



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ  
ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ**

Διπλωματική Εργασία

**ΣΥΝΘΕΣΗ ΚΑΙ ΒΙΟΛΟΓΙΚΗ ΑΠΟΤΙΜΗΣΗ**

**ΦΘΟΡΟΦΑΙΝΥΛΟ ΠΥΡΡΟΛΩΝ**

**SYNTHESIS AND BIOLOGICAL EVALUATION**

**OF FLUOROPHENYL PYRROLES**

Ουρανία Χριστίδου

Λάρισα 2016

**ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ**

**Κομιώτης Δημήτριος** - Καθηγητής Οργανικής Χημείας του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

**Μαρκουλάτος Παναγιώτης** - Καθηγητής Εφαρμοσμένης Μικροβιολογίας του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

**Στυλιανή Μαντά** –ΠΔ 407/80 του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

## ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Αρχικά, θα ήθελα να ευχαριστήσω την Στυλιανή Μαντά, την Αθηνά Δημοπούλου, την Νίκη Τζιουμάκη και τον Νίκο Κολάτο υπό την επίβλεψη των οποίων πραγματοποιήθηκε η παρούσα εργασία, για την επιστημονική καθοδήγηση, τη βοήθεια και την υπομονή τους καθ' όλη τη διάρκεια των πειραματικών διαδικασιών και της συγγραφής. Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον **κ. Κομιώτη Δημήτριο** και τον **κ. Μαρκουλάτο Παναγιώτη** για την συμμετοχή τους στην τριμελή επιτροπή. Ευχαριστώ όλα τα μέλη του εργαστηρίου για την καλή συνεργασία και την υπομονή. Τέλος, οφείλω ένα ιδιαίτερα μεγάλο ευχαριστώ στην οικογένειά και τους φίλους μου και πιο συγκεκριμένα τις Βίκυ, Κατερίνα, Κωνσταντίνα, Χριστίνα, Μαρία Μ. και Μαρία Σ. για την συνεχή υποστήριξη, υπομονή και κατανόηση που μου, παρείχαν όλα αυτά τα ακαδημαϊκά χρόνια.

# Περιεχόμενα

Περιεχόμενα .....	4
ΠΕΡΙΛΗΨΗ .....	6
ABSTRACT .....	6
1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	7
1.1 Καρκίνος.....	7
1.1.1 Γενικά .....	7
1.1.2 Τι ορίζου με καρκίνο; .....	7
1.1.3 Βασικά χαρακτηριστικά των καρκινικών κυττάρων.....	8
1.2 Ετεροκυκλικές ενώσεις .....	11
1.3 Αμίνες.....	12
1.3.1 Οι αμίνες στη φύση.....	12
1.4 Αλκαλοειδή.....	13
1.5 Πυρρολιδίνες.....	13
1.5.1 Vindesine .....	14
1.5.2 Piracetam.....	15
1.5.3 Clausenamide.....	15
1.5.4 Atorvastatin .....	16
1.5.5 Σύνθεση των πυρρολινονών.....	17
1.5.6 Η αντίδραση Mannich .....	18
1.6 Αντιδράσεις πολλών συστατικών (MCRs) .....	19
1.6.1 Χρήση μικροκυμάτων.....	20
2 ΣΚΟΠΟΣ.....	21
3 ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ .....	22
3.1 Microwave CEM.....	22
3.2 Χρωματογραφία στήλης .....	22
3.3 Χρωματογραφίαλεπτήςστιβάδας (TLC:ThinLayerChromatography).....	23
3.4 Ταυτοποίηση ενώσεων .....	24
4 ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ .....	26
4.1 Σύνθεση του 3-υδροξυ-1-μεθυλο-2-οξο-5-(3-φθοροφαινυλο)-2,5-διυδρο-1H- πυρρολο-3-καρβοξυλικού αιθυλεστέρα μέσω αντίδρασης τριών αντιδρώντων. ....	26
4.2 Σύνθεση του 3-υδροξυ-1-αιθυλο-2-οξο-5-(3-φθοροφαινυλο)-2,5-διυδρο-1H- πυρρολο-3-καρβοξυλικού αιθυλεστέρα μέσω αντίδρασης τριών αντιδρώντων.....	28
4.3 Σύνθεση του 3-υδροξυ-1-κυκλοπροπυλο-2-οξο-5-(3-φθοροφαινυλο)-2,5-διυδρο- 1H-πυρρολο-3-καρβοξυλικού αιθυλεστέρα μέσω αντίδρασης τριών αντιδρώντων .....	30

4.4	Σύνθεση του 3-υδροξυ-1-κυκλοβουτυλο-2-οξο-5-(3-φθοροφαινυλο)-2,5-διυδρο-1H-πυρρολο-3-καρβοξυλικού αιθυλεστέραμέσω αντίδρασης τριών αντιδρώντων .....	32
4.5	Σύνθεση του 3-υδροξυ-1-βενζυλο-2-οξο-5-(3-φθοροφαινυλο)-2,5-διυδρο-1H-πυρρολο-3-καρβοξυλικού αιθυλεστέραμέσω αντίδρασης τριών αντιδρώντων .....	34
4.6	ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΜΕ <sup>1</sup> H-NMR .....	36
5	ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ-ΣΥΖΗΤΗΣΗ .....	37
6	ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ .....	41

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η παρούσα διπλωματική εργασία είχε ως στόχο τη σύνθεση και βιολογική αποτίμηση φθοροφαινυλο-πυρρολών. Αυτό επετεύχθη σε μία αντίδραση ενός σταδίου με την χρήση τριών αντιδραστηρίων. Τα αντιδραστήρια αυτά ήταν διαιθυλικό οξαλοξικό άλας, παράγωγα αμινών και 3-φθορο βενζαλδεΐδη. Όλες οι νέοσυντιθέμενες ενώσεις μελετήθηκαν ως προς την κυτταροτοξική και αντιϊική τους δράση. Οι δομές των όλων των προϊόντων ταυτοποιήθηκαν με φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού ( $^1\text{H}$ NMR).

## ABSTRACT

The main focus of the present thesis was the synthesis and biological evaluation of fluorophenyl-pyrroles. This was achieved in an one-step multi component reaction using diethyloxalacetate, primary amines and 3-fluoro-benzaldehyde. All the newly synthesized compounds were evaluated for their cytotoxic and antiviral activity. The structures of all the newly synthesized products were determined by using  $^1\text{H}$  NMR spectroscopy.

# 1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ

## 1.1 Καρκίνος

### 1.1.1 Γενικά

Ο καρκίνος συνεχίζει να αποτελεί παγκόσμια μάστιγα παρά την τεράστια πρόοδο που έχει σημειωθεί στον τομέα της έρευνας τις τελευταίες δεκαετίες. Αποτελεί την δεύτερη πιο κοινή αιτία θανάτου μετά τα καρδιαγγειακά νοσήματα. Μέχρι το 2020, ο παγκόσμιος πληθυσμός αναμένεται να αυξηθεί σε 7,5 δισεκατομμύρια. Από αυτό τον αριθμό θα διαγνωστούν περίπου 15 εκατομμύρια νέες περιπτώσεις καρκίνου και 12 εκατομμύρια ασθενείς θα πεθάνουν. Τα πρώτα ίχνη του εντοπίζονται σε απολιθωμένα οστά και μούμιες της αρχαίας Αιγύπτου. Στην ιατρική, το πρώτο χειρόγραφο που αναφέρεται στον καρκίνο βρέθηκε επίσης στην Αίγυπτο. Ονομάζεται πάπυρος Edwin Smith και χρονολογείται το 3000 π. Χ. Ο συγγραφέας του περιγράφει 8 περιπτώσεις καρκίνου του μαστού οι οποίες αντιμετωπίστηκαν με καυτηριασμό και καταλήγει: << πρόκειται για μια σοβαρή ασθένεια για την οποία δεν υπάρχει θεραπεία >> (Hajdu, 2011).

### 1.1.2 Τι ορίζουμε καρκίνο;

Ο καρκίνος μπορεί να οριστεί ως μια ασθένεια στην οποία μια ομάδα κυττάρων πολλαπλασιάζεται ανεξέλεγκτα αγνοώντας τους κανόνες της κυτταρικής διαίρεσης, στους οποίους υπόκεινται φυσιολογικά τα κύτταρα (Hejmadi, 2010). Αλλαγές στο γονιδίωμα των κυττάρων που συνήθως οφείλονται σε μεταλλάξεις είτε κληρονομήσιμες είτε επαγόμενες από περιβαλλοντικούς παράγοντες, έχουν ως αποτέλεσμα την παραγωγή πρωτεϊνών που διαταράσσουν τη λεπτή ισορροπία μεταξύ της κυτταρικής διαίρεσης και της κυτταρικής αδράνειας (Hejmadi, 2010). Πολλοί ερευνητές υποστηρίζουν ότι δεν αρκεί μια μόνο αλλαγή για τη μετατροπή ενός κυττάρου σε καρκινικό. Απαιτούνται περίπου 4 με 7 αλλαγές προκειμένου ένα φυσιολογικό κύτταρο να εξελιχθεί σε κακοήγη όγκο και συνήθως μεσολαβούν πολλά χρόνια μεταξύ της αρχικής αλλαγής και της εμφάνισης του καρκίνου. Το 1971, ο Alfred Knudson διατύπωσε τη διάσημη υπόθεση των δύο γενετικών αλλαγών (two hits hypothesis) συγκρίνοντας επιδημιολογικά δεδομένα που αφορούσαν κληρονομήσιμες και σποραδικές μορφές του ρετινοβλαστώματος. Σύμφωνα με την υπόθεση αυτή, υπάρχει μια αρχική μετάλλαξη ενός αλληλομόρφου

γονιδίου στα γεννητικά κύτταρα οικογενειών με κληρονομική προδιάθεση για καρκίνο, η οποία κληρονομείται ενώ αργότερα μια δεύτερη μετάλλαξη του άλλου αλληλομόρφου συμβαίνει στα σωματικά κύτταρα οδηγώντας στην ανάπτυξη του καρκίνου. Στην περίπτωση του μη οικογενούς ρετινοβλαστώματος, η πρώτη μετάλλαξη πραγματοποιείται σε ένα ήδη διαφοροποιημένο κύτταρο του αμφιβληστροειδούς. Αυτό το κύτταρο εμφανίζει μια δεύτερη μετάλλαξη αργότερα κατά την παιδική ηλικία πυροδοτώντας την ανάπτυξη του καρκίνου. Αυτό εξηγεί γιατί οι σποραδικές μορφές ρετινοβλαστώματος τείνουν να εμφανίζονται αργότερα από τις κληρονομήσιμες. Η ταυτοποίηση του γονιδίου του ρετινοβλαστώματος (RB) το 1987, επιβεβαίωσε πλήρως την υπόθεση του Knudson (Barlow-Stewart, 2012).

### **1.1.3 Βασικά χαρακτηριστικά των καρκινικών κυττάρων**

Υπάρχουν περισσότεροι από 100 διαφορετικοί τύποι καρκίνου και υπότυποι καρκινικών όγκων που εμφανίζονται σε συγκεκριμένα όργανα (Hanahan and Weinberg, 2000). Παρόλα αυτά τα καρκινικά κύτταρα μοιράζονται όλα ή κάποια από τα παρακάτω χαρακτηριστικά:

#### **1. Αθανασία/ Απεριόριστη διάρκεια ζωής**

Τα φυσιολογικά κύτταρα έχουν περιορισμένη διάρκεια ζωής. Αυτό οφείλεται στη συνεχή βράχυνση των άκρων των χρωμοσωμάτων (τελομερών) σε κάθε κύκλο αντιγραφής του DNA. Η βράχυνση των χρωμοσωμάτων συνεχίζεται μέχρι ενός σημείου πέραν του οποίου ενεργοποιείται ο μηχανισμός προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου. Ωστόσο, τα καρκινικά κύτταρα διατηρούν το μήκος των τελομερικών περιοχών τους λίγο μεγαλύτερο από ένα κρίσιμο σημείο ενεργοποιώντας ένα ένζυμο που λέγεται τελομεράση. Το 85-90% των καρκινικών κυττάρων έχει πλήρη ενεργότητα τελομεράσης, γεγονός που τους επιτρέπει να διαιρούνται επ' άοριστον. Αντίθετα, στα φυσιολογικά κύτταρα η τελομεράση χάνει την ενεργότητα της με το χρόνο, περιορίζοντας έτσι τον αριθμό των διαιρέσεων που μπορεί να υποστεί το κύτταρο (Μαρμάρας-Λαμπροπούλου, 2005; Hanahan and Weinberg, 2000; Hejmadi, 2010).

