

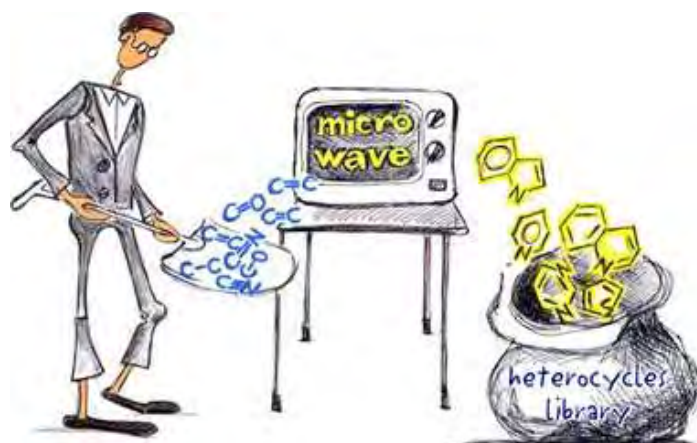


ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ  
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ & ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

Διπλωματική Εργασία

«Σύγκριση συμβατικής και με μικροκύματα σύνθεσης των  
πυρρολοκινοξαλινών»

Γελαδάρη Ευαγγελία



Λάρισα, 2015



**UNIVERSITY OF THESSALY**  
**DEPARTMENT OF BIOCHEMISTRY AND BIOTECHNOLOGY**

**Diploma thesis**

**« Comparison of conventional and microwave synthesis of  
pyrrolo -quinoxalines »**

**Geladari Evagelia**

Larissa, 2015

### **ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ**

**Κοιώτης Δημήτριος** — Καθηγητής Οργανικής Χημείας του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

**Μπαλατσός Νικόλαος** — Επίκουρος Καθηγητής Βιοχημείας του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

**Μαντά Στυλιανή**—Μεταδιδακτορική ερευνήτρια Βιοοργανικής Χημείας

## ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα ερευνητική εργασία πραγματοποιήθηκε στο εργαστήριο Βιο-Οργανικής Χημείας του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω τον επιβλέποντα καθηγητή μου κ. Δημήτριο Κομιώτη για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε αναθέτοντάς μου το ιδιαίτερα ενδιαφέρον αυτό θέμα καθώς και για τις πολύτιμες και εποικοδομητικές υποδείξεις του, όπως επίσης και την διδάσκουσα και επιβλέπουσα της διπλωματικής εργασίας, κα. Στυλιανή Μαντά για την αμέριστη συμπαράσταση, καθοδήγηση και βοήθεια που μου προσέφερε καθ' όλη την περίοδο που βρισκόμουν υπό την επίβλεψή της.

Επιπλέον, θα ήθελα να ευχαριστήσω τους υποψήφιους διδάκτορες του εργαστηρίου Βιο-Οργανικής Χημείας, και ιδιαίτερα την κα. Δημοπούλου Αθηνά, για την υποστήριξη και την εμπιστοσύνη που μου έδειξαν. Θα ήθελα να ευχαριστήσω όλο το προσωπικό του Εργαστηρίου Βιο-Οργανικής Χημείας για την ένθερμη υποδοχή αλλά και για το ευχάριστο κλίμα συνεργασίας που δημιουργήθηκε εντός του εργαστηριακού χώρου.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω την οικογένειά μου και τους φίλους μου για την έμπρακτη καθημερινή τους υποστήριξη και κατανόηση.

# **ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ**

<b>ΠΕΡΙΛΗΨΗ</b> .....	7
<b>ABSTRACT</b> .....	8
<b>1.ΕΙΣΑΓΩΓΗ</b> .....	<b>9</b>
1.1 Πράσινη χημεία- οργανική σύνθεση με χρήση μικροκυμάτων .....	9
1.1.1 Θέρμανση με μικροκύματα .....	11
1.1.2 Επιλογή διαλύτη για θέρμανση με μικροκύματα.....	12
1.1.3 Εξοπλισμός.....	13
1.1.4 Δοχεία αντίδρασης.....	14
1.1.5 Παράμετροι ελέγχου .....	15
1.1.6 Θέρμανση με μικροκύματα- Αντιδράσεις MCRs .....	17
1.2 Πυρρολινόνες .....	18
1.2.1 Παραδείγματα ενώσεων με πυρρολινολικό δακτύλιο και εφαρμογή τους στην φαρμακολογία .....	19
1.2.2 Σύνθεση των πυρρολινονών .....	20
1.3 Πυρρολιδίνες.....	21
1.3.1 Παραδείγματα ενώσεων με πυρρολιδινικό δακτύλιο και βιολογική δράση .....	23
1.4 Κιναζολινικά και κιννοξαλινικά παράγωγα .....	27
1.4.1 Γενικά .....	27
1.4.2 Τα κιννοξαλινικά και κιννοξαλινικά παράγωγα ως αντικαρκινικοί παράγοντες .....	29
1.4.3 Μοριακά στοχευμένη θεραπεία με τη χρήση κιννοξαλινικών και κιννοξαλινικών παραγώγων.....	30
<b>2. ΣΚΟΠΟΣ</b> .....	<b>35</b>
<b>3. ΓΕΝΙΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ</b> .....	<b>36</b>
3.1 Χρωματογραφία λεπτής στιβάδας TLC (Thin Layer Chromatography).....	36
3.2 Χρωματογραφία στήλης .....	37
3.3 Ταυτοποίηση ενώσεων.....	38
3.4 Σύνθεση με χρήση συσκευής μικροκυμάτων .....	40

<b>4. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ .....</b>	<b>41</b>
4.1 Επισκόπηση συνθετικής οδού .....	41
4.1.1 Σύνθεση του 3-υδροξυ-1-μεθυλο-2-οξο-5-(4-αλογονοφαινυλο)-2,5-διυδρο-1H-πυρρολο-3-καρβοξυλικού αιθυλεστέρα.....	42
4.1.2 Σύνθεση του αιθυλο-2-(4-αλογονοφαινυλο)-2,4-διυδρο-1-μεθυλο-1H-πυρρολο-[2,3-b]κινόξαλινο-3-καρβοξυλικού αιθυλεστέρα και του αιθυλο-2-(4-αλογονοφαινυλο) - 1-μεθυλο-1H-πυρρολο-[2,3-b]κινόξαλινο-3-καρβοξυλικού αιθυλεστέρα.....	45
<b>5. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ .....</b>	<b>50</b>
5.1 Σύγκριση συμβατικής και με μικροκύματα σύνθεσης .....	50
5.2 Αντιοξειδωτική δράση.....	51
5.3 Αντικαρκινική δράση .....	54
<b>6.ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....</b>	<b>56</b>

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Στην παρούσα διπλωματική εργασία παρουσιάζεται μία νέα δύο σταδίων σύνθεση των πυρρολο[2,3b]κινοξαλινών μέσω των πρόδρομων ενώσεων τους 2,3-διοξο-πυρρολών, με τη βοήθεια μικροκυμάτων. Το πρώτο βήμα περιλαμβάνει την σύνθεση των 2,3-διοξο-5-αλογονοφαινυλο πυρρολο ενώσεων **4a-c**, με αντίδραση του διαιθυλικού οξαλοξικού άλατος του νατρίου **3**, της μεθυλαμίνης **2** καθώς και διαφόρων υποκατεστημένων βενζαλδεϋδών **1a-c**. Στο δεύτερο στάδιο, η συμπύκνωση μεταξύ των πυρρολο προδρόμων **4a-c** με ο-φαινυλοδιαμίνη **5** οδήγησε σε ένα μίγμα ενώσεων, τις **6** και **7**, χρωματογραφικά διαχωρίσιμες. Όλες οι αντιδράσεις διεξήχθησαν χρησιμοποιώντας την τεχνική ακτινοβολήσης με μικροκύματα και κατόπιν έγινε σύγκριση με την παραδοσιακή συμβατική μέθοδο θέρμανσης. Οι νέες ενώσεις αξιολογήθηκαν για τις αντιοξειδωτικές, κυτταροστατικές και αντιϊκές τους ιδιότητες. Οι περισσότερες από αυτές αποδείχθηκε ότι είναι ισχυροί δεσμευτές ριζών υδροξυλίου και αναστέλλουν *in vitro* την υπεροξειδωση των λιπιδίων. Οι ενώσεις έδειξαν μέτρια κυτταροστατική δράση, ενώ η **6a** εμφανίστηκε να αναστέλλει τον ιό της ευλογιάς σε  $EC_{50}$  2 $\mu$ M και οι ενώσεις **4a** και **6c** φάνηκε να αναστέλλουν τον ιό Sindbis σε  $EC_{50}$  4 $\mu$ M.

## **ABSTRACT**

A novel two-step route for the synthesis of the pyrrolo[2,3-b]quinoxalines *via* their 2,3-dioxo pyrroles, enhanced by microwave irradiation, is presented herein. The first step includes the one-pot, three-component synthesis of 2,3-dioxo-5-halogenophenyl pyrrolo precursors **4a-c** from sodium diethyl oxalacetate **3**, methylamine **2** and various substituted benzaldehydes **1a-c**. In the second step, condensation between pyrrolo precursors **4a-c** with *o*-phenylenediamine **5** led to a mixture of substances separable by thin-layer chromatography, the non-aromatized ethyl 2-(4-halogenophenyl)-1-methyl-2,4-dihydro-1H-pyrrolo[2,3-b]quinoxaline-3-carboxylates **6a-c** and the aromatized ethyl 2-(4-halogenophenyl)-1-methyl-1H-pyrrolo[quinoxaline-3-carboxylates **7a-c**. All reactions were performed using the microwave irradiation technique and compared with the traditional convectional heating. The novel compounds were evaluated for their antioxidant, cytostatic and antiviral properties. Most of them proved to be potent hydroxyl radical scavengers and inhibited *in vitro* lipid peroxidation. The compounds showed moderate antiproliferative activity, while **6a** inhibited vaccinia virus at an  $EC_{50}$  of 2  $\mu$ M, and **4a** and **6c** inhibited Sindbis virus at an  $EC_{50}$  of 4  $\mu$ M.



## 1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

### 1.1 Πράσινη χημεία – Οργανική σύνθεση με χρήση μικροκυμάτων



Στα πλαίσια της ανάπτυξης της συνθετικής χημείας, γίνεται ολοένα και μεγαλύτερη η ανάγκη για την εύρεση νέων μεθόδων πιο καθαρών και φιλικών προς το περιβάλλον καθώς και υψηλότερης αποδοτικότητας. Γι' αυτό λοιπόν, οι χημικές και φαρμακευτικές βιομηχανίες άρχισαν να στρέφονται στη χρήση «πράσινων» μεθόδων για τη σύνθεση χημικών ενώσεων. Αυτό το νέο είδος χημικής

επανάστασης ονομάζεται πράσινη χημεία και ορίζεται ως η ανάπτυξη, ο σχεδιασμός και η εφαρμογή χημικών προϊόντων και διαδικασιών με στόχο τη μείωση ή την εξάλειψη της χρήσης και δημιουργίας επικίνδυνων ουσιών.<sup>1</sup>

Ένας κλάδος της πράσινης χημείας είναι η ακτινοβόληση με μικροκύματα, μια τεχνική η οποία σε πολλές περιπτώσεις αντικαθιστά επάξια τις συμβατικές μεθόδους θέρμανσης αλλά και πλεονεκτεί έναντι αυτών. Η θέρμανση με μικροκύματα αποτελεί μια μέθοδο γρήγορη, καθαρή, οικονομική και φιλική προς το περιβάλλον και έχει προταθεί ως «τεχνολογία του αύριο».<sup>2</sup> Επιπλέον, έχει δώσει μια λύση στο πρόβλημα της διάθεσης των υπολειμμάτων των διαλυτών που χρησιμοποιούνται σε μια αντίδραση καθώς η μέθοδος αυτή παρέχει τη δυνατότητα, σε πολλές αντιδράσεις να μην είναι απαραίτητη η χρήση κάποιου διαλύτη για την ανάπτυξη αντίδρασης.<sup>1</sup>

Η οργανική σύνθεση με τη βοήθεια της ενέργειας των μικροκυμάτων (Microwave Assisted Organic Synthesis - MAOS) αποτελεί μια τεχνική με διαρκώς επεκτεινόμενες εφαρμογές στην οργανική και φαρμακευτική χημεία. Έχει αποδειχθεί ότι μέσω της οργανικής σύνθεσης με μικροκύματα, επιτυγχάνονται:

- Αισθητή μείωση του χρόνου αντίδρασης
- Αύξηση των αποδόσεων παραγωγής των προϊόντων
- Παραγωγή καθαρότερων προϊόντων μέσω της μείωσης των ανεπιθύμητων παράπλευρων αντιδράσεων σε σχέση με τις συμβατικές μεθόδους θέρμανσης<sup>3</sup>

Τα πλεονεκτήματα αυτής της τεχνολογίας αφορούν όχι μόνο στην οργανική και φαρμακευτική χημεία (ανάπτυξη φαρμάκων), αλλά και συναφείς τομείς, όπως στη σύνθεση πολυμερών, στην επιστήμη υλικών, στη νανοτεχνολογία, και στις βιοχημικές διεργασίες. Όσον αφορά την οργανική σύνθεση η χρήση της ενέργειας των μικροκυμάτων επεκτείνεται με ταχείς ρυθμούς. Αποτελεί μια “καθαρή” τεχνική, που παρέχει τη δυνατότητα αυτοματοποίησης μιας διαδικασίας, και οδηγεί στη γρήγορη και με υψηλή απόδοση απομόνωση νέων προϊόντων. Η χρήση των μικροκυμάτων αντικαθιστά την συμβατική θέρμανση (με ελαιόλουτρα ή heat-blocks) με αποτέλεσμα αντιδράσεις που θα απαιτούσαν θέρμανση σε πολύ υψηλές θερμοκρασίες για πολύ μεγάλο χρονικό διάστημα να επιταχύνονται σημαντικά με παράλληλη αύξηση της απόδοσης του προϊόντος.<sup>4</sup>

### 1.1.1 Θέρμανση με μικροκύματα

Η θέρμανση με χρήση μικροκυμάτων χρησιμοποιεί τη δυνατότητα ορισμένων υλικών (διαλύτες ή αντιδραστήρια) να απορροφήσουν την ενέργεια των μικροκυμάτων και να την μετατρέψουν σε θερμότητα, βάσει της οποίας θα ξεκινήσει και η χημική αντιδράση.<sup>1</sup> Το γεγονός αυτό προσφέρει νέες ευκαιρίες στον τομέα της συνθετικής χημείας καθώς παρέχει τη δυνατότητα πραγματοποίησης χημικών αντιδράσεων που δεν θα ήταν δυνατές με τη χρήση της συμβατικής θέρμανσης. Τα μικροκύματα είναι ένα είδος ηλεκτρομαγνητικής ενέργειας και τα όρια συχνοτήτων κυμαίνονται από 300 έως 300,000 MHz και αντιστοιχούν σε μήκη κύματος από 1cm σε 1m.<sup>1</sup> Η ενέργεια των μικροκυμάτων, αποτελείται από ένα ηλεκτρικό και ένα μαγνητικό πεδίο και όσον αφορά στην παραγωγή θερμότητας, μόνο το ηλεκτρικό πεδίο μεταφέρει ενέργεια με τελικό στόχο τη θέρμανση ενώ οι αλληλεπιδράσεις του μαγνητικού πεδίου, δεν αποτελούν σημαντικό παράγοντα.

