JARC

سنتز مشتقات جدیدی از پیرانوکرومن‌ها و بررسی ویژگی ضد باکتری آن‌ها

منظربانو اثنی عشری اصفهانی[۱و*]، اسماعیل وصالی[۲]، زهرا رستگار[۳] و زهرا اسدی[۴]

۱- دانشیار شیمی آلی، دانشکده شیمی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران شمال، تهران، ایران
۲- استادیار شیمی آلی، دانشگاه پیام نور تهران، ایران
۳- دانشجوی کارشناسی ارشد شیمی آلی، دانشکده شیمی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران شمال، تهران، ایران
۴- دانشجوی دکترای شیمی آلی، دانشکده شیمی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران شمال، تهران، ایران

دریافت: آذر ۱۳۹۴، بازنگری نخست: دی ۱۳۹۴، بازنگری دوم: بهمن ۱۳۹۴، پذیرش: اسفند ۱۳۹۴

چکیده: با توجه به اهمیت مشتقات کومارین به عنوان داروی مؤثر بر سلول‌های سرطانی و اثرات دارویی متنوع دیگر، در این پژوهش مشتقات جدیدی از کومارین با استفاده از ۴- هیدروکسی کومارین و ملدروم اسید در مجاور آلدهیدها (شامل: ۴- نیترو بنزآلدهید، ۳- نیترو بنزآلدهید،۴- کلرو بنزآلدهید و ۴- هیدروکسی بنزآلدهید) و در حضور پی پیریدین در دمای ۶۰ °C با استفاده از حلال‌های استون و اتانول سنتز شد، فراورده‌های به دست آمده با طیف سنجی FT-IR ، ^{1}H-NMR و ^{13}C-NMR شناسایی شدند. ویژگی ضد باکتری ترکیب‌های جدید سنتز شده با دو روش صفحه نفوذ وکمترین غلظت بازدارنده روی سه باکتری باسیل گرم منفی اشرشیاکلی، کلپ سیلاو سودوموناس و سه باکتری کوکسی گرم مثبت استافیلوکوک اپیدرمایتیس، استافیلوکوک ساپروفتیکوس واستافیلوکوکوس اوروئوس بررسی شد.

واژه‌های کلیدی: ۴- هیدروکسی کومارین، آلدهید، ملدرم اسید، روش دیسک دیفیوژن، روش MIC

مقدمه

واکنش کومارین با ملدروم اسید در حضور آلدهیدها یا کتون‌های متفاوت قابل توجه است. کومارین و مشتقات آن همانند ترکیبات حلقوی نقش مهمی در سنتز ترکیب‌های آلی ایفا می‌کنند. مطالعه‌ی روی کومارین‌ها از حدود ۲۰۰ سال قبل آغاز شده است و نام این گروه شیمیایی از روی ماده ای که کومارین‌ها نخستین بار از آن جدا شده‌اند، گرفته شده است [۱]. کومارین‌ها به طور گسترده در فعالیت‌های متابولیکی به وجود می‌آیند و کاربردهای فراوانی در مواد غذایی، مواد آرایشی و صنعت داروسازی دارند. امروزه با توجه به ویژگی‌های زیستی این ترکیب‌ها، تعداد زیادی از آن‌ها برای درمان نوین پاره ای از بیماری‌های سنتز شده‌اند [۲]. جلوگیری از تجمع پلاکت‌ها، ضد التهاب، ضد تشنج، ضد ویروس، ضد انعقاد، ضد اکسیدان، ضد میکروب، ضد سل، ضدحساسیت، ضد قارچ، ضد ویروس HIV و ضد سرطان از ویژگی‌های این گروه هستند [۳ و ۴]. از جمله روش‌های متفاوتی که از طریق آن‌ها می‌توان کومارین را سنتز کرد، واکنش‌های بکمن [۵ و ۶] ناونگل [۷ تا ۱۱] ویتیگ [۱۲] و رفرماتسکی [۱۳] را می‌توان نام برد. ۴- هیدروکسی کومارین برای نخستین بار توسط آن شوتز سنتز شد [۱۴ و ۱۵].

