

# Derivati benzopirona s potencijalnim antioksidativnim djelovanjem: sinteza i strukturna karakterizacija

---

Kalčec, Nikolina

Undergraduate thesis / Završni 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:149:781037>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-07-18**



*Repository / Repozitorij:*

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE  
SVEUČILIŠNI PREDDIPLOMSKI STUDIJ

Nikolina Kalčec

# ZAVRŠNI RAD

Zagreb, srpanj 2016.

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE  
SVEUČILIŠNI PREDDIPLOMSKI STUDIJ

Nikolina Kalčec

DERIVATI BENZOPIRONA S POTENCIJALNIM  
ANTIOKSIDATIVNIM DJELOVANJEM: SINTEZA I  
STRUKTURNA KARAKTERIZACIJA

ZAVRŠNI RAD

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

Članovi ispitne komisije: Doc. dr. sc. Tatjana Gazivoda Kraljević

Izv. prof. dr. sc. Dragana Mutavdžić Pavlović

Dr. sc. Lidija Furač, viši predavač

Zagreb, srpanj 2016.

## SAŽETAK

### DERIVATI BENZOPIRONA S POTENCIJALNIM ANTIOKSIDATIVNIM DJELOVANJEM: SINTEZA I STRUKTURNA KARAKTERIZACIJA

U ovom radu prikazana je sinteza, strukturna i spektroskopska karakterizacija novih 7-hidroksi-4-metil derivata kumarina supstituiranih u položaju C-3 (hidroksi/metoksifenil) etinilnim supstituentom u svrhu ispitivanja njihovog antioksidativnog djelovanja. Sonogashira-inom reakcijom unakrsnog povezivanja 7-hidroksi-3-klor-4-metilkumarina i 2-metoksifeniletina ili 3-hidroksifeniletina uz tetrakistrifenilfosfin paladij kao katalizator, CuI kao kokatalizator i uz bazu Et<sub>3</sub>N pripremljeni su spojevi **1** i **2**. Strukturna i spektroskopska karakterizacija novosintetiziranih spojeva **1** i **2** provedena je <sup>1</sup>H- i <sup>13</sup>C-NMR, UV/Vis i fluorimetrijskom spektroskopijom. Farmakološki učinci i moguće biološke mete novopripremljenih spojeva predviđene su *in silico* analizom (PASS). Antiosidativna aktivnost novosintetiziranih spojeva ispitat će se cikličkom voltametrijom.

Ključne riječi: 7-hidroksi-4-metil derivati kumarina, Sonogashira-ina reakcija, <sup>1</sup>H- i <sup>13</sup>C-NMR, UV/Vis i fluorimetrijska spektroskopija, *in silico* analiza

## SUMMARY

### BENZOPIRONE DERIVATIVES WITH POTENTIAL ANTIOXIDANT ACTIVITY: SYNTHESIS AND STRUCTURAL CHARACTERIZATION

This work presents the synthesis, structural and spectroscopic characterization of novel 7-hydroxy-4-methylcoumarin derivatives substituted in position C-3 with (hydroxy/methoxyphenyl)ethynyl substituent in order to determine their antioxidant activity. Sonogashira cross-coupling reaction of 3-chloro-7-hydroxy-4-methylcoumarin and 2-methoxyphenylethyne or 3-methoxyphenylethyne with tetrakis(triphenyl)phosphine palladium as a catalyst, CuI as a cocatalyst and Et<sub>3</sub>N as a base compounds **1** and **2** were obtained. The structural and spectroscopic characterization of new synthesized compounds **1** and **2** was conducted by <sup>1</sup>H- and <sup>13</sup>C-NMR, UV / Vis and fluorimetric spectroscopy. Pharmacological effects and possible biological targets of novel compounds are predicted by *in silico* analysis (PASS). The antioxidant activity of new synthesized compounds will be tested by cyclic voltammetry.

Key words: 7-hydroxy-4-methylcoumarin derivatives, Sonogashira reaction, <sup>1</sup>H- and <sup>13</sup>C-NMR, UV / Vis and fluorimetric spectroscopy, *in silico* analysis

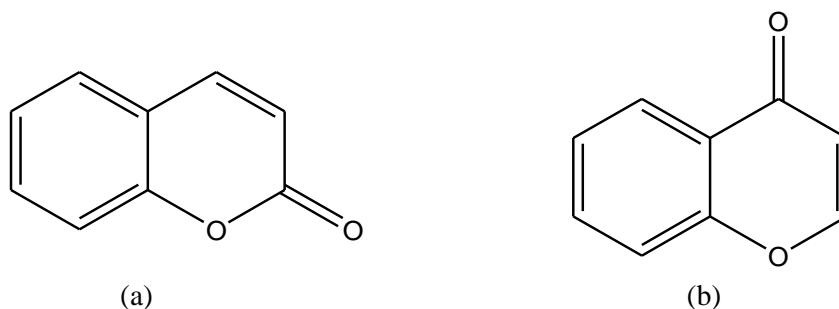
Ovaj rad izrađen je na Zavodu za organsku kemiju Fakulteta kemijskog inženjerstva i tehnologije Sveučilišta u Zagrebu u sklopu projekta Hrvatske zaklade za znanost HRZZ-5596.