Οι συχνότητες των μικροκυμάτων που είναι εμπορικά διαθέσιμες για την επιστημονική έρευνα ή για ιατρικές εφαρμογές είναι 900, 2450, 5800 και 22,125 MHz. Για οικιακά και εργαστηριακά συστήματα, η συχνότητα των 2450 MHz (12.25cm), είναι η πιο κοινώς χρησιμοποιούμενη. Τα μικροκύματα σε αυτήν τη συχνότητα, έχουν ικανότητα διείσδυσης (penetration depth) (~25 mm), τέτοια ώστε να υπάρχει αλληλεπίδραση με τα εργαστηριακά δείγματα. Προκειμένου να αποφευχθούν παρεμβολές από δραστηριότητες ραδιομεταδόσεων και τηλεπικοινωνιών που επίσης δρουν σ αυτό το εύρος συχνοτήτων όλοι οι φούρνοι μικροκυμάτων και όλες οι συσκευές μικροκυμάτων που χρησιμοποιούνται για οργανική σύνθεση λειτουργούν στη συχνότητα των 2450 MHz (12.25cm).<sup>5</sup> Η διαφορά μεταξύ της ενέργειας μικροκυμάτων και άλλων μορφών ακτινοβολίας, όπως η X- και γ-

ακτινοβολία, είναι ότι η ενέργεια των μικροκυμάτων είναι μη ιονίζουσα και επομένως δεν μεταβάλλει τη μοριακή δομή των ουσιών που θερμαίνονται αλλά παρέχει θερμική ενεργοποίηση.<sup>1</sup> Η θερμική ενεργοποίηση που προσφέρει η ενέργεια των μικροκυμάτων σε μια ουσία και στοχεύει στους οργανικούς μετασχηματισμούς, βασίζεται σε δύο κυρίως θεμελιώδεις μηχανισμούς που είναι η διηλεκτρική πόλωση και η ιοντική αγωγιμότητα. Μέσω της θέρμανσης με μικροκύματα επιτυγχάνεται διάχυση της ενέργειας στον πυρήνα του υλικού και επιτρέπεται η πιο «τακτική» κατανομή της θερμοκρασίας σε σύγκριση με την κλασική-συμβατική μέθοδο θέρμανσης.<sup>6</sup>

### **1.1.2 Επιλογή διαλύτη για θέρμανση με μικροκύματα**

Η επιλογή διαλύτη σε αντιδράσεις με χρήση μικροκυμάτων είναι ιδιαίτερης σημασίας διότι πέραν της δυνατότητας του να διαλύει τα αντιδραστήρια και τα προϊόντα, μπορεί να παίζει πολύ πιο ενεργό ρόλο. Πιο συγκεκριμένα, οι διαλύτες είναι σε θέση να απορροφήσουν την μικροκυματική ακτινοβολία αυξάνοντας έτσι την ταχύτητα της αντίδρασης των διαλυμένων αντιδραστηρίων.<sup>7</sup> Συνεπώς, και με βάση τα προαναφερόμενα, τα βασικά χαρακτηριστικά που θα πρέπει να έχει, ιδανικά, ένας διαλύτης είναι τα εξής:

- i. Υψηλό σημείο βρασμού για αντιδράσεις υπό ατμοσφαιρική πίεση
- ii. Υψηλή χημική σταθερότητα και αδράνεια ώστε να μειωθούν οι παράπλευρες αντιδράσεις

### 1.1.3 Εξοπλισμός

Αν και τα πρώτα πειράματα σύνθεσης με μικροκύματα έγιναν σε οικιακούς φούρνους μικροκυμάτων, πλέον, όπως είναι λογικό, οι πειραματικές σειρές και η αντίστοιχη τεχνολογία έχουν εξελιχθεί σημαντικά και χρησιμοποιούνται εξειδικευμένες για σύνθεση με μικροκύματα συσκευές. Πρόσφατα, έχουν αναπτυχθεί δύο αντιδραστήρες διαφορετικής φιλοσοφίας σχεδιασμού για οργανική σύνθεση με μικροκύματα: οι «multimode» και οι «monomode» (ή single-mode) αντιδραστήρες.

Όσον αφορά στα multimode όργανα (θεωρητικά, παρόμοια με τους οικιακούς φούρνους), τα μικροκύματα εισέρχονται στην κοιλότητα και αντανακλώνται στα τοιχώματα. Στην πλειονότητα των περιπτώσεων, χρησιμοποιείται ένας αναδευτήρας, του οποίου η λειτουργία εξασφαλίζει ότι η κατανομή των μικροκυμάτων στο πεδίο είναι όσο το δυνατόν πιο ομοιογενής.

Στα monomode όργανα, η ηλεκτρομαγνητική ακτινοβολία οδηγείται κατευθείαν, μέσω ενός υψηλής ακριβείας σχεδιασμένου ορθογωνίου ή κυκλικού κυματοδηγού, στο δοχείο αντίδρασης που βρίσκεται σε καθορισμένη απόσταση από την πηγή ακτινοβολίας. Η ουσιαστική διαφορά μεταξύ των δύο ειδών αντιδραστήρων βρίσκεται στο γεγονός ότι ενώ στις multimode κοιλότητες μπορούν τα ακτινοβοληθούν ταυτόχρονα πολλά δοχεία αντίδρασης σε multi-vessel rotors (παράλληλη σύνθεση), στα monomode συστήματα μπορεί να ακτινοβοληθεί μόνο ένα δοχείο αντίδρασης τη φορά. Ένα γενικό πρόβλημα που συναντάται στα multimode όργανα, είναι η χαμηλή τους απόδοση σε μικρής κλίμακας αντιδράσεις (<3 mL). Αν η παραγόμενη ισχύς μικροκυμάτων είναι υψηλή

(1000-1400 W), η πυκνότητα ισχύος του πεδίου είναι αρκετά χαμηλή, με αποτέλεσμα η θέρμανση των μικρών επιμέρους δειγμάτων να επιτυγχάνεται δύσκολα και αυτό συνιστά έρευνα. Συνήθως, στις περιπτώσεις των μικρών δειγμάτων, χρησιμοποιούνται single-mode όργανα τα οποία μπορούν να επεξεργαστούν ποσότητες που κυμαίνονται από 0.2 mL έως και περίπου 50 mL σε κλειστά δοχεία (250 °C, 20 bar), καθώς και ποσότητες του ύψους των 150 mL υπό συνθήκες reflux και σε ανοιχτό δοχείο. Για ποσότητες έως και μερικών λίτρων προτιμούνται τα multi-mode όργανα με κλειστά είτε ανοιχτά δοχεία αντίδρασης.<sup>8</sup>

#### **1.1.4 Δοχεία αντίδρασης**

Στη σύνθεση με μικροκύματα, χρησιμοποιούνται δοχεία αντίδρασης κατασκευασμένα από κατάλληλο διαπερατό στη μικροκυματική ακτινοβολία υλικό. Μπορούν να ακολουθηθούν δύο τρόποι σύνθεσης σε σχέση με τα δοχεία που χρησιμοποιούνται για την ανάπτυξη της αντίδρασης και ειδικότερα, να πραγματοποιηθούν αντιδράσεις σε κλειστά δοχεία και αντιδράσεις σε ανοιχτά δοχεία και υπό ατμοσφαιρική πίεση.<sup>9</sup>

#### **ΚΛΕΙΣΤΑ ΔΟΧΕΙΑ**

Αυτού του είδους τα δοχεία μένουν σφραγισμένα καθ' όλη τη διάρκεια της διαδικασίας της ακτινοβόλησης. Επίσης, επιτρέπουν τη χρήση υψηλών πιέσεων και θερμοκρασιών και για λόγους ασφαλείας, είναι εξοπλισμένα με έναν ή περισσότερους μηχανισμούς με τους οποίους η

ταχεία ή υπερβολική αύξηση της πίεση θα μπορεί να αποφευχθεί χωρίς οποιοδήποτε καταστροφικό αποτέλεσμα.

Τέτοιοι μηχανισμοί περιλαμβάνουν δίσκους ασφαλείας από αδρανείς μεμβράνες τεφλόν ή μεταλλικούς δίσκους. Η χρήση τους, είναι σημαντική καθώς επιτρέπουν την εκτεταμένη ασφαλή χρήση του δοχείου το οποίο δέχεται μηχανικές και θερμικές καταπονήσεις.<sup>9</sup>

### ΑΝΟΙΧΤΑ ΔΟΧΕΙΑ

Τα ανοιχτά δοχεία χρησιμοποιούνται για αντιδράσεις που πραγματοποιούνται σε θερμοκρασία ίση ή μικρότερη από το σημείο βρασμού των αντιδραστηρίων σε ατμοσφαιρική πίεση. Κατά την ακτινοβόληση με μικροκύματα σε ατμοσφαιρική πίεση, οι διαλύτες δε μπορούν να ξεπεράσουν το σημείο βρασμού τους, έτσι, προκειμένου να επιτευχθούν υψηλοί ρυθμοί αντίδρασης, σε αντιδράσεις με ανοιχτά δοχεία, χρησιμοποιούνται διαλύτες με υψηλά σημεία βρασμού.<sup>9</sup>

#### **1.1.5 Παράμετροι ελέγχου**

Κατά την εφαρμογή της μεθόδου ακτινοβόλησης ενός δείγματος με μικροκύματα, απαραίτητη είναι η ρύθμιση και ο έλεγχος κάποιων βασικών για την αντίδραση παραμέτρων, μια δυνατότητα που παρέχεται μέσω του χειρισμού του οργάνου.

Τέτοιες βασικές παράμετροι είναι οι εξής<sup>5</sup>:

- Ισχύς/ Χρόνος
- Πίεση
- Χρόνος
- Θερμοκρασία

### **Ισχύς/ Χρόνος :**

Η ισχύς και ο χρόνος, αποτελούν δύο από τις απλούστερες και προφανείς παραμέτρους που πρέπει πρώτα να ελεγχθούν. Ο καθορισμός αυτών των παραμέτρων για μια αντίδραση, θα προκύψει από τον ερευνητή έπειτα από δοκιμή και σφάλμα.<sup>5</sup>

### **Πίεση :**

Η πίεση είναι μια από τις δυο άμεσα προσδιοριζόμενες φυσικές παραμέτρους στο σύστημα μικροκυμάτων. Οι αισθητήρες πίεσης είναι σχετικά φθηνοί και τα δοχεία αντίδρασης μπορεί να κατασκευαστούν έτσι ώστε να επιτρέπουν την ελεγχόμενη παροχή ισχύος στο σύστημα βάσει της μετρούμενης εσωτερικής πίεσης στο δοχείο. Βάσει αυτού του σχεδιασμού, η παροχή ισχύος ανακόπτεται στην επιλεγμένη τιμή πίεσης και επανέρχεται όταν αυτή η τιμή πέσει κάτω τις προεπιλεγμένης. Επιπροσθέτως, άξιο αναφοράς είναι το γεγονός πως η πίεση που επιτυγχάνεται σε μια δεδομένη θερμοκρασία κατά τη διάρκεια της αντίδρασης, εξαρτάται από ένα συνδυασμό παραγόντων. Αυτοί οι παράγοντες είναι η πίεση των ατμών των αντιδρώντων καθώς και η πίεση των αερίων των προϊόντων που παράγονται κατά την αντίδραση.<sup>5</sup>

### **Θερμοκρασία:**

Η θερμοκρασία αποτελεί βασική παράμετρο στις αντιδράσεις με μικροκύματα καθώς από αυτή εξαρτάται και το επίπεδο διάλυσης των ουσιών που συμμετέχουν.

Για να μπορεί να υπάρχει αποτελεσματικός έλεγχος της διεργασίας, ένας αισθητήρας θερμοκρασίας θα πρέπει<sup>5</sup>:



- i. Να είναι ταχείας απόκρισης στα ερεθίσματα
- ii. Να δείχνει την πραγματική εσωτερική θερμοκρασία του δοχείου
- iii. Να είναι αδρανής στην ενέργεια μικροκυμάτων

### **1.1.6 Θέρμανση με μικροκύματα –Αντιδράσεις MCRs**

Μια από τις μεγαλύτερες προκλήσεις στη σύγχρονη ανάπτυξη φαρμάκων, είναι ο σχεδιασμός μιας σειράς χημικών αντιδράσεων υψηλής απόδοσης, που επιτρέπει τη μεγιστοποίηση της δομικής πολυπλοκότητας και ποικιλομορφίας σε ελάχιστο αριθμό βημάτων κατά τη διαδικασία σύνθεσης τους. Έτσι, οι αντιδράσεις πολλών συστατικών (MultiComponent Reactions, MCRs) γίνονται όλο και πιο δημοφιλείς στον τομέα της συνδυαστικής χημείας, εφόσον προσφέρουν τη δυνατότητα παραγωγής μεγάλης ποικιλίας μορίων σε ένα μόνο στάδιο.

Τα προϊόντα αυτών των αντιδράσεων, σχηματίζονται εύκολα με την ανάμιξη και επεξεργασία των αρχικών αντιδραστηρίων, συνεπώς, αυτές οι αντιδράσεις απαιτούν ελάχιστη επεξεργασία στο στήσιμό τους. Οι αντιδράσεις αυτού του τύπου, περιλαμβάνουν επτά ή και περισσότερα συστατικά σε ένα δοχείο ('one-pot'), όμως ο πιο συνηθισμένος αριθμός συστατικών είναι τρία ή τέσσερα.<sup>10</sup> Ο συνδυασμός της τεχνολογίας των μικροκυμάτων και των αντιδράσεων MCR προσελκύει τα τελευταία χρόνια όλο και περισσότερο το ενδιαφέρον των επιστημόνων καθώς έχει βρεθεί ότι επιταχύνουν μια μεγάλη ποικιλία χημικών μετασχηματισμών. Η τεχνολογία των μικροκυμάτων παρέχει πολλές χημικές αντιδράσεις με γνωρίσματα όπως αυξημένοι ρυθμοί αντίδρασης, υψηλότερες αποδόσεις καθαρών προϊόντων, καλύτερη εκλεκτικότητα, ευκολία στον χειρισμό, ταχεία βελτιστοποίηση των αντιδράσεων και πολλά φιλικά προς το

περιβάλλον πλεονεκτήματα.<sup>3</sup> Παράλληλα οι αντιδράσεις πολλών συστατικών (MCRs) αποτελούν ένα από τα καλύτερα εργαλεία για την σύνθεση ποικίλων και πολύπλοκων ενώσεων ανάμεσα στις οποίες και μικρές ετεροκυκλικές ενώσεις.<sup>11</sup>

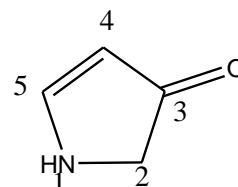
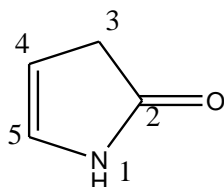
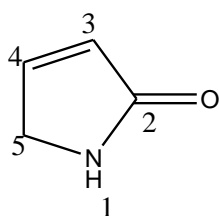
Μεταξύ των διαφόρων κατηγοριών ετεροκυκλικών ενώσεων, τα πυρρολο και κινόξαλινικά παράγωγα είναι γνωστά ως αντιοξειδωτικοί παράγοντες που παρουσιάζουν ισχυρή αναστολή της υπεροξειδωσης των λιπιδίων *in vitro* και αποτελούν και ισχυρούς δεσμευτές των ριζών υδροξυλίου. Ο πυρήνας των κινόξαλινών είναι παρών σε πολλούς φαρμακευτικούς παράγοντες, επιδεικνύοντας ένα ευρύ φάσμα βιολογικών ιδιοτήτων, όπως αντικαρκινικές<sup>12</sup>, αντιαίμες<sup>13</sup> και αντιφλεγμονώδεις ιδιότητες.<sup>14</sup> Επίσης, τα πυρρολοκινόξαλινικά παράγωγα αναφέρονται ως παράγοντες έναντι του HIV<sup>15</sup>, έναντι της ελονοσίας<sup>16</sup>, του καρκίνου<sup>17</sup>, ως αντιοξειδωτικοί<sup>18</sup> αλλά και ως αναστολείς των PARP-1 και Akt κινάσης<sup>19</sup>.

## 1.2 Πυρρολινόνες

Οι πυρρολινόνες είναι οργανικές ετεροκυκλικές ενώσεις με μοριακό τύπο  $C_4H_5NO$ . Είναι κυκλικές αμίνες ή αμίδια, ανάλογα με την θέση της κετονο-ομάδας, με ένα διπλό δεσμό. Οι Πυρρολιν-2-όνες είναι κυκλικά αμίδια αλλά οι πυρρολιν-3-όνες είναι κυκλικές εναμίνες, με μία κετονο-ομάδα στην 3- θέση. Το Σχήμα 1 δείχνει κάποια παραδείγματα πυρρολινονών με τις ονομασίες τους. Η αρίθμησή τους ξεκινάει από το άζωτο και συνεχίζει όπως φαίνεται. Π.χ. η 1,5-δihυδρο-2H-πυρρολ-2-όνη λέγεται και 3-πυρρολιν-2-όνη.