#### **2. Επάρκεια μηνυμάτων επαγωγής της κυτταρικής διαίρεσης**

Τα φυσιολογικά κύτταρα χρειάζονται εξωκυττάρια αυξητικά σήματα (growth signals) προκειμένου να διαιρεθούν. Αυτά τα σήματα (π.χ. διαλυτοί αυξητικοί παράγοντες, πρωτεΐνες της εξωκυττάριας ύλης, μόρια αλληλεπίδρασης μεταξύ των κυττάρων)



δεσμεύονται σε διαμεμβρανικούς υποδοχείς με αποτέλεσμα την ενεργοποίηση μιας σειράς ενδοκυττάρων μορίων και τελικά την έκφραση των γονιδίων που είναι υπεύθυνα για τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό. Τα πρωτο-ογκογονίδια κωδικοποιούν πολλές από τις πρωτεΐνες που συμμετέχουν σε αυτό το μονοπάτι μεταγωγής μηνυμάτων για κυτταρική διαίρεση. Μεταλλάξεις στην κωδική ή τη ρυθμιστική περιοχή ενός πρωτο-ογκογονιδίου, χρωμοσωματικές αναδιατάξεις που οδηγούν σε μετατόπιση μέρους ή ολόκληρου του πρωτο-ογκογονιδίου σε διαφορετική θέση του χρωμοσώματος, αύξηση του αριθμού των αντιγράφων του ή ενσωμάτωση του γενετικού υλικού ενός ιού κοντά ή μέσα στο πρωτο-ογκογονίδιο μπορεί να οδηγήσουν σε μετατροπή του σε ογκογονίδιο. Τα ογκογονίδια χαρακτηρίζονται από υπερπαραγωγή των πρωτεϊνών που κωδικοποιούν ή από υπερβολική αύξηση της ενεργότητάς τους με αποτέλεσμα τα φυσιολογικά κύτταρα να αρχίσουν να πολλαπλασιάζονται ανεξέλεγκτα και ανεξάρτητα από το μικροπεριβάλλον τους και να μετατρέπονται σε καρκινικά. Τα ογκογονίδια συμπεριφέρονται ως επικρατή γονίδια (Hanahan and Weinberg, 2000; Hejmadi, 2010).

3. Μη απόκριση σε μηνύματα καταστολής της κυτταρικής διαίρεσης  
Προκειμένου να διατηρηθεί η ομοιόσταση ενός ιστού, τα κύτταρα εκτός από μηνύματα για κυτταρική διαίρεση δέχονται και μηνύματα τα οποία λειτουργούν ως φρένο για τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό. Τα ογκοκατασταλτικά γονίδια κωδικοποιούν πρωτεΐνες που εμποδίζουν την διαίρεση των κυττάρων. Τα προϊόντα αυτών των γονιδίων εντοπίζονται στην κυτταρική μεμβράνη, στο κυτταρόπλασμα ή στον πυρήνα. Μεταλλάξεις στα ογκοκατασταλτικά γονίδια οδηγούν σε απενεργοποίηση των πρωτεϊνών που κωδικοποιούν με αποτέλεσμα τα κύτταρα να αγνοούν τα εξωκυττάρια μηνύματα καταστολής και να συνεχίζουν να διαιρούνται. Τα ογκοκατασταλτικά γονίδια συμπεριφέρονται ως υποτελή γονίδια (Hanahan and Weinberg, 2000; Hejmadi, 2010).

4. Αποφυγή της απόπτωσης  
Η δημιουργία όγκων μπορεί να ερευνηθεί όχι μόνο από τη σκοπιά του συνεχούς κυτταρικού πολλαπλασιασμού αλλά και από τη σκοπιά του μειωμένου κυτταρικού θανάτου. Τα κύτταρα συνεχώς ελέγχουν την εσωτερική τους κατάσταση δηλαδή τα επίπεδα οξυγόνου και θρεπτικών συστατικών, την ακεραιότητα του γενετικού

υλικού και την ισορροπία των μονοπατιών που ρυθμίζουν τον κυτταρικό κύκλο. Αν αυτός ο έλεγχος αποκαλύψει βλάβη ή δυσλειτουργία, ενεργοποιούνται μηχανισμοί που καθορίζουν αν η ανάπτυξη του κυττάρου θα παγώσει και θα ενεργοποιηθούν μηχανισμοί επιδιόρθωσης ή εναλλακτικά αν η βλάβη είναι εκτεταμένη ενεργοποιούν το μονοπάτι προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου (απόπτωση). Υπάρχουν αρκετά στοιχεία που υποδηλώνουν ότι η αποφυγή της απόπτωσης είναι ένα κύριο χαρακτηριστικό των περισσότερων ,αν όχι όλων, μορφών καρκίνου. Τα καρκινικά κύτταρα αποφεύγουν την απόπτωση με πολλούς τρόπους. Ο πιο κοινός τρόπος περιλαμβάνει μεταλλάξεις στο ογκοκατασταλτικό γονίδιο p53. Η πρωτεΐνη p53 λειτουργεί κυρίως ως ανιχνευτής βλαβών στο DNA και ενεργοποιεί είτε μηχανισμούς επιδιόρθωσης είτε το μονοπάτι απόπτωσης ως απόκριση στη βλάβη. Επίσης, ενδοκυττάρια μηνύματα όπως υποξία ή υπερέκφραση ογκογόνων πρωτεϊνών ενεργοποιούν πρωτεΐνες οι οποίες εμπλέκονται στην απόπτωση και σχετίζονται με την p53. Η απενεργοποίηση της λειτουργίας της p53 έχει παρατηρηθεί σε ποσοστό μεγαλύτερο από το 50% των περιπτώσεων καρκίνων στον άνθρωπο (Hejmadi, 2010).

#### 5. Αγγειογένεση

Όπως τα φυσιολογικά κύτταρα έτσι και τα καρκινικά χρειάζονται οξυγόνο και θρεπτικά συστατικά για να επιβιώσουν και να αναπτυχθούν. Όμως, καθώς ο όγκος μεγαλώνει, τα φυσιολογικά αιμοφόρα αγγεία δεν επαρκούν για να τροφοδοτήσουν τα κύτταρα που βρίσκονται στο κέντρο του. Για το λόγο αυτό τα καρκινικά κύτταρα ενεργοποιούν τη διαδικασία της αγγειογένεσης. Σε αρκετούς όγκους έχει παρατηρηθεί υπερέκφραση των αυξητικών παραγόντων VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor) και/ή FGF (Fibroblast Growth Factor). Σε άλλες περιπτώσεις έχει παρατηρηθεί μειωμένη έκφραση ενδογενών αναστολέων όπως η θρομβοσπονδίνη-1 ή η β-ιντερφερόνη. Σε μερικούς όγκους μπορεί να συμβούν και οι δύο αλλαγές. Και στις δύο περιπτώσεις πάντως διαταράσσεται η ισορροπία μεταξύ των επαγωγέων και των αναστολέων της αγγειογένεσης με αποτέλεσμα το σχηματισμό νέων αιμοφόρων αγγείων (Hanahan and Weinberg, 2000).

#### 6. Μετάσταση

Ορισμένα καρκινικά κύτταρα έχουν την ικανότητα να αποσπώνται από την αρχική καρκινική μάζα και με την κυκλοφορία του αίματος και της λέμφου να

μεταφέρονται σε άλλους ιστούς και όργανα. Εκεί συνεχίζουν την ανεξέλεγκτη διαίρεσή τους με αποτέλεσμα τη δημιουργία νέων όγκων (Hejmadi, 2010). Οι όγκοι που έχουν την ικανότητα μετάστασης ονομάζονται κακοήθεις. Αντίθετα οι όγκοι που δεν έχουν την ικανότητα να διεισδύουν σε γειτονικούς ιστούς και να εξαπλώνονται σε διαφορετικά σημεία του σώματος ονομάζονται καλοήθεις. Συνήθως οι καλοήθεις όγκοι δεν αποτελούν απειλή. Υπάρχουν όμως και περιπτώσεις που μπορεί να αποκτήσουν χαρακτηριστικά κακοήθους όγκου. Με τον όρο καρκίνος αναφερόμαστε στους κακοήθεις όγκους. Οι κακοήθεις όγκοι αποτελούν την αιτία θανάτου στο 90% των καρκινοπαθών (Hanahan and Weinberg, 2000).

Η σοβαρότητα αυτής της ασθένειας οδήγησε στην ανάγκη για δημιουργία καινοτόμων φαρμάκων που να στοχεύουν στην καταστολή της. Στην παρούσα διπλωματική εργασία μελετήθηκε η επίδραση 5 νέων οργανικών μορίων σε διάφορες καρκινικές σειρές. Το βασικό στοιχείο αυτών των μορίων είναι η ύπαρξη υποκαταστατών οι οποίοι ανήκουν στις ομάδες των ετεροκυκλικών ενώσεων, των, πρωτοταγών αμινών, των αλκαλοειδών και των πυρρολιδινών

## 1.2 Ετεροκυκλικές ενώσεις

Οι ετεροκυκλικές ενώσεις είναι μια σημαντική κατηγορία οργανικών ενώσεων που αντιπροσωπεύουν σχεδόν το ένα τρίτο των συνθέσεων της τελευταίας δεκαετίας, οι οποίες ανήκουν στο πεδίο της ετεροκυκλικής χημείας. Μεταξύ αυτών, το πυρρόλιο είναι μια από τις σχετικά πιο απλές ετεροκυκλικές ενώσεις λόγω της παρουσίας του σε ένα μεγάλο αριθμό φυσικών και μη φυσικών ενώσεων με σημαντικές ιδιότητες, τόσο στην φαρμακολογία, όσο στην επιστήμη των υλικών. Τα παράγωγα του πυρρολίου είναι δομικές μονάδες πολλών φυσικών προϊόντων και σημαντικών φαρμακευτικών ουσιών και χρήσιμα δομικά στοιχεία για διάφορα βιολογικά δραστικά μόρια και λειτουργικά υλικά. Γνωστά φυσικά πυρρόλια είναι τα παράγωγα της αίμης και η χλωροφύλλη, τα οποία περιέχουν τέσσερις πυρρολικές ομάδες που ενώνονται μεγέφυρες μεθινίου, ενώ πυρρολικά δομικά θραύσματα είναι ιδιαίτερα συχνά σε φυσικά προϊόντα θαλάσσιας προέλευσης, όπως είναι οι λαμελλαρίνες που απομονώνονται από θαλάσσια ασπόνδυλα και εμφανίζουν ιδιότητες κατά του καρκίνου και του HIV. Εκτός από τα φυσικά προϊόντα και τα ανάλογά τους, τα μη

φυσικά πυρρόλια δείχνουν ενδιαφέρουσες βιοδραστηριότητες, και, πράγματι, υπάρχει ένας σημαντικός αριθμός φαρμάκων που προέρχονται από το πυρρόλιο. Μερικά αντιπροσωπευτικά παραδείγματα είναι οι μη στεροειδείς, αντιφλεγμονώδεις παράγοντες tolmetin και zomepirac, το αντικαρκινικό φάρμακο sunitinib και ο παράγοντας μείωσης της χοληστερόλης, η atorvastatin.

### 1.3 Αμίνες

Οι αμίνες μπορεί να θεωρηθεί ότι προέρχονται από την αμμωνία ( $\text{NH}_3$ ) με αντικατάσταση ενός, δύο ή τριών υδρογόνων με αλκυλομάδες. Συνεπώς η λειτουργική ομάδα τους είναι άζωτο που συνδέεται με μία, δύο ή τρεις αλκυλομάδες. Οι αμίνες διακρίνονται σε πρωτοταγείς, δευτεροταγείς και τριτοταγείς αν το άζωτο συνδέεται με μία, δύο ή τρεις αλκυλομάδες αντίστοιχα. Η λειτουργική ομάδα των πρωτοταγών αμιμών είναι η  $\text{NH}_2$ . Οι αμίνες σχηματίζουν δεσμούς υδρογόνου που είναι ασθενέστεροι από τους δεσμούς υδρογόνου των αλκοολών. Οι αμίνες είναι ασθενείς βάσεις, όπου σε υδατικά διαλύματα δίστανται μερικώς δίνοντας ιόντα  $\text{OH}^-$ . Τα αλκαλοειδή είναι ετεροκυκλικές αμίνες, που απομονώνονται από διάφορα μέρη των φυτών και έχουν επίδραση στις φυσιολογικές λειτουργίες του οργανισμού.