در این پژوهش از واکنش ۴- هیدروکسی کومارین با ملدروم اسید در مجاور آلدهیدها (شامل: ۴-نیترو بنزآلدهید، ۳-نیترو

*عهده‌دار مکاتبات: mb_esnaashari@yahoo.com

بنزآلدهید، ۴-کلرو بنزآلدهید) [۱۷]. مشتق‌های جدیدی از کرومن‌ها سنتز شدند که ویژگی ضد باکتری دارند و در صنایع دارویی می‌توانند مورد استفاده قرار گیرند. فرآورده‌های سنتز شده با روش‌های طیف‌سنجی FT-IR و ^{1}H-NMR و ^{13}C-NMR شناسایی و ویژگی ضدباکتری آن‌ها به دو روش [۱۸] MIC و دیسک دیفیوژن مورد بررسی قرار گرفت [۱۹].

بخش تجربی

مواد

مواد شیمیایی مورد آزمایش از شرکت مرک المان و سیگما آلدریچ هستند. واکنش‌ها تحت شرایط دمایی ۶۰ درجه سانتی‌گراد و در حلال‌های استون و اتانول، در مجاور پی پیریدین انجام گرفت. پیشرفت واکنش‌ها تحت کروماتوگرافی لایه‌ی نازک (TLC) ساخت مرک آلمان کنترل شد.

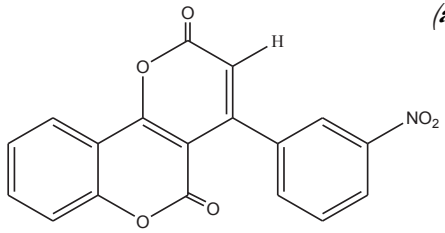
دستگاه‌ها

نقطه‌ی ذوب فراورده‌ها با استفاده از دستگاه Thermo SCIENTIFIC 9200 اندازه‌گیری شد. طیف FT-IR با استفاده از دستگاه Thermo SCIENTIFIC CLASS 1 LASER PRODUCT NICOLET 7800 بر روی قرص KBr انجام گرفت.

طیف‌های ^{1}H-NMR (رزونانس مغناطیسی هسته) به وسیله‌ی دستگاه Bruker -AVANCE AQS-300 MHZ و طیف‌های ^{13}C-NMR به وسیله‌ی دستگاه AVANCE AQS-75MHZ BRUKER– گرفته شد.

روش کار

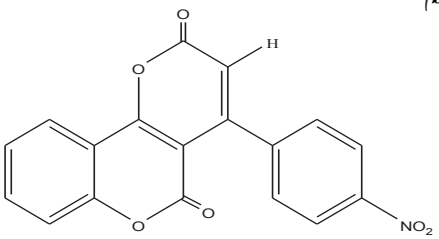
*سنتز ۴- (۳- نیتروفنیل) پیرانو [۳ و ۲- کربن] کرومن-۲ و ۵- دیان (**a**)*



به محلولی از ۰/۱۶ g (۱ mmol) از ۴ – هیدروکسی کومارین در حلال اتانول و ۰/۱۵ g (۱ mmol) از ملدروم اسید [۲۰] در حلال استون و اتانول که به همراه همزن مغناطیسی در دمای ۶۰ °C به هم زده می‌شد، مقدار ۰/۱۵ g (۱ mmol) از ۳ – نیترو بنزآلدهید افزوده شد و سپس دو الی سه قطره پی پیریدین به این مخلوط افزوده شد. در چند ثانیه‌ی اول رنگ محلول زرد شد و به مرور از بین رفت که نشان دهنده‌ی تشکیل حد واسط است. محلول به دست آمده برای مدتی به حالت آرام قرار گرفت و رسوب سفید رنگی با بازده ۹۰٪ به دست آمده که در نرمال هگزان غیر قابل حل بود. از این رو، رسوب با نرمال هگزان شست‌وشو داده و پس از خشک شدن نقطه ذوب آن‌ها گرفته شد. گستره‌ی نقطه ذوب برابر ۱۵۴ تا ۱۵۶ °C بود.