## SADRŽAJ

<b>1. UVOD</b> .....	<b>1</b>
<b>2. OPĆI DIO</b> .....	<b>2</b>
2.1. Benzo- $\alpha$ -pironi (KUMARINI) .....	2
2.1.1. Podjela kumarina .....	3
2.1.2. Metabolizam kumarina .....	7
2.1.3. Reaktivnost kumarina .....	9
2.1.4. Sinteze kumarina .....	10
2.1.4.1. Perkin-ova reakcija .....	10
2.1.4.2. Pechmann-ova reakcija .....	11
2.1.4.3. Knoevenagel-ova reakcija .....	11
2.2. Biološka aktivnost derivata kumarina .....	12
2.2.1. Antikancerogena aktivnost .....	12
2.2.2. Antioksidativna aktivnost .....	14
2.2.3. Antikoagulacijska aktivnost .....	15
2.2.4. Ostale biološke aktivnosti .....	16
2.3. Kumarini kao antioksidansi .....	18
2.4. 7-hidroksi-4-metil derivati kumarina .....	20
2.4.1. Biološka aktivnost .....	20
2.4.2. Sinteze kumarina .....	22
2.5. Metode za određivanje antioksidativne aktivnosti .....	25
2.5.1. Spektroskopske metode .....	25
2.5.1.1. DPPH metoda .....	25
2.5.1.2. ABTS metoda .....	26
2.5.1.3. FRAP metoda .....	26
2.5.1.4. ORAC test .....	26
2.5.1.5. HORAC test .....	26
2.5.1.6. TRAP test .....	27
2.5.1.7. PFRAP metoda .....	27
2.5.1.8. CUPRAC test .....	27
2.5.1.9. Fluorimetrija .....	27
2.5.2. Elektrokemijske metode .....	28
2.5.2.1. Ciklička voltometrija .....	28
2.5.2.2. Biamperometrijska metoda .....	29
2.5.3. Kromatografske metode .....	30
2.5.3.1. Plinska kromatografija .....	30
2.5.3.2. HPLC .....	30
2.6. Sonogashira-ina reakcija .....	31
2.6.1. Sonogashira-ina reakcija u sintezi derivata kumarina .....	33
<b>3. EKSPERIMENTALNI DIO</b> .....	<b>34</b>
3.1. Opće napomene .....	34
3.2. Pregled sintetiziranih spojeva .....	35
3.3. Priprava spojeva .....	36
<b>4. REZULTATI I RASPRAVA</b> .....	<b>37</b>
4.1. Sinteze spojeva .....	37
4.2. Strukturna karakterizacija spojeva $^1\text{H}$ i $^{13}\text{C}$ NMR spektroskopijom .....	38
4.3. Spektroskopska karakterizacija spojeva UV/Vis i fluorimetrijskom spektroskopijom .....	41
4.4. <i>In silico</i> analiza (PASS) .....	43
<b>5. ZAKLJUČCI</b> .....	<b>48</b>
<b>6. LITERATURA</b> .....	<b>49</b>

## 1. UVOD

Organski kemičari pokazuju veliko zanimanje za kemiju heterocikla zbog njihove korisnosti u sintezi različitih biološki aktivnih derivata. Kisik, dušik i sumpor su najzastupljeniji heteroatomi. Spajanjem pironskog prstena s benzenskom jezgrom nastaje nova klasa heterocikličkih spojeva poznata kao benzopironi. Benzopironi se dijele na benzo- $\alpha$ -pironi (slika 1.a) poznate pod nazivom kumarini i benzo- $\gamma$ -pironi (slika 1.b) poznate kao kromoni, a razlikuju se jedino prema položaju karbonilne skupine u pironskom prstenu.



Slika 1. Strukture: a) benzo- $\alpha$ -pirona i b) benzo- $\gamma$ -pirona

Kumarin (2*H*-1-benzopiran-2-on) je prvi put identificiran 1820-ih kao kisikov heterociklički spoj i poznat je po mirisu vanilije ili mirisu svježe pokošene trave.[1] Prvi put kumarin je izoliran iz biljke *Coumarouna odorata* Aube (*Dipetryx odorata*) 1820. godine, po kojoj je i dobio ime (kumarú je naziv za drvo na jeziku južnoameričkih indijanaca iz Francuske Gvajane). Kumarin je kemijski spoj koji se nalazi u mnogim biljkama, osobito u tonka sjemenkama, a također ga ima i u nekim eteričnim uljima. Kumarine u prirodi nalazimo kao slobodne ili u obliku heterozida u mnogim biljkama.[2] Kumarini i njihovi derivati su uvjerljivo najaktivnija vrsta heterocikla, koja pokazuje širok spektar bioloških aktivnosti.[1]

