

Organometalna sinteza novih derivata hidroksikumarina s potencijalnim antioksidativnim i citostatskim djelovanjem

Toma, Mateja

Master's thesis / Diplomski rad

2016

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Chemical Engineering and Technology / Sveučilište u Zagrebu, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:149:028408>

Rights / Prava: [In copyright](#) / [Zaštićeno autorskim pravom](#).

Download date / Datum preuzimanja: **2024-08-19**



FKITMCMXIX

Repository / Repozitorij:

[Repository of Faculty of Chemical Engineering and Technology University of Zagreb](#)



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE
SVEUČILIŠNI DIPLOMSKI STUDIJ

Mateja Toma

DIPLOMSKI RAD

Zagreb, srpanj 2016.

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE
SVEUČILIŠNI DIPLOMSKI STUDIJ

Mateja Toma

**ORGANOMETALNA SINTEZA NOVIH DERIVATA
HIDROKSIKUMARINA S POTENCIJALNIM ANTIOKSIDATIVNIM I
CITOSTATSKIM DJELOVANJEM**

DIPLOMSKI RAD

Voditelj rada: doc. dr. sc. Tatjana Gazivoda Kraljević

Članovi ispitnog povjerenstva:

1. Doc. dr. sc. Tatjana Gazivoda Kraljević
2. Prof. dr. sc. Silvana Raić-Malić
3. Doc. dr. sc. Svjetlana Krištafor

Zagreb, srpanj 2016.

Zahvaljujem mentorici, doc. dr. sc. Tatjani Gazivoda Kraljević, na predloženoj temi, vodstvu, edukaciji, svim savjetima, susretljivosti i pomoći koju mi je pružila prilikom izrade i pisanja diplomskog rada.

Zahvaljujem dr. sc. Maji Stipković Babić na stručnoj pomoći i savjetima pri izradi ovog rada.

Zahvaljujem svim članovima Zavoda za organsku kemiju Fakulteta kemijskog inženjerstva i tehnologije na ugodnom radnom okruženju i pomoći koju su uvijek rado pružali.

Također zahvaljujem roditeljima i bratu, prijateljima, posebice Mladenu, koji su mi pružali podršku u školovanju i bili uz mene u svim dobrim i lošim trenucima.

Ovaj rad je izrađen na Zavodu za organsku kemiju Fakulteta kemijskog inženjerstva i tehnologije Sveučilišta u Zagrebu u sklopu projekta Hrvatske zaklade za znanost, HRZZ-5596.

SAŽETAK

U ovom radu prikazana je sinteza, spektroskopska karakterizacija i *in silico* analiza derivata kumarina supstituiranih u položaju 3 ariletinilnim (**1-3**), alkiletinilnim (**4-7**), arilnim (**11-14**) ili 1,2,3-triazolnim supstuentima (**21-24**) te 3-azido kumarinskih derivata (**18-20**). Sonogashira-inom reakcijom 7-hidroksi-3-klor-4-metilkumarina s odgovarajućim arilnim ili alkilnim terminalnim alkinima uz Pd-katalizator sintetizirani su derivati kumarina supstituirani u položaju 3 (**1-7**) ariletinilnim ili alkinilnim supstuentima. Uvođenje aromatskog prstena u položaj 3 kumarinske jezgre provedeno je Suzuki-jevom reakcijom 7-hidroksi-3-klor-4-metilkumarina s odgovarajućim arilbornim kiselinama pri čemu su pripremljeni spojevi **11-14**. Prekursori **16** i **17** za Perkinovu sintezu kumarinskog prstena sintetizirani su Sonogashira-inom reakcijom koji su potom višestupnjevatom sintezom *in situ* prevedeni u 3-azidokumarinske derivate **19** i **20**. 3-Azido-7-hidroksikumarin **18** pripremljen je višestupnjevatom reakcijom, koja u prvom stupnju uključuje Perkinovu ciklizaciju. 1,2,3-triazolni supstuent u položaj 3 kumarina uveden je „klik“ reakcijama potpomognutim mikrovalovima s odgovarajućim terminalnim alkinima uz Cu katalizator pri čemu su sintetizirani spojevi **21-24**. Strukturna i spektroskopska karakterizacija spojeva provedena je ¹H NMR, UV/Vis i fluorimetrijskom spektroskopijom. Farmakološka aktivnost i moguće biološke mete novopripremljenih spojeva predviđene su *in silico* analizom (PASS).

Ključne riječi: derivati 7-hidroksi-4-metilkumarina, 1,2,3-triazol, Sonogashira-ina reakcija unakrsnog povezivanja, Suzuki-jeva reakcija unakrsnog povezivanja, „klik“ reakcija, Perkinova reakcija.

SUMMARY

This paper describes synthesis, spectroscopic characterization and *in silico* analysis of coumarin derivatives substituted with arylolethynyl (**1-3**), alkylethynyl (**4-7**), aryl (**11-14**) or 1,2,3-triazole substituents at position 3 and 3-azido coumarin derivatives (**18-20**). Coumarin derivatives substituted in position 3 (**1-7**) with alkynyl- or arylolethynyl- substituents were synthesized by Sonogashira cross-coupling reaction of 3-chloro-7-hydroxy-4-methylcoumarin with an appropriate aryl- or alkyl- terminal alkynes using palladium as catalyst. Introduction of an aromatic ring at position 3 of the coumarin moiety was carried out by Suzuki reaction of 3-chloro-7-hydroxy-4-methylcoumarin with corresponding arylboronic acids and compounds **11-14** were synthesized. Precursors **16** and **17** used for Perkin coumarin ring synthesis were prepared by Sonogashira reaction and by multi-step synthesis *in situ* converted into 3-azidocoumarin derivatives **19** and **20**. 3-Azido-7-hydroxycoumarin **18** was also prepared by multi-step synthesis, which included Perkin cyclization in the first step. 1,2,3-triazole ring was introduced at position 3 of coumarin moiety by microwave assisted "click" reaction with appropriate terminal alkyne using copper catalyst which gave compounds **21-24**. Structural and spectroscopic characterization of novel compounds was performed by ¹H NMR, UV / Vis and fluorimetric spectroscopy. Pharmacological activity and possible biological targets of novel compounds were provided by *in silico* analysis (PASS).

Key words: 7-hydroxy-4-methylcoumarin derivatives, 1,2,3-triazole, Sonogashira cross-coupling reaction, Suzuki reaction, „click“ reaction, Perkin reaction.

SADRŽAJ

1.0. UVOD	1
2.0. OPĆI DIO	3
2.1. Kumarini	3
2.1.1. Derivati kumarina i njihova biološka aktivnost	6
2.2. 7-hidroksi-4-metilni derivati kumarina	20
2.3. Sinteza kumarinskog prstena	25
2.3.1. Perkin-ova reakcija	25
2.3.2. Pechmann-ova reakcija	26
2.3.3. Knoevenagel-ova reakcija	27
2.4. Organometalna sinteza	29
2.5. Paladijem katalizirane reakcije unakrsnog povezivanja	32
2.5.1. Sonogashira-ina reakcija	34
2.5.2. Suzuki-jeva reakcija	38
2.5.3. Stille-ova reakcija	41
2.6. „Klik“ reakcije	43
2.7. UV/Vis i fluorimetrijska spektroskopija	45
2.8. Predviđanje spektra aktivnosti spojeva <i>in silico</i> analizom (PASS)	46
3.0. EKSPERIMENTALNI DIO	48
3.1. Opće napomene	48
3.2. Pregled novosintetiziranih spojeva	49
3.3. Priprava spojeva	51
4.0. REZULTATI I RASPRAVA	63
4.1. Sinteze spojeva	63
4.2. Strukturna karakterizacija spojeva ¹ H NMR spektroskopijom	69
4.3. Spektroskopska karakterizacija spojeva UV/Vis i fluorimetrijskom spektroskopijom	77
4.4. <i>In silico</i> analiza novopripremljenih spojeva	80
5.0. ZAKLJUČCI	86
6.0. LITERATURA	87
7.0. ŽIVOTOPIS	91

1. UVOD

Različita biokemijska i klinička istraživanja pokazala su da je patogenezna mnogih smrtonosnih bolesti povezana s oksidativnim stresom izazvanim slobodno-radikalnim vrstama i procesima u kojima one sudjeluju u živim organizmima. Stvaranje slobodnih radikala sastavni je dio staničnog metabolizma kao i njihovo intra- i ekstracelularno uklanjanje prisutnim antioksidansima, no zbog povećane količine u okolišu prisutnih različitih reaktivnih vrsta, često dolazi do narušavanja normalnog metaboličkog procesa i posljedičnog antioksidativnog stresa. Tako slobodni radikali nastali metabolizmom i oni prisutni u okolišu oštećuju proteine, lipide, stanične membrane i molekulu DNA izazivajući ireverzibilne promjene njihove biomolekularne strukture i posljedična oštećenja tkiva te pridonose razvoju različitih bolesti. Smatra se da je oksidativni stres povezan s bolestima poput tromboze, hipertenzije, Alzheimerove i Parkinsonove bolesti, ateroskleroze, ali i da reaktivne kisikove vrste utječu na strukturu DNA u smislu indukcije stvaranja jednolančane DNA i razaranje dvostruke uzvojnice što je prvi korak u razvoju degenerativnih bolesti poput raka, ali i samog procesa starenja. Jasna je stoga potreba pronalaska novih molekula sa što učinkovitijim antioksidativnim djelovanjem, ali i drugim biološkim aktivnostima koje će pomoći u obrani od ovakve vrste štetnih tvari te prevenciji i liječenju bolesti koje one izazivaju, s posebnim naglaskom na rak. Mnoge biološki aktivne molekule prirodnog porijekla poznate su kao antioksidansi pa je sinteza njihovih derivata od velikog interesa kako bi se priredili novi spojevi s poboljšanim biološkim djelovanjem. Primjer takvih prirodnih biološki aktivnih molekula su polifenoli, sekundarni metaboliti biljaka od kojih su značajni predstavnici kumarini, kisikovi heterociklički spojevi koji sve više plijene pažnju i interes u organskoj sintetskoj i medicinskoj kemiji s ciljem istraživanja prirodnih i sintetskih kumarina koji bi se mogli koristiti kao lijekovi.[1]

Kumarini i njihovi derivati pokazuju različitu biološku aktivnost poput antioksidativne, protutumorske, protuupalne, antimikrobne i antivirusne te inhibicije različitih enzima, a zbog mogućnosti supstitucije na svih 7 položaja kumarinske jezgre, moguće je sintetizirati vrlo velik broj derivata kumarina s različitim farmakološkim učincima. Zbog dobre citostatske aktivnosti različitih spojeva s kumarinskom jezgrom kao i zanemarivog ili vrlo malog utjecaja na zdrave stanice te dobra antioksidativna aktivnost kao „hvatača“ radikala hidrosikumarinskih derivata kao i ostale aktivnosti koje pokazuju, kumarini su često istraživana klasa spojeva, a uvođenje novih supstituenata predstavlja izazov organskoj sintezi.[2] Stoga su pored klasične sinteze kumarinskog skeleta Pechmann-ovom, Perkin-ovom ili Knoevenagel-ovom sintezom razvijene mnoge strategije sinteze kumarinskih

derivata koje uključuju reakcije unakrsnog povezivanja katalizirane metalima, ponajviše Pd-katalizirane reakcije stvaranja novih C-C veza poput Suzuki-jeve i Sonogashira-ine reakcija. Te su reakcije vrlo učinkovite za sintezu različitih arilnih derivata zbog svoje jednostavnosti izvedbe, blagih reakcijskih uvjeta, ali i ekološki prihvatljive naravi budući da podrazumijevaju mogućnost provedbe u vodenom mediju i u malim količinama otapala.[3]

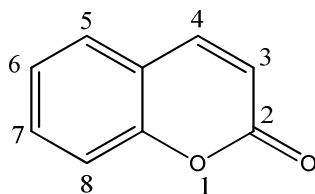
Osim raznolike biološke aktivnosti, kemijska struktura kumarina i njegovih derivata uvjetuje njihova dobra fluorescentna svojstva što omogućuje njihovu upotrebu kao fluorescentnih senzora i markera za označavanje u kemiji biokonjugata. Tipični fluorofori s kumarinskom jezgrom imaju elektron-donirajuću skupinu u C-7 položaju, a uvođenje heteroaromatskog sustava u položaj C-3 poboljšava fotofizikalna svojstva takvih molekula. Tako uvođenje 1,2,3-triazolnog prstena na kumarinsku jezgru vidljivo poboljšava navedena svojstva kumarinskih derivata, a „klik“ kemija omogućava njihovu učinkovitu i jednostavnu sintezu.[4]

2. OPĆI DIO

2.1. Kumarini

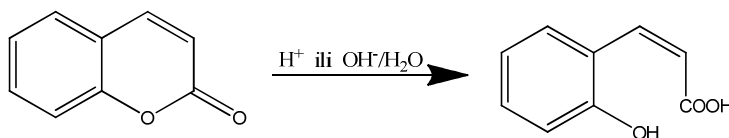
Fenolni spojevi uvelike su rasprostranjeni u prirodi, posebice u biljkama gdje se pojavljuju kao njihovi sekundarni metaboliti, a mnogi od njih imaju antimikrobnu aktivnost te su antioksidansi. Obuhvaćaju fenolne kiseline poput hidroksicimetne i hidroksibenzojeve kiseline te flavonoide, kumarine, tanine, antocijane, antrakinone, lignine i lignane.[5]

Kumarin (slika 1.) odnosno *2H*-kromen-2-on, 5,6-benzo-2-piron ili *2H*-1-benzopiran-2-on se sastoji od kondenziranog benzenskog i pironskog prstena te sadrži dva kisikova atoma kao heteroatome, a strukturno spada u skupinu benzopirona. Benzopironi se mogu podijeliti u skupinu benzo- α -pirona gdje spadaju kumarini te benzo- γ -pirona kojih su glavni predstavnici flavonoidi.[6] Pironski prsten molekule kumarina je ciklički nezasićeni lakton koji u prirodi nastaje iz *o*-hidroksicimetne kiseline ciklizacijom i zatvaranjem prstena.[7]



Slika 1. Struktura kumarina

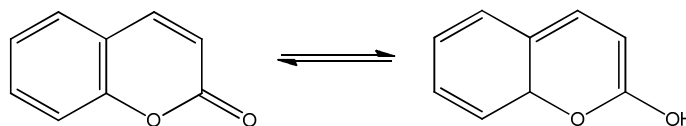
Kako je laktonski prsten ciklički ester, laktoni pokazuju isti oblik nestabilnosti kao i esteri i podliježu kiselo ili bazno kataliziranoj hidrolizi pri čemu nastaje karboksilna kiselina. Tako kumarin u prisutnosti kiseline ili baze hidrolizira (shema 1.) uz otvaranje pironskog prstena u *cis*-*o*-hidroksicimetnu kiselinu koju nije moguće izolirati jer zakiseljavanje dovodi do ponovne ciklizacije, a pri duljem izlaganju bazi *cis* oblik prelazi u *trans*.[8,9]



Shema 1. Kiselo ili bazno katalizirana hidroliza kumarina

Molekula kumarina podložna je tautomeriji i može postojati u keto i enolnom obliku pri čemu je ravnoteža pomaknuta prema keto obliku (slika 2.). S obzirom na navedena kemijska svojstva kumarina, karakteristične reakcije kojima podliježu jesu nukleofilno otvaranje laktonskog prstena te adicija na C-3/C-4 dvostruku vezu, a općenito se može reći da podliježu reakcijama i s nukleofilima i s elektrofilima. Supstitucija na ugljikovim atomima moguća je

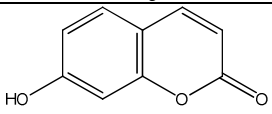
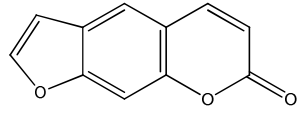
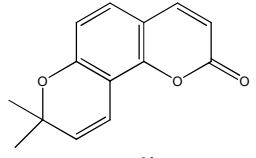
na svih 6 položaja, odnosno u oba prstena što dovodi i do velikog mogućeg broja derivata kumarina. Od elektrofilnih reakcija halogeniranja favorizirana je supstitucija na pironskom prstenu u C-3 položaju, dok se nitriranje odvija preferirano u C-6 i vrlo slabo u C-8 položaju. Također, vrlo reaktivni elektrofilni mogu napasti karbonilni kisik kumarina pri čemu nastaje benzopirilijev ion i soli. U nukleofilnim reakcijama već spomenuti hidroksidni ion otvara laktonski prsten, a u reakciji s Grignarovim reagensom daju smjesu produkata nastalu otvaranjem prstena i adicijom na karbonilni ugljikov atom. Kumarini reagiraju i u Diels-Alderovoj cikloadicijskoj reakciji kao dienofili.[9,10] Različite derivate kumarina moguće je pripraviti iz supstituiranih aldehida i raličitih anhidrida kiselina kao polaznih spojeva u sintezi kumarinskog prstena,[11] a uvođenje novih supstituenata u željene položaje halogeniranog derivata kumarina može se provesti organometalnom sintezom paladij-kataliziranim reakcijama unakrsnog povezivanja, poput Sonogashira-ine, Suzuki-jeve, Stille-ove i drugih reakcija.[12]



Slika 2. Keto-enolna tautomerija kumarina

Kumarinske strukture nalazimo u voću, najviše u marelicama, višnjama, jagodama i u začinskim biljkama poput cimeta i lavande, a mirišu na vaniliju ili pokošenu travu. Kumarin je prvi puta izoliran 1820. godine iz biljke tonovac (*Dipteryx odorata*; *Coumarouna odorata*). U biljnom tkivu kumarini mogu biti prisutni u slobodnom obliku ili kao heterozidi, a prema kemijskoj strukturi dijelimo ih na jednostavne kumarine, furanokumarine, piranokumarine i piron-supstituirane kumarine (Tablica 1.). Jednostavni kumarini su hidroksilirani, alkoksilirani i alkilirani derivati kumarina kao i njihovi glikozidi. Furanokumarini imaju petročlani furanski prsten fuzioniran na kumarinsku jezgru linearno ili angularno i sa supstituiranim jednim ili oba preostala benzoidna položaja. Piranokumarini su analogni furanokumarinima, ali sadrže šesteročlani piranski prsten na kumarinskoj jezgri, dok piron-supstituirani kumarini podrazumijevaju spojeve supstituirane na pironskom prstenu kumarinske jezgre.[6] Tako je poznato mnogo različitih derivata kumarina, sintetskih ili prirodnih što dovodi i do njihovih različitih bioloških aktivnosti, a sama upotreba kumarina ograničena je zbog njegove umjerene toksičnosti za jetru i bubrege pa je u nekim zemljama zabranjen kao dodatak hrani ili je maksimalna dopuštena količina propisana pravilnicima.

Tablica 1. Podjela kumarina i primjeri

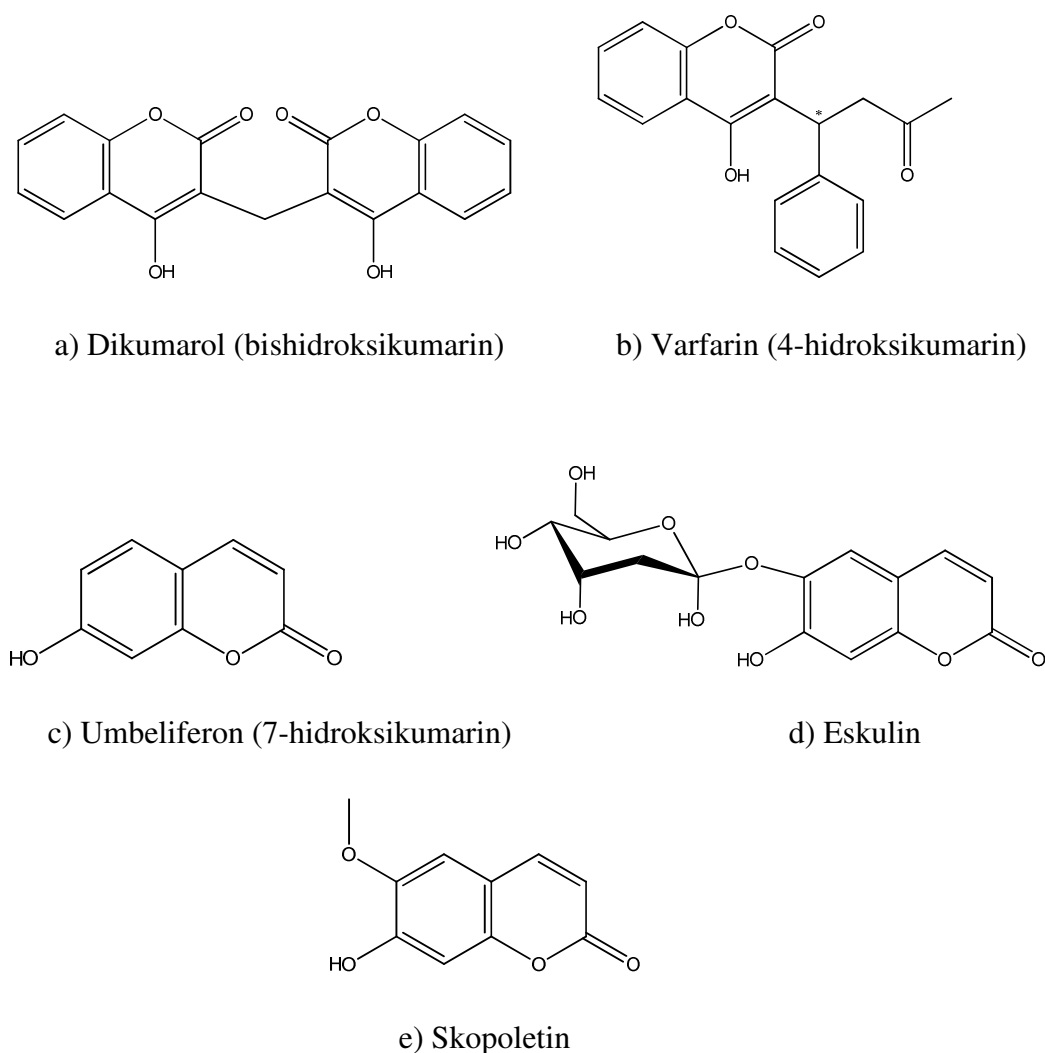
Klasa kumarina	Primjer
Jednostavni	 7-hidroksikumarin
Furanokumarini	 psoralen
Piranokumarini	 seselin
Piron-supstituirani	 dikumarol

Kumarini pokazuju različitu farmakološku aktivnost poput protuupalne, antipiretske, antioksidativne, antibakterijske, antifungalne, antivirusne (uključujući anti-HIV) i citostatske aktivnosti, djeluju i kao antikoagulansi, antihistaminici i antidepresivi, a imaju široku primjenu kao aditivi u hrani, u kozmetičkim preparatima, kao farmaceutski agensi i luminescentni materijali.[13] Neke od bioloških aktivnosti uključuju inhibiciju agregacije krvnih pločica, citokroma P450 (koji je aktivan u metabolizmu lijekova i ksenobitika te sintezi biomolekula koje sudjeluju u kontroli razvoja i održavanju homeostaze organizma) i steroidne 5 α -reduktaze (metabolizam steroida). Zbog raznolike biološke aktivnosti koja ovisi o položaju supstitucije i samom supstituentu, sinteza različitih kumarinskih derivata postala je od velikog interesa organskim i medicinskim kemičarima.[14] Neki od načina sinteze kumarina jesu Perkin-ova, Knoevenagel-ova i Pechmann-ova reakcija te Reformatsky i Wittig-ova reakcija.[11] Od 1954. god. kumarin je klasificiran kao toksična tvar od strane FDA-a (Food and Drug Administration), potencijalni promotor tumora jetre u štakora pa je njegova upotreba zabranjena iako toksičnost za ljude nije dokazana. Naime, postoji razlika u biotransformaciji kumarina i eliminaciji metabolita kumarina iz tijela kod različitih vrsta. Tako je kod ljudi i nekih vrsta majmuna osnovni metabolički put kumarina, ujedno detoksifikacija, 7-hidroksilacija koja se odvija u jetri pomoću citokroma P450 2A6 te se izlučuje u urinu kao glukuronid i sulfatni konjugati. Hepatotoksičnost se kod štakora pripisuje izlučivanju metabolita u žuč pa se enterohepatičkom cirkulacijom povećava izloženost

jetrenih stanica toksičnim metabolitima, a dominirajuća reakcija metabolizma kumarina je 3,4-epoksidacija koja uključuje otvaranje laktonskog prstena i otpuštanje dva ugljikova atoma čemu slijedi nastanak *o*-hidroksifeniletanola kao glavnog metabolita jetre te *o*-hidroksifenilactene kiseline kao glavnog urinarnog metabolita. Osim navedenih štetnih metabolita kumarina, smatra se da 4-metilkumarin nije podložan oksidativnoj dekarboksilaciji (za razliku od kumarina) pa stoga i nije toksičan niti inducira nastanak epoksida.[14]

2.1.1. Derivati kumarina i njihova biološka aktivnost

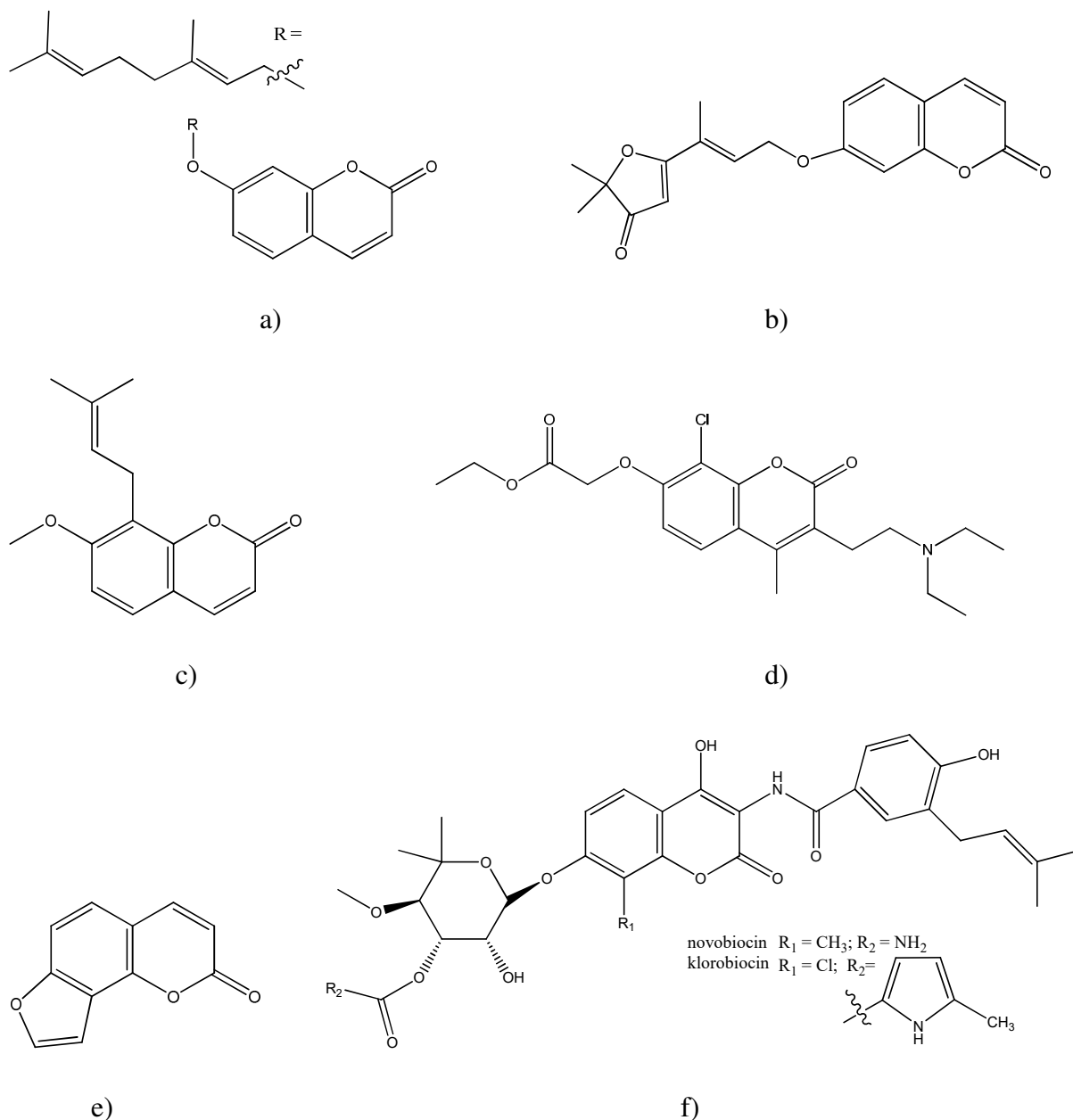
Biljni ekstrakti s derivatima kumarina često su se kroz povijest koristili kao biljni lijekovi što je dovelo do velikog interesa za pripravu novih spojeva derivata kumarina s različitom aktivnosti, a provedena istraživanja pokazala su dobru antioksidativnu, antifungalnu i antikancerogenu aktivnost te različite inhibicijske aktivnosti enzima na temelju kojih su sintetizirani spojevi kao potencijalni lijekovi s kumarinskom jezgrom. Neki od poznatijih prirodnih kumarina (slika 3.) su dikumaroli (slika 3.a) koji nastaju zagrijavanjem kumarina, pokazuju snažna antikoagulacijska svojstva koja se temelje na kompetitivnoj inhibiciji vitamina K u biosintezi protrombina. Također, varfarin, derivat 4-hidroksikumarina je i danas jedno od osnovnih antikoagulacijskih sredstava (slika 3.b), dok umbeliferon, 7-hidroksikumarin (slika 3.c) pokazuje snažno antifungalno djelovanje. Osim navedenih aktivnosti, kumarini pokazuju značajnu antioksidativnu aktivnost, a 7-hidroksikumarin inhibira proliferaciju mnogih humanih i životinjskih staničnih linija *in vitro*. Eskulin (slika 3.d) je glikozidni kumarin iz ploda kestena s vaskularnim terapijskim svojstvima, sastavni je dio lijeka Proctosedyla koji se u medicini upotrebljava za tretiranje hemoroida i rektalnih lezija, a skopoletin (slika 3.e) je nađen u biljci noni i pokazuje aktivnost u regulaciji krvnog tlaka, ima značajna antibakterijska svojstva i potiče funkciju epifize pojačavajući proizvodnju hormona serotonina i melatonina.[14]



Slika 3. Poznatiji prirodni spojevi s kumarinskom jezgrom

Poznati antioksidans izoliran iz kore citrusa je auraptin (slika 4.a), 7-geraniloksikumarin, posjeduje kemopreventivni učinak na kemijski induciranu karcinogenezu, a pokazao se i kao regulator ekspresije gena HepG2 hepatocita. Geiparvarin (slika 4.b), 8-okso-derivat kumarina pokazao je značajnu citostatsku i antimikrotubularnu aktivnost te kao inhibitor monoamin-oksidadze pa se može koristiti u liječenju depresije. Ostol (slika 4.c), 7-metoksi-8-butenilni derivat kumarina kojeg nalazimo u biljci anđeliki, pokazuje inhibitornu aktivnost agregacije krvnih pločica, sprječava progresiju hepatitisa C u hepatokarcinomu ljudi, a neki njegovi derivati koji su topljiviji u vodi predloženi su za upotrebu kao hepatoprotektivni lijekovi. Ovdje je bitno napomenuti da je 7-hidroksi derivat, ostenol, neaktivan pa je prisutnost metoksi skupine vrlo važna kod ostola. Također i klorikromen (slika 4.d), sintetski kumarin, pokazuje inhibiciju agregacije krvnih pločica *in vitro* i *in vivo* i izaziva vazodilataciju. Furanokumarini se koriste u fotokemoterapeutskim tretmanima za

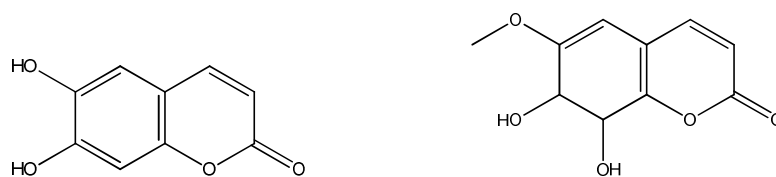
kožne bolesti, autoimune poremećaje i limfome. Angelicin (slika 4.e) je furanokumarin s protuupalnim i antipiretskim svojstvima koji je pokazao i citostatsku aktivnost i antifungalno djelovanje. Antibiotici novobiocin i klorobiocin (slika 4.f) prirodnog su porijekla na bazi kumarina koji inhibiraju DNA girazu i pokazuju široki spektar antibiotske aktivnosti protiv Gram-pozitivnih bakterija.[14]



Slika 4. a) aurapten, b) geiparvarin, c) ostol, d) klorikromen, e) angelicin f) novobiocin i klorobiocin

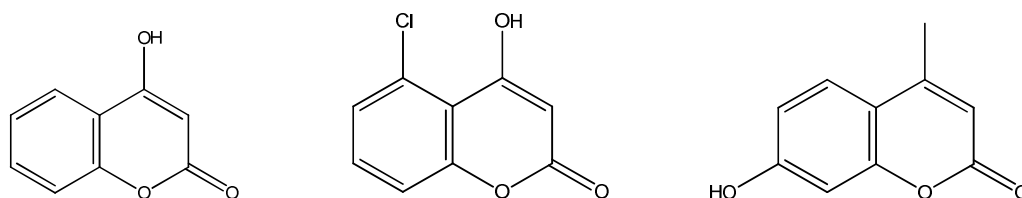
Kumarini s fenolnim hidroksilnim skupinama pokazuju sposobnost hvatanja slobodnih radikala i to reaktivnih kisikovih i dušikovih vrsta (ROS odnosno RNS) djelujući tako kao

antioksidansi. Stvaranje slobodnih radikala poput $O_2^{\bullet-}$, HO^{\bullet} (RO^{\bullet}), HO_2^{\bullet} (RO_2^{\bullet}) i H_2O_2 sastavni je dio metabolizma kao i njihovo intra- i ekstracelularno uklanjanje prisutnim antioksidansima kako bi se izbjegao njihov štetni učinak i posljedični oksidativni stres koji bi oštetio tkiva i biomolekule te doveo do različitih bolesti. Bitno je stoga evaluirati i mjeriti koncentraciju aktivnih radikala *in vivo* i u pogodnim *in vitro* sustavima, kvantitativno okarakterizirati antioksidativni status (odrediti ukupnu antioksidativnu aktivnost) u ljudskom i životinjskom organizmu, posebno u biološkim tekućinama, sintetizirati nove visokoučinkovite inhibitore procesa nastanka slobodnih radikala i definirati odnos između struktura i aktivnosti sintetiziranih i prirodnih antioksidansa u širokom koncentracijskom području. Provedena su tako istraživanja antioksidativne aktivnosti kumarina, eskuletina, fraksetina i dikumarola gdje se za studije inicijacije nastanka slobodnih radikala u tekućoj fazi koristi metoda inhibicije. Kao biokatalizatori koriste se različite organske peroksidaze, a neki poznati supstrati peroksidaza su aromatski amini poput *o*-fenilendiamina (PDA) i tetrametilbenzidina (TMB) koji se koriste kao akceptori radikala čija oksidacija rezultira stvaranjem produkata i omogućava spektrofotometrijsko praćenje odvijanja slobodno-radikalskih procesa. Provedenim je istraživanjem utvrđeno da kumarin nije pokazao inhibicijski učinak za transformaciju TMB što se objašnjava izostankom fenolnih OH skupina na kumarinskoj strukturi. Eskuletin se pokazao kao visokoučinkovit inhibitor oksidacije TMB-a s najnižom inhibicijskom konstantom K_i , slijedi dikumarol koji je također vrlo dobar inhibitor, a posljednji je fraksetin s najvećom vrijednosti K_i . Navedena antioksidativna aktivnost objašnjava se prisutnošću hidroksilnih skupina. Naime, kod eskuletina su prisutne 6,7-dihidroksi skupine koje se smatraju najoptimalnijima za interakciju s radikalskim vrstama, dok se smanjena aktivnost dikumarola pripisuje položaju OH skupina koje su u nearomatskom okruženju. Fraksetin ima OH skupine u položajima 7 i 8 gdje se 8-hidroksi skupina smatra manje aktivnom, a metilirana OH skupina u položaju 6 također smanjuje aktivnost u reakciji s radikalima pa je on očekivano najmanje aktivan. Na slici 5. prikazane su strukture eskuletina i fraksetina.[15]