Οι πυρρολινόνες δύναται να υποκατασταθούν σε κάθε θέση εκτός της θέσης της κετονο-ομάδας. Οι υποκατεστημένες πυρρολινόνες συνήθως συνθέτονται απευθείας από τα πρόδρομά τους μόρια και όχι μέσω

αντίδρασης της μη-υποκατεστημένης πυρρολινόνης με ένα ηλεκτρόφιλο ή πυρηνόφιλο αντιδραστήριο<sup>20</sup>.



1,5-dihydro-2H-pyrrol-2-one

1,3-dihydro-2H-pyrrol-2-one

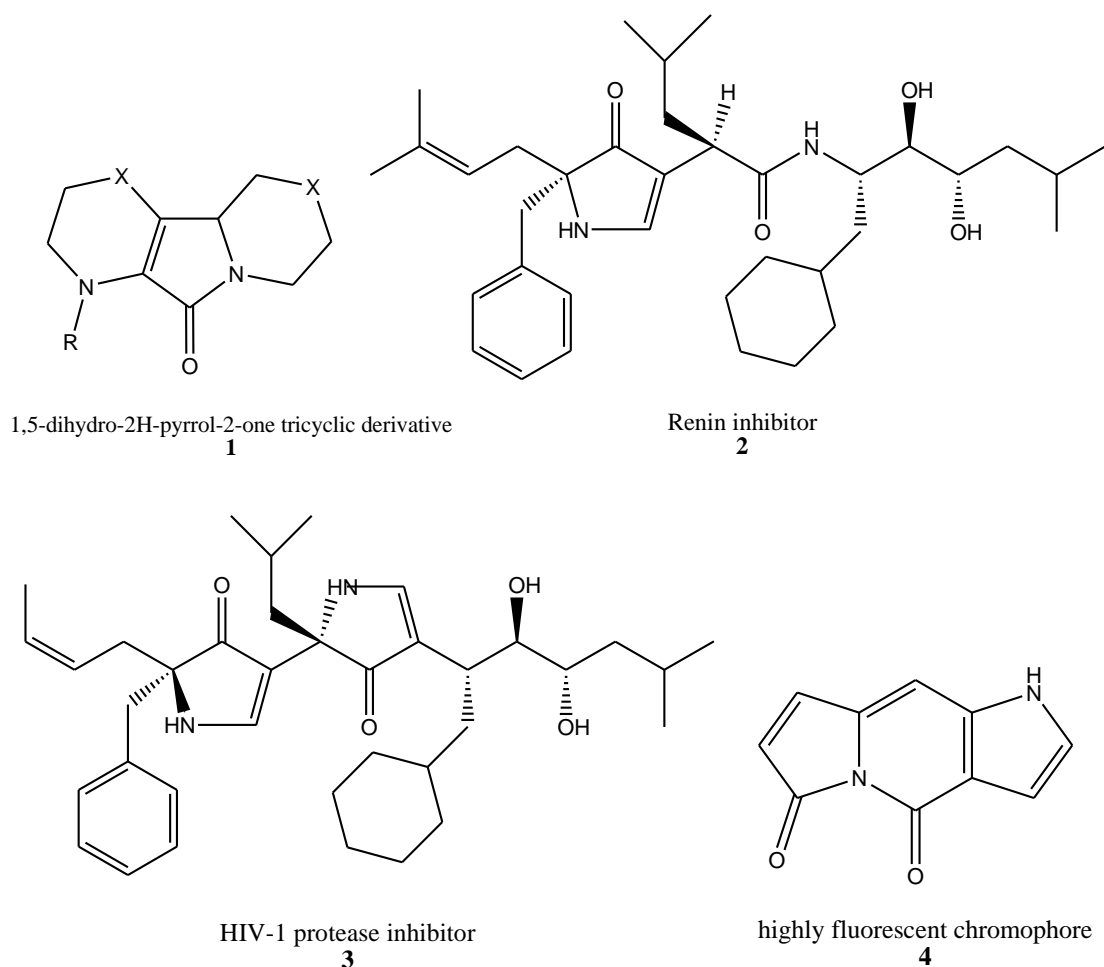
1,2-dihydro-3H-pyrrol-3-one

**Σχήμα 1:** Δομή πυρρολινονών με αρίθμηση κατά IUPAC.

### 1.2.1 Παραδείγματα ενώσεων με πυρρολινονικό δακτύλιο και εφαρμογές τους στην φαρμακολογία.

Οι πυρρολινόνες έχουν πολλές εφαρμογές. Οι ενώσεις της ομάδας τρικυκλικών παραγώγων της 1,5-Διύδρο-2H-πυρρολ-2-όνης **1** είναι παραδείγματα υποκατεστημένων πυρρολινονών με φαρμακολογική δράση, συγκεκριμένα αντι-μολυσματική, αντιβακτηριδιακή ή/και αντιμυκητιακή δράση. Σε αυτήν την ομάδα μορίων, το X μπορεί να αντιπροσωπεύει S, SO, SO<sub>2</sub>, O και R, επιλεγμένο από ένα γκρουπ αποτελούμενο από C<sub>1</sub>-C<sub>5</sub> αλκύλια, C<sub>3</sub>-C<sub>5</sub> αλκένυλα, μη-υποκατεστημένα C<sub>3</sub>-C<sub>7</sub> κυκλοαλκένυλα και 4-φαίνυλβένζυλ. Οι πυρρολινόνες είναι γνωστές και ως αναστολείς της ρενίνης όπως το μόριο **2**. Ένας αναστολέας ρενίνης χρησιμοποιείται κυρίως στην θεραπεία της υπέρτασης. Το μόριο **3** έχει παρόμοια δομή, αλλά διαφορετική εφαρμογή. Αυτό το μόριο φέρει έναν πυρρολινονικό δακτύλιο παραπάνω από ότι το μόριο **2** και δρα ως αναστολέας της HIV-1 πρωτεάσης<sup>21</sup>. Ένα άλλο

παράδειγμα με διαφορετική εφαρμογή είναι ένα πολύ φθορίζον πυρρολο[3,2-f]ινδολιζινο-4,6-δίονο χρωμοφόρο **4** το οποίο ενδέχεται να είναι χρήσιμο στην φθορίζουσα απεικόνιση του μεταβολισμού του ήπατος<sup>20</sup>.



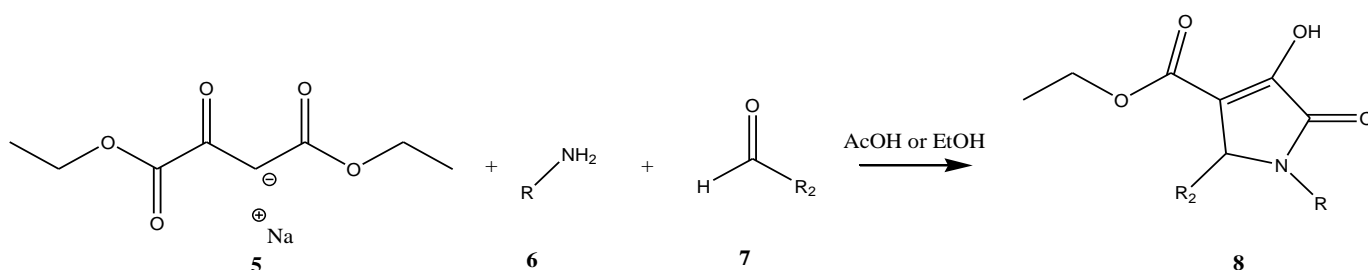
**Σχήμα 2:** Πυρρολινόνες με φαρμακευτικές εφαρμογές.

### 1.2.2 Σύνθεση των πυρρολινονών

Οι διάφορες μελέτες με θέμα τις πυρρολινόνες έχουν καταλήξει σε διαφορετικές στρατηγικές σύνθεσης. Ενώ υπάρχουν ήδη πολλές γνωστές δομές πυρρολινονών, οι τρόποι σύνθεσης των ενώσεων αυτών ακόμη ερευνάται. Προφανώς, η μέθοδος σύνθεσής τους διαφοροποιείται

ανάλογα με τη δομή της ένωσης. Για παράδειγμα, οι 2-πυρρολινόνες συντίθενται με διαφορετικό τρόπο από ότι οι 3-πυρρολινόνες.

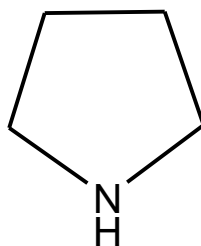
Η κύρια μέθοδος σύνθεσης που μπορεί να χρησιμοποιηθεί είναι μία αντίδραση τριών συστατικών, ξεκινώντας από διαιθυλικό οξαλοξικό άλας του νατρίου, αμμωνία ή πρωτοταγή αμίνη και αλδεΐδη. Στην αντίδραση αυτή μπορεί να χρησιμοποιηθεί οξύ ως καταλύτης ή να θερμανθούν τα συστατικά χρησιμοποιώντας αιθανόλη 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 (Σχήμα 3).



**Σχήμα 3:** Αντίδραση τριών συστατικών με κυκλοποίηση Mannich.

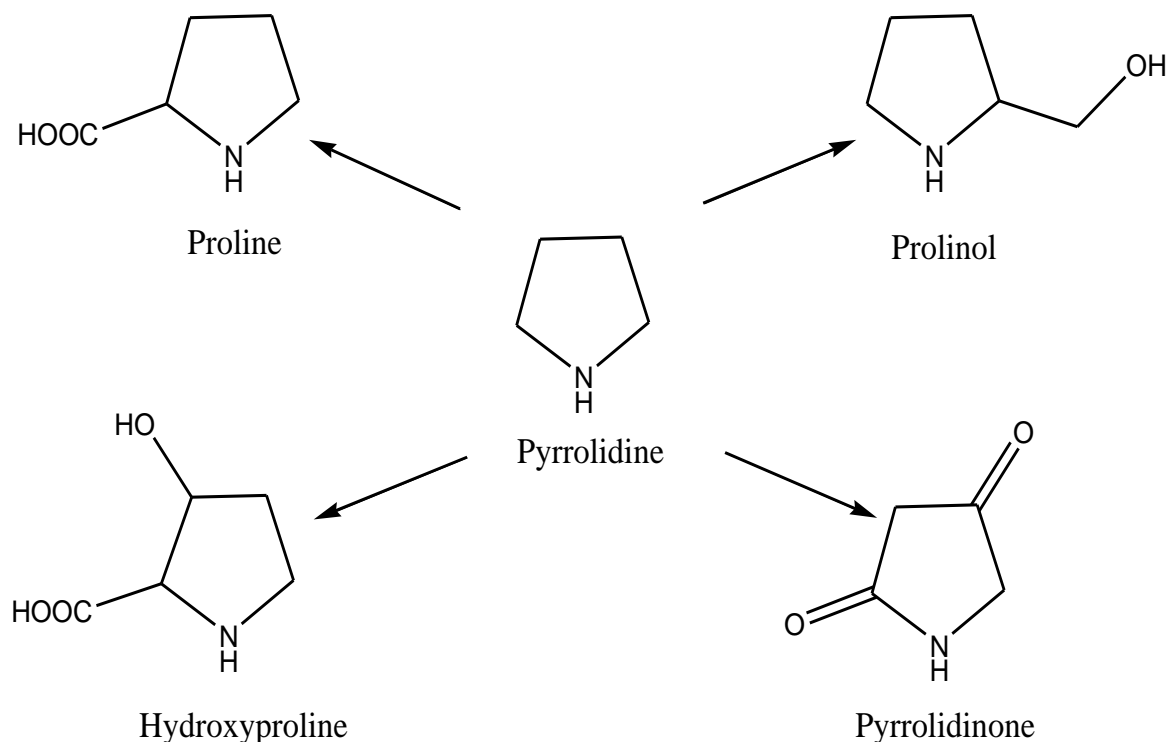
### 1.3 Πυρρολιδίνες

Σημαντικός αριθμός ενώσεων στη βιβλιογραφία, συνθετικών και μη, αναφέρουν την πυρρολιδίνη ως βασικό δομικό συστατικό. Πρόκειται για δευτεροταγή κυκλική αμίνη, που συνιστάται από ετεροκυκλικό δακτύλιο με τέσσερα άτομα άνθρακα και ένα άτομο αζώτου (Εικόνα 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, στη βιβλιογραφία αναφέρονται ενώσεις πυρρολιδίνης, άλλες με υποκατεστημένη πλευρική αλειφατική αλυσίδα και άλλες με καρβonyλίο επί του δακτυλίου (Εικόνα 2). Παρακάτω απεικονίζονται η υδροξυπρολίνη, η πυρρολιδινόνη, η προλινόλη και η προλίνη.



**Εικόνα 2:** Παραδείγματα ενώσεων με πυρρολιδινικό δακτύλιο

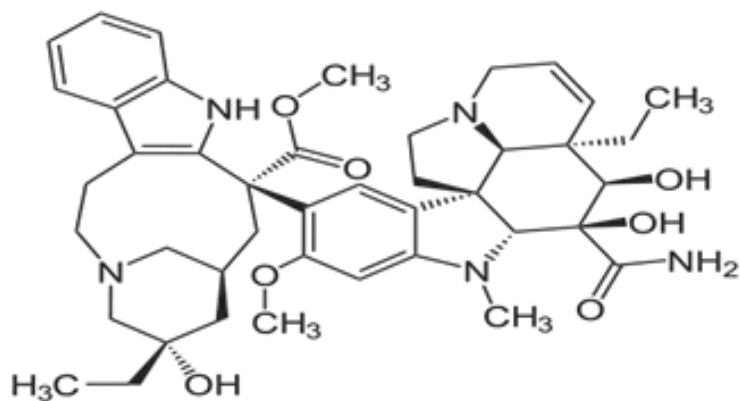
Πολλές ενώσεις με σημαντική βιολογική δράση που απαντώνται στη φύση φέρουν τον βασικό δακτύλιο της πυρρολιδίνης. Παραδείγματα τέτοιων ενώσεων αποτελούν οι vindesine, piracetam, clausenamide και atorvastatin, για τις οποίες έχει αποδειχθεί ότι εμφανίζουν αντιμυτωτικές, αντιβακτηριακές και άλλες ιδιότητες. Οι ίδιες πάλι ενώσεις, αποτελούν ενδιάμεσα για τη σύνθεση πιο περίπλοκων και σημαντικών φαρμακευτικά ενώσεων όπως οι detoxine, lactacystin και πολλών άλλων<sup>22</sup>.

### **1.3.1 Παραδείγματα ενώσεων με πυρρολιδινικό δακτύλιο και βιολογική δράση**

Όπως αναφέρθηκε στη προηγούμενη παράγραφο αρκετές ενώσεις με σημαντική φαρμακολογική δράση εμπεριέχουν τον πυρρολιδινικό δακτύλιο και χρησιμοποιούνται σήμερα για τη θεραπευτική αντιμετώπιση ασθενειών. Παρακάτω αναφέρονται παραδείγματα αυτών και η εφαρμογή τους στη θεραπευτική<sup>22</sup>.

#### Vindesine

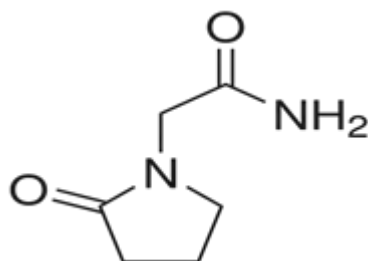
Λειτουργεί ως αναστολέας της μίτωσης και χρησιμοποιείται στην χημειοθεραπεία για την αντιμετώπιση πολλών μορφών καρκίνου όπως είναι η λευχαιμία, το λέμφωμα, το μελάνωμα, ο καρκίνος του μαστού και του πνεύμονα.



