

**ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ  
ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΣΠΟΥΔΩΝ ΓΕΝΙΚΟΥ ΤΜΗΜΑΤΟΣ  
ΚΛΑΔΟΣ ΙΙΙ  
‘ΜΕΛΕΤΗ ΚΑΙ ΑΞΙΟΠΟΙΗΣΗ ΦΥΣΙΚΩΝ ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ’**

**ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΚΑΙ ΜΕΛΕΤΗ ΒΙΟΔΡΑΣΤΙΚΩΝ  
ΣΥΣΤΑΤΙΚΩΝ ΑΡΩΜΑΤΙΚΩΝ ΦΥΤΩΝ**



**ΣΥΜΠΟΥΡΑ ΦΡΑΓΚΙΣΚΗ**

**ΓΕΩΠΟΝΟΣ**

**ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ**

**ΕΠΙΒΛΕΠΟΥΣΑ: ΚΩΝΣΤΑΝΤΙΝΟΥ ΒΙΟΛΕΤΤΑ**

**ΑΘΗΝΑ, ΔΕΚΕΜΒΡΙΟΣ 2009**

**ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ  
ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΣΠΟΥΔΩΝ ΓΕΝΙΚΟΥ ΤΜΗΜΑΤΟΣ  
ΚΛΑΔΟΣ ΙΙΙ  
‘ΜΕΛΕΤΗ ΚΑΙ ΑΞΙΟΠΟΙΗΣΗ ΦΥΣΙΚΩΝ ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ’**

**ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΚΑΙ ΜΕΛΕΤΗ ΒΙΟΔΡΑΣΤΙΚΩΝ  
ΣΥΣΤΑΤΙΚΩΝ ΑΡΩΜΑΤΙΚΩΝ ΦΥΤΩΝ**



**ΣΥΜΠΟΥΡΑ ΦΡΑΓΚΙΣΚΗ**

**ΓΕΩΠΟΝΟΣ**

**ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ**

**ΕΠΙΒΛΕΠΟΥΣΑ: ΚΩΝΣΤΑΝΤΙΝΟΥ ΒΙΟΛΕΤΤΑ**

**ΑΘΗΝΑ, ΔΕΚΕΜΒΡΙΟΣ 2009**

**ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ**  
**ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΣΠΟΥΔΩΝ ΓΕΝΙΚΟΥ ΤΜΗΜΑΤΟΣ**  
**ΚΛΑΔΟΣ ΙΙΙ**  
**‘ΜΕΛΕΤΗ ΚΑΙ ΑΞΙΟΠΟΙΗΣΗ ΦΥΣΙΚΩΝ ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ’**

**ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΚΑΙ ΜΕΛΕΤΗ ΒΙΟΔΡΑΣΤΙΚΩΝ**  
**ΣΥΣΤΑΤΙΚΩΝ ΑΡΩΜΑΤΙΚΩΝ ΦΥΤΩΝ**

**ΣΥΜΠΟΥΡΑ ΦΡΑΓΚΙΣΚΗ**  
**ΓΕΩΠΟΝΟΣ**

**Εξεταστική επιτροπή:**

**Β. Κωνσταντίνου, Καθηγήτρια (επιβλέπουσα)**

**Μ. Πολυσίου, Καθηγητής**

**Σ. Χαρουτουιάν, Καθηγητής**

**Π. Ταραντίλης, Επίκουρος καθηγητής**

**Κ. Μπεθάνης, Επίκουρος καθηγητής**

# ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Το δενδρολίβανο (*Rosmarinus officinalis*) είναι ένα από τα αρωματικά φυτά του ελλαδικού χώρου που περιέχει φαινολικά διτερπένια (καρνοσικό οξύ, καρνοσόλη), φλαβόνες καθώς και αυξημένες ποσότητες ροσμαρινικού οξέος. Πρόσφατες έρευνες έδειξαν ότι το ροσμαρινικό οξύ αναστέλλει την φωσφολιπάση  $A_2$  από το δηλητήριο του φιδιού *Bothrops jararacussu*.

Σκοπός της παρούσας μελέτης ήταν α) η απομόνωση ροσμαρινικού οξέος από δενδρολίβανο καθώς και β) η μελέτη της αλληλεπίδρασης φαινολικών οξέων και τερπενίων με την εκκριτική φωσφολιπάση  $A_2$  (GIIA sPLA<sub>2</sub>). Για τον σκοπό αυτό συλλέχθηκε δενδρολίβανο από την Άνδρο και αφού ξηράνθηκε μελετήθηκε η απομόνωση του ροσμαρινικού οξέος με εκχύλιση με  $CH_3OH:H_2O$  και με εκχύλιση με  $H_2O$ , όπου και καταλήξαμε στο συμπέρασμα ότι η εκχύλιση με  $CH_3OH:H_2O$  είναι αποτελεσματικότερη στην απομόνωση του ροσμαρινικού οξέος από την εκχύλιση με  $H_2O$ . Στα δείγματα προσδιορίστηκε η παρουσία του παραγώγου του ροσμαρινικού οξέος με τη βοήθεια της φασματοσκοπίας  $^1H-NMR$ .

Επειδή στη βιβλιογραφία αναφέρεται ότι το ροσμαρινικό οξύ παρουσιάζει αντιφλεγμονώδη δράση επιλέξαμε να μελετήσουμε την αλληλεπίδραση του με την GIIA sPLA<sub>2</sub>. Για να κατανοήσουμε καλύτερα το μηχανισμό αλληλεπίδρασης μελετήσαμε επίσης το καφεϊκό οξύ που αποτελεί πρόδρομη ένωση του ροσμαρινικού οξέος, όπως επίσης και το φερουλικό οξύ που είναι ένα μεθυλιωμένο παράγωγο του καφεϊκού οξέος. Το ροσμαρινικό οξύ έχει ένα στερεογονικό κέντρο και μελετήσαμε τόσο το (*S*) όσο και το (*R*) εναντιομερές του.

Από τα αποτελέσματα προέκυψαν τα εξής συμπεράσματα: το φερουλικό οξύ έχει παρόμοια δομή με το καφεϊκό οξύ και φαίνεται ότι αλληλεπιδρούν παρόμοια στο ενεργό κέντρο του ενζύμου και έχουν πολύ κοντινό GOLDScore Fitness. Επιπλέον παρατηρούμε μια διαφορά στο GOLDScore Fitness μεταξύ (*R*)-ροσμαρινικού οξέος και (*S*)-ροσμαρινικού οξέος με ελαφρά καλύτερο GOLDScore Fitness για το (*S*)-ροσμαρινικό οξύ.

Επίσης επειδή στην πρόσφατη βιβλιογραφία αναφέρεται ότι το ολεανολικό οξύ αναστέλλει την sPLA<sub>2</sub> και παρουσιάζει αντιφλεγμονώδη δράση μας ώθησε να το συμπεριλάβουμε στη μελέτη μας αλλά μας έδωσε πολύ μικρό GOLDScore Fitness, που δείχνει ότι η αντιφλεγμονώδης δράση του πιθανό δεν στηρίζεται στην αναστολή της φωσφολιπάσης GIIA sPLA<sub>2</sub>.

# ABSTRACT

A large number of polyphenolic compounds with antioxidant activity have been identified in *Rosmarinus officinalis*. The most abundant polyphenol compounds in rosemary plants are phenolic diterpenes (carnosic acid, carnosol), flavones and rosmarinic acid. In recent studies, rosmarinic acid inhibits GIIA sPLA<sub>2</sub> from the venom of snake *Bothrops jararacussu*.

The aims of this study were as follows: to isolate rosmarinic acid from *Rosmarinus officinalis* and to study the interactions of phenolic acids ((*R*)-rosmarinic acid, (*S*)-rosmarinic acid, ferulic acid and caffeic acid) and terpenes (oleanolic acid) with the phospholipase A<sub>2</sub> (GIIA sPLA<sub>2</sub>).

To this reason, rosemary leaves were collected from Andros, dried and ground for extraction analysis with CH<sub>3</sub>OH:H<sub>2</sub>O and H<sub>2</sub>O. The results clearly suggest that CH<sub>3</sub>OH:H<sub>2</sub>O extraction is better than H<sub>2</sub>O extraction and rosmarinic acid fraction was identified by the help of <sup>1</sup>H-NMR spectroscopy. Furthermore, ferulic and caffeic acid have similar interactions with the (GIIA sPLA<sub>2</sub>), (*S*)-rosmarinic acid has the higher GOLDScore Fitness and oleanolic has the worst score which shows us that its inflammatory action is possibly not related to the GIIA sPLA<sub>2</sub> inhibition.

*Στην οικογένειά μου,*

# ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα μεταπτυχιακή μελέτη εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Γενικής Χημείας του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών και στο Εργαστήριο Οργανικής Χημείας του Τμήματος Χημείας του Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών κατά το ακαδημαϊκό έτος 2008 – 2009 με θέμα ‘Απομόνωση και μελέτη βιοδραστικών συστατικών αρωματικών φυτών’.

Σε αυτό το σημείο θα ήθελα να ευχαριστήσω μια σειρά ανθρώπων που χωρίς τη βοήθειά τους δε θα ήταν δυνατή η εκπόνηση της παρούσας μελέτης. Ευχαριστώ θερμά την κα Βιολέττα Κωνσταντίνου για την ανάθεση της συγκεκριμένης μελέτης καθώς και για την πολύτιμη καθοδήγησή της καθόλη τη διάρκεια της εκπόνησής της όσο και κατά τη διάρκεια της συγγραφής της.

Ευχαριστίες θα ήθελα να εκφράσω και στα υπόλοιπα μέλη της εξεταστικής επιτροπής, τον κ. Μ. Πολυσίου, τον κ. Σ. Χαρουτουγιάν, τον κ. Π. Ταραντίλη και τον κ. Κ. Μπεθάνη, καθώς και σε όλα τα μέλη του Εργαστηρίου Γενικής Χημείας του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών για τη συνεργασία τους, το ευχάριστο κλίμα και τη φιλική συμπαράστασή τους.

Ευχαριστώ επίσης, τα μέλη του Εργαστηρίου Οργανικής Χημείας του Τμήματος Χημείας του Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών και ιδιαίτερα το διευθυντή του κ. Γ. Κόκοτο, καθώς επίσης τον κ. Θ. Μαυρομούστακο και τους μεταπτυχιακούς φοιτητές Μούχλη Βαρνάβα και Λημιό Δημήτρη για τη βοήθεια στη λήψη των φασμάτων NMR και για τη χρήση των προγραμμάτων μοντελοποίησης.

Ιδιαίτερα θα ήθελα να ευχαριστήσω τη συμφοιτήτριά και φίλη μου Μαρούλα Κόκοτου για την θαυμάσια συνεργασία που είχαμε.

# ΠΙΝΑΚΑΣ ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΩΝ

<b>CD<sub>3</sub>OD</b>	δευτεριωμένη μεθανόλη
<b>CONJ</b>	αλγόριθμος Βαθμιδωτής Σύζευξης
<b>D<sub>2</sub>O</b>	Δευτεριωμένο νερό
<b>DMAPP</b>	πυροφωσφορικό διμεθυλοαθύλιο
<b>DMSO</b>	(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> SO (διμεθυλοσουλφοξείδιο)
<b>DNA</b>	δεοξυριβονουκλεϊκό οξύ
<b>FPP</b>	πυροφωσφορικό φαρνεζύλιο
<b>GIIA sPLA<sub>2</sub></b>	εκκριτική φωσφολιπάση A <sub>2</sub>
<b>GPP</b>	πυροφωσφορικό γερανύλιο
<b><sup>1</sup>H-NMR</b>	φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού πρωτονίου
<b>HPLC</b>	υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης
<b>IPP</b>	πυροφωσφορικό ισοπεντενύλιο
<b>PLA<sub>2</sub></b>	φωσφολιπάση A <sub>2</sub>
<b>SD</b>	αλγόριθμος Απότομης Καθόδου
<b>SPE</b>	εκχύλιση στερεής φάσης
<b>TLC</b>	χρωματογραφία λεπτής στοιβάδος
<b>ΔH</b>	ενθαλπία
<b>ΔS</b>	εντροπία



# ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

<b>A. ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.....</b>	<b>1</b>
A.1 ΔΕΥΤΕΡΟΓΕΝΕΙΣ ΜΕΤΑΒΟΛΙΤΕΣ Η ΦΥΤΟΧΗΜΙΚΑ.....	1
A.1.1 Γενικά.....	1
A.1.2 ΠΩΣ ΛΕΙΤΟΥΡΓΟΥΝ ΤΑ ΦΥΤΟΧΗΜΙΚΑ.....	2
A.1.3 ΚΑΤΗΓΟΡΙΕΣ ΦΥΤΟΧΗΜΙΚΩΝ.....	3
A.2 ΤΕΡΠΕΝΙΑ-ΙΣΟΠΡΕΝΙΑ.....	3
A.2.1 Γενικά.....	3
A.2.2 ΒΙΟΣΥΝΘΕΣΗ ΤΩΝ ΤΕΡΠΕΝΙΩΝ.....	4
A.3 ΦΑΙΝΟΛΙΚΕΣ ΕΝΩΣΕΙΣ.....	6
A.3.1 Γενικά.....	6
A.3.2 ΦΑΙΝΟΛΙΚΑ ΟΞΕΑ.....	8
A.3.2α ΚΑΦΕΪΚΟ ΟΞΥ.....	9
A.3.2β ΦΕΡΟΥΛΙΚΟ ΟΞΥ.....	9
A.3.2γ ΡΟΣΜΑΡΙΝΙΚΟ ΟΞΥ.....	10
A.4 ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΑ ΦΥΤΑ.....	11
A.5 ΔΕΝΔΡΟΛΙΒΑΝΟ ( <i>ROSMARINUS OFFICINALIS</i> ).....	13
A.5.1 Γενικά.....	13
A.5.2 Ιστορικά.....	14
A.5.3 Φαρμακευτική δράση.....	15
A.5.4 Δόση.....	15
A.5.5 Συστατικά.....	16
A.6 ΕΙΣΑΓΩΓΗ ΣΤΗ ΜΟΡΙΑΚΗ ΜΟΝΤΕΛΟΠΟΙΗΣΗ.....	17
A.6.1 Σχεδιασμός φαρμάκων.....	17
A.6.2 Χρήσεις μοριακής μοντελοποίησης στην ανάπτυξη νέων φαρμάκων.....	18
A.7 ΒΑΣΙΚΕΣ ΑΡΧΕΣ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΜΟΝΤΕΛΟΠΟΙΗΣΗΣ.....	18
A.8 ΜΕΘΟΔΟΙ ΥΠΟΛΟΓΙΣΜΟΥ.....	21
A.8.1 ΚΒΑΝΤΟΜΗΧΑΝΙΚΗ.....	21
A.8.2 ΜΟΡΙΑΚΗ ΜΗΧΑΝΙΚΗ ( <i>Molecular Mechanics</i> ).....	21
.....	23
A.9 ΕΛΑΧΙΣΤΟΠΟΙΗΣΗ ΤΗΣ ΕΝΕΡΓΕΙΑΣ.....	25
A.9.1 ΑΛΓΟΡΙΘΜΟΙ ΠΡΩΤΗΣ ΤΑΞΗΣ.....	26
A.9.2 ΑΛΓΟΡΙΘΜΟΙ ΔΕΥΤΕΡΗΣ ΤΑΞΗΣ.....	26
A.9.3 ΜΟΡΙΑΚΗ ΠΡΟΣΔΕΣΗ.....	27
A.9.4 ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΠΟΥ ΣΥΝΤΕΛΟΥΝ ΣΤΗΝ ΕΛΑΤΤΩΣΗ ΤΗΣ ΑΥΘΟΡΜΗΤΗΣ ΣΥΜΠΛΕΞΗΣ.....	27
A.9.5 ΠΑΡΑΓΟΝΤΑΣ RMSD.....	29
A.10 ΦΩΣΦΟΛΙΠΑΣΗ A <sub>2</sub> .....	30
A.10.1 Η υπεροικογένεια των φωσφολιπασών.....	31
A.10.2 Η χαμηλή μοριακού βάρους εκκριτική φωσφολιπάση A <sub>2</sub> – Τα ισόένζυμα της κατηγορίας.....	31
A.10.3 Ανθρώπινη μη παγκρεατική εκκριτική φωσφολιπάση A <sub>2</sub> Η ομάδα IIA ( <i>Human non pancreatic secretory phospholipase A<sub>2</sub>, ntps-PLA<sub>2</sub>, Group IIA</i> ).....	31
<b>ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ.....</b>	<b>33</b>
<b>B. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.....</b>	<b>34</b>
B.1 ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΦΑΙΝΟΛΙΚΩΝ ΣΥΣΤΑΤΙΚΩΝ ΑΠΟ ΤΟ ΦΥΤΟ <i>ROSMARINUS OFFICINALIS</i> .....	34
B.1.1 Εκχύλιση δείγματος με μεθανόλη : νερό.....	34
B.1.1α Επιλογή κατάλληλου συστήματος ανάπτυξης χρωματογραφήματος λεπτής στοιβάδος του διηθήματος Δ1.....	34
B.1.1β Διαχωρισμός των συστατικών του διηθήματος Δ1 με χρωματογραφία στήλης.....	36
B.1.1γ Μετεστεροποίηση του διηθήματος Δ1.....	40
B.1.2 Εκχύλιση με νερό.....	42
B.1.2α Εκχύλιση λυοφιλιωμένου δείγματος με μεθανόλη.....	42
B.1.2β Ρητίνη τύπου Amberlite.....	44
B.2 ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑΣΗΣ ΦΑΙΝΟΛΙΚΩΝ ΟΞΕΩΝ ΚΑΙ ΤΕΡΠΕΝΙΩΝ ΜΕ ΤΗΝ ΕΚΚΡΙΤΙΚΗ ΦΩΣΦΟΛΙΠΑΣΗ A <sub>2</sub> (GIIA SPLA <sub>2</sub> ).....	46

<i>B.2.1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ</i> .....	46
<i>B.2.2 ΒΑΣΙΚΕΣ ΑΡΧΕΣ ΤΟΥ GOLD</i> .....	47
<i>B.2.3 ΕΠΙΛΟΓΗ ΤΩΝ ΠΡΟΣ ΜΕΛΕΤΗ ΦΥΣΙΚΩΝ ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ</i> .....	49
<i>B.2.4 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ</i> .....	50
B.2.4α Φερουλικό οξύ.....	51
B.2.4β Καφεϊκό οξύ .....	53
B.2.4γ ( <i>R</i> )-Ροσμαρινικό οξύ.....	55
B.2.4δ ( <i>S</i> )-Ροσμαρινικό οξύ.....	58
B.2.4ε Ολεανολικό οξύ .....	61
<b>Γ. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ - ΣΥΖΗΤΗΣΗ</b> .....	<b>63</b>
Γ.1 ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΡΟΣΜΑΡΙΝΙΚΟΥ ΟΞΕΟΣ ΑΠΟ ΤΟ ΦΥΤΟ <i>ROSMARINUS OFFICINALIS</i> .....	63
Γ.2 ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑΣΗΣ ΦΑΙΝΟΛΙΚΩΝ ΟΞΕΩΝ ΚΑΙ ΤΕΡΠΕΝΙΩΝ ΜΕ ΤΗΝ ΕΚΚΡΙΤΙΚΗ ΦΩΣΦΟΛΙΠΑΣΗ A <sub>2</sub> (GIIA SPLA <sub>2</sub> ) .....	65
<b>Δ. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ</b> .....	<b>67</b>

# **A. ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ**

## **A.1 Δευτερογενείς μεταβολίτες ή φυτοχημικά**

### **A.1.1 Γενικά**

Τα φυτά, εκτός από τους υδατάνθρακες, τα λίπη και τις πρωτεΐνες, παράγουν και μια μεγάλη ποικιλία οργανικών συστατικών όπως ορμόνες, φωτοσυνθετικές χρωστικές (χλωροφύλλες, καροτενοειδή), οργανικά οξέα (καφεϊκό, φερουλικό, κουμαρικό κ.α.), κηροί, ελαστικό κόμμι, αιθέρια έλαια, αλκαλοειδή (παπαβερίνη, κοκαΐνη) κ.α. Τέτοια προϊόντα που παράγονται μόνο σε επιμέρους ιστούς ή όργανα, σε συγκεκριμένα στάδια ανάπτυξης και δεν είναι αναγκαία και απαραίτητα για την κανονική αύξηση και ανάπτυξη ενός φυτού συνήθως αναφέρονται ως δευτερογενή προϊόντα ή φυτοχημικά (Dixon 2001, Καραμπουρνιώτης 2003). Η σύνθεση των φυτοχημικών δεν ακολουθεί τους γνωστούς πρωτογενείς μεταβολικούς δρόμους που είναι όμοιοι για όλα τα φυτά. Οι δευτερογενείς μεταβολίτες είναι ουσίες που βιοσυντίθενται κατά τις μεταβολικές διαδικασίες των υδατανθράκων, των λιπών και των αμινοξέων, χρησιμοποιώντας κάποια από τα ενδιάμεσα προϊόντα ως βασικές ουσίες για τη δημιουργία των προϊόντων αυτών. Πολλά από τα φυτοχημικά έχει διαπιστωθεί ότι είναι αναγκαία και απαραίτητα συστατικά για τη βιοσύνθεση βασικών ουσιών που χρειάζονται στην αύξηση και διαφοροποίηση των φυτών, όπως για παράδειγμα οι φυτοορμόνες, οι χρωστικές, τα φυτοχρώματα και τα συνένζυμα.

Τα περισσότερα τρόφιμα περιέχουν μίγματα εκατοντάδων ή χιλιάδων φυτοχημικών ουσιών. Οι ερευνητές ανακάλυψαν ότι η κατανάλωση φυτοχημικών ουσιών ως τμήμα της διατροφής του ανθρώπου μπορεί να αποτρέψει διάφορες ασθένειες όπως τις καρδιακές παθήσεις και τον καρκίνο (Dekker, 2004; Oleszek, 2002). Ορισμένα φυτοχημικά συμβάλλουν στα φωτεινά και ζωηρά χρώματα που βρίσκονται στα φρούτα και τα λαχανικά. Είναι πλέον γνωστό ότι η κατανάλωση φρούτων και λαχανικών, ολικής αλέσεως σιτηρών/δημητριακών και φασολιών μπορεί να μειώσουν τον κίνδυνο ορισμένων τύπου καρκίνου, διαβήτη, υπέρτασης και καρδιακές παθήσεις (Vickery and Vickery, 1981; Edwards and Gatehouse, 1999; Garry et al., 2003; Kliebenstein, 2004; Oksman-Caldentey and Inze, 2004).

## A.1.2 ΠΩΣ ΛΕΙΤΟΥΡΓΟΥΝ ΤΑ ΦΥΤΟΧΗΜΙΚΑ

Οι κυριότερες λειτουργίες των φυτοχημικών είναι:

- **Αντιοξειδωτική δράση:** τα περισσότερα φυτοχημικά αναπτύσσουν αντιοξειδωτική δραστηριότητα, προστατεύοντας τα κύτταρά μας από την οξείδωση και επιβραδύνοντας τη διαδικασία της γήρανσης και μειώνοντας τον κίνδυνο ορισμένων εκφυλιστικών ασθενειών, όπως είναι οι διάφοροι τύποι καρκίνου, τα καρδιαγγειακά νοσήματα και ο διαβήτης. Τα κυριότερα φυτοχημικά με αντιοξειδωτική δραστηριότητα είναι: τα σουλφίδια (κρεμμύδια, πράσα, σκόρδο), τα καροτενοειδή (φρούτα, καρότα), τα φλαβονοειδή (φρούτα, λαχανικά) και οι πολυφαινόλες (τσάι, σταφύλια) (Colic and Pavellic, 2000, Giovanelli et al., 2000, Shankel et al., 2000).

**Παρέμβαση στο DNA:** οι κατεχίνες που βρίσκονται στο πράσινο τσάι παρεμποδίζουν την καταστροφή του DNA των κυττάρων, αποτρέποντας με αυτόν τον τρόπο τον πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων. Η καψαϊσίνη, που βρίσκεται στις πιπεριές, προστατεύει το DNA από τις καρκινογόνες ουσίες. (Anderson et al., 2001, Dufresne and Farnworth, 2001, Lodovici et al., 2001, Russo et al., 2000, Shi et al., 2000).

- **Ορμονική δράση:** κυρίως τα ισοφλαβονοειδή, που βρίσκονται στη σόγια, μιμούνται τα ανθρώπινα οιστρογόνα και βοηθούν να μειώσουν τα εμμηνοπαυσιακά συμπτώματα και την οστεοπόρωση (Oleszek, 2002).

- **Υποκίνηση των ενζύμων:** τα φυτοχημικά που βρίσκονται στα λαχανικά, υποκινούν τα ένζυμα που καθιστούν τα οιστρογόνα λιγότερο αποτελεσματικά και θα μπορούσαν να μειώσουν τον κίνδυνο για τον καρκίνο του μαστού. Άλλα φυτοχημικά παρεμποδίζουν τα ένζυμα και είναι αναστολείς των πρωτεασών (σόγια και φασόλια) (Oleszek, 2002).

- **Αντιβακτηριακή και εντομοαπωθητική δράση:** το φυτοχημικό αλλισίνη που περιέχεται στο σκόρδο έχει αντιβακτηριακές ιδιότητες (Oleszek, 2002)..

- **Πρόληψη ασθενειών:** του καρκίνου, των καρδιακών παθήσεων και της οστεοπόρωσης (Oleszek, 2002).

### **A.1.3 ΚΑΤΗΓΟΡΙΕΣ ΦΥΤΟΧΗΜΙΚΩΝ**

Οι κυριότερες ομάδες φυτοχημικών περιλαμβάνουν:

ο **Τερπένια**: καροτενοειδή, κυτοκινίνες και σαπωνίνες.

ο **Φαινολικές ενώσεις**: φαινόλες και ισοφλαβόνες.

ο **Αζωτούχες ενώσεις**: αλκαλοειδή, μεταλαΐνες, θειογλυκοζίτες, κυανογόνους γλυκοζίτες, πολυαμίνες και μη πρωτεϊνικά αμινοξέα (Croteau et al., 2000; Καραμπουρνιώτης, 2003).

## **A.2 ΤΕΡΠΕΝΙΑ-ΙΣΟΠΡΕΝΙΑ**

### **A.2.1 Γενικά**

Τα τερπένια ή τερπενοειδή αποτελούν την πιο πολυάριθμη ομάδα των δευτερογενών μεταβολιτών. Τα διάφορα συστατικά της ομάδας αυτής είναι αδιάλυτα στο νερό, ενώ έχουν κοινή βιοσυνθετική προέλευση. Όλα τα τερπένια προέρχονται από τη συνένωση περισσοτέρων της μίας μονάδας ανθρακικών ενώσεων με πέντε άτομα άνθρακα (C5) που έχουν το διακλαδισμένο ανθρακικό σκελετό του ισοπρενίου ή ισοπεντανίου (C5). Η ταξινόμησή τους γίνεται ανάλογα με τον αριθμό των μονάδων που περιέχουν στο μόριό τους. Έτσι τερπένια με 10 άτομα άνθρακα στο μόριό τους ονομάζονται μονοτερπένια, ενώσεις με 3 δομικές μονάδες αποτελούν τα σεσκιτερπένια, ενώ ενώσεις με 20 άτομα άνθρακα αποτελούν τα διτερπένια (Πίνακας 1.1). Μεγαλύτερα μόρια τερπενίων είναι τα τριτερπένια (με 30 άτομα C) τα τετρατερπένια (με 40 άτομα C) και τα πολυτερπένια [με n ισοπρενικές μονάδες (C5) n >20] (Banthorpe, 1991; Καράταγλης, 1994; McGarvey and Croteau, 1995; Breitmaier, 2006).