#### 1.3.1 Οι αμίνες στη φύση

Οι αμίνες είναι πολύ διαδεδομένες στη φύση. Είναι οργανικές ενώσεις που εμπλέκονται σε λειτουργίες του οργανισμού ή έχουν φαρμακευτική δράση. Χαρακτηριστικά παραδείγματα αμιμών είναι οι νευροδιαβιβαστές ντοπαμίνη και σεροτινίνη, οι οποίες είναι πρωτοταγείς αμίνες. Επίσης η αδρεναλίνη είναι δευτεροταγής αμίνη, η οποία διεγείρει το κεντρικό νευρικό σύστημα και παράγεται σε καταστάσεις πανικού, πόνου κ.ά. Η ισταμίνη είναι ταυτόχρονα ετεροκυκλική αρωματική και αλειφατική αμίνη και εκκρίνεται σε μεγάλες ποσότητες σε αλλεργικές καταστάσεις. Τα φάρμακα που εμποδίζουν τη δράση της ονομάζονται αντισταμινικά. Οι βάσεις του DNA, όπως η αδενίνη και η γουανίνη, είναι ετεροκυκλικές αμίνες.

Πολλά συστατικά των τροφίμων είναι αμίνες. Η βιταμίνη B1 (θειαμίνη) είναι αρωματική πρωτοταγής αμίνη και ετεροκυκλική αμίνη. Η βιταμίνη B1 έχει

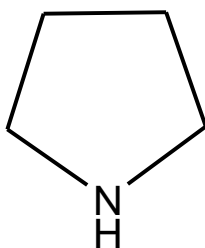
σημαντικό ρόλο στον καταβολισμό των υδατανθράκων και δρα ως συνένζυμο σε μηχανισμούς παραγωγής ενέργειας στον οργανισμό. Πολλές αμίνες χρησιμοποιούνται ως φαρμακευτικές ουσίες. Παράδειγμα αποτελεί η φλουοξετίνη, η οποία είναι η δραστική ουσία του Prozac που χρησιμοποιείται για τη θεραπεία της κατάθλιψης.

#### 1.4 Αλκαλοειδή

Τα αλκαλοειδή είναι ετεροκυκλικές αζωτούχες ενώσεις που απομονώνονται από τις ρίζες, τα φύλλα, τους φλοιούς και τους καρπούς διαφόρων φυτών. Το όνομα αλκαλοειδή οφείλεται στις βασικές (αλκαλικές) τους ιδιότητες που τους επιτρέπει να αντιδρούν με οξέα και να σχηματίζουν υδατοδιαλυτά άλατα. Στα αλκαλοειδή περιλαμβάνονται ενώσεις με πολύ διαφορετικές δομές. Έχουν απομονωθεί χιλιάδες αλκαλοειδή που έχουν επίδραση στις φυσιολογικές λειτουργίες του ανθρώπινου οργανισμού. Άλλα είναι δηλητήρια και άλλα πολλά έχουν φαρμακευτική δράση. Από τα πιο διαδεδομένα αλκαλοειδή είναι η καφεΐνη, νικοτίνη και η μορφίνη.

#### 1.5 Πυρρολιδίνες

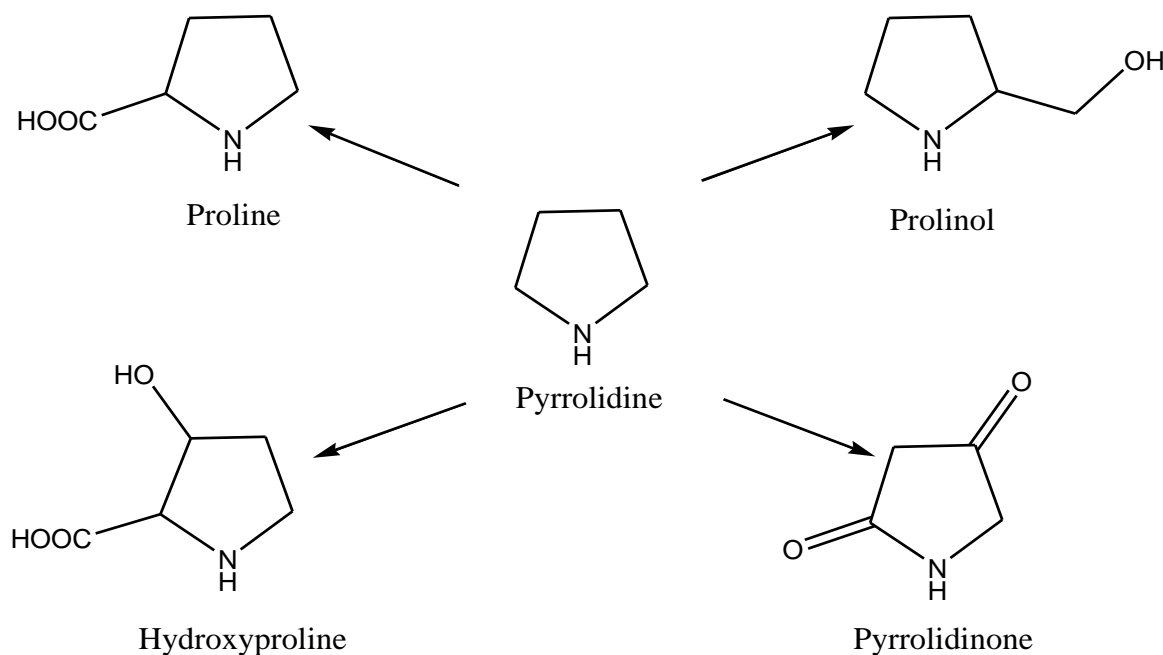
Η πυρρολιδίνη είναι ένα βασικό δομικό συστατικό ενός πλήθους συνθετικών και μη ενώσεων. Πρόκειται για μία δευτεροταγή κυκλική αμίνη, που συνίστανται από ετεροκυκλικό δακτύλιο με τέσσερα άτομα άνθρακα και ένα άτομο αζώτου (Εικ.1 ). Η ύπαρξη του ατόμου αζώτου προσδίδει στον πυρρολιδινικό δακτύλιο βασικό χαρακτήρα.



Εικόνα 1 Πυρρολιδινικός δακτύλιος

Ο πυρρολιδινικός δακτύλιος αποτελεί δομικό στοιχείο των αμινοξέων προλίνη και υδροξυπρολίνη, στα οποία ο πενταμελής δακτύλιος έχει υποκατασταθεί με τις λειτουργικές ομάδες του υδροξυλίου και του καρβοξυλίου. Επίσης, υπάρχουν ενώσεις πυρρολιδίνης, άλλες με υποκατεστημένη πλευρική αλειφατική αλυσίδα και

άλλες με καρβονύλιο επί του δακτυλίου (Εικ. 2). Στο παρακάτω σχήμα απεικονίζονται η υδροξυπρολίνη, η πυρρολιδινόνη, η προλινόλη και η προλίνη.

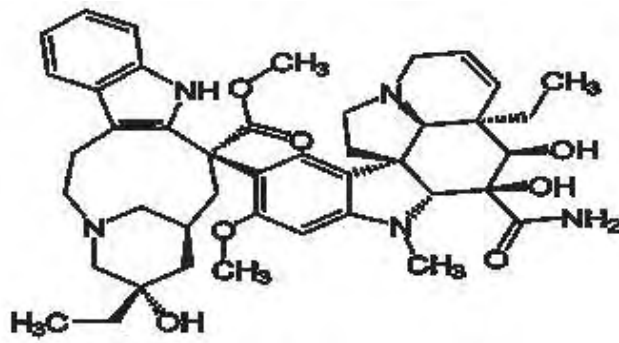


Εικόνα 2 Παραδείγματα ενώσεων με πυρρολιδινικό δακτύλιο

Ο βασικός δακτύλιος της πυρρολιδίνης εμπεριέχεται σε πληθώρα ενώσεων, οι οποίες απαντώνται στη φύση και εμφανίζουν σημαντική βιολογική δράση. Παραδείγματα τέτοιων ενώσεων αποτελούν η βιντεσίνη (vindesine), η πιρακετάμη (piracetam), η κλοσεναμίδη (clausenamida) και η ατορβαστατίνη (atorvastatin), για τις οποίες έχει αποδειχθεί ότι εμφανίζουν αντιμυτωτικές, αντιβακτηριακές και άλλες ιδιότητες. Επιπλέον, οι ενώσεις αυτές αποτελούν ενδιάμεσα για τη σύνθεση πιο περίπλοκων και σημαντικών φαρμακευτικά ενώσεων όπως της διτοξίνης (detoxine), της λακτακυστίνης (lactacystin) και πολλών άλλων. Στη συνέχεια, παραθέτονται παραδείγματα αυτών των ενώσεων και η εφαρμογή τους στη θεραπευτική αντιμετώπιση ασθενειών (Yaakob, 2009).

### 1.5.1 Vindesine

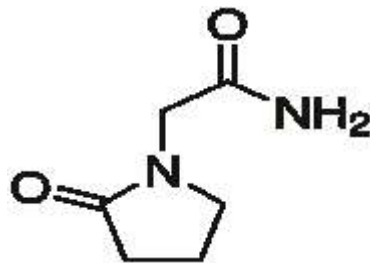
Λειτουργεί ως αναστολέας της μίτωσης και χρησιμοποιείται στην χημειοθεραπεία για την αντιμετώπιση πολλών μορφών καρκίνου όπως είναι η λευχαιμία, το λέμφωμα, το μελάνωμα, ο καρκίνος του μαστού και του πνεύμονα.



Εικόνα 3 Μοριακή δομή του Vindesine

### 1.5.2 Piracetam

Εμφανίζει ιδιότητες ενίσχυσης της νόησης και χρησιμοποιείται για τη θεραπεία νευροεκφυλιστικών νοσημάτων όπως το Alzheimer.



Εικόνα 4 Μοριακή δομή του Piracetam

### 1.5.3 Clausenamide

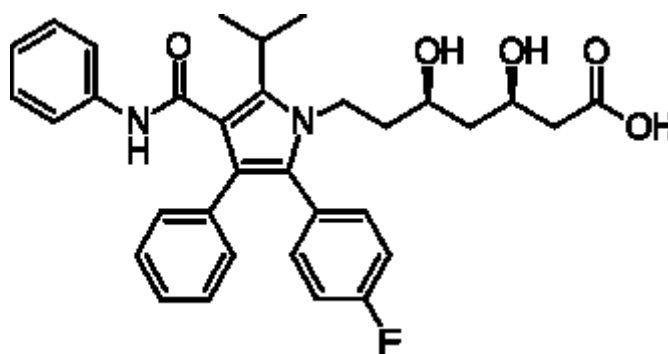
Παράγοντας προστασίας του ήπατος που χρησιμοποιείται συνήθως στην θεραπεία κατά της οξείας και χρόνιας ιογενούς ηπατίτιδας.



Εικόνα 5 Μοριακή δομή του Clausenamide

### 1.5.4 Atorvastatin

Χρησιμοποιείται για τη μείωση των επιπέδων χοληστερόλης και είναι ανταγωνιστικός αναστολέας της HMG-CoA αναγωγάσης εμποδίζοντας τη de novo σύνθεση χοληστερόλης στον οργανισμό.