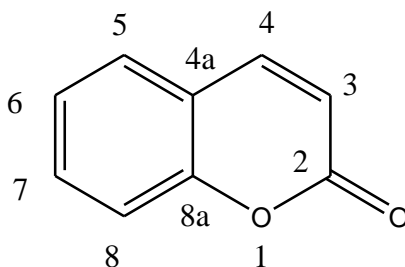
Kromon (4*H*-1-benzopiran-4-on) i njegovi derivati su rašireni u biljnom carstvu od algi do crnogorice. Ovi heterociklički spojevi pokazuju raznolikost farmakoloških svojstava i promjenom njihove strukture sintetizirani su različiti derivati koji su se pokazali korisnima u traženju novih terapijskih sredstava.[3]



## 2. OPĆI DIO

### 2.1. Benzo- $\alpha$ -pironi (KUMARINI)

Kumarini kemijski pripadaju benzopironskoj obitelji (slika 2.). Kumarini (poznati kao 1,2-benzopironi ili 2*H*-1-benzopiran-2-oni) obuhvaćaju veliku klasu fenolnih derivata nađenih u biljkama, a sastoje se od kondenziranog benzenskog i  $\alpha$ -pironskog prstena, te posjeduju - konjugirani sustav bogat elektronima i dobra svojstva prijenosa naboja.[4,5]



Slika 2. Benzo- $\alpha$ -piron s numeriranim prstenom

Obzirom da kumarinski prsten sadrži šest položaja na kojima je moguća reakcija elektrofilne supstitucije, postoje različiti derivati kumarina, bilo sintetički ili prirodni, a takva strukturna raznolikost uzrok je mnoštvu različitih bioloških aktivnosti.[2] Od prve sinteze i identifikacije kumarina 1820. godine započela je i njegova proizvodnja, a kumarin se koristi u proizvodnji aroma i parfema od 1868. godine. Više od 1300 derivata kumarina pronađeno je u zelenim biljkama uglavnom kao sekundarni metaboliti, u gljivama i bakterijama.[4] Derivati kumarina su značajni jer se nalaze u povrću, voću, sjemenkama, orašastim plodovima, kavi, čaju i vinu.[5] Prisutnost kumarinskih derivata u biljkama je vrlo česta, a mnoge od tih biljaka se upotrebljavaju u tradicionalnoj medicini od davnina.[2] Uvjeti okoline i sezonske promjene mogu utjecati na zastupljenost kumarina u različitim dijelovima biljaka.[6].

Kumarini i njihovi derivati imaju vrlo važna biološka i farmakološka svojstva, poput protuupalnih, antikoagulacijskih, antibakterijskih, antigljivičnih, antivirusnih, antihipertenzivnih, antimikrobakterijskih, antikonvulzijskih, antihiperglikemijskih, neuroprotektivnih, anti-HIV te najvažnija antikancerogena i antioksidativna svojstva.[6] Kumarini su fitokemikalije jer se pojavljuju u prirodi, odnosno u biljnom carstvu i imaju biološki značaj. Fitokemikalije općenito imaju potencijalno djelovanje protiv nekih bolesti,

kao što su tumori i metaboličke ili degenerativne bolesti.[5] S obzirom na utvrđenu nisku toksičnost, relativno nisku cijenu, prisutnost u prehrani i pojavu u raznim biljnim lijekovima, njihova svojstva i primjena uvelike se istražuju i proučavaju.[6]