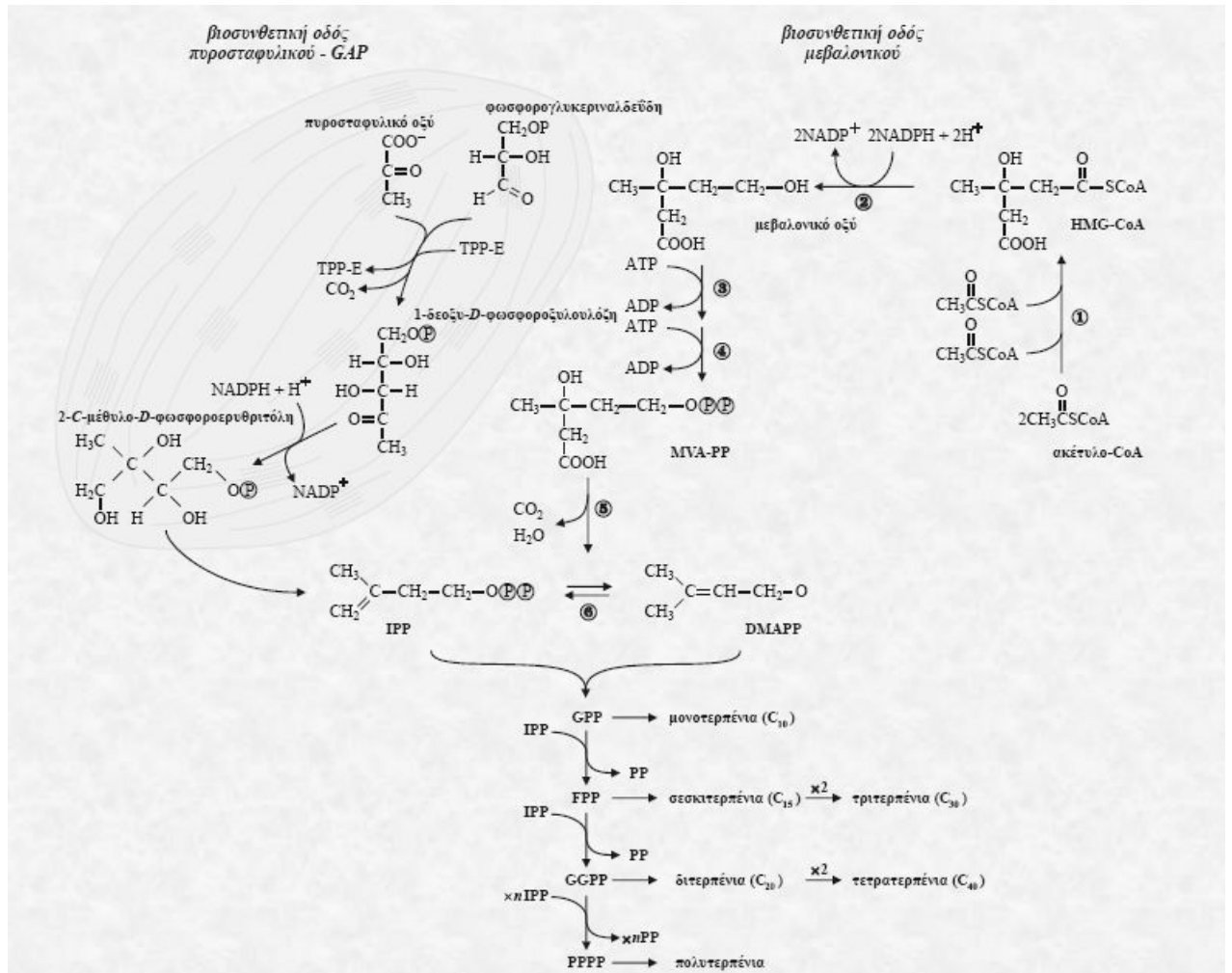
**Πίνακας 1.1 : Χαρακτηριστικοί εκπρόσωποι της ομάδας των τερπενίων**

Αριθμός ατόμων άνθρακα	Τύπος βασικού σκελετού	Κατηγορία ενώσεων	Χαρακτηριστικοί αντιπρόσωποι
5	C <sub>5</sub> H <sub>8</sub>	Ισοπρένιο	Ισοπεντενυλοφωσφορικό
10	C <sub>10</sub> H <sub>16</sub>	Μονοτερπένια	Αιθέρια έλαια
15	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub>	Σεσκιτερπένια	Αιθέρια έλαια, ρητίνες, αμψισικό οξύ
20	C <sub>20</sub> H <sub>32</sub>	Διτερπένια	Αιθέρια έλαια, ρητίνες, γιββεριλλινικό οξύ
30	C <sub>30</sub> H <sub>48</sub>	Τριτερπένια	Ρητίνες, ελαστικό κόμμι
40	C <sub>40</sub> H <sub>64</sub>	Τετρατερπένια	Καροτενοειδή, φυτοένιο
n	(C <sub>5</sub> H <sub>8</sub> ) <sub>n</sub>	Πολυτερπένια	Ελαστικό κόμμι, γουταπέρκα

### **A.2.2 ΒΙΟΣΥΝΘΕΣΗ ΤΩΝ ΤΕΡΠΕΝΙΩΝ**

Η βιοσύνθεση των τερπενίων γίνεται μέσω του μεβαλονικού μονοπατιού ή του μονοπατιού των φωσφορογλυκεραλδεΐδης / πυροσταφυλικού οξέος όπως φαίνεται στο Σχήμα 1.1 μέχρι το σχηματισμό του πυροφωσφορικού ισοπεντενυλίου (IPP) (Dubey et al., 2003; Cheng et al., 2007). Το τελευταίο μαζί με το ισομερές του, που είναι το πυροφωσφορικό διμεθυλοαλύλιο (DMAPP) είναι ενεργά C<sub>5</sub> δομικά συστατικά των τερπενίων. Στα κύτταρα, τα δύο αυτά συστατικά βρίσκονται σε ισορροπία και συνδυάζονται για να σχηματίσουν τις διάφορες ομάδες των τερπενωειδών με άτομα άνθρακα πολλαπλάσια του πέντε. Το πυροφωσφορικό ισοπεντενύλιο και το πυροφωσφορικό διμεθυλοαλύλιο αντιδρούν και δίνουν το πυροφωσφορικό γερανύλιο (GPP) που αποτελεί την πρόδρομη μορφή σχεδόν όλων των μονοτερπενίων με 10 άτομα C. Στη συνέχεια το πυροφωσφορικό γερανύλιο μπορεί να συνδεθεί με ένα άλλο μόριο πυροφωσφορικού ισοπεντενυλίου για να δώσει το πυροφωσφορικό φαρνεξύλιο (FPP) (C<sub>15</sub>), την πρόδρομη μορφή σχεδόν όλων των σεσκιτερπενίων. Το IPP είναι η πρόδρομη μορφή για τη παραγωγή

καροτενοειδών σε φυτά, ζώα και μύκητες (Καραμπουρνιώτης, 2003). Εκτός από τα φυτά η βιοσύνθεση των τερπενίων μπορεί να πραγματοποιηθεί και στο βακτήριο *E. coli*.



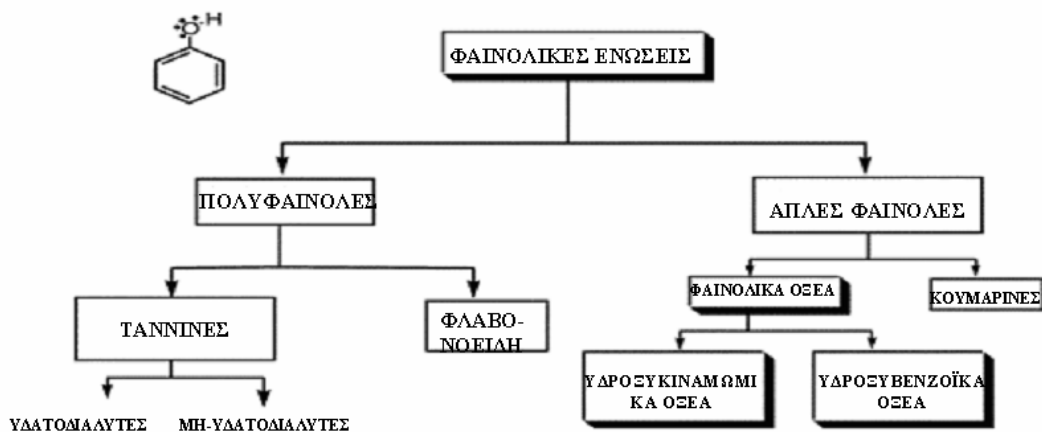
Σχήμα 1.1: Βιοσύνθεση τερπενίων με το μονοπάτι φωσφορογλυκεραλδεΐδης / πυροσταφυλικού και με το μεβαλονικό μονοπάτι (Καραμπουρνιώτης, 2003).

## **A.3 ΦΑΙΝΟΛΙΚΕΣ ΕΝΩΣΕΙΣ**

### **A.3.1 Γενικά**

Με τον όρο φαινολικές ενώσεις ή φαινολικά συστατικά εννοούμε μια κατηγορία χημικών ενώσεων των οποίων το μόριο περιλαμβάνει έναν τουλάχιστον αρωματικό δακτύλιο) που φέρει ένα ή περισσότερα υδροξύλια (Harborne and Baxter, 1999). Μέσω αντιδράσεων συμπύκνωσης, προσθήκης πολυμερισμού του βασικού αρωματικού δακτυλίου, προκύπτει ένας μεγάλος αριθμός παραγώγων. Δεδομένου ότι ο ορισμός αυτός συμπεριλαμβάνει και τις τερπενοειδείς ενώσεις είναι προτιμότερος ένας ορισμός που βασίζεται στη μεταβολική προέλευση. Φαινολικές ενώσεις θεωρούνται εκείνες που προέρχονται από τα μεταβολικά μονοπάτια του σικιμικού οξέος και του φαινυλοπροπανίου και βασικός τους ρόλος είναι η προστασία των φυτών από το φωτοσυνθετικό και το περιβαλλοντικό stress (Morton *et al.*, 2000; Cirico and Omaye, 2005). Πιο αναλυτικά, τα φαινολικά οξέα και τα φλαβονοειδή, βασικές κατηγορίες φαινολικών ενώσεων, είναι δευτερογενείς μεταβολίτες που παράγονται από τη φαινυλαλανίνη, μέσω της βιοσυνθετικής οδού του σικιμικού οξέος, από το γενικό βιοσυνθετικό μονοπάτι των φλαβονοειδών και το ειδικό μονοπάτι σύνθεσης του φαινυλοπροπανίου (Taiz and Zeiger, 1998; Harborne, 1999). Ένας τρόπος κατηγοριοποίησης των φαινολικών ενώσεων είναι ανάλογα με τον αριθμό των φαινολικών δακτυλίων που περιέχουν. Όπως δείχνει το Σχήμα 1.2 οι φαινολικές ενώσεις διακρίνονται σε απλές φαινόλες, όταν έχουν έναν φαινολικό δακτύλιο και σε πολυφαινόλες όταν έχουν δύο ή περισσότερους. Στις απλές φαινόλες ανήκουν τα φαινολικά οξέα και οι κουμαρίνες, ενώ στις πολυφαινόλες τα φλαβονοειδή και οι ταννίνες (Robins, 2003).





Σχήμα 1.2: Κατηγορίες φαινολικών συστατικών.

Σχεδόν όλα τα φυτά και πολλοί μικροοργανισμοί περιέχουν διάφορα είδη και διαφορετικές ποσότητες φαινολικών συστατικών. Τα συστατικά αυτά ίσως είναι τα πιο άφθονα από όλες εκείνες τις χημικές ενώσεις που περιλαμβάνονται στην κατηγορία των δευτερογενών μεταβολιτών. Αν εξαιρέσουμε μεμονωμένες περιπτώσεις, η λειτουργία των περισσοτέρων φαινολών είναι ασαφής. Σήμερα για τις περισσότερες γνωρίζουμε ότι είναι παραπροϊόντα του μεταβολισμού με ενεργή δραστηριότητα, όπως φυτικές ορμόνες, οξειδοαναγωγικοί συμπαράγοντες (π.χ. το συνένζυμο Q –ουβικινόνη), χρωστικές των φλαβονοειδών κ.λ.π (Krygier et al., 1982, Gerothanassis et al., 1998). Στη φύση απαντούν συχνότερα υπό την μορφή γλυκοζιτών, παρά σε ελεύθερη κατάσταση και συνεπώς πολλές φυτικές φαινόλες αποτελούν το άγλυκο τμήμα των γλυκοζιτών (Luthria and Mukhopadhyay, 2006). Το σάκχαρο που συμμετέχει μπορεί να είναι γλυκόζη, γαλακτόζη, ξυλόζη κ.α. Όλα τα φαινολικά συστατικά έχουν ένα αρωματικό δακτύλιο, ο οποίος φέρει τουλάχιστον μια υδροξυλική ομάδα συνδεδεμένη με άνθρακα του πυρήνα ή δραστικά παράγωγα, όπως καρβοξυλικές ή μεθοξυλικές ομάδες (-O-CH<sub>3</sub>), καθώς επίσης και άλλες δομές μη αρωματικού δακτυλίου. Οι πιο γνωστές φαινόλες είναι η φαινόλη, η κατεχόλη και η υδροκινόνη. Οι φυτικές φαινόλες παρουσιάζουν μια ετερογένεια ως προς τη διαλυτότητα τους, αφού μερικές είναι διαλυτές μόνο σε οργανικούς διαλύτες, μερικές είναι υδατοδιαλυτές (κυρίως καρβοξυλικά οξέα και γλυκοζίτες), ενώ άλλες είναι ισχυρά αδιάλυτες. Οι ιδιότητες αυτές προσδίδουν ιδιαίτερα χαρακτηριστικά στις

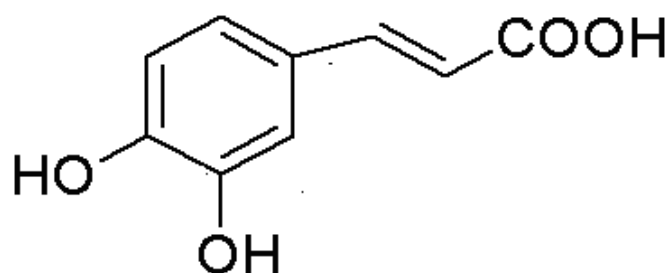
φαινόλες που ταυτόχρονα τις κάνουν να ξεχωρίζουν από τα άλλα χημικά συστατικά. Σε σχέση με τη χημική τους ποικιλότητα οι φαινόλες εκδηλώνουν διάφορους ρόλους στα φυτά ανάλογα με τις περιβαλλοντικές συνθήκες και άλλους εξωτερικούς παράγοντες (π.χ. έντομα). Μερικές έχουν αμυντικό ρόλο κατά των φυτοφάγων ζώων και των παθογόνων οργανισμών. Άλλες λειτουργούν για μηχανική υποστήριξη, άλλες για την προσέλκυση επικονιαστών και τη διασπορά των σπερμάτων, ενώ άλλες για τη μείωση της αύξησης των γειτονικών ανταγωνιστικών φυτών (Καράταγλης, 1994; Zupfer et al., 1998; Ρουμπελάκη-Αγγελάκη, 2003).

### **A.3.2 ΦΑΙΝΟΛΙΚΑ ΟΞΕΑ**

Ενδιαφέρον παρουσιάζουν οι φαινολικές ενώσεις φυτικής προέλευσης, που δεν ανήκουν στην κατηγορία των φλαβονοειδών και οι οποίες χαρακτηρίζονται από αυξημένη αντιοξειδωτική δράση. Στις ενώσεις αυτές υπάγονται τα φαινολικά οξέα τα οποία περιλαμβάνουν υδροξυ- και μεθοξυ-παράγωγα του κινναμωμικού οξέος, όπως για παράδειγμα το κουμαρικό οξύ, το καφεϊκό και το φερουλικό οξύ (Matilla et al., 2005). Οι ενώσεις αυτές εντοπίζονται σε πολλά φυτά, τόσο σε ελεύθερη μορφή όσο και ως εστέρες, αλλά και ως γλυκοζίτες. Οι ενώσεις αυτές χαρακτηρίζονται από αυξημένες αντιοξειδωτικές, αντιμικροβιακές, αντιαλλεργικές και αντικαρκινικές ιδιότητες (Manach et al., 2004). Για παράδειγμα, ο χυμός των μούρων είναι πλούσιος σε φαινολικά οξέα, τα οποία ελαττώνουν την προσκόλληση των βακτηρίων στα δόντια και έτσι ελαττώνεται η οδοντική τερηδόνα (Zadernowski et al., 2005). Αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι η γλυκιά γεύση που έχουν οι φαινολικές ενώσεις δεν επιτρέπουν να προσκολληθούν τα διάφορα βακτήρια.

Με σκοπό την εκμετάλλευση των ιδιοτήτων των φαινολικών οξέων φυτικής προέλευσης έχουν αναπτυχθεί βιοκαταλυτικές μέθοδοι για την τροποποίηση της δομής τους και την παρασκευή τόσο υδρόφιλων όσο και υδρόφοβων παραγώγων τους, μέσω αντιδράσεων εστεροποίησης και γλυκοζυλίωσης που καταλύουν εξειδικευμένες λιπάσες και γλυκοζιδάσες.

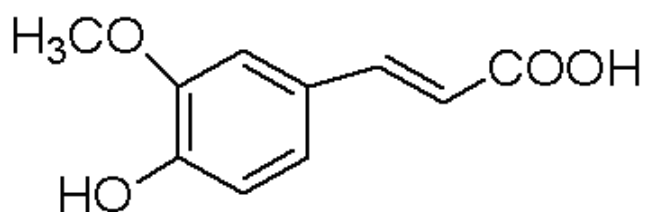
### A.3.2α ΚΑΦΕΪΚΟ ΟΞΥ



Σχήμα 1.3: Καφεϊκό οξύ

Το καφεϊκό οξύ είναι ένα υδροξυκιναμωμικό οξύ που έχει την δυνατότητα να μειώνει τη μεταλλαξιγόνο δράση των πολυκυκλικών αρωματικών υδρογονανθράκων, να συμμετέχει στην παραγωγή της βιταμίνης E και μπορεί να μειώσει τη χοληστερόλη (LDL). Ο καφές έχει αντιοξειδωτικές ιδιότητες, όταν όμως ψηθεί αυξάνεται η αντιοξειδωτική δραστηριότητα (BestBen, 2009). Το καφεϊκό οξύ στο ελαιόλαδο, βρέθηκε ότι αναστέλλει αποτελεσματικά την ανάπτυξη του καρκίνου του δέρματος σε ζώα. Επίσης έχει επιδείξει ανασταλτική δράση κατά της καρκινογένεσης στο ήπαρ και στη γλώσσα σε ζώα και καταστέλλει τις χημικώς προκληθείσες νεοπλασίες στον προστόμαχο ζώων. Τέλος, το καφεϊκό οξύ εμποδίζει την ανάπτυξη ανθρωπίνων λευχαιμικών κυτταρικών σειρών κατά τρόπο δοσοεξαρτώμενο (Πανουργιά, 2004).

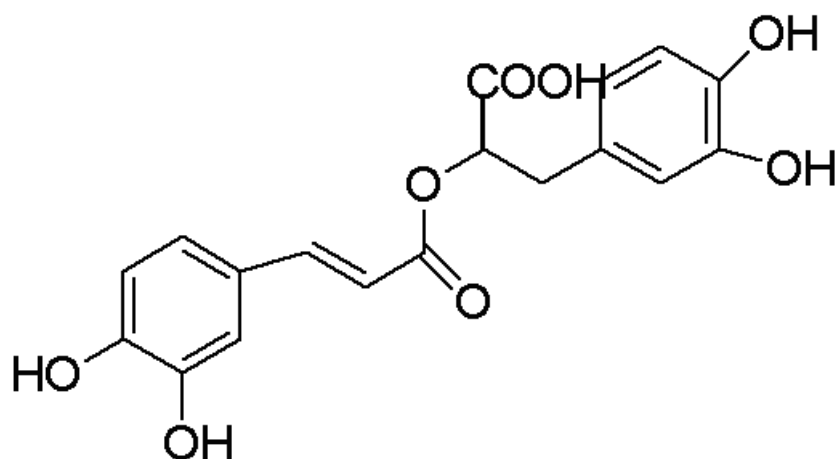
### A.3.2β ΦΕΡΟΥΛΙΚΟ ΟΞΥ



Σχήμα 1.4: Φερουλικό οξύ

Το φερουλικό οξύ είναι από τα φαινολικά οξέα χαμηλού μοριακού βάρους που βρίσκεται σε αφθονία στα σιτηρά και στα δημητριακά σε σχέση με τα υπόλοιπα φαινολικά οξέα. Ο κύριος ρόλος του είναι οι αντιμικροβιακές, καθώς και οι εντομοαπωθητικές ιδιότητές του (Zurfer et al., 1998).

### A.3.2γ ΡΟΣΜΑΡΙΝΙΚΟ ΟΞΥ



Σχήμα 1.5: Ροσμαρινικό οξύ

Το ροσμαρινικό οξύ είναι παράγωγο του καφεϊκού οξέος και καθώς έχει ένα στερεογονικό κέντρο συναντάται σε δύο μορφές ( *R* και *S*). Ελεύθερο στη φύση υπάρχει το *R* εναντιομερές. Πήρε το όνομά του από το δενδρολίβανο ( rosemary) επειδή απομονώθηκε για πρώτη φορά από το συγκεκριμένο φυτό, ενώ υπάρχει σε πολλά είδη της οικογένειας Lamiaceae. Ο κύριος ρόλος του είναι οι αντιμικροβιακές και οι αντιοξειδωτικές ιδιότητές του (Zelic et al., 2005).

## **A.4 ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΑ ΦΥΤΑ**

Για χιλιάδες χρόνια τα φάρμακα και τα καταπλάσματα γίνονταν από φυτά. Ακόμα και σήμερα αρκετά φάρμακα στηρίζονται πάνω στα φυτά και τα βότανα. Στην Ελλάδα, ζουν πάνω από 6.000 είδη φυτών κι από αυτά το ένα δέκατο περίπου είναι αποκλειστικά ελληνικά και μοναδικά στον κόσμο (Πίνακας 1.2).

Από τα πανάρχαια χρόνια, όλοι οι λαοί του κόσμου χρησιμοποιούσαν βότανα για να θεραπεύσουν τις αρρώστιες. Οι κλασικοί έλληνες συγγραφείς και γιατροί της αρχαιότητας, όπως ο Ιπποκράτης, ο Αριστοτέλης, ο Διοσκουρίδης και ο Γαληνός έγραψαν διάφορα συγγράμματα για τις θεραπευτικές ιδιότητες και τον τρόπο χρήσης των φυτών, βασισμένοι στις λαϊκές παραδόσεις της εποχής τους. Στα χρόνια του Μεσαίωνα και της Τουρκοκρατίας, η χρήση των βοτάνων ήταν πολύ διαδεδομένη στη χώρα μας, όπως και στην υπόλοιπη Ευρώπη. Οι λαϊκοί γιατροί παρέδιναν τις συνταγές προφορικά ή γραπτά, από γενιά σε γενιά κι από δάσκαλο σε μαθητή, ενώ πολλές φορές τις συνόδευαν με μάγια ή προσευχές, που καμιά θεραπευτική αξία δεν είχαν, αλλά χρησίμευαν για να δημιουργήσουν στον άρρωστο το κατάλληλο ψυχολογικό κλίμα και την πίστη ότι θα γίνει καλά. Δυστυχώς, από τις αρχές του 20<sup>ου</sup> αιώνα, η βοτανοθεραπεία άρχισε να εγκαταλείπεται και τα φυτά αντικαταστάθηκαν κατά μεγάλο μέρος από διάφορα χημικά παρασκευάσματα. Τα τελευταία χρόνια, ορισμένοι επιστήμονες από διάφορες χώρες, θέλησαν να μελετήσουν τα φυτά που φημίζονταν σαν θεραπευτικά. Μελετώντας τα λοιπόν, διαπίστωσαν γρήγορα πως περιείχαν ουσίες πραγματικά πολύτιμες για την Ιατρική. Στη συνέχεια, απομόνωσαν τις ουσίες αυτές κι έφτιαξαν διάφορα σκευάσματα, που αποδείχθηκαν πολύ πιο αποτελεσματικά από τα αντίστοιχα συνθετικά γιατί ο οργανισμός τα αφομοίωσε καλύτερα. Σήμερα κυκλοφορούν στον κόσμο εκατοντάδες φάρμακα προερχόμενα από φυτά και ολόκληρα εργοστάσια ασχολούνται με την παραγωγή σκευασμάτων από φυσικές και μόνο ουσίες. Όσον αφορά στην Ελλάδα, το ζήτημα της εκμετάλλευσης των φαρμακευτικών φυτών βρίσκεται ακόμα σε μη σωστά προγραμματισμένο στάδιο με αποτέλεσμα ορισμένα είδη να έχουν σχεδόν εξαφανισθεί από περιοχές που άλλοτε αφθονούσαν. Μόνο με συστηματική καλλιέργεια θα μπορέσει να γίνει εκτεταμένη εκμετάλλευση χωρίς καταστροφή, και προς την κατεύθυνση αυτή πρέπει να στραφεί το κράτος και οι ιδιώτες, έχοντας πάντα στο μυαλό τους το σεβασμό απέναντι στο φυσικό περιβάλλον.

Πίνακας 1.2: Κυριότερα φαρμακευτικά φυτά στην Ελλάδα

Αγγελική	Εχινάκια	Μάραθο
Βαλεριάνα	Ηλιοτρόπιο	Μήκων η υπνοφόρος
Βάλσαμο	Ιβίσκος	Μούχλα η ταπεινή
Βασιλικός	Ύταμος (ήμερο έλατο)	Μπερκιά (Κράταιγος)
Βοσουελία	Καλέντουλα	Παιωνία
Γαϊδουράγκαθο	Κίκι	Πιπερόριζα
Γαρύφαλλο	Κολιάνδρος	Ρόδι
Δάφνη	Κρόκος	Σκόρδο
Δενδρολίβανο	Κυπάρισσος	Ταραξάκο (αγριοράδικο)
Δίκταμο	Κώνειο	Τζινσένγκ
Ελιά	Λάδανο	Τσάι του βουνού
Ελλέβορος	Μανδραγόρας	Τσουκνίδα

## A.5 ΔΕΝΔΡΟΛΙΒΑΝΟ (*Rosmarinus officinalis*)



Σχήμα 1.6: Ανθισμένο δενδρολίβανο

### A.5.1 Γενικά

Το δενδρολίβανο (*Rosmarinus officinalis*) είναι ένα ξυλώδες, αειθαλές φυτό με βελονοειδή φύλλα, έντονου άρωματος πολύ χαρακτηριστικής μυρωδιάς (μυρωδιά καμφοράς) και ποικιλόχρωμα άνθη (λευκά, ροζ, πορφυρά ή μπλέ). Είναι μέλος της οικογένειας *Lamiaceae*, που περιλαμβάνει επίσης και άλλα αρωματικά φυτά, ενώ τ' όνομά του προέρχεται από το λατινικό *rosmarinus*, που σημαίνει μεταφορικά «σταγόνα της θάλασσας».

Είναι πυκνόφυλλος και πολύκλαδος θάμνος, με ύψος που δε ξεπερνά τα 2 m, ημι-αυτόφυτος σε πολλά μέρη της Ελλάδας και γενικότερα στις χώρες της Μεσογείου. Τα φύλλα του είναι δερματώδη, μικρά, γραμμοειδή και μοιάζουν με πευκοβελόνες. Η πάνω επιφάνεια των φύλλων έχει χρώμα σκούρο πράσινο και η κάτω επιφάνεια είναι ελαφρώς χνουδωτή με χρώμα λευκό ή αχνά γκριζωπό. Τα άνθη βρίσκονται κατά ομάδες και βγαίνουν στις μασχάλες των φύλλων. Δεν έχει ιδιαίτερη ανάγκη από

πότισμα, προτιμά τα ξηρά και χέρσα εδάφη, εκεί που φυτρώνει και το φασκόμηλο, το θυμάρι κλπ. και ανθίζει το καλοκαίρι (Στεφανάκη – Νικηφοράκη. 1999).

Οι τρυφεροί βλαστοί και τα φύλλα του δενδρολίβανου χρησιμοποιούνται σαν αρωματικό σε πολλά φαγητά. Από τα φύλλα του δενδρολίβανου εξάγεται ένα υγρό που χρησιμοποιείται για την παρασκευή φαρμάκου για τους ρευματισμούς, για τους διάφορους ερεθισμούς του στόματος καθώς και για το βήχα. Από τους βλαστούς εξάγεται ένα αιθέριο έλαιο που χρησιμοποιείται στην αρωματοποιία, καθώς και με κατάλληλη επεξεργασία στην παρασκευή εντομοκτόνων. Τα άνθη του προτιμώνται από τις μέλισσες και γίνονται πηγή για τη παραγωγή μελιού.

