

MS (ESI) m/z υπολογίζεται για $\text{C}_9\text{H}_9\text{O}_4^-$ $[\text{M-H}]^-$ 181.1, βρέθηκε 181.1.

Προπυλεστέρας του 2-(3,4-διυδροξυφαινυλο)οξικού οξέος (114)





Mol. Wt.: 210.226

Η ένωση παρασκευάστηκε σύμφωνα με τη γενική μέθοδο εστεροποίησης Α από το προπυλοβρωμίδιο (**135**) (0.109 mL, 1.2 mmol) και το 3,4-διυδροξυφαινυλοξικό οξύ (**104**). Το προϊόν καθαρίστηκε με χρωματογραφία στήλης και σύστημα έκλουσης PE/AcOEt = 1:1 και παραλήφθηκε ως υποκίτρινο λάδι.

α = 92% (0.193 g)

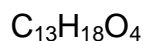
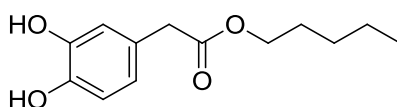
R_f = (PE/AcOEt 1:1) = 0.6

^1H NMR (200 MHz, CDCl_3) δ 6.62 (m, 5H, Αρωματικά πρωτόνια και 2x(OH)), 4.05 (t, J = 6.7 Hz, 2H, COO-CH_2), 3.49 (s, 2H, Ph-CH_2), 1.62 (m, 2H, $\text{CH}_2\text{-CH}_3$), 0.90 (t, J = 7.4 Hz, 3H, CH_3).

^{13}C NMR (50 MHz, CDCl_3) δ 173.8 (COO), 143.8, 143.1, 125.9, 121.6, 116.3, 115.4, 67.0, 40.6, 21.8, 10.3.

MS (ESI) m/z υπολογίζεται για $\text{C}_{11}\text{H}_{13}\text{O}_4^-$ $[\text{M-H}]^-$ 209.1, βρέθηκε 209.1.

Πεντυλεστέρας του 2-(3,4-διυδροξυφαινυλο)οξικού οξέος (**115**)



Mol. Wt.: 238.280

Η ένωση παρασκευάστηκε σύμφωνα με τη γενική μέθοδο εστεροποίησης Α από το πεντυλοβρωμίδιο (**136**) (0.126 mL, 1.2 mmol) και το 3,4-διυδροξυφαινυλοξικό οξύ (**104**). Το προϊόν καθαρίστηκε με χρωματογραφία στήλης και σύστημα έκλουσης PE/AcOEt = 1:1 και παραλήφθηκε ως υποκίτρινο λάδι.

α = 93% (0.222 g)

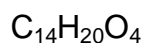
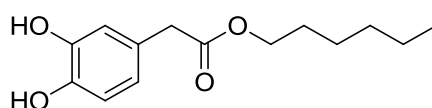
R_f = (PE/AcOEt 1:1) = 0.71

^1H NMR (200 MHz, CDCl_3) δ 6.76-6.36 (m, 5H, Αρωματικά Πρωτόνια και 2x(OH)), 4.11 (t, J = 6.7 Hz, 2H, COO-CH_2), 3.50 (s, 2H, Ph-CH_2), 1.78-1.45 (m, 2H, $\text{COO-CH}_2\text{-CH}_2$), 1.43-1.17 (m, 4H, $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_3$), 0.90 (t, J = 6.3 Hz, 3H, CH_3).

^{13}C NMR (50 MHz, CDCl_3) δ 173.8 (COO), 143.8, 143.1, 125.9, 121.5, 116.3, 115.4, 65.6, 40.6, 28.1, 27.9, 22.2, 13.9.

MS (ESI) m/z υπολογίζεται για $\text{C}_{13}\text{H}_{17}\text{O}_4^-$ $[\text{M-H}]^-$ 237.1, βρέθηκε 237.0.

Εξυλεστέρας του 2-(3,4-διυδροξυφαινυλο)οξικού οξέος (116)



Mol. Wt.: 252.306

Η ένωση παρασκευάστηκε σύμφωνα με τη γενική μέθοδο εστεροποίησης Α από το εξυλοβρωμίδιο **(137)** (0.168 mL, 1.2 mmol) και το 3,4-διυδροξυφαινυλοξικό οξύ **(104)**. Το προϊόν καθαρίστηκε με χρωματογραφία στήλης και σύστημα έκλουσης PE/AcOEt = 1:1 και παραλήφθηκε ως άχρωμο λάδι.

α = 89% (0.225 g)

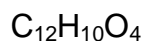
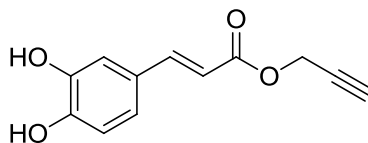
R_f = (PE/AcOEt 1:1) = 0.75

^1H NMR (200 MHz, CDCl_3) δ 6.74-6.59 (m, 3H, Αρωματικά Πρωτόνια), 6.17 (br s, 2H, 2x(OH)), 4.10 (t, J = 6.6 Hz, 2H, COO-CH_2), 3.49 (s, 2H, Ph-CH_2), 1.66-1.55 (m, 2H, $\text{COO-CH}_2\text{-CH}_2$), 1.38-1.27 (m, 6H, $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_3$), 0.87 (t, J = 6.6 Hz, 3H, CH_3).

^{13}C NMR (50 MHz, CDCl_3) δ 173.8 (COO), 143.8, 143.1, 125.9, 121.6, 116.3, 115.4, 65.6, 40.6, 31.3, 28.4, 25.4, 22.5, 13.9.

MS (ESI) m/z υπολογίζεται για $\text{C}_{14}\text{H}_{19}\text{O}_4^-$ $[\text{M-H}]^-$ 251.1, βρέθηκε 251.0.

**(E)-προπ-2-υν-υλεστέρας του 3-(3,4-διυδροξυφαινυλο)ακρυλικού οξέος
(117) ^{[247], [248]}**



Mol. Wt.: 218.205

Η ένωση παρασκευάστηκε σύμφωνα με τη γενική μέθοδο εστεροποίησης Α από το 3-βρώμο προπύνιο (**138**) (0.076 mL, 1.0 mmol) και το καφεϊκό οξύ ((E)-3-(3,4-διυδροξυφαινυλο)ακρυλικό οξύ) (**103**). Το προϊόν καθαρίστηκε με χρωματογραφία στήλης και σύστημα έκλουσης PE/AcOEt = 1:1 και παραλήφθηκε ως λευκό στερεό.

$\alpha = 47\%$ (0.103 g)

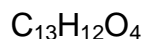
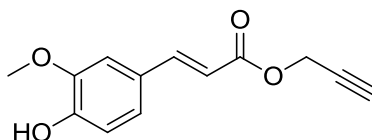
$R_f = (\text{PE/AcOEt } 1:1) = 0.44$

^1H NMR (200 MHz, d_6 -DMSO) δ 7.52 (d, $J = 15.9$ Hz, 1H, Ph-CH), 7.08-6.74 (m, 3H, Αρωματικά Πρωτόνια), 6.30 (d, $J = 15.9$ Hz, 1H, CH-COO), 4.78 (t, $J = 2.2$ Hz, 2H, COO-CH₂), 3.56-3.53 (m, 1H, CH), 3.36 (2, 2H, 2x(OH)).

^{13}C NMR (50 MHz, d_6 -DMSO) δ 165.9 (COO), 148.78, 146.3, 145.7, 125.4, 121.8, 115.8, 115.0, 113.0, 78.8, 77.6, 51.6.

MS (ESI) m/z υπολογίζεται για $\text{C}_{12}\text{H}_9\text{O}_4^-$ [M-H]⁻ 217.1, βρέθηκε 217.0.

**(E)-προπ-2-υν-1-υλεστέρας του 3-(4-υδροξυ-3-μεθοξυφαινυλο)ακρυλικού
οξέος (118) ^[249]**



Mol. Wt.: 232.232

Η ένωση παρασκευάστηκε σύμφωνα με τη γενική μέθοδο εστεροποίησης Α από το 3-βρώμο προπύνιο (**138**) (0.076 mL, 1.0 mmol) και το φερουλικό οξύ

((E)-3-(4-υδροξυ-3-μεθοξυφαινυλο)ακρυλικό οξύ) **(103)**. Το προϊόν καθαρίστηκε με χρωματογραφία στήλης και σύστημα έκλουσης PE/AcOEt = 8:2 και παραλήφθηκε ως υποκίτρινο στερεό.

α = 91% (0.211 g)

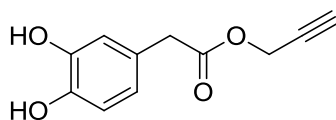
R_f = (PE/AcOEt 8:2) = 0.33

^1H NMR (200 MHz, CDCl_3) δ 7.67 (d, J = 15.9 Hz, 1H, Ph-CH), 7.11-6.90 (m, 3H, Αρωματικά Πρωτόνια), 6.32 (d, J = 15.9 Hz, 1H, CH-COO), 5.95 (s, 1H, OH), 4.81 (d, J = 2.5 Hz, 2H, COO-CH₂), 3.93 (s, 3H, CH₃), 2.51 (t, J = 2.5 Hz, 1H, CH).

^{13}C NMR (50 MHz, CDCl_3) δ 166.3 (COO), 148.2, 146.8, 146.0, 127.7, 123.3, 114.8, 114.3, 109.4, 77.6, 74.8, 55.9, 51.9.

MS (ESI) m/z υπολογίζεται για $\text{C}_{13}\text{H}_{11}\text{O}_4^-$ [M-H]⁻ 231.1, βρέθηκε 231.0.

Προπ-2-υν-1-υλεστέρας του 2-(3,4-διυδροξυφαινυλο)οξικού οξέος (121)



$\text{C}_{11}\text{H}_{10}\text{O}_4$

Mol. Wt.: 206.195

Η ένωση παρασκευάστηκε σύμφωνα με τη γενική μέθοδο εστεροποίησης Α από το 3-βρώμο προπύνιο **(138)** (0.076 mL, 1.0 mmol) και το 3,4-διυδροξυφαινυλοξικό οξύ **(104)**. Το προϊόν καθαρίστηκε με χρωματογραφία στήλης και σύστημα έκλουσης PE/AcOEt = 1:1 και παραλήφθηκε ως λευκό στερεό.

α = 88% (0.181 g)

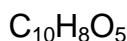
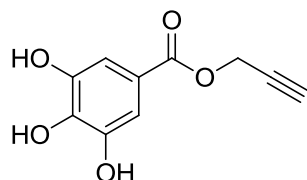
R_f = (PE/AcOEt 1:1) = 0.81

^1H NMR (200 MHz, d_6 -DMSO) δ 8.88 (s, 2H, 2x(OH)), 6.66-6.44 (m, 3H, Αρωματικά Πρωτόνια), 4.66-4.64 (m, 2H, COO-CH₂), 3.51-3.40 (m, 2H, Ph-CH₂), 2.48-2.45 (m, 1H, CH).

^{13}C NMR (50 MHz, $\text{d}_6\text{-DMSO}$) δ 171.5 (COO), 145.7, 144.9, 125.2, 120.7, 117.3, 116.1, 79.1, 78.4, 52.5, 41.3.

MS (ESI) m/z υπολογίζεται για $\text{C}_{11}\text{H}_9\text{O}_4^-$ $[\text{M}-\text{H}]^-$ 205.1, βρέθηκε 205.1.

Προπ-2-υν-1-υλεστέρας του 3,4,5-τριυδροξυβενζοϊκού οξέος (120)



Mol. Wt.: 208.168

Η ένωση παρασκευάστηκε σύμφωνα με τη γενική μέθοδο εστεροποίησης Α από το 3-βρώμο προπύνιο (**138**) (0.076 mL, 1.0 mmol) και το γαλλικό οξύ (**105**). Το προϊόν καθαρίστηκε με χρωματογραφία στήλης και σύστημα έκλουσης PE/AcOEt = 1:1 και παραλήφθηκε ως λευκό στερεό.

α = 27% (0.056 g)

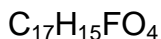
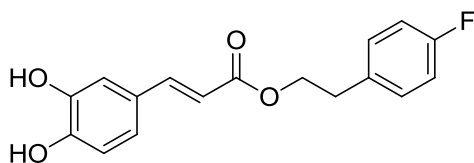
R_f = (PE/AcOEt 1:1) = 0.38

^1H NMR (200 MHz, CD_3COCD_3) δ 8.35 (br s, 3H, 3x(OH)), 7.13-7.09 (m, 2H, Αρωματικά Πρωτόνια), 4.90-4.84 (m, 2H, CH_2), 3.06 (t, J = 2.4 Hz, 1H, CH).

MS (ESI) m/z υπολογίζεται για $\text{C}_{10}\text{H}_7\text{O}_5^-$ $[\text{M}-\text{H}]^-$ 207.2, βρέθηκε 207.1.

Οι ενώσεις που συντέθηκαν με τη Μέθοδο Β είναι:

(*E*)-4-φθοροφαιναιθυλεστέρας του 3-(3,4-διυδροξυφαινυλο)ακρυλικού οξέος (121) ^{[250], [251]}



Mol. Wt.: 302.297

Η ένωση παρασκευάστηκε σύμφωνα με τη γενική μέθοδο εστεροποίησης B από την 2-(4-φθοροφαινυλο)αιθανόλη (**139**) (0.125 mL, 1.0 mmol) και το καφεϊκό οξύ ((*E*)-3-(3,4 διυδροξυφαινυλο)ακρυλικό οξύ) (**102**). Το προϊόν καθαρίστηκε με χρωματογραφία στήλης και σύστημα έκλουσης PE/AcOEt = 1:1 και παραλήφθηκε ως λευκό στερεό.

α = 48% (0.145 g)

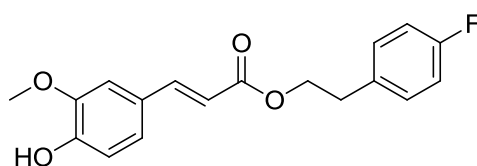
R_f = (PE/AcOEt 1:1) = 0.57

^1H NMR (200 MHz, CD_3OD) δ 7.49 (d, J = 15.9 Hz, 1H, Ph-CH), 7.25-6.75 (m, 7H, Αρωματικά Πρωτόνια), 6.19 (d, J = 15.9 Hz, 1H, CH-COO), 5.00 (br s, 2H, 2x(OH)), 4.29 (t, J = 6.9 Hz, 2H, COO-CH₂), 2.91 (t, J = 6.9 Hz, 2H, CH₂-Ph).

^{13}C NMR (50 MHz, CD_3OD) δ 169.1 (COO), 163.0 (d, $^1J_{\text{C-F}}$ = 242.9 Hz), 149.5, 146.9, 146.7, 135.3 (d, $^4J_{\text{C-F}}$ = 3.2 Hz), 131.6 (d, $^3J_{\text{C-F}}$ = 7.9 Hz), 127.6, 122.9, 116.5, 116.0 (d, $^2J_{\text{C-F}}$ = 21.4 Hz), 115.2, 115.0, 66.0, 35.2.

MS (ESI) m/z υπολογίζεται για $\text{C}_{17}\text{H}_{14}\text{FO}_4^-$ [M-H]⁻ 301.1, βρέθηκε 301.1.

(*E*)-4-φθοροφαιναιθυλεστέρας του 3-(4-υδροξυ-3-μεθοξυφαινυλο)ακρυλικού οξέος (122)



$\text{C}_{18}\text{H}_{17}\text{FO}_4$

Mol. Wt.: 316.324

Η ένωση παρασκευάστηκε σύμφωνα με τη γενική μέθοδο εστεροποίησης B από την 2-(4-φθοροφαινυλο)αιθανόλη (**139**) (0.125 mL, 1.0 mmol) και το φερουλικό οξύ ((*E*)-3-(4-υδροξυ-3-μεθοξυφαινυλο)ακρυλικό οξύ) (**103**). Το προϊόν καθαρίστηκε με χρωματογραφία στήλης και σύστημα έκλουσης PE/AcOEt = 7:3 και παραλήφθηκε ως υποκίτρινο λάδι.

α = 31% (0.098 g)

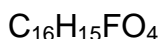
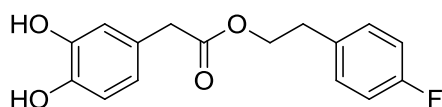
R_f = (PE/AcOEt 7:3) = 0.58

^1H NMR (200 MHz, CDCl_3) δ 7.59 (d, $J = 15.9$ Hz, 1H, Ph-CH), 7.25-6.89 (m, 7H, Αρωματικά Πρωτόνια), 6.25 (d, $J = 16.2$ Hz, 1H, CH-COO), 5.86 (s, 1H, OH), 4.38 (t, $J = 6.9$ Hz, 2H, COO-CH₂), 3.92 (s, 3H, CH₃), 2.98 (t, $J = 7.0$ Hz, 2H, CH₂-Ph).

^{13}C NMR (50 MHz, CDCl_3) δ 167.1 (COO), 161.7 (d, $^1J_{\text{C-F}} = 244.6$ Hz), 148.0, 146.7, 145.1, 133.6 (d, $^4J_{\text{C-F}} = 3.3$ Hz), 130.3 (d, $^3J_{\text{C-F}} = 7.9$ Hz), 126.9, 123.1, 115.5 (d, $^2J_{\text{C-F}} = 13.7$ Hz), 115.2, 114.9, 109.3, 64.8, 55.9, 34.4.