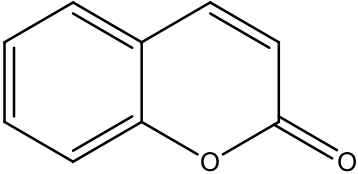
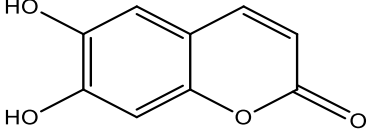
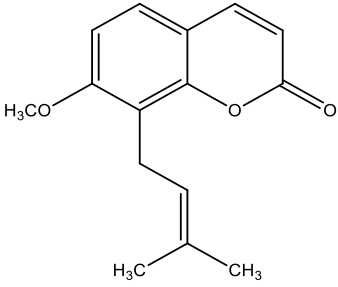
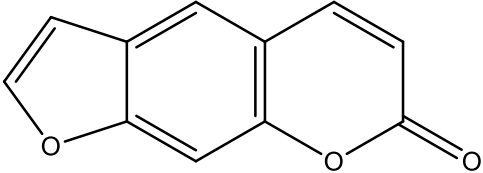
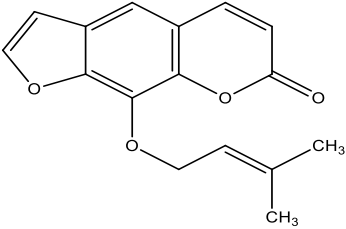
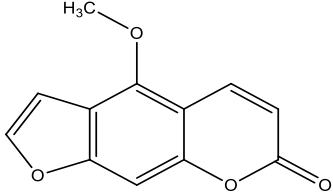
Osim u biološke svrhe, koriste se kao aditivi u hrani, u parfemima, kozmetici, optičkom bjelilu i raspršuju fluorescentne i laserske boje. Optički uređaji, koji sadrže laserske boje, nelinearne optičke kromofore, zatim fluorescenti izbjeljivači i solarni kolektori na neki su način povezani s kumarina i također se intenzivno istražuju. Kumarini su također pronađeni u selektivnim mikroorganizmima. Vrste kumarina izolirane iz mikrobnih izvora su novobiocin iz *Streptomycin-a* i aflatoksin iz *Aspergillus* vrste i koriste se u kozmetičkim proizvodima, kao što su sapuni, paste za zube, parfemi i alkoholna pića. Koriste se kao neutralizatori za gumene i plastične materijale i također u bojama i sprejevima kako bi ublažili neugodne mirise.[1]

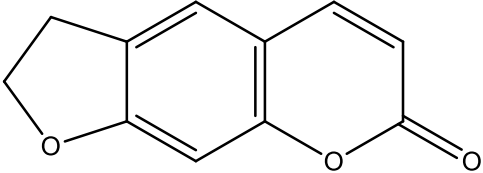
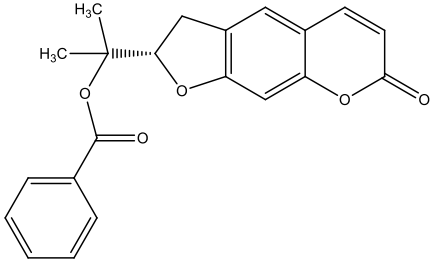
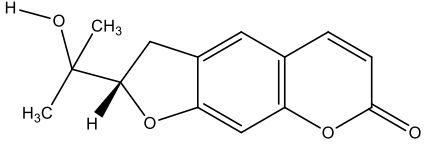
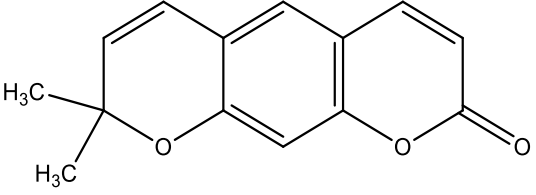
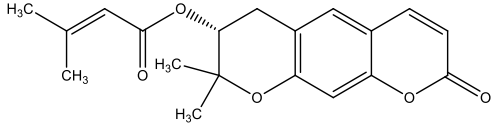
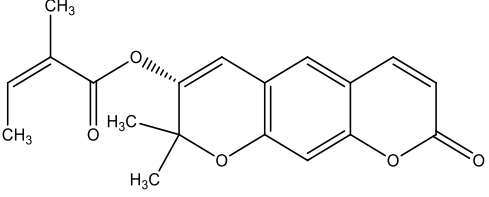
Najpoznatiji prirodni spoj koji sadrži kumarinsku jezgru je 7-hidroksikumarin i pronađen je u mrkvi i korijanderu. Koristi se kao zaštita od sunca, kao indikator fluorescencije i kao indikator boje. Ima osobito važnu biološku aktivnost, kao antioksidans u ljudskoj prehrani i pokazuje antitumorsku aktivnost.[1,2]

### **2.1.1. Podjela kumarina**

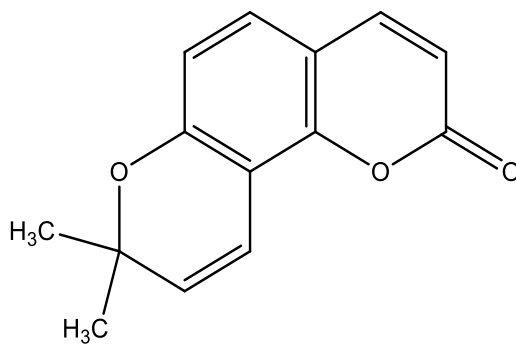
Prirodni kumarini uglavnom su svrstani u šest skupina na temelju kemijske strukture: jednostavni kumarini, furanokumarini, dihidrofuranokumarini, piranokumarini, fenilkumarini i bikumarini.[6]