**Εικόνα 3:** Μοριακή δομή του Vindesine

### Piracetam

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

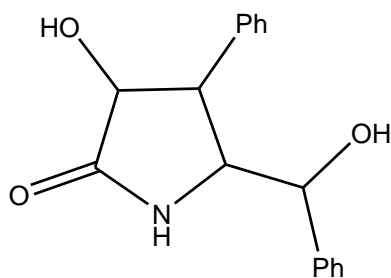


**Εικόνα 4:** Μοριακή δομή του Piracetam

### Clausenamide

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

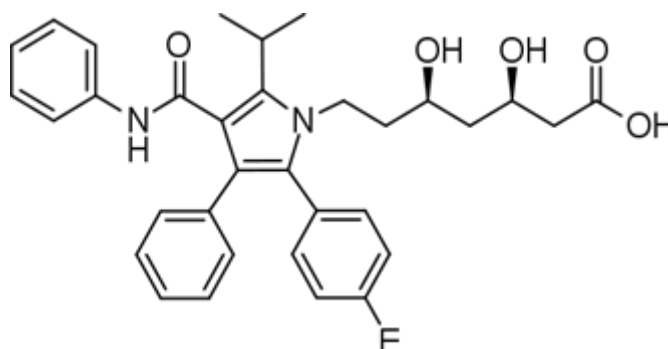




**Εικόνα 5 :** Μοριακή δομή του Clausenamide

### Atorvastatin

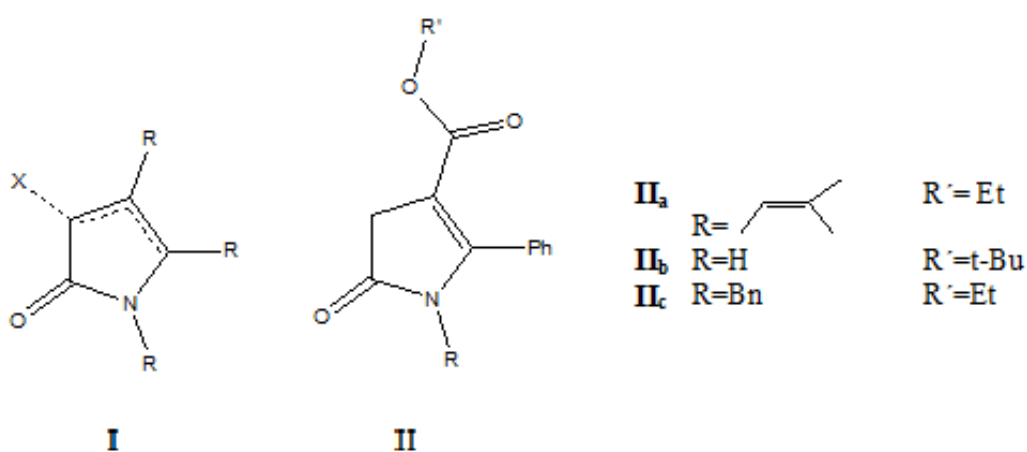
Χρησιμοποιείται για τη μείωση των επιπέδων χοληστερόλης και είναι ανταγωνιστικός αναστολέας της HMG-CoA αναγωγάσης εμποδίζοντας τη de novo σύνθεση χοληστερόλης στον οργανισμό.



**Εικόνα 6:** Μοριακή δομή του Atorvastatin

Εκτός των παραπάνω φυσικών παραγώγων, άλλα ανάλογα που φέρουν στη δομή τους τον πυρρολιδινικό δακτύλιο, διαδραματίζουν καθοριστικό ρόλο τόσο για τη σύνθεση νέων θεραπευτικών ενώσεων όσο και για την αξιολογή αντική και αντικαρκινική τους δράση. Συγκεκριμένα, οι 2-οξοπυρρόλες **I** (Εικόνα 7) χρησιμοποιούνται ευρέως και αποτελούν τη βασική δομή σε πολλά φάρμακα, συμπεριλαμβανομένων και προϊόντων

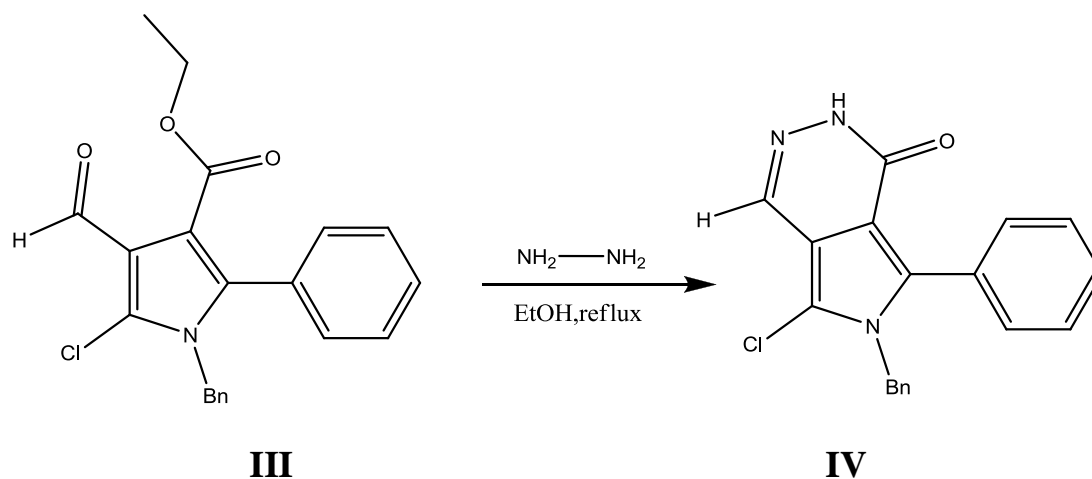
που έχουν ενεργή δράση ενάντια σε ιικές μολυσματικές ασθένειες (HIV, γρίπη), αντικαρκινικούς παράγοντες και προϊόντα που δρουν ενάντια σε ασθένειες μικροβιολογικής φύσεως (είτε βακτηριακής, είτε μυκητιακής). Επιπλέον, οι 2-οξοπυρρόλες είναι γνωστές ως θεμέλιοι λίθοι για τη σύνθεση των αλκαλοειδών, καθώς και προϊόντων όπως οι 2,2'-διπυρρόλες, οι τετραπυρρόλες και κάποιες χρωστικές. Πέρα από τις πολύ γνωστές 5-αλκυλο-2-οξοπυρρόλες, που πρωτοαναφέρθηκαν το 1890 από τον Emery, στην βιβλιογραφία έχει γίνει ελάχιστη αναφορά στα 5-αρυλο-2-πυρρολο παράγωγα **II** (Εικόνα 7). 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 <sup>23</sup>.



**Εικόνα 7:** 2-οξοπυρρόλες **I** και 5-αρυλο-2-οξοπυρρόλες **II**

Στο σημείο αυτό είναι άξιο λόγου να αναφερθεί η δημιουργία παραγώγων του 2-οξοπυρρολίου με αλδεύδες, διαζωνιακά άλατα, ενεργούς εστέρες και διθειάνθρακα με στόχο τη σύνθεση νέων ενώσεων. Επίσης, η χλωροφορμυλίωση του **IIc** παρείχε τις πυρρολο-καρβαλδεύδες **III** (Σχήμα 4). Ένας μεγάλος αριθμός πυρρολο-καρβαλδευδών

χρησιμοποιήθηκε για τη σύνθεση πολυκυκλικών ενώσεων. Για παράδειγμα, οι πυρρολο [3,4-d] πυριδαζινόνες **IV** απομονώθηκαν με σύντηξη αλδεϋδικού και εστερικού δακτυλίου του **III** μέσω υδραζίνης (Σχήμα 4).



**Σχήμα 4:** Παράδειγμα σύνθεσης ετεροκυκλικής ένωσης **IV** από πυρρολο-καρβαλδεϋδη **III**

Συνεπώς, απεδείχθη ότι οι οξοπυρρόλες και τα ανάλογά τους αποτελούν ενδιαφέροντες και πολύπλευρους δομικούς λίθους στη Συνθετική Οργανική Χημεία. Επίσης πολλές από αυτές τις ενώσεις απεδείχθησαν νέα ενδιάμεσα στη σύνθεση πολυυποκατεστημένων πυρρολίων.

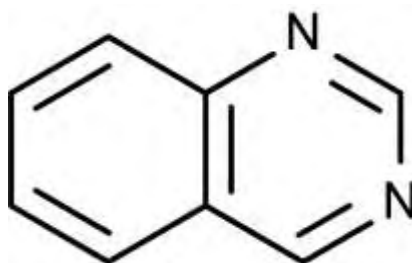
## 1.4 Κιναζολινικά και κινόξαλινικά παράγωγα

### 1.4.1 Γενικά

Η κιναζολίνη είναι μία ετεροκυκλική ένωση συνιστώμενη από δύο συνενωμένους εξανικούς απλούς αρωματικούς δακτυλίους, ένας βενζολικό δακτύλιο και έναν πυριμιδικό δακτύλιο. Η χημική της

φόρμουλα είναι  $C_8H_6N_2$ , και είναι κίτρινο στερεό. Είναι ισομερές με άλλες ναφθυριδίνες συμπεριλαμβανομένων της κινόξαλίνης, της φθαλαζίνης και της κινόλίνης. Τα παράγωγα της κινάζολίνης λέγονται κινάζολίνες.

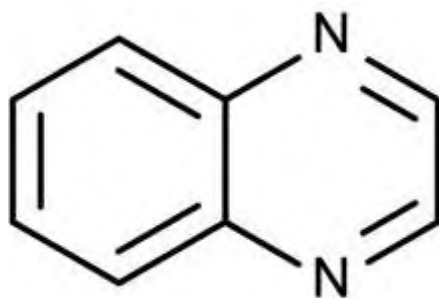
Φαρμακολογικά έχει χρησιμοποιηθεί τόσο ως παράγοντας κατά της ελονοσίας όσο και στην θεραπεία κατά του καρκίνου. Το σύστημα των δακτυλίων παραδοσιακά παρασκευάζεται με τη θέρμανση 2-ακυλανιλιδών παρουσία αμμωνίας ή αμινών<sup>23</sup>.



**Εικόνα 8:** Δομή της κινάζολίνης

Η κινόξαλίνη, ή αλλιώς βενζοπυραζίνη, είναι μία ετεροκυκλική ένωση της οποίας το σύμπλεγμα δακτυλίων αποτελείται από έναν βενζολικό δακτύλιο και έναν πυραζινικό δακτύλιο. Είναι ισομερές με άλλες ναφθυριδίνες συμπεριλαμβανομένων της κινάζολίνης, της φθαλαζίνης και της κινόλίνης.

Οι κινόξαλίνες χρησιμοποιούνται ως βαφές, φαρμακευτικά και αντιβιοτικά. Κάποιες μελέτες διεξήχθησαν με σκοπό τη διερεύνηση των ογκοκατασταλτικών ιδιοτήτων των κινόξαλινικών ενώσεων<sup>24</sup>. Πρόσφατα, η κινόξαλίνη και τα ανάλογά της έχουν διερευνηθεί ως σύνδεσμοι των καταλυτών<sup>25</sup>.



**Εικόνα 9:** Δομή της κινόξαλίνης

#### **1.4.2 Τα κινάζολινικά και κινόξαλινικά παράγωγα ως αντικαρκινικοί παράγοντες.**

Το DNA αποτελεί έναν από τους πιο σημαντικούς στόχους πολλών χημειοθεραπευτικών φαρμάκων. Πολυκυκλικές αζωτούχες ετεροκυκλικές ενώσεις με επίπεδη δομή μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως αντικαρκινικά φάρμακα δεδομένου ότι παρεμβάλλονται μεταξύ των ζευγών βάσεων της διπλής έλικας του DNA. Ευρέως γνωστοί χημειοθεραπευτικοί παράγοντες, όπως οι ανθρακυκλίνες, το camptothecin και το amsacrine, οι οποίοι χαρακτηρίζονται από επίπεδες πολυκυκλικές δομές μπορούν να αλληλεπιδράσουν με τα ένζυμα τοποϊσομεράση I και II σχηματίζοντας ένα τεταρτοταγές σύμπλοκο μεταξύ του φαρμάκου, του DNA και του ενζύμου.

Στην προσπάθεια εύρεσης διάφορων χημικών ενώσεων με στόχο το σχεδιασμό νέων αντικαρκινικών φαρμάκων, αποδείχθηκε ότι τα κινάζολινικά και κινόξαλινικά παράγωγα αποτελούν μία νέα τάξη χημειοθεραπευτικών αναλόγων, ιδιαίτερα αποτελεσματικά έναντι των καρκινικών όγκων.

Οι κινόξαλίνες και οι δομικά συγγενείς κινόξαλινόνες αντιπροσωπεύουν μία σημαντική τάξη ενώσεων που βρίσκονται σε μεγάλο αριθμό

βιολογικά και φαρμακολογικά χρήσιμων παραγόντων. Ένα μεγάλο μέρος των συνθετικών κινοξαλινών παρουσίασε αντινεοπλαστική δραστηριότητα. Για παράδειγμα, οι υποκατεστημένες (φαινοξυμεθυλ) κινοξαλινόνες επέδειξαν άριστη ανταγωνιστικότητα έναντι της Ρ-γλυκοπρωτεΐνης και της πρωτεΐνης (MRP1)α σε σειρές κυττάρων με αντίσταση σε φάρμακα. Ο κινοξαλινικός δακτύλιος οδήγησε σε βενζο[f]πυριδο[4,3-b] και πυριδο[3,4-β] κινοξαλινικά παράγωγα τα οποία επέδειξαν αναστολή των τοποϊσομερασών<sup>26</sup>.

Τα κιναζολινικά παράγωγα είναι γνωστοί ισχυροί αναστολείς του επιδερμικού αυξητικού παράγοντα (EGFR). Ο συγκεκριμένος υποδοχέας είναι μία διαμεμβρανική κινάση της τυροσίνης και υπερεκφράζεται σε πολλές περιπτώσεις καρκινικών όγκων (π.χ. του στήθους, των ωοθηκών, του προστάτη και του κόλον). Συνεπώς, ως αναστολείς του EGFR, τα κιναζολινικά παράγωγα αναμένεται να έχουν θεραπευτικές ιδιότητες έναντι κακοηθών επιθηλιακών νοσημάτων<sup>27</sup>.

### **1.4.3 Μοριακά στοχευμένη θεραπεία με τη χρήση κιναζολινικών και κινοξαλινικών παραγώγων**

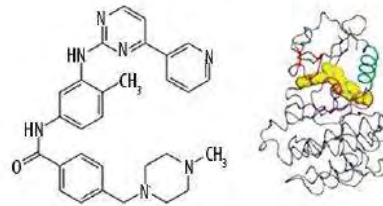
Ενώ μερικοί τύποι καρκίνου είναι ευαίσθητοι στην εφαρμογή αντικαρκινικών θεραπειών όπως η σύνθεση του DNA, παράγοντες που αλλοιώνουν το DNA και συγκεκριμένοι παρεμποδιστές κυτταρικών υποδοχέων, πολλοί άλλοι τύποι καρκίνου παρουσιάζουν υψηλή αντοχή και έχουν αποδειχτεί πολύ δύσκολοι στην θεραπεία τους. Η θεραπεία αυτών των όγκων είναι δύσκολη, και το πεδίο αυτό χρειάζεται επειγόντως νέες θεραπευτικές στρατηγικές. Για παράδειγμα, η χρόνια μυελοειδής λευχαιμία (CML), είναι ένας από τους πολλούς τύπους όγκων

οι οποίοι έχουν αποδειχθεί ανεχτικοί στη θεραπεία έως την πρόσφατη αναγνώριση ενός συγκεκριμένου μικρο-μοριακού φαρμάκου. Η CML αναπτύσσεται μέσω μιας σειράς διακριτών σταδίων, κατά τα οποία οι γενετικές μετατροπές σταδιακά συσσωρεύονται. Σε περισσότερες από το 95% των περιπτώσεων CML υπάρχει αμοιβαία μετατόπιση μεταξύ των χρωμοσωμάτων 9 και 22 η οποία δημιουργεί το BCR-ABL ογκογονίδιο. Η BCR-ABL συντηγμένη πρωτεΐνη συνθέτεται κατά την έκφραση με αποτέλεσμα η δραστηριότητα της κινάσης της τυροσίνης του κωδικοποιημένου ABL να είναι πολύ υψηλή στα CML κύτταρα και να οδηγεί σε καρκινικούς φαινοτύπους. Για το λόγο αυτό, η αναστολή της καταλυτικής δραστηριότητας του ABL έχει προβλεφθεί ως μία αποτελεσματική στρατηγική για τη θεραπεία της CML. Οι πρωτεϊνικές κινάσες παίζουν κεντρικό ρόλο στην ανάπτυξη του καρκίνου και οι φαρμακευτικές εταιρείες έχουν αναπτύξει ειδικούς αναστολείς για αρκετές κινάσες, ώστε να ελέγξουν τις αντικαρκινικές τους ιδιότητες.