MS (ESI) m/z υπολογίζεται για $\text{C}_{18}\text{H}_{16}\text{FO}_4^-$ [M-H]⁻ 315.1, βρέθηκε 315.0.

4-φθοροφαιναιθυλεστέρας του 2-(3,4-διυδροξυφαινυλο)οξικού οξέος (123)



Mol. Wt.: 290.286

Η ένωση παρασκευάστηκε σύμφωνα με τη γενική μέθοδο εστεροποίησης B από την 2-(4-φθοροφαινυλο)αιθανόλη (**139**) (0.125 mL, 1.0 mmol) και το 3,4-διυδροξυφαινυλοξικό οξύ (**104**). Το προϊόν καθαρίστηκε με χρωματογραφία στήλης και σύστημα έκλουσης PE/AcOEt = 1:1 και παραλήφθηκε ως υποκίτρινο λάδι.

$\alpha = 30\%$ (0.087 g)

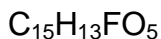
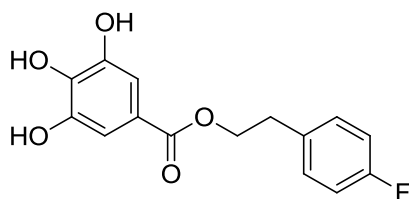
$R_f = (\text{PE/AcOEt } 1:1) = 0.65$

^1H NMR (200 MHz, CDCl_3) δ 7.13-6.59 (m, 7H, Αρωματικά Πρωτόνια), 5.85 (s, 1H, OH), 5.66 (s, 1H, OH), 4.30 (t, $J = 6.8$ Hz, 2H, COO-CH₂), 3.47 (s, 2H, CH₂-COO), 2.90 (t, $J = 6.8$ Hz, 2H, CH₂-Ph).

^{13}C NMR (50 MHz, CDCl_3) δ 172.7 (COO), 164.1 (d, $^1J_{\text{C-F}} = 230.7$ Hz), 143.7, 143.0, 133.2 (d, $^4J_{\text{C-F}} = 2.9$ Hz), 130.3 (d, $^3J_{\text{C-F}} = 7.8$ Hz), 126.1, 121.8, 115.8 (d, $^2J_{\text{C-F}} = 21.4$ Hz), 115.4, 115.0, 65.5, 40.7, 34.1.

MS (ESI) m/z υπολογίζεται για $\text{C}_{16}\text{H}_{14}\text{FO}_4^-$ [M-H]⁻ 289.1, βρέθηκε 289.1.

4-φθοροφαιναιθυλεστέρας του 3,4,5-τριυδροξυβενζοϊκού οξέος (124)



Mol. Wt.: 292.259

Η ένωση παρασκευάστηκε σύμφωνα με τη γενική μέθοδο εστεροποίησης Β από την 2-(4-φθοροφαινυλο)αιθανόλη (**139**) (0.125 mL, 1.0 mmol) και το γαλλικό οξύ (3,4,5-τριυδροξυβενζοϊκό οξύ) (**105**). Το προϊόν καθαρίστηκε με χρωματογραφία στήλης και σύστημα έκλουσης PE/AcOEt = 5:7 και παραλήφθηκε ως υποκίτρινο στερεό. Επίσης, παραλήφθηκε μικρή ποσότητα της αλκοόλης που χρησιμοποιήθηκε.

α = 46% (0.134 g)

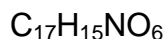
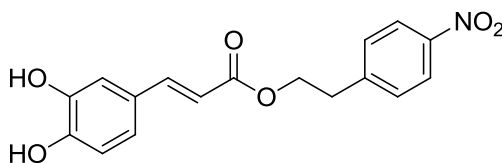
R_f = (PE/AcOEt 5:7) = 0.41

^1H NMR (200 MHz, CD_3OD) δ 7.33-7.26 (m, 2H, Αρωματικά Πρωτόνια), 7.07-6.98 (m, 4H, Αρωματικά Πρωτόνια), 4.88 (s, 3H, 3x(OH)), 4.40 (t, J = 6.7 Hz, 2H, COO- CH_2), 3.01 (t, J = 6.7 Hz, 2H, CH_2 -Ph).

^{13}C NMR (50 MHz, CD_3OD) δ 168.3 (COO), 163.1 (d, $^1J_{\text{C-F}}$ = 242.7 Hz), 146.5, 137.1, 135.5 (d, $^4J_{\text{C-F}}$ = 3.2 Hz), 131.7 (d, $^3J_{\text{C-F}}$ = 8.0 Hz), 121.5, 116.1 (d, $^2J_{\text{C-F}}$ = 21.3 Hz), 110.0, 66.3, 35.4.

MS (ESI) m/z υπολογίζεται για $\text{C}_{15}\text{H}_{12}\text{FO}_5^-$ [M-H] $^-$ 291.1, βρέθηκε 291.1.

(*E*)-4-νιτροφαιναιθυλεστέρας του 3-(3,4-διυδροξυφαινυλο)ακρυλικού οξέος (125) ^{[252], [253]}



Mol. Wt.: 329.304

Η ένωση παρασκευάστηκε σύμφωνα με τη γενική μέθοδο εστεροποίησης Β από την 2-(4-νιτροφαινυλο)αιθανόλη **(140)** (0.1672 g, 1.0 mmol) και το καφεϊκό οξύ ((*E*)-3-(3,4-διϋδροξυφαινυλο)ακρυλικό οξύ) **(102)**. Το προϊόν καθαρίστηκε με χρωματογραφία στήλης και σύστημα έκλουσης PE/AcOEt = 1:1 και παραλήφθηκε ως κιτρινοπράσινο λάδι.

α = 48% (0.158 g)

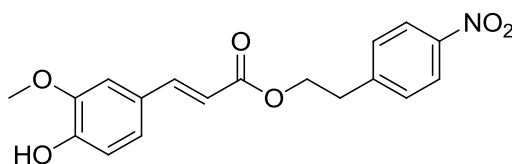
R_f = (PE/AcOEt 7:3) = 0.46

^1H NMR (200 MHz, CD_3OD) δ 8.18 (d, J = 8.8 Hz, 1H, Ph=CH), 7.50 (m, 3H, Αρωματικά Πρωτόνια), 7.01-6.74 (m, 4H, Αρωματικά Πρωτόνια), 6.21 (d, J = 15.9 Hz, 1H, CH-COO), 4.89 (s, 2H, 2x(OH)), 4.43 (t, J = 6.5 Hz, 2H, COO-CH₂), 3.13 (t, J = 6.5 Hz, 2H, CH₂-Ph).

^{13}C NMR (50 MHz, CD_3OD) δ 168.9 (COO), 149.7, 147.7, 147.2, 146.8, 131.2, 127.6, 124.5, 123.0, 116.5, 115.1, 114.7, 65.2, 35.9.

MS (ESI) m/z υπολογίζεται για $\text{C}_{17}\text{H}_{14}\text{NO}_6^-$ [M-H]⁻ 328.1, βρέθηκε 328.2.

(*E*)-4-νιτροφαιναιθυλεστέρας του 3-(4-υδροξυ-3-μεθοξυφαινυλο)ακρυλικού οξέος (126)



$\text{C}_{18}\text{H}_{17}\text{NO}_6$

Mol. Wt.: 343.331

Η ένωση παρασκευάστηκε σύμφωνα με τη γενική μέθοδο εστεροποίησης Β από την 2-(4-νιτροφαινυλο)αιθανόλη **(140)** (0.1672 g, 1.0 mmol) και το φερουλικό οξύ ((*E*)-3-(4-υδροξυ-3-μεθοξυφαινυλο)ακρυλικό οξύ) **(103)**. Το προϊόν καθαρίστηκε με χρωματογραφία στήλης και σύστημα έκλουσης PE/AcOEt = 7:3 και παραλήφθηκε ως κιτρινοπράσινο στερεό.

α = 30% (0.103g)

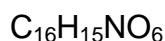
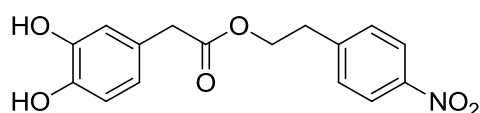
R_f = (PE/AcOEt 7:3) = 0.55

^1H NMR (200 MHz, CDCl_3) δ 8.18 (d, J = 8.8 Hz, 1H, Ph-CH=), 7.63-7.40 (m, 3H, Αρωματικά Πρωτόνια), 7.08-6.89 (m, 4H, Αρωματικά Πρωτόνια), 6.23 (d, J = 15.9 Hz, 1H, CH-COO), 5.93 (s, 1H, OH), 4.46 (t, J = 6.6 Hz, 2H, COO- CH_2), 3.92 (s, 3H, CH_3), 3.12 (t, J = 6.6 Hz, 2H, CH_2 -Ph).

^{13}C NMR (50 MHz, CDCl_3) δ 167.0 (COO), 148.1, 146.8, 146.7, 146.7, 145.8, 145.4, 129.7, 126.7, 123.7, 123.2, 114.7, 109.3, 63.7, 55.9, 35.1.

MS (ESI) m/z υπολογίζεται για $\text{C}_{18}\text{H}_{16}\text{NO}_6^-$ $[\text{M}-\text{H}]^-$ 342.1, βρέθηκε 342.1.

4-νιτροφαιναιθυλεστέρας του 2-(3,4-διυδροξυφαινυλο)οξικού οξέος (127)



Mol. Wt.: 317.293

Η ένωση παρασκευάστηκε σύμφωνα με τη γενική μέθοδο εστεροποίησης Β από την 2-(4-νιτροφαινυλο)αιθανόλη (**140**) (0.1672 g, 1.0 mmol) και το 3,4-διυδροξυφαινυλοξικό οξύ (**104**). Το προϊόν καθαρίστηκε με χρωματογραφία στήλης και σύστημα έκλυσης PE/AcOEt = 7:3 και παραλήφθηκε ως κιτρινοπράσινο στερεό.

α = 41% (0.130 g)

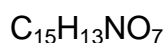
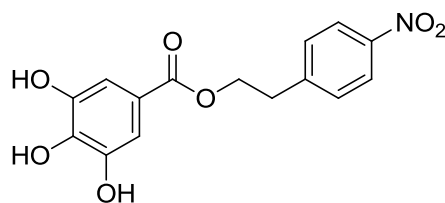
R_f = (PE/AcOEt 7:3) = 0.32

^1H NMR (200 MHz, CD_3OD) δ 8.07 (d, J = 8.7 Hz, 2H, Αρωματικά Πρωτόνια), 7.29 (d, J = 8.7 Hz, 2H, Αρωματικά Πρωτόνια), 6.70-6.47 (m, 3H, Αρωματικά Πρωτόνια), 4.96 (s, 2H, 2x(OH)), 4.31 (t, J = 6.3 Hz, 2H, COO- CH_2), 3.40 (s, 2H, CH_2 -COO), 2.98 (t, J = 6.3 Hz, 2H, CH_2 -Ph).

^{13}C NMR (50 MHz, CD_3OD) δ 173.6 (COO), 148.0, 147.5, 146.3, 145.5, 131.1, 126.8, 124.4, 121.6, 117.4, 116.2, 65.4, 41.5, 35.7.

MS (ESI) m/z υπολογίζεται για $\text{C}_{16}\text{H}_{14}\text{NO}_6^-$ $[\text{M}-\text{H}]^-$ 316.1, βρέθηκε 316.0.

4-νιτροφαιναιθυλεστέρας του 3,4,5-τριυδροξυβενζοϊκού οξέος (128)



Mol. Wt.: 319.266

Η ένωση παρασκευάστηκε σύμφωνα με τη γενική μέθοδο εστεροποίησης Β από την 2-(4-νιτροφαινυλο)αιθανόλη **(140)** (0.1672 g, 1.0 mmol) και το γαλλικό οξύ (3,4,5-τριυδροξυβενζοϊκό οξύ) **(105)**. Το προϊόν καθαρίστηκε με χρωματογραφία στήλης και σύστημα έκλουσης PE/AcOEt = 5:8 και παραλήφθηκε ως λευκό στερεό.

α = 46% (0.147 g)

R_f = (PE/AcOEt 5:8) = 0.48

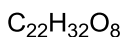
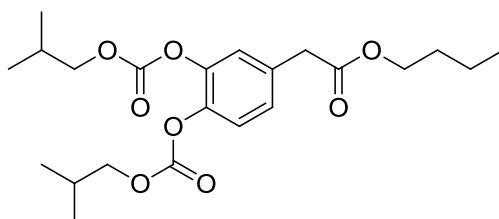
^1H NMR (200 MHz, d_6 -DMSO) δ 9.32-9.00 (m, 3H, 3x(OH)), 8.17 (d, J = 6.3 Hz, 2H, Αρωματικά Πρωτόνια), 7.58 (d, J = 6.3 Hz, 2H, Αρωματικά Πρωτόνια), 6.96-6.89 (m, 2H, Αρωματικά Πρωτόνια), 4.42 (t, J = 6.6 Hz, 2H, COO-CH₂), 3.14 (t, J = 6.6 Hz, 2H, CH₂-Ph).

^{13}C NMR (50 MHz, d_6 -DMSO) δ 165.8 (COO), 147.0, 146.4, 145.7, 138.7, 130.4, 123.6, 119.3, 108.6, 64.0, 34.4.

MS (ESI) m/z υπολογίζεται για $\text{C}_{15}\text{H}_{12}\text{NO}_7^-$ [M-H]⁻ 318.1, βρέθηκε 318.1.

Οι ενώσεις που συντέθηκαν με τη Μέθοδο Γ είναι:

Βουτυλεστέρας του 2-(3,4-δισ(ισοβουτοξυκαρβονυλοξυφαινυλο)οξικού οξέος (162)



Mol. Wt.: 424,485

Η ένωση παρασκευάστηκε σύμφωνα με τη γενική μέθοδο σύνθεσης εστέρων Γ από το 3,4-διυδροξυφαινυλοξικό οξύ (**104**) (1.0 mmol), χλωροφορμικό ισοβουτύλιο (**164**) (4.4 mmol) και 1-βουτανόλη (**141**) (2.1 mmol). Το προϊόν καθαρίστηκε με χρωματογραφία στήλης και σύστημα έκλουσης PE/AcOEt = 8:2 και παραλήφθηκε ως άχρωμο λάδι.

α = 47% (0.200 g)

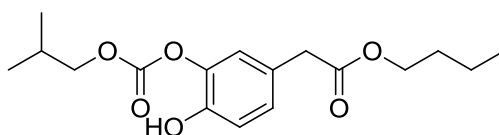
R_f = (PE/AcOEt = 8:2) = 0.65

^1H NMR (200 MHz, CDCl_3) δ 7.26-7.21 (m, 3H, Αρωματικά Πρωτόνια), 4.12-4.01 (m, 4H, $2\times(\text{OCOO}-\text{CH}_2)$), 3.86 (d, J = 6.7 Hz, 2H, $\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_3$), 3.61 (s, 2H, $\text{Ph}-\text{CH}_2$), 2.10-1.24 (m, 6H, $\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_3$, $2\times(\text{CH}_3-\text{CH})$), 0.99-0.87 (m, 15H, $5\times(\text{CH}_3)$).

^{13}C NMR (50 MHz, CDCl_3) δ 170.8, 152.8, 133.0, 127.6, 123.9, 123.0, 77.6, 77.0, 76.4, 75.1, 71.2, 65.0, 40.6, 30.5, 27.7, 27.6, 19.0, 18.8, 13.7.

MS (ESI) m/z υπολογίζεται για $\text{C}_{22}\text{H}_{36}\text{NO}_8^+$ $[\text{M}+\text{NH}_4]^+$ 442.2, βρέθηκε 442.1.

Βουτυλεστέρας του 2-(4-υδροξυ-3-ισοβουτοξυκαρβονυλοξυφαινυλο)οξικού οξέος (163)



$\text{C}_{17}\text{H}_{24}\text{O}_6$
Mol. Wt.: 324,369

Η ένωση παρασκευάστηκε σύμφωνα με τη γενική μέθοδο σύνθεσης εστέρων Γ από το 3,4-διυδροξυφαινυλοξικό οξύ (**104**) (1.0 mmol), χλωροφορμικό ισοβουτύλιο (**164**) (4.4 mmol) και 1-βουτανόλη (**141**) (2.1 mmol). Το προϊόν καθαρίστηκε με χρωματογραφία στήλης και σύστημα έκλουσης PE/AcOEt = 8:2 και παραλήφθηκε ως άχρωμο λάδι.

α = 50% (0.162 g)

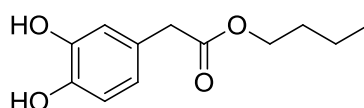
R_f = (PE/AcOEt = 8:2) = 0.38

^1H NMR (200 MHz, CDCl_3) 7.14-6.80 (m, 3H, Αρωματικά Πρωτόνια), 4.12-4.03 (m, 2H, OCOO-CH_2), 3.88-3.84 (m, 1H, OH), 3.54 (s, 2H, Ph-CH_2), 1.59-1.32 (m, 7H, $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_3$ και $\text{CH}_3\text{-CH}$), 1.01-0.86 (m, 9H, $3\times(\text{CH}_3)$).

^{13}C NMR (50 MHz, CDCl_3) δ 171.6, 153.3, 146.9, 146.0, 122.8, 121.9, 121.6, 118.4, 75.3, 71.1, 40.9, 30.5, 27.7, 27.6, 19.0, 18.9, 13.7.