**Tablica 1.** Različite vrste kumarina

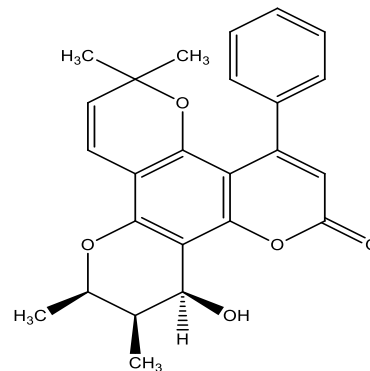
VRSTA KUMARINA	OPĆENITA KEMIJSKA STRUKTURA	PRIMJERI S FARMAKOLOŠKIM AKTIVNOSTIMA
<p><b>1. JEDNOSTAVNI KUMARINI</b></p>		<p><b>ESKULETIN</b> - ANTIOKSIDATIVNA I NEUROPROTEKTIVNA AKTIVNOST</p>  <p><b>OSTOL</b> – ANTIBAKTERIJSKA, ANTIGLJIVIČNA, ANTITUMORSKA, ANTIEPILEPTIČKA I ANTIOKSIDATIVNA AKTIVNOST</p> 
<p><b>2. FURANOKUMARINI</b></p>		<p><b>IMPERATORIN</b> – PROTUUPALNA, ANTIBAKTERIJSKA, ANTIGLJIVIČNA, ANTIVIRUSNA, ANTITUMORSKA I ANTIEPILEPTIČKA AKTIVNOST</p>  <p><b>BERGAPTEN</b> - ANTITUBERKULOSTATSKA AKTIVNOST</p> 

<p><b>3. DIHIDROFURANO KUMARINI</b></p>		<p><b>FELAMIDIN - ANTIBAKTERIJSKA AKTIVNOST</b></p>  <p><b>(+)-(S)-MARMESIN - ANTITUBERKULOSTATSKA AKTIVNOST</b></p> 
<p><b>4. PIRANOKUMARINI-DVA TIPA</b></p>		
<p><b>4a. LINEARNI TIP</b></p>		<p><b>GRANDIVITIN - ANTIBAKTERIJSKA AKTIVNOST</b></p>  <p><b>AGASILN - ANTIBAKTERIJSKA AKTIVNOST</b></p> 

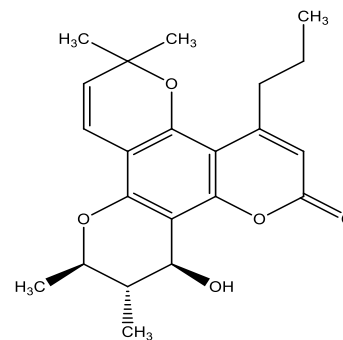
4b. KUTNI TIP



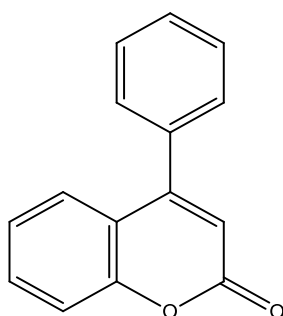
**INOFILUM A - ANTIVIRUSNA  
AKTIVNOST**



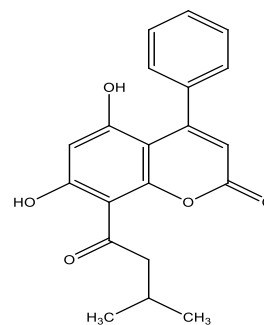
**(+)-KALANOLID A - ANTIVIRUSNA  
AKTIVNOST (ANTI-HIV)**



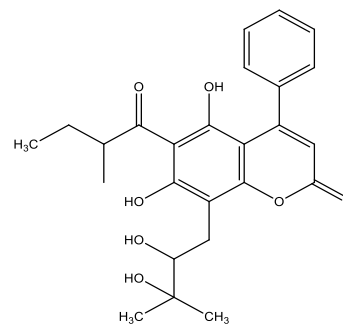
5. FENILKUMARIN

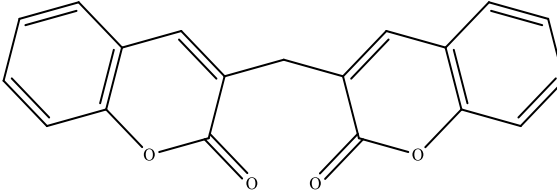
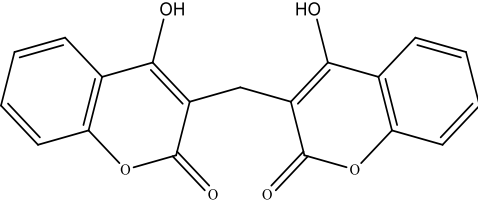


**IZODISPAR B - ANTITUMORSKA  
AKTIVNOST**



**DISPARDIOL B - ANTITUMORSKA  
AKTIVNOST**



<p>6. BIKUMARIN</p>		<p><b>DIKUMAROL – ANTIKOAGULACIJSKA AKTIVNOST</b></p> 
---------------------	--	---

Svaka od skupina kumarina prisutna je u brojnim lijekovima koji se koriste za liječenje u humanoj medicini.