Μία αξιοσημείωτη περίπτωση είναι αυτή του μικρομοριακού αναστολέα (PDGF-R) που ονομάζεται Imatinib mesylate και έδειξε αποτελεσματική ανασταλτική δράση στην δραστηριότητα της κινάσης των ABL πρωτεϊνών. Αυτό το φάρμακο σήμερα χρησιμοποιείται αποτελεσματικά στην θεραπεία ασθενών με CML. Όμως, με το χρόνο, οι ασθενείς στους οποίους χορηγήθηκε το φάρμακο ανέπτυξαν αυξανόμενη αντίσταση, προφανώς λόγω ανάπτυξης δευτερογενών μεταλλάξεων στην EGFR. Για να αντιμετωπιστεί το πρόβλημα της αντίστασης, χρησιμοποιούνται ακόμα δύο μικρά μόρια (το dasatinib και το nolotinib) που αλληλεπιδρούν με την EGFR με κάπως διαφορετικό τρόπο, και προς το παρόν έχουν επιτυχώς εμποδίσει την ανάπτυξη όγκων σε ασθενείς με υποτροπιασμένους όγκους μετά την θεραπεία με το imatinib (Εικόνα 10).

**A**

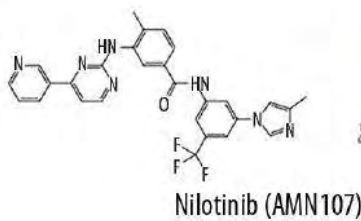
The first-generation ABL TK inhibitor



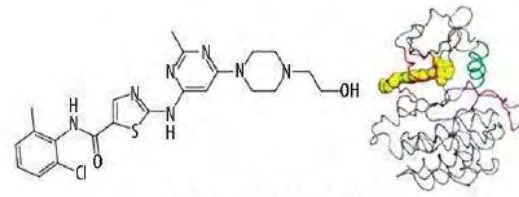
Imatinib (STI571)

**B**

The second-generation ABL TK inhibitors



Nilotinib (AMN107)



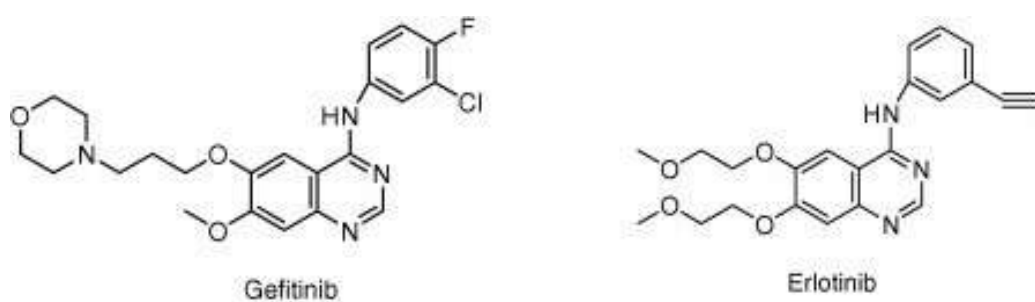
Dasatinib (BMS-354825)

**Εικόνα 10:** Ο μικρομοριακός αναστολέας πρώτης γενιάς Imatinib mesylate και οι μικρομοριακοί αναστολείς δεύτερης γενιάς dasatanib και nolotinib.

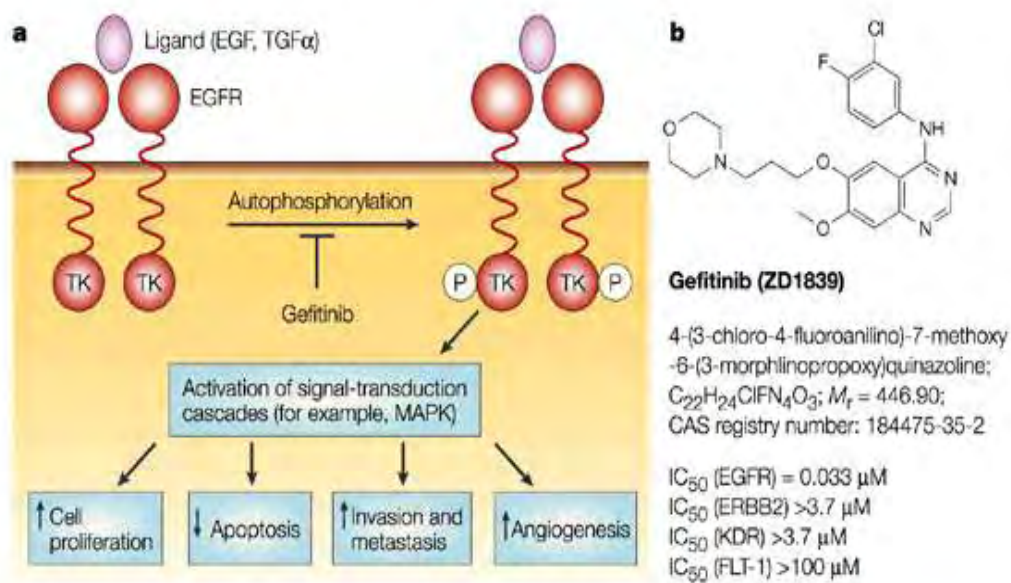
Υπό την ίδια αρχή στόχευσης της δραστηριότητας της κινάσης, η αναστολή της δραστηριότητας της κινάσης της τυροσίνης της EGFR από ακόμη ένα μικρομοριακό φάρμακο, το Gefitinib, έχει επιτύχει στην θεραπεία του μη μικροκυτταρικού καρκίνου των πνευμόνων (NSCLC) (Εικόνα 12). Το Gefitinib είναι ο πρώτος επιλεκτικός αναστολέας της περιοχής της κινάσης της τυροσίνης της EGFR. Η πρωτεΐνη στόχος EGFR αναφέρεται μερικές φορές και ως Her1 ή ErbB-1. Η EGFR υπερεκφράζεται στα κύτταρα συγκεκριμένων τύπων ανθρώπινων καρκινωμάτων, όπως για παράδειγμα, στον NSCLC και στους καρκίνους των πνευμόνων. Ο NSCLC είναι πολύ ανεχτικός και μεταστατικός καρκίνος. Αυτό οδηγεί σε ανάρμοστη ενεργοποίηση του αντι-αποπτωτικού αλυσίδας μετάδοσης σήματος RAS, καταλήγοντας σε μη-



ελεγχόμενο πολλαπλασιασμό των κυττάρων. Έρευνα σε ευαίσθητους στο Gefitinib ασθενείς με μη μικροκυτταρικό καρκίνο των πνευμόνων έδειξε ότι η μετάλλαξη στην περιοχή της κινάσης της τυροσίνης της EGFR ευθύνεται για την ενεργοποίηση αντι-αποπτωτικών μονοπατιών. Αυτές οι μεταλλάξεις τείνουν να προσδίδουν αυξημένη ευαισθησία στους αναστολείς της κινάσης της τυροσίνης όπως είναι το Gefitinib και το Erlotinib (Εικόνα 11)<sup>28</sup>.



**Εικόνα 11:** Οι αναστολείς της κινάσης της τυροσίνης Gefitinib και Erlotinib.



**Εικόνα 12: a** : Απλοποιημένο παράδειγμα της μετάδοσης σήματος μέσω του επιδερμικού αυξητικού παράγοντα υποδοχέα (EGFR). Με την πρόσδεση στον υποδοχέα αυτός διμερίζεται. Αυτό οδηγεί στην αυτοφωσφορυλίωση του υποδοχέα, η οποία αναστέλλεται από το Gefitinib. **b** : Δομή του Gefitinib και η in vitro ανασταλτική του δραστηριότητα εναντίων διαφόρων κινάσεων της τυροσίνης. Το Gefitinib αρχικά αναγνωρίστηκε από μελέτες δομής-δραστηριότητας βασισμένες σε μία αρχική σειρά 4-ανιλνοκιναζολινο (4-anilinoquinazoline). MAPK, μιτογενώς ενεργοποιημένη πρωτεϊνική κινάση, TGF, αυξητικός παράγοντας, TK, περιοχή κινάσης της τυροσίνης<sup>28</sup>.

## **2. ΣΚΟΠΟΣ**

Η ανάγκη για την εύρεση νέων χημειοθεραπευτικών ουσιών με αυξημένη βιολογική δράση, ελαττωμένη τοξικότητα και λιγότερες ανοσοκατασταλτικές παρενέργειες καθώς και η ραγδαία και συνεχής ανάπτυξη της φαρμακευτικής χημείας επέτρεψε τη μελέτη, τη σύνθεση και την προώθηση στην αγορά, πληθώρας φαρμάκων τα οποία περιέχουν ως δραστική ουσία κάποιο πυρρολο ή κινοξαλινικό παράγωγο. Επιπλέον, βασιζόμενοι στο ιδιαίτερο φαρμακολογικό ενδιαφέρον αυτών των παραγώγων και θεωρώντας ότι λίγες μόνο μέθοδοι έχουν αναφερθεί για την σύνθεση των πυρρολο[2,3b]κίνοξαλινών παρουσιάζεται μία νέα μέθοδος σύνθεσής τους σε δύο στάδια που πραγματοποιήθηκε τόσο με την συμβατική μέθοδο θέρμανσης όσο και με μικροκύματα.

Σκοπός αυτής της μελέτης, λοιπόν, είναι:

- Η σύνθεση των 2,3-διοξο-5-αλογονοφαίνυλο πυρρολών μέσω μιας αντίδρασης ενός σταδίου με τρία συστατικά
- Η σύζευξη των παραπάνω ενώσεων με ο-φαινυλο διαμίνη για την σύνθεση των πυρρολο[2,3b]κίνοξαλινών
- Η ταυτοποίηση των προϊόντων με φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού NMR
- Η σύγκριση της συμβατικής μεθόδου θέρμανσης και της θέρμανσης με μικροκύματα
- Η αποτίμηση της ανασταλτικής τους δράσης έναντι της διάδοσης των ελευθέρων ριζών και της εμφάνισης οξειδωτικού στρες
- Η αποτίμηση της ανασταλτικής τους δράσης έναντι μιας σειράς καρκινικών κυτταρικών σειρών

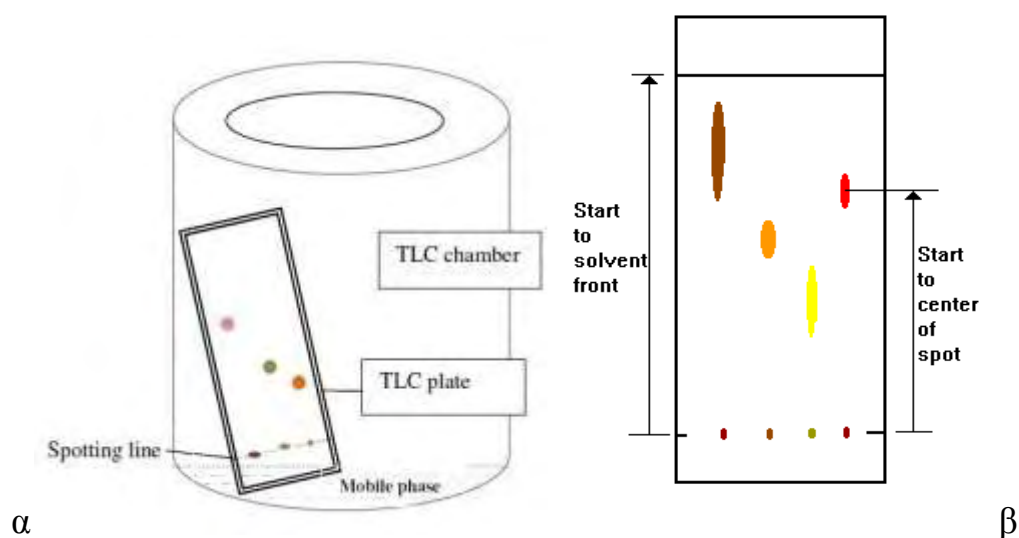
### **3. ΓΕΝΙΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ**

#### **3.1 Χρωματογραφία λεπτής στιβάδας (TLC : Thin Layer Chromatography)**

Ο έλεγχος των αντιδράσεων έγινε με τη χρήση της χρωματογραφικής μεθόδου επίπεδη χρωματογραφία λεπτής στιβάδος TLC. Πρόκειται, για πλάκες αλουμινίου επιστρωμένες με Silica gel (Merck Kieseilel 60F24) πάχους 0,2 mm.

Αυτή η λεπτή στρώση απορροφητικού αποτελεί την σταθερή (ακίνητη) φάση της τεχνικής αυτής. Χρησιμοποιώντας μολύβι (γιατί η μελάνη θα προχωρήσει με την κινητή φάση με την πρόοδο της τεχνικής) γράφεται γραμμή απόστασης περίπου 2cm από την αρχή της πλάκας, πάνω στην οποία τοποθετείται το υπό εξέταση δείγμα με τη μορφή κηλίδας. Στη συνέχεια η πλάκα τοποθετείται όρθια σε αεροστεγή θάλαμο κορεσμένο με ατμούς διαλύτη, έτσι ώστε η στάθμη του διαλύτη να μην καλύπτει τις κηλίδες του δείγματος (γιατί υπάρχει κίνδυνος διάλυσής τους) (Εικόνα 13α). Ο διαλύτης αποτελεί την κινητή φάση της τεχνικής και συνήθως χρησιμοποιείται σύστημα μίγματος δύο διαλυτών. Κατόπιν, ο διαλύτης αφήνεται να ανέλθει με τη βοήθεια του τριχοειδούς φαινομένου μέχρι το μέτωπο του διαλύτη να φτάσει λίγα εκατοστά πριν το τέλος της πλάκας, η οποία αποσύρεται από τον θάλαμο και στεγνώνεται σε ρεύμα αέρα. Επειδή διαφορετικές ουσίες ανεβαίνουν στην πλάκα με διαφορετική ταχύτητα ανάλογα με την πολικότητά τους, το δείγμα διαχωρίζεται και οι ουσίες εμφανίζονται με τη μορφή διακριτών κηλίδων κατά μήκος της πλάκας. Με βάση τη διανυθείσα απόσταση κάθε ένωσης στη στατική φάση, πραγματοποιείται και ο προσδιορισμός του συντελεστή κατακράτησης,  $R_f$ , ο οποίος ορίζεται από το λόγο: απόσταση που

διανύθηκε από την ένωση / απόσταση που διανύθηκε από τον διαλύτη (Εικόνα 13β). Η τιμή  $R_f$  μιας άγνωστης ένωσης χρησιμεύει για την ταυτοποίησή της. Τα προϊόντα στα χρωματογραφήματα ανιχνεύονται είτε ψεκάζοντας με διάλυμα  $H_2SO_4$  (θειϊκού οξέος) 30%, είτε μέσω UV ακτινοβολίας (254nm). Τα συστήματα που χρησιμοποιήθηκαν είναι τα εξής :

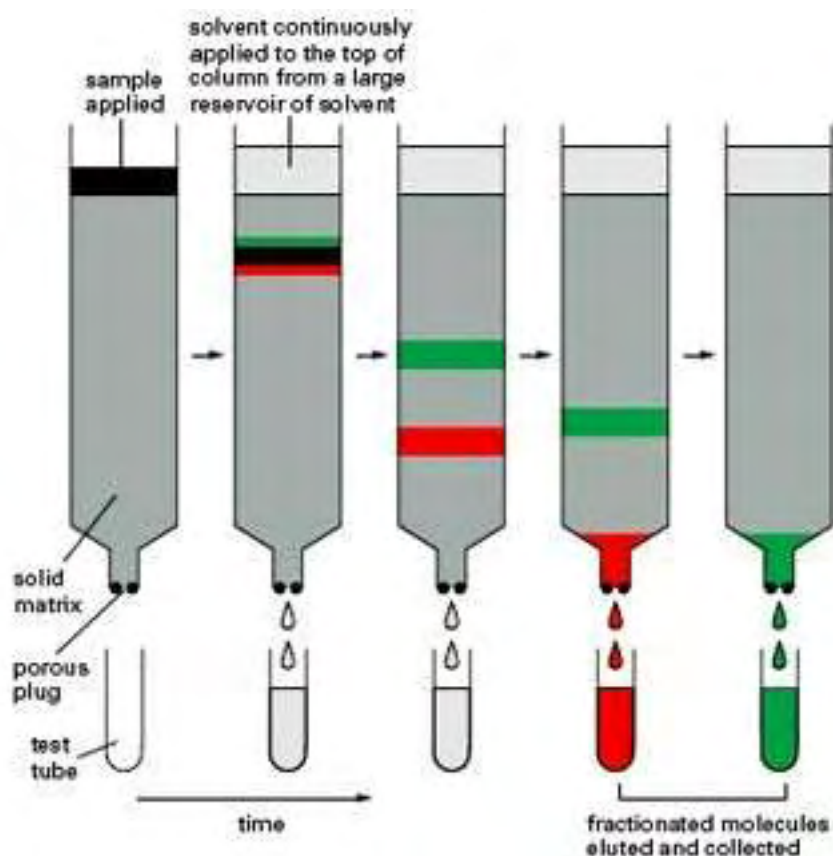


**Εικόνα 13:** α) Τρόπος τοποθέτησης πλάκας TLC σε αεροστεγή θάλαμο. β) Προσδιορισμός του συντελεστή κατακράτησης,  $R_f$ .