MS (ESI) m/z υπολογίζεται για $\text{C}_{17}\text{H}_{28}\text{NO}_6^+$ $[\text{M}+\text{NH}_4]^+$ 342.2, βρέθηκε 342.3.

Βουτυλεστέρας του 2-(3,4-διυδροξυφαινυλο)οξικού οξέος (129)



$\text{C}_{12}\text{H}_{16}\text{O}_4$
Mol. Wt.: 224,253

Η ένωση παρασκευάστηκε σύμφωνα με τη γενική μέθοδο σύνθεσης εστέρων Γ από τον διπροστατευμένο εστέρα **(162)** (1.0 mmol) και την πιπεριδίνη **(165)** (35 mmol). Το προϊόν καθαρίστηκε με χρωματογραφία στήλης και σύστημα έκλουσης $\text{PE}/\text{AcOEt} = 6:4$ και παραλήφθηκε ως άχρωμο λάδι.

$\alpha = 50\%$ (0.112 g)

$R_f = (\text{PE}/\text{AcOEt} = 6:4) = 0.54$

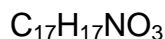
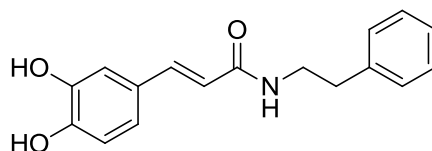
^1H NMR (200 MHz, CDCl_3) δ 6.74 (m, 3H, Αρωματικά Πρωτόνια), 6.62-6.53 (m, 2H, $2\times(\text{OH})$), 4.12-4.05 (m, 2H, COO-CH_2), 3.48 (d, $J = 4.0$ Hz, 2H, Ph-CH_2), 1.63-1.53 (m, 2H, $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_3$), 1.39-1.25 (m, 2H, $\text{CH}_2\text{-CH}_3$), 0.91 (t, $J = 7.3$ Hz, 3H, CH_3).

^{13}C NMR (50 MHz, CDCl_3) δ 174.0 (COO), 144.1, 143.4, 126.2, 121.8, 116.6, 115.7, 65.6, 40.9, 30.7, 19.3, 13.9.

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

Οι ενώσεις που συντέθηκαν με τη Μέθοδο Δ είναι:

(E)-3-(3,4-διυδροξυφαινυλο)-N-φαιναιθυλακρυλαμίδιο (142) ^{[242], [254]}



Mol. Wt.: 283.322

Η ένωση παρασκευάστηκε σύμφωνα με τη γενική μέθοδο σύνθεσης αμιδίων Δ από την 2-φαινυλαιθαναμίνη (**150**) (0.126 mL, 1.0 mmol) και το καφεϊκό οξύ ((*E*)-3-(3,4-διϋδροξυφαινυλο) ακρυλικό οξύ) (**102**). Προκειμένου να βοηθηθεί η διάλυση των στερεών, προστίθεται DMF (0.6 mL). Το προϊόν καθαρίστηκε με χρωματογραφία στήλης και σύστημα έκλουσης $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH} = 9:1$ και παραλήφθηκε ως λευκό στερεό.

$\alpha = 78\%$ (0.221 g)

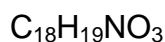
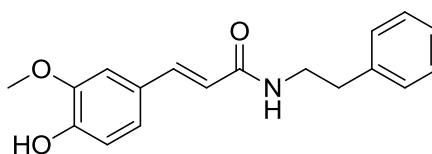
$R_f = (\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH } 9:1) = 0.75$

^1H NMR (200 MHz, $\text{d}_6\text{-DMSO}$) δ 9.39 (s, 1H, OH), 9.16 (s, 1H, OH), 8.09 (s, 1H, NH), 7.29-7.15 (m, 6H, Αρωματικά Πρωτόνια και Ph-CH=), 6.96-6.72 (m, 3H, Αρωματικά Πρωτόνια), 6.34 (d, $J = 15.7$ Hz, 1H, CH-CON), 3.41-3.35 (m, 2H, CON-CH₂), 2.77 (t, $J = 7.1$ Hz, 2H, CH₂-Ph).

^{13}C NMR (50 MHz, $\text{d}_6\text{-DMSO}$) δ 165.5 (CON), 147.4, 145.6, 139.6, 139.2, 128.7, 128.4, 126.5, 126.2, 120.5, 118.5, 115.8, 113.9, 40.4, 35.3.

MS (ESI) m/z υπολογίζεται για $\text{C}_{18}\text{H}_{18}\text{NO}_3^-$ [M-H]⁻ 282.1, βρέθηκε 282.1.

(*E*)-3-(4-υδροξυ-3-μεθοξυφαινυλο)-*N*-φαιναιθυλακρυλαμίδιο (143) ^{[254], [255]}



Mol. Wt.: 297.348

Η ένωση παρασκευάστηκε σύμφωνα με τη γενική μέθοδο σύνθεσης αμιδίων Δ από την 2-φαινυλαιθαναμίνη (**150**) (0.126 mL, 1.0 mmol) και το φερουλικό οξύ ((*E*)-3-(4-υδροξυ-3-μεθοξυφαινυλο)ακρυλικό οξύ) (**103**). Προκειμένου να

βοηθηθεί η διάλυση των στερεών, προστίθεται DMF (0.6 mL). Το προϊόν καθαρίστηκε με χρωματογραφία στήλης και σύστημα έκλουσης CH₂Cl₂/MeOH = 9:1 και παραλήφθηκε ως υποκίτρινο λάδι.

α = 94% (0.280 g)

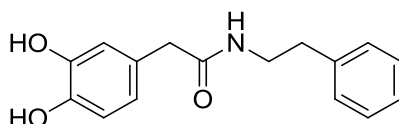
R_f = (CH₂Cl₂/MeOH 9:1) = 0.73

¹H NMR (200 MHz, CDCl₃) δ 7.52 (d, J = 15.5 Hz, 1H, Ph-CH=), 7.32-7.17 (m, 5H, Αρωματικά Πρωτόνια), 7.00-6.84 (m, 3H, Αρωματικά Πρωτόνια), 6.55 (s, 1H, OH), 6.22 (d, J = 15.5 Hz, 1H, CH-CON), 6.04 (s, 1H, NH), 3.81 (s, 3H, CH₃), 3.62 (t, J = 7.0 Hz, 2H, CON-CH₂), 2.85 (t, J = 7.0 Hz, 2H, CH₂-Ph).

¹³C NMR (50 MHz, CDCl₃) δ 166.4 (CON), 147.5, 146.8, 141.0, 138.8, 128.7, 128.5, 127.1, 126.4, 122.0, 118.0, 114.8, 109.7, 55.7, 40.8, 35.6.

MS (ESI) m/z υπολογίζεται για C₁₈H₁₈NO₃⁻ [M-H]⁻ 296.1, βρέθηκε 296.2.

2-(3,4-διυδροξυφαινυλο)-*N*-φαιναιθυλακεταμίδιο (144)



C₁₆H₁₇NO₃

Mol. Wt.: 271.311

Η ένωση παρασκευάστηκε σύμφωνα με τη γενική μέθοδο σύνθεσης αμιδίων Δ από την 2-φαινυλαιθαναμίνη (**150**) (0.126 mL, 1.0 mmol) και το 3,4-διυδροξυφαινυλοξικό οξύ (**104**). Προκειμένου να βοηθηθεί η διάλυση των στερεών, προστίθεται DMF (0.8 mL). Το προϊόν καθαρίστηκε με χρωματογραφία στήλης και σύστημα έκλουσης CH₂Cl₂/MeOH = 9:1 και παραλήφθηκε ως υποκίτρινο στερεό.

α = 75% (0.203 g)

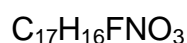
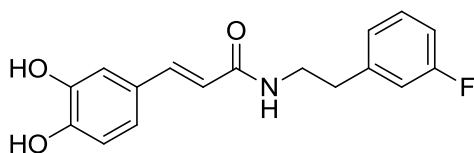
R_f = (CH₂Cl₂/MeOH 9:1) = 0.80

¹H NMR (200 MHz, CDCl₃) δ 7.99 (br s, 2H, 2x(OH)), 7.25-6.45 (m, 8H, Αρωματικά Πρωτόνια), 5.85 (s, 1H, NH), 3.46-3.36 (m, 4H, Ph-CH₂ και CON-CH₂), 2.67 (t, J = 6.6 Hz, 2H, CH₂-Ph).

^{13}C NMR (50 MHz, CDCl_3) δ 173.3 (CON), 144.8, 144.0, 138.1, 128.6, 128.3, 126.6, 125.8, 121.3, 116.2, 115.7, 42.85, 41.0, 35.2.

MS (ESI) m/z υπολογίζεται για $\text{C}_{16}\text{H}_{16}\text{NO}_3^-$ $[\text{M}-\text{H}]^-$ 270.1, βρέθηκε 270.0.

(*E*)-3-(3,4-διυδροξυφαινυλο)-*N*-(3-φθοροφαιναιθυλο)ακρυλαμίδιο (145)



Mol. Wt.: 301.312

Η ένωση παρασκευάστηκε σύμφωνα με τη γενική μέθοδο σύνθεσης αμιδίων Δ από την 2-(3-φθοροφαινυλ)αιθαναμίνη (**151**) (0.131 mL, 1.0 mmol) και το καφεϊκό οξύ ((*E*)-3-(3,4-διυδροξυφαινυλο) ακρυλικό οξύ) (**102**). Το προϊόν καθαρίστηκε με χρωματογραφία στήλης και σύστημα έκλουσης $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ = 9:1 και παραλήφθηκε ως λευκό στερεό.

α = 64% (0.193 g)

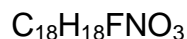
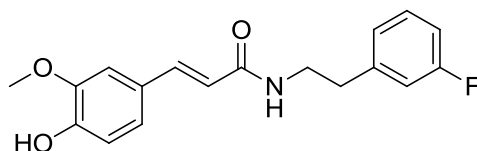
R_f = ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 9:1) = 0.86

^1H NMR (200 MHz, CD_3COCD_3) δ 7.58-6.77 (m, 11H, Αρωματικά Πρωτόνια, 2x(OH), NH και Ph-CH=), 6.45 (d, J = 15.6 Hz, 1H, CH-CON), 3.62-3.52 (m, 2H, CON-CH₂), 2.96-2.79 (m, 2H, CH₂-Ph).

^{13}C NMR (50 MHz, CD_3COCD_3) δ 167.0 (CON), 159.0 (d, $^1J_{\text{C-F}}$ = 245.6 Hz), 147.9, 146.2, 141.0, 139.5 (d, $^3J_{\text{C-F}}$ = 8.2 Hz), 130.9 (d, $^3J_{\text{C-F}}$ = 8.4 Hz), 128.2, 125.6 (d, $^4J_{\text{C-F}}$ = 2.7 Hz), 121.6, 119.2, 116.3, 116.2 (d, $^2J_{\text{C-F}}$ = 21.0 Hz), 114.9, 113.7 (d, $^2J_{\text{C-F}}$ = 21.3 Hz), 41.3, 36.1.

MS (ESI) m/z υπολογίζεται για $\text{C}_{17}\text{H}_{17}\text{FNO}_3^+$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 302.1, βρέθηκε 302.1

(*E*)-*N*-(3-φθοροφαιναιθυλο)-3-(4-υδροξυ-3-μεθοξυφαινυλο)ακρυλαμίδιο (146)



Mol. Wt.: 315.339

Η ένωση παρασκευάστηκε σύμφωνα με τη γενική μέθοδο σύνθεσης αμιδίων Δ από την 2-(3-φθοροφαινυλ)αιθαναμίνη (**151**) (0.131 mL, 1.0 mmol) και το φερουλικό οξύ ((*E*)-3-(4-υδροξυ-3-μεθοξυφαινυλο)ακρυλικό οξύ) (**103**). Το προϊόν καθαρίστηκε με χρωματογραφία στήλης και σύστημα έκλουσης $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH} = 9:1$ και παραλήφθηκε ως κιτρινοπράσινο λάδι.

$\alpha = 93\%$ (0.293 g)

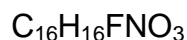
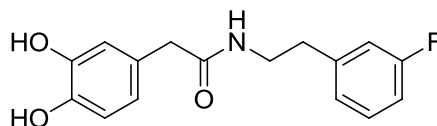
$R_f = (\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH } 9:1) = 0.70$

^1H NMR (200 MHz, CDCl_3) δ 7.52 (d, $J = 15.5$ Hz, 1H, Ph-CH=), 7.26-6.82 (m, 7H, Αρωματικά Πρωτόνια), 6.25 (d, $J = 15.5$ Hz, 2H, CH-CON και NH), 3.78 (s, 3H, CH_3), 3.61-3.54 (m, 2H, CON- CH_2), 3.46 (s, 1H, OH), 2.84 (t, $J = 7.0$ Hz, 2H, CH_2 -Ph).

^{13}C NMR (50 MHz, CDCl_3) δ 166.6 (CON), 162.8 (d, $^1J_{\text{C-F}} = 245.7$ Hz), 147.6, 146.9, 141.3 (d, $^3J_{\text{C-F}} = 7.6$ Hz), 141.2, 130.0 (d, $^3J_{\text{C-F}} = 8.4$ Hz), 126.9, 124.3 (d, $^4J_{\text{C-F}} = 2.8$ Hz), 122.0, 117.7, 115.5 (d, $^2J_{\text{C-F}} = 21.0$ Hz), 114.8, 113.3 (d, $^2J_{\text{C-F}} = 20.9$ Hz), 109.7, 55.7, 40.60, 35.3.

MS (ESI) m/z υπολογίζεται για $\text{C}_{18}\text{H}_{17}\text{NO}_6^-$ $[\text{M-H}]^-$ 314.1, βρέθηκε 314.1.

2-(3,4-διυδροξυφαινυλο)-*N*-(3-φθοροφαιναιθυλο)ακεταμίδιο (**147**)



Mol. Wt.: 289.302

Η ένωση παρασκευάστηκε σύμφωνα με τη γενική μέθοδο σύνθεσης αμιδίων Δ από την 2-(3-φθοροφαινυλ)αιθαναμίνη (**151**) (0.131 mL, 1.0 mmol) και το

3,4-διυδροξυφαινυλοξικό οξύ (**104**). Το προϊόν καθαρίστηκε με χρωματογραφία στήλης και σύστημα έκλουσης CH₂Cl₂/MeOH = 9:1 και παραλήφθηκε ως άχρωμο λάδι.

α = 60% (0.174 g)

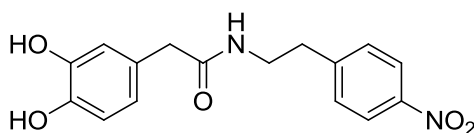
R_f = (CH₂Cl₂/MeOH 9:1) = 0.86

¹H NMR (200 MHz, CDCl₃) δ 7.26-6.45 (m, 9H), 5.90 (s, 1H, NH), 3.44-3.36 (m, 4H, CH₂-CON και CON-CH₂), 2.67 (t, J = 6.8 Hz, 2H, CH₂-Ph).

¹³C NMR (50 MHz, CDCl₃) δ 173.4 (CON), 162.8 (d, ¹ J_{C-F} = 245.9 Hz), 144.7, 144.0, 140.7 (d, ³ J_{C-F} = 7.1 Hz), 130.1 (d, ³ J_{C-F} = 8.4 Hz), 125.8, 124.3 (d, ⁴ J_{C-F} = 2.8 Hz), 121.3, 116.1, 115.9 (d, ² J_{C-F} = 22.2 Hz), 115.2, 113.5 (d, ² J_{C-F} = 20.9 Hz), 42.77, 40.74, 34.93.

MS (ESI) m/z υπολογίζεται για C₁₆H₁₅FNO₃⁻ [M-H]⁻ 288.1, βρέθηκε 288.0

2-(3,4-διυδροξυφαινυλο)-N-(4-νιτροφαιναιθυλο)ακεταμίδιο (**148**)



C₁₆H₁₆N₂O₅

Mol. Wt.: 316.309

Η ένωση παρασκευάστηκε σύμφωνα με τη γενική μέθοδο σύνθεσης αμιδίων Δ από την 2-(4-νιτροφαινυλ)αιθαναμίνη (**152**) (0.2026 g, 1.0 mmol) και το 3,4-διυδροξυφαινυλοξικό οξύ (**104**). Το προϊόν καθαρίστηκε με χρωματογραφία στήλης και σύστημα έκλουσης CH₂Cl₂/MeOH = 9:1 και παραλήφθηκε ως κιτρινοπράσινο στερεό.

α = 76% (0.240g)

R_f = (CH₂Cl₂/MeOH 9:1) = 0.53

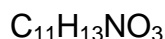
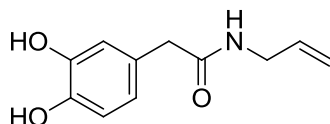
¹H NMR (200 MHz, d₆-DMSO) δ 8.81 (s, 2H, 2x(OH)), 8.17-7.84 (m, 3H, Αρωματικά Πρωτόνια), 7.32-7.32 (m, 2H, Αρωματικά Πρωτόνια), 6.66-6.56 (m, 2H, Αρωματικά Πρωτόνια), 6.44 (d, J = 8.0 Hz, 1H, NH), 3.53 (s, 2H, CON-CH₂), 3.18 (s, 2H, CH₂-CON), 2.82 (s, 2H, CH₂-Ph).

^{13}C NMR (50 MHz, $\text{d}_6\text{-DMSO}$) δ 170.0 (CON), 148.1, 146.1, 145.1, 144.0, 130.2, 127.2, 123.4, 119.9, 116.6, 115.4, 55.0, 42.1, 35.0.