### **A.5.2 Ιστορικά**

Ονομάζεται « ο πρίγκιπας των αρωματικών φυτών ». Από τα αρχαία χρόνια το δενδρολίβανο αποτελούσε για τους λαούς της Μεσογείου σύμβολο ομορφιάς και ευεξίας, ελιξίριο της νεότητας. Είναι γνωστό ως φυσικό φάρμακο από την αρχαιότητα ακόμα, καθώς θεωρείται ότι ενισχύει και ενεργοποιεί τη μνήμη, πεποίθηση που υπάρχει και στις μέρες μας. Το δεντρολίβανο το εκτιμούσαν ιδιαίτερα στην αρχαιότητα για τις θεραπευτικές του ιδιότητες. Οι αρχαίοι Έλληνες το θεωρούσαν δώρο της Θεάς Αφροδίτης στους ανθρώπους. Διακοσμούσαν με αυτό τα αγάλματα των θεών και οι μαθητές όταν μελετούσαν το χρησιμοποιούσαν σαν στεφάνι, χάρη στην ιδιότητά του να τονώνει τη μνήμη. Οι Ρωμαίοι κρατούσαν πάντα ένα κλαράκι δεντρολίβανου κατά την διάρκεια τελετών και θρησκευτικών εορτών, μιας και θεωρείτο πως εξασφαλίζει ευτυχισμένη ζωή και ειρήνη μετά θάνατο. Για τον Χριστιανισμό είναι ιερό φυτό και χρησιμοποιείται για τους αγιασμούς όπως και ο βασιλικός. Αργότερα, κατά το μεσαίωνα, χρησιμοποιήθηκε και σε καλλυντικά σκευάσματα. Στην αρχαία Αγγλία, η ικανότητά του να ενισχύει τη μνήμη το μετέτρεψε σε σύμβολο αφοσίωσης και έπαιξε σημαντικό ρόλο σε κοστούμια, διακοσμήσεις και γαμήλια δώρα. Στην ιστορία αναφέρεται ένα ελιξίριο το οποίο κατασκευαζόταν κατόπιν απόσταξης δεντρολίβανου, κέδρου και τερεβινθίνης που μεταμόρφωσε την παράλυτη 70χρονη βασίλισσα της Ουγγαρίας σε μια ελκυστική νεαρή κοπέλα την οποία ζήτησε σε γάμο ο βασιλιάς της Πολωνίας το 1370. Το ελιξίριο αυτό ονομάστηκε "Το νερό της βασίλισσας της Ουγγαρίας".



### **A.5.3 Φαρμακευτική δράση**

Το δενδρολίβανο περιέχει ουσίες που διεγείρουν το ανοσοποιητικό σύστημα, αυξάνουν την αιματική κυκλοφορία και βελτιώνουν τη διαδικασία της πέψης. Επίσης, περιλαμβάνει αντιφλεγμονώδεις παράγοντες που μπορούν να συνεισφέρουν στη μείωση της έντασης των επεισοδίων του άσθματος.

Φαίνεται πως μπορεί να αυξήσει την αιματική κυκλοφορία στον εγκέφαλο, βελτιώνοντας τη συγκέντρωση. Μια έρευνα αποδεικνύει ότι το καρνοσικό οξύ – που περιέχεται στο δενδρολίβανο – προστατεύει τον εγκέφαλο από τις ελεύθερες ρίζες, μειώνοντας τον κίνδυνο εγκεφαλικού επεισοδίου και νευροεκφυλιστικών νόσων, όπως η νόσος Alzheimer και Gehrig (Kosaka and Yokoi, 2003).

Οι θεραπευτικές του ιδιότητες είναι πολλές και σημαντικές. Θεωρείται ιδανικό για την θεραπεία της τριχόπτωσης. Τονώνει και ενδυναμώνει το τριχωτό της κεφαλής. Ιδιαίτερα ευεργετικό για το δέρμα, αντισηπτικό και αντιβακτηριακό. Καταπολεμά δραστικά την πιτυρίδα και συμβάλλει στην ανάπτυξη της τριχοφυΐας. Για τους λόγους αυτούς, άλλωστε αποτελεί το κύριο συστατικό προϊόντων που αφορούν την περιποίηση των μαλλιών.

Πάντα σε σωστή δοσολογία και με τη γνώμη ειδικού αποτελεί καθαρτικό του αίματος και ιδιαίτερα ευεργετικό στοιχείο στην καταπολέμηση των προβλημάτων του άσθματος και της αναπνοής.

Χρησιμεύει για τους νευρικούς πονοκεφάλους και τις ημικρανίες. Τα μάνια με αφέψημα δενδρολίβανου βοηθούν όσους υποφέρουν από ρευματισμούς στις αρθρώσεις. Ανεβάζει τη διάθεση, είναι τονωτικό και βοηθάει στην αδυναμία και στην υπερκόπωση.

### **A.5.4 Δόση**

Όπως όλα τα βότανα, το δενδρολίβανο είναι γενικά ασφαλές σε μαγειρικές ή θεραπευτικές δόσεις, αν και χρειάζεται προσοχή από όσους υποφέρουν από αλλεργίες ή επιληπτικές κρίσεις. Το αιθέριο έλαιο που περιέχεται στα φύλλα και τα λουλούδια του, μπορεί σε μικρές ποσότητες να προκαλέσει το θάνατο. Βέβαια για να παραχθεί αυτή η ποσότητα χρειάζεται πολύ μεγάλες ποσότητες του φυτού. Πρέπει να γνωρίζει

κανείς τη χρήση του και να αποφεύγει τις υπερβολές παρόλο που είναι εξαιρετικά τονωτικό και διεγερτικό και συνίσταται σε όσους κουράζονται πολύ -σωματικά και πνευματικά. Στα χωριά το χρησιμοποιούσαν ως "εκτριωτικό" για αυτό θα πρέπει να αποφεύγεται κατά την εγκυμοσύνη. Σαν έγχυμα για λούσιμο βοηθά κατά της αλωπεκίας, δυναμώνει και σκουραίνει τα μαλλιά και βοηθά στη λειτουργία της μνήμης. Στη μαγειρική χρησιμοποιούνται τα αποξηραμένα φύλλα και άνθη του για να νοστιμίζουν το φαγητό. Στην οиноποιία αρωματίζει μερικά βερμούτ και άλλα αρωματικά κρασιά. Το αιθέριο έλαιο δενδρολίβανου είναι πιθανόν τοξικό αν καταναλωθεί, ενώ μεγάλες ποσότητες φύλλων του μπορούν να έχουν ανεπιθύμητες ενέργειες (κόμα, σπασμούς, εμετός και πνευμονικό οίδημα).

#### **A.5.5 Συστατικά**

Διατροφικά, το δενδρολίβανο είναι πολύ πλούσιο σε φυτικό σίδηρο, ασβέστιο και βιταμίνη B6, ενώ είναι επίσης καλή πηγή φυτικών ινών. Το φρέσκο δενδρολίβανο περιέχει 25% περισσότερο και 40% λιγότερο ασβέστιο και σίδηρο συγκριτικά με το αποξηραμένο, πιθανότατα λόγω του υψηλότερου ποσοστού υγρασίας του. Σύμφωνα με τους Bano et al. (2003) ύστερα από εκχύλιση με DMSO και με τη βοήθεια HPLC ανάλυσης σε δενδρολίβανο βρέθηκαν φαινολικά διτερπένια (καρνοσικό οξύ, καρνοσόλη), αυξημένες ποσότητες ροσμαρινικού οξέος και φλαβόνες. Σε αντίστοιχη έρευνα που έγινε στο Χαροκόπειο Πανεπιστήμιο Αθηνών από την Μπαλαμώτη (2004), οι κυριότερες πολυφαινόλες που προσδιορίστηκαν σε αφεψήματα δενδρολιβάνου, μετά την παραλαβή τους με μεθανόλη ή οξικό αιθυλεστέρα και τον προσδιορισμό τους με τη βοήθεια συνδυασμού SPE και HPLC ανάλυσης, ήταν το γαλλικό οξύ, η απιγενίνη, το π-OH-βενζοϊκό οξύ, η επικατεχίνη και το π-κουμαρικό οξύ.

## **A.6 ΕΙΣΑΓΩΓΗ ΣΤΗ ΜΟΡΙΑΚΗ ΜΟΝΤΕΛΟΠΟΙΗΣΗ**

### **A.6.1 Σχεδιασμός φαρμάκων**

Ο σχεδιασμός φαρμακευτικών ουσιών με τη βοήθεια Η/Υ αποτελεί μία από τις βασικές μεθόδους ανακάλυψης των φαρμάκων (Μαυρομούστακος και Ζουμπουλάκης, 2008).

Μια θεμελιώδης υπόθεση στο σχεδιασμό φαρμάκων είναι ότι η φαρμακευτική δράση επιτυγχάνεται με την πρόσδεση ενός μορίου, μικρού συνήθως μεγέθους που ονομάζεται προσδέτης (ligand), στην κοιλότητα ενός άλλου μορίου, μεγαλύτερου συνήθως μεγέθους, που ονομάζεται υποδοχέας (receptor). Για να γίνει αυτή η πρόσδεση μεταξύ των 2 μορίων πρέπει να εμφανίζονται χημική και γεωμετρική συγγένεια. Επομένως πρωταρχικό βήμα είναι η σχεδίαση της τρισδιάστατης δομής των μορίων. Αν ο υποδοχέας έχει γνωστή δομή γίνεται προσπάθεια να ανακαλυφθεί ο κατάλληλος προσδέτης που μπορεί να τοποθετηθεί στον υποδοχέα ώστε να ελαχιστοποιηθεί η ενεργειακή κατάσταση του συμπλέγματος των μορίων. Αντίθετα, στην περίπτωση που η δομή του υποδοχέα είναι άγνωστη γίνεται προσπάθεια να αναγνωριστεί η περιοχή πρόσδεσης, το τμήμα δηλ. εκείνο του μορίου που είναι υπεύθυνο για τη φαρμακευτική του δράση. Έχοντας καθορίσει το σύμπλεγμα μορίων που αλληλεπιδρούν (υποδοχέας – προσδέτης) το επόμενο βήμα εστιάζεται στη μελέτη της διαμόρφωσης του συμπλέγματος στο χώρο. Η αναζήτηση της βέλτιστης στερεοδομής στοχεύει στον καθορισμό της δομής του συμπλέγματος που εμφανίζει την ελάχιστη ενέργεια.

Απώτερος σκοπός είναι η σχεδίαση φαρμάκων με τη βοήθεια Η/Υ που να περιλαμβάνει τη βελτιστοποίηση φαρμακοφόρων τμημάτων (με σκοπό την ελαχιστοποίηση των παρενεργειών, όπως η τοξικότητα) καθώς και τη σχεδίαση εκ νέου μορίων που μπορούν να προσδένονται σε συγκεκριμένους υποδοχείς για να λειτουργούν ως ανταγωνιστές ή αναστολείς.

## A.6.2 Χρήσεις μοριακής μοντελοποίησης στην ανάπτυξη νέων φαρμάκων

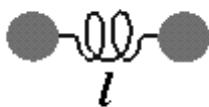
Η χρήση Μοριακών Μοντέλων περιλαμβάνει:

1. τη δόμηση της τρισδιάστατης δομής των προς μελέτη μορίων,
2. την εύρεση ευνοικών διαμορφωμερών τα οποία έχουν μεγαλύτερη πιθανότητα να συμπίπτουν με τη βιοδραστική διαμόρφωσή τους με τη βοήθεια θεωρητικών και πειραματικών δεδομένων,
3. την εύρεση χαρακτηριστικών των μορίων όπως η ηλεκτρονιακή πυκνότητα, ο όγκος, η ακτίνα κλπ.,
4. υπέρθεση μορίων με ποικίλη βιοδραστικότητα ώστε να προσδιοριστούν τα τμήματα με τη φαρμακευτική δράση,
5. αλληλεπιδράσεις με το βιοδραστικό τους κέντρο το οποίο μπορεί να είναι ένζυμο, υποδοχέας ή το DNA,
6. ποσοτικές σχέσεις μεταξύ των φυσικοχημικών παραμέτρων των φαρμακευτικών ουσιών όπως είναι το μέγεθός τους, η λιποφιλικότητά τους και η πιθανή βιοδραστικότητά τους.

## A.7 ΒΑΣΙΚΕΣ ΑΡΧΕΣ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΜΟΝΤΕΛΟΠΟΙΗΣΗΣ

Για να βρεθεί η διαμόρφωση μιας ένωσης, γνωστής δομής, που είναι ενεργειακά πιο σταθερή πρέπει να σχεδιάσουμε την τρισδιάστατη (3D) μορφή της και να προχωρήσουμε στην ελαχιστοποίηση της ενέργειας. Σημαντικές παράμετροι κατά τη διεργασία της ενεργειακής ελαχιστοποίησης είναι οι ακόλουθες:

Το μήκος των δεσμών των ατόμων



Σχήμα 1.7: Μήκος δεσμού ατόμων (l)

Η επιλογή του μήκους των δεσμών που συνδέει 2 άτομα, της απόστασης δηλ. 1, αποτελεί σημαντική παράμετρο στον καθορισμό της βέλτιστης διαμόρφωσης (Σχήμα 1.7). Η επιλογή του αντίστοιχου μήκους δεσμού μεταξύ 2 ατόμων (σε συνδυασμό πάντα και με το είδος του υπό εξέταση μορίου) επηρεάζει τη τιμή της υπολογιζόμενης ενέργειας του μορίου.

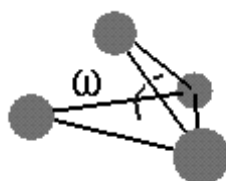
Η γωνία των δεσμών των ατόμων



Σχήμα 1.8: Γωνία ( $\theta$ ) δεσμού ατόμων

Προκειμένου να ορισθεί η γωνία  $\theta$  μεταξύ 2 ατόμων χρειάζονται 3 σημεία (Σχήμα 1.8). Η επιλογή της αρχικής γωνίας (αν είναι οξεία ή αμβλεία) επηρεάζει τη τελική διαμόρφωση.

Οι διέδρες γωνίες



Σχήμα 1.9: Διέδρη γωνία ( $\omega$ )

Μια διέδρη γωνία  $\omega$  ορίζεται από 3 συνεχόμενους δεσμούς ή αλλιώς από 4 συνεχόμενα άτομα (Σχήμα 1.9). Η μεταβολή των διέδρων γωνιών συμβάλλει στη μεταβολή της συνολικής ενέργειας.

Οι μη δεσμικές αλληλεπιδράσεις



Σχήμα 1.10: Δυνάμεις Van der Waals

Εκφράζουν την αλληλεπίδραση μεταξύ ατόμων που αν και δεν είναι γειτονικά αναπτύσσουν μεταξύ τους δυνάμεις που επηρεάζουν τη δομή μορίων όπως οι δυνάμεις Van der Waals (Σχήμα 1.10), καθώς επίσης και στερεοχημικές και ηλεκτροστατικές δυνάμεις (Σχήμα 1.11). Η ενεργειακή ισορροπία του μορίου επηρεάζεται από τις μη δεσμικές αλληλεπιδράσεις.



Σχήμα 1.11: Ηλεκτροστατικές δυνάμεις

## **A.8 ΜΕΘΟΔΟΙ ΥΠΟΛΟΓΙΣΜΟΥ**

Οι διάφορες διαδικασίες που διενεργούνται στη μοριακή μοντελοποίηση περιλαμβάνουν τη χρήση προγραμμάτων ή αλγορίθμων που υπολογίζουν τη διαμόρφωση του εξεταζόμενου μορίου καθώς και ορισμένες ιδιότητες των δομών του, π.χ. ενεργειακό ελάχιστο, φορτίο.

Οι δύο βασικές υπολογιστικές μέθοδοι που χρησιμοποιούνται για τους ενεργειακούς υπολογισμούς μπορούν να χωριστούν σε δύο κατηγορίες:

- 1) Κβαντομηχανική
- 2) Μοριακή Μηχανική

### **A.8.1 ΚΒΑΝΤΟΜΗΧΑΝΙΚΗ**

Η κβαντομηχανική χρησιμοποιεί την κβαντική φυσική για να εξετάσει την αλληλεπίδραση μεταξύ των ηλεκτρονίων και των πυρήνων του μορίου. Η κβαντομηχανική είναι πιο αργή μέθοδος σε σύγκριση με την μοριακή μηχανική. Εδώ τα άτομα δεν αντιμετωπίζονται ως σφαίρες και για να πραγματοποιηθούν οι υπολογισμοί αποιούνται προσεγγίσεις.

Αρχικά, οι πυρήνες θεωρούνται ακίνητοι και τα ηλεκτρόνια περιστρέφονται γύρω από τους σταθερούς πυρήνες, έτσι είναι δυνατό να υπολογιστεί η ηλεκτρονιακή ενέργεια χωριστά από την πυρηνική ενέργεια.

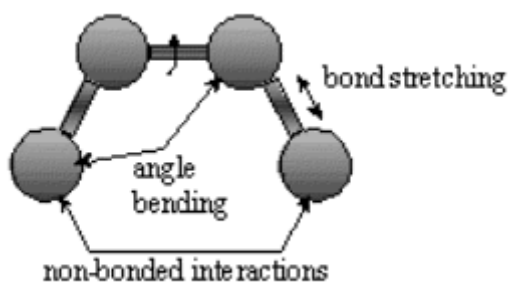
### **A.8.2 ΜΟΡΙΑΚΗ ΜΗΧΑΝΙΚΗ (Molecular Mechanics)**

Στη μοριακή μηχανική οι εξισώσεις που χρησιμοποιούνται ακολουθούν τους νόμους της κλασικής φυσικής. Η υπολογιζόμενη ενέργεια του συστήματος αποτελεί συνάρτηση μόνο των θέσεων των πυρήνων. Ουσιαστικά, το μόριο αντιμετωπίζεται ως μια σειρά από σφαίρες και οι δεσμοί ως ελατήρια. Οι εξισώσεις στη Μοριακή Μηχανική χρησιμοποιούνται για τον υπολογισμό των μεταβολών της ενέργειας που προκύπτουν από την επιμήκυνση των δεσμών, την κάμψη των γωνιών και τις μη δεσμικές αλληλεπιδράσεις.

Ο υπολογισμός της απόλυτης ενέργειας ενός μορίου στη μοριακή μηχανική δεν έχει φυσική σημασία, αλλά χρησιμοποιείται για την σύγκριση των ενεργειακών καταστάσεων των μορίων.

Μια απλή μοριακή ενεργειακή εξίσωση δίνεται από την εξίσωση:

$$\text{ΕΝΕΡΓΕΙΑ (E)} = E_{\text{Δεσμική}} + E_{\text{Κάμψης}} + E_{\text{Περιστροφής}} + E_{\text{Μη δεσμική}}$$

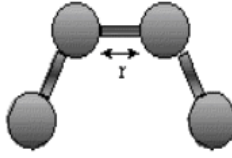
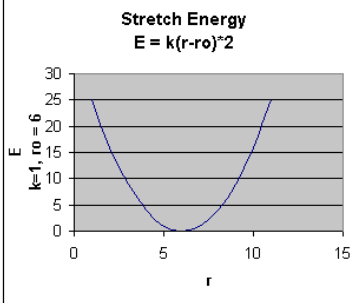
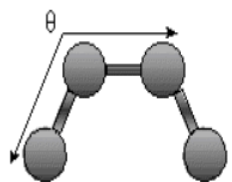
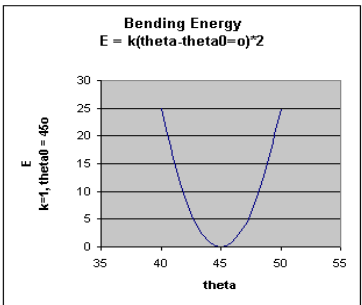
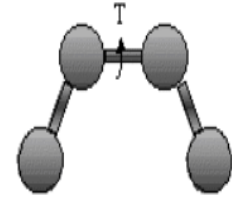
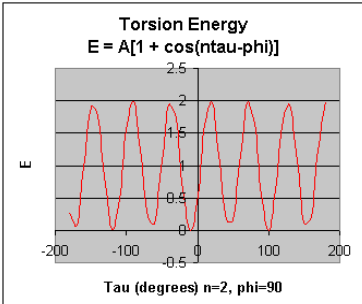
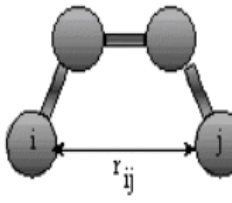
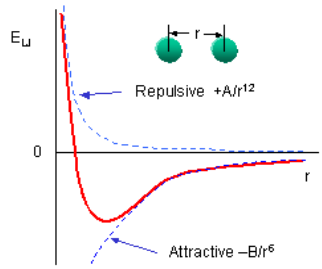


Σχήμα 1.12: Η τάση (stretch), η κάμψη (bend) και η περιστροφή (twist) ενός δεσμού.

Αναλυτικά τα είδη των ενεργειών περιγράφονται στον Πίνακα 1.4



Πίνακας 1.4: Είδη των ενεργειών, εξίσωση, σχηματική απεικόνιση και διαγράμμα (http://employees.csbsju.edu/hjakubowski/classes/ch331/protstructure/mechdynam2.html).

Τύπος ενέργειας	Εξίσωση	Σχηματική απεικόνιση	Διάγραμμα
ΕΝΕΡΓΕΙΑ ΛΟΓΩ ΔΕΣΜΙΚΩΝ ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑΣΕΩΝ (ΤΑΣΕΩΣ ΔΕΣΜΟΥ) (Stretching Energy)	$E_{\text{stretch}} = \sum_{\text{bonds}} k_b (r - r_0)^2$		
ΕΝΕΡΓΕΙΑ ΚΑΜΨΗΣ (Bending Energy)	$E_{\text{bending}} = \sum_{\text{angles}} k_{\theta} (\theta - \theta_0)^2$		
ΕΝΕΡΓΕΙΑ ΠΕΡΙΣΤΡΟΦΗΣ (Torsion Energy)	$E_{\text{torsion}} = \sum_{\text{torsions}} A [1 + \cos(\tau - \phi)]$		
ΕΝΕΡΓΕΙΑ ΛΟΓΩ ΜΗ ΔΕΣΜΙΚΩΝ ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑΣΕΩΝ (Nonbonding Energy)	$E_{\text{nonbonding}} = \sum_i \sum_j [ -A_{ij}/r_{ij}^6 + B_{ij}/r_{ij}^{12} ] + \sum_i \sum_j (q_i q_j) / r_{ij}$		

- Η εξίσωση της ενέργειας λόγω δεσμικών αλληλεπιδράσεων είναι βασισμένη στο νόμο του Hooke και σχετίζεται με τη δυνατότητα των ατόμων που συμμετέχουν σε ένα δεσμό να πλησιάσουν ή να απομακρυνθούν κατα μήκος του δεσμού τους. Η παράμετρος  $k_b$  ελέγχει την ακαμψία των δεσμών, ενώ το  $r_0$  καθορίζει το μήκος ισορροπίας του. Οι παράμετροι  $k_b$  και  $r_0$  ορίζονται βάσει του είδους των ατόμων που συμμετέχουν στον δεσμό (π.χ. C-C, C-H, O-C, κτλ.). Αυτή η εξίσωση υπολογίζει την ενέργεια βάσει της δονητικής κατάστασης για συγκεκριμένο μήκος δεσμού ισορροπίας και έχει σχήμα παραβολής (Πίνακας 1.4)
- Η ενεργειακή εξίσωση κάμψης είναι επίσης βασισμένη στο νόμο του Hooke και σχετίζεται με την κάμψη των δεσμών και την γωνία που σχηματίζουν μεταξύ τους. Η παράμετρος  $k_\theta$  ελέγχει την ακαμψία της γωνίας, ενώ η  $\theta_0$  καθορίζει την γωνία ισορροπίας. Η εξίσωση αυτή υπολογίζει την ενέργεια που συνδέεται με την δονητική κατάσταση της εκάστοτε γωνίας ισορροπίας και παρίσταται ως παραβολή (Πίνακας 1.4). Οι παράμετροι της γωνίας κάμψης ορίζονται για κάθε δεσμική τριάδα ατόμων (π.χ. C-C-C, C-O-C, C-C-H, κτλ.). Οι παράμετροι  $k_\theta$  και  $k_b$  στις εξισώσεις που δίνουν την ενέργεια λόγω δεσμικών αλληλεπιδράσεων και ενέργεια κάμψης επιδρούν στην διεύρυνση ή στην αύξηση της κλίσης της παραβολής. Όσο μεγαλύτερη η αριθμητική τιμή της  $k$ , τόσο μεγαλύτερη ενέργεια απαιτείται για την απομάκρυνση μιας γωνίας ή ενός δεσμού από τη θέση ισορροπίας του.
- Η ενέργεια περιστροφής ενός δεσμού διαμορφώνεται από μια απλή περιοδική κίνηση. Η ενέργεια περιστροφής στη Μοριακή Μηχανική χρησιμοποιείται πρωτίστως για να διορθώσει τους υπόλοιπους ενεργειακούς όρους, παρά για να αντιπροσωπεύσει κάτι από μόνη της. Η ενέργεια περιστροφής αντιπροσωπεύει το ποσό ενέργειας που πρέπει να προστεθεί ή να αφαιρεθεί από τις Ενέργεια Δεσμού+Ενέργεια Κάμψης+Μη Δεσμική Ενέργεια, έτσι ώστε η συνολική ενέργεια να συμφωνεί με τα πειραματικά δεδομένα ή τον αυστηρό κβαντικό υπολογισμό για μια πρότυπη διεδρη γωνία (π.χ. το αιθάνιο να χρησιμοποιηθεί ως πρότυπο για οποιοδήποτε δεσμό H-C-C-H) (Πίνακας 1.4).
- Η μη δεσμική ενέργεια αναφέρεται στη ενέργεια όλων των πιθανών αλληλεπιδράσεων μη συνδεδεμένων ατόμων  $i$  και  $j$ . Η μη δεσμική ενέργεια οφείλεται σε στερεοχημική απώθηση των ατόμων του μορίου, έλξεις λόγω δυνάμεων Van der Waals, οι οποίες είναι στιγμιαίες και εξασθενούν ταχύτατα καθώς επίσης και ηλεκτροστατικής φύσεως αλληλεπιδράσεις. Απώθηση παρουσιάζεται όταν η απόσταση των ατόμων είναι μικρότερη από το άθροισμα των επί μέρους ακτίων

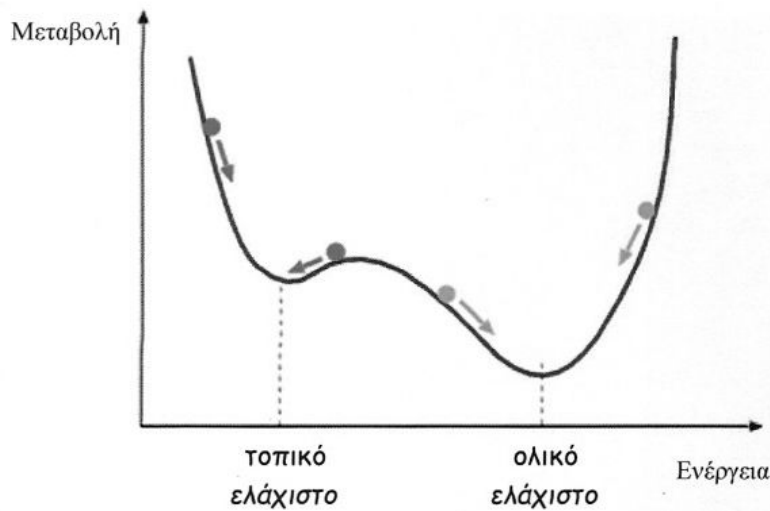
τους. Η παράμετρος  $A$  προσδιορίζεται είτε πολαρογραφικά είτε κβαντομηχανικά, ενώ η  $B$  από κρυσταλλογραφικά στοιχεία (Πίνακας 1.4).

## **A.9 ΕΛΑΧΙΣΤΟΠΟΙΗΣΗ ΤΗΣ ΕΝΕΡΓΕΙΑΣ**

Η ελαχιστοποίηση της ενέργειας ενός συστήματος είναι απαραίτητη καθώς με αυτό τον τρόπο λαμβάνεται η καλύτερη δυνατή γεωμετρία του συστήματος αλλά και υπολογίζεται η ολική ενέργεια του.