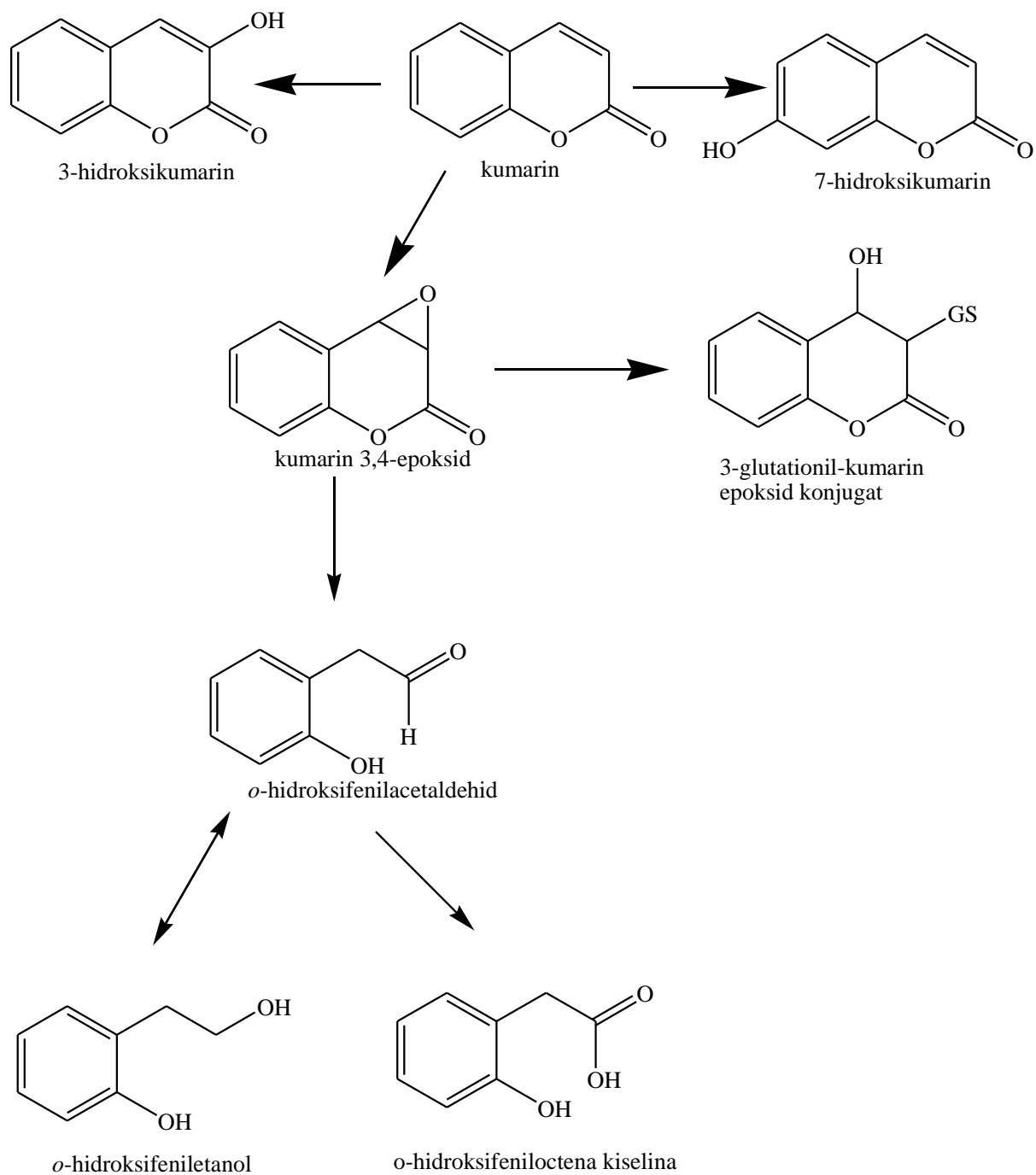
### 2.1.2. Metabolizam kumarina

Istraživanje metabolizma kumarina uključuje mnoge studije *in vivo* i *in vitro*, kod mnogih životinjskih vrsta, ali i kod čovjeka. Kumarin se može metabolizirati hidroksiliranjem svih šest dostupnih položaja (3, 4, 5, 6, 7, 8) i pritom dati 3-, 4-, 5-, 6-, 7- i 8-hidroksikumarine, kao i otvaranjem laktonskog prstena pri čemu nastaju različiti produkti, poput *o*-hidroksifenilacetaldehida (*o*-HPA), *o*-hidroksifeniletanola (*o*-HPE), *o*-hidroksifeniloctene kiseline (*o*-HPAA) i *o*-hidroksifenilmliječne kiseline (*o*-HPLA). Dodatni metaboliti koji mogu nastati su 6,7-dihidroksikumarin, *o*-kumarinska kiselina, *o*-hidroksifenilpropionska kiselina i dihidrokumarin.