MS (ESI) m/z υπολογίζεται για $\text{C}_{16}\text{H}_{15}\text{N}_2\text{O}_5^-$ $[\text{M-H}]^-$ 315.1, βρέθηκε 314.9.

Οι ενώσεις που συντέθηκαν με τη Μέθοδο Ε είναι:

***N*-αλλυλο-2-(3,4-διυδροξυφαινυλο)ακεταμίδιο (149)**



Mol. Wt.: 207.226

Η ένωση παρασκευάστηκε σύμφωνα με τη γενική μέθοδο σύνθεσης αμιδίων Ε από την αλλυλαμίνη (**153**) (0.075 mL, 1.0 mmol) και το 3,4-διυδροξυφαινυλοξικό οξύ (**104**). Το προϊόν καθαρίστηκε με χρωματογραφία στήλης και σύστημα έκλουσης $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH} = 9:1$ και παραλήφθηκε ως λευκό στερεό.

$\alpha = 79\%$ (0.164 g)

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

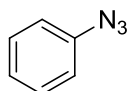
^1H NMR (200 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$) δ 7.99 (br s, 2H, 2x(OH)), 7.27 (br s, 1H, NH), 6.84-6.61 (m, 3H, Αρωματικά Πρωτόνια), 5.87-5.74 (m, 1H, CH), 5.14-4.96 (m, 2H, $\text{CH}=\text{CH}_2$), 3.79 (t, $J = 5.6$ Hz, 2H, CON- CH_2), 3.38 (s, 2H, CH_2 -CON).

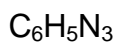
^{13}C NMR (50 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$) δ 172.0 (CON), 145.8, 144.8, 135.9, 128.3, 121.3, 117.1, 116.0, 115.5, 43.2, 42.4.

MS (ESI) m/z υπολογίζεται για $\text{C}_{11}\text{H}_{12}\text{NO}_3^-$ $[\text{M-H}]^-$ 206.1, βρέθηκε 206.0.

Οι ενώσεις που συντέθηκαν με τη Μέθοδο Ζ είναι:

Φαινυλο αζίδιο (166)



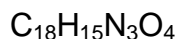
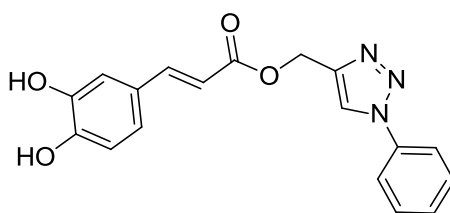


Mol. Wt.: 119,124

Η ένωση παρασκευάστηκε σύμφωνα με τη πειραματική πορεία που έχει περιγραφεί στη γενική πορεία σύνθεσης παραγώγων τριαζολίου από την ανιλίνη και το NaN_3 . Το προϊόν παραλήφθηκε καθαρό ως καφέ λάδι.

$\alpha = 95\%$ (0.113 g)

(E)-(1-φαινυλο-1H-1,2,3-τριαζολ-4-υλο)μεθυλεστέρας του 3-(3,4-διυδροξυφαινυλο)ακρυλικού οξέος (154)



Mol. Wt.: 337.329

Η ένωση παρασκευάστηκε σύμφωνα με τη γενική μέθοδο σύνθεσης παραγώγων τριαζολίου Z από το φαινυλο αζίδιο (**166**) (0.1191 g, 1.0 mmol) και τον (E)-προπ-2-υν-υλο 3-(3,4-διυδροξυφαινυλο)ακρυλικό εστέρα (**117**). Το προϊόν καθαρίστηκε με χρωματογραφία στήλης και σύστημα έκλουσης $\text{PE}/\text{AcOEt} = 3:7$ και παραλήφθηκε ως υποκίτρινο στερεό. Επιπλέον, παρέμεινε μικρή ποσότητα από τον αρχικό εστέρα.

$\alpha = 94\%$ (0.317 g)

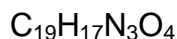
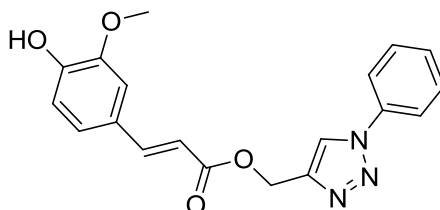
$R_f = (\text{PE}/\text{AcOEt } 3:7) = 0.57$

^1H NMR (200 MHz, d_6 -DMSO), δ 9.43 (br s, 2H, 2x(OH)), 8.89 (s, 1H, CH-N), 7.93-6.74 (m, 9H, Αρωματικά Πρωτόνια και Ph-CH=), 6.32 (d, $J = 15.9$ Hz, 1H, CH-COO), 5.33 (s, 2H, COO-CH₂).

^{13}C NMR (50 MHz, d_6 -DMSO) δ 166.3 (COO), 148.7, 145.9, 145.6, 143.4, 136.6, 130.0, 128.9, 125.5, 123.1, 121.7, 120.2, 115.8, 114.9, 113.4, 57.0

MS (ESI) m/z υπολογίζεται για $\text{C}_{18}\text{H}_{14}\text{N}_3\text{O}_4^-$ [M-H]⁻ 336.3, βρέθηκε 336.2

(E)-(1-φαινυλο-1H-1,2,3-τριαζολ-4-υλο)μεθυλεστέρας του 3-(4-υδροξυ-3-μεθοξυφαινυλο)ακρυλικού οξέος (155)



Mol. Wt.: 351.356

Η ένωση παρασκευάστηκε σύμφωνα με τη γενική μέθοδο σύνθεσης παραγώγων τριαζολίου Z από το φαινυλο αζίδιο **(166)** (0.1191 g, 1.0 mmol) και τον (E)-προπ-2-υν-1-υλο 3-(4-υδροξυ-3-μεθοξυφαινυλο)ακρυλικό εστέρα **(118)**. Το προϊόν καθарίστηκε με χρωματογραφία στήλης και σύστημα έκλουσης PE/AcOEt = 1:1 και παραλήφθηκε ως λευκό στερεό. Επιπλέον, παρέμεινε μικρή ποσότητα από τον αρχικό εστέρα.

α = 93% (0.327 g)

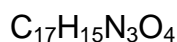
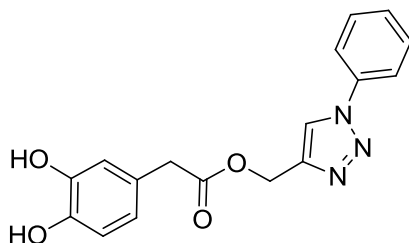
R_f = (PE/AcOEt 1:1) = 0.70

^1H NMR (200 MHz, CDCl_3) δ 8.09 (s, 1H, CH-N), 7.71-7.43 (m, 5H, Αρωματικά Πρωτόνια), 6.97-6.88 (m, 3H, Αρωματικά Πρωτόνια), 6.47 (s, 1H, Ph-CH), 6.25 (d, J = 15.9 Hz, 1H, CH-COO), 5.39 (s, 2H, COO-CH₂), 3.84 (s, 3H, CH₃), 2.00 (s, 1H, OH).

^{13}C NMR (50 MHz, CDCl_3) δ 167.0 (COO), 148.3, 146.8, 145.7, 143.6, 136.7, 129.7, 128.8, 126.5, 123.1, 122.1, 120.5, 114.8, 114.4, 109.3, 57.3, 55.8.

MS (ESI) m/z υπολογίζεται για $\text{C}_{19}\text{H}_{16}\text{N}_3\text{O}_4^-$ [M-H]⁻ 350.1, βρέθηκε 349.8.

(E)-(1-φαινυλο-1H-1,2,3-τριαζολ-4-υλο)μεθυλεστέρας του 2-(3,4-διυδροξυφαινυλο)οξικού οξέος (156)



Mol. Wt.: 325.319

Η ένωση παρασκευάστηκε σύμφωνα με τη γενική μέθοδο σύνθεσης παραγώγων τριαζολίου Z από το φαίνυλο αζίδιο (**166**) (0.1191 g, 1.0 mmol) και τον (*E*)-προπ-2-υν-1-υλο 3-(4-υδροξυ-3-μεθοξυφαινυλο)ακρυλικό εστέρα (**119**). Το προϊόν καθαρίστηκε με χρωματογραφία στήλης και σύστημα έκλουσης PE/AcOEt = 3:7 και παραλήφθηκε ως λευκό στερεό. Επιπλέον, παρέμεινε μικρή ποσότητα από τον αρχικό εστέρα.

α = 91% (0.296 g)

R_f = (PE/AcOEt 3:7) = 0.71

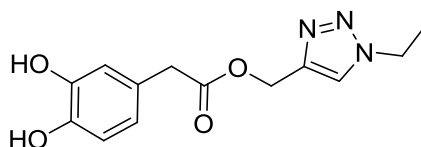
^1H NMR (200 MHz, CDCl_3) δ 7.91 (s, 1H, CH-N), 7.62-7.58 (m, 2H, 2x(OH)), 7.48-7.25 (m, 5H, Αρωματικά Πρωτόνια), 6.79-6.73 (m, 2H, Αρωματικά Πρωτόνια), 6.59-6.54 (m, 1H, Αρωματικό Πρωτόνιο), 5.22 (s, 2H, Ph-CH), 3.45 (s, 2H, COO-CH₂).

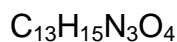
^{13}C NMR (50 MHz, CDCl_3) δ 172.3 (COO), 144.1, 143.5, 143.1, 136.4, 129.7, 129.1, 125.4, 122.2, 121.4, 120.5, 116.3, 115.3, 57.5, 40.3.

MS (ESI) m/z υπολογίζεται για $\text{C}_{17}\text{H}_{14}\text{N}_3\text{O}_4^-$ [M-H]⁻ 324.1, βρέθηκε 324.0.

Οι ενώσεις που συντέθηκαν με τη Μέθοδο Η είναι:

(1-αιθυλο-1H-1,2,3-τριαζολ-4-υλο)μεθυλεστέρας του 2-(3,4-διυδροξυφαινυλο)οξικού οξέος (157)





Mol. Wt.: 277,276

Η ένωση παρασκευάστηκε σύμφωνα με τη γενική μέθοδο παρασκευής τριαζολίων Η από το 1-βρωμοαιθάνιο (**131**) (0.119 mL, 1.6 mmol) και τον προπ-2-υν-1-υλο 2-(3,4-διυδροξυφαινυλο)οξικό εστέρα (**119**). Το προϊόν καθαρίστηκε με χρωματογραφία στήλης και σύστημα έκλουσης PE/AcOEt = 1:9 και παραλήφθηκε ως λευκό στερεό.

α = 51% (0.141 g)

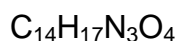
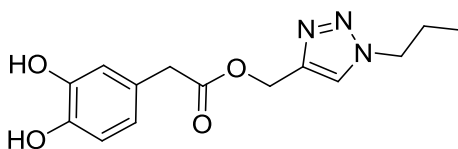
R_f = (PE/AcOEt 1:9) = 0.50

^1H NMR (200 MHz, d_6 -DMSO) δ 8.90 (s, 1H, OH), 8.83 (s, 1H, OH), 8.12 (s, 1H, CH-N), 6.66-6.44 (m, 3H, Αρωματικά Πρωτόνια), 5.11 (s, 2H, COO-CH₂), 4.37 (q, J = 7.3 Hz, 2H, CH₂-CH₃), 3.46 (s, 2H, CH₂-COO), 1.41 (t, J = 7.3 Hz, 3H, CH₃).

^{13}C NMR (50 MHz, d_6 -DMSO) 171.4 (COO), 145.1, 144.3, 141.9, 124.8, 124.3, 120.1, 116.7, 115.5, 57.5, 44.7, 39.6, 15.5.

MS (ESI) m/z υπολογίζεται για $\text{C}_{13}\text{H}_{14}\text{N}_3\text{O}_4^-$ [M-H]⁻ 276.1, βρέθηκε 276.0.

(1-προπυλο-1H-1,2,3-τριαζολ-4-υλο)μεθυλεστέρας του 2-(3,4-διυδροξυφαινυλο)οξικού οξέος (158)



Mol. Wt.: 291.302

Η ένωση παρασκευάστηκε σύμφωνα με τη γενική μέθοδο παρασκευής τριαζολίων Η από το 1-βρωμοπροπάνιο (**132**) (0.145 mL, 1.6 mmol) και τον προπ-2-υν-1-υλο 2-(3,4-διυδροξυφαινυλο)οξικό εστέρα (**119**). Το προϊόν καθαρίστηκε με χρωματογραφία στήλης και σύστημα έκλουσης PE/AcOEt = 1:9 και παραλήφθηκε ως υποκίτρινο λάδι.

α = 37% (0.108 g)

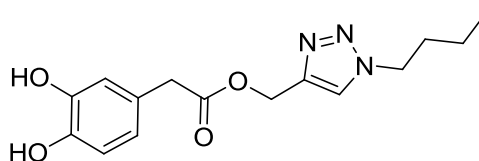
$R_f = (\text{PE}/\text{AcOEt } 1:9) = 0.64$

^1H NMR (200 MHz, $\text{d}_6\text{-DMSO}$) δ 8.82 (br s, 2H, 2x(OH)), 8.07 (s, 1H, CH-N), 6.62-6.41 (m, 3H, Αρωματικά Πρωτόνια), 5.08 (s, 2H, COO-CH₂), 4.27 (t, $J = 7.2$ Hz, 2H, CH₂-CH₂-CH₃), 3.44 (s, 2H, CH₂-COO), 1.83-1.72 (m, 2H, CH₂-CH₃), 0.79 (t, $J = 7.2$ Hz, 3H, CH₃).

^{13}C NMR (50 MHz, $\text{d}_6\text{-DMSO}$) δ 171.4 (COO), 145.1, 144.3, 141.8, 124.8, 124.7, 120.1, 116.7, 115.4, 57.5, 51.0, 39.6, 23.3, 10.9.

MS (ESI) m/z υπολογίζεται για $\text{C}_{14}\text{H}_{16}\text{N}_3\text{O}_4^-$ [M-H]⁻ 290.1, βρέθηκε 290.0.

(1-βουτυλο-1H-1,2,3-τριαζολ-4-υλο)μεθυλεστέρας του 2-(3,4-διυδροξυφαινυλο)οξικού οξέος (159)



$\text{C}_{15}\text{H}_{19}\text{N}_3\text{O}_4$

Mol. Wt.: 305.329

Η ένωση παρασκευάστηκε σύμφωνα με τη γενική μέθοδο παρασκευής τριαζολίων Η από το 1-βρωμοβουτάνιο (**168**) (0.173 mL, 1.6 mmol) και τον προπ-2-υν-1-υλο 2-(3,4-διυδροξυφαινυλο)οξικό εστέρα (**119**). Το προϊόν καθαρίστηκε με χρωματογραφία στήλης και σύστημα έκλουσης PE/AcOEt = 2:8 και παραλήφθηκε ως υποκίτρινο λάδι.

$\alpha = 30\%$ (0.092 g)

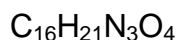
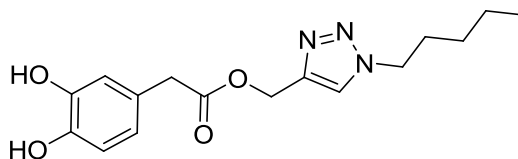
$R_f = (\text{PE}/\text{AcOEt } 2:8) = 0.54$

^1H NMR (200 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$) δ 7.89 (s, 1H, CH-N), 6.78-6.55 (m, 3H, Αρωματικά Πρωτόνια), 5.14 (s, 2H, COO-CH₂), 4.38 (t, $J = 6.9$ Hz, 2H, CH₂-CH₂-CH₂-CH₃), 3.46 (s, 2H, CH₂-COO), 1.92-1.77 (m, 2H, CH₂-CH₂-CH₃), 1.36-1.27 (m, 2H, CH₂-CH₃), 0.91 (t, $J = 6.9$ Hz, 3H, CH₃).

^{13}C NMR (50 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$) δ 172.0 (COO), 145.8, 144.9, 143.2, 126.6, 124.8, 121.4, 117.2, 115.9, 58.4, 50.3, 40.7, 32.9, 20.2, 13.7.

MS (ESI) m/z υπολογίζεται για $\text{C}_{15}\text{H}_{18}\text{N}_3\text{O}_4^-$ [M-H]⁻ 304.1, βρέθηκε 304.1.

**(1-πεντυλο-1H-1,2,3-τριαζολ-4-υλο)μεθυλεστέρας του 2-(3,4-
διυδροξυφαινυλο)οξικού οξέος (160)**



Mol. Wt.: 319,356

Η ένωση παρασκευάστηκε σύμφωνα με τη γενική μέθοδο παρασκευής τριαζολίων Η από το 1-βρωμοπεντάνιο **(136)** (0.167 mL, 1.6 mmol) και τον προπ-2-υν-1-υλο 2-(3,4-διυδροξυφαινυλο)οξικό εστέρα **(109)**. Το προϊόν καθαρίστηκε με χρωματογραφία στήλης και σύστημα έκλουσης PE/AcOEt = 2:8 και παραλήφθηκε ως άχρωμο λάδι.