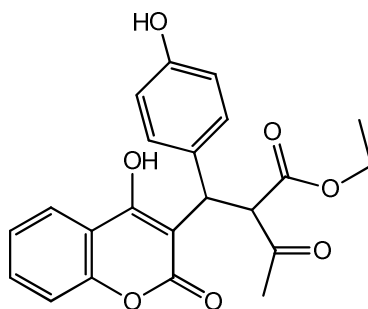
Slika 5. Eskuletin i fraksetin

Jedna od metoda ispitivanja antioksidativne aktivnosti *in vitro* jest metoda čišćenja od slobodnih radikala DPPH (1,1-difenil-2-pikrilhidrazil), superoksida i dušikovog oksida uz istodobnu usporedbu s nekim standardnim antioksidansom poput askorbinske kiseline. Neki od derivata ispitani navedenom metodom su 4-hidroksikumarin, 4-hidroksi-5-klorkumarin i 7-hidroksi-4-metilkumarin (slika 6). Test se temelji na praćenju promjene valne duljine apsorpcijskog maksimuma prilikom redukcije stabilnog slobodnog radikala DPPH određenim antioksidansom. Redukcijom dolazi do pomaka maksimuma apsorpcije u niže valne duljine (hipsokromni pomak), a na osnovu usporedbe pomaka sa standardom (askorbinska kiselina) izračunava se postotak čišćenja tzv. „scavenging activity“. Osim DPPH mogu se koristiti i neki drugi sustavi slobodnih radikala i postupak određivanja antioksidativne aktivnosti je vrlo sličan. Pokazano je da u sustavu DPPH sva tri kumarinska derivata imaju dobru antioksidativnu aktivnost koja je vrlo bliska onoj askorbinske kiseline, a koja je u slučaju 7-hidroksi-4-metilkumarina bolja od askorbinske kiseline, što se pripisuje elektron-donirajućoj prirodi supstituenata poput –OH, –CH₃ i –Cl koji omogućavaju doniranje protona i sparivanje elektrona uz nastanak DPPH-H (hidrazina) žute boje. Slično ponašanje pokazano je i za superoksidni slobodni radikal gdje najbolju antioksidativnu aktivnost pokazuje 7-hidroksi-4-metilkumarin, a u sustavu dušikova oksida sva tri derivata pokazala su antioksidativnu aktivnost koja se ne popodudara dobro s aktivnošću askorbinske kiseline.[16]



Slika 6. 4-hidroksikumarin, 4-hidroksi-5-klorkumarin i 7-hidroksi-4-metilkumarin

Derivati 4-hidroksikumarina pokazuju dobru aktivnost kao hvatači radikala, a utvrđeno je da najbolju aktivnost pokazuju oni supstituirani elektron-donirajućim skupinama na trećem i sedmom položaju kumarinske jezgre. Istraženi su 3-supstituirani derivati kumarina koji imaju hidroksi-, etoksikarbonil-, trimetoksi- i nitro-fenilne skupine te je utvrđeno da su –OH i –OCH₃ skupine neophodne za dobru antioksidativnu aktivnost, one aktiviraju aromatsku jezgru i samim time su dobri hvatači slobodnih radikala. Nitro i karboksilne skupine su elektron-odvlačeće što uzrokuje slabiju antioksidativnu aktivnost takvih kumarinskih derivata. Na slici 7. prikazan je struktura derivata koji je pokazao najizraženiju antioksidativnu aktivnost istraženih kumarinskih derivata.[17]



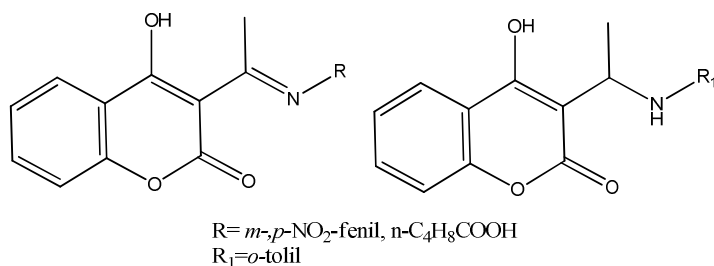
Slika 7. Derivat 4-hidroksikumarina s dobrom antioksidativnom aktivnošću

Reaktivne kisikove vrste doprinose antioksidativnom stresu koji potiče progresiju Chagasove bolesti, odnosno američke tripanosomijaze koju uzrokuje praživotinja bičlaš *Trypanosoma cruzi*, a koja se javlja u Središnjoj i Južnoj Americi, u ruralnim i siromašnijim područjima. Prilikom infekcije i razvoja ove bolesti izlučuju se toksični sekreti parazita koji dovode do nastanka ROS-a, a manjak učinkovitih i specifičnih lijekova za ovu bolest dao je ideju za istraživanje antioksidansa koji bi reducirali nastanak ROS-a i njihova štetnog učinka i nastanka oksidativnog stresa. Tako su sintetizirani neki 3-aril-4-hidroksikumarinski derivati i ispitana je njihova antitripanosomska i antioksidativna aktivnost. Derivati su sintetizirani paladijem kataliziranim Suzuki-jevima reakcijama unakrsnog povezivanja pomoću različito supstituiranih fenilbornih kiselina. Derivati s nesupstituiranim fenilnim prstenom u položaju 3 kumarinske jezgre te oni s *p*-klor ili *p*-metil supstituentom pokazali su dobru antitripanosomalnu aktivnost za razliku od 4-hidroksikumarina ili *p*-metoksi i *m*-hidroksi fenilnog derivata 4-hidroksikumarina (slika 8). Stoga je vidljivo da odsutstvo 3-fenilnog supstituenta ili njegova hidroksi i metoksi susptitucija nisu pogodni za antitripanosomalnu aktivnost derivata 4-hidroksikumarina, dok *p*-klorfenilni supstituent najbolje utječe na navedenu aktivnost. Najbolju antioksidativnu aktivnost pokazali su derivati s *p*-metilfenilnim supstituentom zbog jakog elektron-donirajućeg efekta koji povećava elektronsku gustoću oko 4-hidroksilne skupine pa se favorizira donirajući mehanizam protona te derivat s *m*-hidroksifenilnim supstituentom i 6-klor supstituiranom kumarinskom jezgrom koji je pokazao najbolju antioksidativnu aktivnost (slika 8.). Stoga se može zaključiti da je za dobru antioksidativnu aktivnost potrebna elektron-donirajuća skupina poput hidroksilne, metoksi ili metilne u para položaju 3-fenilnog supstituenta, ali i prisutnost elektron-odvlačeće skupine poput klora na položaju 6 4-hidroksikumarinske strukture.[18]



Slika 8. Derivati 4-hidroksikumarina s istraženom antripanosmalnom i antioksidativnom aktivnošću

Sintetizirani su različiti supstituirani imino i amino derivati 4-hidroksikumarina i istražena su njihova antioksidativna svojstva (zbog dobre antioksidativne aktivnosti 4-hidroksikumarina i njegovih derivata), antibakterijska i antifungalna aktivnost (koje pokazuju imino i amino skupine). Bolju antioksidativnu aktivnost pokazali su amino-supstituirani kumarini s nitrofenilnim skupinama. Derivat s *n*-pentanskom kiselinom kao supstituentom na dušiku amino skupine pokazao je najbolju antibakterijsku aktivnost koja je dobro izražena i kod ostalih amino derivata, a slabije kod imino derivata. Dobru antifungalnu aktivnost pokazali su imino derivati kumarina, od kojih je najbolji *o*-tolilimino derivat. Vidljivo je stoga da uvođenjem novih farmakofora na 4-hidroksikumarinsku jezgru nastaju spojevi s poboljšanom aktivnosti koji bi mogli biti dobri antimikrobni agensi (slika 9.).[19]

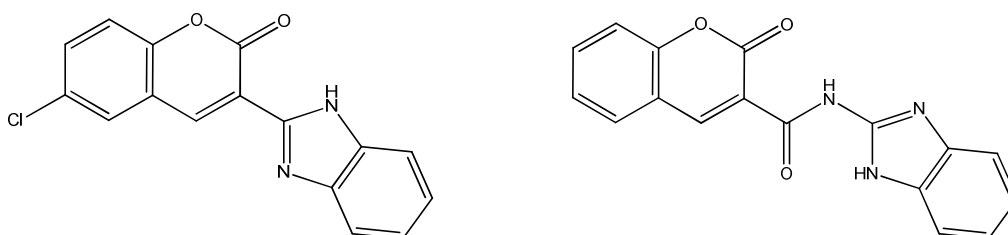


Slika 9. Amino i imino derivati 4-hidroksikumarina s dobrom antioksidativnom, antibakterijskom i antifungalnom aktivnošću

Može se zaključiti da kumarini supstituirani hidroksilnim skupinama pokazuju odličnu antioksidativnu aktivnost upravo zbog sposobnosti sudjelovanja hidroksilnih skupina u radikalnim reakcijama gdje se ponašaju kao fenolni ili kinonski antioksidansi. Pri tome

nastaju stabilni fenoksi ili semikinonski radikali čemu pridonose elektron-odvlačeće skupine na aromatskom sustavu i što veća delokalizacija π elektrona.[20]

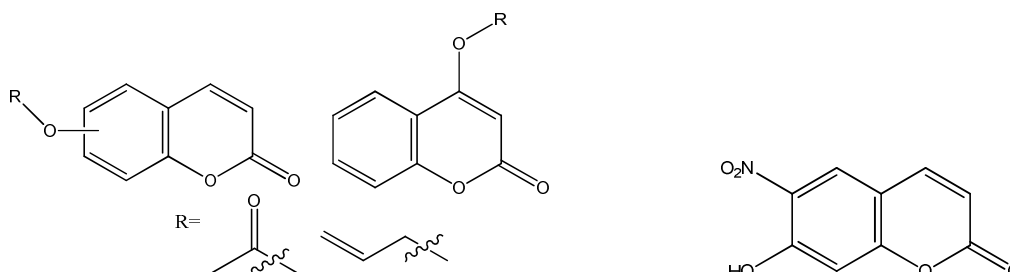
Budući da su upalni procesi važni indikatori mnogih patoloških stanja poput reumatoidnog artritisa, osteoartritisa i Alzheimerove bolesti, a kronične upale mogu aktivirati i druge upalne procese, njihova kontrola je vrlo bitna. Za kontrolu različitih kroničnih upalnih stanja uspješno se koriste nesteroidni protuupalni lijekovi (NSAIDs), ali je njihova glavna mana gastična netolerancija koja se manifestira kao krvarenja i čirevi. S obzirom na svoju raznoliku biološku aktivnost, kumarini su proučavani kao alternativa postojećim protuupalnim lijekovima te je utvrđeno da se protuupalna aktivnost povećava uvođenjem aromatske skupine direktno ili preko amidne poveznice u položaj 3 kumarinske jezgre. Pogodna aromatska skupina je 2-benzimidazolni supstituent koji se nalazi u strukturi mnogih dostupnih lijekova za čireve. Stoga su sintetizirani derivati 6-supstituiranih kumarina kojima je u položaj 3 uveden 2-benzimidazolni supstituent i ispitana je njihova protuupalna i antioksidativna aktivnost sa smanjenom gastro-toksičnošću. Za dobru protuupalnu aktivnost potrebna je direktna supstitucija benzimidazola na kumarinsku jezgru kao i supstitucija kumarina elektron-odvlačećim skupinama (-Cl ili -Br). Dobra antioksidativna aktivnost utvrđena je kod derivata s amidnom poveznicom i elektron-odvlačećim skupinama na supstituiranom kumarinskom derivatu. Na slici 10. prikazani su derivati koji su pokazali najbolju protuupalnu i antioksidativnu aktivnost, dobru oralnu bioraspodjivost i apsorpciju te maksimalnu sigurnost za želučanu sluznicu i induciranje antioksidativnog stresa.[21]



Slika 10. 2-benzimidazolini derivati kumarina s dobrom protuupalnom, antioksidativnom i gastro-protektivnom aktivnošću

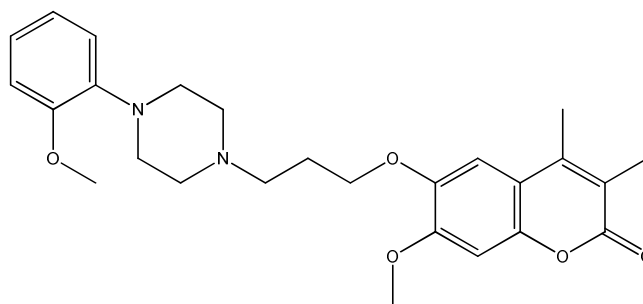
Antifungalni lijekovi često postaju neučinkoviti u borbi protiv gljivičnih oboljenja zbog pojave rezistentnosti ili su pak toksični i imaju utjecaj na različite sustave i organe, izazivaju infekcije i ponašaju se kao fungistatici, a ne fungicidi. Budući da su neki kumarini izolirani iz biljaka pokazali antifungalnu aktivnost, sintetizirani su različiti derivati kumarina i

to *O*-supstituirani te je proučavana njihova *in vitro* antifungalna anktivnost protiv *Aspergillus* vrsta. Najbolju antifungalnu aktivnost pokazali su derivati koji su *O*-supstituirani u položaju 4, 6 ili 7 kumarinske jezgre i to alifatskim lancem poput geranila, prenila ili alila te oni s elektron-odvlačecim skupinama poput NO₂ ili acetata (slika 11.).[22]

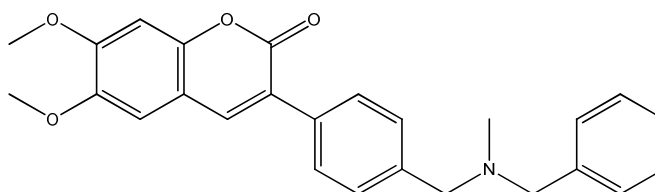


Slika 11. Derivati kumarina s dobrom antifungalnom aktivnošću

Alzheimerova bolest (AD) je progresivni degenerativni poremećaj mozga i jedan od najčešćih oblika demencije kod starijih ljudi, a povezana je s oštećenjem kolinergičkog sustava i smanjenom razinom acetilkolina u dijelovima mozga koji su odgovorni za procese učenja, pamćenja, ponašanja i emocija. Neuropatološki je karakterizirana prisutnošću β -amiloidnih plakova (agregacija amiloid- β proteina, A β) i redukcijom sinaptičke dostupnosti acetilkolina pa su lijekovi za simptomatsko liječenje AD temeljeni na povećanju sinaptičke razine acetilkolina u mozgu i to inhibicijom enzima acetilkolinesteraze (AChE) čija je funkcija hidroliza acetilkolina. Acetilkolinesteraza interreagira s amiloid- β proteinom i potiče agregaciju amiloidnih plakova pa je značajna sinteza spojeva koji će biti AChE inhibitori i usporavati nakupljanje A β . Jedan od poznatih inhibitora AChE je ensakulin koji je u fazi kliničkog ispitivanja kao potencijalni AD agens (slika 12.a). SAR studija sintetiziranih 3,4- i 6,7-disupstituiranih kumarinskih derivata pokazala je da je kumarinska struktura važna za AChE inhibiciju jer spojevi s kromonskom jezgrom pokazuju gubitak navedene aktivnosti. Kumarin interreagira s AChE na perifernoj anionskoj strani pa su sintetizirani derivati koji interreagiraju s katalitičkim mjestom enzima poput onih s benzilamino, fenilpiperazinskim i anilinskim supstituentom povezanim preko tetrametilenske ili fenilne poveznice. Nadalje, 3- i 4- supstitucija navedenim supstituentima je najpogodnija za vezanje u katalitičko mjesto AChE, a pristunost elektron-donirajućih skupina poput -OCH₃, -OH i -NH₂ povećava aktivnost i lipofilnost sintetiziranih derivata. Na slici 12.b prikazan je derivat kumarina koji se pokazao kao najbolji AChE inhibitor s dobrom A β antiagregacijskom aktivnošću.[23]

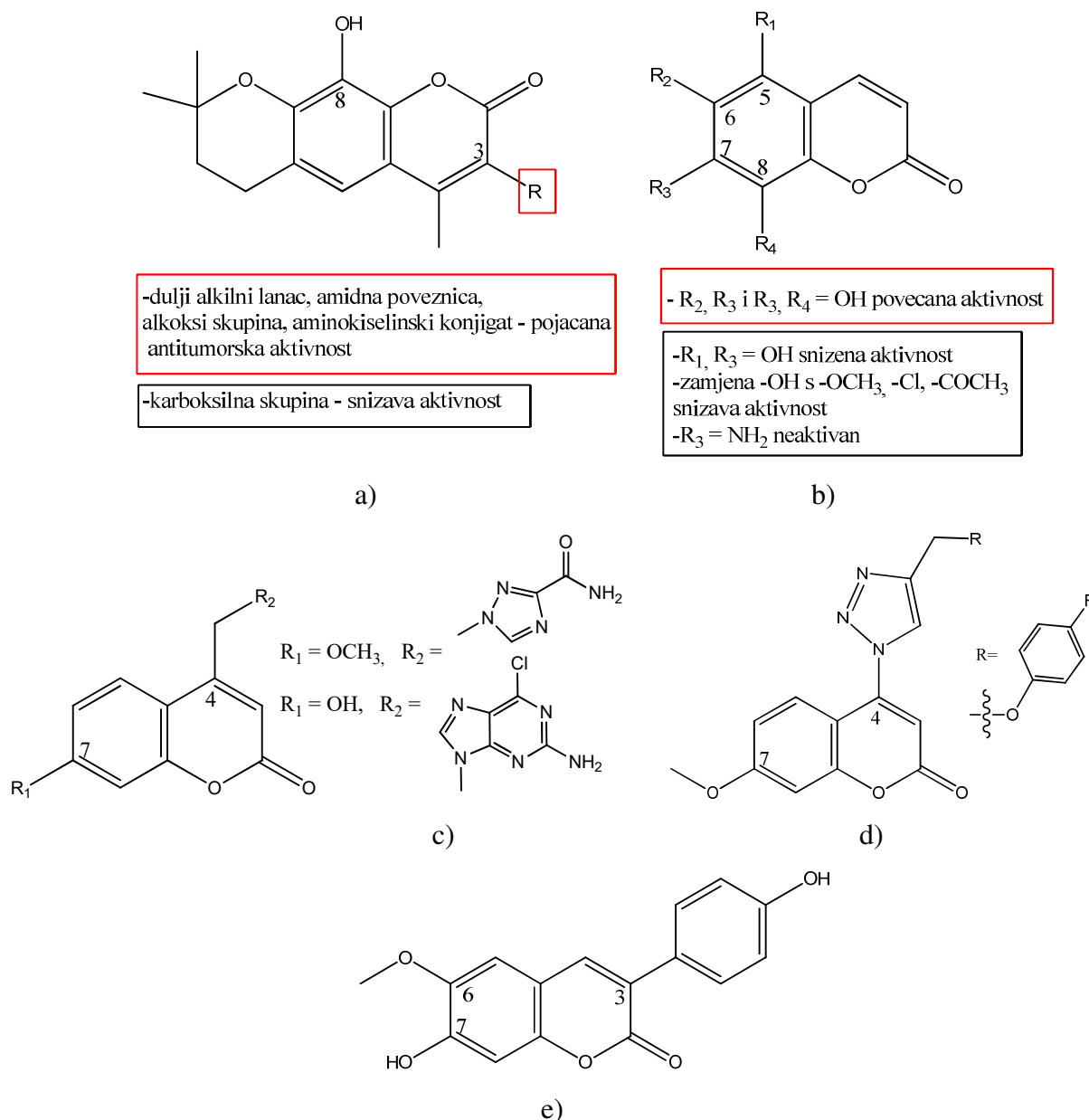


Slika 12. a) Ensakulin, AChE inhibitor u fazi kliničkog ispitivanja za liječenje AD

Slika 12. b) 6,7-dimetkosikumarinski derivat koji se pokazao kao dobar AChE inhibitor s A β antiagregacijskom aktivnošću

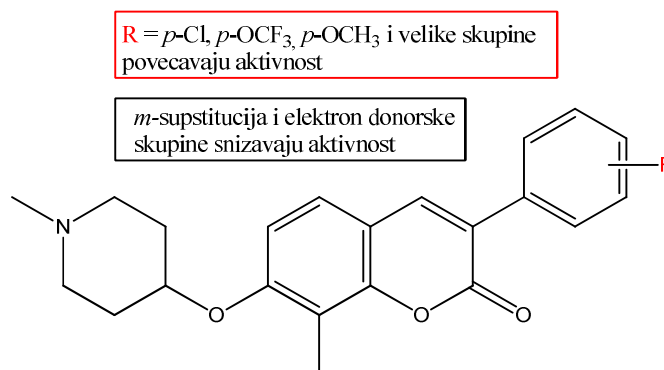
Jedna od najzanimljivijih bioloških aktivnosti kumarina obuhvaća protutumorsku aktivnost, a zbog različitih položaja na kojima je moguće provesti supstituciju ta aktivnost može biti s minimalnim nuspojavama te vrlo selektivna zbog njihove mogućnosti reguliranja različitih staničnih puteva. Neki od tih puteva uključuju inhibiciju kinaza, poticanje faze mirovanja staničnog ciklusa dijeljenja i inhibiciju mitoze, inhibiciju angiogeneze, proteina toplinskog šoka (HSP) i telomeraza, inhibiciju ugljične anhidraze i monokarboksilatnih transportera, aromataza i sulfataza. Stoga su sintetizirani različiti derivati kumarina te su provedena istaživanja antitumorske aktivnosti i određen je odnos strukture i aktivnosti (SAR). Tako su kao inhibitori kinaza istraživani kumarini s hidrazid-hidrazon okosnicom supstituirani bromom koji je neophodan za antitumorsku aktivnost zbog elektronegativnog efekta. Također, različito supstituirani piranokumarini pokazuju antiproliferacijsku aktivnosti i inhibiciju Src-kinaze, npr. C3 alkil-supstituirani piranokumarini s duljim lancem, oni s amidnom poveznicom, alkoksi skupinom ili aminokiselinski konjugati pojačavaju antitumorsku aktivnost, dok ju karboksilna skupina snižava (slika 13.a). Provedeno je SAR ispitivanje pro-apoptozne aktivnosti derivata *orto*-dihidroksikumarina (položaj 6 i 7 ili 7 i 8) te je utvrđeno da su oni aktivniji od *meta*-dihidroksi derivata (položaj 5 i 7), a zamjena bilo koje-OH skupine s $-OCH_3$, $-Cl$ ili $-COCH_3$ snižava aktivnost, dok je monoaminski derivat u položaju 7 kumarinskog prstena inaktivan kao i 4-metilkumarinski derivat (slika 13.b). Citostatsku aktivnost pokazuju i derivati s 1,2,4-triazolilnim i purinskim supstituentom u

položaju 4 7-metoksi- odnosno 7-hidroksikumarina. Značajnu cistotatsku aktivnost protiv cervikalnog karcinoma (HeLa stanica) pokazuje karboksamidni derivat 1,2,4-triazola 7-metoksikumarina, dok 2-amino-6-kloropurinski derivat 7-hidroksikumarina pokazuje dobru aktivnost protiv HepG2 stanične linije (hepatocelularni karcinom) (slika 13.c). Derivati kumarina s 1,2,3-triazolilnim supstituentom u C4 položaju kumarina pokazali su dobru antitumorsku aktivnost protiv stanica MCF 7 (rak dojke), SW480 (adenokarcinom debelog crijeva) te A549 (adenokarcinom alveolarnih bazalnih epitelijskih stanica). SAR studija je pokazala da zamjena 1,2,3-triazola piperazinom uzrokuje gubitak aktivnosti, a važna je i supstitucija u položaju 7 metoksi skupinom. Spoj prikazan na slici 13.d pokazao je dobru antitumorsku aktivnost u induciranju faze mirovanja staničnog ciklusa i apoptoze. Također, antiproliferativnu aktivnost pokazuju 3-arilni derivati hidroksikumarina od kojih je najznačajnija aktivnost derivata supstituiranog *para*-hidroksifenilnim supstituentom u položaju 3, metoksi- u položaju 6 i hidroksi- u položaju 7 kumarinske jezgre. Taj je derivat pokazao dobru aktivnost protiv HL-60 (stanice mijeloične leukemije) i A549 inducirajući fazu mirovanja i apoptoze stanice (slika 13.e).[24]



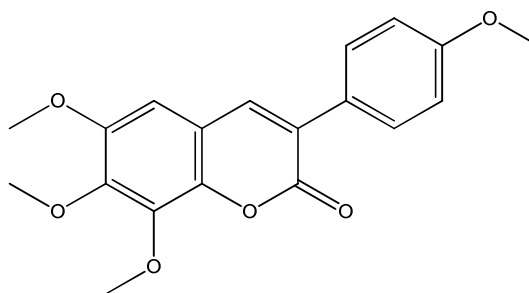
Slika 13. a) Derivati piranokumarina, b) dihidroskikumarinski derivati, c) 1,2,4-triazolilni derivati, d) 1,2,3-triazolilni derivat i e) 3-arilni derivat kumarina s dobrom antitumorskom aktivnošću

Derivati 3-arilkumarina pokazali su se i kao inhibitori HSP 90 proteina (sudjeluje u stabilizaciji proteina neophodnih za rast tumora) i SAR studijom je utvrđeno da je za aktivnost potrebna supstitucija metilnom skupinom u položaju 8 kumarinskog prstena, a *para* supstitucija fenila elektron odvlačećim skupinama pokazuje bolju aktivnost spojeva od *meta* supstituiranih i elektron donirajućih skupina (slika 14.).[24]



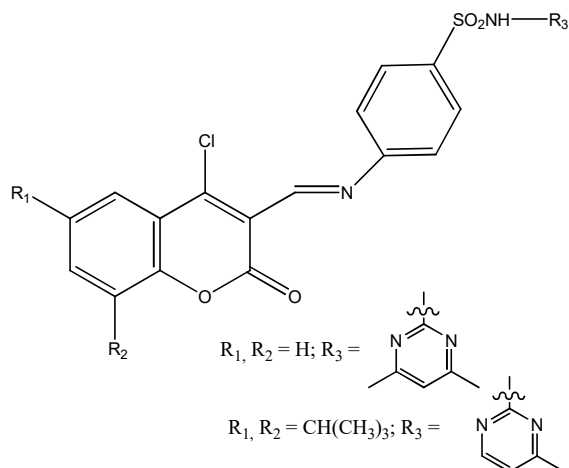
Slika 14. 3-arilni derivati kumarina inhibitori HSP 90 proteina

Neki polialkoksi derivati 3-(4-metoksifenil)kumarina djeluju kao antimitotski agensi, odnosno inhibiraju dijeljenje stanice u prometafazi i metafazi, a čija je meta mikrotubulin. Tako je utvrđeno da metoksi- skupina u položaju C6, C7 i C8 (slika 15.) daje optimalnu aktivnost spojeva i to destabilizacijom mikrotubula.[24]



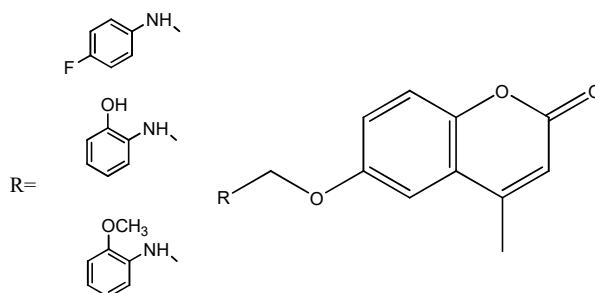
Slika 15. Polialkoksi derivat kumarina s antimikrotubularnom aktivnošću

Sulfonamidni derivati kumarina pokazali su se kao inhibitori hCA IX i hCA II enzima, odnosno ugljične anhidraze koja sudjeluje u stvaranju bikarbonata i pridonosi kiselosti tumorskog okruženja što rezultira stvaranjem metastatskog fenotipa i kemorezistencije na različite antitumorske lijekove. Kumarini mogu dobro regulirati pH tumorskih stanica i inhibirati aktivnost ugljične anhidraze kod hipoksije tumora. Sintetizirani su fenilsulfonamidi povezani preko hidrofilne iminske poveznice s kumarinskom jezgrom i supstituirani metilpirimidinom i pokazali su se kao aktivni i efikasni inhibitori ugljičnih anhidraza (slika 16.).[24]



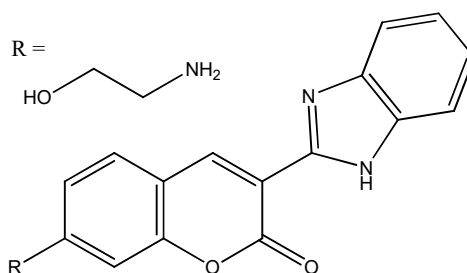
Slika 16. Sulfonamidni derivati kumarina kao inhibitori ugljičnih anhidraza

Derivati 4-metil-kumarina pokazali su citotoksičnu aktivnost protiv Hep2 stanične linije. Tako su sintetizirani derivati kojima su preko metoksi-poveznice u položaju 6 kumarinske jezgre uvedeni *para*-fluor-, *orto*-hidroksi- i *orto*-metoksi-fenilamino- supstituenti (slika 17.). Ti spojevi pokazuju dobru aktivnost u usporedbi s referentnim lijekom Metotreksatom.[24]



Slika 17. Derivati 4-metil-kumarina s dobrom citostatskom aktivnošću

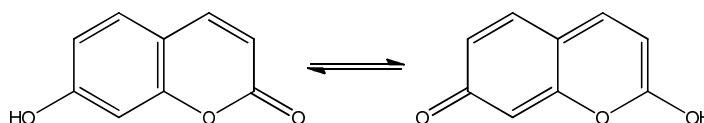
Hibridi benzimidazola i kumarina (slika 18.) pokazuju dobru inhibicijsku aktivnost prema različitim staničnim linijama poput stanica melanoma, tumora jajnika i bubrega, a SAR studija je pokazala da prisutnost etanolaminskog supstituenta u položaju 7 povećava aktivnost spojeva koja je usporediva s aktivnošću 5-fluoruracila.[24]



Slika 18. Hibrid benzimidazola i kumarina s dobrom citostatskom aktivnošću

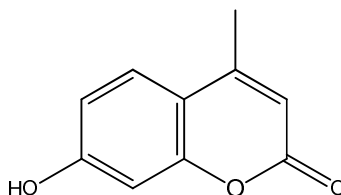
2.2. 7-hidroksi-4-metilni derivati kumarina

Kako 7-hidroksikumarin, trivijalnog imena umbeliferon, posjeduje dobru antioksidativnu, antifungalnu i citostatsku aktivnost, sinteza njegovih derivata od velikog je interesa. Osim bioloških aktivnosti navedenih u poglavlju 2.1., 7-hidroksikumarin i njegovi derivati posjeduju dobra fluorescencijska svojstva što im omogućava potencijalnu upotrebu kao bioloških proba i markera važnih za biološka istraživanja i studije.[25] Kao i molekula nesupstituiranog kumarina, umbeliferon podliježe tautomeriji i može postojati u keto i enolnom obliku (slika 19.).[26]



Slika 19. Tautomerija 7-hidroksikumarina (umbeliferona)

Tako se 7-hidroksi-4-metilkumarin i njegovi derivati široko koriste kao molekulske probe, a s različitim supstituentima moguće je pripremiti spojeve koji će pokazivati vrlo različita svojstva, bilo s boljim fluorescencijskim svojstvima ili pak raznoliku biološku aktivnost. Derivati 7-hidroksi-4-metilkumarina pokazuju biološke aktivnosti poput antibakterijske, antituberkularne, antifungalne, anti-HIV, djeluju kao antineoplastici, neuroleptici i antihelmintici.[27] 7-hidroksi-4-metilkumarin, poznat i pod nazivom 4-metilumbeliferon (slika 20.) može se sintetizirati Peckman-ovom sintezom kao i drugi kumarinski derivati, a po fizikalnim karakteristikama je žućkasti prah s talištem na 194-195°C i topljiv u metanolu, a gotovo netopljiv u vodi. [28]



Slika 20. 7-hidroksi-4-metilkumarin (4-metilumbeliferon)

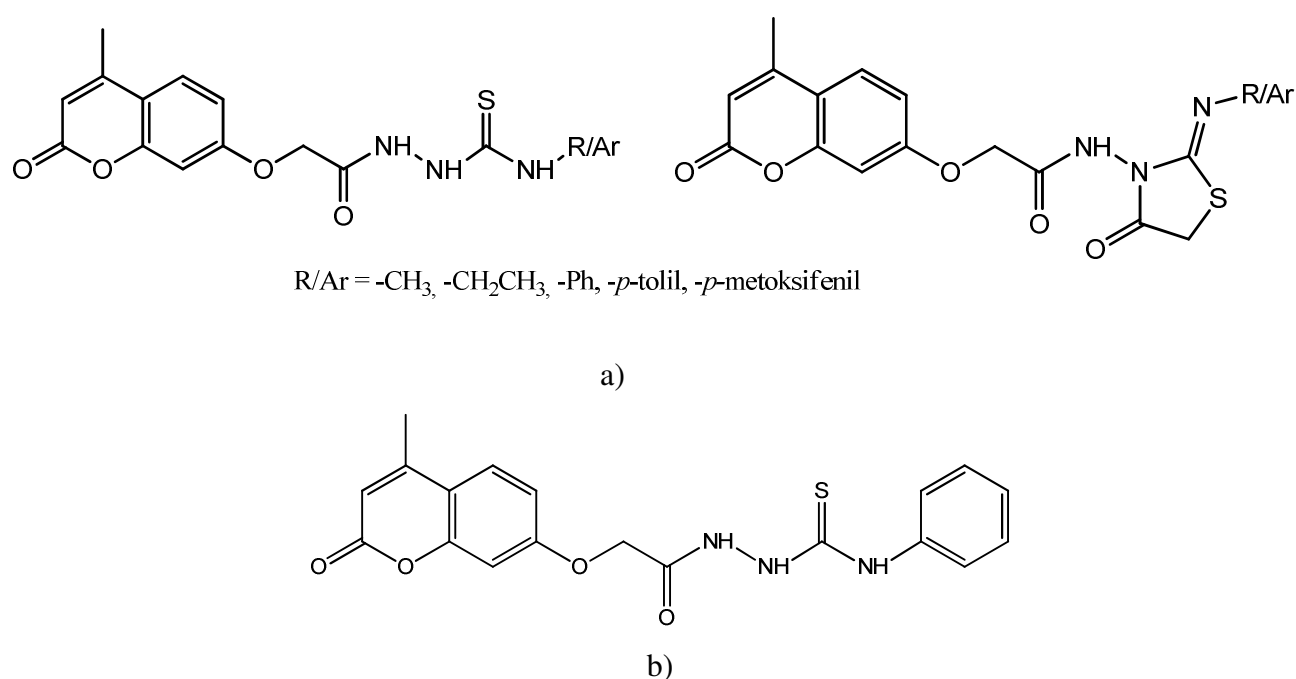
7-hidroksi-4-metilkumarin pokazao se kao inhibitor sinteze hijaluronana (HA). Hijaluronan je visokomolekularni polisaharid, glikozaminoglikan (GAG) koji je prisutan kao većinska komponenta u ekstracelularnom matriksu mnogih tkiva. Ima veliku ulogu u remodeliranju tkiva za vrijeme razvoja, a poremećaji njegova metabolizma, distribucije i funkcije povezani su s mnogim bolestima (artritis, imuno i upalni poremećaji, plućne i

vaskularne bolesti te rak). Povećana razina HA često je povezana s različitim tipovima primarnog i sekundarnog metastatskog tumora kod čovjeka i pridonosi njegovoj proliferaciji i metastaziranju. Stoga je sinteza inhibitora hijaluronana od velikog interesa za tretman različitih vrsta raka, primarno hepatokarcinoma, ali i fibroze ili ciroze jetre, budući da se hijaluronan apsorbira i metabolizira u jetri. HA stvara intra- i inter-molekularne strukture čime se tumoru osigurava strukturni integritet, održavanje homeostaze, otpuštanje faktora rasta, citokina i ostalih nutrienata bitnih za proliferaciju. Sudjeluje u održavanju signalnih procesa bitnih za rast, neovaskularizaciju i metastaziranje. Povišene razine HA također su zabilježene kod nekih kroničnih poremećaja poput dijabetesa tipa 1 i 2 i ciroze jetre, a utječe i na T-limfocite bitne u autoimunom odgovoru. 7-hidroksi-4-metilumarin djeluje kao kompetitivni inhibitor za enzim koji je uključen u jedan od koraka biosinteze HA, kovalentno se veže hidroksilnim skupinama na glukuronsku kiselinu i tako reducira sintezu hijaluronana. Smatra se specifičnim inhibitorom koji ne utječe na ostale glikozaminoglikane. Osim djelovanja na tumorske stanice, HA ima ulogu i u upalnim i kroničnim procesima te autoimunosti pa je 7-hidroksi-4-metilumarin istraživan kao potencijalni agens u terapijskoj strategiji upala i autoimunosti.[28]

Kao potencijalni antimetastatski agens, 7-hidroksi-4-metilumarin istraživan je na humanim stanicama melanoma *in vivo* gdje je dokazana navedena aktivnost jer su nakon tretmana stanice melanoma pokazale sniženu razinu HA i inhibirano je metastaziranje u jetri.[29] Budući da je sam mehanizam inhibicije sinteze HA složen i slabo poznat, provedene su studije na humanim fibroblastima i utvrđeno je da 7-hidroksi-4-metilumarin ne utječe na sintezu drugih glikozaminoglikana, a sam mehanizam inhibicije podrazumijeva vezanje na glukuronsku kiselinu posredstvom enzima UGT i prekidanje sinteze prekursora za sintezu HA pomoću enzima HA sintetaze (HAS).[30] Antitumorska aktivnost istraživana je i na humanim stanicama raka gušterače s različitim derivatima 7-hidroksi-4-metilumarina s ciljem nalaženja efikasnijeg HA inhibitora. Tako su istraženi 6-hidroksi-4-metilumarin, 6,7-dihidroksi-4-metilumarin, 6,7-dihidroksikumarin, 7-hidroksi-3-metilumarin, 7-hidroksi-3,4-dimetilumarin i 5,7-dihidroksi-4-metilumarin te je utvrđeno da su za inhibiciju neophodne i 7-hidroksi i 4-metilna skupina, a dodatna hidroksilna skupina u položaju 5 ili 6 pojačava inhibicijsku aktivnost.[31] Također se 7-hidroksi-4-metilumarin pokazao kao inhibitor hijaluronske kiseline za hepatocelularni tumor kod miševa gdje je utvrđeno znatno reduciranje proliferacije tumorskih stanica i induciranje apoptoze pri čemu nije zabilježena toksičnost.[32] Istražen je i kemopreventivni i terapijski učinak za rak prostate u fazi 1

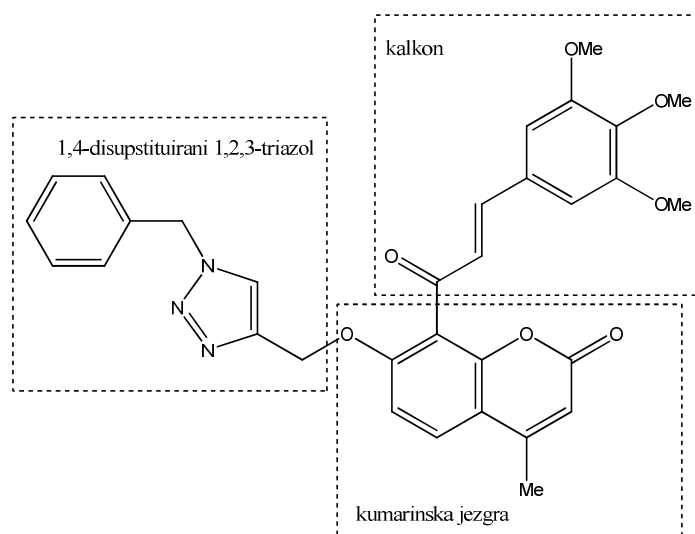
kliničkog istraživanja kako bi se optimirale količine za upotrebu kod ljudi i istražili eventualni toksični učinci pri terapijskoj dozi.[33] 7-hidroksi-4-metilkuarin poznat je i pod nazivom himekromon i koristi se kao terapijski agens u mnogim zemljama kao kolorektalni i žučni antispazmolitik. U Europi je dostupan i koristi se za tretman bilijarne diskinezije, dok u SAD-u nije u upotrebi i zahtijevana su dodatna klinička testiranja.[28]

SAR analizom i biološkim ispitivanjima utvrđeno je da supstitucija 7-hidroksi-4-metilkuarina u položaju 7 povećava njegovu biološku aktivnost. Stoga su sintetizirani različiti derivati u položaju 7 7-hidroksi-4-metilkuarina s tiosemikarbazonskim i 4-tiazolidinonskim supstituentima upravo zbog raznolike biološke aktivnosti koju oni pokazuju poput antibakterijske, antifungalne, antivirusne, antitumorske i antioksidativne. Navedenim je spojevima određena antioksidativna i antifungalna aktivnost te su 4-tiazolidinon supstituirani derivati pokazali bolju antifungalnu aktivnost, a fenil i *p*-metoksi supstituirani tiosemikarbazidni derivati 7-hidroksi-4-metilkuarina pokazali su i antioksidativnu i antifungalnu aktivnost (slika 21.a). Stoga se predlaže njihovo daljnje istraživanje kao potencijalnih agenasa za primjenu u medicini, prehrambenoj industriji i agrikulturi.[27] Na slici 21.b prikazana je struktura fenil- supstituiranog tiosemikarbazidnog derivata 7-hidroksi-4-metilkuarina s dobrom antioksidativnom i antifungalnom aktivnošću.