Yield 90%, White solid, mp: 154-156°C: IR (KBr) υ: 3028.97 (CH, sp2), 1681.92 (C=O), 1605.50 (C=C), 1527.33 and 1346.23 (NO_2) cm^{-1}; ^{1}H-NMR (DMSO, 300 MHz) (= 6.15 (1H, s, CH), 7.19 – 7.24 (2H, t, Aromaric, CH), 7.27 (1H, s, Ph), 7.48 – 7.56 (1H, t, Aromatic, CH), 7.66 (1H, d, J = 8.4 Hz, Aromatic, CH), 7.78 (2H, d, J = 7.8 Hz, Aromatic, CH), 7.91 (1H, d, J = 8.4 Hz, Aromatic, CH), 8.25 (2H, d, J = 7.8 Hz, Aromatic, CH) ppm; ^{13}C-NMR ($CDCl_3$, 75 MHz) δ= 102.1 – 152.3 (16 C Aromatic), 167.5 and 171.3 (C=O) ppm.

*سنتز ۴- (۴- نیتروفنیل) پیرانو [۳ و ۲- کربن] کرومن-۲ و ۵- دیان (**b**)*

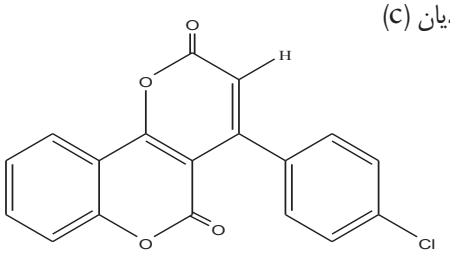


به محلولی از ۰/۱۶ g (۱ mmol) از ۴-هیدروکسی کومارین

در حلال اتانول و g ۰/۱۵ (۱ mmol) از ملدروم اسید در حلال استون و اتانول که با همزن مغناطیسی در دمای °C ۶۰ به هم زده می‌شد، مقدار g ۰/۱۵ (۱ mmol) از ۴-نیترو بنزآلدهید افزوده شد و سپس دو الی سه قطره پی پیریدین به این مخلوط افزوده شد. در چند ثانیه‌ی اول رنگ محلول زرد شد و به مرور از بین رفت که نشان دهنده‌ی تشکیل حد واسط است. محلول به دست آمده برای مدتی به حالت آرام قرار گرفت و رسوب سفید رنگی با بازده ۹۰٪ به دست آمده که در نرمال هگزان غیر قابل حل بود. از این رو، رسوب با نرمال هگزان شست‌وشو داده و پس از خشک شدن نقطه ذوب آن‌ها گرفته شد. گستره‌ی نقطه ذوب برابر ۱۸۰ تا °C ۱۸۲ بود.

Yield 90%, White solid, mp: 180-182 °C: IR (KBr)υ: 3071.39 (CH, sp^2), 1686.54 (C=O), 1644.92 (C=C), 1599.29 and 1340.54 (NO_2) cm^{-1}; ^{1}H-NMR (DMSO, 300 MHz) (= 6.33 (1H, s, CH), 7.23 (1H, t, J = 7.5 Hz, 8.9 Hz, CH), 7.33 (1H, d, J = 8.4 Hz, CH), 7.52 (1H, t, J = 7.8 Hz, 6.8 Hz, CH), 7.81 (2H, d, J = 6.9 Hz, CH), 8.07 (1H, d, J = 8.7 Hz, CH), 8.33 (2H, d, J = 6.0 Hz, CH) ppm; ^{13}C-NMR ($CDCl_3$, 75 MHz) δ= 102.7 – 153.2 (16 C Aromatic), 164.3 and 166.2 (C=O) ppm.

سنتز ۴- (۴- کلروفنیل) پیرانو] ۳ و ۲- کربن[کرومن – ۲ و ۵ – دیان (c)



به محلولی از g ۰/۱۶ (۱ mmol) از ۴ – هیدروکسی کومارین در حلال اتانول و g ۰/۱۵ (۱ mmol) از ملدروم اسید در حلال استون و اتانول که با همزن مغناطیسی در دمای °C ۶۰ به هم زده می‌شد، مقدار g ۰/۱۴ (۱ mmol) از ۴ – کلرو بنزآلدهید افزوده شد و سپس دو الی سه قطره پی پیریدین به مخلوط افزوده شد. در چند ثانیه‌ی اول رنگ محلول زرد شد و به مرور از بین رفت که نشان دهنده‌ی تشکیل حد واسط است. محلول به دست آمده برای چند ثانیه به حالت آرام قرار گرفت و رسوب سفید رنگی با بازده ۹۹٪ به دست آمد که در نرمال هگزان غیر قابل حل بود. از این رو، رسوب با نرمال هگزان شست‌وشو داده و پس از خشک شدن نقطه ذوب آن‌ها گرفته شد. گستره‌ی نقطه ذوب برابر ۱۸۴ تا °C ۱۸۶ بود.