α = 67% (0.214 g)

R_f = (PE/AcOEt 2:8) = 0.74

^1H NMR (200 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$) δ 7.96 (br s, 2H, 2x(OH)), 7.91 (s, 1H, CH-N), 6.77-6.57 (m, 3H, Αρωματικά Πρωτόνια), 5.15 (s, 2H, COO-CH₂), 4.38 (t, J = 7.0 Hz, 2H, CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-CH₃), 3.48 (s, 2H, CH₂-COO), 1.96-1.80 (m, 2H, CH₂-CH₂-CH₂-CH₃), 1.36-1.15 (m, 4H, CH₂-CH₂-CH₃), 0.87 (t, J = 7.0 Hz, 3H, CH₃).

^{13}C NMR (50 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$) δ 171.0 (COO), 144.8, 144.0, 142.2, 125.6, 123.8, 120.4, 116.2, 114.9, 57.4, 49.5, 39.7, 29.6, 28.1, 21.7, 13.1.

MS (ESI) m/z υπολογίζεται για $\text{C}_{16}\text{H}_{20}\text{N}_3\text{O}_4^-$ [M-H]⁻ 318.2, βρέθηκε 318.2.

ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ – ΑΡΚΤΙΚΟΛΕΞΑ – ΑΚΡΩΝΥΜΙΑ

AcOEt	Οξικός αιθυλεστέρας
AHA	Ακετοϋδροξαμικό οξύ
Ala	Αλανίνη
Asp	Ασπαραγινικό οξύ
BME	2-μερκαπτοαιθανόλη
Bn	Βένζυλο
CAT	Κατεχόλη
Cbz- ή Z-	Βενζυλοξυκαρβόνυλο ή καρβοβενζοξυ
CNTX	Κυανοτοξίνη
Cys	Κυστεΐνη
DMAP	4-(<i>N,N</i> -διμεθυλαμινο)πυριδίνη
DME	Διμεθοξυαιθάνιο
DMF	Διμεθυλοφορμαμίδιο
DMSO	Διμεθυλοσουλφοξείδιο
DNA	Δεοξυριβονουκλεϊκό οξύ
EDC·HCl	Υδροχλωρικό <i>N</i> '-αιθυλοκαρβοδιιμίδιο
Et ₃ N	Τριαιθυλαμίνη
GTP	Τριφωσφορική γουανοσίνη
His	Ιστιδίνη
HMPA	Εξαμεθυλοφωσφοραμίδιο
HOBt	1-υδροξυβενζοτριαζόλιο
HPU	Ουρεάση του <i>Helicobacter pylori</i>
JPU	Ουρεάση του <i>Jack bean</i>
KAU	Ουρεάση του <i>Klebsiella aerogenes</i>
Lys	Λυσίνη
MS	Φασματομετρία μάζας
NBPT	<i>N</i> -(βουτυλο)θειοφωσφορικό τριαμίδιο
NMR	Φασματοσκοπία Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού
OBQ	ορθο-βενζοκινόνη
OSQ	ορθο-ημικινόνη

PBQ	π-βενζοκινόνη
PE	Πετρελαϊκός αιθέρας
PPU	Ουρεάση του <i>Pigeon pea</i>
SPU	Ουρεάση του <i>Sporosarcina pasteurii</i>
TBA	Τριτοταγής-βουτυλική αλκοόλη

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- [1] R. P. Hausinger, Nickel utilization by microorganisms, *Microbiol. Rev.*, **1987**, 51, 22–42.
- [2] H. L. T. Mobley and R. P. Hausinger, Microbial ureases: significance, regulation, and molecular characterization, *Microbiol. Rev.*, **1989**, 53, 85–108.
- [3] R. L. Blakeley, J. A. Hinds, H. E. Kunze, E. C. Webb and B. Zerner, Demonstration of a carbamoyl-transfer reaction and inhibition by hydroxamic acids, *Biochemistry*, **1969**, 8, 1991–2000.
- [4] N. E. Dixon, P. W. Riddles, C. Gazzola, R. L. Blakeley and B. Zerner, On the mechanism of action of urease on urea, formamide, acetamide, N-methylurea, and related compounds, *Can. J. Biochem.*, **1980**, 58, 1335–1345.
- [5] C. Follmer, Insights into the role and structure of plant ureases, *Phytochemistry*, **2008**, 69, 18–28.
- [6] J. B. Sumner, The isolation and crystallization of the enzyme urease, *J. Biol. Chem.*, **1926**, 69, 435–441.
- [7] N. E. Dixon, C. Gazzola, R. Blakeley and B. Zerner, Inhibition of jack bean urease (EC 3.5.1.5) by acetoxhydroxamic acid and by phosphoramidate. An equivalent weight for urease, *J. Am. Chem. Soc.*, **1975**, 97, 4131–4132.
- [8] B. P. Callahan, Y. Yuan and R. Wolfenden, The Burden Borne by Urease, *J. Am. Chem. Soc.*, **2005**, 127, 10828–10829.
- [9] B. Krajewska, Ureases I. Fuctional, catalytic and kinetic properties: A review, *J. Mol. Catal. B: Enzym.*, **2009**, 59, 9–21.
- [10] B. Zerner, Recent advances in the chemistry of an old enzyme, urease, *Bioorg. Chem.*, **1991**, 19, 116–131.
- [11] H. L. T. Mobley, M. D. Island, R. P. Hausinger, Molecular Biology of Microbial Ureases, *Microbiol. Rev.*, **1995**, 59, 451-480.
- [12] J. M. Bremner, R. L. Mulvaney, Urease activity in Soil, *Academic Press, New York*, **1978**, 149–196.
- [13] J. M. Bremner, M. J. Krogmeier, Evidence that the adverse effect of urea fertilizer on seed germination in soil is due to ammonia formed through

hydrolysis of urea by soil urease, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **1989**, *86*, 8185–8188.

[14] J. M. Bremner, Recent research on problems in the use of urea as a nitrogen fertilizer, *Fert. Res.*, **1995**, *42*, 321–329.

[15] M. J. Maroney, S. Ciurli, Nonredox Nickel Enzymes, *Chem. Rev.*, **2014**, *114*, 4206–4228.

[16] E. Jabri, M. B. Carr, R. P. Hausinger, P. A. Karplus, The crystal structure of urease from *Klebsiella aerogenes*, *Science*, **1995**, *268*, 998–1004.

[17] S. Benini, W. R. Rypniewski, K. S. Wilson, S. Miletto, S. Ciurli, S. Mangani, A new proposal for urease mechanism based on the crystal structures of the native and inhibited enzyme from *Bacillus pasteurii*: why urea hydrolysis costs two nickels, *Structure*, **1999**, *7*, 205–216.

[18] N.-C. Ha, S.-T. Oh, J. Y. Sung, K. A. Cha, M. H. Lee, B.-H. Oh, Supramolecular assembly and acid resistance of *Helicobacter pylori* urease, *Nat. Struct. Biol.*, **2001**, *8*, 505–509.

[19] J. W. Austin, P. Doig, M. Stewart, T. J. Trust, Structural comparison of urease and a GroEL analog from *Helicobacter pylori*, *J. Bacteriol.*, **1992**, *174*, 7470–7473.

[20] A. Balasubramanian, K. Ponnuraj, Crystal structure of the first plant urease from jack bean: 83 years of journey from its first crystal to molecular structure, *J. Mol. Biol.*, **2010**, *400*, 274–283.

[21] S. Ciurli, S. Benini, W. R. Rypniewski, K. S. Wilson, S. Miletto and S. Mangani, Structural properties of the nickel ions in urease: novel insights into the catalytic and inhibition mechanisms, *Coord. Chem. Rev.*, **1999**, *190*, 331–355.

[22] S. Benini, S. Ciurli, H. F. Nolting, S. Mangani, Interplay of metal ions and urease, *Eur. J. Biochem.*, **1996**, *239*, 61–66.

[23] B. Zambelli, F. Musiani, S. Benini, S. Ciurli, Chemistry of Ni²⁺ in urease: sensing, trafficking, and catalysis, *Acc Chem Res*, **2011**, *44*, 520–530.

- [24] S. Benini, M. Cianci, L. Mazzei, S. Ciurli, Fluoride inhibition of *Sporosarcina pasteurii* urease: structure and thermodynamics, *J. Biol. Inorg. Chem.*, **2014**, 19, 1243-1261.
- [25] S. Benini, P. Kosikowska, M. Cianci, L. Mazzei, A. G. Vara, Ł. Berlicki, S. Ciurli, The crystal structure of *Sporosarcina pasteurii* urease in a complex with citrate provides new hints for inhibitor design, *J. Biol. Inorg. Chem.*, **2013**, 18, 391-399.
- [26] S. Quiroz-Valenzuela, S. C. Sukuru, R. P. Hausinger, L. A. Kuhn, W. T. Heller, The structure of urease activation complexes examined by flexibility analysis, mutagenesis, and small-angle X-ray scattering, *Arch. Biochem. Biophys.*, **2008**, 480, 51-57.
- [27] D. Zamble, M. Rowinska-Zyrek, H. Kozlowski, The Biological Chemistry of Nickel, *Royal Society of Chemistry*, **2017**, 5, 68.
- [28] M. A. Farrugia, L. Macomber, R. P. Hausinger, Biosynthesis of the urease metallocenter, *J. Biol. Chem.*, **2013**, 288, 13178–13185.
- [29] J. K. Kim, S. B. Mulrooney, R. P. Hausinger, Biosynthesis of active *Bacillus subtilis* urease in the absence of known urease accessory proteins, *J. Bacteriol.*, **2005**, 187, 7150–7154.
- [30] Z. Chang, J. Kuchar, R. P. Hausinger, Chemical Cross-linking and Mass Spectrometric Identification of Sites of Interaction for UreD, UreF, and Urease, *J. Biol. Chem.*, **2004**, 279, 15305–15313.
- [31] S. R. Heimer, H. L. T. Mobley, Interaction of *Proteus mirabilis* Urease Apoenzyme and Accessory Proteins Identified with Yeast Two-Hybrid Technology, *J. Bacteriol.*, **2001**, 183, 1423–1433.
- [32] I.-S. Park, R. P. Hausinger, Metal ion interactions with urease and ureD-urease apoproteins, *Biochemistry*, **1996**, 35, 5345–5352.
- [33] M. Salomone-Stagni, B. Zambelli, F. Musiani, S. Ciurli, A model-based proposal for the role of UreF as a GTPase activating protein in the urease active site biosynthesis, *Proteins*, **2007**, 68, 749–761.

- [34] E. L. Carter, J. L. Boer, M. A. Farrugia, N. Flugga, C. L. Towns, R. P. Hausinger, The Function of UreB in *Klebsiella aerogenes* Urease, *Biochemistry*, **2011**, 50, 9296–9308.
- [35] B. Zambelli, A. Berardi, V. Martin-Diaconescu, L. Mazzei, F. Musiani, M. J. Maroney, S. Ciurli, Metal binding properties of *Helicobacter pylori* UreF, an accessory protein in the nickel-based activation of urease, *J. Biol. Inorg Chem.*, **2014**, 19, 319–334.
- [36] M. B. Moncrief, R. P. Hausinger, Characterization of UreG, identification of a UreD-UreF-UreG complex, and evidence suggesting that a nucleotide-binding site in UreG is required for in vivo metallocenter assembly of *Klebsiella aerogenes* urease, *J. Bacteriol*, **1997**, 179, 4081–4086.
- [37] B. Zambelli, M. Stola, F. Musiani, K. De Vriendt, B. Samyn, B. Devreese, J. Van Beeumen, P. Turano, A. Dikiy, D. A. Bryant, S. Ciurli, UreG, a chaperone in the urease assembly process, is an intrinsically unstructured GTPase that specifically binds Zn^{2+} , *J. Biol. Chem.*, **2005**, 280, 4684–4695.
- [38] B. Zambelli, F. Musiani, M. Savini, P. Tucker, S. Ciurli, Biochemical studies on *Mycobacterium tuberculosis* UreG and comparative modeling reveal structural and functional conservation among the bacterial UreG family, *Biochemistry*, **2007**, 46, 3171–3182.
- [39] B. Zambelli, P. Turano, F. Musiani, P. Neyroz, S. Ciurli, Zn^{2+} -linked dimerization of UreG from *Helicobacter pylori*, a chaperone involved in nickel trafficking and urease activation, *Proteins*, **2009**, 74, 222–239.
- [40] F. Musiani, E. Ippoliti, C. Micheletti, P. Carloni, S. Ciurli, Conformational Fluctuations of UreG, an Intrinsically Disordered Enzyme, *Biochemistry*, **2013**, 52, 2949–2954.
- [41] V. Martin-Diaconescu, M. Bellucci, F. Musiani, S. Ciurli, M. J. Maroney, Unraveling the *Helicobacter pylori* UreG zinc binding site using X-ray absorption spectroscopy (XAS) and structural modeling, *J. Biol. Inorg Chem.*, **2012**, 17, 353–361.
- [42] J. C. Rain, L. Selig, H. De Reuse, V. Battaglia, C. Reverdy, S. Simon, G. Lenzen, F. Petel, J. Wojcik, V. Schachter, Y. Chemama, A. Labigne, P.

Legrain, The protein-protein interaction map of *Helicobacter pylori*, *Nature*, **2001**, 409, 211–215.

[43] P. Volland, D. L. Weeks, E. A. Marcus, C. Prinz, G. Sachs, D. Scott, Interactions among the seven *Helicobacter pylori* proteins encoded by the urease gene cluster, *Am. J. Physiol.: Gastrointest. Liver Physiol.*, **2003**, 284, G96–G106.

[44] M. Bellucci, B. Zambelli, F. Musiani, P. Turano, S. Ciurli, *Helicobacter pylori* UreE, a urease accessory protein: specific Ni⁽²⁺⁾- and Zn⁽²⁺⁾-binding properties and interaction with its cognate UreG, *Biochem. J.*, **2009**, 422, 91–100.

[45] A. Merloni, O. Dobrovolska, B. Zambelli, F. Agostini, M. Bazzani, F. Musiani, S. Ciurli, Molecular landscape of the interaction between the urease accessory proteins UreE and UreG, *Biochim. Biophys. Acta*, **2014**, 1844, 1662–1674.

[46] E. L. Carter, N. Flugga, J. L. Boer, S. B. Mulrooney, R. P. Hausinger, Interplay of metal ions and urease, *Metallomics*, **2009**, 1, 207–221.

[47] X. Yang, H. Li, T.-P. Lai, H. Sun, UreE-UreG complex facilitates nickel transfer and preactivates GTPase of UreG in *Helicobacter pylori*, *J. Biol. Chem.*, **2015**, 290, 12474–12485.

[48] R. Lam, V. Romanov, K. Johns, K. P. Battaile, J. Wu-Brown, J. L. Guthrie, R. P. Hausinger, E. F. Pai, N. Y. Chirgadze, Crystal structure of a truncated urease accessory protein UreF from *Helicobacter pylori*, *Proteins*, **2010**, 78, 2839–2848.

[49] Y. H. Fong, H. C. Wong, M. H. Yuen, P. H. Lau, Y. W. Chen, K. B. Wong, Structure of UreG/UreF/UreH Complex Reveals How Urease Accessory Proteins Facilitate Maturation of *Helicobacter pylori* Urease, *PLoS Biol.*, **2013**, 11, e1001678.

[50] H. Remaut, N. Safarov, S. Ciurli, J. Van Beeumen, Structural Basis for Ni²⁺Transport and Assembly of the Urease Active Site by the Metallochaperone UreE from *Bacillus pasteurii*, *J. Biol. Chem.*, **2001**, 276, 49365–49370.

- [51] B. Zambelli, K. Banaszak, A. Merloni, A. Kiliszek, W. Rypniewski, S. Ciurli, Selectivity of Ni(II) and Zn(II) binding to *Sporosarcina pasteurii* UreE, a metallochaperone in the urease assembly: a calorimetric and crystallographic study., *J. Biol. Inorg Chem.*, **2013**, 18, 1005–1017.
- [52] H. K. Song, S. B. Mulrooney, R. Huber and R. P. Hausinger, Crystal Structure of *Klebsiella aerogenes* UreE, a nickel-binding metallochaperone for urease activation, *J. Biol. Chem.*, **2001**, 276, 49359–49364.
- [53] R. Shi, C. Munger, A. Asinas, S. L. Benoit, E. Miller, A. Matte, R. J. Maier, M. Cygler, Crystal Structures of Apo and Metal-Bound Forms of the UreE Protein from *Helicobacter pylori*: role of Multiple Metal Binding Sites *Biochemistry*, **2010**, 49, 7080–7088.
- [54] K. Banaszak, V. Martin-Diaconescu, M. Bellucci, B. Zambelli, W. Rypniewski, M. J. Maroney, S. Ciurli, Crystallographic and X-ray absorption spectroscopic characterization of *Helicobacter pylori* UreE bound to Ni²⁺ and Zn²⁺ reveal a role for the disordered C-terminal arm in metal trafficking, *Biochem. J.*, **2012**, 441, 1017–1026.
- [55] F. Musiani, B. Zambelli, M. Stola, S. Ciurli, Nickel trafficking: insights into the fold and function of UreE, a urease metallochaperone, *J. Inorg. Biochem.*, **2004**, 98, 803–813.
- [56] F. H. Allen, O. Kennard, 3D search and research using the Cambridge Structural Database, *Chemical Design Automation News*, **1993**, 8, 31-37.
- [57] F. Basolo, R. G. Pearson, Mechanisms of Inorganic Reactions- A study of metal complexes in solution, *J. Chem. Educ.*, **1968**, 45, 146.
- [58] A. E. Martell, R. M. Smith, *Critical Stability Constants*, Plenum Press, New York, **1987**, 64, 125-147.
- [59] M. Laitaoja, J. Valjakka, J. Janis, Zinc coordination spheres in protein structures, *Inorg. Chem.*, **2013**, 52, 10983–10991.
- [60] F. Musiani, E. Arnofi, R. Casadio, S. Ciurli, Structure-based computational study of the catalytic and inhibition mechanism of urease, *J. Biol. Inorg Chem.*, **2001**, 6, 300–314.
- [61] C. P. Witte, Urea metabolism in plants, *Plant Sci.*, **2011**, 180, 431–438.