Slika 21. a) Derivati 7-hidroksi-4-metilkuarina tiosemikarbazonskim i 4-tiazolidinonskim supstituentima i b) tiosemikarbazidni derivat 7-hidroksi-4-metilkuarina s dobrom antioksidativnom i antifungalnom aktivnošću

Heterocikličke molekule poput triazola i njihovih derivata predstavljaju često istraživanu zanimljivu klasu spojeva zbog svoje dokazane farmakološke važnosti poput kemoterapeutske, a pokazuju i protuupalnu, analgetsku i anestetsku aktivnost, djeluju kao antineoplastici i antimalarici, anti-HIV i antitumorski agensi. Derivati kumarina koji na kisiku u C7 položaju sadrže benziltriazolilni supstituent i u C8 položaju kalkonsku jedinicu, sintetizirani su reakcijom potpomognutom mikrovalovima i istražena je njihova antimikrobna aktivnost u usporedbi s referentnim antibiotikom amoksicilinom. Novopripremljeni spojevi pokazali su dobru antimikrobnu aktivnost, a čak 2 feniltriazolilna derivata pokazala su bolju aktivnost prema izabranim gram-pozitivnim i negativnim bakterijama nego amoksicilin te protiv gljivica. Također, mikrovalna sinteza provedena u blagim reakcijskim uvjetima pokazala se kao vrlo učinkovita i s dobrim iskorištenjima pri čemu su sintetizirani derivati s dobrom antimikrobnom aktivnošću usporedivom s referentnim lijekom. Iz navedenog je vidljivo kako je kombinacijom različitih biološki aktivnih skupina moguće sintetizirati derivate s poboljšanom biološkom aktivnošću. Na slici 22. prikazana je struktura jednog od novopripremljenih spojeva, feniltriazolilnog derivata 7-hidroksi-4-metilkumarina.[34]

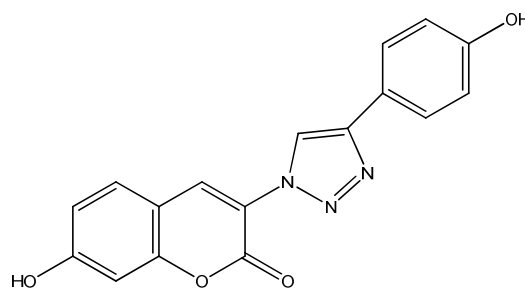


Slika 22. Hibrid triazola, kalkona i kumarina s poboljšanom antimikrobnom aktivnošću

Kumarini pokazuju vrlo dobra fluorescentna svojstva, a uvođenje 1,2,3-triazola dovodi do promjena u valnim duljinama emisije i povećanja intenziteta što su željena fotofizikalna svojstva fluorokromnih molekula. Budući da su ta svojstva direktna posljedica kemijske strukture, i vrlo male promjene mogu pridonijeti značajnom utjecaju na emisijska svojstva. Tako se npr. 3-azido-7-hidroksikumarini koriste za označavanje proteina, DNA i

glikokonjugata. Uvođenjem triazolilnog prstena na kumarinsku jedinicu sintetizirani su fluorofori koji bi se mogli koristiti za označavanje u kemiji biokonjugata jer pokazuju dobra fluorescentna svojstva, a bitno je napomenuti da osim uvođenja samog triazola u fluorofornu okosnicu treba obratiti pažnju i na supstituciju osnovne molekule, u ovom slučaju kumarina. Tako je najveći porast u intenzitetu fluorescencijske emisije uočen kod 7-triazolilnog 7-hidroksi-4-metilkumarinskog derivata, dok je serija 3-supstituiranih kumarinskih derivata s triazolom u položaju C7 pokazala najveće pomake u valnoj duljini emisije.[35]

Osim za navedenu upotrebu, triazolilni derivati kumarina mogu se koristiti kao fluorescentni pH senzori temeljeni na deprotoniranju hidroksilnih skupina. Fluorescentni senzori korisni su za praćenje intracelularnog pH koji igra veliku ulogu u različitim biološkim procesima, proliferaciji stanica i apoptozi. Stoga su razvijeni pH senzori koji su na antitijelima, nanočesticama ili polimerima konjugirani s nekom senzorskom molekulom, a čija su fluorescentna svojstva inducirana protoniranjem ili deprotoniranjem specifične funkcionalne skupine poput hidroksilne ili amino vezane na fluorofor. Takvi senzori mogu detektirati je li pH ispod ili iznad neke specifične vrijednosti, ovisno o pK_a vrijednosti te specifične skupine. Međutim, C3 *p*-hidroksifeniltriazolilni derivat 7-hidroksikumarina pokazao je jaku fluorescenciju u uvjetima neutralnog pH, pri čemu je u kiselom području nefluorescentan i protoniran, u neutralnom je deprotonirana 7-hidroksi skupina, a u lužnatom su obje hidroksilne skupine deprotonirane i fluorescencija nije prisutna. Dakle, porastom pH dolazi do deprotoniranja te do porasta intenziteta fluorescencije, a zatim do ponovnog pada što omogućava upotrebu ovog fluorescentnog senzora za određeni raspon pH. Struktura novog potencijalnog fluorescentnog senzora za specifični raspon pH prikazana je na slici 23.[36]



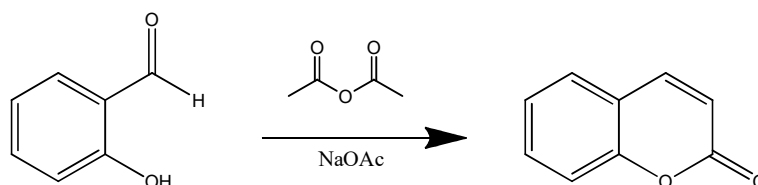
Slika 23. 3-triazolilni derivat 7-hidroksikumarina kao potencijalni fluorescentni senzor za specifični raspon pH

2.3. Sinteza kumarinskog prstena

Dobra biološka svojstva i raznolika aktivnost kumarina prirodnog porijekla čine spojeve s kumarinskim skeletom vrlo atraktivnom metom organske sinteze. Povijest sinteze kumarinskog prstena seže do sredine 19. st. kada je Perkin otkrio slavnu sintezu kumarina, reakciju kojom se i danas sintetiziraju navedeni spojevi. Međutim, danas su razvijeni i drugi sintetski putevi koji uključuju konvencionalne i mikrovalne strategije kao i različite polazne spojeve i reagense. Osim Perkin-ove reakcije, kumarinski prsten se može sintetizirati Pechmann-ovom i Knoevenagel-ovom reakcijom koje se smatraju klasičnim metodama sinteze te u novije vrijeme razvijenom Wittig-ovom, Kostanecki-Robinson i Reformatsky reakcijom.[37]

2.3.1. Perkin-ova reakcija

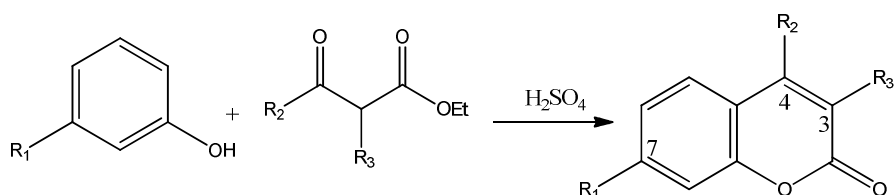
Perkin-ova reakcija općenito podrazumijeva pripravu derivata cimetine kiseline termičkom kondenzacijom aromatskih aldehida i alifatskih anhidrida kiseline u prisutnosti bazične tvari kao katalizatora. U normalnim uvjetima benzaldehid se kondenzira s anhidridom kiseline u prisutnosti soli iste kiseline pri čemu sol ne treba nužno biti specifična, već to mogu biti karbonati, acetati, fosfati, sulfati, sulfidi, natrijeve ili kalijeve soli ili pak tipične organske baze poput tercijarnih amina ili piridina.[38] Reakcija podrazumijeva enolizaciju anhidrida kiseline i aldolnu kondenzaciju aromatskog aldehida pri čemu nastaje intermedijer hidroksicimetna kiselina koja u prisutnosti soli spontano prelazi u lakton i zatvara pironski prsten. Primjer takve sinteze kumarina je kondenzacija *orto*-hidroksibenzaldehida i acetanhidrida u prisutnosti natrijeva acetata (alkalna sol kiseline) što je prikazano na shemi 3. Prva Perkin-ova sinteza kumarina uključivala je salicilaldehid i anhidrid octene kiseline u prisutnosti natrijeva acetata, a do danas su razvijene različite modifikacije koje uključuju katalizatore poput bezvodnog natrijevog fluorida ili dibenzo-18-kruna-6, a od različito supstituiranog salicilaldehida i odgovarajućeg anhidrida kiseline moguće je pripremiti različite kumarinske derivate.[37]



Shema 3. Perkin-ova reakcija sinteze kumarina

2.3.2. Pechmann-ova reakcija

Vrlo korisna i jedna od najučestalijih metoda sinteze kumarina je Pechmann-ova sinteza koja podrazumijeva reakciju fenola i β -ketoestera u prisutnosti jake kiseline kao katalizatora (shema 4.).[37] Prva Pechmann-ova sinteza kumarina provedena je s fenolom i 2-hidroksibutanskom dikiselinom zagrijavanjem u prisutnosti koncentrirane sumporne kiseline. Međutim, takva sinteza je ograničena budući da nastaje kumarin nesupstituiran na pironskom prstenu, a i mnogi fenoli ne podliježu reakciji pa je sinteza s β -ketoesterima puno učinkovitija u sintezi kumarinskih derivata. Mehanizam Pechmann-ove kondenzacije podrazumijeva nekoliko stupnjeva. U prvom stupnju jaka kiselina katalizira transesterifikaciju i keto-enolizaciju, slijedi Michaelova adicija u kojoj se stvara kumarinski skelet što je praćeno rearomatizacijom, a u posljednjem stupnju dolazi do kiselo katalizirane eliminacije vode što daje konačni produkt. Također, ovisno o supstituciji β -ketoestera, moguće je pripremiti različite derivate kumarina supstituirane u C-3 i C-4 položaju, a ovisno o supstituciji fenola dobivaju se i kumarini supstituirani na benzenskom prstenu. Općenito, reakciji lako podliježu β -ketoesteri s jednostavnim alkilnim skupinama u α -položaju te fenoli s aktivirajućim skupinama poput CH₃, OH, OCH₃, NH₂ u *meta*- i *para*- položaju, dok *orto*- položaj onemogućava kondenzaciju. Sinteza se može provesti s različitim kiselinama pa se uspješno koriste i aluminijev klorid i ostali metalni kloridi, fosforov pentoksid, trifluoroctena kiselina, triflati i sulfonska kiselina.

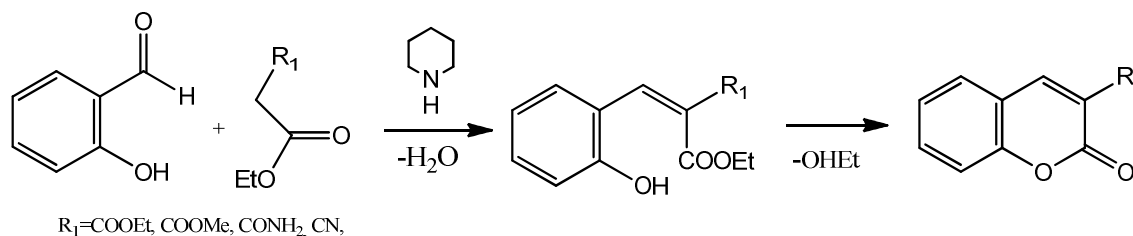


Shema 4. Pechmann-ova sinteza derivata kumarina

U svrhu poboljšanja sinteze i pripreve različitih derivata kumarina, istraženi su različiti reakcijski uvjeti kako bi se smanjilo reakcijsko vrijeme i poboljšalo iskorištenje reakcije. Tako je moguće provoditi sintezu potpomognutu mikrovalovima i ultrazvukom, koristiti različite katalizatore poput ionskih izmjenjivača, zeolita i polianilinskih sulfatnih soli.[39-41] Naposljetku, Pechmann-ovom sintezom rezorcinola (*m*-dihidroksibenzen) i etil acetoacetata u prisutnosti sumporne kiseline na sobnoj temperaturi nastaje 7-hidroksi-4-metilkumarin.[42]

2.3.3. Knoevenagel-ova reakcija

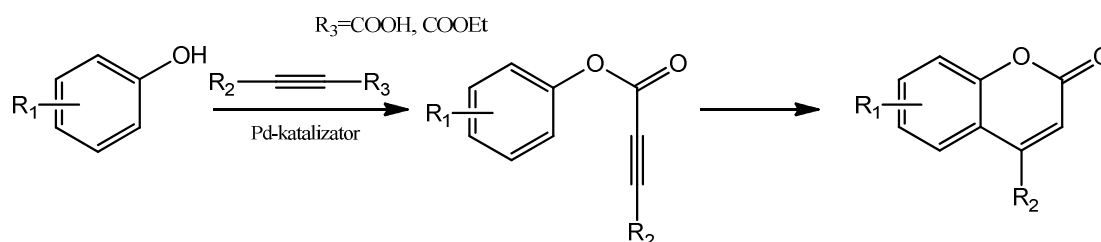
Knoevenagel-ova kondenzacija je reakcija u kojoj se aldehid (ili keton) kondenzira s aktiviranim metilenskim sustavom poput derivata etil-acetata u prisutnosti aminske baze kao katalizatora, piperidina ili piridina. U sintezi kumarinskog prstena najčešće se u Knoevenagel-ovoj reakciji kondenzira *orto*-hidroksibenzaldehid i etil- ili dietil-malonat, etil-acetoacetat ili etil-cijanoacetat u prisutnosti piperidina pri čemu nastaje C-3 supstituirani kumarin u visokim iskorištenjima (shema 5.).[37,39] Ova reakcija također je aldolna kondenzacija u kojoj se koriste 1,3-dikarbonilni spojevi koji stvaraju stabilne enolate u prisutnosti slabe organske baze. Takav stabilni enolat reagira s *orto*-hidroksibenzaldehidom i stvara aldol (transesterifikacija) pri čemu dolazi do eliminacije vode i zatvaranja kumarinskog prstena.[43]



Shema 5. Knoevenagel-ova sinteza kumarina

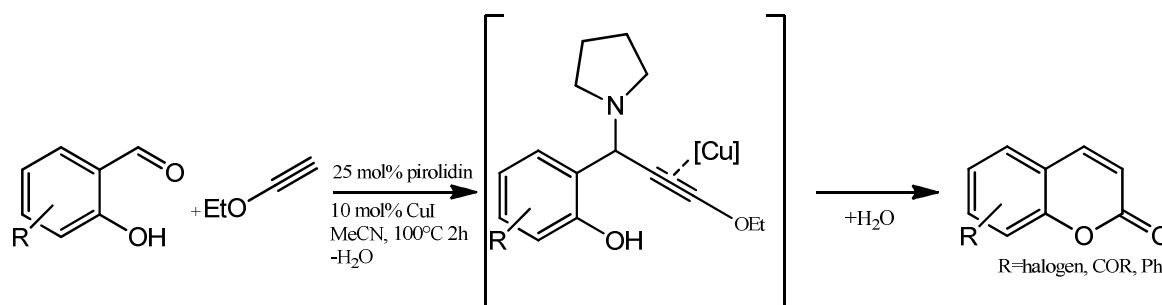
Knoevenagel-ova kondenzacija jedna je od vrlo učinkovitih metoda stvaranja C=C veza, a α,β - nezasićeni sustavi često se koriste kao intermedijeri u sintezi lijekova, prirodnih produkata, polimera i drugih kemikalija, ali mane kojima je reakcija praćena ograničavaju njenu upotrebu poput upotrebe toksičnih i kancerogenih otapala te nemogućnosti ponovne upotrebe katalizatora.[44] Ovom metodom sintetiziran je veliki broj C-3 kumarinskih derivata, ponajviše karboksiliranih i acetiliranih, benziliranih, alkiliranih i aminiranih kao i krunastih etera i različitih heterocikla premoštenjem vezanih na kumarinsku jezgru. Kako bi se sinteza unaprijedila, ispitani su različiti reakcijski uvjeti koji uključuju različite reaktante, reagense, otapala poput ionskih kapljevina, mikrovalnu sintezu i druge modifikacije poput sinteze u čvrstoj fazi i „solvent free one-pot“ reakcija i upotrebu heterogenih katalizatora poput zeolita.[37] Kondenzacijom *orto*-hidroksibenzaldehida i fenil-acetonitrila u prisutnosti natrijeva etoksida moguće je sintetizirati 3-fenilkumarinske derivate. Također, ako se kao otapalo koristi piridin u vrlo maloj količini, može se dobiti produkt u gotovo teoretskom iskorištenju.[41]

Osim navedenih klasičnih metoda sinteze, kumarinske derivate moguće je sintetizirati pomoću stero- i regioselektivnog paladij-kataliziranog hidroariliranja. To je reakcija između aril-halida i funkcionaliziranih alkina na sobnoj temperaturi praćena brzom intramolekularnom reakcijom ciklizacije (shema 6.). Osim funkcionaliziranih alkina, reakcija se može odvijati s terminalnim alkinima s alkilnim, arilnim, sililnim, hidroksilnim, cijano i esterskim supstituentima te *orto*-jodfenolom u piridinu pri čemu dolazi do paladijem katalizirane anulacije.[37,42]



Shema 6. Pd-katalizirana sinteza kumarina

Zabilježena je i sinteza katalizirana bakrom u kojoj se odvija tzv. A³ povezivanje alkina, aldehida i amina što vodi do cikloizomerizacije i hidrolize pri čemu nastaje kumarinski prsten. Navedena reakcija dobra je metoda stvaranja novih C-C i C-N veza, mogu se koristiti različiti prijelazni metali kao katalizatori poput bakra, srebra, zlata, kobalta, željeza, a cikloizomerizacija omogućava sintezu različitih heterocikličkih molekula. Tako je sintetiziran kumarinski prsten iz salicilaldehida, etoksiacetilena i pirolidina u prisutnosti CuI kao metalnog katalizatora pri čemu dolazi do A³ povezivanja i 6-endo-dig ciklizacije te hidrolizom intermedijera vinilnog etera nastaje konačni produkt (shema 7.).[45]



Shema 7. Cu-katalizirana sinteza kumarina

2.4. Organometalna sinteza

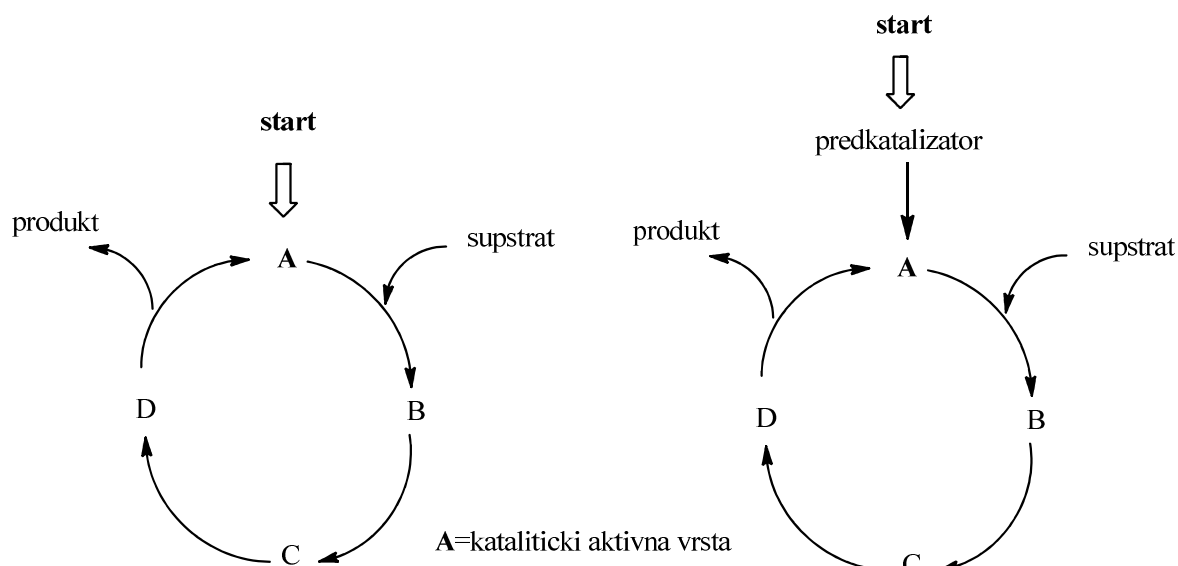
Organometalna kemija temeljena je na reakcijama i upotrebi klase spojeva koje karakterizira kovalentna veza između metala i ugljika (M-R), a podrazumijeva transformacije organskih molekula pomoću organometalnih spojeva u kojima se stvaraju nove C-C veze i različito funkcionalizirane molekule. Ona je dio koordinacijske i anorganske kemije, a spojevi i intermedijeri koji sudjeluju u organometalnim reakcijama sadrže jednu ili više metal-ugljik veza i često sadrže metal vezan na vodik, kisik ili dušik. Organometalni spojevi često se upotrebljavaju kao katalizatori u reakcijama sinteze novih organskih molekula, a značajna je i sposobnost izmjene svojstava supstrata do koje dolazi privremenim kompleksiranjem na metal što također omogućava različitu primjenu u organskoj kemiji. Mnogi katalitički procesi uključuju upotrebu prijelaznih metala te su vrlo korisni u svakodnevnoj laboratorijskoj sintezi, u industriji te u biologiji. Neki poznati organometalni spojevi uključuju polumetale poput kositra, bora i selena te metale poput litija, magnezija i natrija koji stvaraju organolitijeve i organomagnezijeve spojeve kao široko upotrebljavane reagense u organskoj sintezi, a značajni su i organometalni spojevi s bakrom, cinkom i paladijem koji služe kao katalizatori u stvaranju novih veza. Priprava organometalnih spojeva uključuje direktnu reakciju metala i organskog spoja ili zamjenu metala neke druge organometalne molekule. Takvi spojevi predstavljaju izvor nukleofilnog ugljikovog atoma koji može reagirati s elektrofilom pri čemu nastaju nove molekule što je i cilj organske sinteze u kojoj nastaju kompleksne molekule iz jednostavnijih polaznih spojeva.[46-48] Jedna od najkorisnijih reakcija u sintezi novih kompleksnih molekula je ona u kojoj se postiže direktna selektivna funkcionalizacija C atoma. Budući da su organometalni reagensi jaki nukleofili, selektivna metal-vodik izmjena, tzv. reakcija metaliranja vrlo je korisna u sintezi.[49] Upotreba organometalnih spojeva koji sadrže prijelazne metale vrlo je raširena u području katalize. Katalizatori su tvari koje ubrzavaju kemijsku reakciju i nakon nje ostaju nepromijenjeni. Oni povećavaju brzinu kemijske reakcije tako što mijenjaju reakcijski put smanjujući energiju aktivacije reaktanata i pritom ne utječu na termodinamičku ravnotežu reakcije. To svojstvo katalizatora pripisuje se stvaranju nestabilnih međuprodukata koji sudjeluju u daljnoj reakciji, a pri čemu se katalizator oslobađa. Postoje heterogeni, homogeni i biološki katalizatori, a organometalni spojevi spadaju u skupinu homogenih katalizatora jer su katalizator i supstrat u istoj fazi i sama kataliza ne odvija se na površini katalizatora, već preko karakterističnog reakcijskog puta koji je dobro poznat.[50]

Organometalna kemija počela se razvijati u SAD-u, Engleskoj i Njemačkoj sredinom 19. st., a prvi metal-alkil kompleksi uključivali su $ZnEt_2$, $HgEt_2$, $SnEt_4$ i BMe_3 i rezultirali su upotrebom živinih i cinkovih kompleksa u sintezi novih organometalnih spojeva poput organoklorsilana i metal-karbonilnih derivata platine i klora, nikla i željeza. Važno je spomenuti kako je veliki utjecaj na organometalnu kemiju ostvario Grignard s reakcijom magnezija i organskih halida u kojoj nastaju tzv. Grignardovi reagensi $RMgX$ koji su vrlo korisni u organskoj sintezi u reakciji alkiliranja karbonilnih spojeva. 70.-ih godina 20. st. provedene su prve reakcije katalizirane paladijevim kompleksom u kojem je paladij u elementarnom stanju i u kojima nastaju nove C-C veze, tzv. Tsuji-Trost i Mizoroki-Heck reakcije. Osim njih, danas su vrlo poznate Miyaura-Suzuki, Sonogashira i Stille reakcije koje se široko koriste u organskoj sintezi.[46]

U novije vrijeme sve se više teži upotrebi katalizatora u sintezi pa se u organsku kemiju kontinuirano uvode novi katalitički sustavi. Posebna pažnja se pridodaje upotrebi kiralnih liganada u sintezi optički aktivnih spojeva koji predstavljaju izazov farmaceutskoj industriji. Također, sve se više pažnje posvećuje zaštiti okoliša pri organskoj sintezi što uključuje razvoj novih učinkovitijih procesa koji će manje zagađivati okoliš u vidu toksičnosti otapala i njihove količine. Stoga je u okviru tzv. „zelene kemije“ od interesa upotreba ekološki prihvatljivijih otapala poput vode te sinteza novih katalizatora koji će smanjiti broj reakcijskih stupnjeva, minimizirati potrošnju energije i kemikalija i koji će se moći višestruko upotrebljavati i „reciklirati“.[46]

Prijelazni metali i njihovi kompleksi utječu na odvijanje organskih reakcija, a elektronska struktura koja podrazumijeva prazne ili polupopunjene *d*-orbitale omogućava im reverzibilno vezanje na mnoge funkcionalne skupine kao i aktivaciju reakcija koje bez njih nije moguće provesti. Kod analize takvih kompleksa važno je znati oksidacijsko stanje metala te razlikovati kovalentno vezane supstituente od onih koordinativno vezanih. Tako kovalentno vezani supstituenti mogu biti halogeni elementi, vodik, arilne i acilne skupine, a koordinativno su najčešće vezani trifenilfosfini i ugljikov monoksid, a poznati koordinirajući metali su Cr, Pt, Pd, Ni, Co, Zn i dr. Najučestalije strukturne konfiguracije koje takvi organometalni kompleksi zauzimaju su kvadratno planarna, tetraedarska, oktaedarska i trigonalna bipiramida. Tipične reakcije kojima podliježu prijelazni metali kao organometalni katalizatori jesu oksidativna adicija i reduktivna eliminacija. Pri oksidativnoj adiciji metalni se kompleks umeće u jednostruku, dvostruku ili trostruku kovalentnu vezu pri čemu metal iz elementarnog stanja prelazi u stanje $2+$ jer su stvorene 2 nove kovalentne veze metala i

spojeva poput H_2 , X_2 , C-X i alkina. Reduktivno eliminiranje je obrnuti proces oksidativne adicije. Reakcijski put određen je brojem liganda i njihovom veličinom kao i oksidacijskim stanjem metala.[50] U katalitičkom procesu najčešći broj elektrona koji metal posjeduje je 16 ili 18, a sam proces uključuje katalitički aktivnu vrstu ili prevođenje predkatalizatora u katalizator (shema 8.) pri čemu je svaki korak jednako zastupljen i odvija se jednakom brzinom, ali je jedan od njih odlučujući u cijelom procesu.[46]



Shema 8. Katalitički proces

Reakcije unakrsnog povezivanja katalizirane prijelaznim metalima predstavljaju važne metode u organskoj sintezi, vrlo su popularne u totalnoj sintezi prirodnih produkata, medicinskoj kemiji i industriji, biološkoj kemiji, sintezi različitih materijala i nanotehnologiji zahvaljujući sposobnosti reagiranja organometalnih reagensa funkcionaliziranih različitim supstituentima s organskim elektrofilima. Općenito se takve reakcije odvijaju u 3 stupnja koji podrazumijevaju oksidativnu adiciju organometalnog spoja na elektrofilni ugljikov atom vezan za heteroatom, transmetaliranje odnosno zamjenu heteroatoma kao dobro odlazeće skupine s nukleofilnim parom te reduktivnu eliminaciju u kojoj nastaju nove C-C veze. Pri tome je u reakcijama s Pd-kompleksima oksidativna adicija stupanj u kojem se odvija nukleofilna supstitucija (S_N2), dok je primjerice s niklom ili željezom taj stupanj radikalni. Također, za sp^3 elektrofile taj je stupanj sporiji, dok je za sp i sp^2 ugljikove atome brži.[51]

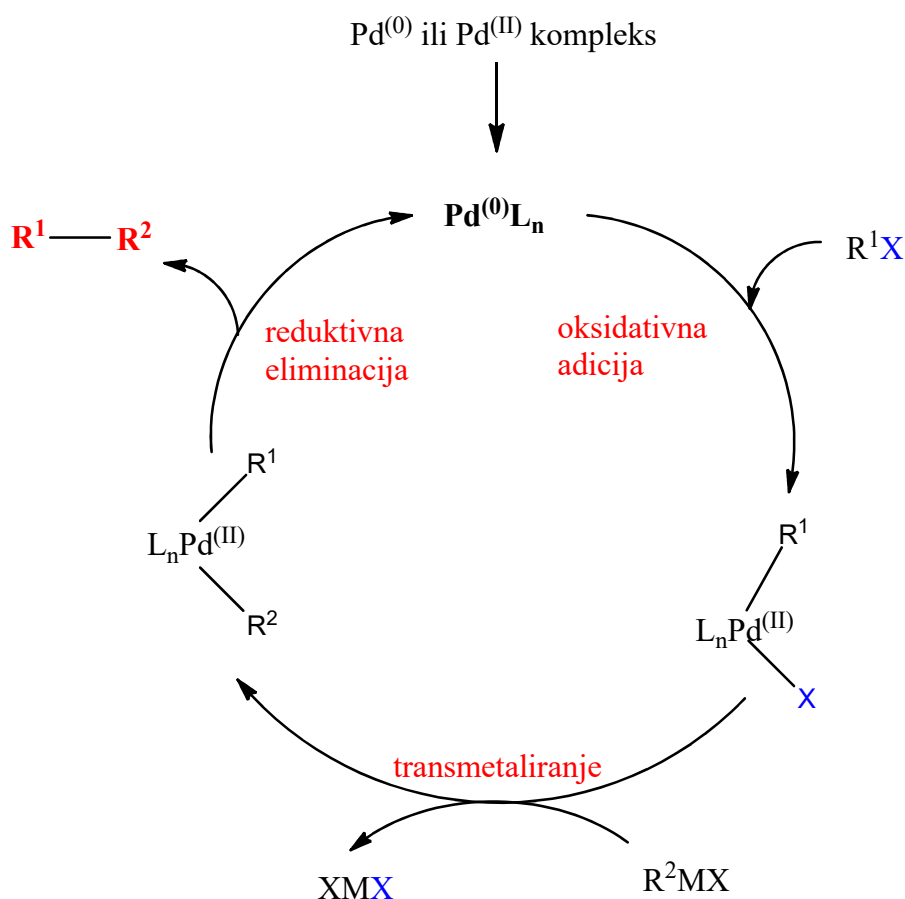
2.5. Paladijem katalizirane reakcije unakrsnog povezivanja

Upotreba paladija u organskoj sintezi vrlo je zastupljena i učinkovita pa se Pd smatra jednim od najbitnijih prijelaznih metala koji tvori organometalne spojeve i služi u katalizi mnogobrojnih organskih reakcija. Ocem paladijem kataliziranih reakcija unakrsnog povezivanja smatra se Richard Heck i unatoč tome što su brojne druge reakcije ovog tipa zabilježene i ranije, njegov je rad zaslužan za popularizaciju i široku primjenu Pd-katalize. Tako je Heckova reakcija uključivala Pd-kataliziranu vinilnu supstituciju s aril-halidima gdje je kao katalizator korišten Pd(II)-acetat, a sinteza se pokazala vrlo korisnom unatoč nekim ograničenjima.[12, 46] Pd-katalizirane reakcije unakrsnog povezivanja predstavljaju jednu od najučinkovitijih metoda stvaranja C-C veza i omogućavaju provedbu reakcija koje ranije nisu bile moguće ili su podrazumijevale višestupnjevitu sintezu, a tome u prilog ide i nekoliko Nobelovih nagrada (R. F. Heck, E. Negishi, A. Suzuki) dodijeljenih za značajan doprinos Pd-kataliziranim reakcijama unakrsnog povezivanja u organskoj sintezi. Neke od poznatijih Pd-kataliziranih reakcija unakrsnog povezivanja su Heck-ova reakcija, Suzuki-jeva, Fukuyama-ina, Sonogashira-ina, Negishi-jeva, Hiyama-ina i Stille-ova reakcije.[52]

Pd-kompleksi su homogeni katalizatori čija koncentracija za neoptimizirane reakcije može iznositi 10-15 mol%, a za optimizirane čak 0,1 mol%. Paladij dobro absorbira vodik na sobnoj temperaturi i pri tome tvori paladijeve hidride tipa PdH_x gdje je „x“ manji od 1. Neke kemijske osobine paladija vrlo su korisne za ovakva unakrsna povezivanja, a uključuju elektronegativnost koja mu omogućava stvaranje relativno jake Pd-H i Pd-C veze kao i polarizirane Pd-X veze te lake promjene oksidacijskog stanja između Pd (II) i Pd (0) što je neophodno za pojedine katalitičke stupnjeve. Također su poznati i Pd (I), Pd (III) i Pd (IV) kompleksi iako se puno manje koriste u katalizi.[53] Bitno je obratiti pozornost i na aril-halid pa se može primijetiti trend upotrebe aril-bromida i jodida, a manje klorida što je vezano uz jakost Ar-X veze koja raste: I < Br < Cl i čini prvi korak katalize, oksidativnu adiciju puno težom. Međutim, aril-kloridi su lakše dostupni i jeftiniji kao supstrati za razliku od bromida i jodida. Razumijevanje mehanizma katalitičkog procesa je važno jer omogućava pravilni odabir odgovarajućih organometalnih katalizatora i sintezu željenih kompleksnih molekula.[12]

Već je spomenuto kako se u Pd-katalizi može koristiti Pd (II) i Pd (0) pa je bitno napomenuti kako se sam katalitički proces odvija kada je paladij u elementarnom stanju. Stoga nulti stupanj katalize u mehanizmu Pd-katalizirane reakcije unakrsnog povezivanja

(shema 9.) podrazumijeva predaktivaciju katalizatora *in situ* ukoliko je on prisutan kao Pd (II) i to redukcijom u Pd (0) pomoću fosfina. Sljedeći je stupanj oksidativna adicija. Tu dolazi do stvaranja dviju kovalentnih veza između paladija pri čemu on prelazi u Pd (II) stanje i organskog halida. Nastaje R¹-Pd-X intermedijer što je popraćeno retencijom konfiguracije kod vinilnih halida, odnosno inverzijom konfiguracije kod alilnih i benzilnih halida. Inicijalno dolazi do stvaranja *cis*-paladijevog kompleksa koji brzo izomerizira u *trans*-kompleks. Ukoliko je u reakciji prisutan ko-katalizator (kao npr. kod Sonogashira-ine reakcije), slijedi transmetaliranje u kojem se stvara R¹-Pd-R² intermedijer čemu pomaže ko-katalizator. Posljednji korak u mehanizmu je reduktivna eliminacija gdje nastaje R¹-R² produkt unakrsnog povezivanja pri čemu paladij izlazi iz reakcije u elementarnom stanju, Pd (0).[52, 53]



Shema 9. Mehanizam Pd-katalizirane reakcije unakrsnog povezivanja

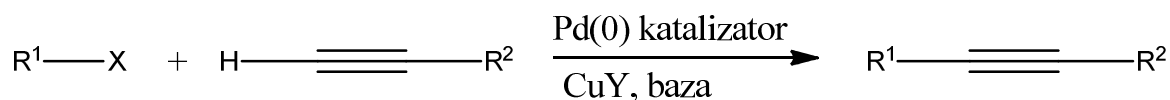
Heck-ova reakcija je reakcija nezasićenih organskih halida ili triflata s alkenima, katalizirana bazom i Pd-kompleksom u kojoj nastaju supstituirani alkeni. Suzuki-jeva reakcija uključuje aril-halide i arilborne kiseline pri čemu nastaju diarilne molekule, a također je bazno katalizirana. Fukuyama-ina reakcija podrazumijeva sintezu ketona iz tioestera i organocinkovih halida u prisutnosti Pd-katalizatora. To je vrlo kemoselektivna reakcija u

blagim reakcijskim uvjetima i s manje toksičnim reagensima. Negishi-jeva reakcija također je Pd -katalizirana reakcija organocinkovih spojeva i arilnih ili vinilnih halida, a pokazala se boljom u prisutnosti osjetljivih skupina poput estera i amida nego organomagnezijeve i organolitijeve reakcije. Sonogashira-ina reakcija je Pd-katalizirana reakcija unakrsnog povezivanja u kojoj se stvaraju C-C veze između aril ili vinil halida i terminalnih alikna uz bazu i bakar kao ko-katalizator. Unakrsno povezivanje između aril- ili vinil-halida ili triflata i organokositrovih spojeva katalizirano paladijem poznato je kao Stille-ova reakcija u kojem nastaju vinil-vinil, aril-vinil ili aril-aril veze, a toksičnost i teško uklanjanje kositra iz reakcijske smjese predstavlja problem za široku upotrebu ove reakcije. Zbog manje toksičnosti i lakše izolacije spojeva iz reakcijske smjese, Sonogashira-ina reakcija uvođenja alkinilne prenosnice (ali i stvaranje novih cikličkih sustava) i Suzuki-jeva reakcija direktnog povezivanja dva arilna sustava, često su primjenjivani načini sinteze novih kompleksnijih organskih molekula.[52]

2.5.1. Sonogashira-ina reakcija

Paladijem katalizirano unakrsno povezivanje u kojem nastaju nove veze C-C veze između sp^2 - i sp - hibridiziranih ugljikovih atoma poznato je kao Sonogashira-ina reakcija. To je jedna od najraširenijih metoda povezivanja aril- ili vinil-halida (ili triflata) s terminalnim alkinima i smatra se iznimno važnom reakcijom organske sinteze s primjenom u kemiji prirodnih spojeva, farmaceutika i kemije materijala. Kenkichi Sonogashira i suradnici Nobue Hagihara i Yasuo Tohda 1975. godine prvi su proveli ovakav tip paladijem katalizirane reakcije pri sobnoj temperaturi uz ko-katalizator CuI i amin kao bazu u dobrom iskorištenju.[54]

Sonogashira-ina reakcija unakrsnog povezivanja je paladijem katalizirana reakcija organskih halogenida ili vinilnih triflata i terminalnih alkina uz prisutstvo organske ili anorganske baze i halogene soli bakra kao ko-katalizatora pri čemu supstitucijom alkinskog vodikovog atoma nastaju disupstituirani alkini (shema 10.).