Εικόνα 6 Μοριακή δομή του Atorvastatin

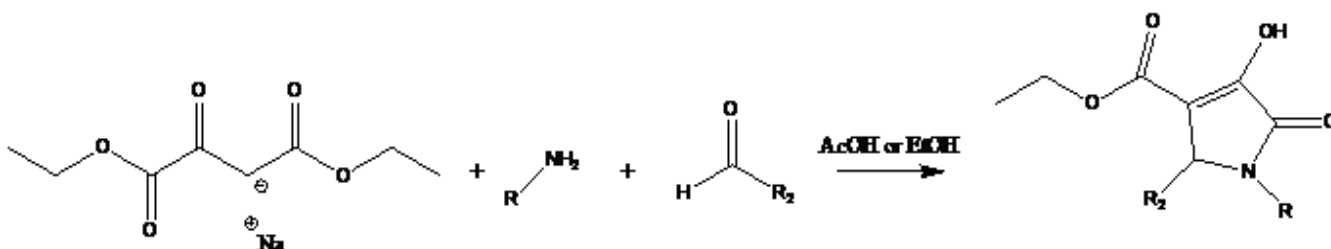
Εκτός από τα παραπάνω φυσικά παράγωγα, υπάρχουν και άλλα ανάλογα που φέρουν στη δομή τους τον πυρρολιδινικό δακτύλιο, διαδραματίζοντας καθοριστικό ρόλο στη δημιουργία νέων θεραπευτικών ενώσεων. Επιπλέον, εμφανίζουν αξιόλογη αντιϊική και αντικαρκινική δράση. Συγκεκριμένα, οι 2-οξοπυρρόλες (Εικ. 7 ένωση I) χρησιμοποιούνται ευρέως και αποτελούν το βασικό συστατικό σε πολλά φάρμακα, συμπεριλαμβανομένων και προϊόντων που έχουν ενεργή δράση ενάντια σε ιικές μολυσματικές ασθένειες (HIV, γρίπη), αντικαρκινικούς παράγοντες και προϊόντα που δρουν ενάντια σε ασθένειες μικροβιολογικής φύσεως (είτε βακτηριακής, είτε μυκητιακής). Επιπλέον, οι ενώσεις αυτές είναι απαραίτητες για τη σύνθεση αλκαλοειδών, καθώς και προϊόντων όπως οι 2,2'-διπυρρόλες, οι τετραπυρρόλες και κάποιες χρωστικές. Με εξαίρεση τις 5-αλκυλο-2-οξοπυρρόλες, που πρωτοαναφέρθηκαν το 1890 από τον Emery, έχει γίνει ελάχιστη αναφορά στα 5-αρυλο-2-πυρρολο παράγωγα (Εικ. 7 ένωση II). Ωστόσο, οι 5-αρυλο-2-οξοπυρρόλες χρησιμοποιήθηκαν ως πρώτη ύλη για τη σύνθεση δικετοπυρρολοπυρρολών ως πιθανοί μη νουκλεοζιτικοί αναστολείς της αντίστροφης μεταγραφάσης (NNRTIs), με φθορίζουσα ικανότητα (Dehaenet al., 2006).





Έτσι, η μέθοδος σύνθεσής τους διαφοροποιείται ανάλογα με τη δομή της ένωσης. Για παράδειγμα, οι 2-πυρρολινόνες συνθέτονται με διαφορετικό τρόπο από ότι οι 3-πυρρολινόνες.

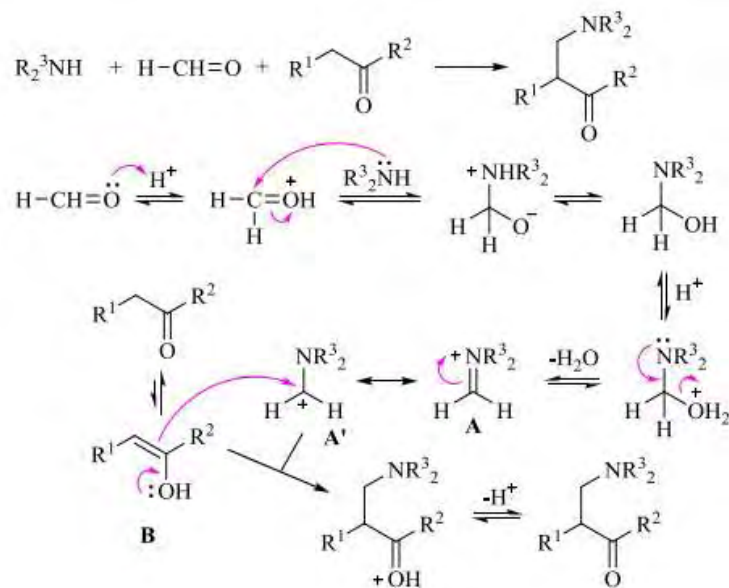
Η κύρια μέθοδος σύνθεσής τους αποτελεί μία αντίδραση τριών συστατικών, ξεκινώντας από διαιθυλικό οξαλοξικό άλας του νατρίου, αμμωνία ή πρωτοταγή αμίνη και αλδεΐδη. Στην αντίδραση αυτή μπορεί να χρησιμοποιηθεί οξύ ως καταλύτης ή να θερμανθούν τα συστατικά χρησιμοποιώντας αιθανόλη ως διαλύτη. Αρχικά η αμίνη και η αλδεΐδη σχηματίζουν μία ιμίνη. Κατόπιν, με αντίδραση Mannich, η ιμίνη και το διαιθυλικό οξαλοξικό άλας του νατρίου σχηματίζουν δακτύλιο. Μετά από ισομερισμό, σχηματίστηκε πυρρολινόνη με υποκαταστάτες στην 1-και/ή 2-θέση.



Εικόνα 9 Αντίδραση τριών συστατικών με κυκλοποίηση Mannich.

### 1.5.6 Η αντίδραση Mannich

Η αντίδραση Mannich (Mannichreaction) είναι μια αντίδραση τριών συστατικών: μια πρωτοταγής ή δευτεροταγής αμίνη, μια μη ενολοποιήσιμη αλδεΐδη (συνήθως φορμαλδεΐδη) και μια ενολοποιήσιμη καρβονυλική ένωση αντιδρούν για να δώσουν μια β-αμινοκαρβονυλική ένωση. Η αντίδραση καταλύεται από οξύ (στην πράξη η αμίνη είναι με την πρωτονιωμένη της μορφή). Στο πρώτο στάδιο σχηματίζεται από τη μη ενολοποιήσιμη αλδεΐδη και την αμίνη το ιμινιακόκατιόν Α, το οποίο στη συνέχεια προσβάλλεται από την ενολική μορφή της ενολοποιήσιμης καρβονυλικής ένωσης(Β).



Εικόνα 10 Μηχανισμός της αντίδρασης Mannich

## 1.6 Αντιδράσεις πολλών συστατικών (MCRs)

Οι αντιδράσεις πολλών συστατικών (Multicomponentreactions - MCRs) μπορούν να οριστούν ως συγκλίνουσες χημικές διαδικασίες όπου τρία ή περισσότερα αντιδραστήρια συνδυάζονται με τέτοιο τρόπο έτσι ώστε το τελικό προϊόν διατηρεί σημαντικά τμήματα όλων των αρχικών συστατικών. Ως εκ τούτου, οδηγούν στη σύνδεση τριών ή περισσότερων αρχικών υλικών σε ένα ενιαίο σύνθετο μόριο με υψηλή ατομική οικονομία και αποτελεσματικότητα σχηματισμού δεσμών, αυξάνοντας έτσι τη μοριακή ποικιλία και πολυπλοκότητα με έναν γρήγορο και συχνά πειραματικά απλό τρόπο. Για το λόγο αυτό, οι MCRs έχουν αναδειχθεί ως μια ισχυρή στρατηγική στην οργανική, συνδυαστική, και φαρμακευτική χημεία. Διάφορες MCRs έχουν αναπτυχθεί, όχι μόνο για την αποτελεσματικότητά τους, αλλά και για την οικονομία και την οικολογία στην οργανική σύνθεση. Αυτά τα χαρακτηριστικά καθιστούν MCRs κατάλληλες για την εύκολη κατασκευή ποικίλων ετεροκυκλικών κριωμάτων. Στην πραγματικότητα, οι MCRs έχουν καταδειχθεί ως μια ευθύς προσέγγιση των πυρρολών, οι οποίες έχουν μελετηθεί εκτενώς. Πιο πρόσφατα, ο Parrainetal. ανέπτυξε την σύνθεση τρισυποκατεστημένων πυρρολών, που καταλύεται από το παλλάδιο και τον χαλκό μέσω της MCR 3,4-διοξοαλκ-2-ενοϊκών παραγώγων, πρωτοταγών αμινών, και τερματικών αλκινίων. Οι Zhuetal.

ανέφεραν μια MCR/ μετα-ενεργοποιητική στρατηγική για τη σύνθεση 2-αμινο-5-κυανοπυρρολών. Τα ενεργοποιημένα πυρρόλια συντέθηκαν επίσης από ενώσεις 1,3-δικαρβονυλίου, αμίνες, αλδεΐδες, και νιτροαλκάνια μέσω ενός σιδήρου-καταλυόμενης MCR.

### 1.6.1 Χρήση μικροκυμάτων

Η θέρμανση με μικροκύματα χρησιμοποιήθηκε για πρώτη φορά στην οργανική σύνθεση το 1986, από τις ομάδες των Gedye και Giguere-Majetich (Gedyeetal, 1986, Giguereetal, 1986). Σήμερα χρησιμοποιείται ευρύτατα και με μεγάλη επιτυχία γιατί δίνει υψηλές αποδόσεις υπό ηπιότερες και φιλικότερες προς το περιβάλλον συνθήκες, συχνά χωρίς την χρήση διαλυτών, άλλοτε με ανακύκλωση τους, αλλά και με μικρότερη κατανάλωση ενέργειας. Η δυνατότητα εκτέλεσης αντιδράσεων με απ' ευθείας αλληλεπίδραση μικροκυματικής ενέργειας επί του μίγματος της αντίδρασης, σε πολύ μικρούς χρόνους, σε αντιδιαστολή προς την έμμεση μεταφορά ενέργειας με την χρήση ελαιόλουτρου ή παρόμοιας συσκευής, επιτρέπει να θεωρηθεί, η πρώτη, ως «πράσινη» διεργασία, όχι μόνον λόγω της μειωμένης κατανάλωσης ενέργειας αλλά και λόγω της οικονομίας χρόνου, δηλαδή της αυξημένης αποτελεσματικότητας της.

Μια από τις πιο σημαντικές και περισσότερο μελετημένες ομάδες των αντιδράσεων που υποβοηθούνται με μικροκύματα, είναι η σύνθεση των πυρρολών.

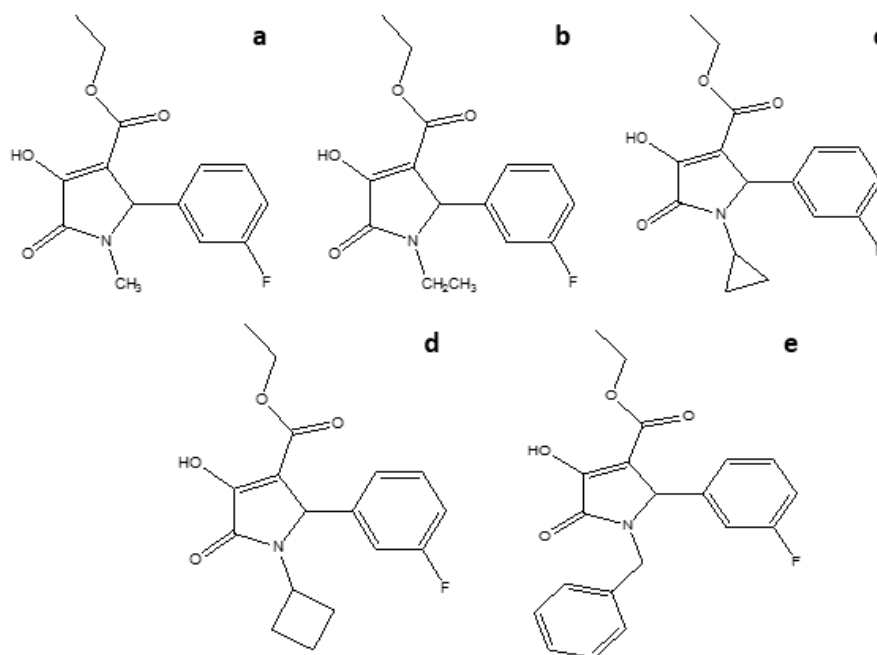
Γενικά θα μπορούσαμε να πούμε ότι η οργανική σύνθεση με χρήση μικροκυμάτων αποτελεί "πράσινη" τεχνική και υπερέχει σε σχέση με τη συμβατική θέρμανση στα εξής βασικά σημεία:

- Προσφέρει ομοιόμορφη θέρμανση σε όλο το μίγμα της αντίδρασης
- Αυξάνει σημαντικά την ταχύτητα της αντίδρασης
- Ελαττώνει τις παράπλευρες αντιδράσεις
- Παρέχει αυξημένες αποδόσεις

## 2 ΣΚΟΠΟΣ

Σκοπός της παρούσας διπλωματικής εργασίας είναι η χρήση του διαιθυλικού οξαλοξικού άλατος, της 3-φθορο βενζαλδεΐδης και 5 διαφορετικών παραγώγων αμινών για τη σύνθεση των παρακάτω:

- 3-υδροξυ-1-μεθυλο-2-οξο-5-(3-φθοροφαινυλο)-2,5-διυδρο-1H-πυρρολο-3-καρβοξυλικού αιθυλεστέρα(Εικόνα11.a)
- 3-υδροξυ-1-αιθυλο-2-οξο-5-(3-φθοροφαινυλο)-2,5-διυδρο-1H-πυρρολο-3-καρβοξυλικού αιθυλεστέρα (Εικόνα11.b)
- 3-υδροξυ-1-κυκλοπροπυλο -2-οξο-5-(3-φθοροφαινυλο)-2,5-διυδρο-1H-πυρρολο-3-καρβοξυλικού αιθυλεστέρα(Εικόνα11.c)
- 3-υδροξυ-1-κυκλοβουτυλο -2-οξο-5-(3-φθοροφαινυλο)-2,5-διυδρο-1H-πυρρολο-3-καρβοξυλικού αιθυλεστέρα (Εικόνα11.d)
- 3-υδροξυ-1-βενζυλο -2-οξο-5-(3-φθοροφαινυλο)-2,5-διυδρο-1H-πυρρολο-3-καρβοξυλικού αιθυλεστέρα (Εικόνα11.e)



Εικόνα 11 Δομές των ενώσεων που παρήχθησαν

Επιπλέον η ταυτοποίηση των προϊόντων πραγματοποιήθηκε με φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (NMR) και τέλος, έγινε αποτίμηση της βιολογικής τους δράσης.

## 3 ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ

### 3.1 Microwave CEM

Αρχικά να τονίσουμε ότι οι αντιδράσεις πραγματοποιήθηκαν με μια παραλλαγή της συμβατικής μεθόδου δημιουργίας φαινυλοπυρρολών. Κατά τη συμβατική μέθοδο έχουμε χρήση εσμυρισμένης σφαιρικής φιάλης, όπου τοποθετούνται όλα τα αντιδρώντα και εφαρμόζεται κάθετος ψυκτήρας για τη ψύξη του δείγματος. Τέλος, το διάλυμα θερμαίνεται με επαναρροή για κάποιες ώρες στην αντίστοιχη θερμοκρασία που απαιτείται για κάθε πειραματική διαδικασία. Στη παρούσα πτυχιακή εργασία, τα αντιδρώντα αρχικά τοποθετήθηκαν σε ειδικό σωληνάριο και στη συνέχεια στο μηχάνημα Microwave CEM όπου πραγματοποιήθηκε η αντίδραση. Η συγκεκριμένη μέθοδος χρησιμοποιήθηκε διότι είναι ταχύτερη και επιτυγχάνει την δημιουργία των προϊόντων σε συντομότερο χρονικό διάστημα.



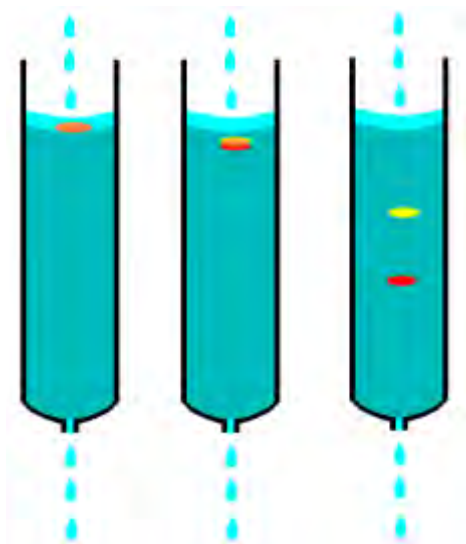
*Εικόνα 12CEMMicrowave Αντιδραστήρας με αυτόματο συλλέκτη δειγμάτων*

### 3.2 Χρωματογραφία στήλης

Όταν μια χημική ένωση απομονώνεται, η ένωση στόχος θα πρέπει να καθαριστεί από διαλύτες και παραπροϊόντα. Η τεχνική που χρησιμοποιείται για να επιτευχθεί αυτό είναι η χρωματογραφία στήλης κανονικής φάσης και επιτυγχάνεται με την εισαγωγή αέρα υπό πίεση (flash chromatography) σε silicagel (240-400, Merckgrade).

Η χρωματογραφία στήλης κανονικής φάσης είναι μια τεχνική διαχωρισμού που βασίζεται στην προσρόφηση των συστατικών ενός δείγματος πάνω σε μια σταθερή φάση, συνήθως silicagel και την έκλουση τους με μια κίνητη φάση, που είναι ένας διαλύτης ή μείγμα διαλυτών. Οι πολικές ουσίες προσρροφούνται και κολλούν στην αφετηρία (κορυφή) της στήλης και χρειάζονται πιο πολικό διαλύτη για να

προχωρήσουν. Οι μη πολικές ουσίες συνήθως προχωρούν ή κατεβαίνουν πιο εύκολα ακόμη και με διαλύτες χαμηλής πολικότητας. Για την έκλυση των ουσιών από το silica gel χρειάζεται να γίνει έκλυση της στήλης με διάφορους διαλύτες αρχίζοντας από τους λιγότερο πολικούς και καταλήγοντας στους περισσότερο πολικούς.



Εικόνα 13 Χρωματογραφία στήλης όπου διαχωρίζονται τα συστατικά ενός δείγματος με βάση τη πολικότητα

### 3.3 Χρωματογραφία λεπτής στιβάδας (TLC: Thin Layer Chromatography)

Ο έλεγχος των αντιδράσεων έγινε με τη χρήση επίπεδης χρωματογραφίας λεπτής στιβάδας (TLC). Κατά τη τεχνική αυτήν χρησιμοποιούνται πλάκες αλουμινίου επιστρωμένες με Silica gel (Merck Kieselgel 60F24) πάχους 0.2 mm.

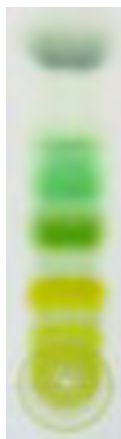
Το διάλυμα του υπό εξέταση δείγματος τοποθετείται υπό τη μορφή κηλίδας στην αρχή της πλάκας σε απόσταση περίπου 2 cm. Στη συνέχεια η πλάκα τοποθετείται όρθια εντός αεροστεγούς κορεσμένου με ατμούς διαλύτη θαλάμου. Ως διαλύτης χρησιμοποιείται σύστημα δύο διαλυτών μεταβλητής αναλογίας. Το ύψος της στάθμης του διαλύτη δεν πρέπει να καλύπτει τις κηλίδες της υπό εξέταση ουσίας, διότι υπάρχει κίνδυνος διάλυσης αυτών. Ακολούθως ο διαλύτης αφήνεται να ανέλθει με τη βοήθεια τριχοειδών φαινομένων μέχρι το μέτωπο του διαλύτη να φθάσει λίγα εκατοστά πριν το τέλος της πλάκας. Ύστερα, η πλάκα αποσύρεται και στεγνώνεται με ρεύμα αέρα. Οι διάφορες ουσίες που περιέχονται στο υπό εξέταση δείγμα μετακινούνται επί της πλάκας με διαφορετική ταχύτητα ανάλογα με την

πολικότητα τους και εμφανίζονται με τη μορφή διακριτών κηλίδων. Με βάση τη διανυθείσα απόσταση κάθε μορίου στη στατική φάση πραγματοποιείται και ο προσδιορισμός του συντελεστή κατακράτησης  $R_f$ , που ορίζεται από το λόγο: απόσταση που διανύθηκε από την ένωση ( $\beta$ ) προς την απόσταση που διανύθηκε από το διαλύτη ( $\alpha$ ). Η τιμή  $R_f$  ενός συγκεκριμένου μορίου χρησιμεύει για την ταυτοποίηση μιας άγνωστης ουσίας.

$$R_f = \frac{\beta}{\alpha}$$

Η παρατήρηση των κηλίδων γίνεται με εξέταση στο υπεριώδες φως (254 ή 356 nm) ή μετά από ψεκασμό με διάλυμα  $H_2SO_4$  (θειικού οξέος) 30%.

Μια χρωματογραφία λεπτής στιβάδας απεικονίζεται στην εικόνα που δίνεται παρακάτω.



Εικόνα 14 Παράδειγμα χρωματογραφίας λεπτής στιβάδας

### 3.4 Ταυτοποίηση ενώσεων

Η φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (NMR) αποτελεί την πρώτη και χρησιμότερη φασματοσκοπική τεχνική προσδιορισμού της δομής των μορίων καθώς παρέχει ένα χάρτη του ανθρακικού σκελετού μαζί με τα υδρογόνα σε ένα οργανικό μόριο.

Ο πυρηνικός μαγνητικός συντονισμός NMR, είναι ένα φαινόμενο που συμβαίνει όταν πυρήνες ορισμένων ατόμων τοποθετούνται εντός ενός ομογενούς, στατικού



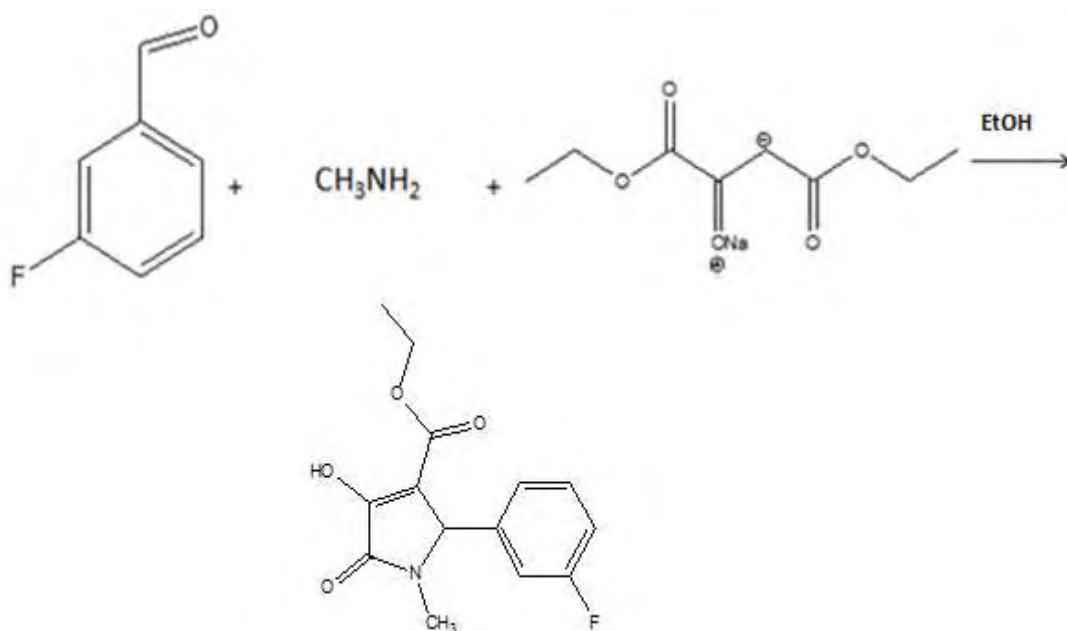
μαγνητικού πεδίου και διεγείρονται από ένα δεύτερο ταλαντευόμενο μαγνητικό πεδίο. Οι περισσότεροι πυρήνες εμφανίζουν το φαινόμενο NMR, άλλοι λιγότερο και άλλοι καθόλου. Αυτό εξαρτάται από το εάν οι πυρήνες έχουν μαγνητικές ιδιότητες, όπως αυτές αντανακλώνται στην ιδιότητα του σπίν. Στη φασματοσκοπία NMR μελετάται η αλληλεπίδραση της ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας με την ύλη, για την μελέτη των χημικών, φυσικών και βιολογικών ιδιοτήτων της.