Γίνεται με την χρήση μαθηματικών μοντέλων που μπορούν να βρουν γρήγορα την ελάχιστη τιμή μιας πολυδιάστατης συνάρτησης. Σε μια διαμόρφωση χαμηλής τιμής ενέργειας τα άτομα βρίσκονται σε θέση τέτοια όπου η πρώτη παράγωγος της συνάρτησης της ενέργειας τείνει να μηδενιστεί.

Τα μαθηματικά αυτά μοντέλα αναζητούν τον συνδυασμό εκείνο όπου η κλίση της εξίσωσης ενέργειας μειώνεται. Για την ελαχιστοποίηση της ενέργειας χρησιμοποιούνται αλγόριθμοι. Η κατάταξη των αλγορίθμων γίνεται ανάλογα με την τάξη τους, δηλαδή ανάλογα με τη μεγαλύτερη παράγωγο της συνάρτησης που χρησιμοποιεί ο αλγόριθμος. Έτσι, έχουμε αλγόριθμους μηδενικής τάξης και είναι εκείνοι που χρησιμοποιούν μόνο την εξίσωση της συνάρτησης. Οι αλγόριθμοι που χρησιμοποιούν την πρώτη παράγωγο ονομάζονται αλγόριθμοι πρώτης τάξης κ.λ.π. Είναι πολλοί οι παράγοντες που πρέπει να ληφθούν υπόψη για την επιλογή του καταλληλότερου αλγορίθμου. Ο ιδανικότερος αλγόριθμος είναι εκείνος που υπολογίζει το τοπικό ελάχιστο της ενέργειας του μορίου στον ελάχιστο δυνατό χρόνο και με τη χρήση της μικρότερης δυνατής μνήμης του υπολογιστή (Σχήμα 1.13).



Σχήμα 1.13: Τοπικό και ολικό ενεργειακό ελάχιστο.

### A.9.1 ΑΛΓΟΡΙΘΜΟΙ ΠΡΩΤΗΣ ΤΑΞΗΣ

Οι αλγόριθμοι πρώτης τάξης χρησιμοποιούν την πρώτη παράγωγο της συνάρτησης για την αναζήτηση του τοπικού ελαχίστου. Οι κυρίως χρησιμοποιούμενοι αλγόριθμοι πρώτης τάξης είναι ο αλγόριθμος Απότομης Καθόδου (Steepest-Descent, SD), ο αλγόριθμος Συζυγούς Βαθμιδωτού Πεδίου Powell Conjugate Gradient (Powell) και ο αλγόριθμος Βαθμιδωτής Σύζευξης ( Conjugated Gradient, CONJ) . Η μέθοδος SD χρησιμοποιείται για να βελτιώσει την διαμόρφωση του μορίου μας, αλλά δεν συγκλίνει στο ολικό ελάχιστο αλλά δίνει μια διαμόρφωση χαμηλότερης ενέργειας από την αρχική. Το μειονέκτημα της μεθόδου είναι ότι απαιτεί πολλές επαναλήψεις κατά την εφαρμογή της.

### A.9.2 ΑΛΓΟΡΙΘΜΟΙ ΔΕΥΤΕΡΗΣ ΤΑΞΗΣ

Οι αλγόριθμοι δεύτερης τάξης χρησιμοποιούν την πρώτη και την δεύτερη παράγωγο κατά την διάρκεια της ελαχιστοποίησης. Ο κυριότερος αλγόριθμος δεύτερης τάξης είναι ο αλγόριθμος Newton-Raphson. Το πλεονέκτημα των αλγορίθμων δεύτερης τάξης είναι ότι οδηγούν ευκολότερα σε τοπικό ελάχιστο, όταν τα μόρια ενεργειακά

βρίσκονται κοντά σε τοπικό ελάχιστο. Γι' αυτό και πρώτα γίνεται ελαχιστοποίηση με πρώτη τάξης αλγόριθμο και στην συνέχεια με αλγόριθμο δεύτερης τάξης.

Τα μειονεκτήματα του αλγόριθμου δεύτερης τάξης είναι

- χρονοβόρος και
- για πρωτεΐνες και μακρομόρια που έχουν περισσότερα από 500 άτομα η μέθοδος Newton-Raphson δεν μπορεί να χρησιμοποιηθεί.

Και γι' αυτό σε τέτοιες περιπτώσεις εφαρμόζεται η τροποποιημένη μορφή της Adopted Basis Newton Raphson.

### **A.9.3 ΜΟΡΙΑΚΗ ΠΡΟΣΔΕΣΗ**

Η μοριακή πρόσδεση είναι η πρόβλεψη της δομής ενός συμπλόκου, που προκύπτει από την πρόσδεση του προσδέτη στον υποδοχέα.

Η κινητήρια δύναμη που ωθεί την πρόσδεση των μορίων στον υποδοχέα, είναι οι στερεοηλεκτρονιακές τους ιδιότητες. Οι διάφορες διαμοριακές αλληλεπιδράσεις που παρατηρούνται όταν τα μόρια προσεγγίζουν τον υποδοχέα, είναι πολύ σημαντικές, γιατί στοχεύουν στη θεωρητική μελέτη και στο σχεδιασμό νέων φαρμακευτικών προϊόντων, αφού γνωρίζουμε την μοριακή βάση μιας ασθένειας.

### **A.9.4 ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΠΟΥ ΣΥΝΤΕΛΟΥΝ ΣΤΗΝ ΕΛΑΤΤΩΣΗ ΤΗΣ ΑΥΘΟΡΜΗΤΗΣ ΣΥΜΠΛΕΞΗΣ**

Εκτός από τις ελκτικές δυνάμεις που συντελούν στην συνολική ενέργεια της αλληλεπίδρασης υποδοχέα-μόριο υπάρχουν και διεργασίες, οι οποίες ελαττώνουν το αυθόρμητο της αλληλεπίδρασης αυτής. Οι διεργασίες αυτές μπορεί να είναι εντροπικές ή ενθαλπικές. Συγκεκριμένα, μερικές βασίζονται στην μείωση της εντροπίας ( $\Delta S < 0$ ), που οφείλεται στην απώλεια της ελεύθερης περιστροφής. Της μεταφοράς και της διαμόρφωσης που συνοδεύουν τον υποδοχέα και το μόριο που θα προσδεθεί σε αυτόν. Ενώ άλλες βασίζονται στην αύξηση της ενθαλπίας ( $\Delta H > 0$ ), όπως οι διεργασίες που εμπλέκονται στην επίτευξη της διαμόρφωσης με υψηλότερη συγγένεια πρόσδεσης ή στη διάσπαση των δεσμών μεταξύ των μορίων του διαλύτη και των πολικών τμημάτων του μορίου που θα ενωθεί.

Ο σχηματισμός οποιουδήποτε συμπλέγματος μορίου-υποδοχέα ακολουθείται από την αντικατάσταση των τριών βαθμών ελευθερίας περιστροφής και των τριών βαθμών ελευθερίας μεταφοράς του μορίου με τους έξι βαθμούς ελευθερίας δόνησης του συμπλέγματος.

Σε περίπτωση άκαπτων μορίων, για τα οποία δεν υπάρχει απώλεια εντροπίας λόγω διαμορφωτικών περιορισμών κατά την πρόσδεση, άρα η σύμπλεξη είναι πιο αυθόρμητη ( $\Delta G < 0$ ).

Οι διαμορφώσεις του υποδοχέα ή του μορίου κατά την πρόσδεση μπορεί να είναι :

- I. Υψηλής ενέργειας
- II. Χαμηλής ενέργειας (τοπικό ελάχιστο)
- III. Χαμηλότερης ενέργειας (ολικό ελάχιστο)

Στις δύο πρώτες θα παρατηρηθεί ελάττωση στο αυθόρμητο της ικανότητας σύμπλεξης σε σχέση με την τελευταία περίπτωση, που ο παράγοντας της διαμόρφωσης δεν συνεισφέρει στο αυθόρμητο της σύμπλεξης υποδοχέα-μορίου. Τα παραπάνω συνοψίζονται στον Πίνακα 1.5.

Πίνακας 1.5: Περιπτώσεις ελάττωσης του βαθμού αυθόρμητης σύμπλεξης υποδοχέα-μορίου.

$\Delta G = \Delta H - T\Delta S$	
<p>Ενθαλπικοί παράγοντες που οδηγούν στην <math>\Delta H &lt; 0</math></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>* Τα μόρια συμπλέκονται με διαμορφώσεις υψηλής ενέργειας</li> <li>* Διάσπαση δεσμού διαλύτη ή τμήμα του μορίου</li> </ul>	<p>Εντοπικοί παράγοντες που οδηγούν στη <math>T\Delta S &lt; 0</math></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>* Περιστροφικοί περιορισμοί διαλύτη ή των μορίων που συμπλέκονται</li> <li>* Μεταφορικοί περιορισμοί διαλύτη ή των μορίων που συμπλέκονται</li> <li>* Διαμορφωτικοί περιορισμοί διαλύτη ή των μορίων που συμπλέκονται</li> </ul>

### A.9.5 ΠΑΡΑΓΟΝΤΑΣ RMSD

Ο παράγοντας RMSD είναι η τετραγωνική ρίζα της μέσης απόστασης τετραγωνική απόστασης και το χρησιμοποιούμε ως μέτρο σύγκρισης μεταξύ δύο διαμορφώσεων. Η τιμή της προκύπτει από τον παρακάτω τύπο. Θεωρείται ότι επιτυγχάνει η μέγιστη υπέρθεση όταν η τιμή της RMSD λάβει τη μικρότερη τιμή.

$$\text{RMSD} = \sqrt{\frac{1}{N} \sum_{i=1}^N (|r_i - r_j|)^2}$$

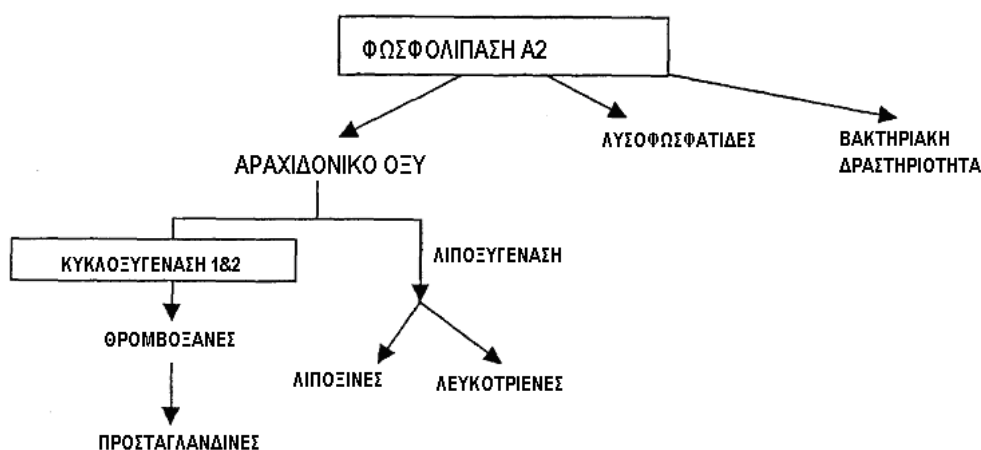
Όπου:

N: ο αριθμός των ατόμων που συγκρίνονται σε κάθε μόριο

$r_i$  και  $r_j$  : οι θέσεις των ατόμων των μορίων που συγκρίνονται.

## A.10 ΦΩΣΦΟΛΙΠΑΣΗ A<sub>2</sub>

Η φωσφολιπάση A<sub>2</sub> (Phospholipase A<sub>2</sub>, PLA<sub>2</sub>) καταλύει την υδρόλυση του εστερικού δεσμού της sn-2 θέσης των φωσφολιπιδίων των μεμβρανών απελευθερώνοντας ακόρεστα λιπαρά οξέα (Μούγλης, 2007; Burke and Dennis, 2009). Σε αυτά τα λιπαρά οξέα συμπεριλαμβάνεται το αραχιδονικό οξύ, το οποίο αποτελεί το υπόστρωμα σε διάφορες μεταβολικές διεργασίες. Ως αποτέλεσμα του μεταβολισμού του αραχιδονικού οξέος παράγονται τα λεγόμενα εικοσανοειδή στα οποία συμπεριλαμβάνονται τα λευκοτριένια, οι προσταγλανδίνες και οι θρομβοξάνες (Σχήμα 1.14).



Σχήμα 1.14: Η φωσφολιπάση A<sub>2</sub> και η συμβολή της στην κατάλυση της υδρόλυσης του εστερικού δεσμού της sn-2 θέσης των φωσφολιπιδίων των μεμβρανών.



### **A.10.1 Η υπεροικογένεια των φωσφολιπασών**

Η υπεροικογένεια των φωσφολιπασών που προέρχονται από τα θηλαστικά περιλαμβάνει 4 κατηγορίες ενζύμων: την κυτοσολική φωσφολιπάση A<sub>2</sub> η ομάδα IV (cytosolic PLA<sub>2</sub>, Group IV), την εκκριτική φωσφολιπάση A<sub>2</sub> (secretory PLA<sub>2</sub>, sPLA<sub>2</sub>), την φωσφολιπάση A<sub>2</sub> που σχετίζονται με την λιποπρωτεΐνη (LpPLA<sub>2</sub>) και την ανεξάρτητη ασβεστίου φωσφολιπάση A<sub>2</sub> ή ομάδα VI (Ca<sup>2+</sup>-independent. iPLA<sub>2</sub>, Group VI) (Schaloske and Dennis, 2006).

Οι τέσσερις αυτές κατηγορίες των φωσφολιπασών διαφέρουν τόσο στη γενική δόμη τους όσο και στην εξειδίκευση τους στα διάφορα υποστρώματα .

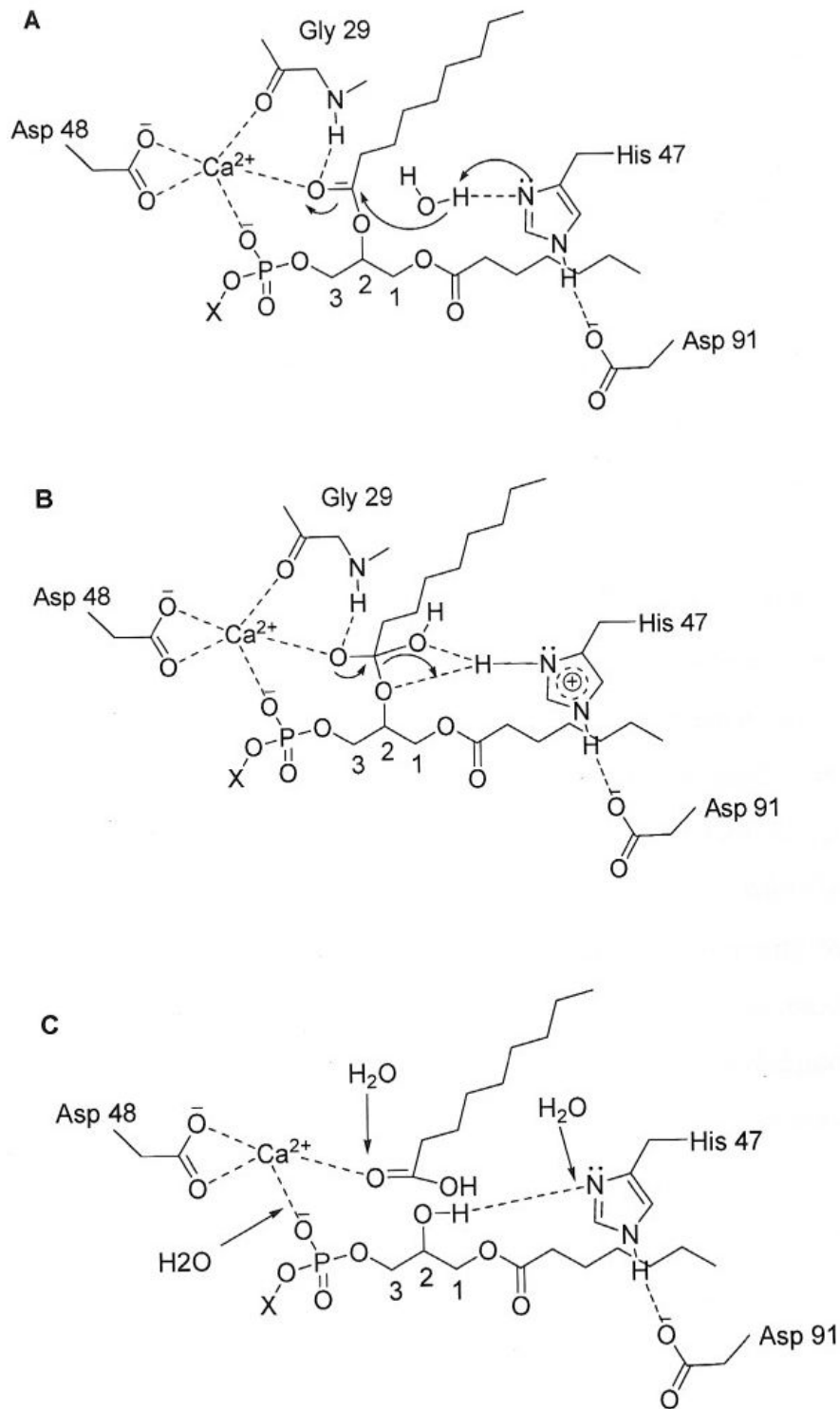
### **A.10.2 Η χαμηλή μοριακού βάρους εκκριτική φωσφολιπάση A<sub>2</sub> – Τα ισοένζυμα της κατηγορίας**

Η εκκριτική φωσφολιπάση A<sub>2</sub> (sPLA<sub>2</sub>) αποτελεί μια υποοικογένεια από ισοένζυμα τα οποία περιέχουν ασβέστιο στο ενεργό τους κέντρο (Lambeau and Geld, 2008; Boyanovsky, 2009). Είναι χαμηλού μοριακού βάρους και στο μηχανισμό δράσης τους παίρνει μέρος η καταλυτική δυάδα των αμινοξέων His-48/Asp-99. Μέχρι σήμερα υπάρχουν 10 ισοένζυμα sPLA<sub>2</sub> που έχουν απομονωθεί από τα θηλαστικά και αναφέρονται ως ομάδες IB, IIA, IIC, IID, IIE, IIF, III, V, X, XII.

### **A.10.3 Ανθρώπινη μη παγκρεατική εκκριτική φωσφολιπάση A<sub>2</sub> Ή ομάδα IIA (Human non pancreatic secretory phospholipase A<sub>2</sub>, nhrs-PLA<sub>2</sub>, Group IIA)**

Η ανθρώπινη μη παγκρεατική φωσφολιπάση A<sub>2</sub> είναι αντιπροσωπευτικό παράδειγμα sPLA<sub>2</sub> η οποία βρίσκεται άφθονη σε φλεγμονώδη υγρά και θεωρείται ότι διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στη διαδικασία της φλεγμονής. Απομονώθηκε και χαρακτηρίστηκε το 1989 από το μη παγκρεατικό αρθρικό υγρό ασθενών που πάσχουν από ρευματοειδή αρθρίτιδα (Seilhamer et al, 1989). Χαρακτηρίζεται όπως και τα υπόλοιπα ισοένζυμα της ίδιας κατηγορίας από την καταλυτική δυάδα των αμινοξέων His-48/Asp-99 καθώς και το ασβέστιο που περιέχει στο ενεργό κέντρο. Στο Σχήμα 1.15 απεικονίζεται ο καταλυτικός μηχανισμός δράσης της (Scott et al, 1990).

Σημαντικό χαρακτηριστικό που την ξεχωρίζει από τις άλλες κατηγορίες είναι το χαμηλό μοριακό της βάρος (14kDa).



Σχήμα 1.15: Καταλυτικός μηχανισμός δράσης της GIIA sPLA<sub>2</sub>.

# ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Το έντονο ερευνητικό ενδιαφέρον των τελευταίων ετών για την απομόνωση και τη μελέτη των βιοδραστικών συστατικών των αρωματικών φυτών του κάθε τόπου οδήγησε σε μια σειρά ανακαλύψεων που σχετίζονται με τη σημασία της κατανάλωσης αυτών των φυτών, κυρίως ως αφεψήματα. Το δενδρολίβανο (*Rosmarinus officinalis*) είναι ένα από τα αρωματικά φυτά του ελλαδικού χώρου που περιέχει φαινολικά διτερπένια (καρνοσικό οξύ, καρνοσόλη), флаβόνες καθώς και αυξημένες ποσότητες ροσμαρινικού οξέος.

Σκοπός της παρούσας μελέτης είναι η απομόνωση των πολικών συστατικών, όπως το ροσμαρινικό οξύ, από το δενδρολίβανο (*Rosmarinus officinalis*) καθώς και η μελέτη της αλληλεπίδρασης βιοδραστικών οξέων που είναι γνωστό στη βιβλιογραφία ότι παρουσιάζουν αντιφλεγμονώδη δράση με την εκκριτική φωσφολιπάση  $A_2$  (GIIA sPLA<sub>2</sub>).

Μελετήσαμε την αλληλεπίδραση του ροσμαρινικού οξέος, τόσο του (*S*) όσο και το (*R*) εναντιομερούς του, του καφεϊκού οξέος που αποτελεί κοινό συστατικό πολλών βιοδραστικών φαινολικών οξέων, καθώς επίσης και του φερουλικού οξέος που είναι ένα μεθυλιωμένο παράγωγο του καφεϊκού, με την GIIA sPLA<sub>2</sub> με τη βοήθεια της μοριακής μοντελοποίησης. Τέλος επειδή στην πρόσφατη βιβλιογραφία αναφέρεται ότι το ολεανολικό οξύ αναστέλλει την sPLA<sub>2</sub> και παρουσιάζει αντιφλεγμονώδη δράση μας ώθησε να το συμπεριλάβουμε στη μελέτη μας.

## **B. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ**

### **B.1 Απομόνωση φαινολικών συστατικών απο το φυτό *Rosmarinus officinalis***

Το δενδρολίβανο που χρησιμοποιήθηκε στα πειράματά μας προέρχεται από την Άνδρο και ταυτοποιήθηκε βοτανικά στο εργαστήριο συστηματικής βοτανικής του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών ότι ανήκει στο είδος *Rosmarinus officinalis*. Στη συνέχεια τοποθετήθηκε σε σκιερό μέρος με σκοπό να γίνει η ξήρανσή του με φυσικό τρόπο. Τέλος, διαχωρίστηκαν τα φύλλα από τα λοιπά τμήματα του φυτού και κονιοροποιήθηκαν με τη βοήθεια κοπτικής μηχανής (multi). Έγινε μελέτη της εκχύλισης των συστατικών του δενδρολιβάνου χρησιμοποιώντας διαφορετικούς διαλύτες εκχύλισης.

#### **B.1.1 Εκχύλιση δείγματος με μεθανόλη : νερό**

25 g κονιοροποιημένου δείγματος εκχυλίζονται με 200 mL διαλύματος μεθανόλης:νερού (70:30 v/v) για 15' σε θερμοκρασία περιβάλλοντος. Στη συνέχεια ακολουθεί διήθηση και η διαδικασία της εκχύλισης επαναλαμβάνεται 3 φορές οπότε λαμβάνεται διήθημα Δ1.

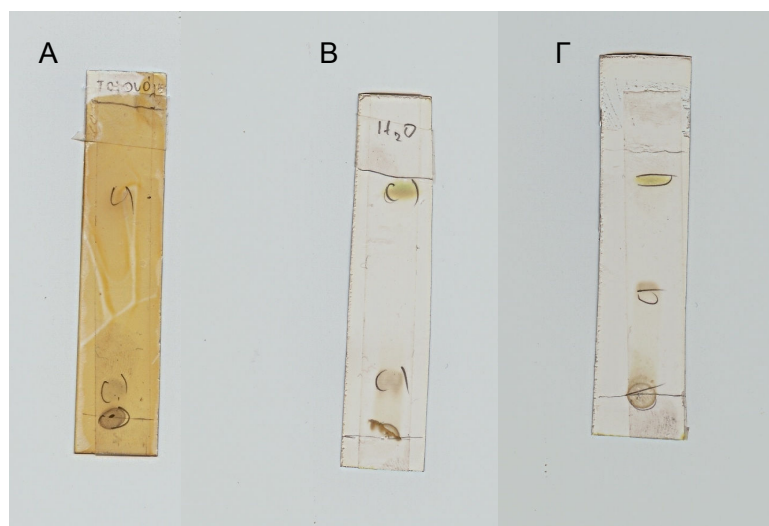
#### **B.1.1α Επιλογή κατάλληλου συστήματος ανάπτυξης χρωματογραφήματος λεπτής στοιβάδος του διηθήματος Δ1**

Προκειμένου να επιλεγεί το σύστημα ανάπτυξης χρωματογραφήματος λεπτής στοιβάδος δοκιμάσθηκαν 3 συστήματα ανάπτυξης Α, Β και Γ. Στο Σχήμα 2.1 φαίνονται τα χρωματογράφημα λεπτής στοιβάδος του εκχυλίσματος Δ1 σε σύστημα ανάπτυξης Α, Β και Γ, όπου:

Α: C<sub>7</sub>H<sub>8</sub> : AcOEt : CH<sub>3</sub>COOH (5:4:1 v/v/v)

Β: AcOEt : MeOH : H<sub>2</sub>O (8:1:1 v/v/v)

Γ: AcOEt : CH<sub>3</sub>COOH : H<sub>2</sub>O (8:1:1 v/v/v)



Σχήμα 2.1: TLC του εκχυλίσματος Δ1 σε σύστημα ανάπτυξης Α, Β και Γ όπου:  
 Α:  $C_7H_8$  : AcOEt :  $CH_3COOH$  (5:4:1 v/v/v) μετά από εμφάνιση με αιθανολικό διάλυμα  $FeCl_3$ , Β: AcOEt : MeOH :  $H_2O$  (8:1:1 v/v/v) και Γ: AcOEt :  $CH_3COOH$  :  $H_2O$  (8:1:1 v/v/v) μετά από εμφάνιση με  $I_2$ .

Για την εμφάνιση των χρωματογραφημάτων χρησιμοποιήθηκε ή θάλαμος  $I_2$  ή ψεκασμός με αιθανολικό διάλυμα  $FeCl_3$ .

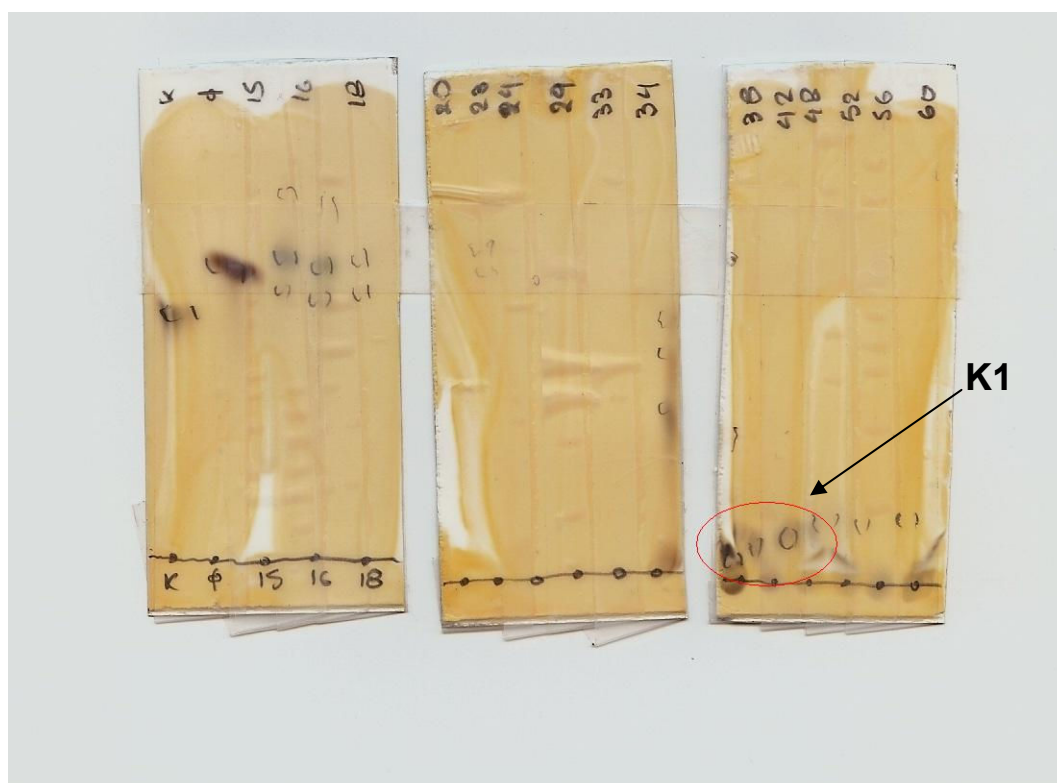
Στο Σχήμα 2.2 φαίνεται το χρωματογράφημα του δείγματος Δ1 καθώς και των προτύπων διαλυμάτων μας (ροσμαρινικό, καφεϊκό και φερουλικό) στο σύστημα ανάπτυξης Α που επιλέχτηκε ως το καλύτερο.