### 3.2 Χρωματογραφία στήλης

Η χρωματογραφία στήλης είναι η τεχνική που χρησιμοποιείται μετά την απομόνωση μιας χημικής ένωσης με σκοπό τον καθαρισμό της από παραπροϊόντα. Το επιθυμητό προϊόν διαλύεται σε σύστημα οργανικών διαλυτών συγκεκριμένης κάθε φορά αναλογίας και αφήνεται να διαρρεύσει μέσω ενός κατακόρυφου γυάλινου σωλήνα που εμπεριέχει προσροφητικό υλικό. Ο χρόνος έκλουσης μιας ουσίας επηρεάζεται άμεσα από την πολικότητά της. Μόρια με πολικές λειτουργικές ομάδες

προσροφώνται κατά κανόνα, εντονότερα και άρα μετακινούνται βραδύτερα μέσω της στατικής φάσης σε σχέση με τα περισσότερα άπολα. Η διαδικασία επιτυγχάνεται με την εισαγωγή αέρα υπό πίεση (flash chromatography) σε silica gel (240-400, Merck grade).



Εικόνα 14: Χρωματογραφία στήλης

### 3.3 Ταυτοποίηση ενώσεων

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, οι λιγότεροι, όχι. Αυτό εξαρτάται από το εάν οι πυρήνες έχουν μαγνητικές ιδιότητες, όπως αυτές αντανακλώνται στην ιδιότητα του σπιν. Όπως σε άλλους φασματοσκοπικούς κλάδους, έτσι και στη φασματοσκοπία NMR μελετάται η αλληλεπίδραση της ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας με την ύλη. Στην περίπτωση της φασματοσκοπίας NMR γίνεται χρήση του φαινομένου NMR για τη μελέτη φυσικών, χημικών και βιολογικών ιδιοτήτων της ύλης. Έτσι, η φασματοσκοπία NMR βρίσκει εφαρμογές σε πολλούς επιστημονικούς κλάδους. Η φασματοσκοπία NMR μιας διάστασης χρησιμοποιείται σχεδόν αποκλειστικά από τους χημικούς στη μελέτη της δομής χημικών ενώσεων. Τεχνικές NMR δύο ή περισσότερων διαστάσεων (πολυδιάστατο NMR) χρησιμοποιούνται για τον προσδιορισμό της δομής πολυπλοκότερων μορίων, π.χ. πρωτεϊνών. Τεχνικές NMR στο χώρο του χρόνου (πυρηνικής μαγνητική αποδιέγερση) χρησιμοποιούνται για τη μελέτη της δυναμικής ενώσεων σε διαλύματα. Τέλος, η φασματοσκοπία NMR χρησιμοποιείται ευρέως για τη μελέτη της δομής και δυναμικής ενώσεων σε στερεά κατάσταση.

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 φωτόμετρο Bruker AVAMCE<sup>III</sup> 300 και τα φάσματα  $^{13}\text{C}$ -NMR καταγράφηκαν στα 75.5MHz στο ίδιο φωτόμετρο, 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 σταθερές σύζευξης J μετρήθηκαν σε Hz.

### 3.4 Σύνθεση με χρήση συσκευής μικροκυμάτων

Όλα τα πειράματα με τη χρήση μικροκυμάτων διεξήχθησαν σε μία ειδική CEM-Explorer και CEM Discover monomode συσκευή μικροκυμάτων(εικόνα 15), που λειτουργεί σε συχνότητα 2,45 GHz με συνεχή ισχύ ακτινοβολίας 0-300 W με τη χρήση προτύπου επιπέδου απορρόφησης μέγιστης ισχύς 300 W . Οι αντιδράσεις διεξήχθησαν σε γυάλινους σωλήνες των 10 mL, σφραγίστηκαν με ένα διάφραγμα από Teflon και τοποθετήθηκαν στην συσκευή των μικροκυμάτων. Αρχικά, χρησιμοποιήθηκε η απαιτούμενη ισχύς μικροκυματικής ακτινοβολίας και η θερμοκρασία ανυψώθηκε από την θερμοκρασία δωματίου έως την επιθυμητή θερμοκρασία. Μόλις αυτό επιτεύχθηκε το μίγμα της αντίδρασης διατηρήθηκε στη θερμοκρασία αυτή για τον απαιτούμενο χρόνο. Το μίγμα της αντίδρασης αναδεύονταν συνεχώς κατά την διάρκεια της αντίδρασης. Η θερμοκρασία μετρήθηκε με ένα αισθητήρα υπερύθρων και μετά την περίοδο ακτινοβολήσης, το δοχείο της αντίδρασης ψύχεται ταχέως σε θερμοκρασία περιβάλλοντος με μια δέσμη ψυχρού αερίου.

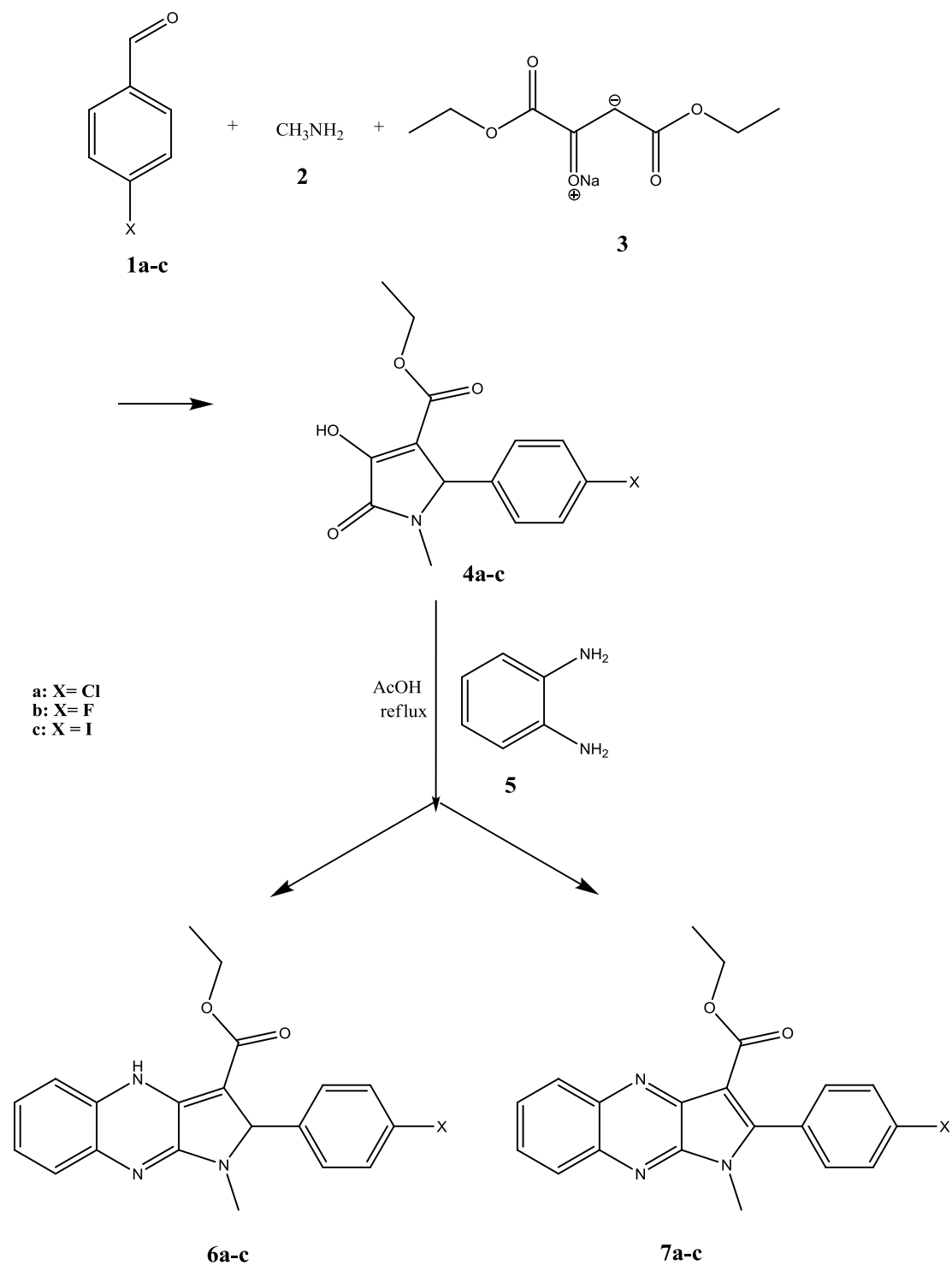


**Εικόνα 15.** Συσκευή μικροκυμάτων



## 4. Πειραματικό μέρος

### 4.1 Επισκόπηση συνθετικής οδού



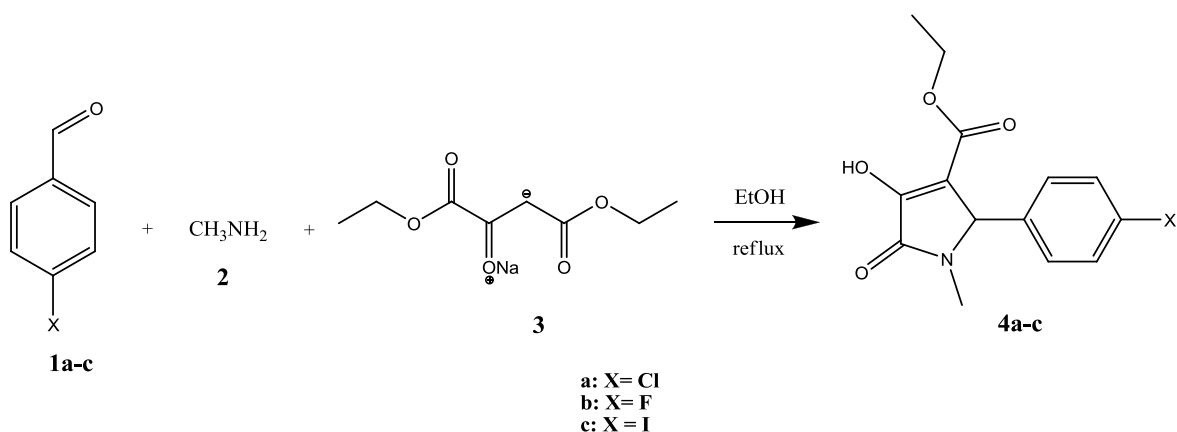
Σε αυτή την έρευνα, για τη σύνθεση των 2,3 πυρρολιδινών (πυρρολο-2-νών) μέσω μιας αντίδρασης τριών συστατικών, χρησιμοποιήθηκαν ως πρώτη ύλη

- Διαιθυλικό οξαλικό άλας του νατρίου
- Μεθυλαμίνη και
- 4-φθορο, 4-χλωρο και 4-ιωδο βενζαλδεΐδη .

Έπειτα τα προϊόντα **4a-c** του πρώτου μέρους υπέστησαν σύζευξη με ο-φαινυλο διαμίνη απ' όπου προέκυψαν έξι επιθυμητά προϊόντα **6a-c** (μη αρωματικά) και **7a-c** (αρωματικά).

#### 4.1.1 Σύνθεση του 3-υδροξυ-1-μεθυλο-2-οξο-5-(4-αλογονοφαινυλο)-2,5-διυδρο-1H-πυρρολο-3-καρβοξυλικού αιθυλεστέρα **4a-c** μέσω αντίδρασης τριών αντιδρώντων.

##### Αντίδραση:



Πρωτόκολλο:

7.11 mmol 4-βρωμο-βενζαλδεΐδης απαιτούν: 7.11 mmol μεθυλαμίνης, 7.11 mmol διαιθυλικού οξαλοξικού άλατος του νατρίου και 25 ml αιθανόλη.

**Γενική διαδικασία για την παρασκευή των 5-(4-αλογοφαινυλο)-2-οξοπυρρόλες:**

**Συμβατική μέθοδος :** Ένα διάλυμα διαιθυλικού οξαλοξικού άλατος του νατρίου (3) , μεθυλαμίνης (2), και αλδεΐδης (1) σε αιθανόλη θερμάνθηκε με επαναροή μέχρι την ολοκλήρωση της αντίδρασης (TLC). Ακολούθησε ψύξη, έπειτα το μίγμα προστέθηκε σε παγωμένο νερό και στη συνέχεια οξινίστηκε με HCl μέχρι pH 4. Το ίζημα διηθήθηκε, πλύθηκε με νερό και αιθέρα, ώστε να αφαιρεθούν τα ίχνη αλδεΐδης. Μετά από ξήρανση υπό ελαττωμένη πίεση, οι 2,3-διοξο-πυρρολιδίνες (4a-c) ελήφθησαν με επαρκή καθαρότητα ως λευκά στερεά.

**Μέθοδος ακτινοβόλησης με μικροκύματα:** Το μίγμα της αντίδρασης, όπως και στη συμβατική μέθοδο σύνθεσης, υποβλήθηκε σε ακτινοβόληση με μικροκύματα στα 100 watt και σε επαναροή μέχρι την ολοκλήρωση της αντίδρασης, η οποία παρακολουθήθηκε με TLC. Το μίγμα της αντίδρασης στη συνέχεια επεξεργάστηκε σύμφωνα με την διαδικασία που ακολουθήθηκε στη συμβατική μέθοδο.

## Αποτελέσματα

### Για R=Cl

3-υδροξυ-1-μεθυλο-2-οξο-5-(4-χλωροφαινυλο)-2,5-διυδρο-1H-πυρρολο-3-καρβοξυλικός αιθυλεστέρας (4a): m.p. 155-157 °C; Rf = 0.30 (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH, 9.5:0.5); ESI-MS (*m/z*): 296.08 ([M+H]<sup>+</sup>); <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 7.42 (d, 2H, *J* = 8.4 Hz, *o*-C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>Cl), 7.21 (d, 2H, *J* = 8.4 Hz, *m*-C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>Cl), 5.19 (s, 1H, CH, pyrrole), 3.99 (q, 2H, *J* = 7.4 Hz, OCH<sub>2</sub>), 2.65 (s, 3H, NCH<sub>3</sub>), 1.06 (t, 3H, *J* = 7.1 Hz, CH<sub>3</sub>); <sup>13</sup>C NMR (100 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 183.22, 165.18, 163.29, 141.45, 135.17, 130.11, 129.27, 107.39, 65.97, 56.02, 34.27, 13.99; IR (KBr, cm<sup>-1</sup>): 1673 (C=O); Anal. calcd. for C<sub>14</sub>H<sub>14</sub>ClNO<sub>4</sub>: C, 56.86; H, 4.77; Cl, 11.99; N, 4.74. Found: C, 56.54; H, 4.88; Cl, 12.17; N, 4.49.