Η ταυτοποίηση των ενώσεων που συντέθηκαν έγινε με τη χρήση του φάσματος πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού NMR (Nuclear Magnetic Resonance). Τα φάσματα  $^1\text{H}$ -NMR καταγράφηκαν στα 300MHz στο Bruker AVAMCE III 300 MHz χρησιμοποιώντας δευτεριωμένο χλωροφόρμιο ( $\text{CDCl}_3$ ), και διμεθυλοσουλφοξείδιο ( $\text{DMSO-d}_6$ ). Το τετραμεθυλοσιλάνιο (TMS) χρησιμοποιήθηκε ως σημείο αναφοράς και η πολλαπλότητα των καμπύλων φαίνεται με s (single), d (double), t (triple), q (quadruple), m (multiple). Οι συχνότητες J μετρήθηκαν σε Hz.

## 4 ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

### 4.1 Σύνθεση του 3-υδροξυ-1-μεθυλο-2-οξο-5-(3-φθοροφαινυλο)-2,5-διυδρο-1H-πυρρολο-3-καρβοξυλικού αιθυλεστέρα μέσω αντίδρασης τριών αντιδρώντων.

Αντίδραση:



*Αντίδραση 1 Σύνθεση του 3-υδροξυ-1-μεθυλο-2-οξο-5-(3-φθοροφαινυλο)-2,5-διυδρο-1H-πυρρολο-3-καρβοξυλικού αιθυλεστέρα*

Πρωτόκολλο:

7.11 mmol 3-φθορο-βενζαλδεΐδης απαιτούν : 7.11 mmol μεθυλαμίνης, 7.11 mmol διαιθυλικού οξαλοξικού άλατος του νατρίου και 25 ml αιθανόλη.

Πειραματική διαδικασία:

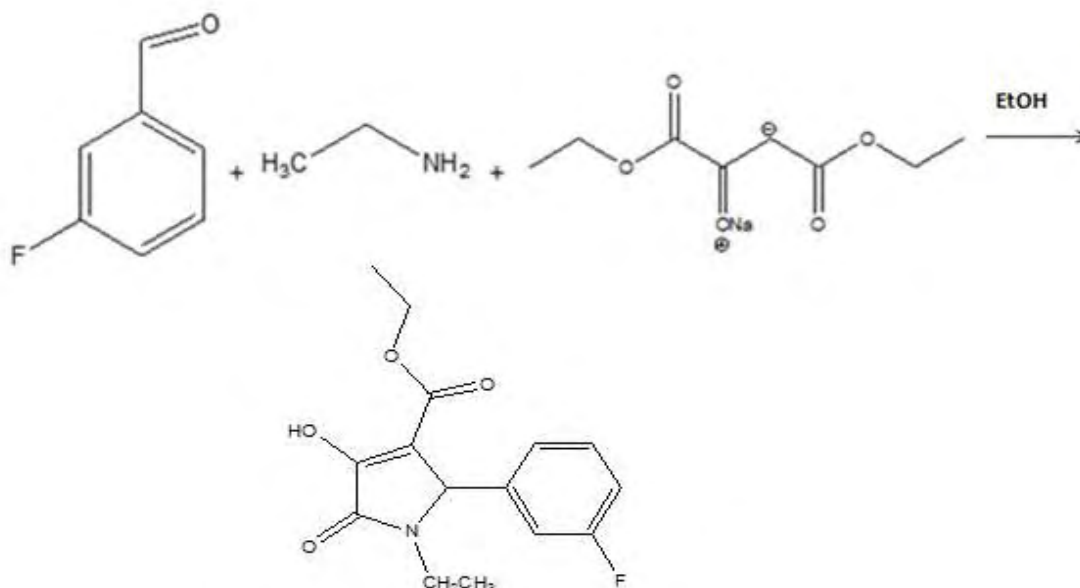
Σε σωληνάκι microwave CEM προστέθηκαν 3-φθορο-βενζαλδεΐδη(85,37μl), μεθυλαμίνη (26,2μl), διαιθυλικό οξαλοξικό άλας του νατρίου (169,18 mg) και αιθανόλη (2,83 ml). Τοποθετήθηκε στο microwave CEM και το διάλυμα θερμάνθηκε στους 110°C για 15' σε 100Watt. Η πορεία της αντίδρασης ελέγχεται με TLC. Έπειτα προστέθηκαν ακόμη 169,18 mg, 1.42 mmol διαιθυλικό οξαλοξικό άλας του νατρίου (30,81μl)και 1.42 mmol μεθυλαμίνης. Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε χρωματογραφία στήλης για να απομακρυνθούν τυχόν υπολείμματα ή

παραπροϊόντα. Έπειτα τοποθετήθηκε το διάλυμα σε εσφυρισμένη σφαιρική φιάλη και συμπυκνώθηκε. Μετά προστέθηκε λίγο παγωμένο απιονισμένο H<sub>2</sub>O και μερικές σταγόνες πυκνού διαλύματος HCl (37%) ώστε το pH του διαλύματος της αντίδρασης να είναι περίπου 4-5. Ξύνοντας τα τοιχώματα με μια μεταλλική σπάτουλα σε θερμοκρασία δωματίου δημιουργήθηκε ίζημα και στην συνέχεια τοποθετήθηκε η φιάλη στο ψυγείο. Τέλος το επιθυμητό προϊόν διηθήκε υπό κενό και παραλήφθηκε υπό τη μορφή λευκού στερεού.

TLC (9.8CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> /0.2 MeOH)	R <sub>f</sub> =0,25
Απόδοση	α =78%

## 4.2 Σύνθεση του 3-υδροξυ-1-αιθυλο-2-οξο-5-(3-φθοροφαινυλο)-2,5-διυδρο-1H-πυρρολο-3-καρβοξυλικού αιθυλεστέρα μέσω αντίδρασης τριών αντιδρώντων

Αντίδραση:



*Αντίδραση 2Σύνθεση του 3-υδροξυ-1-αιθυλο-2-οξο-5-(3-φθοροφαινυλο)-2,5-διυδρο-1H-πυρρολο-3-καρβοξυλικού αιθυλεστέρα*

Πρωτόκολλο:

7.11 mmol 3-φθορο-βενζαλδεΰδης απαιτούν : 7.11 mmol αιθυλαμίνης, 7.11 mmol διαιθυλικού οξαλοξικού άλατος του νατρίου και 25 ml οξικό οξύ.

Πειραματική διαδικασία:

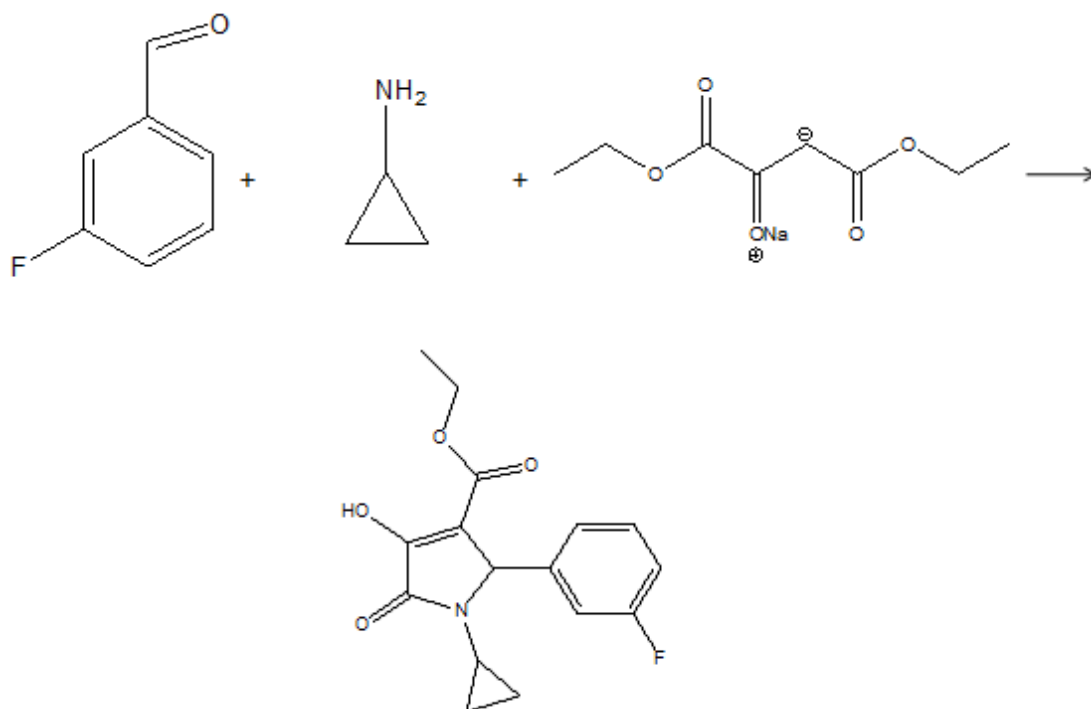
Σε σωληνάκι microwave CEM προστέθηκαν 3-φθορο-βενζαλδεΰδη(85,37μl) αιθυλαμίνη (25 μl) διαιθυλικό οξαλοξικό άλας του νατρίου (169,18 mg) και αιθανόλη (2,83ml). Τοποθετήθηκε στο microwave CEM και το διάλυμα θερμάνθηκε στους 110°C για 15' σε 100Watt. Η πορεία της αντίδρασης ελέγχεται με TLC. Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε χρωματογραφία στήλης για να απομακρυνθούν τυχόν υπολείμματα ή παραπροϊόντα. Έπειτα τοποθετήθηκε το διάλυμα σε εσφυρισμένη σφαιρική φιάλη και συμπυκνώθηκε. Μετά προστέθηκε λίγο παγωμένο απιονισμένο

H<sub>2</sub>O και μερικές σταγόνες πυκνού διαλύματος HCl (37%) ώστε το pH του διαλύματος της αντίδρασης να είναι περίπου 4-5. Ξύνοντας τα τοιχώματα με μια μεταλλική σπάτουλα σε θερμοκρασία δωματίου δημιουργήθηκε ίζημα και στην συνέχεια τοποθετήθηκε η φιάλη στο ψυγείο. Τέλος το επιθυμητό προϊόν διηθήκε υπό κενό και παραλήφθηκε υπό τη μορφή λευκού στερεού.

TLC (9.8CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> /0.2 MeOH)	R <sub>f</sub> =0,22
Απόδοση	α =76%

### 4.3 Σύνθεση του 3-υδροξυ-1-κυκλοπροπυλο-2-οξο-5-(3-φθοροφαινυλο)-2,5-διυδρο-1H-πυρρολο-3-καρβοξυλικού αιθυλεστέρα μέσω αντίδρασης τριών αντιδρώντων

Αντίδραση:



*Αντίδραση 3 Σύνθεση του 3-υδροξυ-1-κυκλοπροπυλο -2-οξο-5-(3-φθοροφαινυλο)-2,5-διυδρο-1H-πυρρολο-3-καρβοξυλικού αιθυλεστέρα*

Πρωτόκολλο:

7.11 mmol 3-φθορο-βενζαλδεΐδης απαιτούν : 7.11 mmol κυκλοπροπυλαμίνης, 7.11 mmol διαιθυλικού οξαλοξικού άλατος του νατρίου και 25 ml οξικό οξύ.