Yield 99%, White solid, mp: 184-186°C: IR (KBr) υ: 3155.22 (CH, sp^2), 1704.76 (C=O), 1605.86 (C=C) cm^{-1}; ^{1}H-NMR (DMSO, 300 MHz) (= 6.21 (1H, s, CH), 7.07 (1H, d, J = 8.4 Hz, CH), 7.24 (3H, 2t, d, J = 9.0 Hz, 3.0 Hz, CH), 7.66 (2H, d, J = 9.0 Hz, CH), 8.25 (2H, d, J = 9.0 Hz, CH) ppm; ^{13}C-NMR (DMSO, 75 MHz) δ= 103.07 – 153.3 (16 C Aromatic), 164.3 and 166.1 (C=O) ppm.

شکل ۱ ساز وکار واکنش را نشان می‌دهد.

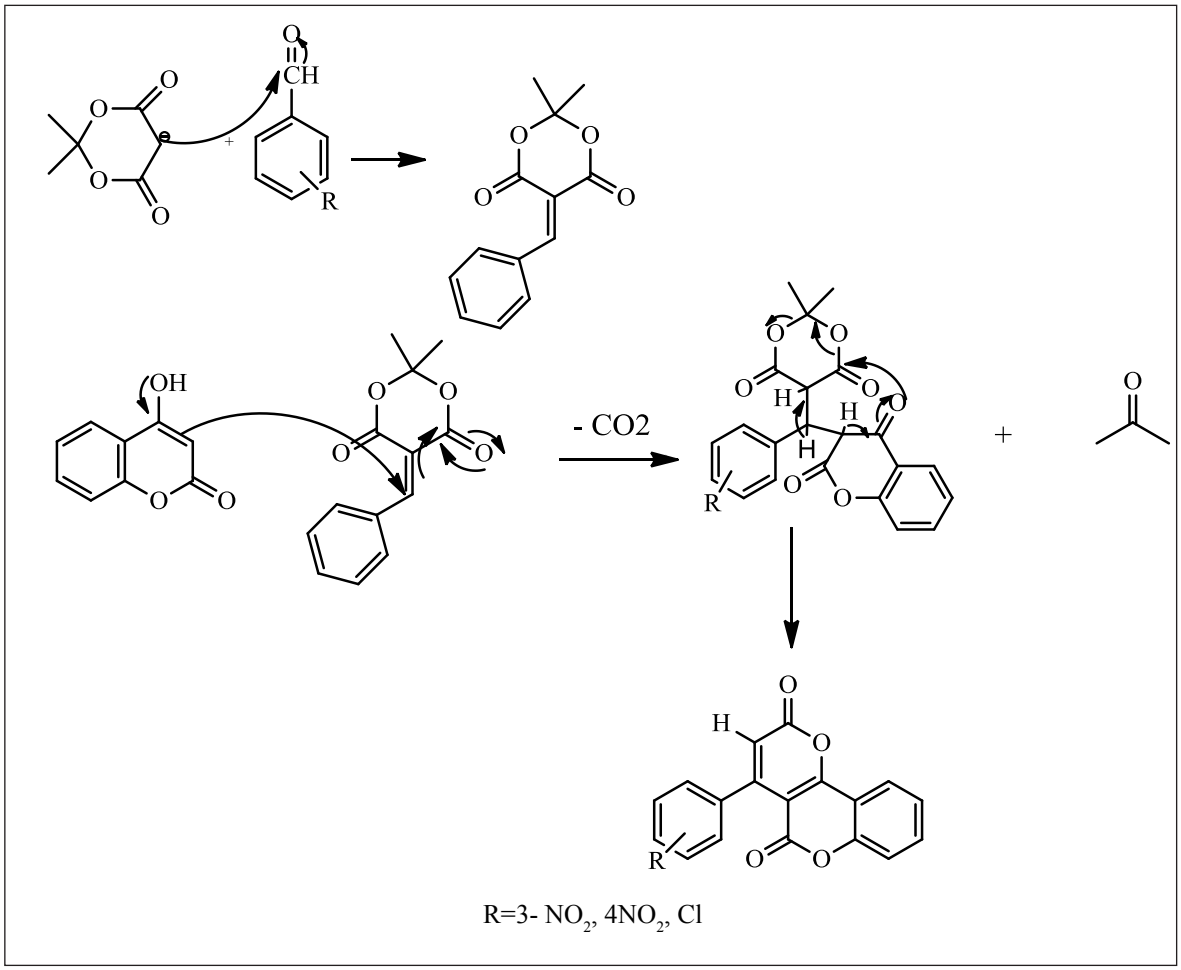
*بررسی اثر ضد باکتری ترکیب‌های **a**، **b** و **c**:*