Σχήμα 2.2: TLC του δείγματος Δ1 καθώς και των προτύπων διαλυμάτων ροσμαρινικό (P), καφεϊκό (K) και φερουλικό οξύ (Φ) στο σύστημα ανάπτυξης Α.

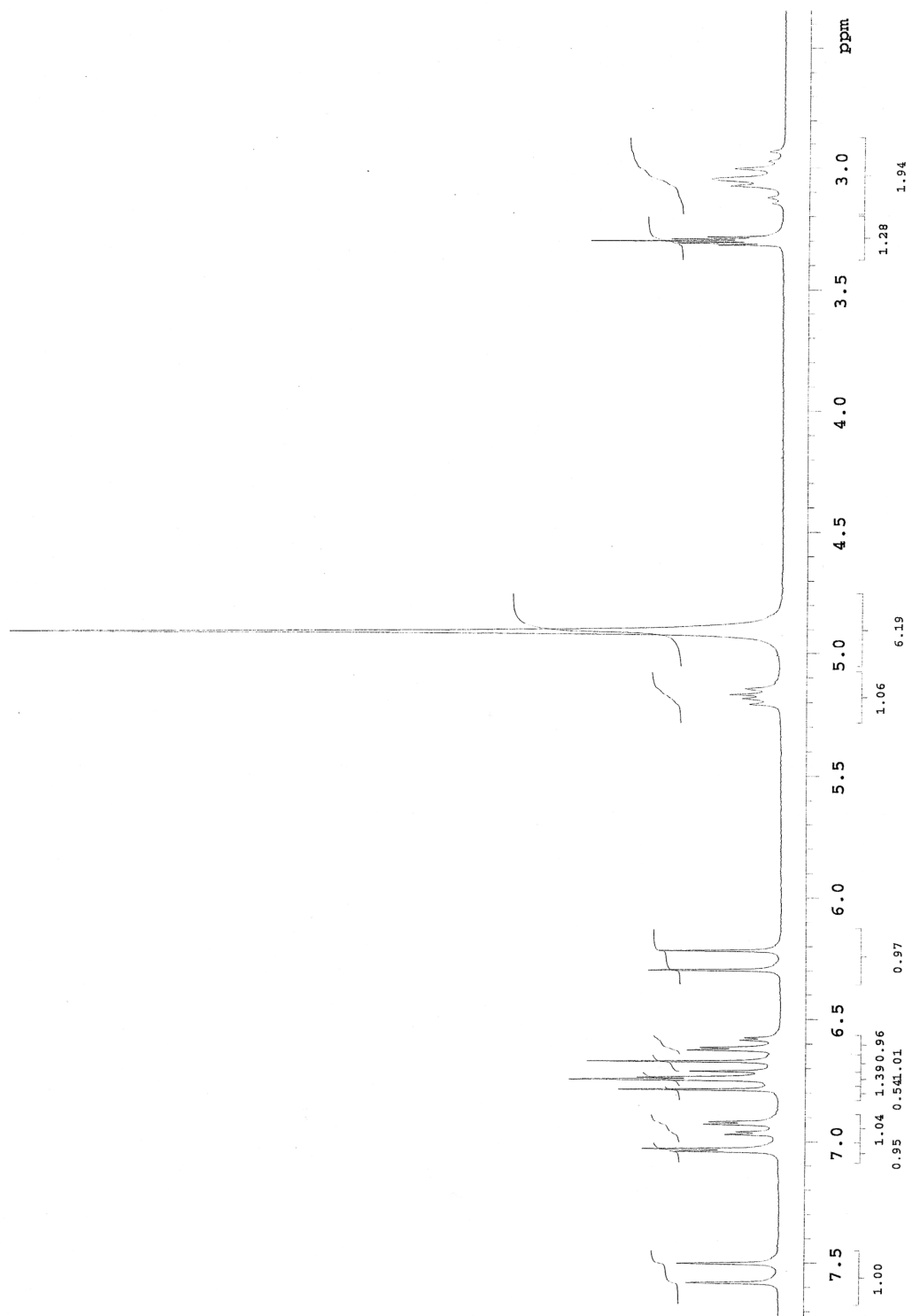
### B.1.1β Διαχωρισμός των συστατικών του διηθήματος Δ1 με χρωματογραφία στήλης

150 mL του διηθήματος Δ1 συμπυκνώθηκαν και χρησιμοποιήθηκε χρωματογραφία στήλης silica gel με διαλύτη έκλουσης  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  : MeOH (4 : 6) προκειμένου να γίνει ο διαχωρισμός των συστατικών του Δ1. Στη συνέχεια απομονώθηκε κλάσμα K1 (110,8 mg) που αντιστοιχεί στη χρωματογραφία λεπτής στοιβάδος στο  $R_f$  του ροσμαρινικού οξέος (Σχήμα 2.3).

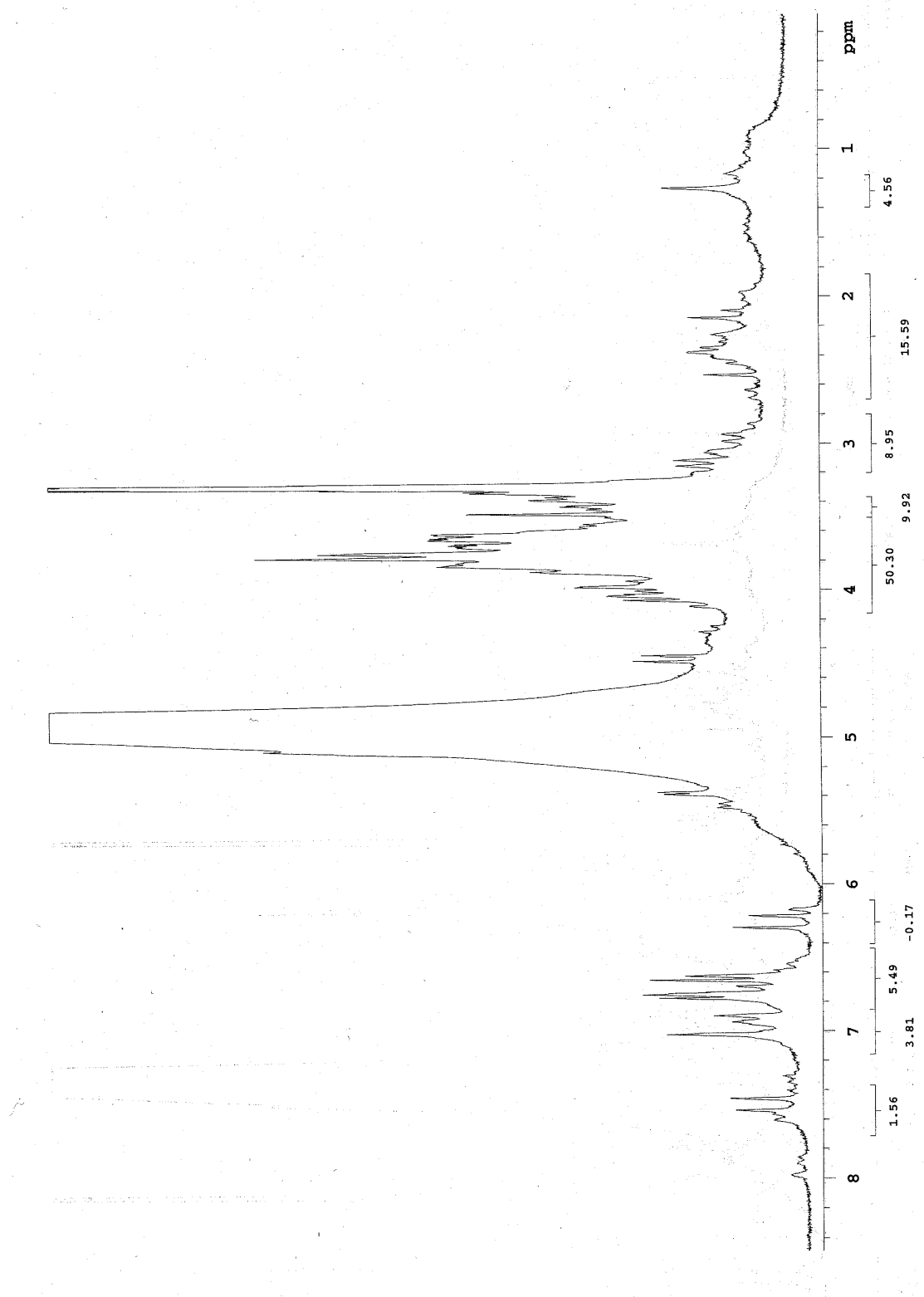


Σχήμα 2.3: TLC κλασμάτων του διηθήματος Δ1 αφού συμπυκνώθηκαν πέρασαν από χρωματογραφία στήλης silica gel με διαλύτη έκλουσης  $\text{CHCl}_2$  : MeOH (4 : 6).

Στα Σχήματα 2.4 και 2.5 δίνονται τα φάσματα  $^1\text{H-NMR}$  (200MHz) του πρότυπου ροσμαρινικού οξέος σε  $\text{CD}_3\text{OD}$  και του κλάσματος K1 σε  $\text{D}_2\text{O}$  αντίστοιχα.

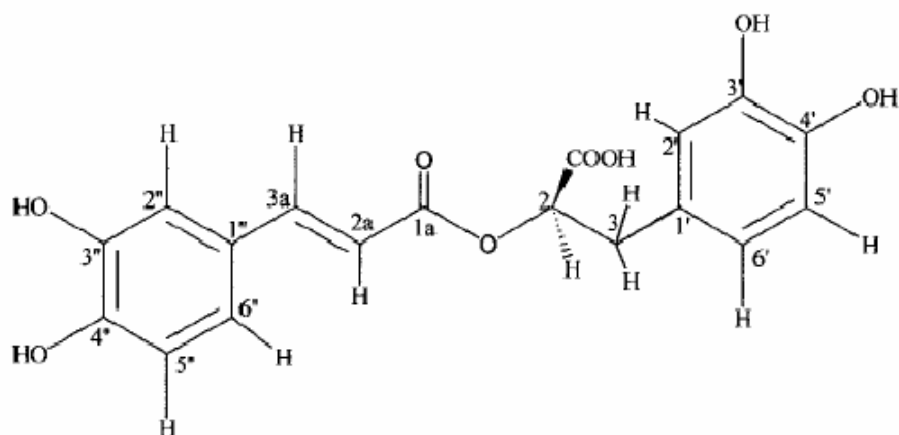


Σχήμα 2.4: Φάσμα  $^1\text{H-NMR}$  (200MHz) του πρότυπου ροσμαρινικού οξέος σε  $\text{CD}_3\text{OD}$ .



Σχήμα 2.5: Φάσμα  $^1\text{H-NMR}$  (200MHz) του κλάσματος K1 σε  $\text{D}_2\text{O}$ .





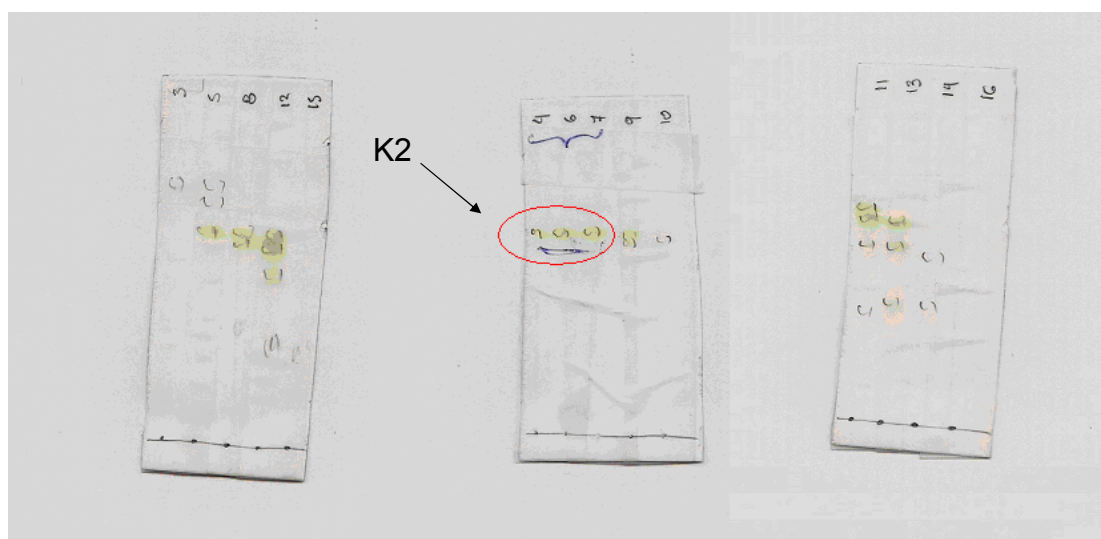
Σχήμα 2.6: Ροσμαρινικό οξύ (Exarchou et al., 2001)

Στο φάσμα  $^1\text{H-NMR}$  του προτύπου ροσμαρινικού οξέος σε  $\text{CD}_3\text{OD}$  (Σχήμα 2.4) τα πρωτόνια  $\text{H}_{3a}$  και  $\text{H}_{2a}$  του διπλού δεσμού εμφανίζονται ως διπλέτες στα 7.54 και 6.26 ppm αντίστοιχα, με μεγάλη σταθερά σύζευξης που είναι χαρακτηριστική της παρουσίας *trans* διπλού δεσμού. Το πρωτόνιο  $\text{H}_{5''}$  εμφανίζεται ως διπλή κορυφή και το  $\text{H}_{6''}$  ως διπλή διπλών στα 6.77 και 6.94 ppm αντίστοιχα. Όμοια εμφανίζονται τα  $\text{H}_{5'}$  και  $\text{H}_{6'}$  στα 6.69 και 6.61 ppm αντίστοιχα. Τέλος, τα  $\text{H}_{2''}$  και  $\text{H}_{2'}$  εμφανίζονται ως διπλές στα 7.03 και 6.75 ppm αντίστοιχα (Σχήμα 2.6).

Στο φάσμα  $^1\text{H-NMR}$  του κλάσματος K1 φαίνεται η παρουσία του τμήματος του καφεϊκού οξέος στην περιοχή από 7.60 – 6.20 ppm. Στην ίδια περιοχή υπάρχουν χημικές μετατοπίσεις που δείχνουν την παρουσία και δεύτερου φαινολικού δακτυλίου και χημικές μετατοπίσεις που δεν έχουν ταυτοποιηθεί, περιέχονται όμως σε μικρότερη συγκέντρωση από το παράγωγο του καφεϊκού οξέος. Επειδή ο διαλύτης που χρησιμοποιήθηκε στο  $^1\text{H-NMR}$  είναι το  $\text{D}_2\text{O}$ , δεν φαίνεται η χημική μετατόπιση του πρωτονίου του  $\text{C}_2$  που κρύβεται μέσα στη χημική μετατόπιση του διαλύτη. Επιπλέον, στα 3.20 – 3.00 ppm φαίνεται η περιοχή που συντονίζονται τα πρωτόνια του  $\text{C}_3$ . Τέλος, οι χημικές μετατοπίσεις στα 4.00 – 3.00 ppm δείχνουν την παρουσία σακχάρου ή γενικότερα πολυδροξυλιωμένου ετεροκυκλικού δακτυλίου.

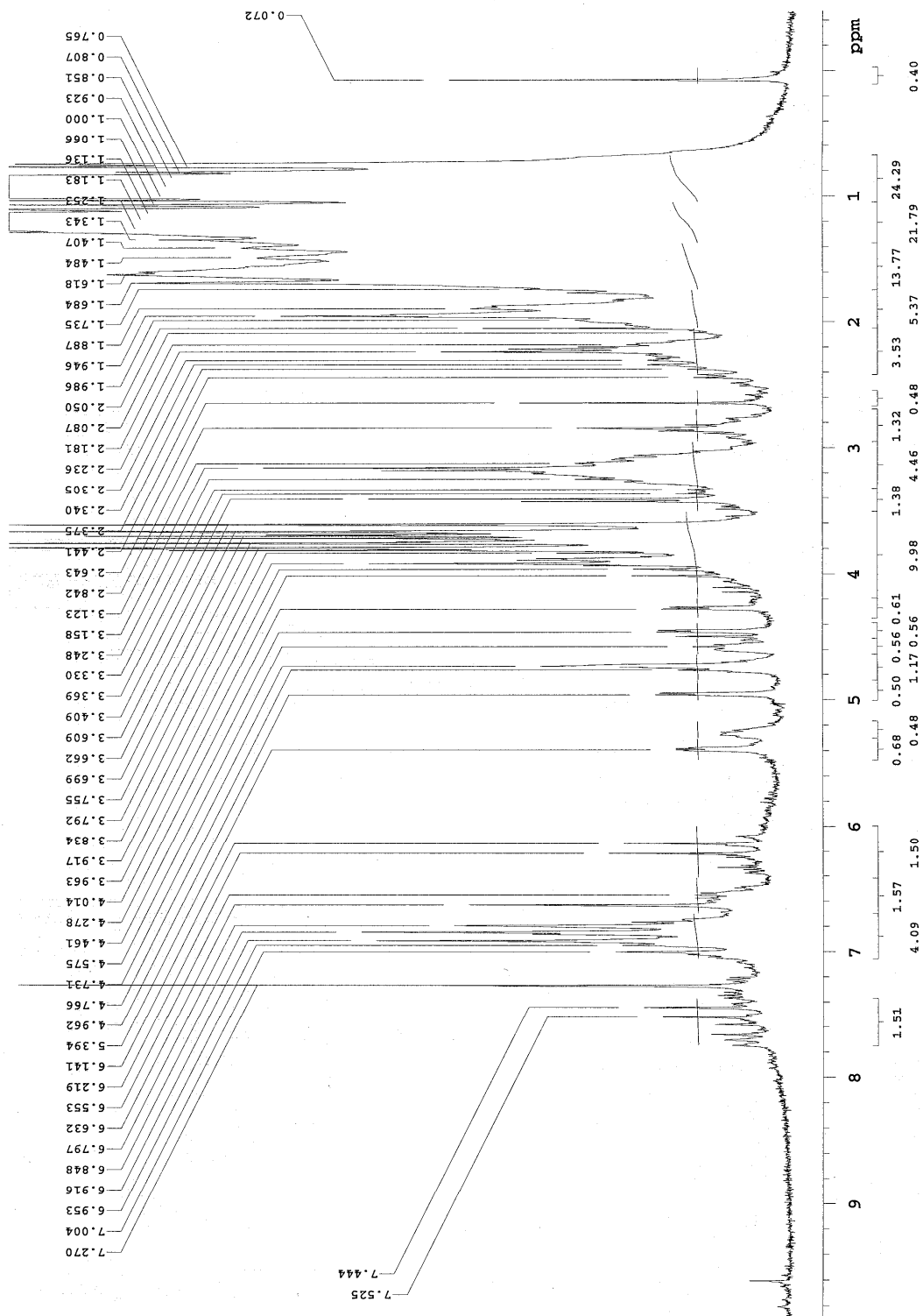
### B.1.1γ Μετεστεροποίηση του διηθήματος Δ1

Σε 50 mL του μεθανολικού εκχυλίσματος Δ1 προστέθηκαν 10 mL HCl 6M για 1h υπό ανάδευση και θέρμανση. Με την επεξεργασία του δείγματος με HCl υδρολύθηκαν οι εστερικοί και γλυκοζιτικοί δεσμοί του μίγματος οπότε λαμβάνεται ένα μίγμα μεθυλεστέρων και μεθυλογλυκοζιτών. Στη συνέχεια το μίγμα συμπυκνώθηκε μέχρι ξηρού και χρωματογραφήθηκε σε στήλη silica gel και με διαλύτη έκλουσης AcOEt οπότε απομονώθηκε το κλάσμα K2 (61,8 mg). Στο Σχήμα 2.7 δίνεται το χρωματογράφημα λεπτής στοιβάδος από τα κλάσματα της παραπάνω στήλης.



Σχήμα 2.7: TLC στα κλάσματα του μεθυλεστεροποιημένου δείγματος K2 αφού χρωματογραφήθηκε σε στήλη silica gel και με διαλύτη έκλουσης AcOEt.

Στο φάσμα  $^1\text{H-NMR}$  του κλάσματος K2 με  $\text{D}_2\text{O}$  (Σχήμα 2.8) παρατηρείται στην περιοχή από 7.80 – 6.00 ppm αλλαγή στις χημικές μετατοπίσεις των  $\text{H}_{3\alpha}$  και  $\text{H}_{2\alpha}$  σε υψηλότερα πεδία σε σχέση με τις αντίστοιχες του ροσμαρινικού οξέος (Σχήμα 2.4). Αυτό οφείλεται στο ότι από την υδρόλυση του ροσμαρινικού οξέος προέκυψε το καφεϊκό οξύ που σύμφωνα με τους Exarchou *et al.* (2001) παρουσιάζει χημικές μετατοπίσεις διαφορετικές από αυτές του ροσμαρινικού οξέος. Το κλάσμα K2 δίνει ποικιλία σημάτων που δεν είναι εύκολο να ταυτοποιηθούν.



Σχήμα 2.8: Φάσμα  $^1\text{H-NMR}$  (200 MHz) στο κλάσμα K2 με  $\text{D}_2\text{O}$ .

### B.1.2 Εκχύλιση με νερό

16,5 g κονιορτοποιημένου δείγματος εκχυλίστηκε με 200 mL δισαπεσταγμένο νερό σε θερμοκρασία δωματίου, για 1h υπό ανάδευση και υπό αποκλεισμό φωτός. Στη συνέχεια ακολούθησε διήθηση. Αυτή η διαδικασία επαναλήφθηκε άλλες 2 φορές, οπότε ελήφθη διήθημα E1. Στο Σχήμα 2.9 φαίνεται το χρωματογράφημα λεπτής στοιβάδος του E1 σε σύστημα ανάπτυξης Τολουόλιο : AcOEt : CH<sub>3</sub>COOH (5:4:1 v/v/v) μετά από εμφάνιση με αιθανολικό διάλυμα FeCl<sub>3</sub> (Δ) καθώς και των προτύπων δειγμάτων φερουλικό οξύ (Φ) και καφεϊκό οξύ (Κ). Το υδατικό εκχύλισμα E1 μετά από λυοφιλίωση για την απομάκρυνση του νερού δίνει στερεό E2 (720 mg).

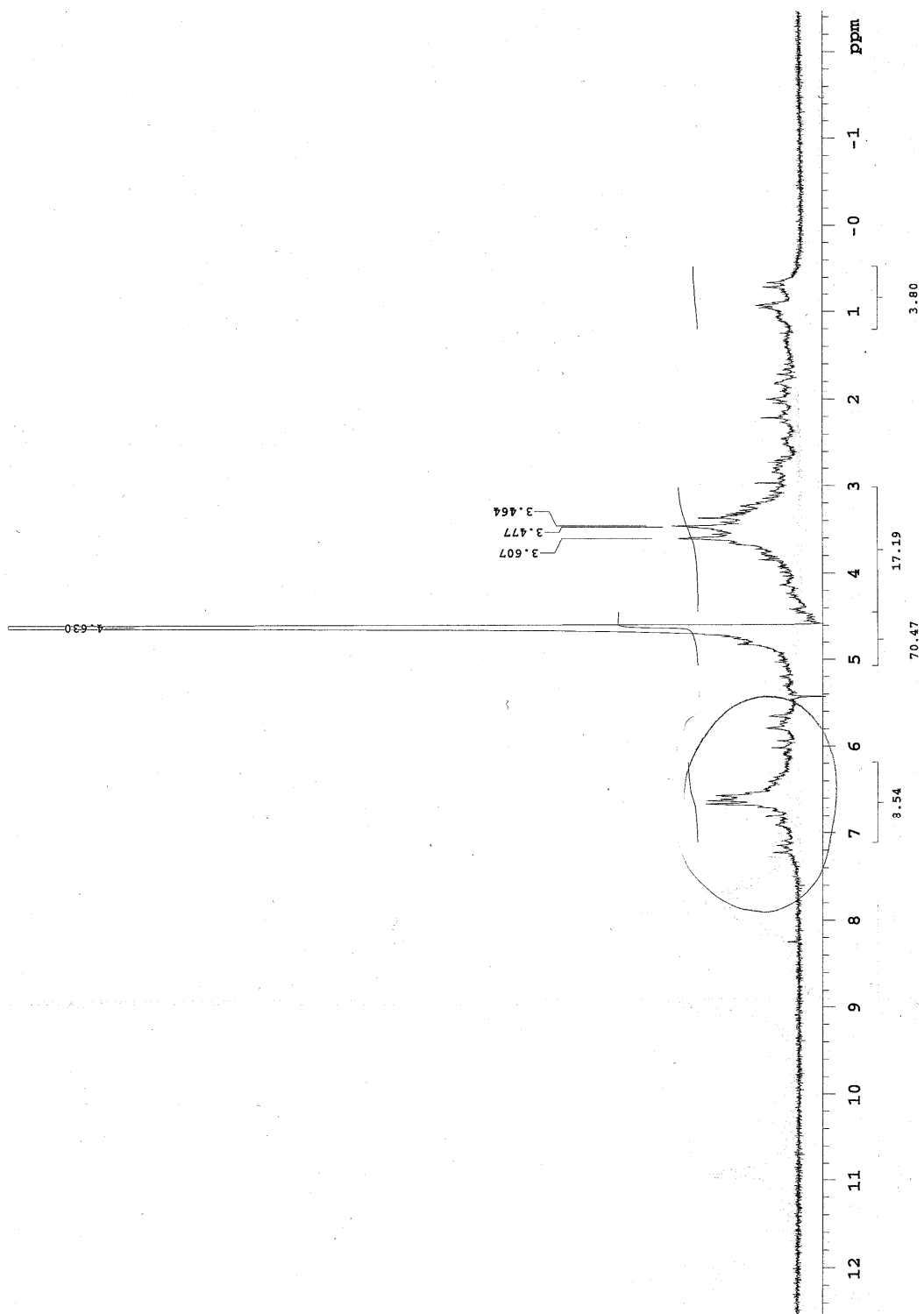


Σχήμα 2.9: TLC του E1 σε σύστημα ανάπτυξης A μετά από εμφάνιση με αιθανολικό διάλυμα FeCl<sub>3</sub> (Δ) καθώς και των προτύπων δειγμάτων φερουλικό οξύ (Φ) και καφεϊκό οξύ (Κ).

#### B.1.2α Εκχύλιση λυοφιλωμένου δείγματος με μεθανόλη

Το λυοφιλωμένο στερεό E2 (300 mg) εκχυλίζεται με 25 mL μεθανόλη για 1h. Στη συνέχεια φυγοκεντρείται και συμπυκνώνεται το διήθημα μέχρι ξηρού (21,4 mg).

Στο φάσμα <sup>1</sup>H-NMR του διηθήματος μετά την εκχύλιση με μεθανόλη φαίνεται ότι περιέχεται το παράγωγο του καφεϊκού οξέος που υπήρχε και στο κλάσμα K1 (Σχήμα 2.5), αλλά η περιεχόμενη ποσότητα είναι πολύ μικρή οπότε συμπεραίνουμε ότι η αρχική εκχύλιση με νερό δεν βοηθά στην απομόνωση των παραγώγων του καφεϊκού οξέος.