Πειραματική διαδικασία:

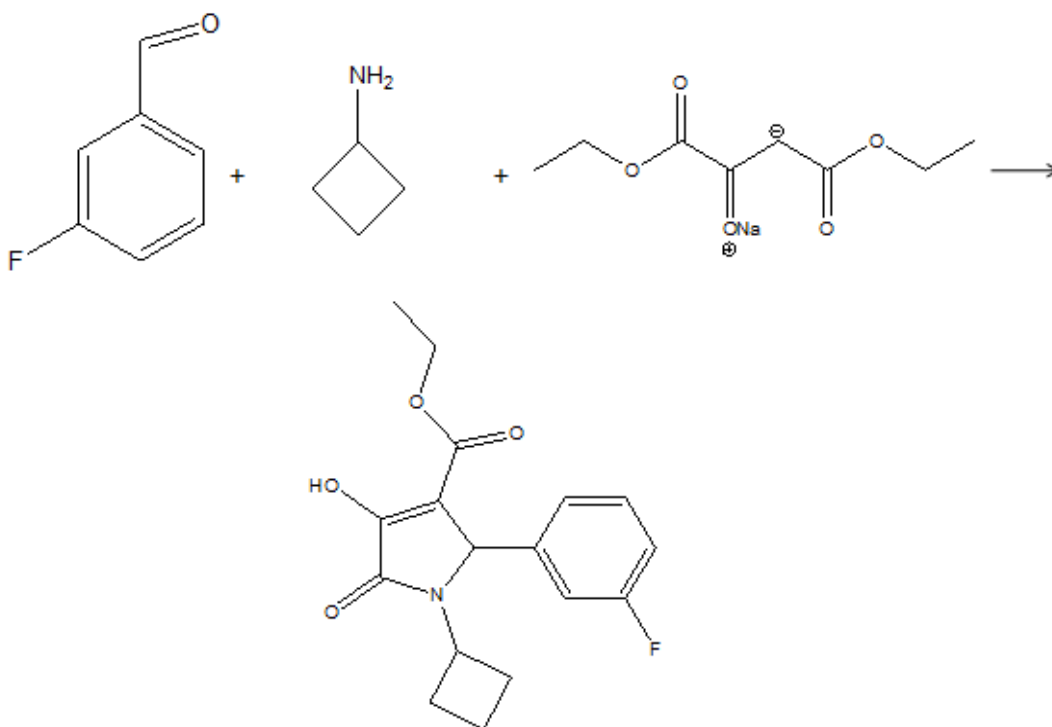
Σε σωληνάκι microwave CEM προστέθηκαν 3-φθορο-βενζαλδεΐδη (42,73 ml), κυκλοπροπυλαμίνη(27,72ml), διαιθυλικό οξαλοξικό άλας του νατρίου (84,06mg) και οξικό οξύ (1,14ml) . Τοποθετήθηκε στο microwave CEM και το διάλυμα θερμάνθηκε στους 40°C για 5' σε 200Watt και μετά για ακόμα 5' στους 40ο σε 200Watt. Η πορεία της αντίδρασης ελέγχθηκε με χρήση της μεθόδου TLC. Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε χρωματογραφία στήλης για να απομακρυνθούν τυχόν

υπολείμματα ή παραπροϊόντα. Έπειτα το διάλυμα τοποθετήθηκε σε εσφυρισμένη σφαιρική φιάλη και συμπυκνώθηκε. Κατόπιν προστέθηκε λίγο παγωμένο απιονισμένο H<sub>2</sub>O και, ξύνοντας τα τοιχώματα με μια μεταλλική σπάτουλα σε θερμοκρασία δωματίου, δημιουργήθηκε ίζημα. Στην συνέχεια η φιάλη τοποθετήθηκε στο ψυγείο. Μετά πραγματοποιήθηκε κρυστάλλωση με τολουόλιο στον ελάχιστο δυνατό όγκο. Αρχικά αφέθηκε σταδιακά να κατακρημνιστεί σε θερμοκρασία δωματίου και κατόπιν τοποθετήθηκε στην κατάψυξη. Το ίζημα, όπου βρίσκεται το επιθυμητό προϊόν, διηθήθηκε υπό κενό και ξεπλύθηκε αρκετές φορές με παγωμένο H<sub>2</sub>O. Το προϊόν παραλήφθηκε ως λευκό στερεό.

TLC (9.8CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> /0.2 MeOH)	R <sub>f</sub> =0,21
Απόδοση	α =85%

#### 4.4 Σύνθεση του 3-υδροξυ-1-κυκλοβουτυλο-2-οξο-5-(3-φθοροφαινυλο)-2,5-διυδρο-1H-πυρρολο-3-καρβοξυλικού αιθυλεστέρα μέσω αντίδρασης τριών αντιδρώντων

Αντίδραση:



*Αντίδραση 4 Σύνθεση του 3-υδροξυ-1-κυκλοβουτυλο -2-οξο-5-(3-φθοροφαινυλο)-2,5-διυδρο-1H-πυρρολο-3-καρβοξυλικού αιθυλεστέρα*

Πρωτόκολλο:

7.11 mmol 3-φθορο-βενζαλδεΐδης απαιτούν : 7.11 mmol κυκλοβουτυλαμίνης 7.11 mmol διαιθυλικού οξαλοξικού άλατος του νατρίου και 25 ml οξικό οξύ.

Πειραματική διαδικασία:

Σε σωληνάκι microwave CEM προστέθηκαν 3-φθορο-βενζαλδεΐδη (42,44ml), κυκλοβουτυλαμίνη (34,27ml), διαιθυλικό οξαλοξικό άλας του νατρίου (84,5mg) και οξικό οξύ (1,4ml). Τοποθετήθηκε στο microwave CEM και το διάλυμα θερμάνθηκε στους 40°C για 10' σε 200watt. Η πορεία της αντίδρασης ελέγχεται με TLC. Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε χρωματογραφία στήλης για να απομακρυνθούν τυχόν υπολείμματα ή παραπροϊόντα. Έπειτα τοποθετήθηκε το διάλυμα σε εσφυρισμένη

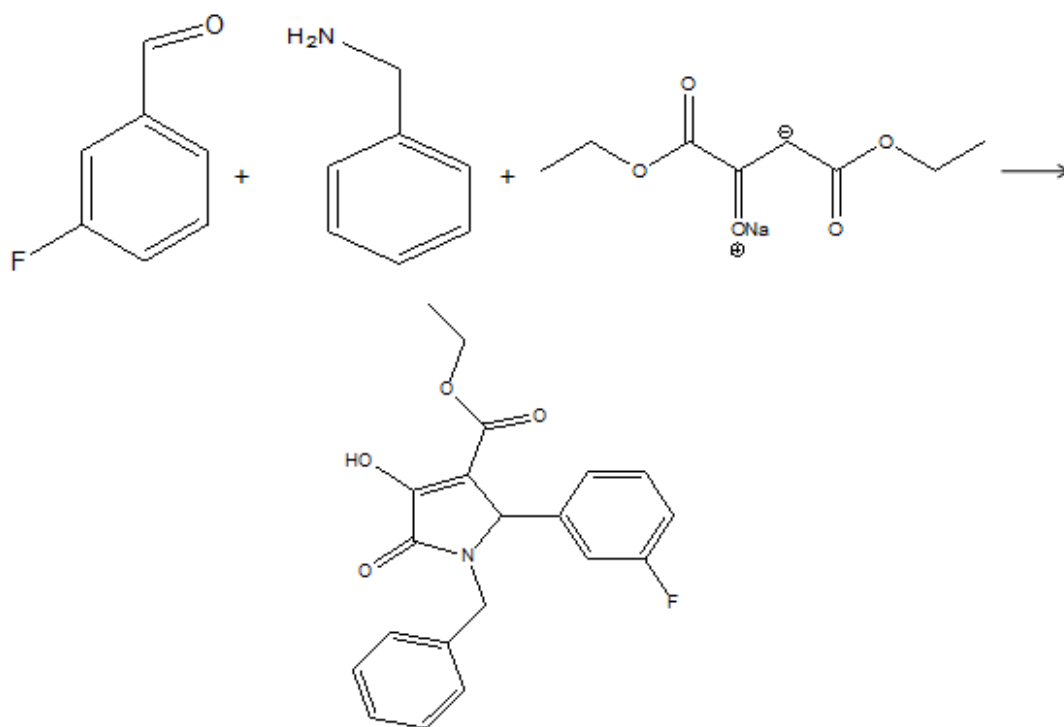


σφαιρική φιάλη και συμπυκνώθηκε. Μετά προστέθηκε λίγο παγωμένο απιονισμένο H<sub>2</sub>O και ξύνοντας τα τοιχώματα με μια μεταλλική σπάτουλα σε θερμοκρασία δωματίου δημιουργηθεί ίζημα και στην συνέχεια τοποθετήθηκε η φιάλη στο ψυγείο.. Τέλος το επιθυμητό προϊόν διηθήκε υπό κενό.

TLC(CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> )	R <sub>f</sub> =0,24
Απόδοση	α = 79%

#### 4.5 Σύνθεση του 3-υδροξυ-1-βενζυλο-2-οξο-5-(3-φθοροφαινυλο)-2,5-διυδρο-1H-πυρρολο-3-καρβοξυλικού αιθυλεστέρα μέσω αντίδρασης τριών αντιδρώντων.

Αντίδραση:



*Αντίδραση 5 Σύνθεση του 3-υδροξυ-1-βενζυλο-2-οξο-5-(3-φθοροφαινυλο)-2,5-διυδρο-1H-πυρρολο-3-καρβοξυλικού αιθυλεστέρα*

Πρωτόκολλο:

7.11 mmol 3-φθορο-βενζαλδεΐδης απαιτούν : 7.11mmol μεθυλαμίνης, 7.11mmol διαιθυλικού οξαλοξικού άλατος του νατρίου και 25 ml οξικό οξύ.

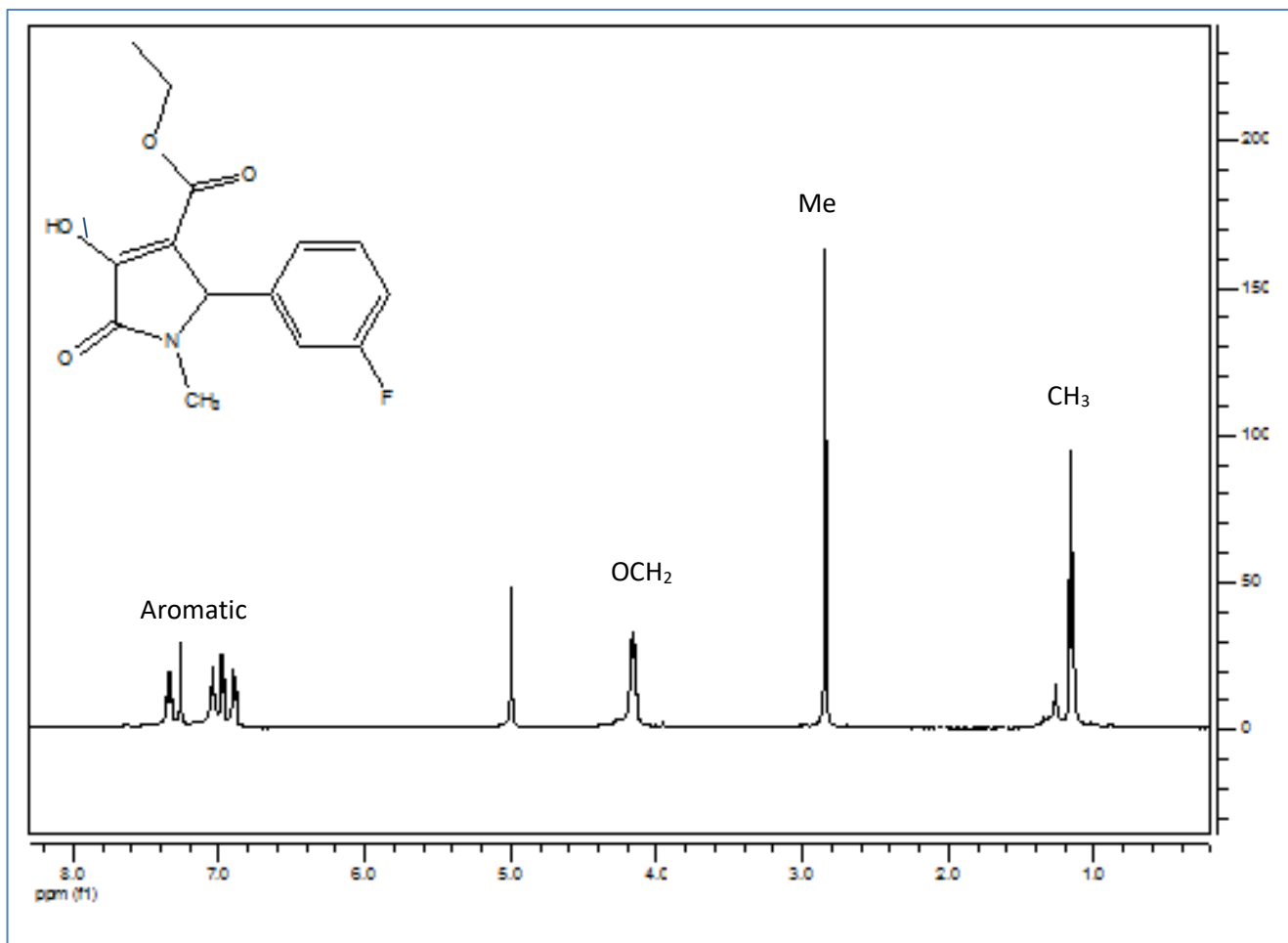
Πειραματική διαδικασία:

Σε σωληνάκι microwave CEM προστέθηκαν 3-φθορο-βενζαλδεΐδη (42,74ml), μεθυλαμίνη(44,8ml), διαιθυλικό οξαλοξικό άλας του νατρίου (86,16mg, και οξικό όξυ (1,44 ml). Τοποθετήθηκε στο microwave CEM και το διάλυμα θερμάνθηκε στους 40°C για 10' σε 200watt. Η πορεία της αντίδρασης ελέγχεται με TLC. Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε χρωματογραφία στήλης για να απομακρυνθούν τυχόν υπολείμματα ή παραπροϊόντα. Έπειτα τοποθετήθηκε το διάλυμα σε εσφυρισμένη σφαιρική φιάλη και συμπυκνώθηκε. Μετά πραγματοποιήθηκε κρυστάλλωση με

τολουόλιο στον ελάχιστο δυνατό όγκο. Αφέθηκε σταδιακά να πέσει σε θερμοκρασία δωματίου και μετά το τοποθετήθηκε στην κατάψυξη. Το επιθυμητό προϊόν έπεσε ως ίζημα το οποίο διηθήθηκε υπό κενό και ξεπλύθηκε αρκετές φορές με παγωμένο H<sub>2</sub>O. Το προϊόν παραλαμβάνεται ως λευκό στερεό.

TLC (9.8CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> /0.2CH <sub>3</sub> OH)	Rf = 0.78
Απόδοση	α = 75%

#### 4.6 ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΜΕ $^1\text{H}$ NMR

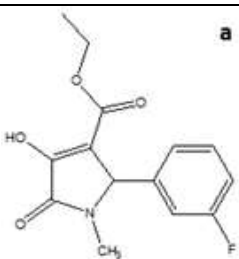
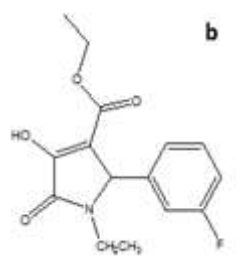
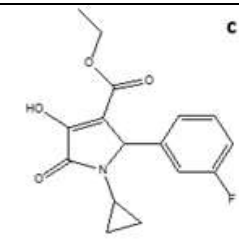


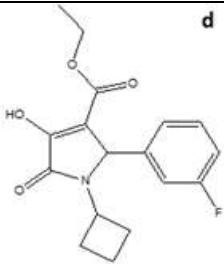
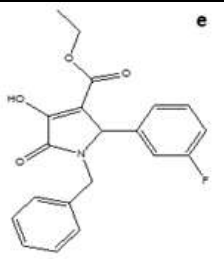
Εικόνα 15 NMR του 3-υδροξυ-1-μεθυλο-2-οξο-5-(3-φθοροφαινυλο)-2,5-διωδρο-1H-πυρρολο-3-καρβοξυλικού αιθυλεστέρα

## 5 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ-ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Όλα τα μόρια αξιολογήθηκαν για την κυτταροτοξική και κυτταροστατική τους δράση έναντι κυττάρων λευχαιμίας ποντικού (L1210), ανθρώπινου λεμφώματος (CEM) καθώς και των ανθρώπινων καρκινικών κυττάρων του τραχήλου της μήτρας (HeLa). Για την εκτίμηση της κυτταροστατικής δράσης χρησιμοποιήθηκε η παράμετρος IC<sub>50</sub>, η οποία αντιπροσωπεύει τη συγκέντρωση του φάρμακου που απαιτείται για την αναστολή της κυτταρικής ανάπτυξης κατά 50%

- Τα βιολογικά αποτελέσματα

Προϊόν	IC <sub>50</sub> * (μM)		
	L1210	CEM	HeLa
 <p><b>a</b></p>	170 ± 47	138 ± 18	198 ± 12
 <p><b>b</b></p>	≥ 250	208 ± 51	> 250
 <p><b>c</b></p>	> 250	≥ 250	225 ± 35

 <p style="text-align: center;"><b>d</b></p>	162 ± 34	88 ± 9	103 ± 1
 <p style="text-align: center;"><b>e</b></p>	≥ 250	126 ± 8	143 ± 35

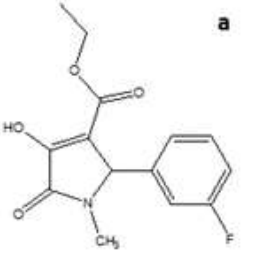
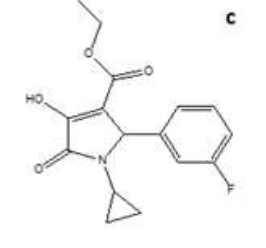
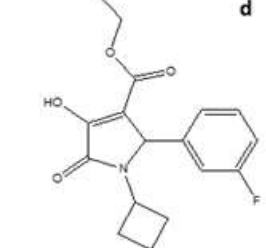
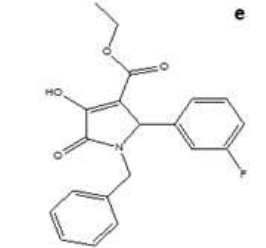
\*50% inhibitory concentration.

ΟΠΟΥ:

- a) 3-υδροξυ-1-μεθυλο-2-οξο-5-(3-φθοροφαινυλο)-2,5-διυδρο-1Η-πυρρολο-3-καρβοξυλικού αιθυλεστέρα
- b) 3-υδροξυ-1-αιθυλο-2-οξο-5-(3-φθοροφαινυλο)-2,5-διυδρο-1Η-πυρρολο-3-καρβοξυλικού αιθυλεστέρα
- c) 3-υδροξυ-1-κυκλοπροπυλο -2-οξο-5-(3-φθοροφαινυλο)-2,5-διυδρο-1Η-πυρρολο-3-καρβοξυλικού αιθυλεστέρα
- d) 3-υδροξυ-1-κυκλοβουτυλο -2-οξο-5-(3-φθοροφαινυλο)-2,5-διυδρο-1Η-πυρρολο-3-καρβοξυλικού αιθυλεστέρα
- e) 3-υδροξυ-1-βενζυλο -2-οξο-5-(3-φθοροφαινυλο)-2,5-διυδρο-1Η-πυρρολο-3-καρβοξυλικού αιθυλεστέρα

Όπως βλέπουμε από τον παραπάνω πίνακα, όλες οι εξετασθείσες ενώσεις παρουσίασαν μέτρια ανασταλτική δράση έναντι της ανάπτυξης των καρκινικών κυττάρων, παρουσιάζοντας τιμές IC<sub>50</sub> μεταξύ 88-225 μΜ.

• Τα αντιϊικά αποτελέσματα στη κυτταρική σειρά HEL

Compound	EC <sub>50</sub> <sup>b</sup>					
	Herpes simplex virus-1 (KOS)	Herpes simplex virus-2 (G)	Herpes simplex virus-1 TK <sup>-</sup> KOS ACV <sup>r</sup>	Vaccinia virus	Adeno virus-2	Human Coronavirus (229E)
 <b>a</b>	>100	>100	>100	>100	>100	>100
 <b>c</b>	>100	>100	>100	>100	>100	>100
 <b>d</b>	>100	<b>100</b>	<b>100</b>	>100	>100	<b>45</b>
 <b>e</b>	>100	>100	>100	>100	>100	<b>45</b>
Brivudin	0.04	112	50	5.8	-	-
Cidofovir	2	2	3.8	29	19	-
Acyclovir	0.2	0.8	5.8	>250	-	-
Ganciclovir	0.032	0.094	58	>100	-	-
Zalcitabine	-	-	-	-	10	-
Alovudine	-	-	-	-	25	-
UDA	-	-	-	-	-	2
Ribavirin	-	-	-	-	-	111

Τα πύρρολο παράγωγα 3-υδροξυ-1-κυκλοβουτυλο-2-οξο-5-(3-φθοροφαινυλο)-2,5-διυδρο-1H-πυρρολο-3-καρβοξυλικού αιθυλεστέρα και 3-υδροξυ-1-βενζυλο-2-οξο-5-(3-φθοροφαινυλο)-2,5-διυδρο-1H-πυρρολο-3-καρβοξυλικού αιθυλεστέρα έδειξαν αξιοσημείωτη αντιϊική δράση με  $EC_{50}=45\mu M$  στη κυτταρική σειρά HEL έναντι του Human Coronavirus (229E)



## 6 ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Barlow-Stewart, K. (2012). *Enviromental and genetic interactions*. 9th Edition.
- Hajdu, S.I. (2011). A Note From History: Landmarks in History of Cancer, Part 1.
- *Cancer* 1097-1102.
- Hanahan, D., and Weinberg, R. A. (2000). The Hallmarks of Cancer. *Cell* 100: 57-70.
- Hejmadi, M. (2010). *Introduction to Cancer Biology*. Ventus Publishing ApS.
- Χονδρού Βασιλική(2013) *IN VITRO* Διερεύνηση της θραυσματογόνου και αποπτωτογόνου δράσης του αντικαρκινικού αντιβιοτικού δοξορουβικίνη στην λευχαιμική κυτταρική σειρά του ανθρώπου HL-60, Μεταπτυχιακό Δίπλωμα
- Yaakob I.U., Degree of Bachelor of Science (Hons.), 2009
- McMurry J. Οργανική Χημεία, τόμος Ι, Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης, σελ.334-336.
- Wade L.G.Jr, Οργανική Χημεία, Εκδόσεις Τζιόλα.
- Dehaen W.; Metten B.; Kostermans M.; Van Baelen G. and Smet M., *Tetrahedron* 62 (2006) 6018–6028.
- Diana P.; Martorana A.; Barraja P.; Montalbano A.; Dattolo G.; Cirrincione G.; Dall’Acqua F.; Salvador A.; Vedaldi D.; Basso G. and Viola G., *J. Med. Chem.* 2008, 51, 2387–2399.
- M. F. Mohammat, Z. Shaameri and A. S. Hamzah, ( 2009), Synthesis of 2,3-Dioxo-5-(substituted) arylpyrroles and Their 2-Oxo-5-aryl-3-hydrazone Pyrrolidine Derivatives, *Molecules*
- Srinivasa R. Cheruku ; Maniyan P. Padmanilayam ; Jonathan L. Vennerstrom
- , (2003), Synthesis of 2H-pyrroles by treatment of pyrrolidines with DDQ, *Tetrahedron Letters*
- Sobolev A.; Cekavicus B.; Kore K.; Jakovele L.; Plotniece A.; Pajuste K.; Petrova M. and Belyakov S., (2011), Formation of novel 1,2,3,4-tetrasubstituted 3-pyrrolines via cyclisation of  $\gamma$ -halo- $\beta$ -ketoesters with aromatic amines and aldehydes, *Tetrahedron Letters*
- Rampa A.; Piazzzi L.; Belluti F.; Bisi A.; Gobbi S.; Rizzo S.; Bartolini M.; Andrisano V. and Recanatini M., *Bioorg. ,* (2007), Cholinesterase inhibitors: SAR and enzyme inhibitory activity of 3-[omega-(benzylmethylamino)alkoxy]xanthen-9-ones, *Journal Article*
- Cowan MM,(1999), Plant products as antimicrobial agents
- Suresh C. Ameta, Pinki B. Punjabi, Rakshit Ameta, Chetna Ameta, *Microwave-Assisted Organic Synthesis*, Apple Academic Press(2015)