۱- آزمون MIC[1] :

در این آزمون حداقل غلظتی از داروی پاد زیستی[2] که جلوی رشد میکروب را می‌گیرد، تعیین می‌شود.

زمانی که می‌خواهیم داروی پاد زیستی مناسبی برای درمان انتخاب شود به آزمون ضد بیوگرام احتیاج است. به طور معمول برای این کار، نمونه را بر روی محیط کشت با سواب کشت داده و گرما گذاری می‌شود. هاله عدم رشد ایجاد شده به وسیله خط کش اندازه گیری می‌شود. و با جدول استاندارد مقایسه می‌شود و برای درمان برگزیده می‌شود.

1. Minimum inhibitory concentration 2. Antibutic



شکل ۱ سازوکار واکنش

۲- *آزمون رقیق‌سازی داروی ضد زیستی*[1]

ابتدا باید براساس میکروگرم یا میلی گرم از داروی ضد زیستی مربوط محلول رقیقی تهیه شود. در ۱۰ لوله آزمایش، ۱ ml از محیط کشت مایع غنی شده ریخته می‌شود. از رقت تهیه شده ۱ ml به لوله شماره ۱ حاوی محیط افزوده و به خوبی تکان داده می‌شود. سپس به ترتیب از لوله شماره ۱ تا لوله شماره ۱۰، ۱ ml به لوله شماره بعد افزوده می‌شود. به این ترتیب رقت ضد زیستی رفته رفته با افزایش شماره لوله‌ها، کاهش می‌یابد. مرحله بعد تهیه سوسپانسیون باکتری است. باکتری که درون سرنگ کشیده شده است قطره قطره در سرم فیزیولوژی ریخته می‌شود تا به رقت ۰/۵ مکفارلند[2] برسد.

سپس ۱ ml از سوسپانسیون تهیه شده به تمامی لوله‌ها افزوده و در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت قرار داده می‌شود.

به طور معمول در این ۱۰ لوله، لوله آخر را به عنوان کنترل مثبت قرار می‌دهند. بنابراین، هیچ پاد زیستی در آن ریخته نمی‌شود و تنها دارای ۱ ml محیط کشت غنی شده مایع و ۱ ml از سوسپانسیون باکتری است.

1. Macrodilution

۲- رقت ۰/۵ مکفارلند: کدورت خاصی است که مقدار مشخصی باکتری دارد.

در نهایت، برای مثال، اگر از لوله شماره ۵ ml به بعد کدورت دیده شود، لوله ۴، MIC نامیده می‌شود. به بیان دیگر، MIC لوله ما قبل از لوله دارای کدورت است.

دیسک دیفیوژن (Disk diffusion)