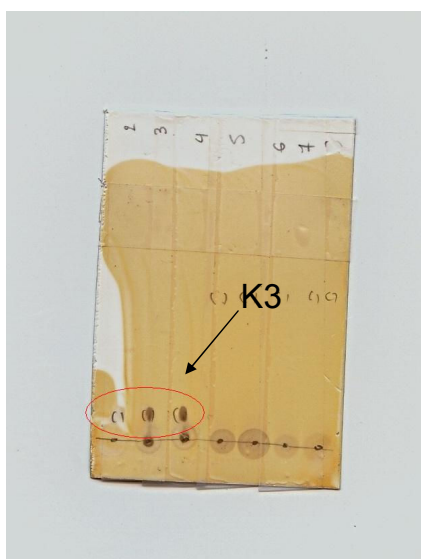


Σχήμα 2.10: Φάσμα  $^1\text{H-NMR}$  (200 MHz) υπερκειμένου δείγματος E2 μετά την εκχύλιση με μεθανόλη σε  $\text{CD}_3\text{OD}$ .

### B.1.2β Ρητίνη τύπου Amberlite

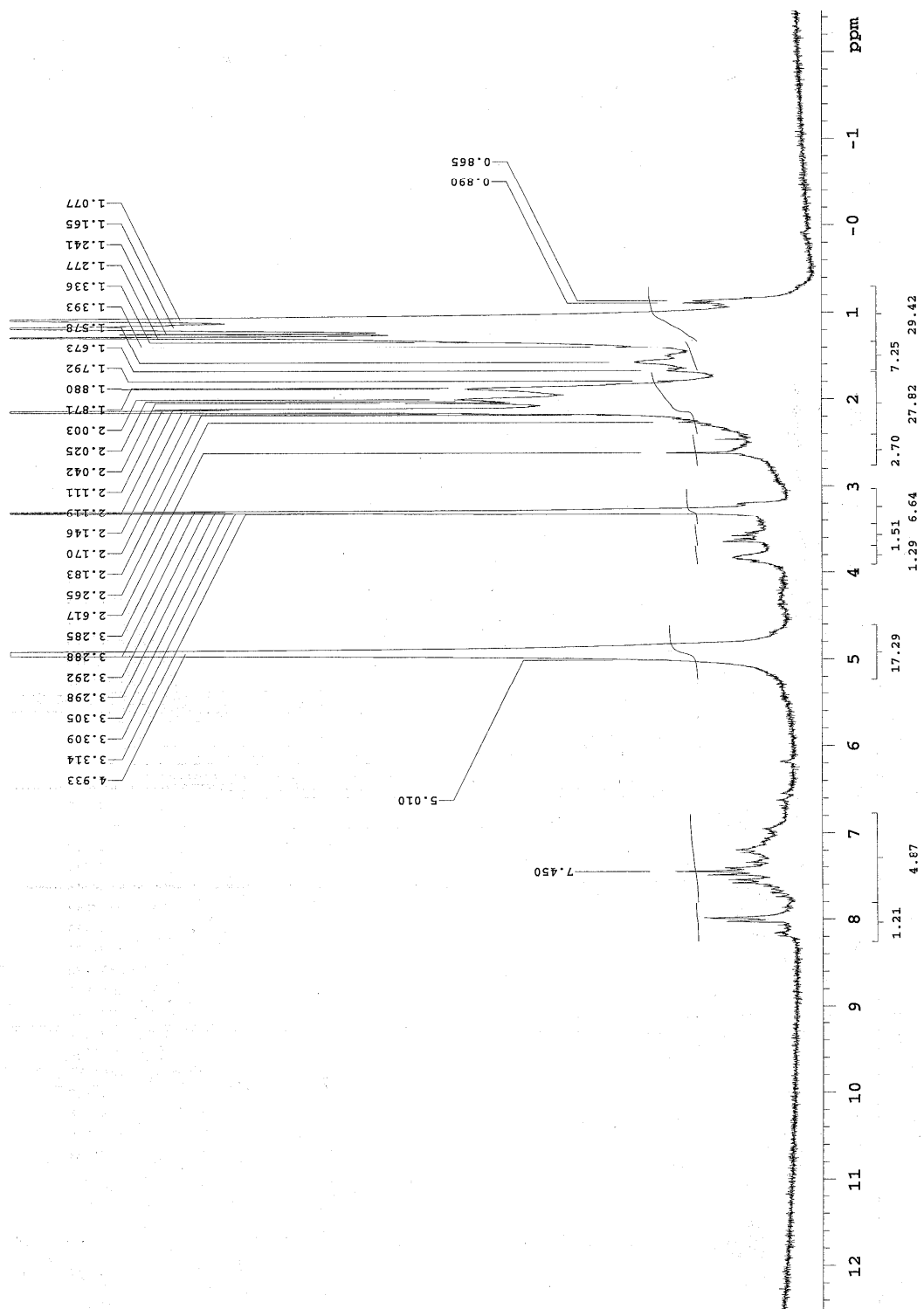
Στην προσπάθεια να απομονωθεί κλάσμα που περιέχει τα παράγωγα του καφεϊκού οξέος σε μεγαλύτερη συγκέντρωση χρησιμοποιήθηκε ιονταλλακτική ρητίνη. Το λυοφιλωμένο στερεό E2 (50 mg) διαλύεται σε δισαπεσταγμένο νερό ρυθμίζοντας το pH του στο 3.0 με τη βοήθεια HCl και περνιέται από ρητίνη τύπου Amberlite που έχει ξεπλυθεί με δισαπεσταγμένο νερό. Μετά την προσθήκη του δείγματος η στήλη εκπλένεται με δισαπεσταγμένο νερό και στη συνέχεια με μεθανόλη. Η πορεία ελέγχεται με τη βοήθεια χρωματογραφίας λεπτής στοιβάδος και συγκεντρώνεται το κλάσμα K3.

Επειδή το κλάσμα που απομονώθηκε με τη βοήθεια ιονταλλακτικών ρητινών έδωσε πολύ αραιό δείγμα, για αυτό η ίδια διαδικασία επαναληφθηκε με 100 mg λυοφιλωμένου δείγματος και με τη βοήθεια της χρωματογραφίας λεπτής στοιβάδος του Σχήματος 2.11 συγκεντρώθηκε το κλάσμα με το ίδιο  $R_f$  με προηγουμένως. Συνολικά συλλέγονται 52,7 mg του K3 για να τα μελετήσουμε με φασματοσκοπία  $^1\text{H-NMR}$ .



Σχήμα 2.11: Σχήμα TLC στο κλάσμα K3 αφού περάσει από ρητίνη τύπου Amberlite.

Στο φάσμα  $^1\text{H-NMR}$  (Σχήμα 2.12) του K3 φαίνεται ότι περιέχεται το παράγωγο του καφεϊκού οξέος που υπήρχε και στο κλάσμα K1 (Σχήμα 2.5), αλλά και πάλι η ποσότητα που απομονώνεται είναι μικρή γιατί το K3 είναι μίγμα ουσιών.



Σχήμα 2.12: Φάσμα  $^1\text{H-NMR}$  (200 MHz) κλάσματος K3 ύστερα απο κατεργασία με ρητίνες τύπου Amberlite σε  $\text{CD}_3\text{OD}$ .

## ***B.2 Μελέτη της αλληλεπίδρασης φαινολικών οξέων και τερπενίων με την εκκριτική φωσφολιπάση A<sub>2</sub> (GIIA sPLA<sub>2</sub>)***

### **B.2.1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ**

Στην παρούσα μελέτη πραγματοποιήθηκε η μοριακή πρόσδεση μιας σειράς φυσικών προϊόντων στο ενεργό κέντρο της GIIA sPLA<sub>2</sub>. Σκοπός ήταν να ελεγχθεί ο τρόπος της αλληλεπίδρασης των μορίων αυτών με το ένζυμο. Για την προσομοίωση της πρόσδεσης προσδετών στο ενεργό κέντρο των υποδοχέων, έχουν αναπτυχθεί πολλά υπολογιστικά προγράμματα μοριακής πρόσδεσης. Για τον σχεδιασμό των τρισδιάστατων δομών των προσδετών χρησιμοποιήθηκε το πακέτο μοριακής μοντελοποίησης SYBYL 8.0 της εταιρίας TRIPOS. Η ελαχιστοποίηση της ενέργειας τους έγινε με χρήση του αλγόριθμου POWELL με βαθμίδα ελαχιστοποίησης ενέργειας 0.01 kcal mol<sup>-1</sup>Å<sup>-1</sup>. Το πρόγραμμα μοριακής πρόσδεσης είναι το GOLD v 4.1 (Genetic Optimisation for Ligand Docking) (Gold, v4.1, CCDC).

Ως ένζυμο στους υπολογισμούς μοριακής πρόσδεσης χρησιμοποιήθηκε το αρχείο PDB 1D:1DB4 που βρίσκετε καταχωρημένο στην τράπεζα δεδομένων (Protein Data Base). Το αρχείο αυτό αφορά τη κρυσταλλογραφική δομή της GIIA sPLA<sub>2</sub> συγκρυσταλλωμένης με ένα παράγωγο ινδολίου στο ενεργό της κέντρο.

Για τους ευέλικτους προσδέτες χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος υψηλής θερμοκρασίας ανόπτησης (Annealing method) με σκοπό να γίνει η μελέτη του διαμορφωτικού χώρου του προσδέτη. Για το σκοπό αυτό κάθε προσδέτης θερμάνθηκε στους 2000K για 2000fs και στη συνέχεια η θερμοκρασία του μειώθηκε σταδιακά στους 0K για 10000fs. Η διαδικασία αυτή πραγματοποιήθηκε 100 φορές για κάθε προσδέτη. Οι εκατό διαφορετικές διαμορφώσεις που προέκυψαν για κάθε προσδέτη ελαχιστοποιήθηκαν ενεργειακά με τον αλγόριθμο POWELL με κλίση 0.01 kcal mol<sup>-1</sup>Å<sup>-1</sup>. Για τους υπολογισμούς χρησιμοποιήθηκε το πεδίο δυνάμεων Tripos. Όλη η μέθοδος έγινε με το SYBYL 8.0.

Η μοριακή πρόσδεση έγινε με τη χρήση του προγράμματος GOLD v 4.1 CCDC. Έγινε έλεγχος των αμινοξέων, του Ca<sup>2+</sup> και τις δυάδας His/Asp που παίζει καταλυτικό ρόλο στο σημείο πρόσδεσης. Τα πέντε μόρια νερού κοντά στο ενεργό κέντρο του ενζύμου τα ενεργοποιήσαμε με το “Toggle” και τα υδρογόνα του νερού



τα υποβάλουμε σε περιστροφή “Spin”. Η γεωμετρία του  $\text{Ca}^{2+}$  προσομοιώθηκε με το GOLD σε οκταεδρική δομή.

## **B.2.2 ΒΑΣΙΚΕΣ ΑΡΧΕΣ ΤΟΥ GOLD**

Το GOLD (Genetic Optimisation for Ligand Docking) είναι ένας γενετικός αλγόριθμος μοριακής πρόσδεσης που χρησιμοποιείται για την πρόσδεση μικρών μορίων (ligands) στο ενεργό κέντρο των ενζύμων (Gold, v4.1, CCDC).

Το GOLD χρησιμοποιεί αρχεία εισόδου για του υπολογισμούς μοριακής πρόσδεσης. Τα αρχεία εισόδου για τους προσδέτες συνήθως σχεδιάζονται σε άλλα πακέτα μοριακής μοντελοποίησης αφού το ίδιο στερείται σχεδιαστικού. Το πακέτο μοριακής μοντελοποίησης SYBYL 8.0 είναι συμβατό με το GOLD. Το αρχείο εισόδου του υποδοχέα συνήθως είναι σε PDB μορφή και λαμβάνεται κατευθείαν από την τράπεζα δεδομένων πρωτεϊνών.

Είναι πολύ δύσκολο να προβλεφθεί πως ένα μικρό μόριο θα προσδεθεί στην πρωτεΐνη και κανένα πρόγραμμα δεν μπορεί να εγγυηθεί την επιτυχία της πρόσδεσης. Το καλύτερο είναι αρχικά να ελεγχθεί πόσο ακριβές και αξιόπιστο είναι το πρόγραμμα. Γι' αυτό το λόγο το GOLD δοκιμάστηκε για την ικανότητα του να υπολογίζει την πρόσδεση αναστολέων σε πολλούς γνωστούς υποδοχείς και τα αποτελέσματα είχαν 70-80% επιτυχία.

Το GOLDScore χρησιμοποιήθηκε για την κατάταξη των αποτελεσμάτων μοριακής πρόσδεσης. Στο λογισμικό GOLD εφαρμόζονται δύο μεθοδολογίες πρόσδεσης, το GOLDScore και το CHEMScore. Εμείς χρησιμοποιήσαμε το GOLDScore γιατί μας έδωσε επιτυχή αποτελέσματα. Η ικανότητα πρόσδεσης εκφράζεται με το GOLDScore Fitness.

Το GOLD δίνει πλήρη ευελιξία στον προσδέτη και μερική ευελιξία στον υποδοχέα. Η εξίψωση υπολογισμού ενέργειας μοριακής πρόσδεσης GOLDScore χρησιμοποιήθηκε για την κατάταξη των αποτελεσμάτων (ποζών) μοριακής πρόσδεσης.

Το GOLDScore Fitness είναι σύνθεση τεσσάρων τιμών :

- \* Ενέργεια δεσμών υδρογόνου προσδέτη – υποδοχέα.
- \* Ενέργεια Van der Waals αλληλεπιδράσεων προσδέτη – υποδοχέα.
- \* Εσωτερική ενέργεια Van der Waals αλληλεπιδράσεων προσδέτη.

\* Ενέργεια στροφής προσδέτη.

Μερικές φορές υπάρχει και πέμπτη παράμετρος

\* Ενέργεια ενδομοριακών δεσμών υδρογόνου του προσδέτη.

Για μεγαλύτερη ακρίβεια στην προσομοίωση μοριακής πρόσδεσης χρησιμοποιήσαμε παραμέτρους που να επιτρέπουν την εκτενή έρευνα πιθανών λύσεων. Οι παράμετροι που δόθηκαν είναι :GOLD GA:100 πρόσδεσης με 100.000GA δομές ανά πρόσδεση και στον αλγόριθμο δεν επιτρεπόταν να τερματίσει γρηγορότερα σε περίπτωση που πόζες με μικρή διαφορά RMSD επαναλαμβανόταν.

Αφού έγινε η κατάταξη των δομών με το GOLDScore, μελετήσαμε την κάθε δομή. Ειδικότερα, μελετήσαμε τεσσάρων ειδών δυνάμεις που σταθεροποιούν το σύμπλοκο υποδοχέα-προσδέτη:

- Τις αλληλεπιδράσεις με το κατιόν ασβεστίου με όριο 3 Å.
- Τους δεσμούς υδρογόνου με όριο 2.5 Å απόσταση υδρογόνου ετεροατόμου και 3.5 Å απόσταση ετεροατόμου-ετεροατόμου.
- Τις αρωματικές αλληλεπιδράσεις (π-π stacking) με όριο απόστασης μεταξύ των κεντροειδών των δακτυλίων 4.5-7 Å.
- Αλειφατικές-αλειφατικές και αλειφατικές-αρωματικές αλληλεπιδράσεις με όριο 4 Å.
- Και τις Van der Walls αλληλεπιδράσεις με όριο 4 Å.

Στη συνέχεια έγινε μέτρηση της γωνίας των κάθετων διανυσμάτων που διέρχονται από τα κεντροειδή των αρωματικών δακτυλίων που συμμετέχουν σε αρωματικές (π-π) αλληλεπιδράσεις. Η συνηθέστερη γωνία των αλληλεπιδράσεων των αρωματικών δακτυλίων είναι 30°-90°, δημιουργώντας μία “tilted-T” ή “edge-to-face” διαμόρφωση στους δακτυλίους που αλληλεπιδρούν. Αν η γωνία είναι < 30° τότε έχουμε π-π parallel stacking (Hunter *et al*, 1991).

Το PYMOL χρησιμοποιήθηκε για την επεξεργασία των εικόνων από το GOLD.

### B.2.3 ΕΠΙΛΟΓΗ ΤΩΝ ΠΡΟΣ ΜΕΛΕΤΗ ΦΥΣΙΚΩΝ ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ

Στη διεθνή βιβλιογραφία υπάρχει μια μεγάλη ποικιλία χημικών ενώσεων που έχουν την ικανότητα να αναστέλλουν την εκκριτική φωσφολιπάση  $A_2$  (Reid, 2005). Ανάμεσα σε αυτές τις ενώσεις υπάρχουν και διάφορα φυσικά προϊόντα. Ο πρώτος αναστολέας της  $sPLA_2$  που ανακαλύφθηκε ήταν ένα φυτικό προϊόν θαλάσσιας προέλευσης, το μανοαλίδιο (De Silva and Scheuer, 1980). Μία σημαντική κατηγορία αναστολέων της  $sPLA_2$  είναι τα σεσκιτερπένια πετροσασπογκιολίδια M-R για τα οποία έχει μελετηθεί και ο μηχανισμός δράσης τους (Randazzo et al, 1998). Τα τελευταία χρόνια υπάρχει ιδιαίτερο ενδιαφέρον για την αναστολή της  $sPLA_2$  από φαινολικές ενώσεις, όπως για παράδειγμα η κερκετίνη (Lindahl and Tagesson, 1997; Lattig et al, 2007). Πρόσφατα αναφέρθηκε στη βιβλιογραφία ότι το ροσμαρινικό οξύ αναστέλλει την φωσφολιπάση  $A_2$  από δηλητήριο φιδιού *Bothrops jararacussu*.

Στην παρούσα εργασία επιλέξαμε να μελετήσουμε την αλληλεπίδραση του ροσμαρινικού οξέος με την GIIA  $sPLA_2$ . Για να κατανοήσουμε καλύτερα το μηχανισμό αλληλεπίδρασης και να καθορίσουμε τα δομικά χαρακτηριστικά του μορίου που είναι υπεύθυνα για την μοριακή αναγνώριση μελετήσαμε επίσης το καφεϊκό οξύ που αποτελεί πρόδρομη ένωση του ροσμαρινικού οξέος, όπως επίσης και το φερουλικό οξύ που είναι ένα μεθυλιωμένο παράγωγο του καφεϊκού οξέος. Επειδή το ροσμαρινικό οξύ έχει ένα στερεογονικό κέντρο μελετήσαμε τόσο το (S) όσο και το (R) εναντιομερές (Ticli et al, 2005).

Τέλος, η πολύ πρόσφατη δημοσίευση των Dharmappa et al (2009) ότι το ολεανολικό οξύ αναστέλλει την  $sPLA_2$  και παρουσιάζει αντιφλεγμονώδη δράση μας ώθησε να συμπεριλάβουμε στη μελέτη μας και αυτή την ένωση.

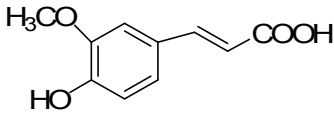
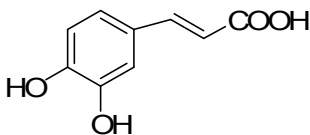
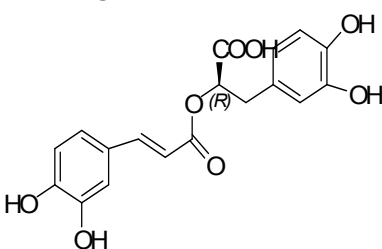
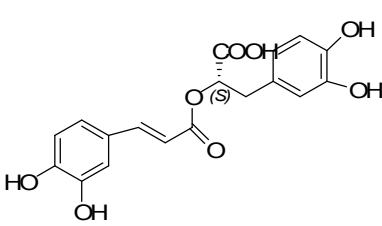
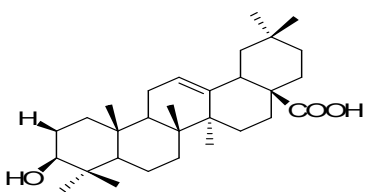
Θα πρέπει να τονίσουμε ότι η εκκριτική φωσφολιπάση  $A_2$  εμπλέκεται στην παραγωγή προφλεγμονωδών μεσολαβητών και οι αναστολείς της παρουσιάζουν ιδιαίτερο ενδιαφέρον για την εύρεση και ανάπτυξη νέων αντιφλεγμονωδών φαρμάκων.

## B.2.4 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

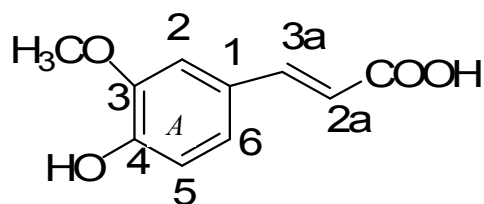
Όπως φαίνεται στον Πίνακα 2.1, το φερουλικό οξύ έχει παρόμοια δομή με το καφεϊκό οξύ και φαίνεται ότι αλληλεπιδρούν παρόμοια στο ενεργό κέντρο του ενζύμου και έχουν πολύ κοντινό GOLDScore Fitness. Επιπλέον παρατηρούμε διαφορά στο GOLDScore Fitness μεταξύ (*R*)-ροσμαρινικού οξέος και (*S*)-ροσμαρινικού οξέος με καλύτερο GOLDScore Fitness για το (*S*)-ροσμαρινικό οξύ. Τέλος το ολεανολικό οξύ παρουσιάζει πολύ μικρό GOLDScore Fitness.

Εδώ πρέπει να σημειωθεί ότι το GOLDScore Fitness είναι η συνολική ενέργεια του μορίου και μας ενδιαφέρει να έχει μεγάλη τιμή σε σύγκριση με τα άλλα μόρια, το Gsc HBond αναφέρεται στην ενέργεια λόγω δεσμών υδρογόνου και το Gsc Vdw στην ενέργεια λόγω Van der Waals αλληλεπιδράσεων.

Πίνακας 2.1: Δομές και ενέργειες ενώσεων.

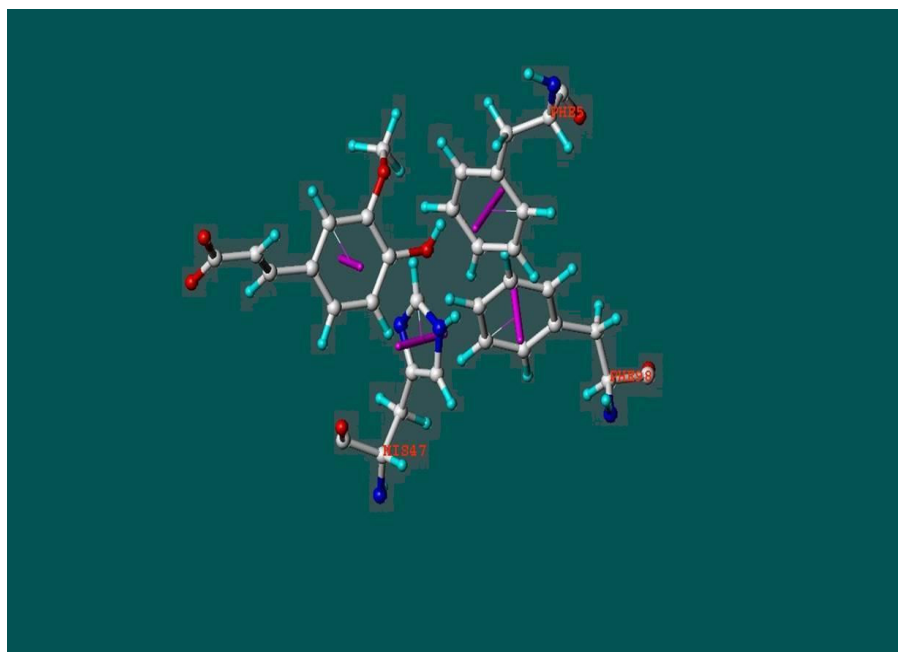
<i>a.a.</i>	Όνομα	Δομή	<i>Gsc. Fit.</i>	<i>Gsc. HBond</i>	<i>Gsc. Vdw</i>
1	Φερουλικό οξύ		36.32	21.96	26.11
2	Καφεϊκό οξύ		38.96	21.13	24.99
3	( <i>R</i> )-Ροσμαρινικό οξύ		61.32	18.90	49.19
4	( <i>S</i> )-Ροσμαρινικό οξύ		71.23	29.46	49.46
5	Ολεανολικό οξύ		17.07	7.05	22.99

### B.2.4α Φερουλικό οξύ



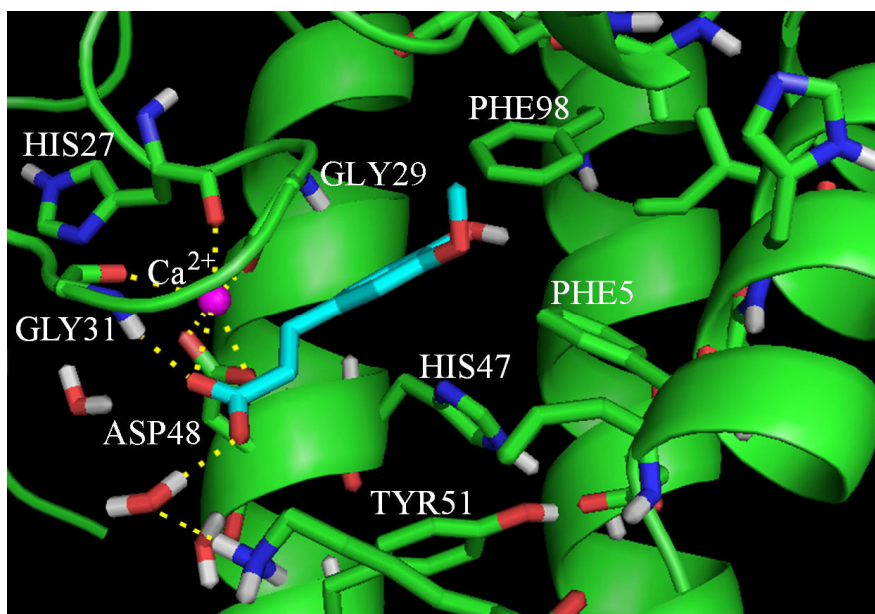
Σχήμα 2.13: Δομή και αρίθμηση φερουλικού οξέος.

Στο Σχήμα 2.13 φαίνεται η δομή και η αρίθμηση του μορίου του φερουλικού οξέος. Στην Εικόνα 2.1 παρουσιάζονται τα κάθετα διανύσματα που διέρχονται από τα κεντροειδή των αρωματικών αλληλεπιδράσεων που συμμετέχουν σε αρωματικές (π-π) αλληλεπιδράσεις. του φερουλικού οξέος που βρέθηκε με το SYBYL 8.0.



Εικόνα 2.1: Δομή και μέτρηση γωνιών με το SYBYL. 8.0.

Στην Εικόνα 2.2 φαίνεται ο τρόπος τοποθέτησης του φερουλικού οξέος στο ενεργό κέντρο της φωσφολιπάσης sPLA<sub>2</sub>.



Εικόνα 2.2: Τρόπος τοποθέτησης του φερουλικού οξέος στην φωσφολιπάση sPLA<sub>2</sub>.

Το φερουλικό οξύ παρουσιάζει τις εξής αλληλεπιδράσεις με το ενεργό κέντρο του ενζύμου:

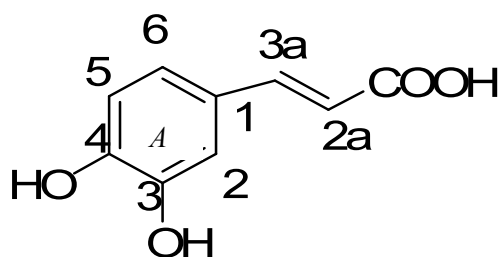
- (i) Ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις: α) μεταξύ του COOH με το Ca<sup>2+</sup> (COO<sup>-</sup>... Ca<sup>2+</sup> 2.72 Å)
- (ii) Δεσμοί υδρογόνου: α) του COOH με Gly31 (O...H-N 2.16 Å και O...N 3.10 Å) και β) COOH με την Lys62 μέσω ενός μορίου νερού (O...H-O...H-N 2.40 Å, 1.90 Å και O...O...N 3.40 Å, 2.90 Å)
- (iii) π-stacking αλληλεπιδράσεις του αρωματικού δακτυλίου A του φερουλικού οξέος με τα αμινοξέα Phe5, His47 και Phe98.

Οι αλληλεπιδράσεις συνοψίζονται στον Πίνακα 2.2.