- [62] W.-H. Wang, B. Köhler, F.-Q. Cao, L.-H. Liu, Molecular and physiological aspects of urea transport in higher plants, *Plant Sci.*, **2008**, 175, 467-477.
- [63] S. Kojima, A. Bohner, N. von Wirén, Molecular Mechanisms of Urea Transport in Plants, *J. Membr. Biol.*, **2006**, 212, 83-91.
- [64] L. E. Zonia, N. E. Stebbins, J. C. Polacco, Essential Role of Urease in Germination of Nitrogen-Limited *Arabidopsis thaliana* Seeds, *Plant Physiol.*, **1995**, 107, 1097-1103.
- [65] R. G. Winkler, D. G. Blevins, J. C. Polacco, D. D. Randall, Ureide catabolism in nitrogen-fixing legumes, *Trends Biochem. Sci.*, **1988**, 13, 97–100.
- [66] C. D. Todd, P. A. Tipton, D. G. Blevins, P. Piedras, M. Pineda, J. C. Polacco, Update on ureide degradation in legumes, *J. Exp. Bot.*, **2006**, 57, 5–12.
- [67] J. C. Polacco, M. A. Holland, Roles of Urease in Plant Cells, *Int. Rev. Cytol.*, **1993**, 145, 65-103.
- [68] C. Follmer, R. Real-Guerra, G. E. Wasserman, D. Olivera-Severo, C. R. Carlini, Jackbean, soybean and *Bacillus pasteurii* ureases: Biological effects unrelated to ureolytic activity, *Eur. J. Biochem.*, **2004**, 271, 1357-1363.
- [69] C. Follmer, G. E. Wassermann, C. R. Carlini, Separation of jack bean (*Canavalia ensiformis*) urease isoforms by immobilized metal affinity chromatography and characterization of insecticidal properties unrelated to ureolytic activity, *Plant Sci.*, **2004**, 167, 241-246.
- [70] A. Menegassi, G. E. Wassermann, D. Olivera-Severo, A. B. Becker-Ritt, A. H. S. Martinelli, V. Feder, C. R. Carlini, Urease from Cotton (*Gossypium hirsutum*) Seeds: Isolation, Physicochemical Characterization, and Antifungal Properties of the Protein, *J. Agric. Food Chem.*, **2008**, 56, 4399-4405.
- [71] A. B. Becker-Ritt, A. H. S. Martinelli, S. Mitidieri, V. Feder, G. E. Wassermann, L. Santi, M. H. Vainstein, J. T. A. Oliveira, L. M. Fiuza, G. Pasquali, C. R. Carlini, Antifungal activity of plant and bacterial ureases, *Toxicon*, **2007**, 50, 971-983.

- [72] R. A. Burne, Y.-Y. M. Chen, Bacterial ureases in infectious diseases, *Microb. Infect.*, **2000**, 2, 533-542.
- [73] H. A. Krebs, K. Henseleit, Investigations on urea formation in animal corporate, *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.*, **1932**, 210, 33–66.
- [74] C. M. Collins, S. E. F. D'Orazio, Bacterial ureases: structure, regulation of expression and role in pathogenesis, *Mol. Microbiol.*, **1993**, 9, 907-913.
- [75] B. E. Dunn, S. H. Phadnis, Structure, function and localization of *Helicobacter pylori* urease, *Yale J. Biol. Med.*, **1998**, 71, 63-73.
- [76] D. J. McGee, H. L. T. Mobley, Pathogenesis of *Helicobacter pylori* infection, *Curr. Opin. Gastroenterol.*, **2000**, 16, 24-31.
- [77] C. Montecucco, R. Rappuoli, Living dangerously: how *Helicobacter pylori* survives in the human stomach, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **2001**, 2, 457–466.
- [78] B. D. Jones, C. V. Lockatell, D. E. Johnson, J. W. Warren, H. L. T. Mobley, Construction of a urease-negative mutant of *Proteus mirabilis*: Analysis of virulence in a mouse model of ascending urinary tract infection, *Infect. Immun.*, **1990**, 58, 1120–1123.
- [79] W. Lin, V. Mathys, E. L. Y. Ang, V. H. Q. Koh, J. M. Martinez Gomez, M. L. T. Ang, S. Z. Zainul Rahim, M. P. Tan, K. Pethe, S. Alonso, Urease activity represents an alternative pathway for *Mycobacterium tuberculosis* nitrogen metabolism, *Infect. Immun.*, **2012**, 80, 2771–2779.
- [80] G. M. Young, D. Amid, V. L. Miller, A bifunctional urease enhances survival of pathogenic *Yersinia enterocolitica* and *Morganella morganii* at low pH, *J. Bacteriol.*, **1996**, 178, 6487–6495.
- [81] G. M. Cox, J. Mukherjee, G. T. Cole, A. Casadevall, J. R. Perfect, Urease as a virulence factor in experimental cryptococcosis, *Infect. Immun.*, **2000**, 68, 443–448.
- [82] S. Kakimoto, K. Okazaki, T. Sakane, K. Imai, Y. Sumino, S. Akiyama, Y. Nakao, Isolation and Taxonomic Characterization of Acid Ureaseproducing Bacteria, *Agric. Biol. Chem.*, **1989**, 53, 1111-1117.

- [83] S. Kakimoto, Y. Sumino, K. Kawahara, E. Yamazaki, I. Nakatsui, Purification and characterization of acid urease from *Lactobacillus fermentum*, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **1990**, 32, 538-543.
- [84] S. Kakimoto, Y. Sumino, S. Akiyama, Y. Nakao, Purification and Characterization of Acid Urease from *Lactobacillus reuteri*, *Agric. Biol. Chem.*, **1989**, 53, 1119-1125.
- [85] E. Yamazaki, T. Kurasawa, S. Kakimoto, Y. Sumino, I. Nakatsui, Characteristics of Acid Urease from *Streptococcus mitior*, *Agric. Biol. Chem.*, **1990**, 54, 2433-2435.
- [86] S. Takebe, K. Kobashi, Acid Urease from *Lactobacillus* of Rat Intesine, *Chem. Pharm. Bull.*, **1988**, 36, 693-699.
- [87] M. Fidaleo, M. Esti, M. Moresi, Assessment of Urea Degradation Rate in Model Wine Solutions by Acid Urease from *Lactobacillus fermentum*, *J. Agric. Food Chem.*, **2006**, 54, 6226-6235.
- [88] K. Miyagawa, M. Sumida, M. Nakao, M. Harada, H. Yamamoto, T. Kusumi, K. Yoshizawa, T. Amachi, T. Nakayama, Purification, characterization, and application of an acid urease from *Arthrobacter mobilis*, *J. Biotechnol.*, **1999**, 68, 227-236.
- [89] M. Esti, M. Fidaleo, M. Moresi, P. Tamborra, Modeling of Urea Degradation in White and Rosé Wines by Acid Urease, *J. Agric. Food Chem.*, **2007**, 55, 2590-2596.
- [90] S. Castanier, G. Le Métayer-Levrel, J.-P. Perthuisot, Ca-carbonates precipitation and limestone genesis – the microbiogeologist point of view, *Sediment. Geol.*, **1999**, 126, 9-23.
- [91] F. Hammes, W. Verstaete, Key roles of pH and calcium metabolism in microbial carbonate precipitation, *Rev. Environ. Sci. Biotechnol.*, **2002**, 1, 3-7.
- [92] F. Hammes, N. Boon, J. de Villiers, W. Verstaete, S. D. Siciliano, Strain-Specific Ureolytic Microbial Calcium Carbonate Precipitation, *Appl. Environ. Microbiol.*, **2003**, 69, 4901-4909.

- [93] F. Hammes, N. Boon, G. Clement, J. de Villiers, Molecular, biochemical and ecological characterization of a bio-catalytic calcification reactor, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **2003**, 62, 191-201.
- [94] I. Sonđi, E. Matijević, Homogeneous Precipitation of Calcium Carbonates by Enzyme Catalyzed Reaction, *J. Coll. Interf. Sci.*, **2001**, 238, 208-214.
- [95] I. Sonđi, B. Salopek-Sonđi, Influence of the Primary Structure of Enzymes on the Formation of CaCO₃ Polymorphs: A Comparison of Plant (*Canavalia ensiformis*) and Bacterial (*Bacillus pasteurii*) Ureases, *Langmuir*, **2005**, 21, 8876-8882.
- [96] A. Yu, I. Gentle, G. Lu, F. Caruso, Nanoassembly of biocompatible microcapsules for urease encapsulation and their use as biomimetic reactors, *Chem. Commun.*, **2006**, 20, 2150-2152.
- [97] F. Hammes, A. Seka, S. de Knijf, W. Verstaete, A novel approach to calcium removal from calcium-rich industrial wastewater, *Water Res.*, **2003**, 37, 699-704.
- [98] Y. Fujita, F. G. Ferris, R. D. Lawson, F. S. Colwell, R. W. Smith, Subscribed Content Calcium Carbonate Precipitation by Ureolytic Subsurface Bacteria, *Geomicrobiol.*, **2000**, 17, 305-318.
- [99] S. Stocks-Fischer, J. K. Galinat, S. S. Bang, Microbiological precipitation of CaCO₃, *Soil Biol. Biochem.*, **1999**, 31, 1563-1571.
- [100] S. S. Bang, J. K. Galinat, V. Ramakrishnan, Calcite precipitation induced by polyurethane-immobilized *Bacillus pasteurii*, *Enzyme Microb. Technol.*, **2001**, 28, 404-409.
- [101] K. L. Bachmeier, A. E. Williams, J. R. Warmington, S. S. Bang, Urease activity in microbiologically-induced calcite precipitation, *J. Biotechnol.*, **2002**, 93, 171-181.
- [102] G. Le Métayer-Levrel, S. Castanier, G. Orial, J.-F. Loubière, J.-P. Perthuisot, Applications of bacterial carbonatogenesis to the protection and regeneration of limestones in buildings and historic patrimony, *Sediment. Geol.*, **1999**, 126, 25-34.

- [103] C. R. Carlini, R. Ligabue-Braun, Ureases as multifunctional toxic proteins: A review, *Toxicon*, **2016**, 110, 90–109.
- [104] A. B. Becker-Ritt, C. R. Carlini, Fungitoxic and insecticidal plant polypeptides, *Biopolymers*, **2012**, 98, 367–384.
- [105] F. Staniscuaski, V. Te Brugge, C. R. Carlini, I. Orchard, First report of an antifungal amidase from *Peltophorum pterocarpum*, *J. Insect Physiol.*, **2009**, 55, 255–263.
- [106] F. Staniscuaski, V. Te Brugge, C. R. Carlini, I. Orchard, Jack bean urease alters serotonin-induced effects on *Rhodnius prolixus* anterior midgut, *J. Insect Physiol.*, **2010**, 56, 1078–1086.
- [107] M. S. Defferrari, R. da Silva, I. Orchard, C. R. Carlini, Jack bean (*Canavalia ensiformis*) urease induces eicosanoid-modulated hemocyte aggregation in the Chagas' disease vector *Rhodnius prolixus*, *Toxicon*, **2014**, 82, 18–25.
- [108] M. S. Defferrari, D. H. Lee, C. L. Fernandes, I. Orchard, C. R. Carlini, A phospholipase A2 gene is linked to Jack bean urease toxicity in the Chagas' disease vector *Rhodnius prolixus*, *Biochim. Biophys. Acta*, **2014**, 1840, 396–405.
- [109] C. R. Carlini, J. A. Guimaraes, J. M. Ribeiro, Platelet release reaction and aggregation induced by canatoxin, a convulsant protein: evidence for the involvement of the platelet lipoxygenase pathway, *Br. J. Pharmacol.*, **1985**, 84, 551–560.
- [110] C. Barja-Fidalgo, J. A. Guimaraes, C. R. Carlini, Canatoxin, a plant protein, induces insulin release from isolated pancreatic islets, *Endocrinology*, **1991**, 128, 675–679.
- [111] C. Barja-Fidalgo, J. A. Guimaraes, C. R. Carlini, Lipoxygenase-mediated secretory effect of canatoxin the toxic protein from *Canavalia ensiformis* seeds, *Toxicon*, **1991**, 29, 453–459.
- [112] F. A. Ghazaleh, I. M. Francischetti, M. E. Gombarovits, C. R. Carlini, F. A. Ghazaleh, I. M. Francischetti, M. E. Gombarovits, C. R. Carlini, Stimulation

of calcium influx and platelet activation canatoxin: methoxyverapamil inhibition and downregulation by cGMP, *Arch. Biochem. Biophys.*, **1997**, 339, 362–367.

[113] C. R. Carlini and J. A. Guimaraes, Isolation and characterization of a toxic protein from *Canavalia ensiformis* (jack beans) seeds, distinct from concanavalin, *Toxicon*, **1981**, 19, 667–675.

[114] C. Follmer, G. B. S. Barcellos, R. B. Zingali, O. L. T. Machado, E. W. Alves, C. Barja-Fidalgo, J. A. Guimaraes and C. R. Carlini, Canatoxin, a toxic protein from jack beans (*Canavalia ensiformis*), is a variant form of urease (EC 3.5.1.5): biological effects of urease independent of its ureolytic activity, *Biochem. J.*, **2001**, 360, 217–224.

[115] F. Mulinari, F. Staniscuaski, L. R. Bertholdo-Vargas, M. Postal, O. B. Oliveira-Neto, D. J. Rigden, M. F. Grossi-de-Sa and C. R. Carlini, Jaburetox-2Ec: an insecticidal peptide derived from an isoform of urease from the plant *Canavalia ensiformis*, *Peptides*, **2007**, 28, 2042–2050.

[116] F. C. Lopes, O. Dobrovolska, R. Real-Guerra, V. Broll, B. Zambelli, F. Musiani, V. N. Uversky, C. R. Carlini and S. Ciurli, *Pliable natural biocide: Jaburetox, an intrinsically disordered insecticidal and fungicidal polypeptide derived from jack bean urease*, *FEBS J.*, **2015**, 282, 1043–1064.

[117] R. A. Bauer, Covalent inhibitors in drug discovery from accidental discoveries to avoided liabilities and designed therapies, *Elsevier Ltd*, **2015**, 20, 1061-1073.

[118] P. Kosikowska, Ł. Berlicki, Urease inhibitors as potential drugs for gastric and urinary tract infections: a patent review, *Expert Opin. Ther. Pat.*, **2011**, 21, 945–957.

[119] Z. Amtul, A.-U. Rahman, R. A. Siddiqui, M. I. Choudhary, Chemistry and mechanism of urease inhibition, *Curr. Med. Chem.*, **2002**, 9, 1323–1348.

[120] R. L. Blakeley, N. E. Dixon, B. Zerner, Jack bean urease VII. Light scattering and nickel (II) spectrum Thiolate→nickel (II) charge-transfer peaks in the spectrum of the β -mercaptoethanol-urease complex, *Biochim. Biophys. Acta*, **1983**, 744, 219–229.

- [121] M. G. Finnegan, A. T. Kowal, M. T. Werth, P. A. Clark, D. E. Wilcox, M. K. Johnson, Variable-temperature magnetic circular dichroism spectroscopy as a probe of the electronic and magnetic properties of nickel in jack bean urease, *J. Am. Chem. Soc.*, **1991**, 113, 4030–4032.
- [122] S. Benini, S. Ciurli, W. R. Rypniewski, K. S. Wilson, S. Mangani, Crystallization and preliminary high-resolution X-ray diffraction analysis of native and beta-mercaptoethanol-inhibited urease from *Bacillus pasteurii*, *Acta Crystallogr., Sect. D: Biol. Crystallogr.*, **1998**, 54, 409–412.
- [123] S. Benini, W. R. Rypniewski, K. S. Wilson, S. Ciurli, S. Mangani, The complex of *Bacillus pasteurii* urease with β -mercaptoethanol from X-ray data at 1.65 Å resolution, *J. Biol. Inorg. Chem.*, **1998**, 3, 268–273.
- [124] G. B. Kistiakowsky, R. Lumry, Anomalous Temperature Effects in the Hydrolysis of Urea by Urease, *J. Am. Chem. Soc.*, **1949**, 71, 2006–2013.
- [125] J. F. Ambrose, G. B. Kistiakowsky, A. G. Kridl, Inhibition of Urease by Sulfur Compounds, *J. Am. Chem. Soc.*, **1950**, 72, 317–321.
- [126] L. Mazzei, M. Cianci, S. Benini, L. Bertini, F. Musiani, S. Ciurli, Kinetic and structural studies reveal a unique binding mode of sulfite to the nickel center in urease, *J. Inorg. Biochem.*, **2016**, 154, 42–49.
- [127] M. J. Todd and R. P. Hausinger, *J. Biol. Chem.*, **1989**, 264, 15835–15842.
- [128] K. Kobashi, J.-I. Hase and K. Uehara, *Biochim. Biophys. Acta*, **1962**, 62, 380–383.
- [129] N. E. Dixon, C. Gazzola, J. J. Watters, R. Blakeley and B. Zerner, *J. Am. Chem. Soc.*, **1975**, 97, 4130–4131.
- [130] K. Kobashi, J. Hase, K. Uehare, Specific inhibition of urease by hydroxamic acids, *Biochim. Biophys. Acta.*, **1962**, 65, 380-393.
- [131] W. N. Fishbein, P. P. Carbone, Urease Catalysis: II. Inhibition of the enzyme by hydroxyurea, hydroxylamine, and acetohydroxamic acid, *J. Biol. Chem.*, **1965**, 240, 2407-2414.