بعد از ایزوله کردن باکتری، مقداری از کلونی باکتری را به وسیله انس (نه لوپ) برداشته و در سرم فیزیولوژی استریل حل می‌کنیم. باید در نظر داشت که، در آزمون ضد بیوگرام میزان کدر بودن خیلی مهم است. بنابراین، در انتخاب مقدار نمونه باید دقت کرد تا نمونه بیشتر یا کمتر از نیم مکفارلند برنداشته شود. اگر میزان کدورت کمتر از نیم مکفارلند باشد، مقداری دیگر از نمونه را در سرم فیزیولوژی استریل حل می‌کنیم و یا اگر میزان کدر بودن، بیشتر از نیم مک فارلند باشد در این صورت باید مقداری سرم فیزیولوژی استریل افزود تا به کدورت مناسب و برابر با نیم مکفارلند برسیم. پس از تهیه محلول همگن خود، با سواب استریل محلول را به هم زده و پس از آبکشی کردن سواب، (برای آب کشی، سواب با قدرت به دیواره لوله تکیه و فشار داده می‌شود تا آب آن گرفته شود.) آن را به محیط کشت مولر هینتون انتقال می‌دهیم و به طور کامل به وسیله سواب، محیط کشت به صورت چمنی کشت شود به طوری که هیچ محلی در محیط از قلم نیافتد . بعد از کشت، دیسک‌ها که قبل از نیم ساعت از آزمون، بیرون یخچال قرار داده شده‌اند را انتخاب و بر روی محیط کشت انتقال می‌دهیم. باید ذکرکرد که چگونگی قرار دادن دیسک‌ها در محیط کشت مولر هینتون، به صورت دایره ای است وفاصله این دیسک‌ها از همدیگر حدود ۱۲ میلی متر باشد وباید از دیواره هم فاصله داشته باشند. درضمن فاصله این دیسک‌ها رامی توان با توجه به تجربه خود کم و یا زیاد کرد. دیسک‌های مورد استفاده هم باید بانوع باکتری ایزوله شده ما مناسب باشد. پس از قرار دادن دیسک‌ها، در پلیت را بسته و به مدت ۲۴ ساعت آن‌ها را در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد، انکوبه می‌کنیم. پس از ۲۴ ساعت پلیت را زیر چراغ بررسی می‌کنیم.. سپس قطر هاله عدم رشد را با خط کش اندازه گیری کرد و آزمون را برای هر یک از آنتی بیوتیک‌ها (مشتق‌های سنتز شده) گزارش داد.

نتیجه‌ها و بحث

با توجه به مزایای فراوانی که واکنش‌های چند جزیی در سنتز ترکیبات آلی از جمله هتروسیکل‌های پیچیده دارند، در پژوهش حاضر با کمک این نوع واکنش‌ها، واکنش ۴-هیدروکسی کومارین با ملدروم اسید در مجاورت آلدهیدهای متفاوت انجام شد و مشتق‌های جدیدی از کومارین‌ها سنتز شد. واکنش‌های انجام شده همگی در حرارت ۶۰ تا ۷۰ °C و در حلال‌های استون و اتانول به همراه چند قطره پی پیریدین صورت پذیرفت. برای تعیین ساختار محصول‌های ایجاد شده از طیف‌های FT-IR و ^{1}H-NMR و ^{13}C-NMR استفاده شد و نتایج مورد بررسی آزمون‌های ضد باکتری قرار گرفت.

نتیجه‌های ضد باکتری

MIC

غلظت عصاره استفاده شده به مقدار یک میلی گرم در یک میلی لیتر از حلال مورد نظر است (۱ ppm).

تمامی مراحل زیر هود میکروبی انجام شد.

باکتری E.coli (باسیل گرم منفی)

عصاره	a	b	c
MIC	۲	۳	۳
غلظت (ppm)	۰/۲۵	۰/۱۲۵	۰/۱۲۵

باکتری کلبسیلا klebsiella (باسیل گرم منفی)

عصاره	a	b	c
MIC	۳	۳	۳
غلظت (ppm)	۰/۱۲۵	۰/۱۲۵	۰/۱۲۵

باکتری سودوموناس (باسیل گرم منفی)

عصاره	a	b	c
MIC	۳	۳	۳
غلظت (ppm)	۰/۱۲۵	۰/۲۵	۰/۱۲۵

باکتری استافیلوکوک اپیدرمایتیس (کوکسی گرم مثبت)

عصاره	a	b	c
MIC	۴	۵	۷
غلظت (ppm)	۰/۰۶۲	۰/۰۳۱	۰/۰۰۷

باکتری استافیلوکوک ساپروفتیکوس (کوکسی گرم مثبت)

عصاره	a	b	c
MIC	۴	۲	۶
غلظت (ppm)	۰/۰۶۲	۰/۲۵	۰/۰۱۵

باکتری استافیلوکوکوس اورئوس (کوکسی گرم مثبت)

عصاره	a	b	c
MIC	۵	۷	۴
غلظت (ppm)	۰/۰۳۱	۰/۰۰۷	۰/۰۶۲

نتایج دیسک دیفیوژن

	Klebsiella (mm)	E.coli (mm)	Pseudomonas (mm)	Staphylococcus aureus (mm)	Staphylococcus epidermidis (mm)	Staphylococcus saprophyticus (mm)
a	۸	۴	۳	۱۲	۱۳	۲۰
b	۹	۴	۴	۱۶	۱۴	۱۹
c	۴	۳	۴	۱۳	۲۰	۱۷

مراجع

[1] Campose Toimil, M.; Orallo, F.; Santana, L.; Uriarte, E. Broorg. Med. Chem Left., 12, 783, 2012.