Πίνακας 2.2: Αλληλεπιδράσεις φερουλικού οξέος.

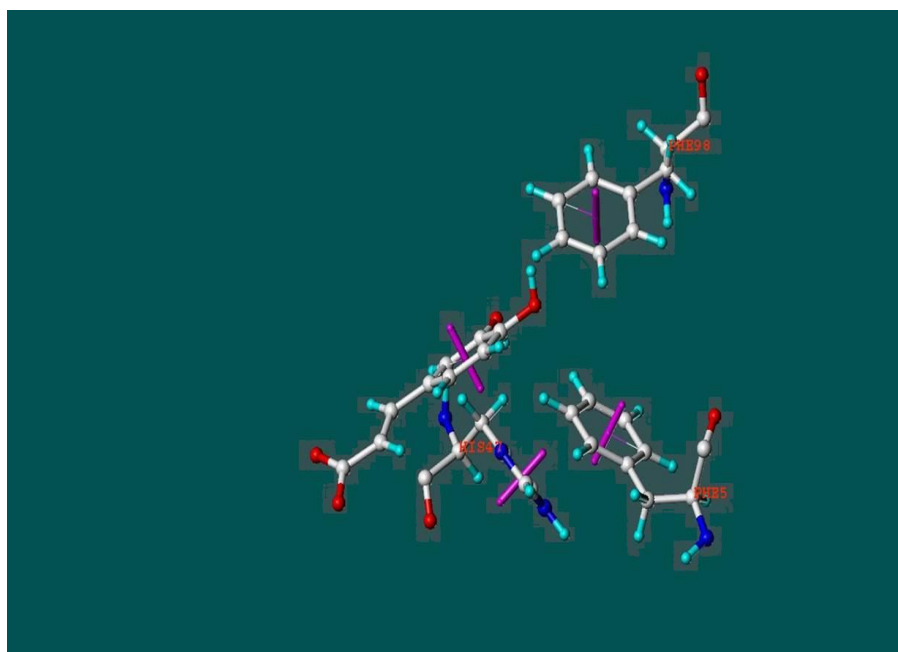
COO <sup>-</sup> ... Ca <sup>2+</sup> (COOH)	2.72 Å
GLy 31 N-H...O (COOH)	2.16 Å
GLy 31 N...O (COOH)	3.10 Å
O...H-O...H-N (COOH- H <sub>2</sub> O <sub>13</sub> - Lys62)	2.40 Å, 1.90 Å
O...O...N (COOH- H <sub>2</sub> O <sub>13</sub> - Lys62)	3.40 Å, 2.90 Å
Αλληλεπίδραση	Απόσταση και γωνίες
A- PHE5	5.62 Å, θ= 4°
A- PHE98	6.75 Å, θ= 42°
A-HIS47	4.92 Å, θ= 86°

## B.2.4β Καφεϊκό οξύ



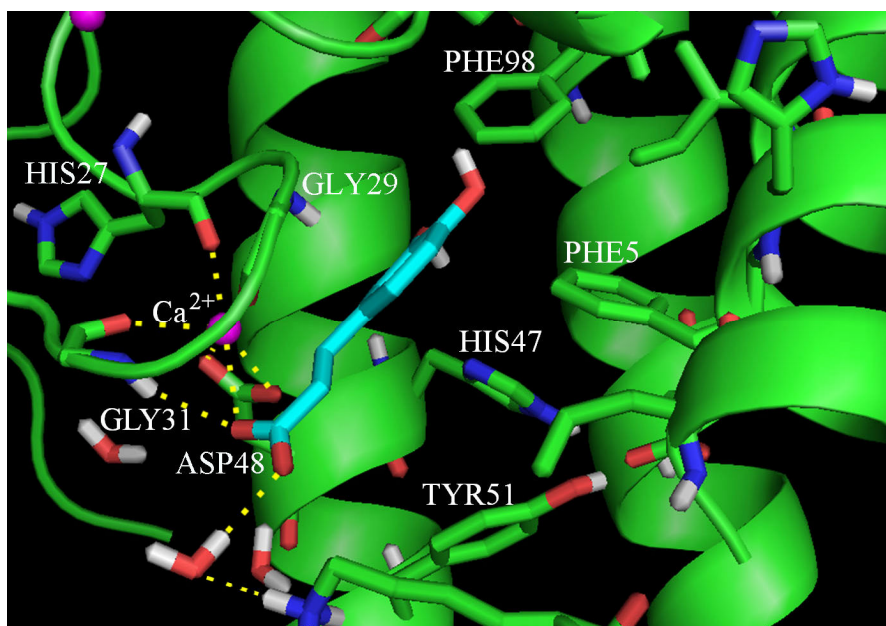
Σχήμα 2.14: Δομή και αρίθμηση καφεϊκού οξέος.

Στο Σχήμα 2.14 φαίνεται η δομή και η αρίθμηση του μορίου του καφεϊκού οξέος. Στην Εικόνα 2.3 παρουσιάζονται τα κάθετα διανύσματα που διέρχονται από τα κεντροειδή των αρωματικών αλληλεπιδράσεων που συμμετέχουν σε αρωματικές (π-π) αλληλεπιδράσεις. του καφεϊκού οξέος που βρέθηκε με το SYBYL 8.0.



Εικόνα 2.3: Δομή και μέτρηση γωνιών με το SYBYL.8.0.

Στην Εικόνα 2.4 φαίνεται ο τρόπος τοποθέτησης του καφεϊκού οξέος στο ενεργό κέντρο του ενζύμου (φωσφολιπάσης sPLA<sub>2</sub>).



Εικόνα 2.4: Τρόπος τοποθέτησης του καφεϊκού οξέος στην φωσφολιπάση sPLA<sub>2</sub>.

Το καφεϊκό οξύ παρουσιάζει τις εξής αλληλεπιδράσεις με το ενεργό κέντρο του ενζύμου:

- (i) Ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις: α) μεταξύ του COOH με το Ca<sup>2+</sup> (COO<sup>-</sup>... Ca<sup>2+</sup> 2.88 Å)
- (ii) Δεσμοί υδρογόνου: α) COOH με Gly31 (O...H-N 2.66 Å και O...N 3.64 Å) και β) COOH με την Lys62 μέσω ενός μορίου νερού (O...H-O...H-N 2.40 Å, 1.90 Å και O...O...N 3.40 Å, 2.90 Å)
- (iii) π-stacking αλληλεπιδράσεις του αρωματικού δακτυλίου A του καφεϊκού οξέος με τα αμινοξέα Phe5, His47 και Phe98.

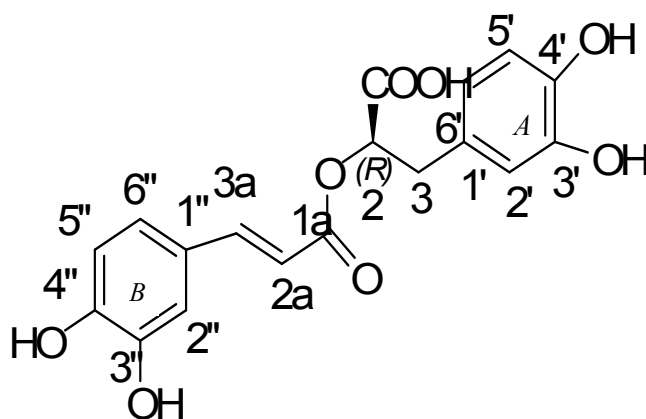
Οι αλληλεπιδράσεις συνοψίζονται στον Πίνακα 2.3.

Πίνακας 2.3: Αλληλεπιδράσεις καφεϊκού οξέος.

COO <sup>-</sup> ... Ca <sup>2+</sup> (COOH)	2.88 Å
GLy 31 N-H...O (COOH)	2.66 Å
GLy 31 N...O (COOH)	3.64 Å
O...H-O...H-N (COOH- H <sub>2</sub> O <sub>13</sub> - Lys62)	2.40 Å, 1.90 Å
O...O...N (COOH- H <sub>2</sub> O <sub>13</sub> - Lys62)	3.40 Å, 2.90 Å
Αλληλεπίδραση	Απόσταση και γωνίες
A- PHE5	5.33 Å, θ= 22°
A- PHE98	6.73 Å, θ= 46°
A-HIS47	5.10 Å, θ= 68°

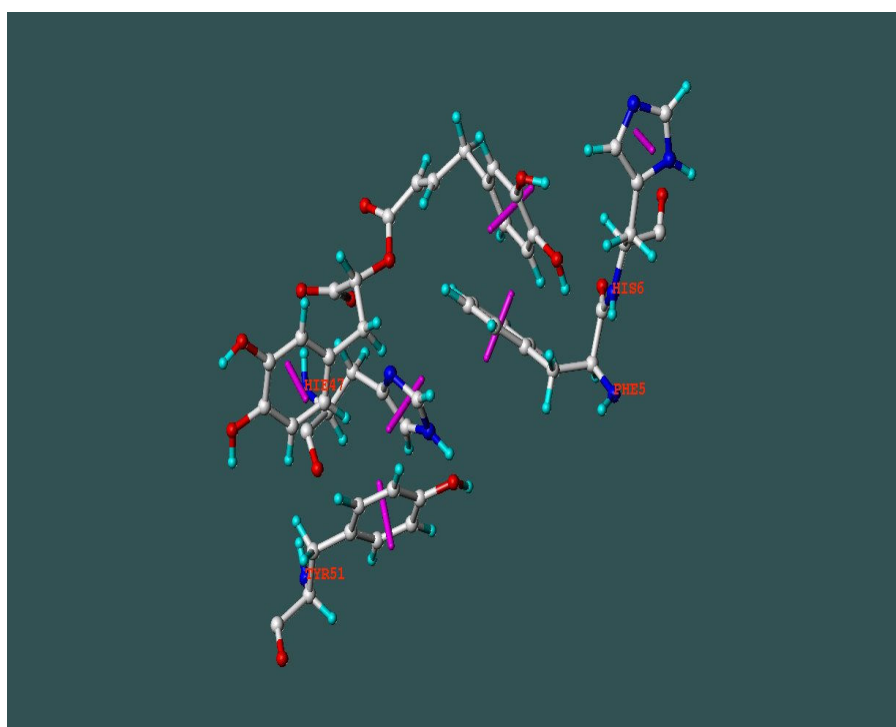


### B.2.4γ (*R*)-Ροσμαρινικό οξύ



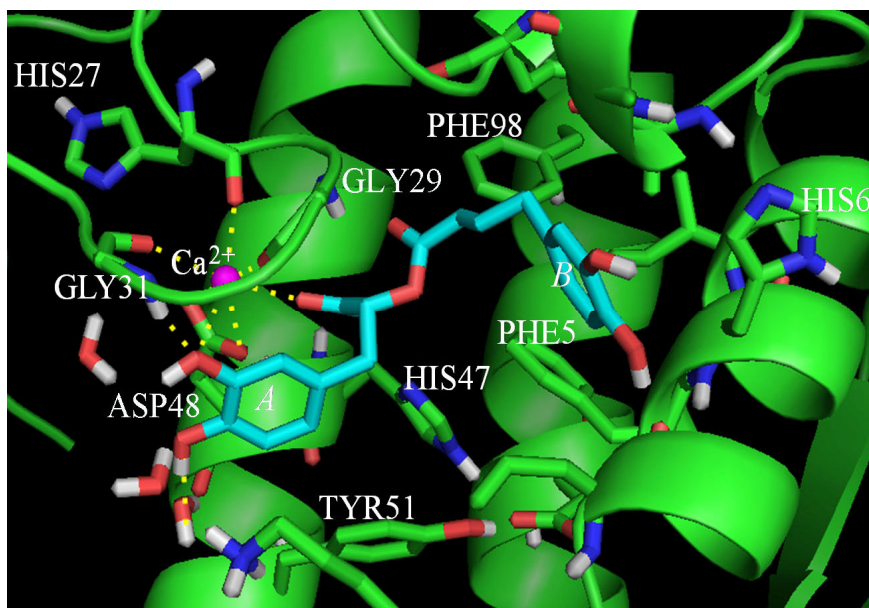
Σχήμα 2.15: Δομή και αριθμηση (*R*)-ροσμαρινικού οξέος.

Στο Σχήμα 2.15 φαίνεται η δομή και η αριθμηση του μορίου του (*R*)-ροσμαρινικού οξέος. Στην Εικόνα 2.5 παρουσιάζονται τα κάθετα διανύσματα που διέρχονται από τα κεντροειδή των αρωματικών αλληλεπιδράσεων που συμμετέχουν σε αρωματικές (π-π) αλληλεπιδράσεις του (*R*)-ροσμαρινικού οξέος που βρέθηκε με το SYBYL 8.0.



Εικόνα 2.5: Δομή και μέτρηση γωνιών με το SYBYL 8.0.

Στην Εικόνα 2.6 φαίνεται ο τρόπος τοποθέτησης του (*R*)-ροσμαρινικού οξέος στο ενεργό κέντρο της φωσφολιπάσης sPLA<sub>2</sub>.



Εικόνα 2.6: Τρόπος τοποθέτησης του (*R*)-ροσμαρινικού οξέος στην φωσφολιπάση sPLA<sub>2</sub>.

Το (*R*)-ροσμαρινικό οξύ παρουσιάζει τις εξής αλληλεπιδράσεις:

(i) Ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ α) της υδροξυλομάδας του 3'-OH του δακτυλίου *A* με το Ca<sup>2+</sup> (H-O... Ca<sup>2+</sup> 2.97 Å) και β) του COOH με το Ca<sup>2+</sup> (COO<sup>-</sup>... Ca<sup>2+</sup> 2.51 Å)

(ii) Δεσμοί υδρογόνου: α) 3'-OH του δακτυλίου *A* με Gly31 (O...H-N 1.78 Å και O...N 2.77 Å) και β) 4'-OH του δακτυλίου *A* με το H<sub>2</sub>O (O...H-O...H-N 1.21 Å και O...O...N 2.16 Å)

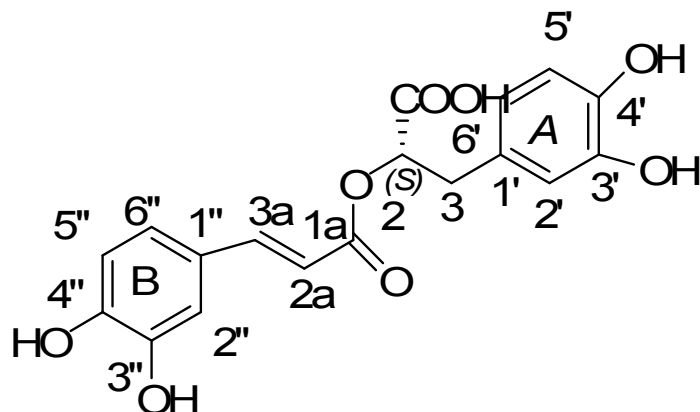
(iii) π-stacking αλληλεπιδράσεις των αρωματικών δακτυλίων *A* και *B* του (*R*)-ροσμαρινικού οξέος με τα αμινοξέα Phe5, His6, His47 και Tyr51. Πιο συγκεκριμένα, ο δακτύλιος *A* παρουσιάζει π-π αλληλεπιδράσεις με τα αμινοξέα His47 και Tyr51, ενώ ο δακτύλιος *B* με τα αμινοξέα Phe5 και His6.

Οι αλληλεπιδράσεις συνοψίζονται στον Πίνακα 2.4.

Πίνακας 2.4: Αλληλεπιδράσεις (*R*)-ροσμαρινικού οξέος.

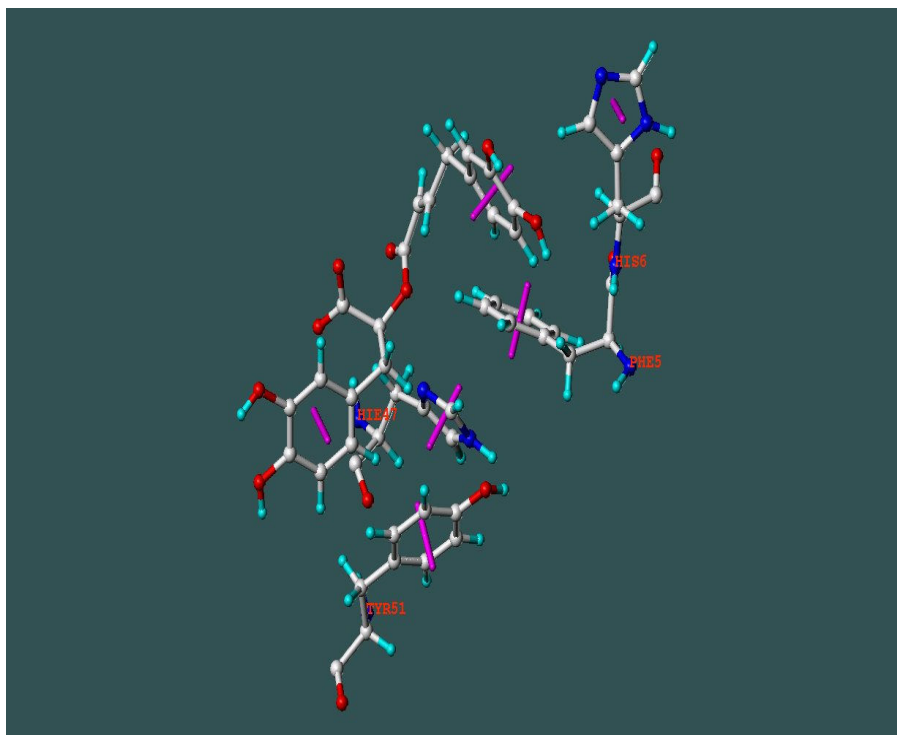
Ca <sup>2+</sup> ...O-H ( το -OH του C3')	2.97 Å
GLy 31 N-H...O (το -OH του C3')	1.78 Å
GLy 31 N...O (το -OH του C3')	2.77 Å
H <sub>2</sub> O 20 O...O (το -OH του C4')	2.16 Å
H <sub>2</sub> O 20 OH...O (το -OH του C4')	1.21 Å
Ca <sup>2+</sup> ...COO <sup>-</sup> ( του COOH)	2.51 Å
<b>Αλληλεπίδραση</b>	<b>Απόσταση και γωνίες</b>
<i>A</i> - TYR51	5.20Å, θ= 34 °
<i>A</i> - HIS47	6.00 Å, θ= 74 °
<i>B</i> -HIS6	5.42 Å, θ= 12 °
<i>B</i> -PHE5	5.50 Å, θ= 23 °

### B.2.4δ (*S*)-Ροσμαρινικό οξύ



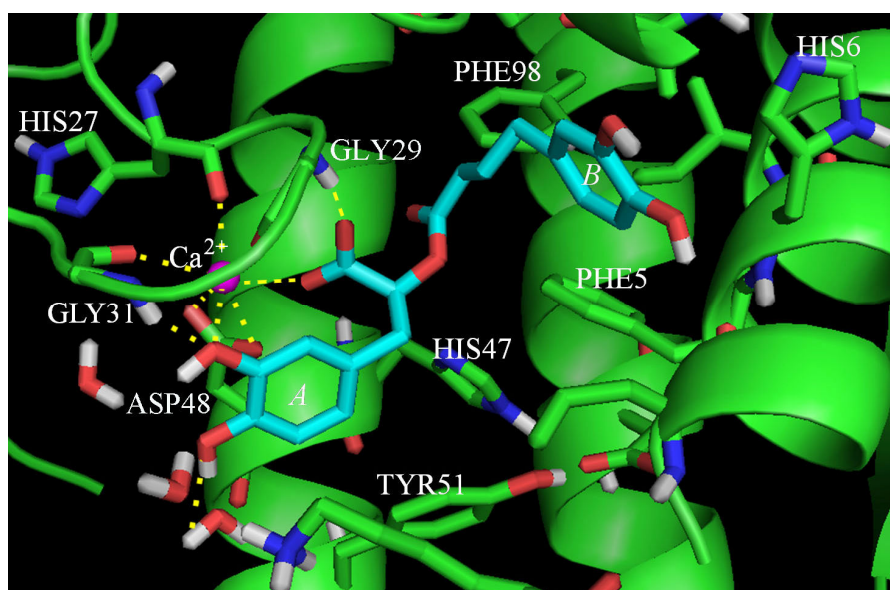
Σχήμα 2.16: Δομή και αρίθμηση του (*S*)-ροσμαρινικού οξέος.

Στο Σχήμα 2.16 φαίνεται η δομή και η αρίθμηση του μορίου (*S*)-ροσμαρινικού οξέος. Στην Εικόνα 2.7 παρουσιάζονται τα κάθετα διανύσματα που διέρχονται από τα κεντροειδή των αρωματικών αλληλεπιδράσεων που συμμετέχουν σε αρωματικές ( $\pi$ - $\pi$ ) αλληλεπιδράσεις. του (*S*)-ροσμαρινικού οξέος που βρέθηκε με το SYBYL 8.0.



Εικόνα 2.7: Δομή και μέτρηση γωνιών με το SYBYL 8.0.

Στην Εικόνα 2.8 φαίνεται ο τρόπος τοποθέτησης του (*S*)-ροσμαρινικού οξέος στο ενεργό κέντρο του ενζύμου (φωσφολιπάσης sPLA<sub>2</sub>).



Εικόνα 2.8: Τρόπος τοποθέτησης του (*S*)-ροσμαρινικού οξέος στην φωσφολιπάση sPLA<sub>2</sub>.

Το (*S*)-ροσμαρινικό οξύ παρουσιάζει τις εξής αλληλεπιδράσεις με το ενεργό κέντρο του ενζύμου:

(i) Ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ α) της υδροξυλομάδας του 3'-OH του δακτυλίου *A* με το Ca<sup>2+</sup> (H-O... Ca<sup>2+</sup> 2.61 Å) και β) του COOH με το Ca<sup>2+</sup> (COO<sup>-</sup>... Ca<sup>2+</sup> 2.40 Å)

(ii) Δεσμοί υδρογόνου: α) 3'-OH του δακτυλίου *A* με Gly31 (O...H-N 1.98 Å και O...N 2.94 Å), β) 4'-OH του δακτυλίου *A* με το H<sub>2</sub>O (O...H-O...H-N 1.30 Å και O...O...N 2.16 Å) και γ) το COOH με Gly29 (O...H-N 1.40 Å και O...N 2.30 Å)

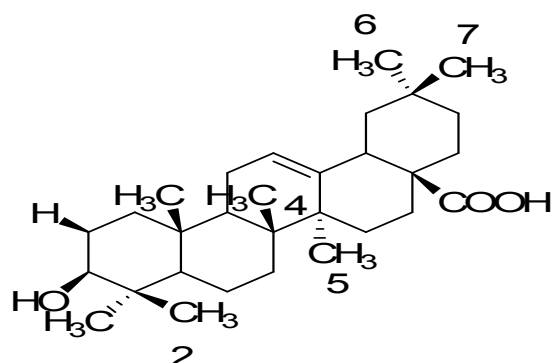
(iii) π-stacking αλληλεπιδράσεις των αρωματικών δακτυλίων *A* και *B* του (*S*)-ροσμαρινικού οξέος με τα αμινοξέα Phe5, His6, His47 και Tyr51. Πιο συγκεκριμένα, ο δακτύλιος *A* παρουσιάζει π-π αλληλεπιδράσεις με τα αμινοξέα His47 και Tyr51, ενώ ο δακτύλιος *B* με τα αμινοξέα Phe5 και His6.

Οι αλληλεπιδράσεις συνοψίζονται στον Πίνακα 2.5.

Πίνακας 2.5: Αλληλεπιδράσεις (S)-ροσμαρινικού οξέος.

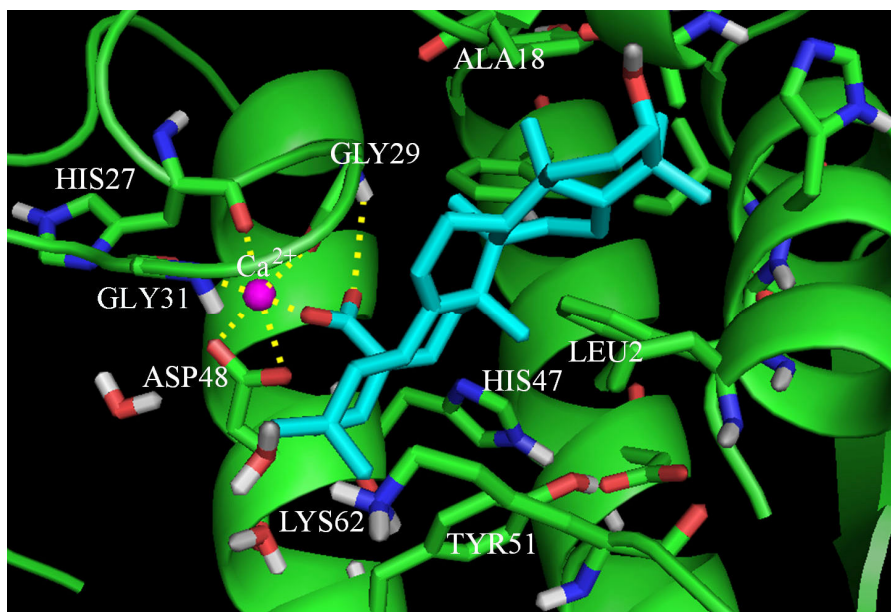
Ca <sup>2+</sup> ...COO <sup>-</sup> ( του COOH)	2.40 Å
Ca <sup>2+</sup> ...O-H( το -OH του C3')	2.61 Å
GLy 31 N-H...O (το -OH του C3')	1.98 Å
GLy 31 N...O (το -OH του C3')	2.94 Å
H <sub>2</sub> O 20 O...O (το -OH του C4')	2.22 Å
H <sub>2</sub> O 20 OH...O (το -OH του C4')	1.30 Å
GLy 29 N-H...O ( του COOH)	1.40 Å
GLy 29 N...O ( του COOH)	2.94 Å
<i>A</i> - TYR51	5.02 Å, θ= 40 °
<i>A</i> - HIS47	5.71 Å, θ= 65 °
<i>B</i> -HIS6	5.61 Å, θ= 9 °
<i>B</i> -PHE5	5.36 Å, θ= 13 °

### Β.2.4ε Ολεανολικό οξύ



Σχήμα 2.17: Δομή και αρίθμηση του ολεανολικού οξέος.

Στο Σχήμα 2.17 φαίνεται η δομή και η αρίθμηση του μορίου του ολεανολικού οξέος. Στην Εικόνα 2.9 φαίνεται ο τρόπος τοποθέτησης του ολεανολικού οξέος στο ενεργό κέντρο του ενζύμου (φωσφολιπάσης sPLA<sub>2</sub>).



Εικόνα 2.9: Τρόπος τοποθέτησης του ολεανολικού οξέος στην φωσφολιπάση sPLA<sub>2</sub>.

Σε αυτό το μόριο μας απασχόλησαν οι VdW αλληλεπιδράσεις, που το όριο για να δεχτούμε την ύπαρξη αλληλεπίδρασης είναι τα 4.00 Å. Έχουμε αλειφατικές – αλειφατικές αλληλεπιδράσεις και αρωματικές – αλειφατικές.

Πιο συγκεκριμένα παρατηρούνται:

- (i) Ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις: μεταξύ του COOH με το Ca<sup>2+</sup> (COO<sup>-</sup>... Ca<sup>2+</sup> 1.55 Å)
- (ii) Δεσμοί υδρογόνου του COOH με Gly29 (O...H-N 2.88 Å και O...N 3.77 Å)
- (iii) αλειφατικές- αλειφατικές αλληλεπιδράσεις της Leu2 με το μεθύλιο-5 (CH<sub>3</sub>-(5)) και με το μεθύλιο-4 (CH<sub>3</sub>-(4)).
- (iv) αρωματικές-αλειφατικές αλληλεπιδράσεις της His47 με το μεθύλιο-6 (CH<sub>3</sub>-(6)).
- (v) Van der walls αλληλεπιδράσεις του μεθυλίου-2 με την Ala18.

Οι αλληλεπιδράσεις συνοψίζονται στον Πίνακα 2.6.

Πίνακας 2.6: Αλληλεπιδράσεις ολεανολικού οξέος.