R^1 = aril, heteroaril, vinil

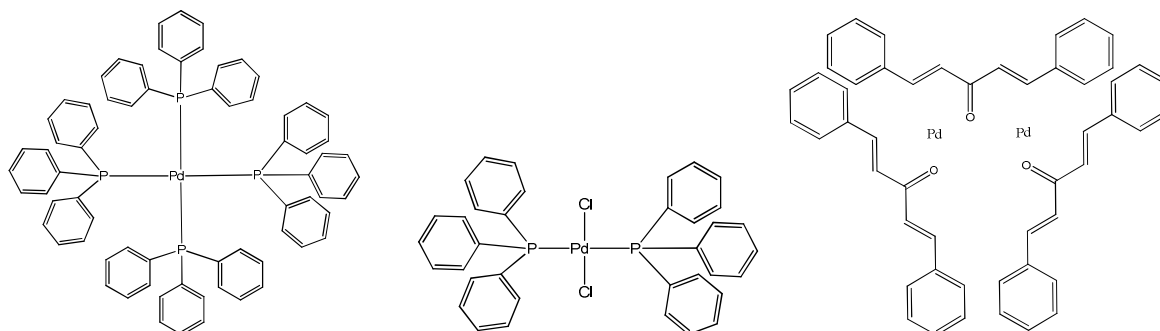
R^2 = aril, heteroaril, alkil, SiR_3

X = I, Br, Cl, OTf

Y = I, Br

Shema 10. Sonogashira-ina reakcija unakrsnog povezivanja

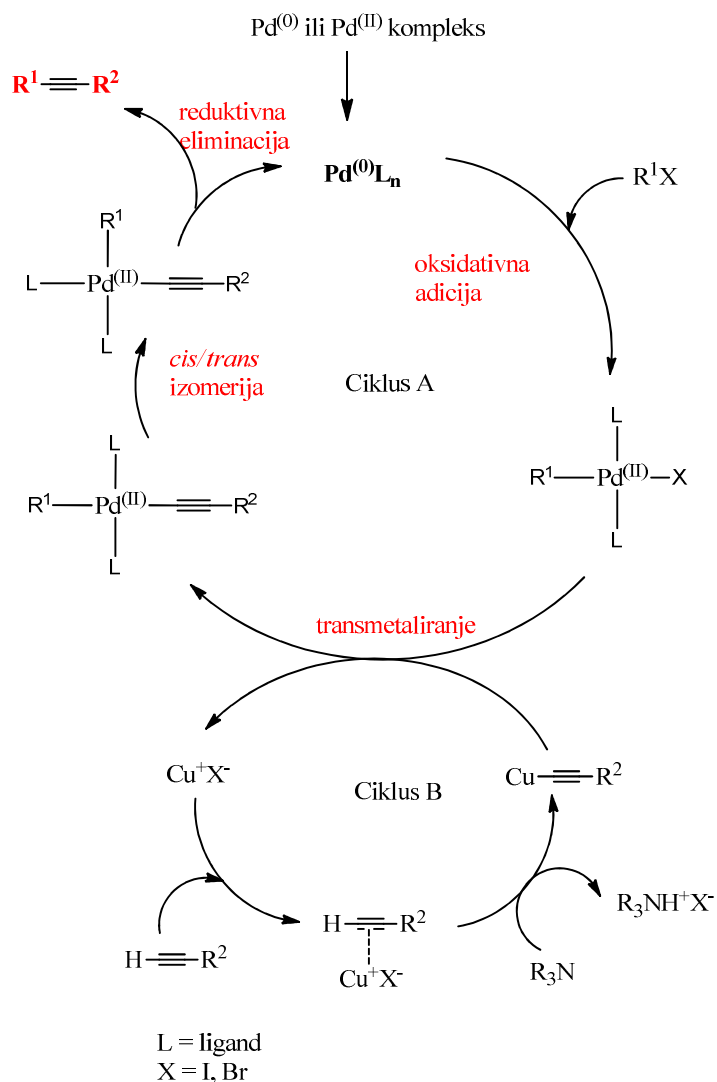
Najčešće upotrebljavani paladijevi katalizatori su kompleksi Pd (0) poput tetrakis(trifenilfosfin)paladija $[(PPh_3)_4Pd]$ koji je i komercijalno najkorišteniji Pd(0) kompleks, diklorobis(trifenilfosfin)paladij $[PdCl_2(PPh_3)_2]$ i tris(dibenzildenacetone)dipaladij $[Pd_2(dba)_3]$ (slika 24.). Tetrakis(trifenilfosfin)paladij je po prirodi fotosenzibilan i nestabilan u atmosferskim uvjetima, a njegovi su nedostaci otežano uklanjanje iz smjese produkata kao i povremena slaba reaktivnost kao posljedica velikog broja liganada, dok je diklorobis(trifenilfosfin)paladij stabilniji i topljiviji. Pd (0) katalizator može biti zamijenjen i Pd (II) katalizatorima poput paladijeva klorida, $PdCl_2$ ili paladijeva acetata, $Pd(OAc)_2$ budući da je poznato da se aktivni Pd (0) stvara *in situ*. Također su u upotrebi i drugi katalizatori s bidentatnim ligandima poput $PdCl_2(dppe)$, $PdCl_2(dppp)$, $PdCl_2(dppf)$.



Slika 24. Paladijevi kompleksi koji služe kao katalizatori

Dodatak bakrene soli kao ko-katalizatora povećava reaktivnost sustava, ali nosi i određene mane koje podrazumijevaju uvjete bez prisutnosti kisika kako bi se izbjegao nastanak neželjenog alkinskog produkta homopovezivanja kojem podliježu alkil i aril supstituirani terminalni alkini.[55] Najčešće korištene halogene soli bakra kao ko-katalizatora su bakar-jodid (CuI) i bakar-bromid ($CuBr$). Kao baza se najčešće koristi trietilamin (Et_3N), dietilamin (Et_2NH), dipropilamin (Pr_2NH) i morfolin, a kao otapalo DMF, DMSO, THF i *N*-metilpirolidon.[56]

Mehanizam Sonogashira-ine paladij/bakar katalizirane reakcije nije u potpunosti razjašnjen, ali smatra se da je cijeli proces temeljen na dva nezavisna katalitička ciklusa od kojih prvi obuhvaća „paladij-ciklus“ (ciklus A), a drugi je „bakar-ciklus“ (ciklus B) (shema 11.). Ciklus A započinje $[Pd(0)L_2]$ kompleksom koji može nastati *in situ* iz Pd (II) pomoću amina ili anorganske baze. Takav aktivirani Pd kompleks kreće u proces oksidativne adicije aril- ili vinil-halida, ujedno i najsporijeg stupanj Sonogashira-ine reakcije što ovisi o halogenom elementu vezanom na arilni ili vinilni sustav gdje je najaktivniji ArI, slijedi ArBr te ArCl. Tako elektron-donirajuće skupine s višom energijom HOMO-orbitale (E_{HOMO}) tvore stabilnije supstrate koji imaju i veću energijsku barijeru za pojedini stupanj reakcije, dok one elektron-odvlačeće imaju nižu energiju HOMO-orbitale i olakšavaju oksidativnu adiciju. Kako se u oksidativnoj adiciji na paladij vežu arilna ili vinilna skupina i halogen, paladij prelazi u Pd (II), a nastali adukt $[Pd(II)R^1L_2X]$ ulazi u stupanj transmetaliranja s bakar-acetilidom koji uključuje ciklus B. Tu nastaje kompleks $[Pd(II)L_2R^1(C\equiv CR^2)]$. „Bakar-ciklus“ je slabije poznat, ali smatra se da baza pomaže u stvaranju bakar-acetilida zajedno s π -alkin-bakar-kompleksom. Stoga se stupanj transmetaliranja odvija s *in situ* nastalim Cu-acetilidom koji predstavlja aktivirani alkin pri čemu nastaje *cis* alkinil-Pd- R^1 vrsta koja se u trećem stupnju prevodi u *trans* oblik, a u završnom stupnju reduktivne eliminacije u alkin, $R^1\equiv R^2$, dok se Pd kompleks regenerira u $[Pd(0)L_2]$ oblik.[55]



Shema 11. Mehanizam Pd-katalizirane Sonogashira-ine reakcije

Sonogashira-ina reakcija može se provesti i bez prisutnosti bakra kao ko-katalizatora i to s piperidinom ili pirolidonom pri čemu nastaju arilalkini ili enini u visokim iskorištenjima. Takav je katalitički proces također vođen [Pd(0)L₂] kompleksom koji u oksidativnoj adiciji podrazumijeva stvaranje alkin-Pd(II) kompleksa reverzibilnom π -koordinacijom čime acetilenski proton postaje kiseliji pa je olakšano njegovo uklanjanje bazom. Takav [Pd(II)R¹(C≡CR²)L₂] kompleks podliježe reduktivnom eliminiranju uz regeneriranje katalitički aktivnog oblika paladija, [Pd(0)L₂].[55]

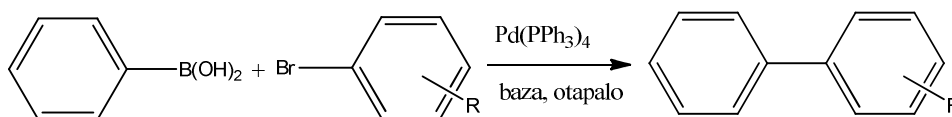
Reakcijski uvjeti Sonogashira-ine reakcije su blagi, odvija se pri sobnoj temperaturi, ali blago povećanje temperature ponekad pospešuje nastanak nove C–C veze što ujedno podrazumijeva i veće reakcijsko iskorištenje. Također su najbolji uvjeti za provedbu reakcije pri molarnom omjeru Cu : Pd = 2:1, 2.0-2.5 ekvivalenta terminalnih alkina te 1.2 ekvivalenta

Et_3N i otapalo dodano u minimalnim količinama radi lakšeg uklanjanja iz reakcijske smjese nakon provedene reakcije. Kao što je već spomenuto, dobri supstrati za stvaranje novih C-C veza su arilni jodidi, bromidi i kloridi pri čemu dolazi do supstitucije halogenog atoma s elektrofilom. [57]

Obično je Sonogashira-ina reakcija u kojoj nastaje aciklički alkinilni derivati praćena nastankom bicikličkih ko-produkata u niskim iskorištenjima. Stoga je ova reakcija često korištena za sintezu novih prstena na heteroaril-kloridima i koristi se u sintezi bicikličkih nukleozdinih analoga (BCNAs) s ciljem pripreve spojeva sa značajnim antivirusnim djelovanjem. Ako je sinteza bicikličkih spojeva željena reakcija, moguće ju je pospješiti korištenjem većih količina bakar-jodida i trietilamina, a ako su biciklički ko-produkti neželjeni moguće je reducirati njihov nastanak korištenjem većih količina otapala kao što je DMF. Mehanizam nastajanja bicikličkog derivata temeljen je na aktiviranju trostruke ugljik-ugljik veze djelovanjem intermedijera aril-paladij-jodida koji pospješuje reaktivnost prema nukleofilu. Prisutan atom kisika vezan na heteroarilnu strukturu nukleofilno napada trostruku vezu pri čemu nastaje vinil-paladij intermedijer koji se reduktivnom eliminacijom paladija ciklizira i stvara novi heteroarilni višeciklički sustav.[58]

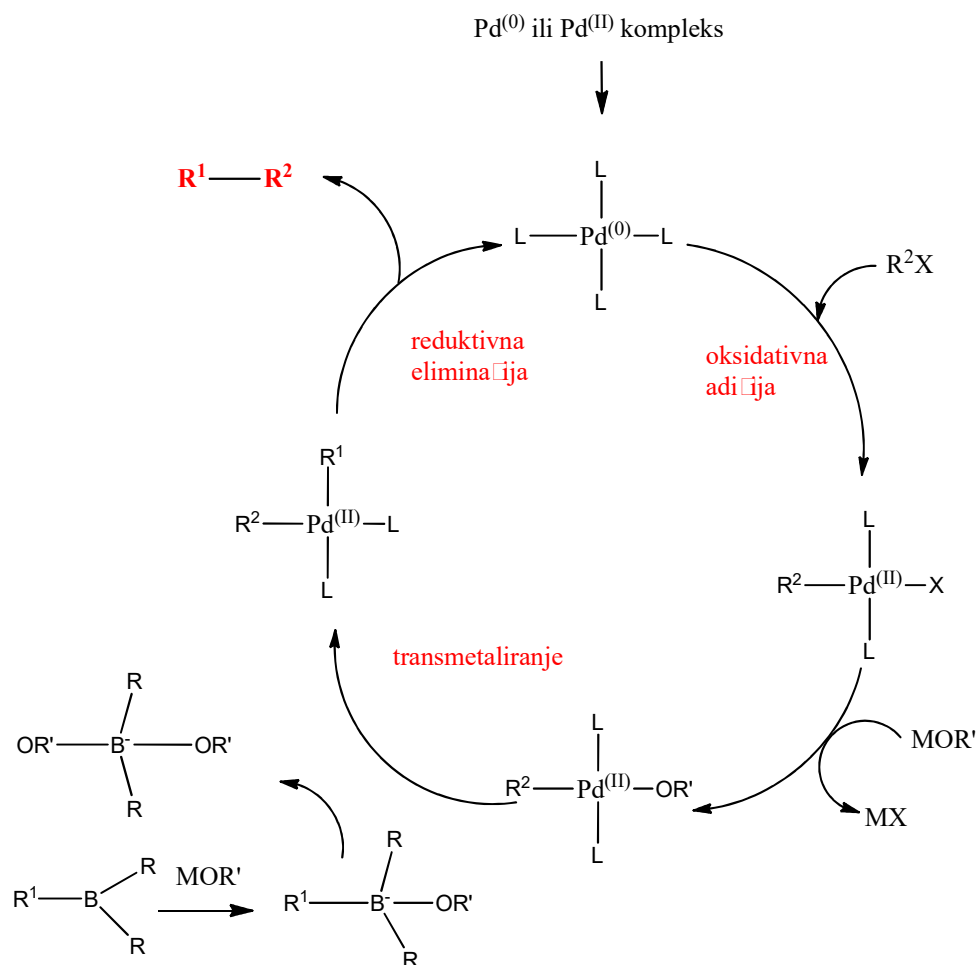
2.5.2. Suzuki-jeva reakcija

Suzuki-jeva reakcija je paladijem katalizirana reakcija arilbornih spojeva i aril-halida ili pseudohalida u kojoj se na arilnu strukturu direktno uvodi novi ciklički sustav i stvaraju biarilni spojevi. Ova reakcija važna je za stvaranje novih C-C veza budući da je jednostavna za izvedbu, provodi se u blagim uvjetima i ekološki je vrlo prihvatljiva. Organoborovi spojevi mogu uključivati širok spektar funkcionalnih skupina i supstituenata, uključuju i organoborne kiseline i estere i jednostavno se sintetiziraju hidroboriranjem iz terminalnih alkena. Suzuki i Myaura 1979. g. prvi put su učinkovito sintetizirali biarile reakcijom unakrsnog povezivanja alkenilborana i organskih halida kataliziranu s $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$ u prisutnosti baze, dok je klasična Suzuki reakcija aril-halida i fenilborne kiseline uz $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$ izvedena 2 godine kasnije što je nagrađeno Nobelovom nagradom 2010. g. Danas je Suzuki reakcija unakrsnog povezivanja aril-halida i fenilbornih kiselina jedna od najučinkovitijih metoda sinteze biarila i supstituiranih aromatskih spojeva (shema 12.). Zbog dobre stabilnosti, lake sinteze i niske toksičnosti boronskih kiselina kao reagensa, vrlo je velik interes za istraživanje i primjenu Suzuki-jeve reakcije u organskoj sintezi.[15, 51, 59]



Shema 12. Suzuki-jeva reakcija unakrsnog povezivanja

Reakcijski mehanizam Suzuki-jeve reakcije podrazumijeva tri reakcijska stupnja kao i ostale paladijem katalizirane reakcije, oksidativnu adiciju, transmetaliranje i reduktivnu eliminaciju (shema 13.). Organoborovi spojevi su jaki elektrofilni, ali supstituenti ih čine slabo nukleofilnima, a koordinacija negativno nabijene baze na borov atom može dodatno povećati nukleofilnost. Borna kiselina mora biti aktivirana kako bi mogla sudjelovati u reakciji što se postiže bazom, a aktivacija atoma bora uključuje polarizaciju organskog liganda i olakšava transmetaliranje, slijedeći korak u mehanizmu Suzuki-jeve reakcije. Oksidativna adicija, kao prvi stupanj u reakcijskom mehanizmu, predstavlja vezanje Pd-kompleksa s alkil halidom pri čemu nastaje organopaladijev kompleks $[Pd(II)R^2L_2X]$. Pri tome s alilnim i benzilnim halidima dolazi do inverzije konfiguracije, a vinilni halidi zadržavaju konfiguraciju, a sam kompleks je u početku u *cis* konfiguraciji i izomerizira u *trans*. Takav kompleks podliježe transmetaliranju čemu prethodi aktiviranje organobornog spoja - nastanak $[R^1R_2B^+OR]$ za što je neophodna baza jer se koordinacijom na atom bora povećava nukleofilnost za transmetaliranje. Takav aktivirani organoborni spoj napada Pd-kompleks i u transmetaliranju nastaje $[Pd(II)R^1R^2L_2]$. Ovdje također dolazi do *cis/trans* izomerizacije pa kompleks u zadnjem stupnju reakcije ponovno prelazi u *cis* oblik kako bi se mogla odviti reduktivna eliminacija. Reduktivnom eliminacijom nastaje produkt unakrsnog povezivanja R_1-R_2 pri čemu se Pd-kompleks regenerira u Pd (0) oblik i ponovno sudjeluje u katalitičkom procesu.[59]



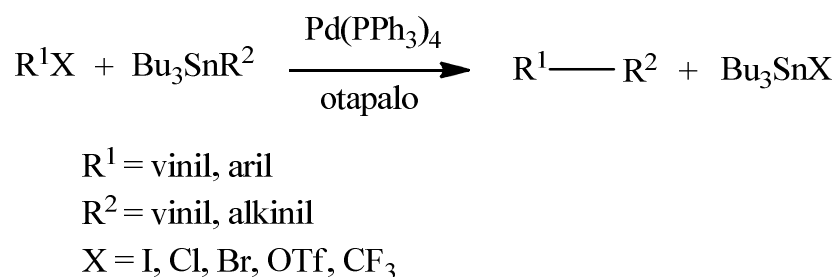
Shema 13. Mehanizam Suzuki-jeve reakcije

Spojevi koji služe u sintezi spojeva Suzuki-jevom reakcijom nisu striktno ograničeni na arile, već to mogu biti i alkili, alkenili i alkinili te pseudohalidi (triflati), a od reagensa umjesto bornih kiselina se mogu koristiti i kalijevi trifluoroborati i organoborani te boronatni esteri. Najčešće upotrebljavani paladijevi katalizatori su kompleksi Pd (0) poput tetrakis(trifenilfosfin)paladija [(PPh₃)₄Pd] te Pd(OAc) i PdCl₂. Vrlo je bitno za Suzuki-jevu reakciju odabrati pogodnu bazu budući da ona omogućava nastanak aktiviranog organobornog spoja. Tako su jake baze poput NaOH i NaOMe učinkovite kada se koriste u kombinaciji s otapalom poput THF/H₂O, dok su K₂CO₃ i K₃PO₄ učinkovite u DMF-u.[51] Mogu se upotrijebiti i baze poput Na₂CO₃, Cs₂CO₃, KOH kao i organske baze poput Et₃N, a kao otapalo može se koristiti i smjesa EtOH/H₂O ili dioksan/H₂O. Također se može upotrijebiti i tetra-n-butilamonijev bromid (TBAB) kao reagens za fazni prijenos koji u reakcijama u vodenoj smjesi otapala povećava topljivost organskog supstrata čime se može povećati iskorištenje reakcije.[60] Osim toga, poli(etilenglikol) (PEG) je netoksičan i jeftin medij koji služi kao fazni prijenosnik te je kao vodena otopina vrlo dobar i pogodan katalitički medij i

ujedno otapalo za Suzuki-jevu reakciju pri čemu se u blagim uvjetima lagano povišene temperature mogu postići vrlo visoka reakcijska iskorištenja.[61] Najčešće se za Suzuki-jevu reakciju unakrsnog povezivanja koriste aril- ili alkenil-jodidi ili bromidi, dok se kloridi manje upotrebljavaju zbog smanjene reaktivnosti iako se to može dobro riješiti upotrebom elektron-bogatih i sterički ometanih katalizatora te supstrata osiromašenih elektronima. Osim konvencionalne sinteze, moguće je provoditi i mikrovalovima potpomognutu Suzuki-jevu reakciju, a može se zaključiti kako je Suzuki-jeva reakcija vrlo korisna za stvaranje Csp_2-Csp_2 veza, ali i Csp_2-Csp_3 veza.[51,59]

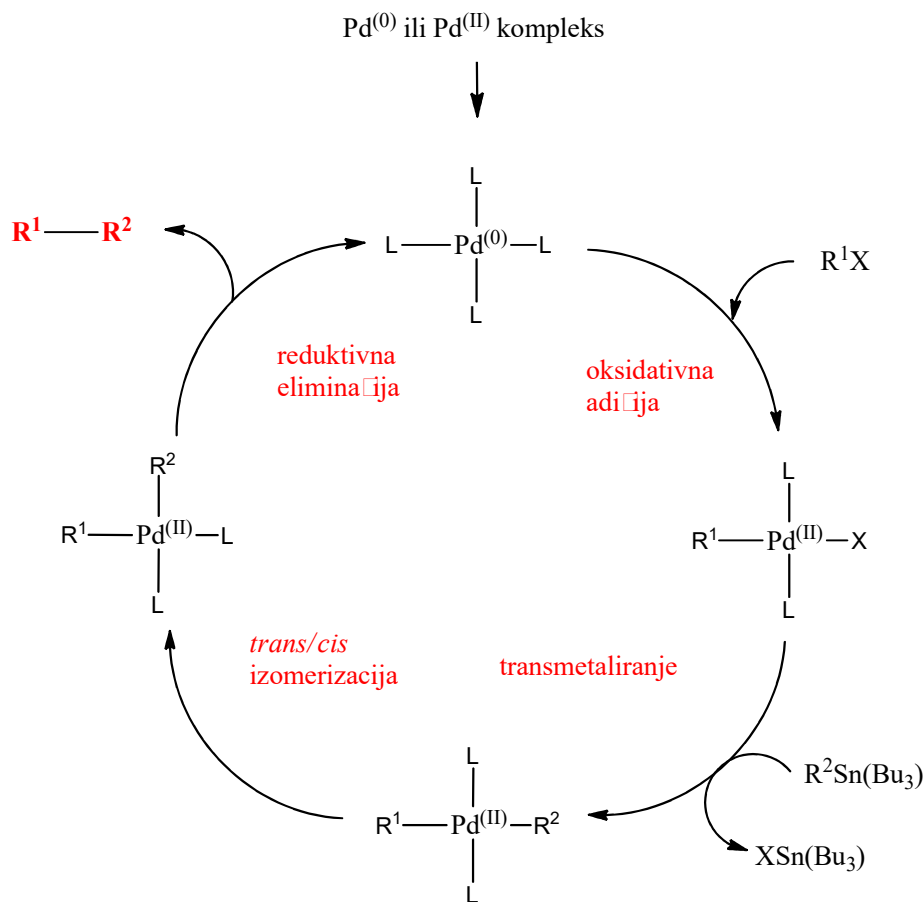
2.5.3. Stille-ova reakcija

Unakrsno povezivanje sp^2 -hibridiziranih organskih halida i organokositrovih spojeva (stanana) katalizirano paladijem poznato je kao Stille-ova reakcija kojom je omogućeno stvaranje vinil-vinil, aril-vinil ili aril-aril veza (shema 14.). Prvi puta je reakcija objavljena 1978. g. kada je provedena sinteza ketona iz kiselinskog klorida i organokositrovog spoja katalizirana paladijem.[12] Organokositrovi spojevi vrlo su reaktivni, ali je njihovo uklanjanje iz reakcijske smjese otežano što predstavlja problem za industrijsku upotrebu. Unatoč tome, ova reakcija ima mnogih prednosti, prvenstveno zbog lako dostupnih organokositrovih spojeva, stabilnosti na zraku i vlazi i tolerancije prema mnogim funkcionalnim skupinama. To je često upotrebljavana metoda sinteze kompleksnih molekula s konjugiranim sustavima te se u medicinskoj kemiji upotrebljava u sintezi antitumorskih antibiotika.[46,62] Stille-ova reakcija često je korištena za reakcije heteroaril-klorida kao i alken- i aril-jodide, a rijetko za aril-kloride.[12]



Shema 14. Stille-ova reakcija

Kao i kod Sonogashira-ine i Suzuki-jeve reakcije, reakcijski mehanizam Pd-katalizirane Stille-ove reakcije također podrazumijeva tri stupnja, oksidativnu adiciju, transmetaliranje i reduktivnu eliminaciju (shema 15.). Katalitički aktivni oblik katalizatora, Pd (0) ulazi u prvi stupanj reakcijskog mehanizma, oksidativnu adiciju, pri čemu dolazi do stvaranja paladijeva kompleksa $[Pd(II)R^1L_2X]$. Ovdje inicijalno nastaje *cis*-kompleks koji brzo izomerizira u *trans*-kompleks koji je termodinamički mnogo stabilniji. Transmetaliranje je korak u kojem se prenose R^2 skupine (alkilne, alkenilne ili arilne) s atoma kositra koji ima vezane alkilne (Me, Bu) skupine – $[R^2Sn(alkil)_3]$, na paladij i nastaje kompleks $[Pd(II)R^1R^2L_2]$ pri čemu halid s paladija prelazi na kositar - $[XSn(alkil)_3]$. Ponovno dolazi do *trans/cis* izomerizacije nakon čega slijedi reduktivno eliminiranje u kojem se iz *cis*-kompleksa $[Pd(II)R^1R^2L_2]$ izdvaja R_1-R_2 , a Pd-kompleks se regenerira u Pd (0) oblik i ulazi u novi katalitički ciklus.[63]



Shema 15. Mehanizam Stille-ove reakcije

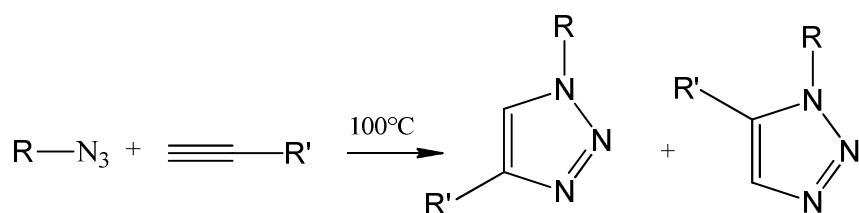
Elektronima bogati i sterički ometani aril-halidi sporo podliježu oksidativnoj adiciji i lošiji su supstrati, dok elektronima siromašni stanani sporije podliježu transmetaliranju. U

stupnju transmetaliranja najbrže se s kositrovog na paladijev atom prenose alkinilne, alkenilne i arilne skupine, a najsporije alkilne skupine. Najčešće korišteni Pd-katalizatori u Stille-ovim reakcijama su $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$, $\text{Pd}(\text{OAc})_2$ te $\text{Pd}_2(\text{dba})_3$. Otapala koja se koriste u reakciji su obično DMF te dioksan i THF koji obično zahtijevaju dodatak LiCl kao ko-katalizatora. Također se dodaje CuI kao ko-katalizator koji stvara organokuprate i sudjeluje u transmetaliranju paladija ili fluoridni ioni.[63]

2.6. „Klik“ reakcije

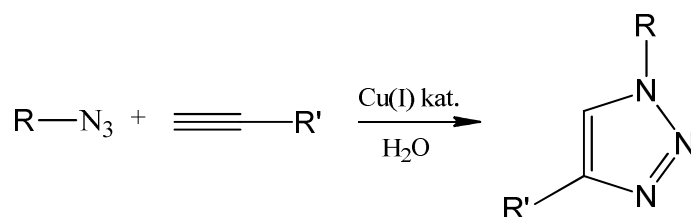
„Klik“ kemija je noviji pristup u sintezi kojeg su K. B. Sharpless i njegovi suradnici 2001. godine opisali kao reakciju s blagim reakcijskim uvjetima, stereoselektivnu i s visokim iskorištenjima, lako dostupnim reagensima, neosjetljivu na kisik i vodu i korištenje za okoliš prihvatljivih otapala uz jednostavnu izolaciju produkata bez upotrebe kromatografskih metoda. Koncept „klik“ kemije razvijen je kao pristup koji će jednostavnom sintezom ubrzati proces istraživanja lijekova. Navedene kriterije ispunjava nekoliko vrsta reakcija: nukleofilno otvaranje prstena epoksida i aziridina, nealdolne karbonilne reakcije (sinteza hidrazona i heterocikla), reakcije adicije na dvostruku vezu i reakcije Michaelove adicije i cikloadicije.[64]

Huisgenova 1,3-dipolarna cikloadicija reakcija je između dipolarofila i 1,3-dipola u kojoj nastaje peteročlani ciklički odnosno heterociklički prsten. Dipolarofili su molekule poput alkena i alkina i slične molekule s funkcionalnom skupinom vezanom preko heteroatoma (karbonili i nitrili), a 1,3-dipolarni spojevi sadrže 1 ili više heteroatoma i posjeduju barem jednu mezomernu strukturu koja predstavlja nabijenu dipolnu molekulu (npr. azidi, nitril oksidi, diazoalkani). Reakcija se provodi pri temperaturama višim od 100°C u trajanju od nekoliko sati pri čemu nastaje smjesa produkata 1,4- i 1,5-disupstituiranih 1,2,3-triazola (shema 16.). Zbog visoke reakcijske temperature i nastanka smjese izomera ova reakcija prema Sharpless-ovoj definiciji nije prava „klik“ reakcija.[64]



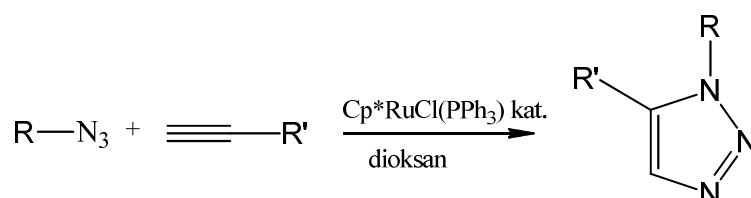
Shema 16. Huisgenova 1,3-dipolarna cikloadicija

Primjenom bakra kao katalizatora reakciju je moguće provoditi pri mnogo nižim temperaturama i uz kraće vrijeme trajanja reakcije te je ona regiosektivna za nastanak 1,4-disupstituiranog triazola (shema 17.). Reakcija katalizirana bakrom provodi se jednako učinkovito u vodenim i organskim otapalima pri blagim reakcijskim uvjetima i nije osjetljiva na promjene pH vrijednosti između 4 i 12, može se provoditi u širokom rasponu temperatura i tolerira široki spektar funkcionalnih skupina. Kao bakrov katalizator može se koristiti Cu(I) sol te Cu(II) sol iz koje nastaje aktivni Cu(I) katalizator pomoću natrijeva askorbata kao redukcijskog sredstva ili disproporcioniranjem Cu(II) soli uz pristunost bakrene žice.[64]



Shema 17. Bakrom katalizirana Huisgenova 1,3-dipolarna cikloadicija

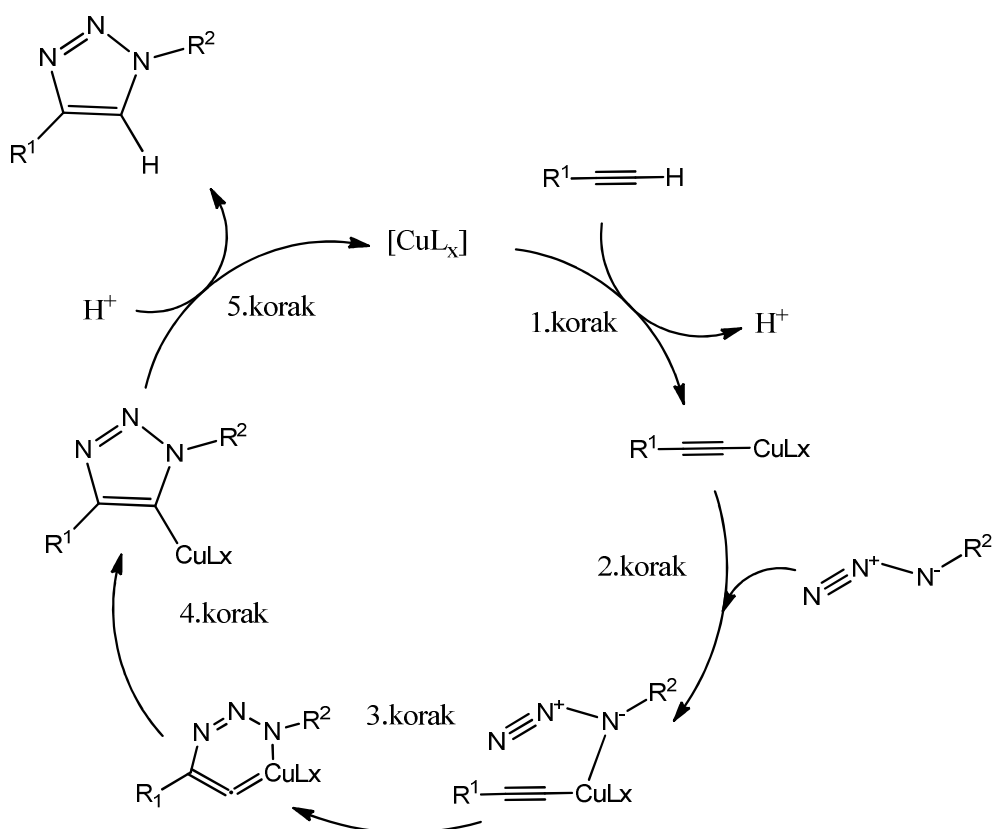
Osim bakra kao katalizatora, u Huisgenovoj 1,3-dipolarnoj cikloadiciji može se koristiti rutenij. Rutenijem katalizirana reakcija regiosektivna je za nastanak 1,5-disupstituiranih 1,2,3-triazola (Shema 18.).[64]



Shema 18. Rutenijem katalizirana Huisgenova 1,3-dipolarna cikloadicija

„Klik“ reakcija poznata je i kao bakrom katalizirana azid-alkin cikloadicija (CuAAC) azida i terminalnih alkena u kojoj nastaju isključivo 1,4-disupstituirani 1,2,3-triazoli. Na reakciju ne utječu značajno sterička i elektronska svojstva skupina vezanih na azid ili terminalni alkin, odvija se u mnogim protičnim i aprotičnim otapalima, uključujući vodu i ne zahtijeva uvođenje zaštitnih skupina na molekulu. 1,2,3-triazoli su kemijski vrlo stabilni i inertni, aromatskog su karaktera i mogu stvarati vodikove veze. Organski azidi reagiraju s nukleofilima na terminalnom N-3 atomu, a općenito su termalno i fotokemijski nestabilni.