- [132] K. Kobashi, J. Hase, T. Komai, Evidence for the formation of an inactive urease-hydroxamic acid complex, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **1966**, 23, 34-38.
- [133] K. Kumaki, S. Tomioka, K. Kobashi, J. Hase, Structure-Activity Correlations between Hydroxamic Acids and Their Inhibitory Powers on Urease Activity. I. A Quantitative Approach to the Effect of Hydrophobic Character of Acyl Residue, *Chem. Pharm. Bull.*, **1972**, 20, 1599-1606.
- [134] S. Benini, W. R. Rypniewski, K. S. Wilson, S. Miletto, S. Ciurli and S. Mangani, The complex of *Bacillus pasteurii* urease with acetohydroxamate anion from X-ray data at 1.55 Å resolution, *J. Biol. Inorg. Chem.*, **2000**, 5, 110–118.
- [135] M. A. Pearson, L. Overbye Michel, R. P. Hausinger and P. A. Karplus, Structures of Cys319 Variants and Acetohydroxamate-Inhibited *Klebsiella aerogenes* Urease, *Biochemistry*, **1997**, 36, 8164–8172.
- [136] D. P. Griffith, D. M. Musher, Acetohydroxamic acid. Potential use in urinary infection caused by urea-splitting bacteria, *Urology*, **1975**, 5, 299-302.
- [137] J. J. Williams, J. S. Rodman, C. M. Peterson, A randomized double-blind study of acetohydroxamic acid in struvite nephrolithiasis, *N. Engl. J. Med.*, **1984**, 311, 760-764.
- [138] N. C. Bailie, C. A. Osborne, J. R. Leininger, Teratogenic effect of acetohydroxamic acid in clinically normal beagles, *Am. J. Vet. Res.*, **1986**, 47, 2604-2611.
- [139] K. Munakata, S. Tanaka, S. Toyoshima, Therapy for urolithiasis with hydroxamic acids. I. Synthesis of new N-(aroyl)glycinohydroxamic acid derivatives and related compounds, *Chem. Pharm. Bull.*, **1980**, 3, 444-450.
- [140] K. Munakata, H. Mochida, S. Kondo, Mutagenicity of N-acylglycinohydroxamic acids and related compounds, *J. Pharmacobiodyn.*, **1980**, 3, 557-561.
- [141] M. Satoh, K. Munakata, H. Takeuchi, Evaluation of effects of novel urease inhibitor, N-(pivaloyl)glycinohydroxamic acid on the formation of an infection

bladder stone using a newly designed urolithiasis model in rats, *Chem. Pharm. Bull.*, **1991**, 39, 894-896.

[142] S. Benini, W. R. Rypniewski, K. S. Wilson, S. Mangani, S. Ciurli, Molecular details of urease inhibition by boric acid: insights into the catalytic mechanism, *J. Am. Chem. Soc.*, **2004**, 126, 3714–3715.

[143] B. Krajewska, W. Zaborska, M. Leszko, Z. Brzozka, Inhibition of jack bean urease by a mixture of boric and phosphate buffer pH 6.96, *Pol. J. Chem.*, **1999**, 73, 359–366.

[144] J. M. Breitenbach, R. H. Hausinger, *Proteus mirabilis* urease. Partial purification and inhibition by boric acid and boronic acids, *Biochem. J.*, **1988**, 250, 917–920.

[145] N. E. Dixon, R. L. Blakeley, B. Zerner, Jack Bean Urease (EC 3.5.1.5). III. The involvement of active-site nickel ion in inhibition by β -mercaptoethanol, phosphoramidate and fluoride, *Can. J. Biochem.*, **1980**, 58, 481–488.

[146] M. J. Todd, R. P. Hausinger, Fluoride inhibition of *Klebsiella aerogenes* urease: Mechanistic implications of a pseudo-uncompetitive, slow-binding inhibitor, *Biochemistry*, **2000**, 39, 5389–5396.

[147] B. Krajewska, W. Zaborska, M. Leszko, Inhibition of chitosan-immobilized urease by slow binding inhibitors: Ni^{2+} , F^- and acetohydroxamic acid, *J. Mol. Catal. B: Enzym.*, **2001**, 14, 101–109.

[148] B. Krajewska, Mono- (Ag, Hg) and di- (Cu, Hg) valent metal ions effects on the activity of jack bean urease. Probing the models of metal binding to the enzyme, *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.*, **2008**, 23, 535–542.

[149] C. Follmer, C. R. Carlini, Effect of chemical modification of histidines on the copper-induced oligomerization of jack bean urease (EC 3.5.1.5), *Arch. Biochem. Biophys.*, **2005**, 435, 15–20.

[150] J. R. Lambert, P. Midolo, The actions of bismuth in the treatment of *Helicobacter pylori* infection, *Aliment. Pharmacol. Ther.*, **1997**, 11, 27–33.

[151] G. G. Briand, N. Burford, Bismuth Compounds and Preparations with Biological or Medicinal Relevance, *Chem. Rev.*, **1999**, 99, 2601–2658.

- [152] H. Sun, L. Zhang, K. Y. Szeto, Bismuth in chemistry, *Met. Ions Biol. Syst.*, **2004**, *41*, 333–378.
- [153] L. Zhang, S. B. Mulrooney, A. F. K. Leung, Y. Zeng, B. B. C. Ko, R. P. Hausinger, H. Sun, Inhibition of urease by bismuth(III): implications for the mechanism of action of bismuth drugs, *BioMetals*, **2006**, *19*, 503–511.
- [154] J. W. Lown, The mechanism of action of quinone antibiotics, *Mol. Cell. Biochem.*, **1983**, *55*, 17–40.
- [155] M. G. Peter, Chemical Modifications of Biopolymers by Quinones and Quinone Methides, *Angew. Chem., Int. Ed.*, **1989**, *28*, 555–570.
- [156] W. Zaborska, B. Krajewska, M. Kot, W. Karcz, Jack bean (*Canavalia ensiformis*) urease. Probing acid–base groups of the active site by pH variation, *Bioorg. Chem.*, **2007**, *35*, 233–242.
- [157] W. Zaborska, B. Krajewska, M. Kot, W. Karcz, Inhibition of Jack Bean urease by 1,4- benzoquinone and 2,5-dimethyl-1,4-benzoquinone. Evaluation of the inhibition mechanism, *J. Enzym. Inh. Med. Chem.*, **2002**, *17*, 247–253.
- [158] J. M. Bremner, L. A. Douglas, Inhibition of urease activity in soils, *Soil Biol. Biochem.*, **1971**, *3*, 297–307.
- [159] L. G. Bundy, J. M. Bremner, Effects of substituted *p*-benzoquinones on urease activity in soils, *Soil Biol. Biochem.*, **1973**, *5*, 847–853.
- [160] R. L. Mulvaney, J. M. Bremner, Use of *p*-benzoquinone and hydroquinone for retardation of urea hydrolysis in soils, *Soil Biol. Biochem.*, **1978**, *10*, 297–302.
- [161] A. Ashiralieva, D. Kleiner, Polyhalogenated benzo- and naphthoquinones are potent inhibitors of plant and bacterial ureases, *FEBS Lett.*, **2003**, *555*, 367–370.
- [162] D. Kleiner, A. Ashiralieva, Use of quinones and their derivatives as urease inhibitors, particularly for treating infections with urease-producing bacteria, e.g., *Helicobacter pylori*, **2005**, DE10333448.

- [163] L. S. Redgrave, S. B. Sutton, M.A. Webber, L. V. J. Piddock, Fluoroquinolone resistance: mechanisms, impact on bacteria, and role in evolutionary success, *Trends Microbiol.*, **2014**, 22, 438–455.
- [164] M. Abu-Sini, A. Mayyas, N. Al-Karablieh, R. DARwish, Y. Al-Hiari, T.Aburjai, Synthesis of 1,2,3-triazolo[4,5-h]quinolone derivatives with novel antimicrobial properties against Metronidazole resistant *Helicobacter pylori*, *Molecules*, **2017**, 22, 841.
- [165] M. A. A. Abdullah, R. M. A. El-Baky, H. A. Hassan, ES. MN. Abdelhafez, GE. DA. Abuo-Rahma, Fluoroquinolones as urease inhibitors: anti-*Proteus mirabilis* activity and molecular docking studies, *Am. J. Microbiol. Res.*, **2016**, 4, 81–84.
- [166] H. G. Kathrotiya, M. P. Patel, Synthesis and identification of b-aryloxyquinoline based diversely fluorine substituted N-aryl quinolone derivatives as a new class of antimicrobial, antituberculosis and antioxidant agents, *Eur. J. Med. Chem.*, **2013**, 63, 675–684.
- [167] M. A. A. Abdullah, GE. DAA. Abuo-Rahma, E. S. M. N. Abdelhafez, H.A. Hassan, R. M. A. El-Baky, Design, synthesis, molecular docking, anti-*Proteus mirabilis* and urease inhibition of new fluoroquinolone carboxylic acid derivatives, *Bioorg. Chem.*, **2017**, 70, 1–11.
- [168] M. Nisar, S. Ali Khan, M. Raza Shah, A. Khan, U. FARooq, G. Uddin G, Moxifloxacin-capped noble metal nanoparticles as potential urease inhibitors, *New J. Chem.*, **2015**, 39, 8080–8086.
- [169] Z. P. Xiao, D. H. Shi, H. Q. Li, L. N. Zhang, C. Xu, H. L. Zhu, Polyphenols based on isoflavones as inhibitors of *Helicobacter pylori* urease, *Bioorg. Med. Chem.*, **2007**, 15, 3703–3710.
- [170] Z. P. Xiao, T. W. Ma, W. C. Fu, X. C. Peng, A. H. Zhang and H. L. Zhu, The synthesis, structure and activity evaluation of pyrogallol and catechol derivatives as *Helicobacter pylori* urease inhibitors, *Eur. J. Med. Chem.*, **2010**, 45, 5064–5070.
- [171] Z. P. Xiao, Z. Y. Peng, J. J. Dong, J. He, H. Ouyang, Y. T. Feng, C. L. Lu, W. Q. Lin, J. X. Wang, Y. P. Xiang, H. L. Zhu, Synthesis, structure-activity

relationship analysis and kinetics study of reductive derivatives of flavonoids as *Helicobacter pylori* urease inhibitors, *Eur. J. Med. Chem.*, **2013**, 63, 685–695.

[172] A. N. Loes, N. Ruyle, M. Arvizu, A. L. Gresko, C. E. Deutch, Inhibition of urease activity in the urinary tract pathogen *Staphylococcus saprophyticus*, *Lett. Appl. Microbiol.*, **2013**, 58, 31–41.

[173] F. Mansoor, I. Anis, A. Khan, B. P. Marasin, M. Iqbal Choudhary, M. Raza Shah, Urease inhibitory constituents from *Daphne retusa*, *J. Asian Nat. Prod. Res.*, **2014**, 16, 210–215.

[174] G. Uddin, Ismail, A. Rauf, M. Raza, H. Khan, Naruddin, Urease inhibitory profile of extracts and chemical constituents of *Pistacia atlantica* ssp. *cabulica* Stocks, *Nat. Prod. Res.*, **2016**, 12, 1411–1416.

[175] Y. Chen, J. Liao, M. Chen, Q. Huang, Q. Lu, Gossypol: new class of urease inhibitors, molecular docking and inhibition assay, *J. Chem. Pharm. Res.*, **2015**, 7, 10–15.

[176] Z. P. Xiao, X. D. Wang, Z. Y. Peng, S. Huang, P. Yang, Q. S. Li, Molecular docking, kinetics study, and structure–activity a of quercetin and its analogous as *Helicobacter pylori* urease inhibitors, *Agric. Food Chem.*, **2012**, 60, 10572–10577.

[177] L. Tan, J. Su, D. W, X. Yu, Z. Su, J. He, Kinetics and mechanism study of competitive inhibition of jack-bean urease by baicalin, *Sci. World J.*, **2013**, art.879501.

[178] X. D. Yu, R. B. Zheng, J. H. Xie, J. Y. Su, X. Q. Huang, Biological evaluation and molecular docking of baicalin and scutellarin as *Helicobacter pylori* urease inhibitors, *J. Ethnopharmacol*, **2015**, 162, 69–78.

[179] B. W. Lee, I. H. Park, D. Yim, S. S. Coi, Comprehensive evaluation of the anti- *Helicobacter pylori* activity of *scutellariae radix*, *Nat. Prod. Sci.*, **2017**, 23, 46–52.

[180] T. M. C. Babu, S. S. Rajesh, B. V. Bhaskar, S. Devi, A. Rammohan, T. Sivaraman, Molecular docking, molecular dynamics simulation, biological

evaluation and 2D QSAR analysis of flavonoids from *Syzygium alternifolium* as potent anti- *Helicobacter pylori* agents, *RSC Adv.*, **2017**, 7, 18277–18292.

[181] M. Amin, F. Anwar, F. Naz, T. Mehmood, N. Saari, Anti-*Helicobacter pylori* and urease inhibition activities of some traditional medicinal plants. *Molecules*, **2013**, 18, 2135–2149.

[182] S. Mahernia, K. Bagherzadeh, F. Mojab, M. Amanlou, Urease inhibitory activities of some commonly consumed herbal medicines, *Iran J. Pharm. Res.*, **2015**, 14, 943–947.

[183] S. Bai, P. Bharti, L. Seasotiya, A. Malik, S. Dalal, In vitro screening and evaluation of some Indian medicinal plants for their potential to inhibit Jack bean and bacterial ureases causing urinary infections, *Pharm. Biol.*, **2015**, 53, 326–333.

[184] L. V. Modolo, A. X. de Souza, L. P. Horta, D. P. Araujo, A. de Fátima, An overview on the potential of natural products as ureases inhibitors: a review, *J. Adv. Res.*, **2015**, 6, 35–44.

[185] S. T. S. Hassan, M. Z̃emlic̃ka, Plant-derived urease inhibitors as alternative chemotherapeutic agents, *Arch. Pharm.*, **2016**, 349, 507–522.

[186] S. Golbabei, R. Bazl, S. Golestanian, F. Nabati, Z. B. Omrany, B. Yousefi, Urease inhibitory activities of b- boswellic acid derivatives, *J. Pharm. Sci.*, **2013**, 21, 2.

[187] C. Li, J. Xie, X. Chen, Z. Mo, W. Wu, Y. Liang, Comparison of *Helicobacter pylori* urease inhibition by rhizoma *Coptidis*, cortex *Phellodendri* and berberine: mechanisms of interaction with the sulfhydryl group, *Planta Med.*, **2016**, 82, 305–311.

[188] J. T. Zhou, C. L. Li, L. H. Tan, Y. F. Xu, Y. H. Liu, Z. Z. Mo, Inhibition of *Helicobacter pylori* and its associated urease by palmatine: pnvestigation on the potential mechanism, *PLoS ONE*, **2017**, 12, e0168944.

[189] L. Tan, C. Li, H. Chen, Z. Mo, J. Zhou, Y. Liu, Epiberberine, a natural protoberberine alkaloid, inhibits urease of *Helicobacter pylori* and jack bean: Susceptibility and mechanism, *Eur. J. Pharm. Sci.*, **2017**, 110, 77–86.

- [190] Z. Z. Mo, X. F. Wang, X. Zhang, J. Y. Su, H. M. Chen, Y. H. Liu, Andrographolide sodium bisulphite-induced inactivation of urease: inhibitory potency, kinetics and mechanism, *BMC Compl. Alternat. Med.*, **2015**, 15, 238.
- [191] M. Ranjbar-Omid, M. Arzanlou, M. Amani, S. K. S. Al-Hashem, N. A. Mozafari, H. P. Doghaheh, Allicin from garlic inhibits the biofilm formation and urease activity of *Proteus mirabilis* in vitro, *FEMS Microbiol. Lett.*, **2015**, 362, fnv049.
- [192] R. Mathialagan, N. Mansor, B. Al-Khateeb, M. H. Mohamad, M. R. Shamsuddin, Evaluation of allicin as soil urease inhibitor, *Procedia Eng.*, **2017**, 184, 449–459.
- [193] H. Sahin, Honey as an apitherapeutic product: its inhibitory effect on urease and xanthine oxidase, *J. Enz. Inhib. Med. Chem.*, **2015**, 31, 491–494.
- [194] J. Rückriemen, O. Klemm, T. Henl, Manuka honey (*Leptospermum scoparium*) inhibits jack bean urease activity due to methylglyoxal and dihydroxyacetone, *Food Chem.*, **2017**, 230, 540-546.
- [195] S. Kolyali, N. Baltas, H. Sahin, S. Karaoglu, Evaluation of anti-*Helicobacter pylori* activity and urease inhibition by some Turkish authentic honeys, *J. Sci. Food Eng.*, **2017**, 7, 67–73.
- [196] F. Matongo, U. U. Nwodo, In vitro assessment of *Helicobacter pylori* ureases inhibition by honey fractions, *Arch. Med. Res.*, **2014**, 45, 540–546.
- [197] F. Hashem-Dabaghian, M. Agah, M. Taghavi-Shirazi, A. Ghobadi, Combination of *Nigella sativa* and honey in eradication of gastric *Helicobacter pylori* infection, *Iran Red Crescent Med. J.*, **2016**, 18, 23771.
- [198] T. Arshad, K. M. Khan, N. Rasool, U. Salar, S. Hussain, H. Asghar, 5-Bromo-2-aryl benzimidazole derivatives as non-cytotoxic potential dual inhibitors of α -glucosidase and urease enzymes, *Bioorg. Chem.*, **2017**, 72, 21–31.
- [199] M. Hanif, K. Shoaib, M. Saleem, N. H. Rama, S. Zaib, J. Iqbal, Synthesis, urease inhibition, antioxidant, antibacterial, and molecular docking studies of 1,3,4- oxadiazole derivatives, *ISRN Pharmacol.*, **2012**, art.928901.