### Για R=F

3-υδροξυ-1-μεθυλο-2-οξο-5-(4-φθοροφαινυλο)-2,5-διυδρο-1H-πυρρολο-3-καρβοξυλικός αιθυλεστέρας (4b): m.p. 136-138 °C; Rf = 0.45 (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH, 9.8:0.2); ESI-MS (*m/z*): 280.11 ([M+H]<sup>+</sup>); <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 7.16-7.04 (m, 4H, aromatic), 4.99 (s, 1H, CH, pyrrole), 4.14 (q, 2H, *J* = 7.1 Hz, OCH<sub>2</sub>), 2.81 (s, 3H, NCH<sub>3</sub>), 1.14 (t, 3H, *J* = 7.1 Hz, CH<sub>3</sub>); <sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 184.53, 165.80, 161.19, 158.45, 133.95, 130.72, 117.19, 106.23, 63.49, 49.87, 30.63, 17.06; IR (KBr, cm<sup>-1</sup>): 1693 (C=O); Anal. calcd. for C<sub>14</sub>H<sub>14</sub>FNO<sub>4</sub>: C, 60.21; H, 5.05; F, 6.80; N, 5.02. Found: C, 59.98; H, 5.22; F, 6.44; N, 5.32.

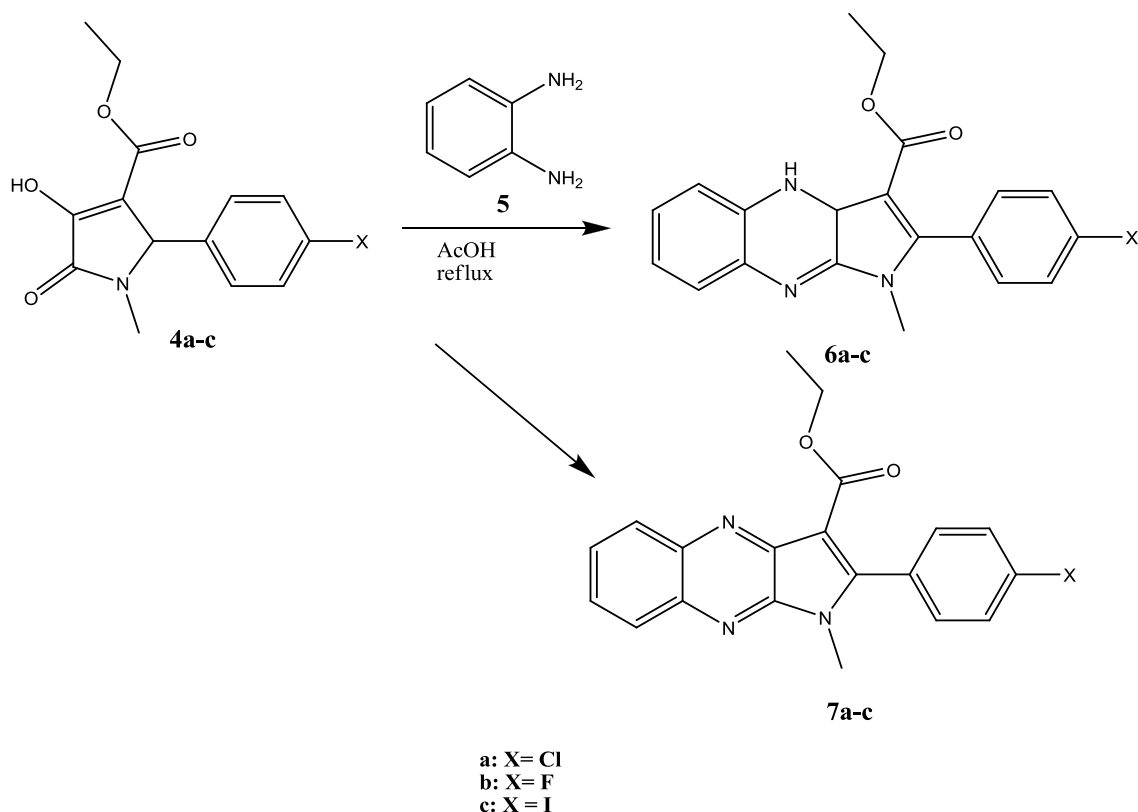
### Για R=I

3-υδροξυ-1-μεθυλο-2-οξο-5-(4-ιωδοφαινυλο)-2,5-διυδρο-1H-πυρρολο-3-καρβοξυλικός αιθυλεστέρας (4c): m.p. 146-148 °C; Rf = 0.45

(CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH, 9.8:0.2); ESI-MS (*m/z*): 388.00 ([M+H]<sup>+</sup>); <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 7.69 (d, 2H, *J* = 8.2 Hz, *o*-C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>Cl), 6.92 (d, 2H, *J* = 8.2 Hz, *m*-C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>Cl), 4.94 (s, 1H, CH, pyrrole), 4.17 (q, 2H, *J* = 7.1 Hz, OCH<sub>2</sub>), 2.81 (s, 3H, NCH<sub>3</sub>), 1.16 (t, 3H, *J* = 7.1 Hz, CH<sub>3</sub>); <sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 185.81, 164.53, 161.96, 140.03, 138.88, 133.63, 112.12, 95.84, 58.72, 49.09, 30.31, 12.98; IR (KBr, cm<sup>-1</sup>): 1693 (C=O); Anal. calcd. for C<sub>14</sub>H<sub>14</sub>INO<sub>4</sub>: C, 43.43; H, 3.64; I, 32.78; N, 3.62. Found: C, 43.08; H, 3.83; I, 32.51; N, 4.01

**4.1.2 Σύνθεση του αιθυλο-2-(4-αλογονοφαινυλοφαινυλο)-2,4-διυδρο-1-μεθυλο-1H-πυρρολο[2,3-b]κινόξαλινο-3-καρβοξυλικού αιθυλεστέρα 6a-c και του αιθυλο-2-(4-αλογονοφαινυλοφαινυλο)-1-μεθυλο-1H-πυρρολο[2,3-b]κινόξαλινο-3-καρβοξυλικού αιθυλεστέρα 7a-c μέσω σύζευξης του 3-υδροξυ-1-μεθυλο-2-οξο-5-(4-αλογονοφαινυλο)-2,5-διυδρο-1H-πυρρολο-3-καρβοξυλικού αιθυλεστέρα 4a-c.**

Αντίδραση:



**Γενική διαδικασία για την σύνθεση του αιθυλο-2-(4-αλογοφαινυλοφαινυλο)-2,4-διυδρο-1-μεθυλο-1H-πυρρολο[2,3-b]κινόξαλινο-3-καρβοξυλικού αιθυλεστέρα (6a-c) και του αιθυλο-2-(4-αλογοφαινυλοφαινυλο)-1-μεθυλο-1H-πυρρολο[2,3-b]κινόξαλινο-3-καρβοξυλικού αιθυλεστέρα(7a-c):**

**Συμβατική μέθοδος:** Ένα μίγμα της 5-(4-αλογοφαινυλο)-2-οξοπυρρόλης **4a-c** (3mmol) της ο-φαινυλο-διαμίνης και του οξικού οξέος (40ml) θερμάνθηκε με επαναροή για μία ώρα, αραιώθηκε με τολουόλιο και συν-αποστάχθηκε πολλές φορές με τον ίδιο διαλύτη υπό συνθήκες υψηλού κενού προκειμένου να απομακρυνθούν τα ίχνη οξικού οξέος. Ο καθαρισμός με την χρήση χρωματογραφίας στήλης έδωσε τις επιθυμητές πυρρολοκινόξαλινικές ενώσεις **6a-c** και **7a-c** με αποδόσεις 39-46% και 50-58% αντίστοιχα. Με την επέκταση του χρόνου αντίδρασης σε δύο

ώρες τα αρωματικά ισομερή **7a-c** εμφάνισαν αποδόσεις 70,72 και 65% αντίστοιχα.

**Μέθοδος ακτινοβόλησης με μικροκύματα:** Το μίγμα της αντίδρασης, όπως στη συμβατική μέθοδο σύνθεσης, υποβλήθηκε σε ακτινοβόληση με μικροκύματα στα 200 watt και επαναροή μέχρι την ολοκλήρωση της αντίδρασης, η οποία παρακολούθηθηκε με TLC. Το μίγμα της αντίδρασης στη συνέχεια επεξεργάστηκε σύμφωνα με την διαδικασία που ακολουθήθηκε στη συμβατική μέθοδο.

### Αποτελέσματα

#### Για R=Cl

Αιθυλο-2-(4-χλωροφαινυλο)-1-μεθυλο-2,4-διυδρο-1H-πυρρολο[2,3b]κινολινο-3-καρβοξυλικός αιθυλεστέρας (6a):  $R_f = 0.30$  (AcOEt/Hexane, 3:7); ESI-MS ( $m/z$ ): 368.13 ( $[M+H]^+$ );  $^1H$  NMR (400 MHz,  $CDCl_3$ ):  $\delta$  11.07 (brs, 1H, NH,  $D_2O$  exchangeable), 7.34-6.78 (m, 8H, aromatic), 5.02 (s, 1H, CH, pyrrole), 3.97 (q, 2H,  $J = 7.1$  Hz,  $OCH_2$ ), 2.76 (s, 3H,  $NCH_3$ ), 1.00 (t, 3H,  $J = 7.1$  Hz,  $CH_3$ );  $^{13}C$  NMR (100 MHz,  $CDCl_3$ ):  $\delta$  168.46, 165.89, 153.27, 147.11, 136.32, 135.18, 133.27, 130.51, 130.00, 129.20, 122.17, 121.42, 117.36, 103.11, 64.71, 60.39, 32.68, 17.46; IR (KBr,  $cm^{-1}$ ): 1675 (C=O); Anal. calcd. for  $C_{20}H_{18}ClN_3O_2$ : C, 65.31; H, 4.93; Cl, 9.64; N, 11.42. Found: C, 65.54; H, 4.79; Cl, 9.45; N, 11.73.

Αιθυλο-2-(4-χλωροφαινυλο)-1-μεθυλο-2,4-διυδρο-1H-πυρρολο[2,3b]κινολινο-3-καρβοξυλικός αιθυλεστέρας (7a):  $R_f = 0.68$  (AcOEt/Hexane, 3:7); ESI-MS ( $m/z$ ): 366.18 ( $[M+H]^+$ );  $^1H$  NMR (400 MHz,  $CDCl_3$ ):  $\delta$  8.44-7.46 (m, 8H, aromatic), 4.30 (q, 2H,  $J = 7.1$  Hz,

OCH<sub>2</sub>), 3.78 (s, 3H, NCH<sub>3</sub>), 1.22 (t, 3H, *J* = 7.1 Hz, CH<sub>3</sub>); <sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 169.24, 147.81, 145.76, 138.09, 135.63, 132.24, 131.87, 130.93, 130.90, 128.11, 106.20, 62.32, 32.63, 17.09; IR (KBr, cm<sup>-1</sup>): 1698 (C=O); Anal. calcd. for C<sub>20</sub>H<sub>16</sub>ClN<sub>3</sub>O<sub>2</sub>: C, 65.67; H, 4.41; Cl, 9.69; N, 11.49. Found: C, 65.38; H, 4.20; Cl, 9.81; N, 11.66.

#### Για R=F

Αιθυλο-2-(4-φθοροφαινυλο)-1-μεθυλο-2,4-διυδρο-1H-πυρρολο[2,3b]κινολινο-3-καρβοξυλικός αιθυλεστέρας (6b): R<sub>f</sub> = 0.35 (AcOEt/Hexane, 3:7); ESI-MS (*m/z*): 352.23 ([M+H]<sup>+</sup>); <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 10.39 (brs, 1H, NH, D<sub>2</sub>O exchangeable), 7.16-6.77 (m, 8H, aromatic), 4.89 (s, 1H, CH, pyrrole), 4.04 (q, 2H, *J* = 7.0 Hz, OCH<sub>2</sub>), 1.25 (s, 3H, NCH<sub>3</sub>), 1.08 (t, 3H, *J* = 7.0 Hz, CH<sub>3</sub>); <sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 167.32, 166.14, 162.87, 156.04, 145.58, 133.78, 130.35, 130.11, 127.28, 123.32, 115.25, 114.38, 101.13, 59.41, 58.37, 29.72, 14.15; IR (KBr, cm<sup>-1</sup>): 1625 (C=O); Anal. calcd. for C<sub>20</sub>H<sub>18</sub>FN<sub>3</sub>O<sub>2</sub>: C, 68.36; H, 5.16; F, 5.41; N, 11.96. Found: C, 68.15; H, 5.47; F, 5.33; N, 11.70.

Αιθυλο-2-(4-φθοροφαινυλο)-1-μεθυλο-2,4-διυδρο-1H-πυρρολο[2,3b]κινολινο-3-καρβοξυλικός αιθυλεστέρας (7b): R<sub>f</sub> = 0.72 (AcOEt/Hexane, 3:7); ESI-MS (*m/z*): 350.17 ([M+H]<sup>+</sup>); <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 8.40-7.51 (m, 8H, aromatic), 4.29 (q, 2H, *J* = 7.1 Hz, OCH<sub>2</sub>), 3.78 (s, 3H, NCH<sub>3</sub>), 1.20 (t, 3H, *J* = 7.1 Hz, CH<sub>3</sub>); <sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 165.47, 162.77, 150.29, 142.25, 139.41, 131.89, 129.39, 128.47, 127.97, 127.02, 115.68, 103.67, 60.41, 29.69, 14.16; IR (KBr, cm<sup>-1</sup>): 1695 (C=O); Anal. calcd. for C<sub>20</sub>H<sub>16</sub>FN<sub>3</sub>O<sub>2</sub>: C, 68.76; H, 4.62; F, 5.44; N, 12.03. Found: C, 68.49; H, 4.30; F, 5.33; N, 11.67.



Για R=I

Αιθυλο-2-(4-ιωδοφαινυλο)-1-μεθυλο-2,4-διωδρο-1H-

πυρρολο[2,3b]κινόξαλινο-3-καρβοξυλικός αιθυλεστέρας (6c): Rf = 0.30 (AcOEt/Hexane, 3:7); ESI-MS ( $m/z$ ): 460.11 ( $[M+H]^+$ );  $^1H$  NMR (400 MHz,  $CDCl_3$ ):  $\delta$  10.02 (brs, 1H, NH,  $D_2O$  exchangeable), 7.53-6.78 (m, 8H, aromatic), 4.85 (s, 1H, CH, pyrrole), 4.05 (q, 2H,  $J = 6.9$  Hz,  $OCH_2$ ), 1.25 (s, 3H,  $NCH_3$ ), 1.09 (t, 3H,  $J = 6.9$  Hz,  $CH_3$ );  $^{13}C$  NMR (100 MHz,  $CDCl_3$ ):  $\delta$  168.12, 167.25, 156.33, 141.86, 144.57, 138.98, 132.16, 131.62, 125.53, 122.19, 119.70, 112.64, 94.58, 58.33, 55.41, 38.09, 16.47; IR (KBr,  $cm^{-1}$ ): 1650 (C=O); Anal. calcd. for  $C_{20}H_{18}IN_3O_2$ : C, 52.30; H, 3.95; I, 27.63; N, 9.15. Found: C, 52.58; H, 3.92; I, 27.35; N, 9.50.