Mehanizam CuAAC podrazumijeva 5 stupnjeva (shema 19.) od kojih prvi stupanj uključuje stvaranje bakrova (I) acetilida gdje dolazi do π -koordinacije alkina na bakar. Time terminalni vodikov atom alkina postaje znatno kiseliji i dolazi do deprotoniranja u vodenom mediju te nastaje σ -acetilid. U drugom stupnju nastaje intermedijer koji predstavlja aktivirani azid nastao koordinacijom na bakar. Tom koordinacijom azida terminalni dio postaje elektrofilniji pa u trećem stupnju nastaje prva C-N veza, a slijedi stvaranje bakar-triazolida koje je energetski vrlo povoljno (4. stupanj). U zadnjem stupnju oslobađa se triazol, a bakar ponovno ulazi u katalitički ciklus.[65]



Shema 19. Mehanizam bakrom katalizirane azid-alkin cikloadicije

2.7. UV/Vis i fluorimetrijska spektroskopija

Vidljivo zračenje uzrokuje pobuđivanje elektrona unutar atoma, molekula, kristalnih tvari ili amorfne tvari, a uključuje prijelaz elektrona iz atomske ili molekulske orbitale niže energije u orbitalu više energije. Opisani proces poznat je kao apsorpcija elektromagnetskog zračenja. U UV/Vis spektrofotometriji zraka svjetlosti propušta se kroz uzorak te se mjeri intenzitet svjetlosti koja je došla do detektora. Pri sudaru fotona s molekulom analita može

doći do njegove apsorpcije, ovisno o strukturi molekule i energiji (valnoj duljini) fotona, te se pri tome smanjuje intenzitet propuštene zrake svjetlosti. UV/Vis spektroskopija u svakodnevnoj je upotrebi u farmaceutskim analitičkim laboratorijima u kontroli kvalitete i razvoju lijekova kako u kvalitativne tako i u kvantitativne svrhe.

Fluorescencija je pojava pri kojoj atomi ili molekule apsorbiraju elektromagnetsko zračenje kojem su izloženi te prelaze u pobuđeno energetska stanje. Prilikom vraćanja u osnovno stanje, emitiraju energiju u obliku elektromagnetskih valova i to manje valne duljine od zračenja kojem je tvar bila izložena. Intenzitet fluorescencije mjeri se u ovisnosti o valnoj duljini pobude. Na fluorescenciju utječe nekoliko parametara poput strukture pa tako aromatski spojevi i planarne strukture daju najintenzivnije i najupotrebljivije molekulske fluorescencijske emisije, ali fluoresciraju i neki aciklički i alifatski karbonili te visoko konjugirane strukture. Pogodno je neviskozno polarno otapalo, a niske koncentracije pogoduju postizanju fluorescencijskog maksimuma koji se počinje smanjivati povećanjem koncentracije. Primjena fluorimetrijske spektroskopije također je uspješno primjenjivana u ispitivanju interakcije biološki aktivnih supstancija s polinukleotidima (molekulama DNA i RNA).[64]

Fluorescirajuće molekule koje u različitim uvjetima (pH, viskoznost, polarnost) pokazuju promjene u valnoj duljini i intenzitetu fluorescencije vrlo su atraktivne za primjenu u kemiji i biološkoj kemiji. Zbog svoje fluorescirajuće prirode, kumarini i njihovi derivati, a pogotovo triazolilni derivati koji su već ispitivani kao potencijalni fluorescentni agensi, te zbog netoksičnosti i mogućnosti stvaranja brojnih interakcija s biomolekulama, novosintetizirani kumarinski derivati značajni su za istraživanje funkcija i interakcija biomolekula poput proteina i nukleinskih kiselina, za detekciju promjene pH, detekciju gena te dijagnozu i djelovanje lijekova.

2.8. Predviđanje spektra aktivnosti spojeva *in silico* analizom (PASS)

PASS - Prediction of Activity Spectra for Substances, odnosno predviđanje spektra aktivnosti spojeva predstavlja *in silico* analizu. To je softver koji omogućava predviđanje biološke aktivnosti, farmakoloških učinaka i mehanizama djelovanja i interakcija pa i toksičnosti na temelju strukture spojeva. Predviđanje aktivnosti temeljeno je na bazi podataka o odnosu strukture i aktivnosti (SAR) za postojeće spojeve kojima je određena biološka

aktivnost, lijekova i spojeva kojima je aktivnost dobro poznata. Ta baza podataka obuhvaća preko 250 000 spojeva s poznatom biološkom aktivnosti i svakodnevno se obnavlja i širi. Softver radi tako da nakon unošenja strukturne formule spoja daje povratnu informaciju o potencijalnoj biološkoj aktivnosti spoja, a vrlo je koristan budući da je moguće predvidjeti aktivnost i za neku hipotetsku molekulu koja nije nužno sintetizirana. Trenutno PASS omogućava predikciju preko 4000 vrsta biološke aktivnosti s točnošću od 95%, a biološku aktivnost opisuje kvalitativno s „da/ne“ odnosno „aktivno/neaktivno“. Obuhvaća evaluaciju na temelju glavnih i sporednih farmakoterapeutskih učinaka poput antihipertenzivnog djelovanja, vazodilacijskog, anestetskog, antitumorskog – citostatskog i sl., biokemijski mehanizam djelovanja poput inhibitora acetilkolinesteraze, agonista 5-hidroksitriptamin itd., specifičnu toksičnost, npr. karcinogen, hepatotoksičan itd., metabolizam lijekova (npr. CYP1A supstrat, CYP3A4 supstrat i sl.) transport lijekova (npr. P-glikoprotein supstrat, inhibitor ili induktor) te ekspresiju gena (ErbB2 inhibitor ekspresije). Da bi rezultati dobiveni ovakvom analizom bili što točniji, trebalo bi poznavati čitav spektar biološkog djelovanja svih molekula koje čine bazu podataka ovog softvra, što je nemoguće i unatoč tome, PASS algoritam je dovoljno robusan i daje razumne i dobre podatke predikcije. PASS metoda koristi MNA deskriptore (The Multilevel Neighborhoods of Atoms) koji predstavljaju molekulsku strukturu spoja, a oni zapravo opisuju svaki atom u molekuli u nekoliko razina (definicija vrste atoma, uključenosti u prsten i susjednih atoma), a generalni princip algoritma je usporedba aktivnosti onih spojeva iz SAR baze podataka koji su strukturno slični molekuli koju se ispituje. Analiza je temeljena na izračunavanju vjerojatnosti aktivnosti P_a – „to be active“ i vjerojatnost P_i – „to be inactive“ za određenu biološku aktivnost što je i krajnji rezultat analize. Pri tome se samo aktivnosti za koje vrijedi $P_a > P_i$ mogu razmatrati i uzeti u obzir za pojedini spoj. Međutim, ako se želi skratiti lista aktivnosti moguće je uzeti u obzir samo visoke vrijednosti P_a , npr. $P_a > 70\%$, ali se tada isti toliki postotak aktivnosti i gubi. PASS analiza dostupna je na web-u i omogućuje pristup akademskim korisnicima. Vrlo je korisna i omogućava znanstvenicima da na temelju rezultata predviđanja aktivnosti odaberu molekulu koja se pokazala najboljom te provedu kemijsku sintezu i biološka ispitivanja.[66,67]

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. Opće napomene

Sva korištena otapala sušena su i pročišćavana prema preporučenom postupku sušenja agensima i/ili destiliranjem preko molekulskih sita veličine 3Å.

Tijek reakcije praćen je tankoslojnom kromatografijom (TLC), na pločama 60F-254 presvučenim slojem silikagela Merck u odgovarajućem sustavu otapala. Za detekciju izoliranih komponenata korištena je UV-svjetlost valne duljine 254 nm.

Kromatografija na koloni provedena je na silikagelu *Fluka* (0.063-0.2 nm), a staklene kolone su punjene pod utjecajem gravitacije te je kao eluens korištena smjesa diklormetan/ metanol te n-heksan/etil-acetat u odgovarajućem omjeru.

Točke tališta novosintetiziranih spojeva su određene na instrumentu Kofler (Reichert, Wien) i nisu korigirane

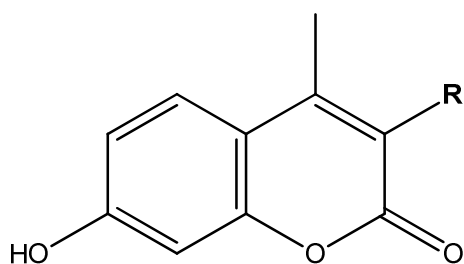
Mikrovalna (MW) sinteza provedena je u Milestone start S mikrovalnom reaktoru u kvarcnoj kiveti.

Spektri ^1H NMR su snimljeni na spektrometru Bruker 300 i 600 MHz. Svi su uzorci otopljeni u $\text{DMSO-}d_6$ i mjereni pri 298 K u NMR cjevčici promjera 5 mm. Kemijski pomaci (δ) u ^1H NMR spektrima izraženi su u jedinicama ppm u odnosu na tetrametilsilan (TMS, $\delta=0,0$ ppm), a konstante sprege (J) u hercima (Hz). Pojedinačne rezonancije asignirane su na temelju njihovih kemijskih pomaka, intenziteta signala, multipliciteta signala i konstanti sprega H-H.

Apsorpcijski spektri snimljeni su na spektrometru Varian Cary 50.

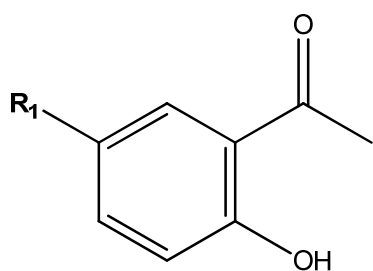
Emisijski spektri snimljeni su na Carry Eclipse spektrofotometru. U oba slučaja korištene su kvarcne kivete promjera 0,5 cm i volumena 3 cm^3 .

3.2. Pregled nosintetiziranih spojeva

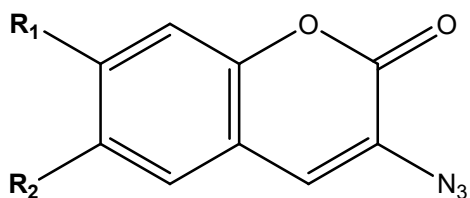


	R		R
1		5	
2		6	
3		7	
4			

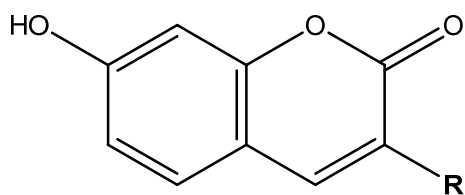
	11	12	13	14
R				



	R_1
16	
17	



	R_1	R_2
18	OH	H
19	H	
20	H	



	21	22	23	24
R				

3.3. Priprava spojeva

3.3.1. 7-hidroksi-4-metil-((4-(pentiloksi)fenil)etnil)-2H-kromen-2-on (1)

7-hidroksi-3-klor-4-metilkumarin (300 mg; 1,42 mmol) otopljen je u dimetilformamidu (DMF, 10 mL) te je dodan bakrov (I) jodid (CuI, 53,7 mg; 0,28 mmol), trietilamin (Et₃N, 0,4 mL; 2,84 mmol), tetrakis(trifenilfosfin)paladij((Pd(PPh₃)₄, 164,1 mg; 0,142 mmol) i 4-n-pentiloksifenilaceten (0,42 mL; 2,13 mmol). Reakcijska smjesa miješana je preko noći na sobnoj temperaturi. Potom je otapalo upareno pod sniženim tlakom, a smjesa pročišćena kolonskom kromatografijom (eluens CH₂Cl₂ : CH₃OH = 100:1), pri čemu je dobiven žuto-smečkasti uljasti spoj **1** (23,2 mg; 4,5 %).

¹H NMR (σ/ppm) (300 MHz): 10,54 (1H, s, OH); 7,79 (3H, m, H-5, H-5', 5''); 7,14 (2H, d, *J*=7,6 Hz, H-4',4''); 6,85 (1H, m, H-6); 6,72 (1H, d, *J*=2,4 Hz, H-8); 3,5 (2H, t, *J*=6 Hz, H-7'); 2,38 (2H, m, H-8'); 1,48 (4H, m, H-9',10'); 0,81 (3H, m, CH₃)

3.3.2. 7-hidroksi-4-metil-3-((3-metoksifenil)etnil)-2H-kromen-2-on (2)

7-hidroksi-3-klor-4-metilkumarin (300 mg; 1,42 mmol) otopljen je u dimetilformamidu (DMF, 10 mL) te je dodan bakrov (I) jodid (CuI, 53,7 mg; 0,28 mmol), trietilamin (Et₃N, 0,4 mL; 2,84 mmol), tetrakis(trifenilfosfin)paladij((Pd(PPh₃)₄, 164,1 mg; 0,142 mmol) i 3-metoksifenilaceten (0,27 mL; 2,13 mmol). Reakcijska smjesa miješana je preko noći na sobnoj temperaturi. Potom je otapalo upareno pod sniženim tlakom, a smjesa pročišćena kolonskom kromatografijom (eluens CH₂Cl₂ : CH₃OH = 100:1) i preparativnom kromatografijom u sustavu CH₂Cl₂. pri čemu je dobiven žuto-smečkasti uljasti spoj **2** (6,1 mg; 1,4 %)

¹H NMR (σ/ppm) (300 MHz): 9,82 (1H, s, OH); 7,96 (1H, s, H-4'); 7,65 (2H, m, H-5, H-6'); 7,20 (1H, t, *J*=7,6 Hz, H-7'); 6,84 (3H, m, H-6, H-8, H-8'); 4,12 (3H, s, OCH₃)

3.3.3. 7-hidroksi-4-metil-3-((4-metoksifenil)etnil)-2H-kromen-2-on (3)

7-hidroksi-3-klor-4-metilkumarin (300 mg; 1,42 mmol) otopljen je u dimetilformamidu (DMF, 10 mL) te je dodan bakrov (I) jodid (CuI, 53,7 mg; 0,28 mmol), trietilamin (Et₃N, 0,4 mL; 2,84 mmol), tetrakis(trifenilfosfin)paladij((Pd(PPh₃)₄, 164,1 mg; 0,142 mmol) i 4-metoksifenilaceten (0,28 mL; 2,13 mmol). Reakcijska smjesa miješana je preko noći na sobnoj temperaturi. Potom je otapalo upareno pod sniženim tlakom, a smjesa pročišćena kolonskom kromatografijom (eluens CH₂Cl₂ : CH₃OH = 100:1) i preparativnom

kromatografijom u sustavu CH₂Cl₂. pri čemu je dobiven žuto-smečkasti uljasti spoj **3** (3,5 mg; 0,8 %)

¹H NMR (σ/ppm) (300 MHz): 10,12 (1H, s, OH); 7,78 (3H, m, H-5, H-5',5'"); 7,03 (2H, d, *J*=7,7 Hz, H-4',4'"); 6,81 (1H, d, *J*=7,8 Hz, H-6); 6,70 (1H, d, *J*=3,1 Hz, H-8); 3,96 (3H, s, OCH₃)

3.3.4. 7-hidroksi-3-(4-hidroksibut-1-in-1-il)-4-metil-2*H*-kromen-2-on (4)

7-hidroksi-3-klor-4-metilkumarin (300 mg; 1,42 mmol) otopljen je u dimetilformamidu (DMF, 10 mL) te je dodan bakrov (I) jodid (CuI, 53,7 mg; 0,28 mmol), trietilamin (Et₃N, 0,4 mL; 2,84 mmol), tetrakis(trifenilfosfin)paladij((Pd(PPh₃)₄, 164,1 mg; 0,142 mmol) i 3-butin-1-ol (0,17 mL; 2,13 mmol). Reakcijska smjesa miješana je 2 dana na sobnoj temperaturi. Potom je otapalo upareno pod sniženim tlakom, a smjesa pročišćena kolonskom kromatografijom (eluens CH₂Cl₂ : CH₃OH = 200:1) pri čemu je dobiven žuto-smečkasti uljasti spoj **4** (7 mg; 2 %).

¹H NMR (σ/ppm) (300 MHz): 10,51 (1H, s, OH); 7,60 (1H, d, *J*=8,8 Hz, H-5); 6,80 (1H, m, H-6); 6,71 (1H, d, *J*=2,4 Hz, H-8); 3,90 (1H, s, OH); 2,84 (2H, m, H-4'), 2,31 (2H, m, H-3')

3.3.5. 3-(hept-1-in-1-il)-7-hidroksi-4-metil-2*H*-kromen-2-on (5)

7-hidroksi-3-klor-4-metilkumarin (300 mg; 1,42 mmol) otopljen je u dimetilformamidu (DMF, 10 mL) te je dodan bakrov (I) jodid (CuI, 53,7 mg; 0,28 mmol), trietilamin (Et₃N, 0,4 mL; 2,84 mmol), tetrakis(trifenilfosfin)paladij((Pd(PPh₃)₄, 164,1 mg; 0,142 mmol) i 1-heptin (0,20 mL; 2,13 mmol). Reakcijska smjesa miješana je preko noći na sobnoj temperaturi i još 24h na 50°C. Potom je otapalo upareno pod sniženim tlakom, a smjesa pročišćena kolonskom kromatografijom (eluens CH₂Cl₂ : CH₃OH = 200:1) pri čemu je dobiven žuto-smečkasti uljasti spoj **5** (38,4 mg; 11,3 %).

¹H NMR (σ/ppm) (600 MHz): 10,06 (1H, s, OH); 7,56 (1H, d, *J*=8,6 Hz, H-5); 6,82 (1H, dd, *J*=8,6 Hz; 2,3 Hz, H-6); 6,73 (1H, d, *J*=2,3 Hz, H-8); 2,97 (2H, t, *J*=6,4 Hz, H-3'); 2,31 (2H, m, H-4'); 2,12 (4H, m, H-5',6'); 0,87 (3H, m, CH₃)

3.3.6. 7-hidroksi--4-metil-3-(okt-1-in-1-il)-2*H*-kromen-2-on (6)

7-hidroksi-3-klor-4-metilkumarin (300 mg; 1,42 mmol) otopljen je u dimetilformamidu (DMF, 10 mL) te je dodan bakrov (I) jodid (CuI, 53,7 mg; 0,28 mmol),

triethylamin (Et_3N , 0,4 mL; 2,84 mmol), tetrakis(trifenilfosfin)paladij($(\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$, 164,1 mg; 0,142 mmol) i 1-oktin (0,31 mL; 2,13 mmol). Reakcijska smjesa miješana je dva dana na sobnoj temperaturi. Potom je otapalo upareno pod sniženim tlakom, a smjesa pročišćena kolonskom kromatografijom (eluens CH_2Cl_2 : CH_3OH = 200:1) pri čemu je dobiven žuto-smečkasti uljasti spoj **6** (6,6 mg; 1,5 %).

^1H NMR (σ/ppm) (300 MHz): 10,47 (1H, s, OH); 7,63 (1H, d, $J=8,8$ Hz, H-5); 6,80 (1H, d, $J=8,8$ Hz; H-6); 6,75 (1H, s, H-8); 2,86 (2H, m, H-3'); 2,18 (8H, m, H-4'-7'); 0,84 (3H, m, CH_3)

3.3.7. 7-hidroksi--4-metil-3-(non-1-in-1-il)-2H-kromen-2-on (7)

7-hidroksi-3-klor-4-metilkumarin (300 mg; 1,42 mmol) otopljen je u dimetilformamidu (DMF, 10 mL) te je dodan bakrov (I) jodid (CuI , 53,7 mg; 0,28 mmol), triethylamin (Et_3N , 0,4 mL; 2,84 mmol), tetrakis(trifenilfosfin)paladij ($(\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$, 164,1 mg; 0,142 mmol) i 1-nonin (0,35 mL; 2,13 mmol). Reakcijska smjesa miješana je dva dana na sobnoj temperaturi. Potom je otapalo upareno pod sniženim tlakom, a smjesa pročišćena kolonskom kromatografijom (eluens CH_2Cl_2 : CH_3OH = 200:1) pri čemu je dobiven žuto-smečkasti uljasti spoj **7** (33,8 mg; 8 %).

^1H NMR (σ/ppm) (300 MHz): 9,83 (1H, s, OH); 7,65 (1H, d, $J=8,6$ Hz, H-5); 6,72 (1H, dd, $J=8,6$; 2,3 Hz; H-6); 6,65 (1H, d, $J=2,3$ Hz, H-8); 2,80 (2H, m, H-3'); 1,93 (10H, m, H-4'-8'); 0,84 (3H, m, CH_3)

3.3.8. 7-hidroksi-4-metil-3-(*p*-toliletinil)-2H-kromen-2-on (8)

7-hidroksi-3-klor-4-metilkumarin (300 mg; 1,42 mmol) otopljen je u dimetilformamidu (DMF, 10 mL) te je dodan bakrov (I) jodid (CuI , 53,7 mg; 0,28 mmol), triethylamin (Et_3N , 0,4 mL; 2,84 mmol), tetrakis(trifenilfosfin)paladij($(\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$, 164,1 mg; 0,142 mmol) i 4-etiniltoluen (0,27 mL; 2,13 mmol). Reakcijska smjesa miješana je preko noći na sobnoj temperaturi. Potom je otapalo upareno pod sniženim tlakom, a smjesa pročišćena kolonskom kromatografijom (eluens CH_2Cl_2 : CH_3OH = 150:1) i preparativnom kromatografijom u sustavu CH_2Cl_2 . Produkt **8** nije izoliran što je utvrđeno ^1H -NMR karakterizacijom.

3.3.9. 3-(4-fenilbut-1-in-1-il)-7-hidroksi-4-metil-2H-kromen-2-on (9)

7-hidroksi-3-klor-4-metilkumarin (300 mg; 1,42 mmol) otopljen je u dimetilformamidu (DMF, 10 mL) te je dodan bakrov (I) jodid (CuI, 53,7 mg; 0,28 mmol), trietilamin (Et₃N, 0,4 mL; 2,84 mmol), tetrakis(trifenilfosfin)paladij((Pd(PPh₃)₄, 164,1 mg; 0,142 mmol) i 4-fenil-1-butin (0,3 mL; 2,13 mmol). Reakcijska smjesa miješana je preko noći na sobnoj temperaturi i 12h na 50°C. Potom je otapalo upareno pod sniženim tlakom, a smjesa pročišćena kolonskom kromatografijom (eluens CH₂Cl₂ : CH₃OH = 150:1) i preparativnom kromatografijom u sustavu CH₂Cl₂. Produkt **9** nije izoliran što je utvrđeno ¹H-NMR karakterizacijom.

3.3.10. 7-hidroksi-3-(3-hidroksibut-1-in-1-il)-4-metil-2H-kromen-2-on (10)

7-hidroksi-3-klor-4-metilkumarin (300 mg; 1,42 mmol) otopljen je u dimetilformamidu (DMF, 10 mL) te je dodan bakrov (I) jodid (CuI, 53,7 mg; 0,28 mmol), trietilamin (Et₃N, 0,4 mL; 2,84 mmol), tetrakis(trifenilfosfin)paladij((Pd(PPh₃)₄, 164,1 mg; 0,142 mmol) i 3-butin-2-ol (0,17 mL; 2,13 mmol). Reakcijska smjesa miješana je preko noći na sobnoj temperaturi. Potom je otapalo upareno pod sniženim tlakom, a smjesa pročišćena kolonskom kromatografijom (eluens CH₂Cl₂ : CH₃OH = 150:1). Produkt **10** nije izoliran što je utvrđeno ¹H-NMR karakterizacijom.

3.3.11. 3-fenil-7-hidroksi-4-metil-2H-kromen-2-on (11)**Metoda A**

7-hidroksi-3-klor-4-metilkumarin (200 mg; 0,95 mmol) otopljen je u tetrahidrofuranu (THF, 8 mL) te je dodan kalijev karbonat (K₂CO₃, 393,9 mg; 2,85 mmol), tetrakis(trifenilfosfin)paladij ((Pd(PPh₃)₄, 109,8 mg; 0,095 mmol) i fenilboronska kiselina (231,7 mg; 1,9 mmol). Reakcijska smjesa miješana je preko noći na sobnoj temperaturi i dva dana na 65°C. Potom je otapalo upareno pod sniženim tlakom, a smjesa pročišćena kolonskom kromatografijom (eluens n-heksan : etil-acetat = 10:1) pri čemu je dobiven bijeli kristalinični spoj **11** (2,4 mg; 1 %).

¹H NMR (σ/ppm) (600 MHz): 9,82 (1H, s, OH); 7,63 (1H, d, *J*=8,8 Hz, H-5); 7,48 (2H, t, *J*=6,8 Hz; H-3',3''); 7,27 (1H, t, *J*=6,8 Hz, H-4'); 7,16 (2H, d, *J*=6,8 Hz, H-2',2''); 6,72 (1H, s, H-8)

Metoda B

7-hidroksi-3-klor-4-metilkumarin (200 mg; 0,95 mmol) otopljen je u metanolu (MeOH, 10 mL) te je dodan natrijev karbonat (Na_2CO_3 , 201,4 mg; 1,9 mmol), paladijev acetat ($(\text{PdOAc})_2$, 6,4 mg; 0,0285 mmol) i fenilboronska kiselina (139,0 mg; 1,14 mmol). Reakcijska smjesa miješana je preko noći na sobnoj temperaturi i dva dana na 65°C. Potom je otapalo upareno pod sniženim tlakom, a smjesa pročišćena kolonskom kromatografijom (eluens n-heksan : etil-acetat = 10:1) pri čemu je dobiven bijeli kristalinični spoj **11** (3,1 mg; 1,3 %).

Metoda C

7-hidroksi-3-klor-4-metilkumarin (100 mg; 0,47 mmol) otopljen je u tetrahidrofuranu (THF, 4 mL) te je dodan kalijev karbonat (K_2CO_3 , 194,9 mg; 1,41 mmol), diklorobis(trifenilfosfin)paladij ($\text{PdCl}_2(\text{PPh}_3)_2$, 33,0 mg; 0,047 mmol) i fenilboronska kiselina (114,6 mg; 0,94 mmol). Reakcijska smjesa miješana je 24h na sobnoj temperaturi. Potom je otapalo upareno pod sniženim tlakom, a smjesa pročišćena kolonskom kromatografijom (eluens n-heksan : etil-acetat = 10:1) pri čemu je dobiven bijeli kristalinični spoj **11** (2,8 mg; 2,3 %).

Metoda D

7-hidroksi-3-klor-4-metilkumarin (100 mg; 0,47 mmol) otopljen je u smjesi tetrahidrofuran/voda (THF/ H_2O 1:1, 4 mL) te je dodan kalijev karbonat (K_2CO_3 , 194,9 mg; 1,41 mmol), tetrakis(trifenilfosfin)paladij ($(\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$, 54,3 mg; 0,047 mmol) i fenilboronska kiselina (114,6 mg; 0,94 mmol). Reakcijska smjesa miješana je 24h na sobnoj temperaturi. Potom je otapalo upareno pod sniženim tlakom, a smjesa pročišćena kolonskom kromatografijom (eluens n-heksan : etil-acetat = 10:1) pri čemu je dobiven bijeli kristalinični spoj **11** (1,8 mg; 1,5 %).

Metoda E

7-hidroksi-3-klor-4-metilkumarin (100 mg; 0,47 mmol) otopljen je u dimetilformamidu (DMF, 4 mL) te je dodan kalijev karbonat (K_2CO_3 , 194,9 mg; 1,41 mmol), tetrakis(trifenilfosfin)paladij ($(\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$, 54,3 mg; 0,047 mmol) i fenilboronska kiselina (114,6 mg; 0,94 mmol). Reakcijska smjesa miješana je 24h na sobnoj temperaturi. Potom je

otapalo upareno pod sniženim tlakom, a smjesa pročišćena kolonskom kromatografijom (eluens n-heksan : etil-acetat = 10:1) pri čemu je dobiven bijeli kristalinični spoj **11** (4 mg; 3,4 %).

Metoda F

7-hidroksi-3-klor-4-metilkumarin (100 mg; 0,47 mmol) otopljen je u otopini poli(etilenglikola) i vode (PEG:H₂O 1:6, 6 mL) te je dodan natrijev karbonat (Na₂CO₃, 99,6 mg; 0,94 mmol), paladijev acetat ((PdOAc)₂, 1,1 mg, 0,0047 mmol) i fenilboronska kiselina (86,0 mg; 0,705 mmol). Reakcijska smjesa miješana je 48h na 60°C. Potom je otapalo upareno pod sniženim tlakom, a smjesa ekstrahirana u sustavu CH₂Cl₂/H₂O (50 mL) i organski sloj sušen iznad bezvodnog magnezij sulfata, filtriran i uparen pri sniženom tlakou. Produkt je pročišćen kolonskom kromatografijom (eluens n-heksan : etil-acetat = 3:1) pri čemu je dobiven crvenkasti uljasti spoj **11** (12,6 mg; 10,6 %).

Metoda G

7-hidroksi-3-klor-4-metilkumarin (100 mg; 0,47 mmol) otopljen je u vodi (H₂O, 20 mL) te je dodan je *tert*-butilamonijev bromid (TBAB, 151,5 mg; 0,47 mmol), natrijev karbonat (Na₂CO₃, 248,9 mg; 2,35 mmol), tetrakis(trifenilfosfin)paladij ((Pd(PPh₃)₄, 27,2 mg; 0,0235 mmol) i fenilboronska kiselina (201,2 mg; 1,65 mmol). Reaktanti su pomiješani u kivetu za mikrovalni reaktor u kojem je provedena reakcija tijekom 30 minuta pri 100° C i snazi od 300 W. Nakon završetka reakcije, otapalo je upareno, a smjesa pročišćena kolonskom kromatografijom (eluens n-heksan : etil-acetat = 3:1) pri čemu je dobiven crvenkasto-crni uljasti spoj **11** (63,1 mg; 53,3 %).

Metoda H

7-hidroksi-3-klor-4-metilkumarin (100 mg; 0,47 mmol) otopljen je u otopini poli(etilenglikola) i etanola (PEG:EtOH 3:6, 6 mL) te je dodan kalijev fluorid (KF, 81,9 mg; 1,41 mmol), paladijev acetat ((PdOAc)₂, 10,6 mg; 0,047 mmol) i fenilboronska kiselina (85,9 mg; 0,705 mmol). Reakcijska smjesa miješana je 48h na 60°C. Reaktanti su pomiješani u kivetu za mikrovalni reaktor u kojem je provedena reakcija tijekom 30 minuta pri 100° C i snazi od 300 W. Nakon završetka reakcije, otapalo je upareno, a smjesa ekstrahirana u sustavu CH₂Cl₂/H₂O (50 mL) i organski sloj sušen iznad bezvodnog magnezij sulfata, filtriran i uparen pri sniženom tlakou. Produkt je pročišćen kolonskom kromatografijom (eluens n-

heksan : etil-acetat = 3:1) pri čemu je dobiven smečkasto-žuti kristalinični spoj **11** (11,9 mg; 10,0 % , 147-151°C).

Metoda I

7-hidroksi-3-klor-4-metilkumarin (100 mg; 0,47 mmol) otopljen je u vodi (H₂O, 5 mL) te je dodan je natrijev karbonat (Na₂CO₃, 149,4 mg; 1,41 mmol), tetrakis(trifenilfosfin)paladij ((Pd(PPh₃)₄, 54,3 mg; 0,047 mmol) i fenilboronska kiselina (0,61 mg; 74,5 mmol). Reaktanti su pomiješani u kiveti za mikrovalni reaktor u kojem je provedena reakcija tijekom 30 minuta pri 100° C i snazi od 300 W. Nakon završetka reakcije, otapalo je upareno, a smjesa pročišćena kolonskom kromatografijom (eluens n-heksan : etil-acetat = 3:1) pri čemu je dobiven uljasti žuto-smečkasti spoj **11** (13,5 mg; 11,4 %).

3.3.12. 7-hidroksi-3-(3-hidroksifenil)-4-metil-2H-kromen-2-on (12)

7-hidroksi-3-klor-4-metilkumarin (300 mg; 1,42 mmol) otopljen je u metanolu (MeOH, 20 mL) te je dodan natrijev karbonat (Na₂CO₃; 300,9 mg; 2,84 mmol), paladijev acetat ((PdOAc)₂, 15,9 mg, 0,071 mmol) i 3-hidroksifenilboronska kiselina (295,2 mg; 2,14 mmol). Reakcijska smjesa miješana je 24h na sobnoj temperaturi. Potom je otapalo upareno pod sniženim tlakom, a smjesa pročišćena kolonskom kromatografijom (eluens n-heksan : etil-acetat = 1:1) pri čemu je dobiven bijeli kristalini spoj **12** (7,4 mg; 6,3 % , 169-173°C).

¹H NMR (σ/ppm) (300 MHz): 10,51 (1H, s, OH); 7,70 (1H, s, OH); 7,60 (1H, d, *J*=8,4 Hz, H-5); 7,51 (1H, d, *J*=7,2 Hz, H-4'); 7,13 (2H, d, *J*=7,4 Hz, H-5); 6,81 (1H, dd; *J*=8,4; 2,4 Hz, H-6); 6,72 (1H, d, *J*=2,5 Hz, H-8); 6,14 (1H, s, H-6')

3.3.13. 7-hidroksi-4-metil-3-(2-metoksifenil)-2H-kromen-2-on (13)

7-hidroksi-3-klor-4-metilkumarin (300 mg; 1,42 mmol) otopljen je u metanolu (MeOH, 20 mL) te je dodan natrijev karbonat (Na₂CO₃, 300,9 mg; 2,84 mmol), paladijev acetat ((PdOAc)₂, 31,9 mg, 0,142 mmol) i 2-metoksifenilboronska kiselina (431,57 mg; 2,84 mmol). Reakcijska smjesa miješana je 24h na sobnoj temperaturi. Potom je otapalo upareno pod sniženim tlakom, a smjesa pročišćena kolonskom kromatografijom (eluens n-heksan : etil-acetat = 5:1 i 1:1) pri čemu je izoliran bijeli kristalini spoj **13** (8,81 mg; 2,2 %)

¹H NMR (σ/ppm) (300 MHz): 9,91 (1H, s, OH); 7,52 (2H, m, H-5, H-3'); 7,31 (1H, t, *J*=8,1 Hz, H-5'); 7,03 (4H, m, H-6, H-4',6', H-8); 3,69 (3H, s, OCH₃)

3.3.14. 7-hidroksi-4-metil-3-(3-metoksifenil)-2H-kromen-2-on (14)

7-hidroksi-3-klor-4-metilkumarin (300 mg; 1,42 mmol) otopljen je u metanolu (MeOH, 20 mL) te je dodan natrijev karbonat (Na_2CO_3 , 300,9 mg; 2,84 mmol), paladijev acetat ($(\text{PdOAc})_2$, 31,9 mg, 0,142 mmol) i 3-metoksifenilboronska kiselina (431,57 mg; 2,84 mmol). Reakcijska smjesa miješana je 24h na sobnoj temperaturi. Potom je otapalo upareno pod sniženim tlakom, a smjesa pročišćena kolonskom kromatografijom (eluens n-heksan : etil-acetat = 5:1 i 1:1) pri čemu je izoliran bijeli kristalični spoj **14** (2,8 mg; 0,7 %).