Ca <sup>2+</sup> ...COO <sup>-</sup> ( του COOH)	1.55 Å
GLy 29 N-H...O ( του COOH)	2.88 Å
GLy 29 N...O ( του COOH)	3.77 Å
Ala18 (C) – C <sub>H</sub> 3 (του C2)	3.94 Å
Ala18 (O) - C <sub>H</sub> 3 (του C2)	3.36 Å
Leu2 - C <sub>H</sub> 3 (του C5)	3.75 Å
Leu2 - C <sub>H</sub> 3 (του C4)	2.76 Å
HIS47 - C <sub>H</sub> 3 (του C6)	3.70 Å



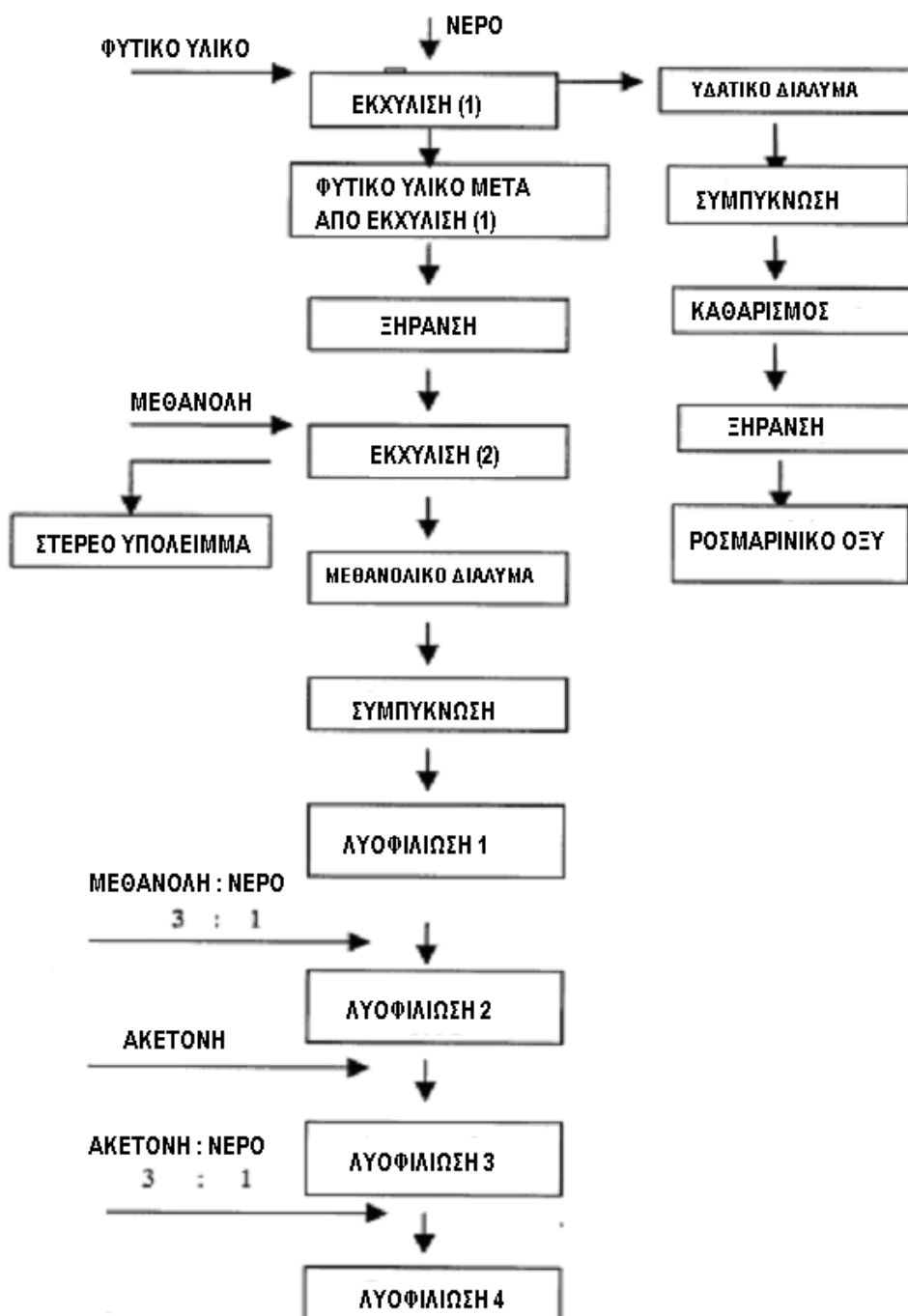
## Γ. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ - ΣΥΖΗΤΗΣΗ

### **Γ.1 Απομόνωση ροσμαρινικού οξέος απο το φυτό *Rosmarinus officinalis***

Το δενδρολίβανο (*Rosmarinus officinalis*) χρησιμοποιήθηκε ως πρώτη ύλη για την απομόνωση των πολικών φαινολικών συστατικών του. Σύμφωνα με τους Bano et al. (2003) η περισσότερη ποσότητα ροσμαρινικού οξέος απομονώνεται από το δενδρολίβανο με εκχύλιση με H<sub>2</sub>O, ακολουθώντας το διάγραμμα του Σχήματος 3. Στην δική μας όμως περίπτωση, αυτή η πορεία οδήγησε στην απομόνωση παραγώγου του ροσμαρινικού οξέος, σε μικρή ποσότητα και ως μίγμα με άλλα φαινολικά συστατικά.

Σε άλλη μελέτη, οι Huafu Wang et al. (2003) κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι τα φαινολικά οξέα ροσμαρινικό και καφεϊκό απομονώνονται καλύτερα με εκχύλιση χρησιμοποιώντας μίγμα CH<sub>3</sub>OH : H<sub>2</sub>O. Για αυτό δοκιμάστηκε η χρήση CH<sub>3</sub>OH : H<sub>2</sub>O αναλογίας 70 : 30, οπότε πράγματι η απομόνωση του παραγώγου του ροσμαρινικού οξέος είναι αποτελεσματικότερη σε σχέση με την εκχύλιση με μόνο του το H<sub>2</sub>O.

Το κλάσμα που απομονώθηκε μελετήθηκε με τη βοήθεια της φασματοσκοπίας NMR που έδειξε ότι το περιεχόμενο ροσμαρινικό οξύ δεν είναι ελεύθερο, αλλά δεσμευμένο. Αυτό συμφωνεί με την αναφορά των Luthria and Mukhopadhyay (2006) στο ότι στη φύση οι φαινολικές ενώσεις απαντούν συχνότερα υπό την μορφή γλυκοζιτών ή εστέρων, παρά σε ελεύθερη κατάσταση και συνεπώς πολλές φυτικές φαινόλες αποτελούν το άγλυκο τμήμα γλυκοζιτών.



Σχήμα 3: Διαγραμματική απεικόνιση απομόνωσης ροσμαρινικού οξέος από το φυτό *Rosmarinus officinalis* σύμφωνα με τους Bano et al. (2003). Το καλύτερο κλάσμα ήταν αυτό που εκχυλίστηκε με H<sub>2</sub>O.

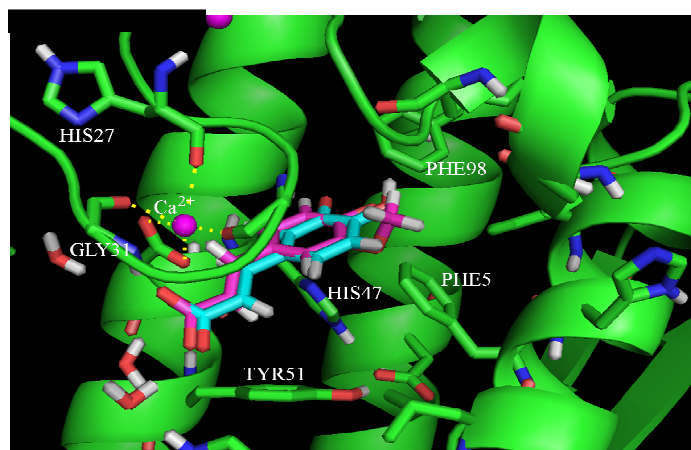
## Γ.2 Μελέτη της αλληλεπίδρασης φαινολικών οξέων και τερπενίων με την εκκριτική φωσφολιπάση A<sub>2</sub> (GIIA sPLA<sub>2</sub>)

Μελετήθηκαν τα φαινολικά οξέα, (*R*)- και (*S*)-ροσμαρινικό οξύ, καφεϊκό και φερουλικό, καθώς και το ολεανολικό οξύ, που ανήκει στην κατηγορία των τερπενίων, με τη βοήθεια της μοριακής μοντελοποίησης. Έγινε πρόσδεση στο ενεργό κέντρο της GIIA sPLA<sub>2</sub> και βρέθηκε ότι από τα φαινολικά οξέα, το (*S*)-ροσμαρινικό οξύ έχει το καλύτερο GOLDScore Fitness, ενώ το φερουλικό οξύ το χειρότερο. Το ολεανολικό οξύ, που ανήκει στην κατηγορία των τερπενίων, παρουσιάζει πολύ κακό GOLDScore Fitness, υποδηλώνοντας ότι τέτοιου είδους μόρια δεν μπορούν να διευθετηθούν καλά στο ενεργό κέντρο της GIIA sPLA<sub>2</sub>.

Πιο συγκεκριμένα, φαίνεται ότι υπάρχουν οι εξής ομοιότητες μεταξύ των ενώσεων φερουλικό οξύ και καφεϊκό οξύ:

1. Το COOH είναι απαραίτητο για τις ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις με το Ca<sup>2+</sup>.
2. Το COOH είναι απαραίτητο για τους δεσμούς υδρογόνου που αναπτύσσονται με τη Gly31.
3. Το COOH είναι απαραίτητο για τους δεσμούς υδρογόνου που αναπτύσσονται με τη Lys62 μέσω ενός μορίου νερού.
4. Ο δακτύλιος A είναι απαραίτητος για την ανάπτυξη π-π stacking με Phe5, His47 και Phe98

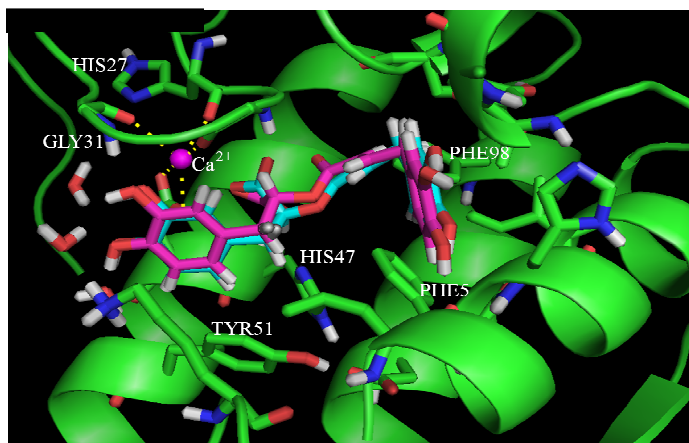
Ακόμα καλύτερα μπορούμε να διαπιστώσουμε τις ομοιότητες και τις διαφορές τους στις Εικόνες υπέρθεσης. Στην Εικόνα 3.1 μπορούμε να δούμε τις ομοιότητες και τις διαφορές του καφεϊκού οξέος (με γαλάζιο χρώμα) και του φερουλικού οξέος (με ροζ χρώμα).



Εικόνα 3.1. Ομοιότητες και διαφορές του καφεϊκού οξέος και του φερουλικού οξέος.

Στην Εικόνα 3.2 μπορούμε να παρατηρήσουμε τις ομοιότητες και τις διαφορές πρόσδεσης μεταξύ (*R*)-ροσμαρινικού οξέος (με γαλάζιο χρώμα) και (*S*)-ροσμαρινικού οξέος (με ροζ χρώμα) και να καταλήξουμε στα ακόλουθα συμπεράσματα:

1. Το COOH και το 3'-OH του δακτυλίου *A* είναι απαραίτητα για τις ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις με το Ca<sup>2+</sup>.
2. Το 3'-OH είναι απαραίτητο για τους δεσμούς υδρογόνου που αναπτύσσονται με τη Gly31
3. Το 4'-OH του δακτυλίου *A* για τους δεσμούς υδρογόνου που αναπτύσσονται με το H<sub>2</sub>O 20
4. Το COOH είναι απαραίτητο για τους δεσμούς υδρογόνου που αναπτύσσονται με τη Lys62 μέσω ενός μορίου νερού.
5. Ο δακτύλιος *A* είναι απαραίτητος για την ανάπτυξη π-π stacking με τα αμινοξέα His47 και Tyr51 ενώ ο δακτύλιος *B* με τα αμινοξέα Phe5 και His6.



Εικόνα 3.2 Ομοιότητες και διαφορές των (*R*)-ροσμαρινικού οξέος και (*S*)-ροσμαρινικού οξέος.

## Δ. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Anderson, R.F., Fisher, L.J., Hara, Y., Harris, T., Mak, W.B., Melton, L.D. and Packer, J. E. Green Tea Catechins Partially Protect DNA From (.) OH radicalinduced Strand Breaks and Base Damage Through Fast Chemical Repair of DNA Radicals. *Carcinogenesis*. 2001: 22 (8), pp. 1189-1193.
- Bano, M.J., Lorente, J., Castillo, J., Obdulio Benavente-García, O., Del Río, J.A., Ortuno, A., Quirin, K. and Gerard D. Phenolic Diterpenes, Flavones and Rosmarinic Acid Distribution During the Development of Leaves, Flowers Stems and Roots of *Rosmarinus Officinalis*. Antioxidant Activity. *J Agric Food Chem*. 2003: 51, pp. 4247-4253.
- Banthorpe, D.V Classification of terpenoids and general procedures for their characterisation, *In: Methods in Plant Biochemistry*, Vol. 7 - Terpenoids (B.V. Charlwood, D.V. Banthorpe eds.). New York: Academic Press. 1991, pp. 1-41.
- Boyanovsky, BB and Webb, NR. Biology of secretory phospholipase A<sub>2</sub>. *Cardiovasc. Drugs Ther*. 2009; 23, pp. 61 – 72.
- Breitmaier, E. Terpenes: Flavors, Fragrances, Pharmaca, Pheromones. Weinheim: Wiley. 2006, pp. 223.
- Burke, JE. and Dennis EA. Phospholipase A<sub>2</sub> structure/function, mechanism, and signaling *J Lipid Res*. 2009; 50, pp. 237 – 242.
- Cheng, A.-X. Lou, Y.-G., Mao, Y.-B., Lu, S., Wang, L.-J. and Chen, X.-Y. Plant terpenoids: biosynthesis and ecological functions. *Journal of Intergrative Plant Biology*. 2007: 49, pp. 179-186.
- Cirico, TL. and Omaye, ST. Additive or synergetic effects of phenolic compounds on human low density lipoprotein oxidation. *Food Chem. Toxic*. 2005.
- Colic, M. and Pavelic, K. Molecular Mechanisms of Anticancer Activity of Natural Dietetic Products. *Journal of Molecular Medicine*. 2000: 78 (6), pp. 333–336.
- Croteau, R. Kutchan, TM. and Lewis, NG. Natural products (secondary metabolites) in *Biochemistry and Molecular Biology of Plants* (B. Buchanan,

W. Gruissem, R. Jones *eds.*). Rockville: American Society of Plant Biologists. 2000: pp. 1250-1318.

- Dharmappa, K.K., Kuman, R.K., Nataraju, A., Mohamed, R., Shivaprasad, H.V. and Vishwanath B.S. Anti-inflammatory activity of oleanolic acid by inhibition of secretory phospholipase A2. *Planta Med.* 2009; 75, pp. 211.
- Dixon, R.A. Natural products and plant disease resistance. *Nature.* 2001: 411, pp. 843-847.
- Dekker M. Phytochemicals in health and disease. *Free Radical Biology & Medicine.* 2004: 37 (12), pp. 2082-2086.
- De Silva, E.D. and Scheuer, P.J. Manoalide, An Antibiotic Sesterterpenoid from the Marine Sponge *Luffariella variabilis* (Polejaffe). *Tetrahedron Lett.* 1980; 21, pp. 1611 – 1614.
- Dubey, V.S. Bhalla, R. and Luthra, R. An overview of the non-mevalonate pathway for terpenoid biosynthesis in plants. *Journal of Biosciences* 2003: 28, pp. 637-646.
- Dufresne, J.C. and Farnworth, R.E. A Review of Latest Research Findings on the Health Promotion Properties of Tea. *Journal of Nutritional Biochemistry.* 2001: 12, pp. 404-421.
- Edwards, R. and Gatehouse, J.A. Secondary metabolism, *In: Plant Biochemistry and Molecular Biology* (P.J. Lea, R.C. Leegood *eds.*). New York: John Wiley and Sons. 1999, pp. 193-218.
- Exarchou, V., Troganis, A., Gerothanassis, I.P., Tsimidou, M. and Boskou, D. Identification and Quantification of Caffeic and Rosmarinic Acid in Complex Plant Extracts by the Use of Variable-Temperature Two-Dimensional Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy. *J. Agric. Food Chem.* 2001: 49, pp. 2-8.
- Garry, G.D., Peter, T., Gardner, A. Kyle, M. Plant Polyphenols: Are They the New Magic Bullet. *Proceedings of the Nutrition Society.* 2003: 62, pp. 599-603.
- Gerothanassis, I.P., Exarchou, V., Lagouri, V., Troganis, A., Tsimidou, M. and Boskou, D. Methodology for Identification of Phenolic Acids in Complex Phenolic Mixtures by High-Resolution Two-Dimensional Nuclear Magnetic Resonance. Application to Methanolic Extracts of Two Oregano Species. *J. Agric. Food Chem.* 1998: 46, pp. 4185 – 4192.

- Giovannelli, L., Testa, G., De Filippo, C., Cheynier, V., Clifford, M. N. and Dolara, P. Effect of Complex Polyphenols and Tannins From Red Wine on DNA Oxidative Damage of Rat Colon Mucosa in Vivo. *European Journal of Nutrition*. 2000; 39 (5), pp. 207-212.
- Harborne, J.B. and Baxter, H. *The Handbook of Natural Flavonoids*. Chichester: Wiley. 1999, pp. 1768.
- Harborne, J.B. Classes and functions of secondary products from plants, *In: Chemicals from Plants: Perspectives on Plant Secondary Products* (N.J. Walton, D.E. Brown eds.). London: Imperial College Press. 1999, pp. 1-25.
- Huafu, W., Provan, G.J. and Helliwell, K. Determination of rosmarinic acid and caffeic acid in aromatic herbs by HPLC. *Food Chemistry*. 2004; 87, pp. 307–311.
- Hunter, C., Singh, J. and Thotnton, J. J. Pi-Pi Interactions: The Geometry and Energetics of Phenylalanine-phenylalanine Interactions in Proteins. *Mol. Biol.* 1991, pp. 218.
- Kliebenstein, D.J. Secondary metabolites and plant/environment interactions: a view through *Arabidopsis thaliana* tinted glasses. *Plant, Cell and Environment*. 2004; 27, pp. 675- 684.
- Kosaka, K. and Yokoi, T. Carnosic Acid, a Component of Rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.), Promotes Synthesis of Nerve Growth Factor in T98G Human Glioblastoma Cells. *Biol. Pharm. Bull.* 2003; 6 (11), pp. 1620 – 1622.
- Krygier, K., Sosulski, F. and Hoggeet, L. Free, Esterified, and Insoluble-Bound Phenolic Acids. 1. Extraction and Purification Procedure. *J. Agric. Food Chem.* 1982; 30, pp. 330-334.
- Lambeau, G. and Gelb MH. Biochemistry and physiology of mammalian secreted phospholipase A<sub>2</sub>. *Annu. Rev. Biochem.* 2008; 77, pp. 495 – 520.
- Lattig, J., Bohl, M., Fischer, P., Tischer, S., Tietbohl, C., Menschikowski, M., Gutzeil, H.O., Metz, P. and Pisabarro M.T. Mechanism of inhibition of human secretory phospholipase A<sub>2</sub> by flavonoids: rationale for lead design. *J. Comput. Aided Mol. Des.* 2007; 21, pp. 473 – 483.
- Lindahl, M. and Tagesson, C. Flavonoids as phospholipase A<sub>2</sub> inhibitors: importance of their structure for selective inhibition of group II phospholipase A<sub>2</sub>. *Inflammation*. 1997; 21, pp. 347 – 356.

- Lodovici, M., Guglielmi, F, Meonim, M. and Dolara, P. Effect of Natural Phenolic Acids on DNA Oxidation in Vitro. *Food and Chemical Toxicology*. 2001: 39, pp. 1205-1210.
- Luthria, D and Mukhopadhyay, S. Influence of Sample Preparation on Assay of Phenolic Acids from Eggplant. *J. Agric. Food Chem.* 2006: 54, pp. 41 - 47.
- Manach, C., Scalbert, A., Morand, C., Remesy, C. and Jimenez, L. Polyphenols: Food sources and bioavailability. *Am. J. Clin. Nutr.* 2004: 79, pp. 727-747.
- Matilla, P., Pihlava, J. And Hellström, J. Contents of Phenolic Acids, Alkyl- and Alkenylresorcinols, and Avenanthramides in Commercial Grain Products. *J. Agric. Food Chem.* 2005: 53 pp. 8290 – 8295.
- McGarvey, D.J. and Croteau, R. Terpenoid metabolism. *Plant Cell*. 1995: 7 pp. 1015-1026.
- Morton, LW., Caccetta, R.A., Puddey, I.B. and Croft, K.D. Chemistry and biological effects of dietary phenolic compounds. *Clin. Exp. Pharmac. and Physiol.* 2000: 27, pp.152 – 159.
- Oksman-Caldentey, K.-M. and Inze, D. Plant cell factories in the post-genomic era: new ways to produce designer secondary metabolites. *Trends in Plant Science*. 2004: 9, pp. 433-440.
- Oleszek, W. Dietary phytochemicals and human health. *Phytochemistry Reviews*. 2002: 1, pp. 163–166.
- Randazzo, A., Debitus, C., Minale, L., Pastor, P.G., Alcazar, M.J., Paya, M. and Gomez, P. Petrosaspongiolides M – R: New Potent and Selective Phospholipase A<sub>2</sub> Inhibitors from the New Caledonian Marine Sponge *Petrosaspongia nigra*. *L. J. Nat. Prod.* 1998; 61, pp. 571.
- Reid, RC. Inhibitors of secretory phospholipase A<sub>2</sub> Group IIA. *Cur Med Chem.* 2005; 12, pp. 3011 – 3026.
- Robins, RJ. Phenolic acids in food. An overview of analytical methodology. *J. Agric. Food Chem.* 2003: 51, pp. 2866-87.
- Russo, A., Acquaviva, R., Campisi, A., Sorrenti, V., Di Giacomo, C., Virgata, G., Barcellona, M.L. and Vanella, A. Bioflavonoids as Antiradicals, Antioxidants and DNA Cleavage Protectors. *Cell Biology and Toxicology*. 2000: 16, pp. 91-98.



- Schaloske RH. and Dennis EA. The phospholipase A<sub>2</sub> superfamily and its group numbering system. *Biochim. Biophys. Acta.* 2006; 1761, pp. 1246 – 1259.
- Scott D.L.White, S.P., Otwinowski, Z., Yuan, W., Gelb, M.H. and Singer, P.B. Interfacial catalysis: the mechanism of phospholipase A<sub>2</sub>. *Science.* 1990; 250, pp. 1541 – 1546.
- Seilhamer, J., Pruzanski, W., Vadas, P, et al. Cloning and recombinant expression of phospholipase A<sub>2</sub> present in rheumatoid arthritis synovial fluid. *J. Biol. Chem.* 1989; 264, pp. 5335 – 5338.
- Shankel, D.M., Pillai, S.P., Telikepalli, H., Menon, S.R., Pillai, C.A. and Mitscher, L.A. Role of Antimutagens / Anticarcinogens in Cancer Prevention. *Biofactors.* 2000: 12 (1-4), pp. 113-121.
- Shi, X., Leonard, S. S., Ding, M., Vallyathan, M, Castranova, V.,. Rojanasaki, Y. and Dong, Z. Antioxidant Properties of (-)-epicatechin-3-gallate and its Inhibition of Cr (I)-Induced DNA Damage and Cr (CI) –or TPA- Stimulated NF-KB Activation. *Molecular and Cellular Biochemistry.* 2000: 206, pp. 125-132.
- Taiz, L. and Zeiger, E. *Plant Physiology*, Second ed. Sunderland: Sinauer Associates. 1998, pp. 792.
- Ticli, F.K., Hage, L.I.S., Cambraia, R.S., Pereira, P.S., Magro, A.J. Fontes, M.R.M., Stabel, R.G., Giglio, I.R., Franca, S.C., Soares, A.M. and Sampaio S.V. Rosmarinic acid, a new snake venom phospholipase A<sub>2</sub> inhibitor from *Cordia verbenacea* (Boraginaceae): anti serum action potentiation and molecular interaction. *Toxicon.* 2005; 46, pp. 318 – 327.
- Vickery, M.L. and Vickery, B. Introduction, In: *Secondary Plant Metabolism* ( M.L. Vickery, B. Vickery eds.). London: The MacMillan Press. 1981, pp. 1-19.
- Zadernowski, R., Naczki, M. and Nesterowicz, J. Phenolic Acid Profiles in Some Small Berries. *J. Agric. Food Chem.* 2005: 53, pp. 2118 – 2124.
- Zelic, B., Hadolin, M., Bauman, D. and Vasic-Racki, D. Recovery and Purification of Rosmarinic Acid from Rosemary Using Electrodialysis. *Acta Chim. Slov.* 2005: 52, pp. 126 – 130.

- Zupfer, J.M., Churchill, K.E., Rasmusson, D.C. and Fulcher, R.G. Variation in Ferulic Acid Concentration among Diverse Barley Cultivars Measured by HPLC and Microspectrophotometry. *J. Agric. Food Chem.* 1998: 46, pp. 1350 - 1354.
- Καραμπουρνιώτης, Γ. Δευτερογενής μεταβολισμός, Εντός: Φυσιολογία Φυτών: Από το Μόριο στο Περιβάλλον (Κ.Α. Ρουμπελάκη-Αγγελάκη eds.), Ηράκλειο: Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης. 2003.
- Καρατάγλης, Σ. Φυσιολογία φυτών. ΤΕΙ Δυτικής Μακεδονίας – Παράρτημα Φλώρινας. 1994.
- Μαυρομούστακος, Θ. και Ζουμπουλάκης Π. Μοριακή Μοντελοποίηση. Ιατρικές Εκδόσεις Γιάννης Β. Παρισιανός. 2008.
- Μούχλης, Βαρνάβας. Ορθολογικός σχεδιασμός καινοτόμων αναστολέων της ανθρώπινης εκκριτικής φωσφολιπάσης Α<sub>2</sub>. Μεταπτυχιακή Διατριβή. ΕΚΠΑ Τμήμα Χημείας, Αθήνα. 2007.
- Μπαλαμώτη, Χ. Μικροσυστατικά σε ελληνικά βότανα και αφεψήματα. Μεταπτυχιακή Διατριβή. Χαροκόπειο Πανεπιστήμιο. 2004.
- Πανουργιά, Α. Αντιοξειδωτικές και φυτοχημικές ουσίες στα βότανα και καρκίνος. Πτυχιακή εργασία. Χαροκόπειο Πανεπιστήμιο. 2004
- Ρουμπελάκη-Αγγελάκη, Κ. Φυσιολογία φυτών από το μόριο στο περιβάλλον. Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης. 2003.
- Στεφανάκη-Νικηφοράκη, Μ. Συστηματική Βοτανική – Αγγειόσπερμα. Τόμος Α'. Εκδόσεις Σταμούλη. 1999.

## ΙΣΤΟΣΕΛΙΔΕΣ

- <http://www.benbest.com/nutrceut/phytochemicals.html> (Δεκέμβριος 2009)
- <http://en.wikipedia.org/wiki/Rosemary> (Δεκέμβριος 2009)
- <http://www.pfaf.org/database/plants.php?Rosmarinus+officinalis> (Δεκέμβριος 2009)
- <http://www.botanical.com/botanical/mgmh/r/rosema17.html> (Δεκέμβριος 2009)
- <http://employees.csbsju.edu/hjakubowski/classes/ch331/protstructure/mechdynam2.html> (Δεκέμβριος 2009)
- <http://www.ccdc.cam.ac.uk/support/documentation/gold/4.1/gold/gold.1.1.html> (Δεκέμβριος 2009)