Dva važna puta metabolizma kumarina su **7-hidroksiliranje i metabolizam laktonskog prstena**, koji uključuje otvaranje prstena i otpuštanje ugljikovog atoma 2, pri čemu nastaje ugljikov dioksid (shema 1).

Provedena su istraživanja na dva različita metabolizma, kod štakora i čovjeka. Za razliku od štakora i miševa, kod kojih veće doze kumarina mogu uzrokovati toksičnost i karcinogenezu, toksičnost za ljude nije dokazana. Niska toksičnost se temelji na razlici u biotransformaciji kumarina i eliminaciji metabolita kumarina iz tijela kod određenih vrsta. Kod štakora se hepatotoksičnost ove vrste pripisuje izlučivanju metabolita kumarina u žuč i dominirajuća reakcija metabolizma kumarina je 3,4-epoksidacija, pri čemu je glavni metabolit jetrenih mikrosoma *o*-HPA, koji se povezuje s akutnom plućnom toksičnošću i plućnim tumorima kod miševa, dok je glavni urinarni metabolit *o*-HPAA. Čovjek izlučuje metabolite

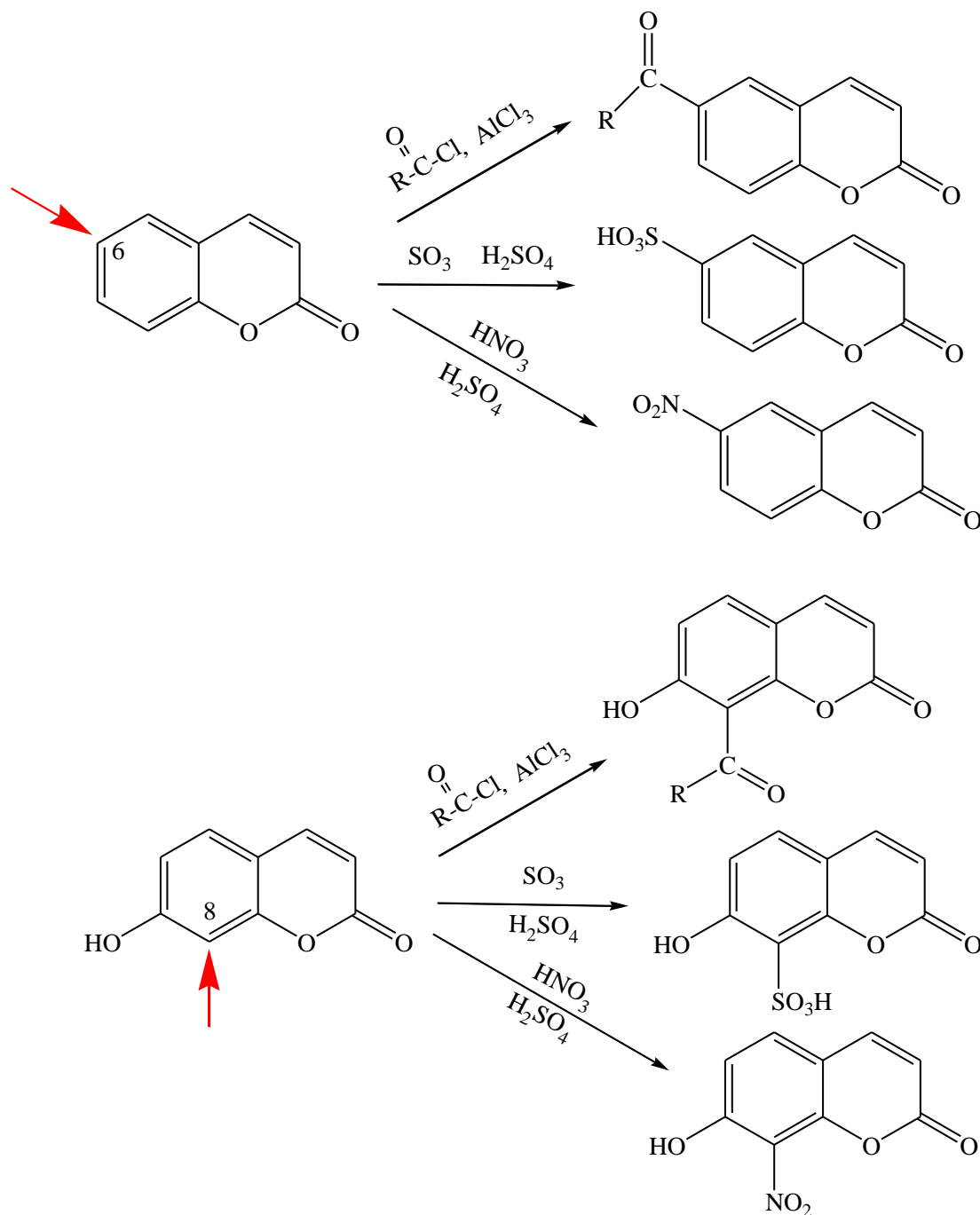
kumarina primarno u urinu osobito u obliku 7-hidroksikumarina tako da u ovom slučaju nema izlučivanja u žuč i dominirajuća reakcija je 7-hidroksiliranje što je u biti detoksifikacija.[2]