^1H NMR (σ /ppm) (300 MHz): 10,52 (1H, s, OH); 7,61 (1H, d, $J=8,3$ Hz, H-5); 7,50 (2H, m, H-2',4'); 7,26 (2H, m, H-5',6'); 6,82 (1H, dd, $J=8,2; 2,6$ Hz, H-6); 6,70 (1H, d; $J=2,6$ Hz, H-8); 3,69 (3H, s, OCH_3)

3.3.15. 3-etinil-7-hidroksi-4-metil-2H-kromen-2-on (15)**Metoda A**

7-hidroksi-3-klor-4-metilkumarin (100 mg; 0,47 mmol) otopljen je u tetrahidrofuranu (THF, 10 mL) te je dodan tetrakis(trifenilfosfin)paladij ($(\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$, 54,3 mg; 0,047 mmol) i etiniltributilstanan (1,36 mL; 4,7 mmol). Reakcijska smjesa zagrijavana je na refluku 24h nako nakon čega je otapalo upareno pod sniženim tlakom, a smjesa pročišćena kolonskom kromatografijom (eluens CH_2Cl_2 : CH_3OH = 50:1, n-heksan : etil-acetat = 1:1). Produkt **15** nije izoliran što je utvrđeno ^1H -NMR karakterizacijom.

Metoda B

7-hidroksi-3-klor-4-metilkumarin (200 mg; 0,94 mmol) otopljen je u tetrahidrofuranu (THF, 15 mL) te je dodan diklorobis(trifenilfosfin)paladij ($\text{PdCl}_2(\text{PPh}_3)_2$, 66,0 mg; 0,094 mmol) i etiniltributilstanan (2,96 mL; 9,4 mmol). Reakcijska smjesa zagrijavana je na refluku 48h nako nakon čega je otapalo upareno pod sniženim tlakom, a smjesa pročišćena kolonskom kromatografijom (eluens CH_2Cl_2 : CH_3OH = 50:1 i CH_2Cl_2). Produkt **15** nije izoliran što je utvrđeno ^1H -NMR karakterizacijom.

3.3.16. 2-hidroksi-5-(2-metoksifeniletinil)benzaldehyd (16)

5-bromsalicilaldehyd (300 mg; 1,49 mmol) otopljen je u bezvodnom dimetilformamidu (DMF, 10 mL), dodan je trietilamin (Et_3N , 0,32 mL, 3 mmol), tetrakis(trifenilfosfin)paladij ($(\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$, 172,4 mg; 0,149 mmol), bakrov (I) jodid (56,8 mg; 0,298 mmol) i terminalni

alkin 2-metoksifeniletinil (0,29 mL; 2,235 mmol). Reakcijska smjesa miješana je preko noći na sobnoj temperaturi nakon čega je otapalo upareno pod sniženim tlakom, a smjesa pročišćena kolonskom kromatografijom (eluens CH₂Cl₂ : CH₃OH = 80:1). Izoliran je smeđi kristalinični spoj **16** (140,8 mg; 37,5 %).

¹H NMR (σ/ppm) (300 MHz): 8,60 (1H, s, OH); 8,12 (1H, s, H-6); 7,61 (3H, m, H-3, H-4, H-5'); 7,27 (3H, m, H-6' - H-8'); 3,87 (3H, s, OCH₃); 2,61 (3H, s, CH₃CO)

3.3.17. 2-hidroksi-5-(4-metoksifeniletinil)benzaldehyd (17)

5-bromsalicilaldehyd (300 mg; 1,49 mmol) otopljen je u bezvodnom dimetilformamidu (DMF, 10 mL), dodan je trietilamin (Et₃N, 0,32 mL, 3 mmol), tetrakis(trifenilfosfin)paladij ((Pd(PPh₃)₄, 172,4 mg; 0,149 mmol), bakrov (I) jodid (56,8 mg; 0,298 mmol) i terminalni alkin 4-metoksifeniletinil (0,29 mL; 2,235 mmol). Reakcijska smjesa miješana je preko noći na sobnoj temperaturi nakon čega je otapalo upareno pod sniženim tlakom, a smjesa pročišćena kolonskom kromatografijom (eluens CH₂Cl₂ : CH₃OH = 80:1). Izoliran je smeđi kristalinični spoj **17** (355,2 mg; 94,0 %).

¹H NMR (σ/ppm) (600 MHz): 8,43 (1H, s, OH); 8,10 (1H, s, H-6); 7,96 (2H, d, *J*=7,8 Hz, H-5',5''); 7,31 (4H, m, H-3, H-4, H-4',4'' - H-8'); 3,83 (3H, s, OCH₃); 2,64 (3H, s, CH₃CO)

3.3.18. 3-azido-7-hidroksi-2*H*-kromen-2-on (18)

2,4-dihidroksibenzaldehyd (2,76 g; 20 mmol), N-acetilglicin (2,34 g; 20 mmol) i natrijev acetat (4,292 g; 60 mmol) otopljeni su u acetanhidridu (100 mL) i zagrijavani na refluxu 4h (140-150°C). Reakcijska smjesa je izlijana na led (300-400 mL) i preko noći hlađena u zamrzivaču pri čemu je nastao talog koji je profiltriran preko Büchnerovog lijevka i ispran ledenom vodom. Talog je otopljen u smjesi konc. klorovodične kiseline i etanola (konc. HCl/H₂O 2:1, 30 mL) i smjesa je zagrijavana 1h na refluxu (120°C). Potom je dodano 40 mL ledene vode, smjesa hlađena u ledenoj kupelji i dodan natrijev nitrit (NaNO₂, 2,76 g; 40 mmol) u obrocima. Smjesa je miješana 5-10 min i u obrocima dodan natrijev azid (NaN₃, 3,9 g; 60 mmol) i miješana 15min. Nastali talog je filtriran preko Büchnerovog lijevka, ispran vodom i osušen pri čemu je dobiven smeđi praškasti spoj **18** (543,7 mg; 13,4 %)

¹H NMR (σ/ppm) (600 MHz): 10,53 (1H, s, OH); 7,60 (1H, s, H-4); 7,48 (1H, d, *J*=8,5 Hz, H-5); 6,81 (1H, dd, *J*=8,5; 2,3 Hz, H-6); 6,76 (1H, d, *J*=2,2 Hz, H-8)

3.3.19. 3-azido-6-(2-metoksifeniletinil)-2H-kromen-2-on (19)

2-hidroksi-5-(2-metoksifeniletinil)benzaldehyd (140,8 mg; 0,558 mmol), N-acetilglicin (65,3 mg; 0,558 mmol) i natrijev acetat (137,3 mg; 1,674 mmol) otopljeni su u acetanhidridu (10 mL) i zagrijavani na refluksu 4h (140-150°C). Reakcijska smjesa je izlijana na led (30 mL) i preko noći hlađena u zamrzivaču pri čemu je nastao talog koji je profiltriran preko Büchnerovog lijevka i ispran ledenom vodom. Talog je otopljen u smjesi konc. klorovodične kiseline i etanola (konc. HCl/H₂O 2:1, 6 mL) i smjesa je zagrijavana 1h na refluksu (120°C). Potom je dodano 20 mL ledene vode, smjesa hlađena u ledenoj kupelji i dodan natrijev nitrit (NaNO₂, 77 mg; 1,44 mmol) u obrocima. Smjesa je miješana 5-10 min i u obrocima dodan natrijev azid (NaN₃, 108,8 mg; 1,674 mmol) i miješana 15min. Nastali talog je filtriran preko Büchnerovog lijevka, ispran vodom i osušen pri čemu je dobiven crno-smeđi praškasti spoj **19** (82,7 mg; 46,7 %)

¹H NMR (σ/ppm) (300 MHz): 10,91 (1H, s, OH); 7,73 (1H, s, H-4); 7,49 (1H, d, *J*=8,4 Hz, H-5); 7,23 (4H, m, H-4'-7'); 6,90 (1H, dd, *J*=8,5; 2,2 Hz, H-6); 6,84 (1H, d, *J*=2,0 Hz, H-8) 4,11 (3H, s, OCH₃)

3.3.20. 3-azido-6-(4-metoksifeniletinil)-2H-kromen-2-on (20)

2-hidroksi-5-(4-metoksifeniletinil)benzaldehyd (355,2 mg; 1,41 mmol), N-acetilglicin (165,1 mg; 1,41 mmol) i natrijev acetat (347,0 mg; 4,23 mmol) otopljeni su u acetanhidridu (10 mL) i zagrijavani na refluksu 4h (140-150°C). Reakcijska smjesa je izlijana na led (30 mL) i preko noći hlađena u zamrzivaču pri čemu je nastao talog koji je profiltriran preko Büchnerovog lijevka i ispran ledenom vodom. Talog je otopljen u smjesi konc. klorovodične kiseline i etanola (konc. HCl/H₂O 2:1, 6 mL) i smjesa je zagrijavana 1h na refluksu (120°C). Potom je dodano 20 mL ledene vode, smjesa hlađena u ledenoj kupelji i dodan natrijev nitrit (NaNO₂, 194,6 mg; 2,82 mmol) u obrocima. Smjesa je miješana 5-10 min i u obrocima dodan natrijev azid (NaN₃, 275,0 mg; 4,23 mmol) i miješana 15min. Nastali talog je filtriran preko Büchnerovog lijevka, ispran vodom i osušen pri čemu je dobiven crno-smeđi praškasti spoj **20** (269,2 mg; 60,2 %)

¹H NMR (σ/ppm) (300 MHz): 10,88 (1H, s, OH); 8,59 (1H, s, H-4); 7,74 (1H, d, *J*=8,6 Hz, H-5); 7,29 (2H, m, H-4'); 7,19 (2H, m, H-5'); 6,90 (1H, dd, *J*=8,5; 2,2 Hz, H-6); 6,86 (1H, d, *J*=2,1 Hz, H-8) 4,09 (3H, s, OCH₃)

3.3.21. 3-(4-(feniletil-1*H*-1,2,3-triazol-1-il)-7-hidroksi-2*H*-kromen-2-on (21)

Spoj **18**, 3-azido-7-hidroksi-2*H*-kromen-2-on (200 mg; 1 mmol) otopljen je u smjesi *tert*-butanol/voda (t-BuOH/H₂O 1:1, 4 mL) i dimetilformamidu (DMF, 0,5 mL) te je dodana bakrena žica (50,8 mg; 0,8 mmol), otopina bakrova sulfata pentahidrata (CuSO₄·5H₂O 0,24 mL; 0,24 mmol) i 4-fenil-1-butin (0,11 mL; 0,8 mmol). Reaktanti su pomiješani u kiveti za mikrovalni reaktor u kojem je provedena reakcija tijekom 1h pri 80° C i snazi od 300 W. Nakon završetka reakcije, otapalo je upareno, a smjesa pročišćena kolonskom kromatografijom (eluens CH₂Cl₂ : CH₃OH = 100:1) pri čemu je dobiven žuto-smečkast kristalični spoj **21** (130 mg; 39 % , >250°C).

¹H NMR (σ/ppm) (600 MHz): 10,90 (1H, s, OH); 8,57(1H, s, H-1'); 8,31 (1H, s, H-4) 7,74 (1H, d, *J*=8,6 Hz, H-5); 7,28 (1H, m, H6'-8') 6,90 (1H, dd, *J*=8,5; 2,2 Hz, H-6) 6,76 (1H, d, *J*=2,2 Hz, H-8); 3,16 (2H, t, *J*=5,1 Hz, H-3'), 3,00 (2H, dt, *J*=9,1; 7,1 Hz, H-4')

3.3.22. 7-hidroksi-3-(4-(piridin-2-il)-1*H*-1,2,3-triazol-1-il)-2*H*-kromen-2-on (22)

Spoj **18**, 3-azido-7-hidroksi-2*H*-kromen-2-on (200 mg; 1 mmol) otopljen je u smjesi *tert*-butanol/voda (t-BuOH/H₂O 1:1, 4 mL) i dimetilformamidu (DMF, 0,5 mL) te je dodana bakrena žica (50,8 mg; 0,8 mmol), otopina bakrova sulfata pentahidrata (CuSO₄·5H₂O 0,24 mL; 0,24 mmol) i 2-etinilpiridin (0,08 mL; 0,8 mmol). Reaktanti su pomiješani u kiveti za mikrovalni reaktor u kojem je provedena reakcija tijekom 1h pri 80° C i snazi od 300 W. Nakon završetka reakcije, otapalo je upareno, a smjesa pročišćena kolonskom kromatografijom (eluens CH₂Cl₂ : CH₃OH = 50:1) pri čemu je dobiven bijelo-žučkasti kristalični spoj **22** (38 mg; 12,4 % , >250°C).

¹H NMR (σ/ppm) (600 MHz): 10,94 (1H, s, OH); 8,97 (1H, s, H-1'); 8,69 (1H, s, H-4); 8,65 (2H, d, *J*=4,3 Hz, H-5'); 8,12 (1H, d, *J*=7,8 Hz, H-8'); 7,95 (1H, t, *J*=7,8 Hz, H-7'); 7,78 (1H, d, *J*=8,6 Hz; H-5); 7,40 (1H, m, H-6') 6,93 (1H, dd, *J*=8,6; 2,3 Hz, H-6); 6,88 (1H, d, *J*=2,2 Hz, H-8)

3.3.23. 3-(4-(4-bromfenil)-1*H*-1,2,3-triazol-1-il)-7-hidroksi-2*H*-kromen-2-on (23)

Spoj **18**, 3-azido-7-hidroksi-2*H*-kromen-2-on (200 mg; 1 mmol) otopljen je u smjesi *tert*-butanol/voda (t-BuOH/H₂O 1:1, 4 mL) i dimetilformamidu (DMF, 0,5 mL) te je dodana bakrena žica (50,8 mg; 0,8 mmol), otopina bakrova sulfata pentahidrata (CuSO₄·5H₂O 0,24 mL; 0,24 mmol) i 1-brom-4-etinilbenzen (144,8 mg; 0,8 mmol). Reaktanti su pomiješani u

kiveti za mikrovalni reaktor u kojem je provedena reakcija tijekom 1h pri 80° C i snazi od 300 W. Nakon završetka reakcije, otapalo je upareno, a smjesa pročišćena kolonskom kromatografijom (eluens CH₂Cl₂ : CH₃OH = 100:1) pri čemu je dobiven žuto kristalični spoj **23** (244 mg; 63,7 % , >250°C).

¹H NMR (σ/ppm) (600 MHz): 10,96 (1H, s, OH); 9,08 (1H, s, H-1'); 8,66 (1H, s, H-4); 7,93 (1H, d, *J*=8,5 Hz, H-4',4''); 7,77 (1H, d, *J*=8,6 Hz, H-5); 7,69 (1H, d, *J*=8,5 Hz, H-5',5''); 6,91 (1H, m, H-6); 6,87 (1H, d, *J*=2,0 Hz, H-8)

3.3.24. 3-(4-(3,5-difluorfenil)-1*H*-1,2,3-triazol-1-il)-7-hidroksi-2*H*-kromen-2-on (24)

Spoj **18**, 3-azido-7-hidroksi-2*H*-kromen-2-on (200 mg; 1 mmol) otopljen je u smjesi *tert*-butanol/voda (t-BuOH/H₂O 1:1, 4 mL) i dimetilformamidu (DMF, 0,5 mL) te je dodana bakrena žica (50,8 mg; 0,8 mmol), otopina bakrova sulfata pentahidrata (CuSO₄·5H₂O 0,24 mL; 0,24 mmol) i 1-etinil-3,5-difluorobenzen (0,095 mL; 0,8 mmol). Reaktanti su pomiješani u kiveti za mikrovalni reaktor u kojem je provedena reakcija tijekom 1h pri 80° C i snazi od 300 W. Nakon završetka reakcije, otapalo je upareno, a smjesa pročišćena kolonskom kromatografijom (eluens CH₂Cl₂ : CH₃OH = 100:1) pri čemu je dobiven žuto kristalični spoj **24** (72 mg; 21,1 % , >250°C).

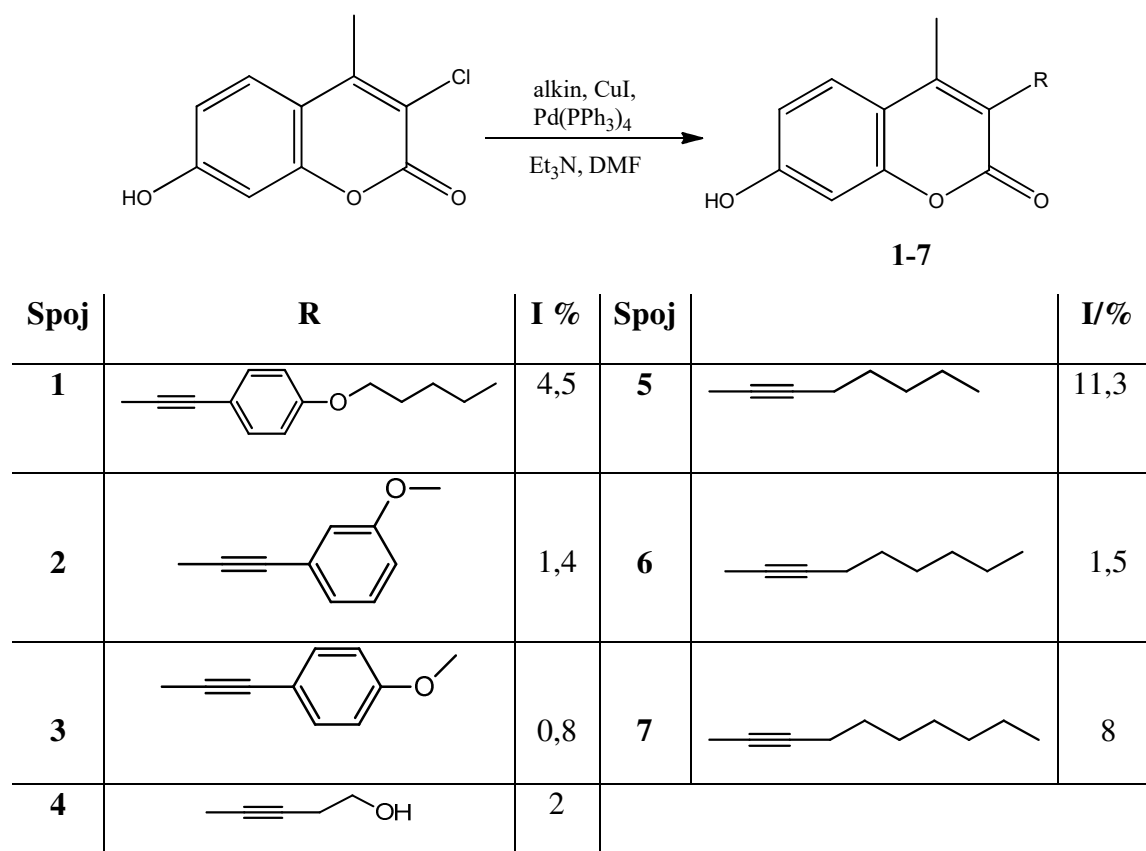
¹H NMR (σ/ppm) (300 MHz): 10,96 (1H, s, OH); 9,21 (1H, s, H-1'); 8,69 (1H, s, H-4); 7,78 (1H, d, *J*=8,6 Hz, H-5); 7,73 (1H, t, *J*=6,5 Hz, H-6',6''); 7,27 (2H, m, H-4',4''); 6,93 (1H, dd, *J*=8,4;2,4 Hz, H-6); 6,88 (1H, d, *J*=2,1 Hz, H-8)

4. REZULTATI I RASPRAVA

4.1. Sinteze spojeva

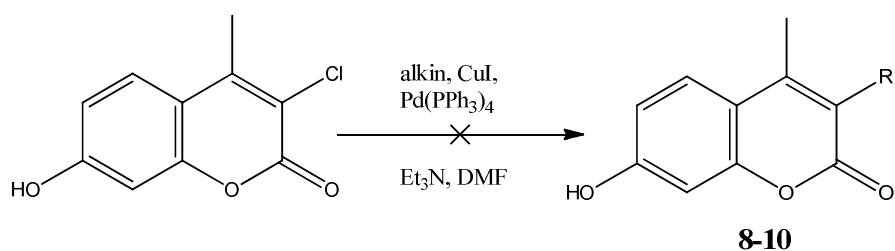
U ovom radu sintetizirani su potencijalno biološki aktivni derivati kumarina paladijem i bakrom kataliziranim reakcijama. U C-3 položaj 7-hidroksi-4-metilkumarina Sonogashira-inom reakcijom uvedeni su različiti alkinilni supstituenti, a Suzuki-jevom reakcijom arilni supstituenti. „Klik“ reakcijama pripremljeni su derivati 7-hidroksikumarina u položaju 3 supstituirani 1,2,3-triazolnim prstenom, a Perkinovom sintezom kumarinskog prstena sintetizirani su odgovarajući kumarinski azidi korišteni kao prekursori u „klik“ reakcijama.

Sonogashira-inom reakcijom unakrsnog povezivanja sintetizirani su derivati 7-hidroksi-4-metilkumarina koji su u položaju C-3 kumarinske jezgre supstituirani ariletinilnim (**1-3**) i alkiletinilnim (**4-7**) skupinama. Tako su u reakciji 7-hidroksi-3-klor-4-metilkumarina s odgovarajućim feniletinom (4-n-pentiloksifenilaceten, 3-metoksifenilaceten i 4-metoksifenilaceten) i u prisutnosti Pd-katalizatora (tetrakis(trifenilfosfin)paladij(0)), kokatalizatora CuI i trietilamina u DMF-u sintetizirani spojevi **1-3** s iskorištenjima od 4,5%, 1,4% i 0,8%. S odgovarajućim alkil-supstituiranim alkinima (3-butin-1-ol, 1-heptin, 1-oktin i 1-nonin) sintetizirani su spojevi: **4** u iskorištenju od 2%, **5** u iskorištenju od 11,3%, **6** u iskorištenju od 1,5%, **7** u iskorištenju od 8%, (shema 1.)



Shema 1. Sonogashira-ina reakcija sinteze C-3 alkinilnih derivata kumarina

U istim reakcijskim uvjetima s aril supstituiranim alkinima (4-etiniltoulen, 4-fenil-1-butin) te s 3-butin-2-olom reakcije nisu uspješno provedene i produkti **8-10** nisu izolirani (shema 2.).

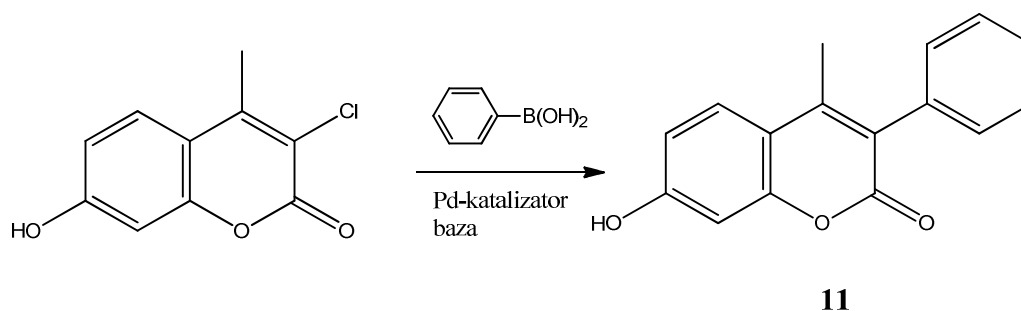


Spoj	R	I /%
8		-
9		-
10		-

Shema 2. Sonogashira-ina reakcija sinteze alkin supstituiranih derivata kumarina koja nije uspješno provedena

Suzuki-jevom reakcijom unakrsnog povezivanja 7-hidroksi-3-klor-4-metilkumarina s odgovarajućim bornim kiselinama u položaj C-3 kumarinske jezgre uvedeni su arilni supstituenti te su pripremljeni spojevi **11-14** (shema 3.). Provedeno je optimiranje Suzuki-jeve reakcije u sintezi 3-fenil derivata kumarina (**11**) uz različite reakcijske uvjete pri čemu su za sintezu korišteni različiti Pd-katalizatori te različite baze i otapala kako bi se poboljšalo reakcijsko iskorištenje. Tako je metodom A sintetiziran spoj **11** u iskorištenju od 1%, metodom B u iskorištenju od 1,3%, metodom C u iskorištenju od 2,3%, metodom D u iskorištenju od 1,5%, metodom E u iskorištenju od 3,4%, metodom F u iskorištenju od 10,6%,

dok su metode G, H i I provedene u mikrovalnom reaktoru rezultirale boljim iskorištenjima (53,3%, 10% i 11,4%). Vidljivo je kako su sinteze potpomognute mikrovalovima učinkovitije od klasičnih jer daju bolje iskorištenje reakcije (metoda G 53,3%) u vrlo kratkom vremenu od 30 min uz vodu ili etanol kao otapalo, a korištenje poli(etilenglikola) i *tert*-butilamojevog bromida također vodi većem iskorištenju.



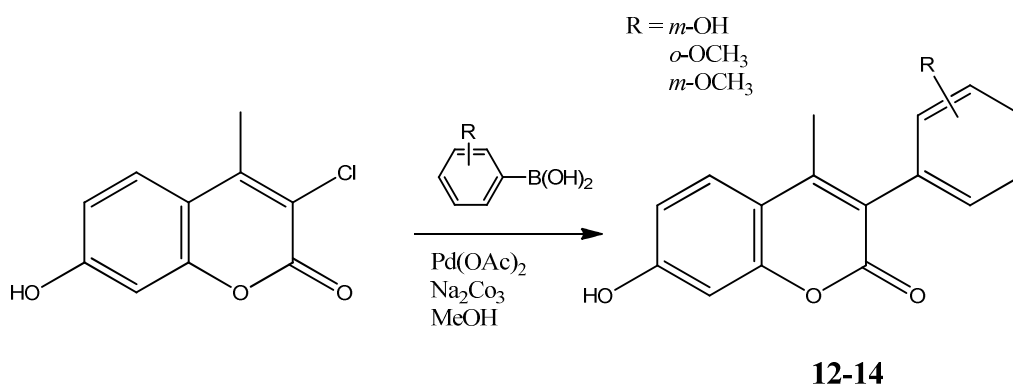
Shema 3. Sinteza 3-fenil-7-hidroksi-4-metilumarina Suzuki-jeva reakcijom pri različitim reakcijskim uvjetima

Tablica 1. Optimiranje reakcijskih uvjeta za sintezu 3-arilkumarinskih derivata Suzuki-jevom reakcijom

Metoda	Katalizator	Otapalo	Baza	Reakcijski uvjeti	I / %
A	Pd(PPh ₃) ₄	THF	K ₂ CO ₃	r.t./24h 60°C/48h	1,0
B	Pd(OAc) ₂	MeOH	Na ₂ CO ₃	r.t./24h 60°C/48h	1,3
C	PdCl ₂ (PPh ₃) ₂	THF	K ₂ CO ₃	r.t./24h	2,3
D	Pd(PPh ₃) ₄	THF/H ₂ O 1:1	K ₂ CO ₃	r.t./24h	1,5
E	Pd(PPh ₃) ₄	DMF	K ₂ CO ₃	r.t./24h	3,4
F	Pd(OAc) ₂	PEG/ H ₂ O 1:6	Na ₂ CO ₃	60°C/48h	10,6

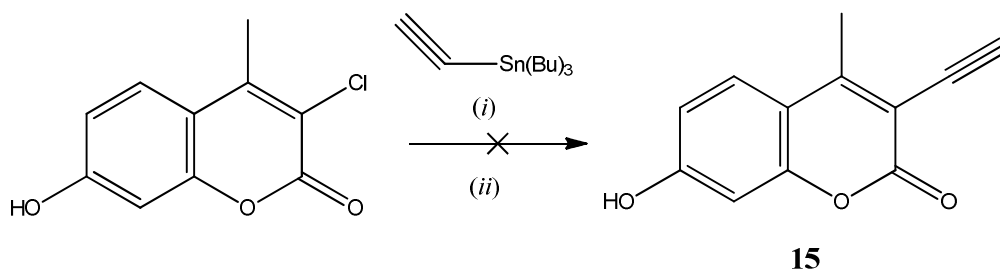
G	Pd(PPh ₃) ₄	H ₂ O	Na ₂ CO ₃ TBAB	MW 300W 100°C, 30 min	53,3
H	Pd(OAc) ₂	PEG/EtOH 3:6	KF	MW 300W 100°C, 30 min	10,0
I	Pd(PPh ₃) ₄	H ₂ O	Na ₂ CO ₃	MW 300W 100°C, 30 min	11,4

Nadalje, sinteza 3-arilnih derivata kumarina provedena je i s 3-hidroksifenilbornom kiselinom, 2-metoksifenilbornom i 3-metoksifenilbornom kiselinom u metanolu, uz paladijev acetat kao katalizator te bazu natrijev karbonat (shema 4.). Pri tome su izolirani derivati kumarina **12-14** u iskorištenju od 6,3%, 2,2% i 0,7%



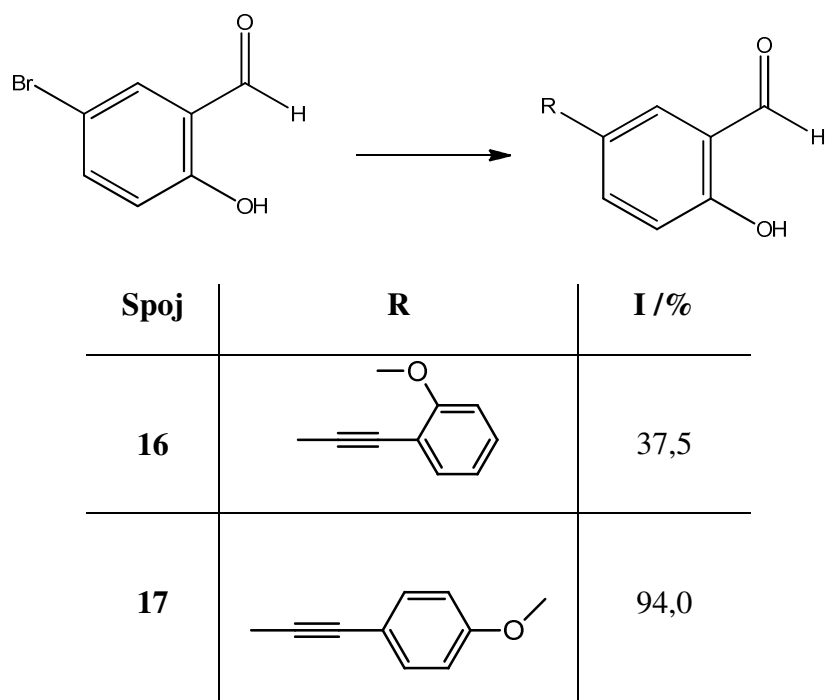
Shema 4. Sinteza 3-arilnih derivata kumarina Suzuki-jevom reakcijom s hidroksi i metoksifenilbornim kiselinama

Sinteza 3-alkinilnog derivata 7-hidroksi-4-metilkumarina **15** provedena je Stille-ovom reakcijom unakrsnog povezivanja s etiniltributilstananom u tetrahidrofuranu (shema 5.). Reakcija je provedena uz 2 paladijeva katalizatora, tetrakis(trifenilfosfin)paladij (*i*) i diklorobis(trifenilfosfin)paladij (*ii*) u tetrahidrofuranu, a produkti nisu uspješno izolirani.



Shema 5. Stille-ova reakcija sinteze 3-etinil-7-hidroksi-4-metilkumarina

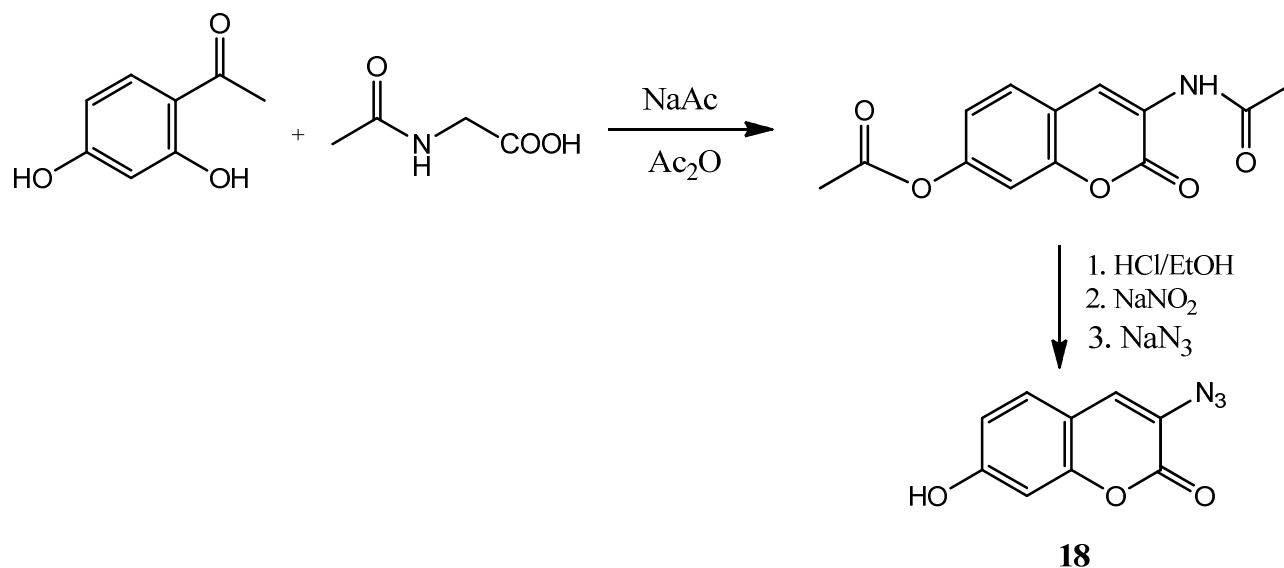
Sonogashira-inom reakcijom sintetizirani su i C-5 alkinilni derivati 5-brom-2-hidroksibenzaldehida **16** i **17** supstituirani orto- i para-metoksifenilnim supstuentom u prisutnosti Pd-katalizatora (tetrakis(trifenilfosfin)paladij(0)), kokatalizatora CuI i trietilamina u DMF-u s iskorištenjima od 37,5% i 94,0 %. Ti su spojevi korišteni kao prekursori za sintezu 6-supstituiranih 3-azidokumarina **19** i **20** (shema 6.)



Shema 6. Sonogashira-ina reakcija sinteze prekursora za sintezu azidokumarina

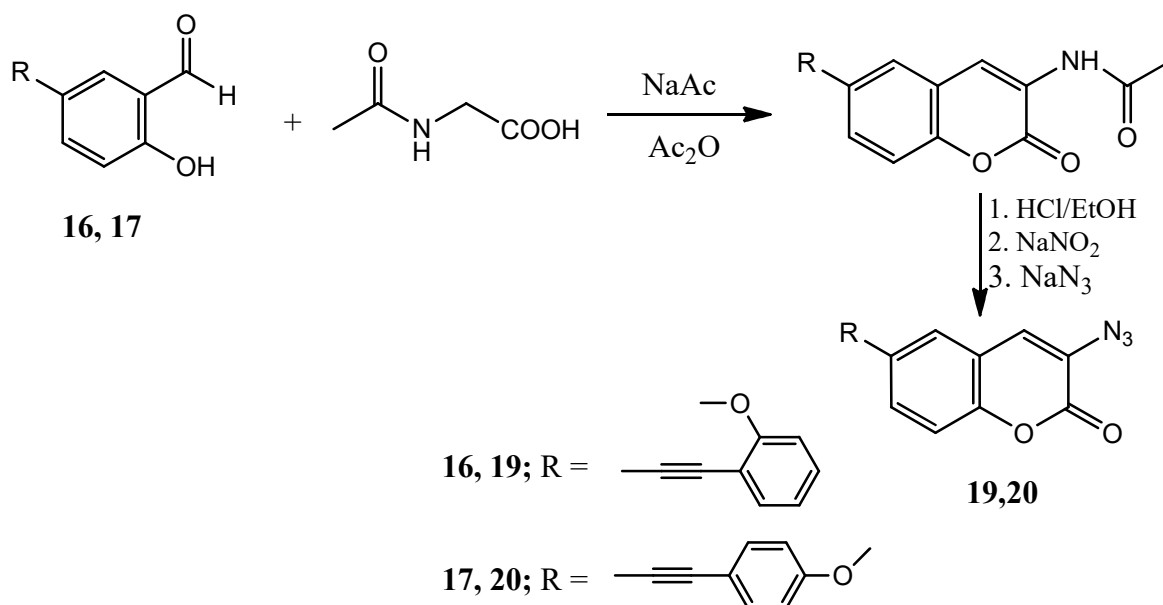
Kao prekursor za sintezu C-3 1,2,3-triazolil supstituiranih derivata kumarina pripremljen je spoj **18** u iskorištenju od 13,4% višestunjevitom reakcijom. Perkinovom sintezom pripremljen je kumarinski prsten iz aromatskog aldehida, natrijeva acetata i acetanhidrida uz prisutnost *N*-acetilglicina (shema 7.). Taj sintetski put uključivao je nastanak

i izolaciju acetamidnog derivata koji u smjesi konc. klorovodične kiseline i etanola hidrolizira u amin, a uz natrijev nitrit i natrijev acetat nastaje željeni azid **18**. Na isti su način sintetizirani i 3-azidokumarinski derivati s metoksifeniletinilnim supstuentima u položaju C-6 kumarina (**19** i **20**) s iskorištenjima od 46,7% i 60,2% (shema 8.).