- [200] M. A. Laothi, S. Shams, K. M. Khan, Thiazolidine esters: new potent urease inhibitors, *J. Chem. Soc. Pak.*, **2014**, 36, 858–864.
- [201] L. P. Horta, Y. C. C. Mota, G. M. Barbosa, T.C. Braga, I. E. Marriel, A. de Fátima, Urease inhibitors of agricultural interest inspired by structures of plant phenolic aldehydes, *J. Braz. Chem. Soc.*, **2016**, 27, 1512–1519.
- [202] A. M. Hakimi, N. Lashgari, S. Mahernia, G. M. Ziarani, M. Amanlou, Facile one-pot four-component synthesis of 3,4-dihydro-2-pyridone derivatives: novel urease inhibitor scaffold, *Res. Pharm. Sci.*, **2017**, 12, 353–363.
- [203] E. Z. Dajani, M. J. Klamut, Novel therapeutic approaches to gastric and duodenal ulcers: an update, *Expert Opin. Invest. Drugs*, **2000**, 9, 1537-1544.
- [204] T. C. Kühler, J. Fryklund, N. Bergman, J. Weillitz, A. Lee, H. Larsson, Structure-Activity Relationship of Omeprazole and Analogs as *Helicobacter pylori* Urease Inhibitors, *J. Med. Chem.*, **1995**, 38, 4906-4916.
- [205] Takeda Chemical Industries Ltd. Urease inhibitor. JP7025767, **1995**.
- [206] K. Nagata, H. Satoh, T. Iwahi, T. Shimoyama, T. Tamura, Potent inhibitory action of the gastric proton pump inhibitor lansoprazole against urease activity of *Helicobacter pylori*: unique action for *H. pylori* cells, *Antimicrob. Agents Chemother.*, **1993**, 37, 769-774.
- [207] M. Tsuchiya, L. Imamura, J.-B. Park, K. Kobashi, *Helicobacter pylori* Urease Inhibition by Rabeprazole, a Proton Pump Inhibitor, *Biol. Pharm. Bull.*, **1995**, 18, 1053-1056.
- [208] F. Alvandifar, A. Tahghighi, R. Sabourian, L. Firoozpour, M. Mahdavi, P. Saniee, 2-Substituted-5-(5-nitro-furan-2-yl)-1,3,4-thiadiazoles: Anti *Helicobacter pylori* activity evaluation and docking study, *J. Chem. Pharm. Res.*, **2015**, 7, 2512–2519.
- [209] E. Mentese, H. Bektas, B. B. Sokmen, M. Emirik, D. Çakir, B. Kahvecii, Synthesis and molecular docking study of some 5,6-dichloro-2- cyclopropyl-1Hbenzimidazole derivatives bearing triazole, oxadiazole, and imine functionalities as potent inhibitors of urease, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2017**, 27, 3014–3018.

- [210] L. K. Adsul, B. P. Bandgar, H. V. Chavan, S. S. Jalde, V. D. Dhakane, A. L. Shirfule, Synthesis and biological evaluation of novel series of aminopyrimidine derivatives as urease inhibitors and antimicrobial agents, *J. Enz. Inhib. Med. Chem.*, **2013**, 28, 1316–1323.
- [211] S. P. Howell, J. B. Sumner, The specific effects of buffers upon urease activity, *J. Biol. Chem.*, **1934**, 104, 619–626.
- [212] S. Benini, W. R. Rypniewski, K. S. Wilson, S. Ciurli, S. Mangani, Structure-based rationalization of urease inhibition by phosphate: novel insights into the enzyme mechanism, *J. Biol. Inorg. Chem.*, **2001**, 6, 778-780.
- [213] C. A. Grant, Use of NBPT and ammonium thiosulphate as urease inhibitors with varying surface placement of urea and urea ammonium nitrate in production of hard red spring wheat under reduced tillage management. *Can. J. Plant. Sci.*, **2014**, 94, 329–335.
- [214] A. G. B. Silva, C. H. Sequeira, R. A. Sermarini, R. Otto, Urease inhibitor NBPT on ammonia volatilization and crop productivity: a meta-analysis. *Agron. J.*, **2017**, 109, 1–13.
- [215] F. M. Oliveira, L. C. A. Barbosa, A. J. Demuner, C. R. A. Maltha, S. R. Pereira, L. P. Horta, Synthesis, molecular properties and DFT studies of new phosphoramidates as potential urease inhibitors, *Med. Chem. Res.*, **2014**, 23, 5174–5187.
- [216] S. Vassiliou, A. Grabowiecka, P. Kosikowska, A. Yiotakis, P. Kafarski, Ł. Berlicki, Design, Synthesis, and Evaluation of Novel Organophosphorus Inhibitors of Bacterial Ureases, *J. Med. Chem.*, **2008**, 51, 5736-5744.
- [217] R. K. Andrews, A. Dexter, R. L. Blakeley, B. Zerner, Jack bean urease (EC 3.5.1.5) VIII. On the inhibition of urease by amides and esters of phosphoric acid, *J. Am. Chem. Soc.*, **1986**, 108, 7124-7125.
- [218] S. Vassiliou, P. Kosikowska, A. Grabowiecka, A. Yiotakis, P. Kafarski, Ł. Berlicki, Computer-aided optimization of phosphinic inhibitors of bacterial ureases, *J. Med. Chem.*, **2010**, 53, 5597–5606.
- [219] S. Vassiliou, P. Kosikowska, A. Grabowiecka, Ł. Berlicki, Three component Kabachnik-Fields condensation leading to substituted

aminomethane-Phydroxymethylphosphonic acids as a tool for screening of bacterial urease inhibitors, *ARKIVOC*, **2012**, 33–43.

[220] Ł. Berlicki, M. Bochno, A. Grabowiecka, A. Białas, P. Kosikowska, P. Kafarski, N-Substituted aminomethanephosphonic and aminomethane-P-methylphosphonic acids as inhibitors of ureases, *Amino Acids*, **2012**, 42, 1937–1945.

[221] K. Macegoniuk, A. Dzielak, A. Mucha, Ł. Berlicki, Bis(aminomethyl)-phosphinic acid, a highly promising scaffold for the development of bacterial urease inhibitors, *ACS Med. Chem. Lett.*, **2015**, 6, 146–150.

[222] V. Ntatsopoulos, S. Vassiliou, K. Macegoniuk, Ł. Berlicki, A. Mucha, Novel organophosphorus scaffolds of urease inhibitors obtained by substitution of Morita-Baylis-Hillman adducts with phosphorus nucleophiles. *Eur. J. Med. Chem.*, **2017**, 133, 107–120.

[223] K. Macegoniuk, R. Kowalczyk, A. Rudzinska, M. Psurski, J. Wietrzyk, Ł. Berlicki, Potent covalent inhibitors of bacterial urease identified by activity-reactivity profiling, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2017**, 27, 1346–1350.

[224] Á. G. Díaz-Sánchez, E. Alvarez-Parrilla, A. Martínez-Martínez, L. Aguirre-Reyes, J. A. Orozpe-Olvera, M. A. Ramos-Soto, Inhibition of urease by Disulfiram, an FDA-approved thiol reagent used in humans, *Molecules*, **2016**, 21, 1628.

[225] K. Macegoniuk, E. Grela, J. Palus, E. Rudzinska-Szostak, A. Grabowiecka, M. Biernat, 2-Benziselenazol-3(2H)-one derivatives as a new class of bacterial urease inhibitors, *J. Med. Chem.*, **2016**, 59, 8125–8133.

[226] S. Matsubara, H. Shibata, F. Ishikawa, T. Yokokura, M. Takahashi, T. Sugimura, K. Wakabayashi, Suppression of *Helicobacter pylori*-induced gastritis by green tea extract in Mongolian gerbils, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **2003**, 310, 715–719.

[227] L. Mazzei, M. Cianci, F. Musiani, G. Lente, M. Palombo, S. Ciurli, Inactivation of urease by catechol: Kinetics and structure, *J. Inorg. Biochem.*, **2017**, 166, 182–189.

- [228] R. B. Silverman, Mechanism-based enzyme inactivators, *Methods Enzymol.*, **1995**, 249, 240–283.
- [229] H. Wagreich, J.M. Nelson, On the oxidation product of catechol when oxidized by means of tyrosinase, *J. Biol. Chem.*, **1936**, 115, 459–465.
- [230] L. Mazzei, M. Cianci, F. Musiani, S. Ciurli, Inactivation of urease by 1,4-benzoquinone: chemistry at the protein surface, *Dalton Trans*, **2016**, 45, 5455–5459.
- [231] X. M. Shen, G. Dryhurst, Iron- and manganese-catalyzed autoxidation of dopamine in the presence of L-cysteine: possible insights into iron- and manganese-mediated dopaminergic neurotoxicity, *Chem. Res. Toxicol.*, **1998**, 11, 824–837.
- [232] N. Schweigert, A.J. Zehnder, R.I. Eggen, Chemical properties of catechols and their molecular modes of toxic action in cells, from microorganisms to mammals, *Environ. Microbiol.*, **2001**, 3, 81–91.
- [233] R. F. Weiss, The solubility of nitrogen, oxygen and argon in water and seawater, *Deep-Sea Res.*, **1970**, 17, 721–735.
- [234] Á. Balogh, G. Lente, J. Kalmár, I. Fábián, Reaction schemes that are easily confused with a reversible first-order reaction, *In. J. Chem. Kinet.*, **2015**, 47, 773–782.
- [235] G. Li, H. Zhang, F. Sader, N. Vadhavkar, D. Njus, Oxidation of 4-methylcatechol: implications for the oxidation of catecholamines, *Biochemistry*, **2007**, 46, 6978–6983.
- [236] J. Yang, M. A. Cohen Stuart, M. Kamperman, Jack of all trades: versatile catechol crosslinking mechanisms, *Chem. Soc. Rev.*, **2014**, 43, 8271–8298.
- [237] L. C. Chan, B. G. Cox, Kinetics of Amide Formation through Carbodiimide/N-Hydroxybenzotriazole (HOBt) Couplings, *J. Org. Chem.*, **2007**, 72, 8863–8869.
- [238] B. T. Worell, J. A. Malik, V. V. Fokin, Direct evidence of a dinuclear copper intermediate in Cu(I)-catalyzed azide-alkyne cycloadditions, *Science*, **2013**, 340, 457–460.

- [239] T. Silva, T. Mohamed, A. Shakeri, P.-P.-N. Rao, L. Martínez-Gonzalez, D.-I. Pérez, A. Martínez, M.-J. Valente, J. Garrido, E. Uriarte, P. Serrão, P. Soares-Da-silva, F. Remião, F. Borges, Development of Blood-Brain Barrier Permeable Nitrocatechol-Based Catechol O-Methyltransferase Inhibitors with Reduced Potential for Hepatotoxicity., *J. Med. Chem.*, **2016**, 59, 7584-7597.
- [240] R. Taguchi, K. Hatayama, T. Takahashi, T. Hayashi, Y. Sato, D. Sato, K. Ohta, H. Nakano, C. Seki, Y. Endo, K. Tokuraku, K. Uwai, Structure activity relations of rosmarinic acid derivatives for the amyloid β aggregation inhibition and antioxidant properties., *Eur. J. Med. Chem.*, **2017**, 138, 1066-1075.
- [241] J. Xie, F. Yang, M. Zhang, C. Lam, Y. Qiao, J. Xiao, D. Zhang, Y. Ge, L. Fu, D. Xie, Antiproliferative activity and SARs of caffeic acid esters with mono-substituted phenylethanols moiety, *Bioorganic Med. Chem. Lett.*, **2017**, 27, 131-134.
- [242] V.- P. Sonar, A. Corona, S. Distinto, E. Maccioni, R. Meleddu, B. Fois, C. Floris, N.-V. Malpure, S. Alcaro, E. Tramontano, F. Cottiglia, Natural product-inspired esters and amides of ferulic and caffeic acid as dual inhibitors of HIV-1 reverse transcriptase, *Eur. J. Med. Chem.*, **2017**, 130, 248-260.
- [243] H. Shi, D. Xie, R. Yang, Y. Cheng, Synthesis of Caffeic Acid Phenethyl Ester Derivatives, and Their Cytoprotective and Neuritogenic Activities in PC12 Cells, *J. Agric. Food Chem.*, **2014**, 62, 5046-5053.
- [244] L. M. LeBlanc, A. F. Pare, J. Jean-Francois, M.- J.- G. Hebert, M. - E. Surette, M. Touaibia, Mohamed, Synthesis and Antiradical/Antioxidant Activities of Caffeic Acid Phenethyl Ester and Its Related Propionic, Acetic, and Benzoic Acid Analogues, *Molecules*, **2012**, 17, 14637-14650.
- [245] T. Bozzini, G. Botta, M. Delfino, S. Onofri, R. Saladino, D. Amatore, R. Sgarbanti, L. Nencioni, A.-T. Palamara, Tyrosinase and Layer-by-Layer supported tyrosinases in the synthesis of lipophilic catechols with antiinfluenza activity, *Bioorganic Med. Chem.*, **2013**, 21, 7699-7708.
- [246] Y.-F. Liang, X. Li, X. Wang, M. Zou, C. Tang, Y. Liang, S. Song, N. Jiao, A highly efficient metal-free approach to *meta*- and multiple-substituted phenols *via* a simple oxidation of cyclohexenones, *J. Am. Chem. Soc.*, **2016**, 138, 12271-12277.

- [247] J.-D. Buynak, R. A Srinivasa, V.-R. Doppalapudi, G. Adam, P.-J. Petersen, S.-D. Nidamarthy, The synthesis and evaluation of 6-alkylidene-2'- β -substituted penam sulfones as β -lactamase inhibitors, *Bioorganic Med. Chem. Lett.*, **1999**, 9, 1997-2002.
- [248] G. Allegretta, E. Weidel, M. Empting, R.-W. Hartmann, Catechol-based substrates of chalcone synthase as a scaffold for novel inhibitors of PqsD, *Eur. J. Med. Chem.*, **2015**, 90, 351-359.
- [249] K. Takubo, K. Furutsu, T. Ide, H. Nemoto, Y. Ueda, K. Tsujikawa, T. Ikawa, T. Yoshimitsu, S. Akai, Diversity Oriented Synthesis of Allocolchicinoids with Fluoro and/or Oxygen Substituent(s) on the C-Ring from a Single Common Intermediate, *Eur. J. Org. Chem.*, **2016**, 1562-1576.
- [250] P.-P. Roy, D. Faye, S. Blanchard, M. Cormier, J.-A. Doiron, M.-E. Surette, M. Touaibia, New Caffeic Acid Phenylethyl Ester Analogs Bearing Substituted Triazole: Synthesis and Structure-Activity Relationship Study towards 5-Lipoxygenase Inhibition, *Journal of Chemistry*, **2017**, 2380531.
- [251] J.-A. Doiron, L.-M. Leblanc, M.-J.-G. Hébert, N.-A. Levesque, A.-F. Paré, J. Jean-François, M. Cormier, M.-E. Surette, M. Touaibia, Structure activity relationship of caffeic acid phenethyl ester analogs as new 5 lipoxygenase inhibitors, *Chem. Biol. Drug Des.*, **2017**, 89, 514-528.
- [252] T.-K. Vu, S.-P. Patil, Y.-J. Park, D.-T. Thao, Synthesis and in vitro cytotoxic activity evaluation of novel Mannich bases and modified AZT derivatives possessing Mannich base moieties via click chemistry, *Lett. Drug. Des. Discov.*, **2013**, 10, 585-593.
- [253] D. Xie, F. Yang, J. Xie, M. Zhang, W. Liu, L. Fu, A rapid and practical catalytic esterification for the preparation of caffeic acid esters, *J. Chem. Res.*, **2014**, 38, 695-700. [254] X.-X. He, X.-H. Yang, R.-Y. Ou, Y. Ouyang, S.-N. Wang, Z.-W. Chen, S.-J. Wen, R.-B. Pi, Synthesis and evaluation of multifunctional ferulic and caffeic acid dimers for Alzheimer's disease., *Nat. Prod. Res.*, **2017**, 31, 734-737.
- [255] G. Chen, Y. Zhang, X. Liu, Q. Fang, Z. Wang, L. Fu, Z. Liu, Y. Wang, Y. Zhao, X. Li, G. Liang, Discovery of a New Inhibitor of Myeloid Differentiation 2

from Cinnamamide Derivatives with Anti-Inflammatory Activity in Sepsis and Acute Lung Injury, *J. Med. Chem.*, **2016**, 59, 2436-2451.