Αιθυλο-2-(4-ιωδοφαινυλο)-1-μεθυλο-2,4-διωδρο-1H-

πυρρολο[2,3b]κινόξαλινο-3-καρβοξυλικός αιθυλεστέρας (7c): Rf = 0.61 (AcOEt/Hexane, 3:7); ESI-MS ( $m/z$ ): 458.11 ( $[M+H]^+$ );  $^1H$  NMR (400 MHz,  $CDCl_3$ ):  $\delta$  8.40-7.72 (m, 8H, aromatic), 4.29 (q, 2H,  $J = 7.1$  Hz,  $OCH_2$ ), 3.77 (s, 3H,  $NCH_3$ ), 1.22 (t, 3H,  $J = 7.1$  Hz,  $CH_3$ );  $^{13}C$  NMR (100 MHz,  $CDCl_3$ ):  $\delta$  169.51, 147.19, 145.72, 141.44, 136.20, 133.84, 132.96, 132.28, 129.25, 127.92, 105.63, 91.48, 63.12, 36.77, 13.86; IR (KBr,  $cm^{-1}$ ): 1697 (C=O); Anal. calcd. for  $C_{20}H_{16}IN_3O_2$ : C, 52.53; H, 3.53; I, 27.75; N, 9.19. Found: C, 52.32; H, 3.56; I, 27.94; N, 9.54.

## 5. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ

### 5.1 Σύγκριση συμβατικής και με μικροκύματα σύνθεσης

Όλες οι οργανικές αντιδράσεις που περιγράφηκαν παραπάνω πραγματοποιήθηκαν τόσο με τη συμβατική μέθοδο θέρμανσης όσο και με τη χρήση μικροκυμάτων. Ακολούθησε σύγκριση αυτών των δύο μεθόδων ως προς τον χρόνο της αντίδρασης και την απόδοση των πυρρολοκινοξαλινικών προϊόντων ( Πίνακας 1).

**Πίνακας 1.** Σύγκριση συμβατικής και με μικροκύματα σύνθεσης των ενώσεων **4a-c**, **6a-c** and **7a-c**.

Προϊόν	Συμβατική μέθοδος		Μικροκύματα			
	Χρόνος (h)	Απόδοση (%)	Χρόνος (min)	Απόδοση (%)	Θερμοκρασία (°C)	Ισχύς (W)
<b>4a</b>	4	45	20	51	110	100
<b>4b</b>	6	36	20	46	110	100
<b>4c</b>	5	48	20	52	110	100
<b>6a/7a</b>	1	46/50	3	56 (μόνο <b>6a</b> )	40	200
<b>6b/7b</b>	1	42/56	3	53 (μόνο <b>6b</b> )	40	200
<b>6c/7c</b>	1	39/58	3	50 (μόνο <b>6c</b> )	40	200
<b>7a</b>	2	70	10	74	180	200
<b>7b</b>	2	72	10	76	180	200
<b>7c</b>	2	65	10	70	180	200

Όπως φαίνεται στον παραπάνω πίνακα με την χρήση μικροκυμάτων όλα τα προϊόντα λαμβάνονται με απόδοση σε πολύ λιγότερο χρόνο (3-20 λεπτά) σε σχέση με την συμβατική μέθοδο σύνθεσης όπου απαιτούνται αρκετές ώρες (1-6) . Επίσης παρατηρούμε ότι με την χρήση μικροκυμάτων στους 40<sup>0</sup>C για 3 λεπτά παράγονται μόνο τα προϊόντα **6a-c** σε αντίθεση με την συμβατική μέθοδο όπου παράγεται μίγμα των προϊόντων **6** και **7**.

## 5.2 Αντιοξειδωτική δράση

Λόγω της πολυπαραγοντικής φύσης του οξειδωτικού στρες, τα προϊόντα **4a,b,c**, τα προϊόντα **6a,b,c** και τα προϊόντα **7a,b,c** αξιολογήθηκαν ως προς την *in vitro* αντιοξειδωτική τους δράση με τρεις διαφορετικούς τρόπους: Α) με την 1,1-διφαινυλο-2-πικρυλο-υδραζύλο (DPPH) σταθερή ελεύθερη ρίζα, Β) με την υδροξυλική ρίζα (HO $\cdot$ ) παραγόμενη από το σύστημα Fe<sup>3+</sup>/ασκορβικό οξύ και Γ) ελέγχθηκε η ικανότητά τους να αναστέλλουν την υπεροξείδωση των λιπιδίων που προκαλείται από τον παραγωγέα ελευθέρων ριζών 2,2'-αζοδις-(2-αμιδινοπροπανο) διυδροχλωρίδιο (AAPH) (Πίνακας 2).

**Πίνακας 2:** Αλληλεπίδραση-Αναγωγική Δραστικότητα% με DPPH (RA%); Ικανότητα δέσμευσης υδροξυλικών ριζών OH %; % Αναστολή της Υπεροξειδωσης των Λιπιδίων (AAPH %).

Ένωση	Clog <i>P</i> <sup>36</sup>	RA % 100 μM 20 min	RA % 100 μM 60 min	OH % 100 μM	AAPH % 100 μM
<b>4a</b>	3.15	13±0.01	15±0.8	No	88±2.1
<b>4b</b>	2.58	22±0.2	41±1.4	No	72±1.7
<b>4c</b>	3.56	42±1.1	21±1.1	No	94±2.9
<b>6a</b>	5.86	41±1.8	65±1.9	92±2.3	90±3.4
<b>6b</b>	4.32	57±1.2	59±0.8	91±3.3	73±2.4
<b>6c</b>	6.27	23±1.1	32±1.0	97±2.7	39±1.9
<b>7a</b>	4.29	23±0.8	26±0.6	No	18±0.5
<b>7b</b>	3.72	6±0.8	22±0.2	95±3.7	59±2.1
<b>7c</b>	4.70	9±0.5	17±0.3	No	No
<b>NDGA<sup>a</sup></b>	-	81±1.9	83±2.3	-	-
<b>trolox</b>	-	-	-	73±1.4	63±1.7

<sup>a</sup>**NDGA** = nordihydroguaiaretic acid; no results under the reported experimental conditions; each experiment was performed at least in triplicate and the standard deviation of absorbance was less than 10% of the mean.

Ο έλεγχος με DPPH είναι από τις πιο γνωστές, ευρέως χρησιμοποιούμενες και ακριβείς μεθόδους. Η αλληλεπίδραση των παραχθέντων μορίων με την σταθερή ελεύθερη ρίζα DPPH, παρουσιάζεται στον Πίνακα 2, συγκριτικά με έναν πολύ γνωστό αντιοξειδωτικό παράγοντα, το NDGA. Η αλληλεπίδραση αυτή δείχνει την ικανότητα ανεύρεσης ριζών σε σύστημα χωρίς σίδηρο. Την καλύτερη ικανότητα δέσμευσης ριζών παρουσίασε η ένωση **6b** τόσο στα 20 min όσο και στα 60 min, ενώ τα αποτελέσματα στα 100 μM εξαρτώνται από τον χρόνο για όλες τις ενώσεις εκτός της **4c**. Μικρή αύξηση μετά το πέρας 60 min παρατηρήθηκε για τις ενώσεις **4a**, **6b** και **7a**. Οι τιμές % των εξεταζόμενων ενώσεων αποδείχθηκαν μικρότερες από αυτές του NDGA.

Για την εκτίμηση της ικανότητας δέσμευσης υδροξυλικών ριζών των εξεταζόμενων ενώσεων, χρησιμοποιήθηκε ο ανταγωνισμός των εξεταζόμενων ενώσεων με το DMSO για τις ρίζες HO $\cdot$  του συστήματος Fe<sup>3+</sup>/ασκορβικό οξύ, εκφραζόμενος ως % αναστολή της παραγωγής φορμαλδεΰδης. Μόνο οι ενώσεις **6a**, **6b**, **6c** και **7b** παρουσίασαν πάρα πολύ καλή δραστηριότητα στα 100 μM (πιο υψηλή από αυτή του ευρέως γνωστού αντιοξειδωτικού trolox). Αντιθέτως, οι υπόλοιπες ενώσεις δεν παρουσίασαν δραστηριότητα.

Όσον αφορά στην αναστολή της υπεροξειδωσης των λιπιδίων λόγω του AAPH, σχεδόν όλες οι ενώσεις, εκτός της **7c**, ήταν επιτυχείς. Όλες οι ενώσεις εκτός από τις **6c** και **7a** επέδειξαν υψηλότερη δραστηριότητα από την αναφορική ένωση trolox, με υψηλότερη αυτή της ένωσης **4c**.

### 5.3 Αντικαρκινική δράση

Όλα τα μόρια αξιολογήθηκαν για την κυτταροτοξική 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  $IC_{50}$ , η οποία αντιπροσωπεύει τη συγκέντρωση του φάρμακου που απαιτείται για την αναστολή της κυτταρικής ανάπτυξης κατά 50%.

**Πίνακας 3.** Κυτταροστατική δράση των νέων ενώσεων

Ένωση	$CC_{50}^*$ ( $\mu$ M)		
	L1210	CEM	HeLa
<b>4a</b>	274 $\pm$ 8	175 $\pm$ 6	118 $\pm$ 26
<b>4b</b>	119 $\pm$ 1	> 250	98 $\pm$ 5
<b>4c</b>	21 $\pm$ 11	146 $\pm$ 25	5.8 $\pm$ 0.7
<b>6a</b>	43 $\pm$ 1	35 $\pm$ 2	35 $\pm$ 1
<b>6b</b>	93 $\pm$ 2	101 $\pm$ 11	72 $\pm$ 14
<b>6c</b>	51 $\pm$ 9	37 $\pm$ 1	18 $\pm$ 4
<b>7a</b>	216 $\pm$ 1	93 $\pm$ 28	54 $\pm$ 9
<b>7b</b>	176 $\pm$ 42	117 $\pm$ 51	126 $\pm$ 44
<b>7c</b>	34 $\pm$ 9	30 $\pm$ 19	32 $\pm$ 9
<b>6-Mercaptopurine</b>	2.8 $\pm$ 1.1	2.8 $\pm$ 1.3	1.1 $\pm$ 0.1
<b>6-Thioguanine</b>	0.94 $\pm$ 0.04	1.1 $\pm$ 0.3	0.38 $\pm$ 0.17

\*50% cytostatic concentration.

Καμία από τις ενώσεις που ελέγχθηκαν δεν παρουσίασε αξιόλογη αντικαρκινική δράση ( $CC_{50}$ :  $\geq 20 \mu$ M), με μόνη εξαίρεση την **4c** η οποία επέδειξε σημαντική κυτταροστατική δράση ( $CC_{50}$ : 5.8  $\mu$ M) έναντι των κυττάρων HeLa.

Όταν ελέγχθηκαν για τη δράση τους ενάντια σε μεγάλη ποικιλία ιών DNA και RNA, μόνο η ένωση **6a** ανέστειλε τον ιό της δαμαλίτιδας, σε EC50 2  $\mu$ M. Επιπλέον, οι ενώσεις **4c** και **6c** επέδειξαν αξιοσημείωτη ανασταλτική δράση ενάντια του ιού Sindbis (EC50: 4  $\mu$ M).

## **6. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ**

1. Ravichandran S., Karthikeyan E., “Microwave synthesis - A potential tool for green chemistry”. *International Journal of ChemTech Research*. **2011**, 3 (1), 466-470.
2. Gaba M., Dhingra N., “Indian Journal of Pharmaceutical Education and Research”. **2011**, 45 (2), 175-183.
3. Caddick S., Fitzmaurice R., “Microwave enhanced synthesis”. *Tetrahedron*. **2009**, 65, 3325–3355.
4. Kappe C.O., Dallinger D., “Controlled microwave heating in modern organic synthesis: Highlights from the 2004-2008 literature”. *Molecular Diversity*. **2009**, 13 (2), 71-193
5. King, E.E., Barclay, D., “Microwave-based extraction”. *Comprehensive Analytical Chemistry*. **2003**, 41, 257-300.
6. Perreux L., Loupy A., “A tentative rationalization of microwave effects in organic synthesis according to the reaction medium, and mechanistic considerations”. *Tetrahedron*. **2001**, 57 (45), 9199-9223.
7. Mazuela J., Pàmies O., Diéguez M., “Biaryl phosphite-oxazoline ligands from the chiral pool: Highly efficient modular ligands for the asymmetric Pd-catalyzed heck reaction”, *Chemistry - A European Journal*. **2010**, 16 (11), 3434-3440.
8. Kappe C.O., Dallinger D., Murphree S.S., “Practical Microwave Synthesis for Organic Chemists: Strategies, Instruments, and Protocols”. *Wiley-VCH*. **2009**.
9. Larhed M., Olofsson K., Appukkuttan P., “Microwave methods in organic synthesis”. *Springer*, **2006**.



10. Tierney J.P, Lidstrom P., "Microwave Assisted Organic Synthesis".  
*Blackwell Publishing. 2005*
11. Mehta, V. P.; Modha, S. G.; Ruijter, E.; Van Hecke, K.; Van Meervelt, L.; Pannecouque, C.; Balzarini, J.; Orru, R. V. A.; Van der Eycken, E. *J. Org. Chem.* **2011**, *76*, 2828.
12. Angela, C.; Suhey, P.; Arlene, Y.; Paredes, L.; Montecinos, L.; Llovera, L.; Rodríguez, C. *Journal of Heterocyclic Chemistry* **2008**, *45*, 1199.
13. Olayiwola, G.; Obafemi, C. A.; Taiwo, F. O. *African Journal of Biotechnology* **2007**, *6*, 777
14. Barreca, M. L.; Rao, A.; De Luca, L.; Zappala, M.; Gurnari, C.; Monforte, P.; De Clercq, E.; Van Maele, B.; Debyser, Z.; Witvrouw, M.; Briggs, J. M.; Chimirri, A. *J. Chem. Inf. Comput. Sci.* **2004**, *44*, 1450.
15. Campiani, G.; Aiello, F.; Fabbrini, M.; Morelli, E.; Ramunno, A.; Armaroli, S.; Nacci, V.; Garofalo, A.; Greco, G.; Novellino, E.; Maga, G.; Spadari, S.; Bergamini, A.; Ventura, L.; Bongiovanni, B.; Capozzi, M.; Bolacchi, F.; Marini, S.; Coletta, M.; Guiso, G.; Caccia, S. *J. Med. Chem.* **2001**, *44*, 305.
16. Guillon, J.; Moreau, S.; Mouray, E.; Sinou, V.; Forfar, I.; Fabre, S. B.; Desplat, V.; Millet, P.; Parzy, D.; Jarry, C.; Grellier, P. *Bioorg. Med. Chem.* **2008**, *16*, 9133.
17. Desplat, V.; Moreau, S.; Gay, A.; Fabre, S. B.; Thiolat, D.; Massip, S.; Macky, G.; Godde, F.; Mossalayi, D.; Jarry, C.; Guillon, J. *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.* **2010**, *25*, 204.
18. Nakhi, A.; Rahman, S.; Kishore, R.; Meda, C. L. T.; Deora, G. S.; Parsa, K. V. L.; Pal, M. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2012**, *22*, 6433.

19. Desplat, V.; Geneste, A.; Begorre, M. A.; Fabre, S. B.; Brajot, S.; Massip, S.; Thiolat, D.; Mossalayi, D.; Jarry, C.; Guillon, J. *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.* **2008**, *23*, 648.
20. Boiadjev S.E., Lightner D.A., *J. Org. Chem.*, 2005, *70*, 688-691
21. Guzman M., Hirschmann R., Holcomb R.C., Keenan T., Smith A.B., Sprengler P., Wood J.L., US Patent 5,489,692, 1996
22. Yaakob I.U., Degree of Bachelor of Science (Hons.), 2009
23. Armarego, W.L.F., 1963, "Quinazolines". *Advances in Heterocyclic Chemistry Volume 1*. *Advances in Heterocyclic Chemistry 1*. p. 253
24. Jean Renault, Michel Baron, Patrick Mailliet et al. (1981). "Heterocyclic
25. Xianghong Wu, Anne E. V. Gordon (2007). "Regioselective Synthesis of Asymmetrically Substituted 2-Quinoxalinol Salen Ligands". *J. Org. Chem.* *72* (23), 8691–8699.
26. 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
27. Noolvi M. N., Patel H. M., Bhardwaj V., Chauhan A., *Europ. Jour. Of Med. Chem.* *46*, 2011, 2327-2346
28. Ramasamy Paulmurugan, *Molecular Imaging Probes for Cancer Research*, World Scientific Publishing, 2012, Session 1, chapter1