Shema 7. Sinteza 3-azido derivata 7-hidroksikumarina (**18**)

Perkin-ovom reakcijom

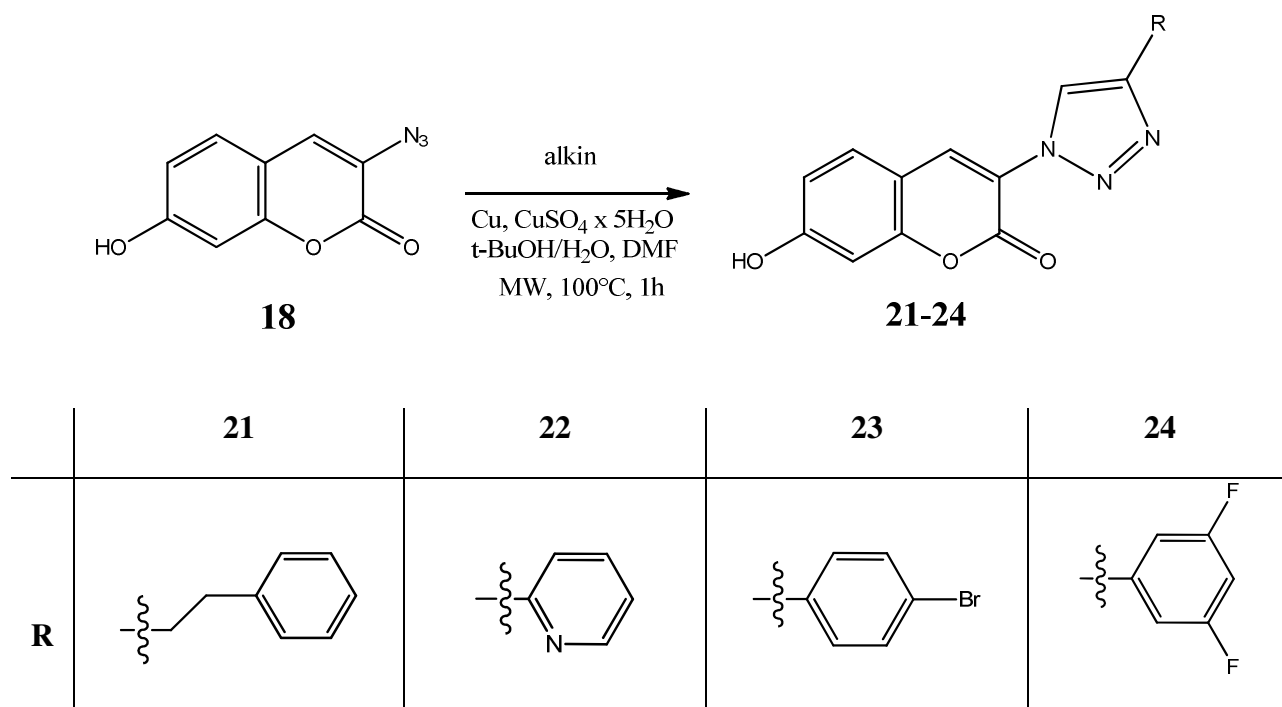


Shema 8. Sinteza 3-azido derivata 6-alkin supstituiranih kumarina

Perkin-ovom reakcijom

„Klik“ reakcijom 3-azido-7-hidroksikumarina i odgovarajućih alkina (2-etinilpiridin, 4-fenil-1-butin, 1-brom-4-etinilbenzen i 1-etinil-3,5-difluorbenzen) mikrovalnom sintezom u trajanju od 1 h i pri 100°C te 300 W pripremljeni su 1,2,3-triazolilni derivati 7-

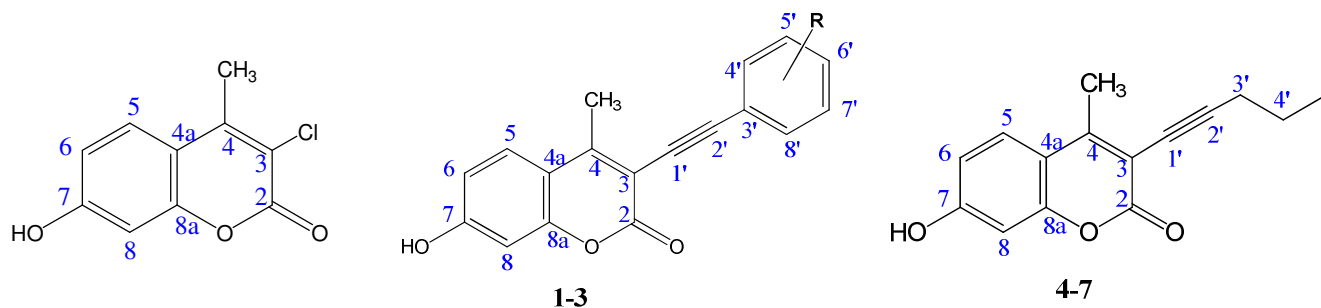
hidroksikumarina (shema 9.). Spoj **21** izoliran je u iskorištenju od 39 % , spoj **22** izoliran je u iskorištenju od 12,4 % , spoj **23** od čak 63,7 % , a spoj **24** u iskorištenju od 21,1 % . Sinteze su provedene uz bakar kao katalizator te bakrov (II) sulfat pentahidrat u smjesi otapala *tert*-butanol/voda i dimetilformamid.



Shema 9. Sinteza 1,2,3-triazolilnih derivata 7-hidroksikumarina
„Klik“ reakcijom

4.2. Strukturna karakterizacija spojeva ^1H NMR spektroskopijom

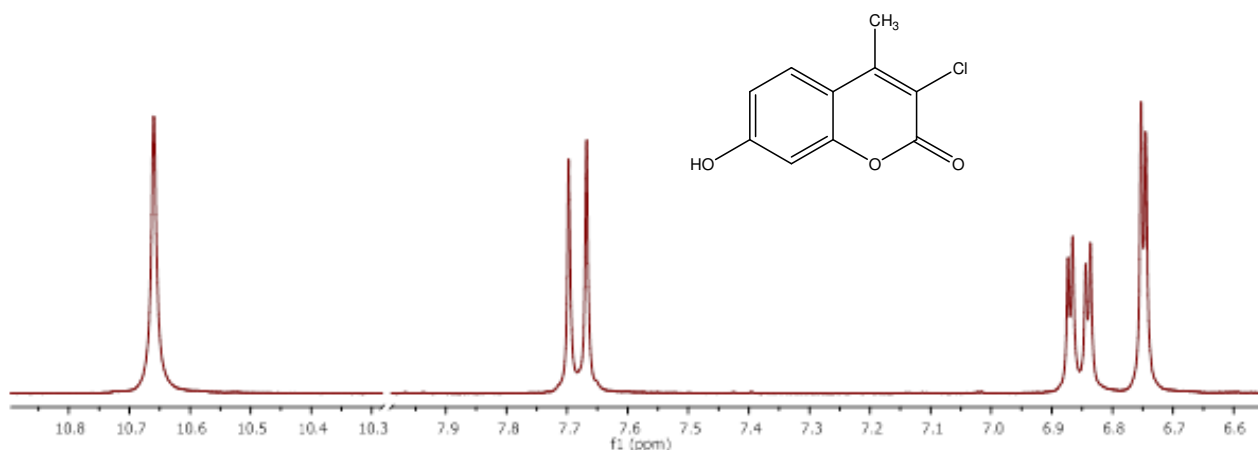
Asigniranje ^1H NMR spektara provedeno je na osnovu kemijskih pomaka, intenziteta signala, multipliciteta rezonancija te H-H konstanti sprege.



Spektri ^1H NMR spojeva **1-3** pokazuju signale protona kumarinskog prstena uz prisustvo protona arilnog supstituenta u položaju C-3 na temelju čega je potvrđeno da je

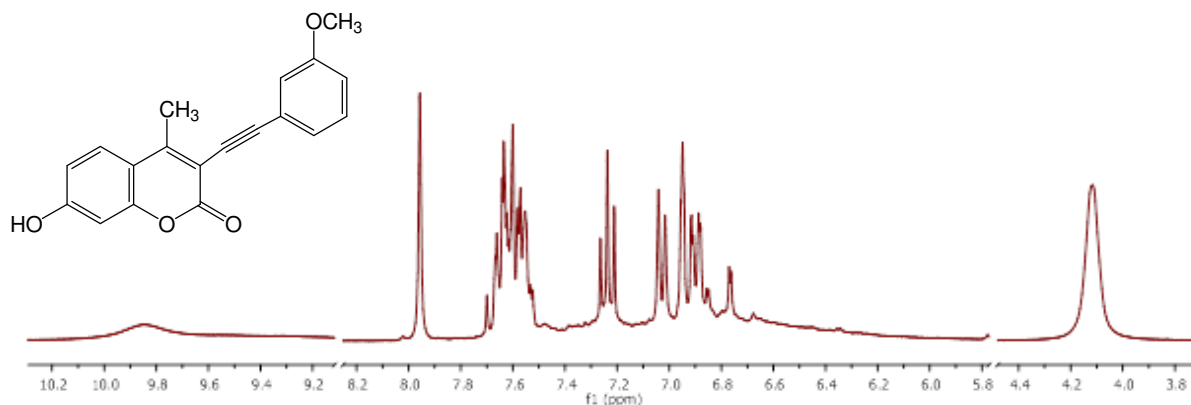
Sonogashira-inom reakcijom uveden preko etinilne prenosnice arilni supstituent u položaj C-3 kumarina.

U ^1H NMR spektru početnog spoja, 7-hidroksi-3-klor-4-metilkumarina (slika 1.) prisutni su signali: singlet za hidroksilni proton na 10,66 ppm intenziteta 1H, dublet intenziteta 1H za proton H-5 na 7,68 ppm ($J = 8,8$ Hz), dublet dubleta za proton H-6 na 6,85 ppm intenziteta 1H, dublet intenziteta 1H za proton H-8 na 6,75 ppm ($J = 2,3$ Hz) i signal za metilne protone $\sim 2,5$ ppm koji je prekriven signalom dimetilsulfoksida.



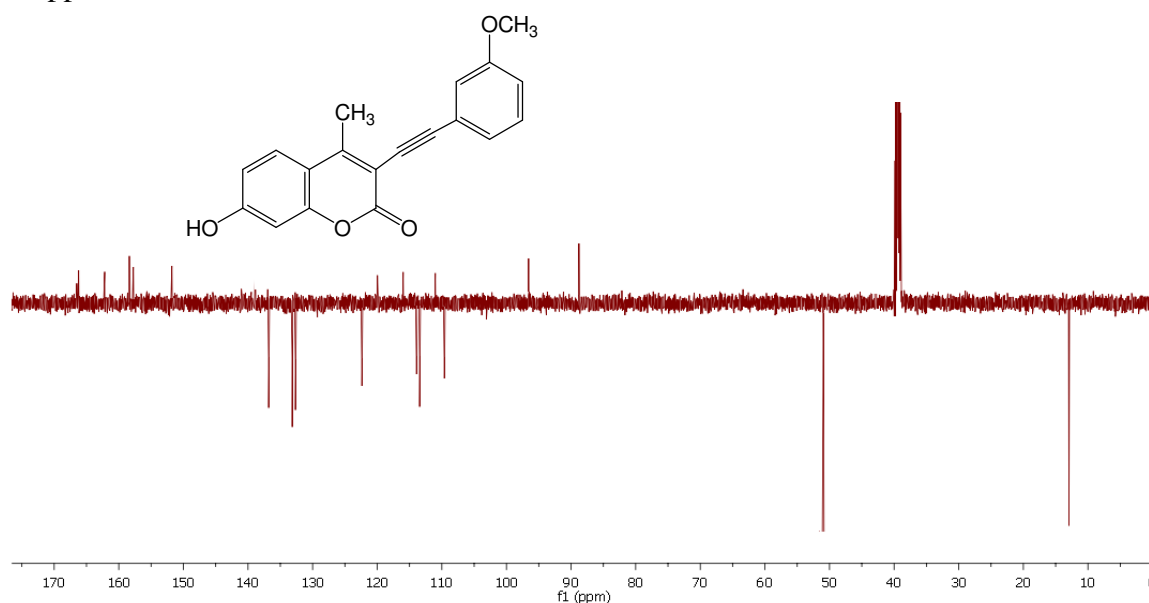
Slika 1. ^1H NMR spektar 7-hidroksi-3-klor-4-metilkumarina

Usporedbom ^1H NMR spektra početnog spoja (7-hidroksi-3-klor-4-metilkumarina) i spektra spoja **2** (slika 2.), uz signale za protone kumarinskog prstena prisutni su i novi signali za fenilne protone u aromatskom području (H-4' na 7,96 ppm; H-6' na 7,65 ppm; H-7' na 7,20 ppm; H-8' na 6,90 ppm) i u alifatskom području singlet intenziteta 3H za protone metoksi skupine na 4,12 ppm.



Slika 2. ^1H NMR spektar spoja **2**

U ^{13}C NMR spektru spoja **2** (slika 3.) prisutni su signali kumarinskog prstena u aromatskom području (C-4 na 164,8 ppm; C-7 na 162,2 ppm; C-2 na 158,8 ppm; C-8a na 151,6 ppm; C-4 na 132,4 ppm; C-4a na 120,0 ppm; C-6 na 113,1 ppm; C-3 na 111,3 ppm i C-8 na 110,0 ppm) i signal za metilni ugljik na 13,2 ppm. Pored signala kumarinskog prstena prisutni su i signali (o-metoksifenil)etinilnog supstituenta u položaju 3 kumarina: C-4' na 164,7 ppm, C-8' na 136,8 ppm, C-6' na 134,6 ppm, C-7' na 121,1 ppm, C-3' na 115,2 ppm, C-5' na 114,8 ppm, C-2' na 96,3 ppm, C-1' na 89,5 ppm i signal za ugljik metoksi skupine na 50,1 ppm.

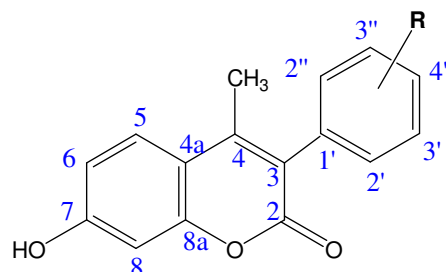


Slika 3. ^{13}C NMR spektar spoja **2**

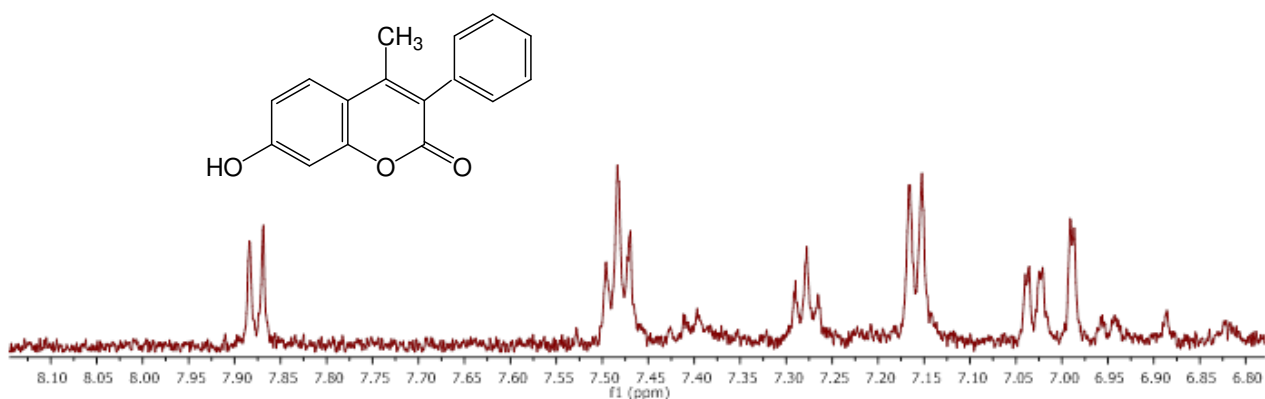
U ^1H NMR spektru spoja **1**, pored signala koji su prisutni u spektru spoja **2**, uočeni su i signali u alifatskom području koji odgovaraju p-pentilnom supstituentu fenilnog prstena (H-7' na 3,53 ppm, H-8' na 2,38 ppm, H-9',10' na 1,48 ppm i CH_3 na 0,81 ppm). ^1H NMRspektar spoja **3** pokazuje u odnosu na spektar spoja **2** razliku u multiplicitetima u aromatskom dijelu spektra. ^1H NMR spektri spojeva **4-7** uz signale za protone kumarinskog prstena pokazuju i signale u alifatskom dijelu spektra: signal intenziteta 2H na ~ 2,9 ppm za H-3' te prikrivene signale metilenskih protona na ~ 2 ppm kao i signal za metilne protone na ~ 0,85 ppm čime je potvrđeno uvođenje alkinskog supstituenta u položaj 3 kumarina.

U ^1H NMR spektrima spojeva **8-10** nisu uočeni odgovarajući dodatni signali za supstituent u položaju 3 kumarina iz čega se može zaključiti da spojevi **8-10** nisu sintetizirani.

Spektri ^1H NMR spojeva **11-14** pokazuju signale protona kumarinskog prstena uz prisustvo protona arilnog supstituenta u položaju C-3 na temelju čega je potvrđeno da je Suzuki-jevom reakcijom uveden u položaj C-3 kumarinskog prstena fenilni supstituent.

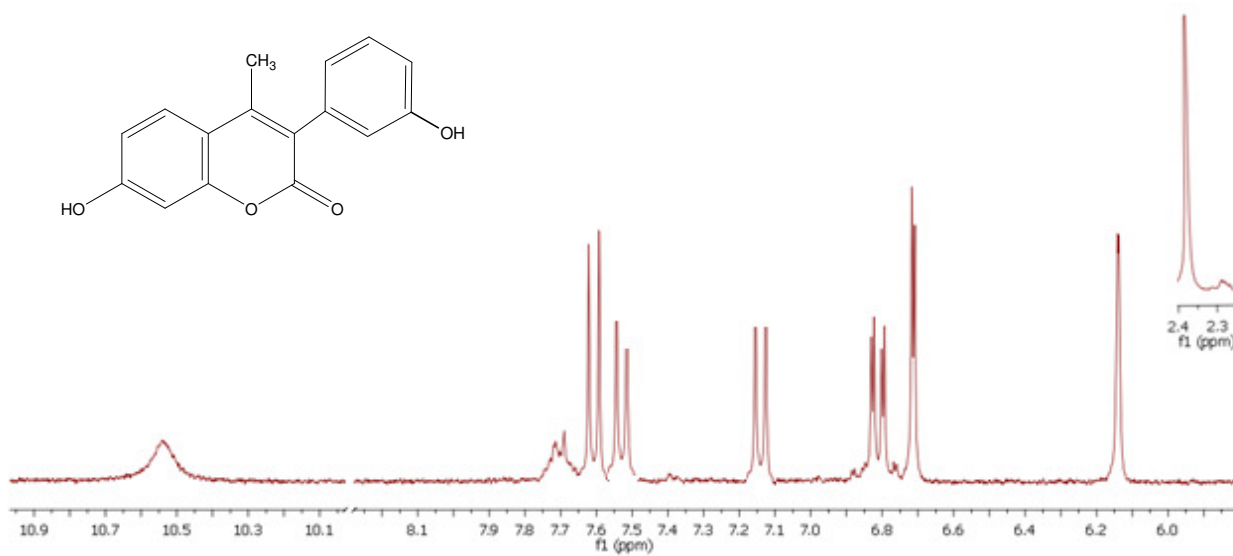
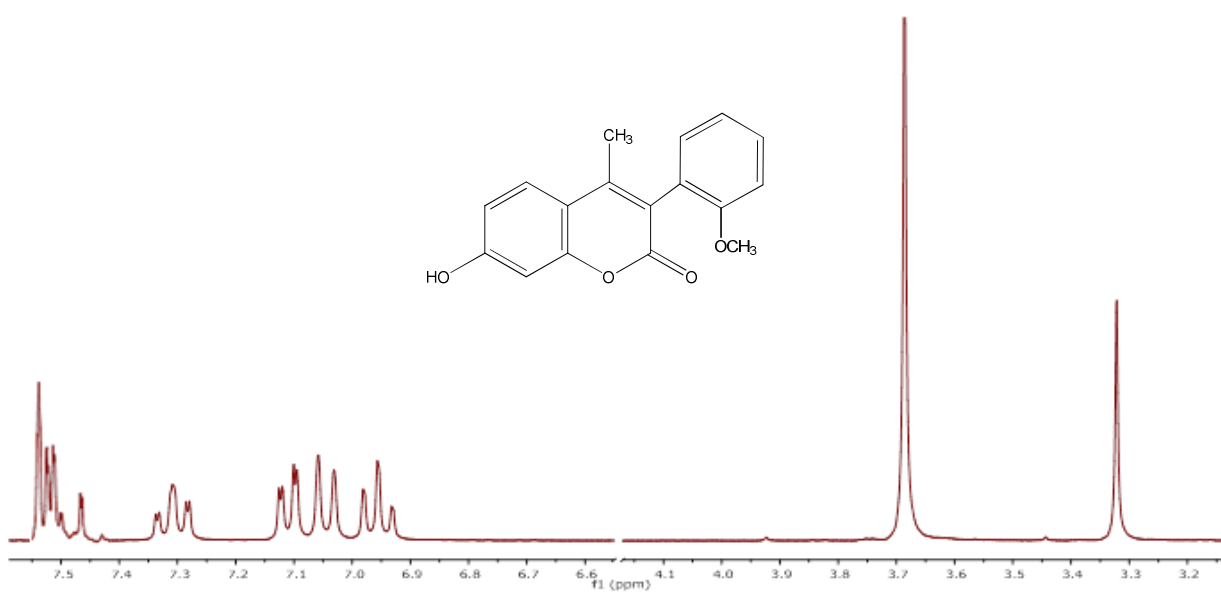


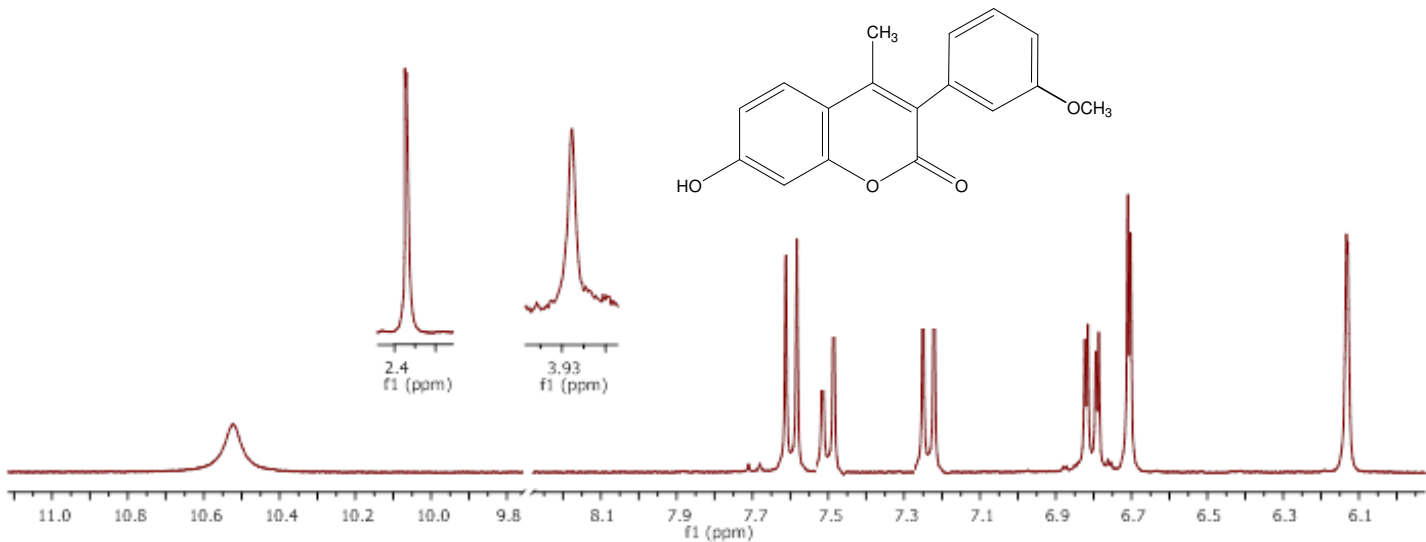
U ^1H NMR spektru spoja **11** (slika 4.) pored signala za protone kumarinskog prstena prisutni su signali za protone fenilnog supstituenta u položaju 3 kumarina u aromatskom području: triplet intenziteta 2H za H-3',3'' na 7,48 ppm; triplet intenziteta 1H za H-4' na 7,27 ppm i dublet intenziteta 2H za H-2',2'' na 7,16 ppm.



Slika 4. ^1H NMR spektar spoja **11**

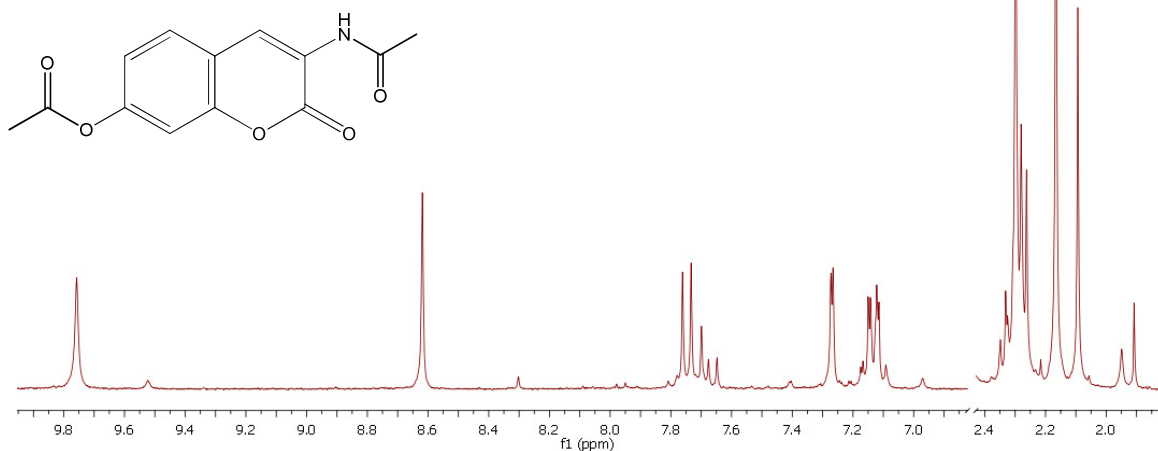
Spektri ^1H NMR spojeva **12-14** (slika 5.-7.) koji na fenilnom supstituentu imaju hidroksi- ili metoksi skupinu u usporedbi sa spektrom spoja **11** pokazuju dodatne signale za protone metoksi skupine (~3,9 ppm) uz istovremeni izostanak signala intenziteta 1H za proton benzenskog prstena i uz različite multiplicitete zbog kemijske neekvivalencije protona supstituiranog fenilnog prstena.

Slika 5. ^1H NMR spektar spoja **12**Slika 6. ^1H NMR spektar spoja **13**

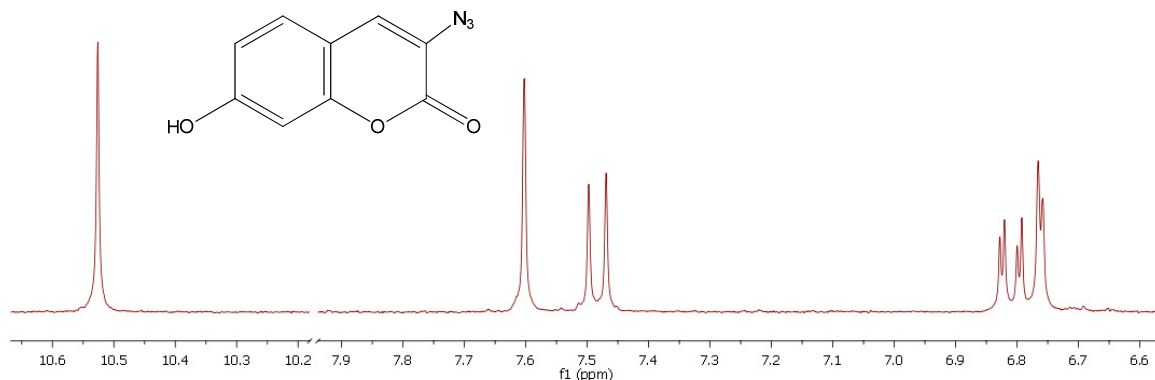
Slika 7. ^1H NMR spektar spoja **14**

^1H NMR spektar spojeva **16** i **17** pokazuje sljedeće signale: na $\sim 8,5$ ppm singlet intenziteta 1H za hidroksilni proton, na $\sim 8,1$ ppm singlet intenziteta 1H za H-6 proton benzenskog prstena, na $\sim 7,5$ ppm multiplete za fenilne protone početnog poja i protone uvedenog arilnog supstituenta te signale za metoksi i metilne skupine na $\sim 3,85$ i $2,63$ ppm.

U ^1H NMR spektru acetamidnog derivata kumarina (slika 8.) prisutni su signali za protone kumarinske jezgre čime je dokazan nastanak kumarinskog prstena Perkinovom ciklizacijom. U spektru su prisutni sljedeći signali: singlet za H-4 proton na 8,62 ppm intenziteta 1H, multiplet intenziteta 2H za H-5 protone na 7,70 ppm, dublet intenziteta 1H za H-8 proton na 7,27 ppm ($J = 2,1$ Hz) i multiplet na 7,14 ppm intenziteta 2H za H-6 proton. Pored navedenih signala, prisutan je i signal amidnog protona, singlet na 9,76 ppm intenziteta 1H te signali za metilne protone vezane na amidnoj i karboksilnoj skupini – dublet na 2,27 ppm intenziteta 3H ($J = 5,4$ Hz) i singlet na 2,17 ppm intenziteta 1H.

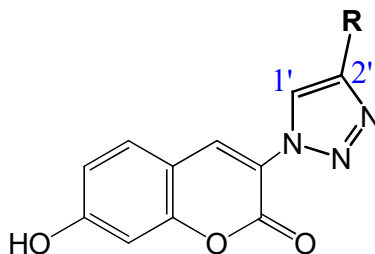
Slika 8. ^1H NMR spektar acetamidnog derivata kumarina

^1H NMR spektar spoja **18** (slika 9.) pokazuje pored signala za protone kumarinske jezgre i signal za hidroksilni proton 10,53 ppm, singlet intenziteta 1H, uz istovremeno odsutstvo signala za amidni proton i metilne protone vezane na amidnu i karboksilnu skupinu vidljive u spektru acetamidnog derivata kumarina. Time je dokazan nastanak spoja **18**.

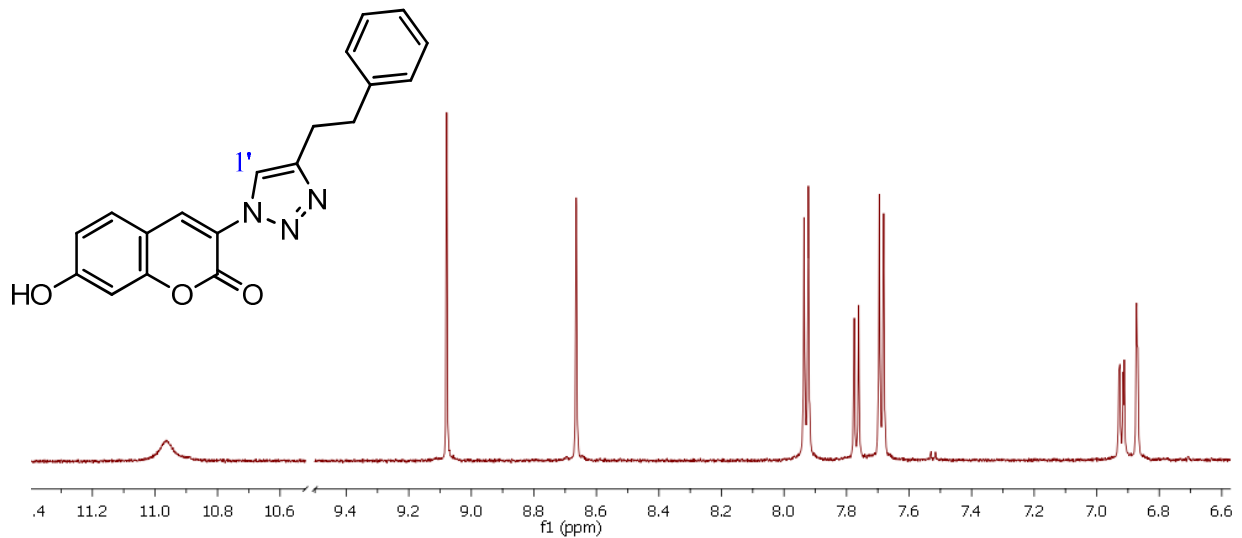


Slika 9. ^1H NMR spektar spoja **18**

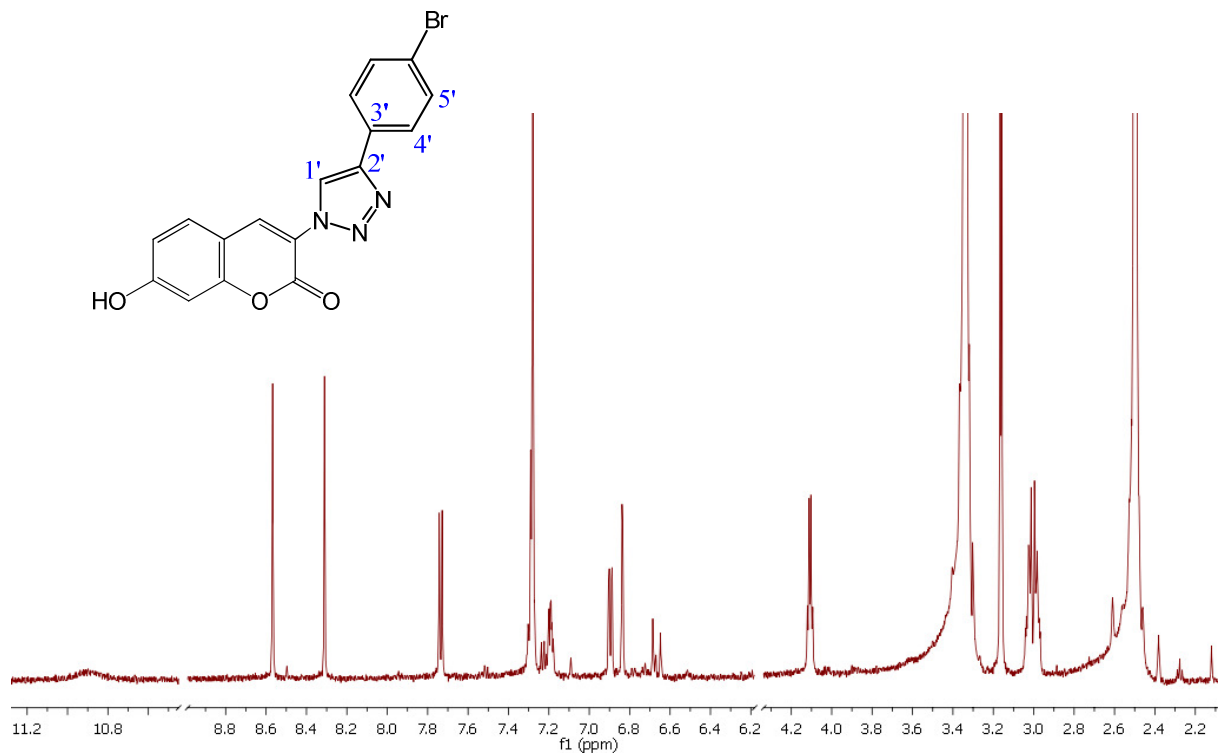
U ^1H NMR spektrima spojeva **21-24** pored signala kumarinskog prstena prisutan je signal za proton triazolnog prstena na ~9 ppm (H-1') te signali za fenilne protone ovisno o supstuentima na fenilnom prstenu na triazolu što se vidi na primjeru spojeva **21** i **23** (slike 10. i 11.).



U ^1H NMR spektru spoja **21** (slika 10.) vidljivi su uz signale za protone kumarinske jezgre, triazolnog prstena i fenilnog supstituenta i signali za metilenske protone u području od 4,23 ppm, 4,11 ppm, 3,16 ppm i 3,0 ppm.