[2] Balan, D.; Adolffen, H.; Tetrahedron left, 44, 2521 – 2524, 2003.

[3] De Clereq, E.A.; Curr. Opin. Antivitral Res, 67, 57- 75. 2005.

[4] Debenedetti, S-L.; Nadinic, EL.; Coussio, J.D.; De Kimpe. N.; Phylochemistry, 48, 807, 1998

[5] Schonleber, R.; Bending, J.; Hagen, V.; Bioorg. Med. Chem, 10, 97, 2002.

[6] Murray, R. D. H.; prog. Chem. Org. Nat, 58, 83, 1991.

[7] Selvan, P.; Ramlakshima, N.; Uma, G.; Kumar, S.;Chem Med, 3, 275-280, 2010.

[8] Strakova, I.; Petrova, M.; Belyakocv, Hetrocycle. Comp, 39, 1608. 2003.

[9] Schio, L.; Chatreaux, F.; Klich, M.; Tetrahedron Letter, 41, 1543, 2000.

[10] Syguch, J.; B rise, j.; Hanessian, S.; Kluepfel, D.; Aceta Crystallogy, 32, 1139, 1976.

[11] Komnenos, T.; Justus; Perlmutter, R.; Chem., 218, 145-169, 1883.

[12]Tiew, P.; Puntumchai, A.; Kokpol, U.; Chavasiri, W.; Phytochemistry, 28, 66, 2002.
[13]Van, T. N.; Debenedetti, S., Debenedetti, S., Tetrahedron Letter,44, 4199, 2003.
[14]Anschutz, R. A.; Ber. Btsch., Chem. Ges, Vol. 36, PP. 463-465, 1903.
[15]Anschutz, R.A.; Liebigs Ann. Chem, Vol. 367, P. 169, 1909.
[16]Meldrum, Andrew Norman. J.Chem. Soc., 93: 598–601, 1908
[17]Franca Bigi; Tetrahedron letters, 31, 5203-5205, 2001.
[18]Trith wiegand, published online; 2008.
[19]Kirby bauer, Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. Am.j. clin. Pathol, 36: 493-496, 1960.
[20]Yuji oikawa, Kiyoshi sugano, the Journal of organic chemistry, 43, 2087-2088, 1978.

JARC

The synthesis of new derivatives of pyrano chromenes and investigating their anti-bacterial tests

M. Esnaashari-Isfahani[1,*], E. Vessali[2], Z. Rastegar[3] and Z. asadi[4]

1. Associate Prof. of Organic Chemistry, Chemistry Department, Islamic Azad University, North Tehran Branch, Tehran, Iran
2. Assistant Prof. of Organic Chemistry, Payame Noor University of Tehran, Iran
3. MSc student in Organic Chemistry, Chemistry Department, Islamic Azad University, North Tehran Branch, Tehran, Iran
4. Ph.D student of Organic Chemistry, Chemistry Department, Islamic Azad University, North Tehran Branch, Tehran, Iran

Recieved: Nvember 2015, First Revised: December 2015, Second Revised: January 2016, Accepted: February 2016

Abstract: With respect to the importance of coumarin derivatives as drugs affecting cancer cells and various other pharmacological effects, in this study new coumarin derivatives were synthesized by using 4-hydroxy coumarin and Meldrom's acid in the presence of aldehydes (such as 4-nitro benzaldehyde, 3-nitro-benzaldehyde, 4-cloro-benzaldehyde and 4-hydroxy benzaldehyde) and pyridine at 60 °C and using acetone and ethanol as solvents. The prepared samples were characterized by FT-IR, ^{1}HNMR and ^{13}CNMR methods. Then new derivatives checked by disc diffusion and MIC methods on the 3 gram-negative (Coli, klebsiella, and pseudomonas) bacteria and 3 gram-positive (Staphylococcus epidermidis, Staphylococcus saprophyticus, and Staphylococcus aureus) bacteria.

Keywords: 4-hydroxy coumarin, Aldehyde, Meldrom's acid, Disc diffusion method, MIC method

*Corresponding author Email: mb_esnaashari@yahoo.com