Slika 10. ^1H NMR spektar spoja **21**

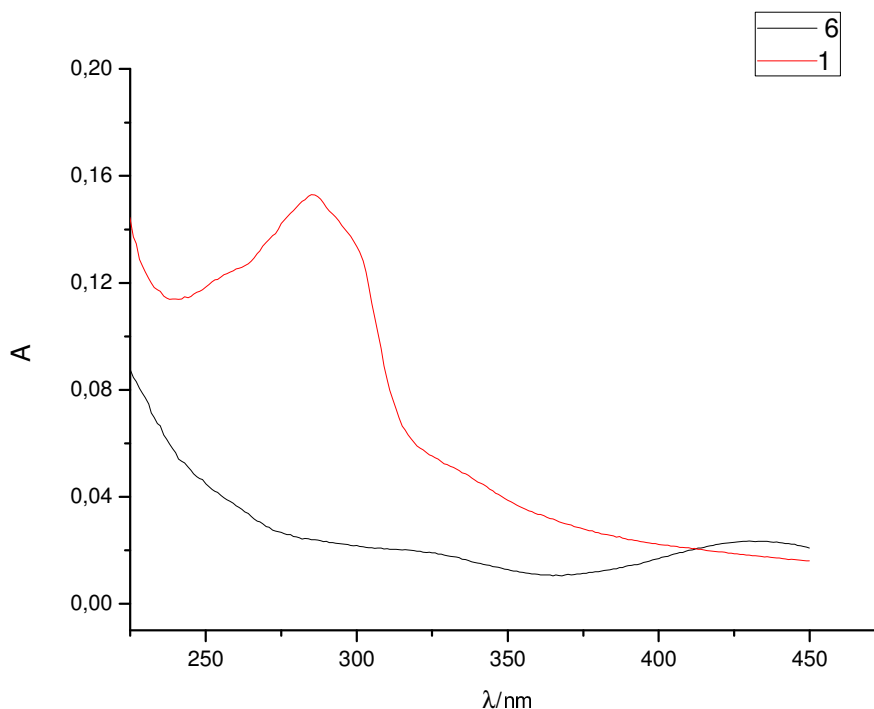
Vidljivo je iz ^1H NMR spektra spoja **23** (slika 11.) da su uz signale za protone kumarinske jezgre i triazolnog prstena prisutni protoni fenilnog supstituenta i to za H-4',4'' fenilne protone dublet na 7,93 ppm ($J = 8,5$ Hz) te za H-5',5'' protone dublet na 7,69 ppm ($J = 8,5$ Hz).

Slika 11. ^1H NMR spektar spoja **21**

4.3. Spektroskopska karakterizacija spojeva UV/Vis i fluorimetrijskom spektroskopijom

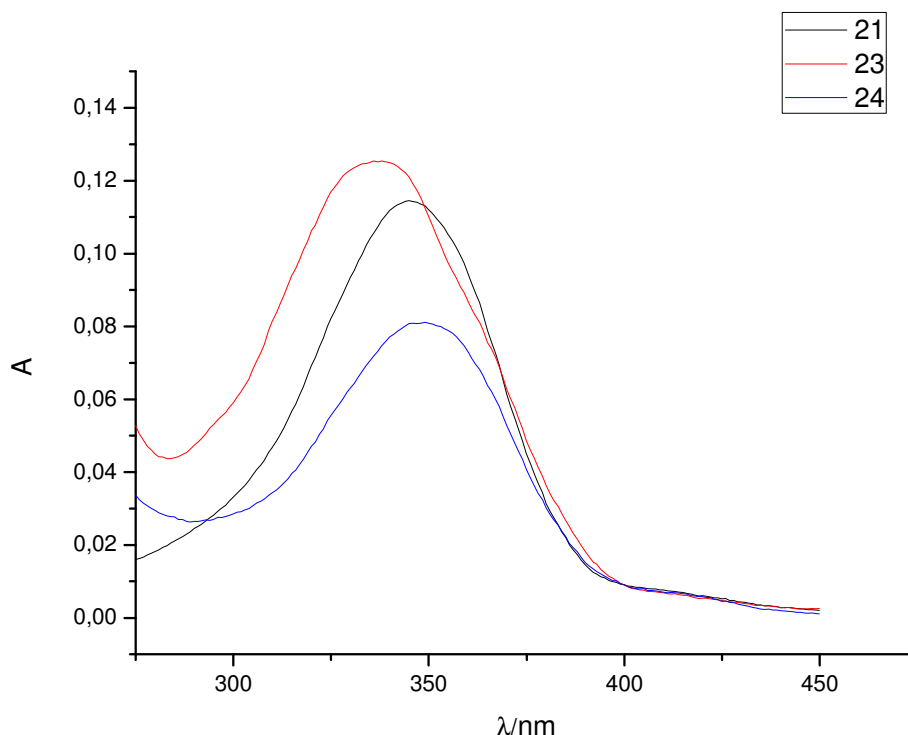
Derivati kumarina **1**, **6**, **12**, **21**, **23** i **34** spektroskopski su okarakterizirani UV/Vis i fluorimetrijskom spektroskopijom te su im određeni maksimumi apsorpcije, molarni ekstinkcijski koeficijenti i valne duljine emisije. Matične otopine ispitivanih spojeva priređene su u metanolu. UV/Vis spektri svih ispitivanih spojeva snimljeni su kod koncentracije $2,0 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$ u metanolu.

Spoj **1** pokazuje apsorpcijski maksimum na 285 nm, dok spoj **6** pokazuje maksimum apsorpcije na 434 nm (slika 12.). Uvođenje etinilne poveznice u položaj 3 kumarinske jezgre kod spojeva **1** i **6** uzrokuje pomake apsorpcijskih maksimuma prema nižim valnim duljinama (hipsokromni pomak) u usporedbi sa spektrom 7-hidroksi-3-klor-4-metilkumarina koji pokazuje maksimum apsorpcije pri 450 nm. Može se uočiti i pomak apsorpcijskog maksimuma prema nižim valnim duljinama kao i povećanje intenziteta apsorpcije, hiperkromni pomak, kod spoja **1** s feniletinilnim supstituentom u odnosu na spoj **6** s alkiletinilnim supstituentom.



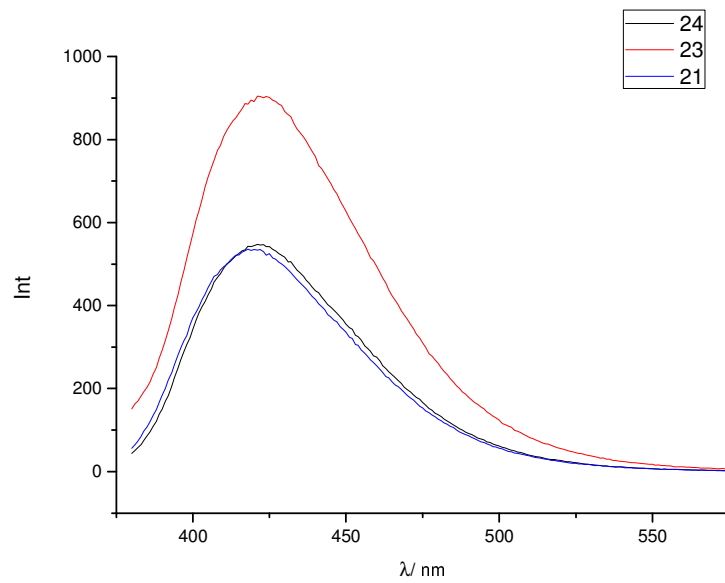
Slika 12. UV/Vis spektar spojeva **1** i **6** ($c = 2,0 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$)

1,2,3-triazolni derivati kumarina pokazuju slijedeće apsorpcijske maksimume: spoj **21** na 345 nm, spoj **23** na 338 nm, a spoj **24** na 349 nm (slika 13.). Iz spektara je vidljiv batokromni i hiperkromni pomak spojeva **21** i **24** u odnosu na spoj **23**.



Slika 13. UV/Vis spektar spojeva **21**, **23** i **24** ($c = 2,0 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$)

Fluorimetrijska spektroskopska ispitivanja provedena su zbog visoke osjetljivosti metode pri koncentraciji $1 \times 10^{-6} \text{ mol dm}^{-3}$ za spojeve **1**, **6**, **12**, **21**, **23** i **24** u metanolu. Otopine pripremljenih spojeva pobuđene su svjetlošću valne duljine ekscitacije (λ_{ex}) koja odgovara valnoj duljini maksimuma apsorpcije (λ_{max}). Na slici 14. prikazani su emisijski fluorimetrijski spektri spojeva **21**, **23** i **24** snimani pri danoj koncentraciji u metanolu. C-3 arilni derivat kumarina **12** kao i aril- i alkiletilnilni derivati **1** i **6** nisu pokazali značajnu fluorescenciju. Spoj **23** pokazuje najveći intenzitet emisije pri valnoj duljini 421 nm, spoj **24** pokazuje najveći intenzitet emisije pri valnoj duljini 423 nm, a spoj **21** pri 418 nm. Pri tome su u odnosu na valne duljine ekscitacije vidljivi pomaci u valnim duljinama emisije, tzv. Stokes-ov pomak za sva tri ispitana spoja od 70 do 80 nm.



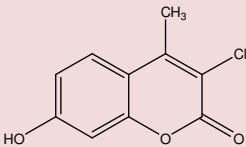
Slika 14. Emisijski spektri spojeva **21**, **23** i **24** ($c = 1 \times 10^{-6} \text{ mol dm}^{-3}$)

4.4. *In silico* analiza novopripremljenih spojeva

Predviđanja vjerojatnih bioloških meta i farmakoloških djelovanja (Tablice 1.-10.) izrađene su web-servisom PASS (<http://www.pharmaexpert.ru/passonline/index.php> [1.7. 2016.]) koji se temelji na identifikaciji substrukturnih značajki tipičnih za aktivne molekule.

Spektar bioloških djelovanja početnog spoja 7-hidroksi-3-klor-4-metilumarina i sintetiziranih spojeva **1-6**, **11-14**, **16**, **17** i **21-24** predviđen PASS-om prikazan je kao aktivnost s vjerojatnošću "da su aktivni" (Pa) i "da su neaktivni" (Pi). Najvjerojatnija predviđena aktivnost treba imati što veću vrijednost Pa i što manju vrijednost Pi.

Tablica 1. Najvjerojatnije ljudske i virusne biološke mete i učinci predviđeni PASS-om za 7-hidroksi-3-klor-4-metilumarin

					
Pa	Pi	aktivnost	Pa	Pi	aktivnost
0,925	0,007	CYP2C12 supstrat	0,765	0,014	Inhibitor ekspresije HIF1A
0,915	0,004	Inhibitor klordekon – reduktaze	0,746	0,005	UGT1A6 supstrat
0,880	0,006	Antiseboreik	0,738	0,002	CYP2A5 supstrat
0,856	0,006	Inhibitor aldehyd-oksidge	0,737	0,005	Opći anestetik
0,859	0,014	Inhibitor ubikvinol-citokrom-c-reduktaze	0,729	0,005	CYP2A4 supstrat
0,829	0,002	Akarikid (pesticid)	0,754	0,033	CYP2J supstrat
0,822	0,004	Inhibitor nitrat-reduktaze	0,741	0,024	Inhibitor permeabilnosti membrane
0,787	0,003	Antihelmitik	0,714	0,007	Inhibitor histidin-kinaze
0,786	0,004	Inhibitor tetrahidroksinaftalen-reduktaze	0,711	0,005	Inhibitor p-benzokinon-reduktaze
0,773	0,010	Inhibitor ekspresije JAK2	0,715	0,014	Inhibitor alkan 1 – monooksigenaze
0,771	0,009	Inhibitor arilsulfat-sulfotransferaze	0,708	0,009	CYP2B5 supstrat
0,767	0,010	Inhibitor faktora D	0,702	0,009	CYP2A6 supstrat

Tablica 2. Najvjerojatnije ljudske i virusne biološke mete i učinci predviđeni PASS-om za spojeve 1 i 2

Spoj 1			Spoj 2		
Pa	Pi	aktivnost	Pa	Pi	aktivnost
0,947	0,004	CYP2C12 supstrat	0,926	0,007	CYP2C12 supstrat
0,920	0,006	Agonist membranskog integriteta	0,921	0,006	Agonist membranskog integriteta
0,902	0,004	CYP2B supstrat	0,912	0,004	Inhibitor aldehid-oksidge
0,876	0,003	Antiseptik	0,899	0,008	Inhibitor aspulvinon-dimetilalil-transferaze
0,871	0,007	Antiekcematik	0,877	0,005	CYP2B substrate
0,853	0,005	CYP2B6 supstrat	0,876	0,007	Antiekcematik
0,845	0,003	Antimutagenik	0,865	0,004	CYP2A6 supstrat
0,834	0,003	Inhibitor otpuštanja 5-hidroksitriptamina	0,863	0,009	Inhibitor klordekon reduktaze
0,835	0,014	Inhibitor klordekon reduktaze	0,852	0,005	CYP2A supstrat
0,825	0,005	CYP2A6 supstrat	0,849	0,005	CYP1A supstrat

Tablica 3. Najvjerojatnije ljudske i virusne biološke mete i učinci predviđeni PASS-om za spojeve 3 i 4

Spoj 3			Spoj 4		
Pa	Pi	aktivnost	Pa	Pi	aktivnost
0,922	0,008	CYP2C12 supstrat	0,925	0,005	Agonist membranskog integriteta
0,919	0,007	Agonist membranskog integriteta	0,907	0,010	CYP2C12 supstrat
0,911	0,006	Inhibitor aspulvinon-dimetilalil-transferaze	0,863	0,005	Inhibitor aldehid-oksidge
0,900	0,004	Inhibitor aldehid-oksidge	0,833	0,014	Inhibitor klordekon reduktaze
0,892	0,005	Inhibitor klordekon reduktaze	0,825	0,027	Inhibitor aspulvinon-dimetilalil-transferaze
0,880	0,006	Antiekcematik	0,813	0,028	Inhibitor ubikvinol-citokrom-c-reduktaze
0,862	0,005	CYP2B supstrat	0,758	0,005	Antiseptik
0,851	0,004	CYP2A6 supstrat	0,728	0,005	Antimutagenik
0,834	0,005	CYP2A supstrat	0,720	0,003	Antagonist neurotransmitera
0,829	0,005	CYP1A supstrat	0,718	0,012	Inhibitor nitrat-reduktaze

Tablica 4. Najvjerojatnije ljudske i virusne biološke mete i učinci predviđeni PASS-om za spojeve **5** i **6**

5			6				
Spoj	Pa	Pi	aktivnost	Spoj	Pa	Pi	aktivnost
0,938	0,005		CYP2C12 supstrat	0,938	0,005		CYP2C12 supstrat
0,891	0,013		Agonist membranskog integriteta	0,891	0,013		Agonist membranskog integriteta
0,841	0,007		Inhibitor aldehid-oksidade	0,841	0,007		Inhibitor aldehid-oksidade
0,824	0,003		Antimutagenik	0,824	0,003		Antimutagenik
0,828	0,024		Inhibitor ubikvinol-citokrom-c-reduktaze	0,828	0,024		Inhibitor ubikvinol-citokrom-c-reduktaze
0,820	0,017		Inhibitor klordekon reduktaze	0,820	0,017		Inhibitor klordekon reduktaze
0,802	0,005		Inhibitor nitrat-reduktaze	0,802	0,005		Inhibitor nitrat-reduktaze
0,809	0,031		Inhibitor aspulvinon-dimetilalil-transferaze	0,809	0,031		Inhibitor aspulvinon-dimetilalil-transferaze
0,767	0,007		Regulator metabolizma lipida	0,767	0,007		Regulator metabolizma lipida
0,778	0,023		Antiekcematik	0,778	0,023		Antiekcematik

Tablica 5. Najvjerojatnije ljudske i virusne biološke mete i učinci predviđeni PASS-om za spojeve **11** i **12**

11			12				
Spoj	Pa	Pi	aktivnost	Spoj	Pa	Pi	aktivnost
0,954	0,004		CYP2C12 supstrat	0,957	0,003		CYP2C12 supstrat
0,930	0,004		Inhibitor aspulvinon-dimetilalil-transferaze	0,920	0,005		Inhibitor aspulvinon-dimetilalil-transferaze
0,922	0,006		Agonist membranskog integriteta	0,910	0,009		Agonist membranskog integriteta
0,890	0,005		Inhibitor aldehid-oksidade	0,900	0,004		Inhibitor aldehid-oksidade
0,878	0,005		CYP1A supstrat	0,881	0,007		Inhibitor klordekon reduktaze
0,875	0,007		Inhibitor ekspresije HIF1A	0,877	0,005		CYP1A supstrat
0,869	0,009		Inhibitor klordekon reduktaze	0,878	0,007		Inhibitor ekspresije HIF1A
0,866	0,008		Antiseboreik	0,872	0,004		UGT1A6 supstrat
0,857	0,004		UGT1A6 supstrat	0,869	0,007		Antiseboreik
0,845	0,004		CYP1A1 supstrat	0,849	0,004		CYP1A1 supstrat

Tablica 6. Najvjerojatnije ljudske i virusne biološke mete i učinci predviđeni PASS-om za spojeve **13** i **14**

13			14				
Spoj	Pa	Pi	aktivnost	Spoj	Pa	Pi	aktivnost
0,947	0,004		CYP2C12 supstrat	0,948	0,004		CYP2C12 supstrat
0,924	0,004		Inhibitor aspulvinon-dimetilalil-transferaze	0,943	0,003		Inhibitor aspulvinon-dimetilalil-transferaze
0,919	0,007		Agonist membranskog integriteta	0,912	0,004		Inhibitor aldehid-oksidge
0,902	0,004		Inhibitor aldehid-oksidge	0,898	0,005		Inhibitor klordekon reduktaze
0,886	0,005		CYP1A supstrat	0,889	0,005		CYP1A supstrat
0,863	0,004		UGT1A6 supstrat	0,895	0,012		Agonist membranskog integriteta
0,867	0,009		Inhibitor klordekon reduktaze	0,856	0,004		UGT1A6 supstrat
0,858	0,008		Inhibitor ekspresije HIF1A	0,850	0,004		CYP1A1 supstrat
0,846	0,005		CYP2B6 supstrat	0,846	0,005		CYP1A2 supstrat
0,842	0,005		CYP1A2 supstrat	0,849	0,009		Inhibitor ekspresije HIF1A

Tablica 7. Najvjerojatnije ljudske i virusne biološke mete i učinci predviđeni PASS-om za spojeve **16** i **17**

16			17				
Spoj	Pa	Pi	aktivnost	Spoj	Pa	Pi	aktivnost
0,883	0,012		Inhibitor aspulvinon-dimetilalil-transferaze	0,915	0,005		Inhibitor aspulvinon-dimetilalil-transferaze
0,836	0,022		Inhibitor CDP-glicerol-glicerofosfat-transferaze	0,854	0,006		Inhibitor aldehid-oksidge
0,819	0,002		Inhibitor aminomukonat-semialdehid-dehidrogenaze	0,856	0,018		Inhibitor CDP-glicerol-glicerofosfat-transferaze
0,818	0,015		Antiekcematik	0,839	0,011		Antiekcematik
0,773	0,009		Agonist apoptoze	0,824	0,006		Agonist apoptoze
0,771	0,011		Inhibitor aldehid-oksidge	0,817	0,001		Inhibitor orcinol-2-monooksigenaze
0,760	0,016		Inhibitor feruloil-esteraze	0,822	0,016		Inhibitor klordekon reduktaze
0,731	0,034		Inhibitor klordekon reduktaze	0,790	0,002		Inhibitor aminomukonat-semialdehid-dehidrogenaze

Tablica 8. Najvjerojatnije ljudske i virusne biološke mete i učinci predviđeni PASS-om za spojeve **21** i **22**

21			22				
Spoj	Pa	Pi	aktivnost	Spoj	Pa	Pi	aktivnost
0,773	0,015		Antineoplastik	0,793	0,013		Antineoplastik
0,712	0,005		Antineoplastikk (rak dojke)	0,702	0,005		Inhibitor p-benzokinon-reduktaze
0,681	0,010		Inhibitor protonskih pumpi	0,669	0,011		Inhibitor protonskih pumpi

0,646	0,066	CYP2C12 supstrat	0,660	0,004	Inhibitor aril-alkohol-dehidrogenaze
0,563	0,013	CYP2A11 supstrat	0,658	0,007	Antineoplastik (rak dojke)
0,596	0,062	Inhibitor klordekon reduktaze	0,665	0,016	Inhibitor peroksidaze
0,542	0,011	Interleukin 2 agonist	0,610	0,035	Inhibitor dehidro-L-gulonat-dekarboksilaze
0,604	0,074	Agonist membranskog integriteta	0,561	0,019	CYP2F1 supstrat

Tablica 9. Najvjerojatnije ljudske i virusne biološke mete i učinci predviđeni PASS-om za spojeve **23** i **24**

Spoj		23	Spoj		24
Pa	Pi	aktivnost	Pa	Pi	aktivnost
0,811	0,010	Antineoplastik	0,783	0,014	Antineoplastik
0,741	0,005	Antineoplastik (rak dojke)	0,673	0,007	Antineoplastik (rak dojke)
0,696	0,065	Inhibitor aspulvinon-dimetilalil-transferaze	0,606	0,023	Inhibitor protonskih pumpi
0,572	0,010	UGT1A6 supstrat	0,599	0,034	Inhibitor ekspresije HIF1A
0,583	0,029	Inhibitor protonskih pumpi	0,536	0,015	CYP2A11 supstrat
0,552	0,014	CYP2A11 supstrat	0,528	0,023	Stimulans vezanja 5-hidroksitriptamina
0,560	0,021	Pojačivač ekspresije HMGCS2	0,481	0,023	Inhibitor p-benzokinon-reduktaze
0,519	0,018	Inhibitor p-benzokinon-reduktaze	0,474	0,033	Inhibitor histidin-kinaze

Usporedbom spektara predviđenih bioloških djelovanja PASS-om sintetiziranih spojeva **1-6**, **11-14**, **16**, **17** i **21-24** (Tablica 10.) može se uočiti da spojevi **11-14** pokazuju veliku vjerojatnost aktivnosti ($>0,89$) kao supstrati CYP2C12, i kao agonisti membranskog integriteta, dok spojevi **1-6** pokazuju visoku vjerojatnost aktivnosti i kao inhibitori aldehid-oksidade ($>0,85$). U odnosu na početni spoj 7-hidroksi-3-klor-4-metilkumarin vidi se dobro slaganje s aktivnostima spojeva **1-6**. Nadalje, spojevi **16** i **17** pokazuju veliku vjerojatnost ($>0,8$) za djelovanje kao inhibitori aspulvinon-dimetilalil-transferaze te kao antiokcematici i agonisti apoptoze. Spojevi **21-24** pokazuju dobru vjerojatnost aktivnosti kao antineoplastici ($>0,65\%$) te kao inhibitori protonskih pumpi ($>0,5\%$).

Tablica 10. Najvjerojatnije ljudske i virusne biološke mete i učinci predviđeni PASS-om za početni spoj i spojeve **1-6**, **11-14**, **16**, **17** i **21-24**

Spoj	Aktivnost	Pa	Pi
7-hidroksi-3-klor-4-metilkumarin	CYP2C12 supstrat	0,925	0,007
	Inhibitor aldehid-oksidge	0,856	0,006
1-6	CYP2C12 supstrat	>0,920	<0,010
	Agonisti membranskog integriteta	>0,890	<0,013
	Inhibitori aldehid oksidge	>0,840	<0,007
11-14	CYP2C12 supstrat	>0,940	<0,004
	Agonisti membranskog integriteta	>0,895	<0,012
16, 17	Inhibitori aspulvinon-dimetilalil-transferaze	>0,880	<0,012
	Antiekcematici	>0,810	<0,015
	Agonisti apoptoze	>0,770	<0,009
21-24	Antineoplastici	>0,770	<0,015
	Inhibitori protonske pumpe	>0,580	<0,029

Može se zaključiti kako najbolju vjerojatnost aktivnosti uz najveće vrijednosti Pa, ali i niske vrijednosti Pi pokazuju spojevi **11-14** kao CYP2C12 supstrati, dok spojevi **21-24** pokazuju niže vrijednosti Pa i više vrijednosti Pi i to kao antineoplastici i inhibitori protonske pumpe.

5. ZAKLJUČCI

- Sonogashira-inom reakcijom unakrsnog povezivanja 7-hidroksi-3-klor-4-metilkumarina s odgovarajućim terminalnim alkinima uz Pd-katalizator i CuI sintetizirani su 3-ariletinil-**(1-3)** i 3-alkinil-7-hidroksi-4-metilni derivati kumarina **(4-7)**.
- Analizom ^1H NMR spektara spojeva **8-10** utvrđeno je da Sonogashira-inom reakcijom nisu pripremljeni ciljani spojevi.
- Suzuki-jevom reakcijom 7-hidroksi-3-klor-4-metilkumarina s odgovarajućim arilbornim kiselinama uz Pd(II)-acetat i $(\text{PPh}_3)_4\text{Pd}$ kao katalizator u položaj 3 kumarinskog prstena uvedeni su arilni supstituenti pri čemu su pripremljeni spojevi **11-14**.
- Stille-ovom reakcijom 7-hidroksi-3-klor-4-metilkumarina s tributiletinstananom uz Pd-katalizator nije pripremljen ciljani spoj **15** s etinskim supstituentom u položaju C-3 kumarina.
- Sonogashira-inom reakcijom 5-brom-2-hidroksibenzaldehida s odgovarajućim arilnim terminalnim alkinima sintetizirani su spojevi **16** i **17** kao prekursori za Perkinovu ciklizaciju kojom su pripremljeni 3-azido-6-aril kumarinski derivati **19** i **20**.
- 3-azido-7-hidroksikumarin **18** pripremljen je Perkinovom reakcijom 2,4-dihidroksibenzaldehida s *N*-acetilglicinom te je potom *in-situ* deacetiliranjem s HCl-om i nitriranjem dobiven 3-nitro-7-hidroksikumarin koji je u konačnici preveden s NaN_3 u azid.
- „Klik“ reakcijom 3-azido-7-hidroksikumarina (**18**) s odgovarajućim arilnim terminalnim alkinima uz Cu kao katalizator sintetizirani su 1,2,3-triazolni derivati kumarina **21-24**.
- Strukture novopripremljenih spojeva potvrđene su ^1H NMR spektroskopijom.
- Fluorimetrijskom spektroskopijom derivata kumarina **1, 6, 12, 21, 23** i **24** utvrđeno je da uvođenje 1,2,3-triazolnog prstena u položaj 3 kumarina povećava intenzitet emisije i uzrokuje Stokes-ove pomak za ~ 70 nm.
- *In silico* analiza (PASS) ukazuje da svi spojevi pokazuju veliku vjerojatnost aktivnosti kao CYP2C12 supstrati i agonisti membranskog integriteta, a djeluju i kao antiokcematici i antineoplastici.
- Novosintetiziranim spojevima biti će ispitana antioksidativna i antitumorska aktivnost na tumorskim staničnim linijama porijeklom iz čovjeka.

6. LITERATURA

1. Y. Yang, Q.-W. Liu, Y. Shi, Z.-G. Song, Y.-H. Jin, Z.-Q. Liu, *European Journal of Medicinal Chemistry* 2014 (**84**) 42.
2. K. Benci, L. Mandić, T. Suhina, M. Sedić, M. Klobučar, S. Kraljević Pavelić, K. Pavelić, K. Wittine, M. Mintas, *Molecules* 2012 (**17**) 11010.
3. Y. B. Kwon, J. H. Park, B. R. Choi, H. S. Kim, C. M. Yoon, *Bull. Korean Chem. Soc.* 2011 (**32**) 2897.
4. A. A. Zen, J. W. Aylott, W. C. Chan, *Tetrahedron Letters* 2014 (**55**) 5521.
5. R. Cooper, G. Nicola, *Natural Products Chemistry, Sources, Separations, and Structures* 2015, 65.
6. P. K. Jain, H. Joshi, *J.App.Pharm.Sci.* 2012 (**02**) 236.
7. T.W. Graham Solomons, Craig B. Fryhle, *Organic Chemistry, 10 ed*,
8. L. D. Quin, J. Tyrell, *Fundamentals of Heterocyclic Chemistry: Importance in Nature and in the Synthesis of Pharmaceuticals*, Wiley 2010.
9. J.A. Joule i K. Millis, *Heterocyclic chemistry*, 5th ed. 2010., 229.
10. T. Eicher, S. Hauptmann, *The chemistry of heterocycles*, 2nd ed. 2003., 247.
11. F. Borges, F. Roleira, N. Milhazes, L. Santana, E. Uriarte, *Curr. Med. Chem.* 2005 **12**, 887.
12. C. Barnard, *Platinum Metals Rev.* 2008 (**1**) 38.
13. F. G. Medina, J. G. Marrero, M. Macias-Alonso, M. C. Gonzáles, I. Córdova-Guerrero, A. G. Teissier García, S. Osegueda-Robles, *Nat. Prod. Rep.* 2015 (**32**) 1472.
14. M. Molnar, M. Čačić, *Croat. J. Food Sci. Technol.* 2011 (**3**) 55.
15. M. V. Potapovich, D. I. Metelitsa, O. I. Shadyro, *Applied Biochemistry and Microbiology* 2012 (**48**) 250.
16. M. Rajesh Patel, J. Natvar Patel, *Journal of Advanced Pharmacy Education & Research* 2011 (**1**) 52.
17. S. Stanchev, V. Hadjimitova, T. Traykov, T. Boyanov, I. Manolov, *Eur. J. Med. Chem.* 2009 (**44**) 3077.
18. F. Pérez-Cruz, S. Serra, G. Delogu, M. Lapier, J. D. Maya, C. Olea-Azar, L. Santana, E. Uriarte, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2012 (**22**) 5569.
19. N. Vukovic, S. Sukdolak, S. Solujic, N. Nicifirovic, *Food Chemistry*, 2010 (**120**) 1011.

20. J. B. Veselinović, A. M. Veselinović, Ž. J. Vitnik, V. D. Vitnik, G. M. Nikolić, *Chemico-Biological Interactions* 2014 (**214**) 49.
21. R. Krishan Arora, N. Kaur, Y. Bansal, G. Bansal, *Acta Pharm. Sin. B* 2014 (**4**) 368.
22. R. S. de Araújo, F. Q. Guerra, E. de O. Lima, C. A. de Simone, J. F. Tavares, L. Scotti, M. T. Scotti, T. M. de Aquino, R. O. de Moura, F. J. Mendonça, J. M. Barbosa-Filho, *Int. J. Mol. Sci.* 2013 (**14**) 1293.
23. P. Anand, B. Singh, N. Singh, *Bioorg. Med. Chem.* 2012 (**20**) 1175.
24. A. Thakur, R. Singla, V. Jaitak, *European Journal of Medicinal Chemistry* 2015 (**101**) 476.
25. M. Adamczyk, M. Cornwell, J. Huff, S. Rege, T. V. S. Rao, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 1997 (**7**) 1985.
26. T. Moiya, *Buul. Chem. Soc. Jpn.* 1983 (**56**) 6.
27. B. Šarkanj, M. Molnar, M. Čačić, L. Gille, *Food Chemistry*, 2013 (**139**) 488.
28. N. Nagy, H. F. Kuipers, A. R. Frymoyer, H. D. Ishak, J. B. Bollyky, T. N. Wight, P. L. Bollyky, *Front. Immunol.* 2015 (**6**) 123.
29. S. Yoshihara, A. Kon, D. Kudo, H. Nakazawa, I. Kakizaki, M. Sasaki, M. Endo, K. Takagaki, *FEBS Letters* 2005 (**579**) 2722.
30. I. Kakizaki, K. Kojima, K. Takagaki, M. Endo, R. Kannagi, M. Ito, Y. Maruo, H. Sato, T. Yasuda, S. Mita, K. Kimata, N. Itano, *Journal of Biological Chemistry* 2004 (**279**) 33281.
31. H. Morohashi, A. Kon, M. Nakai, M. Yamaguchi, I. Kakizaki, S. Yoshihara, M. Sasaki, K. Takagaki, *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2006 (**345**) 1454.
32. F. Piccioni, M. Malvicini, M. G Garcia, A. Rodriguez, C. Atorrasagasti, N. Kippes, I. T Piedra Buena, M. M Rizzo, J. Bayo, J. Aquino, M. Viola, A. Passi, L. Alaniz, G. Mazzolini, *Glycobiology* 2012 (**22**) 400.
33. T. J. Yates, L. E. Lopez, S. D. Lokeshwar, N. Ortiz, G. Kallifatidis, A. Jordan, K. Hoye, N. Altman, V. B. Lokeshwar, *J. Natl. Cancer Inst.* 2015 (**107**)
34. A. Dongamanti, V. L. Bommidi, G. Arram, R. Sidda, *Heterocycl. Commun.* 2014 (**20**) 293.
35. J. A. Key, S. Koh, Q. K. Timerghazin, A. Brown, C. W. Cairo, *Dyes and Pigments* 2009 (**82**) 196.
36. T. Shiraishi, T. Saito, H. Kagechika, T. Hirano, 2014 (**55**) 6784.
37. F. Borges, F. Roleira, N. Milhazes, L. Santana, E. Uriarte, *Current Medicinal Chemistry* 2005 (**12**) 887.

38. Z. Wang, *Comprehensive Organic Name Reactions and Reagents*, 2010., 2160.
39. http://shodhganga.inflibnet.ac.in/bitstream/10603/7035/8/08_chapter%202.pdf (18.6. 2016. 10:00)
40. <http://www.organic-chemistry.org/namedreactions/pechmann-condensation.shtml> (20.6.2016. 11:00)
41. S. M. Setha, N. M. Shah, *The chemistry of coumarins*, 1944.
42. D. M. Young, J. J. C. Welker, K. M. Doxsee, *Journal of Chemical Education* 2011 (**88**)
43. T. Nalli, *Experiment #9. Coumarin Synthesis Using Enolate Chemistry. A Microwave-Assisted Knoevenagel Condensation*, Winona State University, 2006.
44. P. Verdía, F. Santamarta, E. Tojo, *Molecules* 2011 (**16**) 4379.
45. M. S. Reddy, N. Thirupathi, M. Haribab, *Beilstein J. Org. Chem.* 2013 (**9**) 180-.
46. D. Astruck, *Organometallic Chemistry and catalysis*, 2007.
47. R. P. Irwin, *Organometallic chemistry research perspectives*, 2007.
48. <http://www.chem.ucalgary.ca/courses/350/Carey5th/Ch14/ch14-0.html> (20.6.2016. 13:00)
49. <https://www2.chemistry.msu.edu/faculty/reusch/virttxtjml/orgmetal.htm> (21.6.2016. 9:00)
50. http://alpha.chem.umb.edu/chemistry/ch611/documents/Lec21OrganometalliccatalysisII_001.pdf (21.6.2016. 11:00)
51. R. Jana, T. P. Pathak, M. S. Sigman, *Chem. Rev.* 2011 (**111**) 1417.
52. A. F. P. Biajoli, C. S. Schwalm, J. Limberger, T. S. Claudino, A. L. Monteiro, *J. Braz. Chem. Soc.* 2014 (**25**) 2186.
53. Megha sahu, P. Sapkale, *International Journal of Pharmaceutical and Chemical Sciences* 2013 (**2**) 1159.
54. http://www.users.miamioh.edu/gungbw/CHM254_html/pdfs/name_reactions2.pdf (22.6.2016. 16:00)
55. R. Chinchilla, C. Najera, *Chem. Soc. Rev.* 2011. (**40**) 5084.
56. L. A. Agrofoglio, I. Gillaizeau, Y. Saito, *Chem. Rev.* 2003 (**103**) 1875.
57. R. F. Heck, *J. Am. Chem. Soc.*, 1968 (**90**) 5518.
58. McGuigan, C., Balzarini, J., *Antiviral Res.* 2006 (**71**) 149.
59. J. Soloduch, K. Olech, A. Swist, D. Zajac, J. Cabaj, *Advances in Chemical Engineering and Science* 2013. (**3**) 19.

-
60. N. E. Leadbeater, V. A. Williams, T. M. Barnard, M. J. Collins Jr., *Organic Process Research & Development* 2006. (10) 833.
61. L. Liu, Y. Zhang, Y. Wang, *J. Org. Chem.* 2005. (70) 6122.
62. http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0103-50532014001202186
(23.6.2016. 13:00)
63. P. Espinet and A. M. Echavarren, *Angew. Chem. Int. Ed.* 2004. (43) 4704.
64. M. Toma, *Paladijem kataliziranim domino reakcijama do novih deazapurinskih analoga*, Završni rad, 2014.
65. J. E. Hein, V. V. Fokin, *Chem. Soc. Rev.*, 2010. (39) 1302.
66. <http://www.genexplain.com/pass> (26.6.2016. 13:00)
67. <http://www.pharmaexpert.ru/passonline/> (26.6.2016. 14:00)

7. ŽIVOTOPIS

Zovem se Mateja Toma, rođena sam 23. rujna 1992. godine u Varaždinu. Osnovnu školu završila sam 2007. godine u Novom Marofu, a iste godine svoje srednjoškolsko obrazovanje nastavila na općem smjeru Prve gimnazije Varaždin. Po završetku srednje škole nagrađena sam direktnim upisom na Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije i isti upisala 2011. godine na smjeru Primijenjene kemije. Završni rad izradila sam na Zavodu za organsku kemiju te 2014. godine završila preddiplomski studij nakon kojeg sam upisala diplomski studij, smjer Primijenjena organska kemija. 2015. godine nagrađena sam Dekanovom nagradom za zapažen studentski znanstveni rad, a početkom 2016. sudjelovala sam s posterskim priročenjem na XI. Susretu mladih kemijskih inženjera.