Schema 1. Glavni metabolički putevi biotransformacije kumarina

### 2.1.3. Reaktivnost kumarina

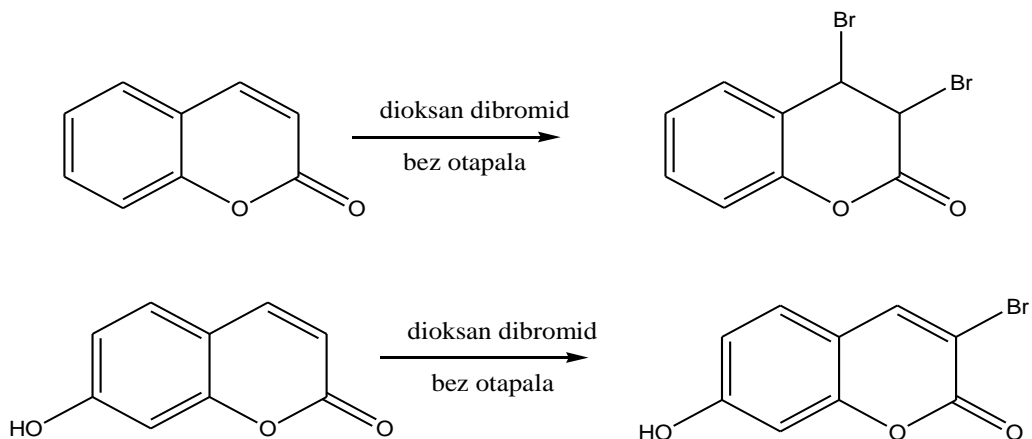
Kumarini i njihovi derivati su vrlo reaktivni zbog alifatske skupine prisutne u kumarinu i vjerojatno je da će doći do otvaranja prstena na acilnom centru.[1] Kod kumarina elektrofilna supstitucija (nitriranje, sulfoniranje, Friedel-Crafts-ovo aciliranje) se uvijek događa na C-6 položaju na aromatskom prstenu (shema 2).[7]



Shema 2. Elektrofilna supstitucija (nitriranje, sulfoniranje i Friedel-Crafts-ovo aciliranje) na kumarinu i 7-hidroksikumarinu



U reakcijama kao što su bromiranje i merkuriranje, elektrofilna adicija se događa na dvostrukoj vezi između C-3 i C-4 položaja. Kod kumarina nastaje 3,4-dibromkumarin, a kod 7-hidroksikumarina nastaje 3-brom-7-hidroksikumarin (shema 3).[8] 7-hidroksikumarini podložni su supstituciji na C-8 položaju, ako je taj položaj zauzet, supstitucija se odvija na C-6 položaju.[7] Reaktivnost metilne skupine na kumarinskoj jezgri ovisi o položaju supstitucije. Metilna skupina je najreaktivnija kad se nalazi na položaju C-4 i tada kumarin ima najbolja biološka svojstva.[1]



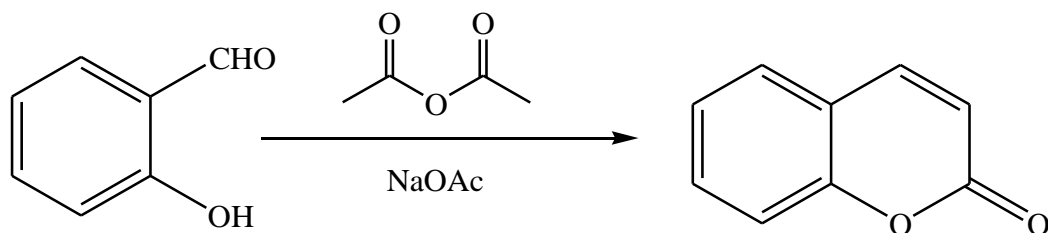
Shema 3. Bromiranje kumarina i 7-hidroksikumarina.

#### 2.1.4. Sinteze kumarina

Kumarinski prsten se može klasično sintetizirati Perkin-ovom, Pechmann-ovom i Knoevenagel-ovom reakcijom.[9]

##### 2.1.4.1. Perkin-ova reakcija

Perkin-ova reakcija je reakcija salicilaldehida i anhidrida octene kiseline, kojom, u prisutnosti natrijevog acetata, nastaje kumarinski prsten (shema 4).

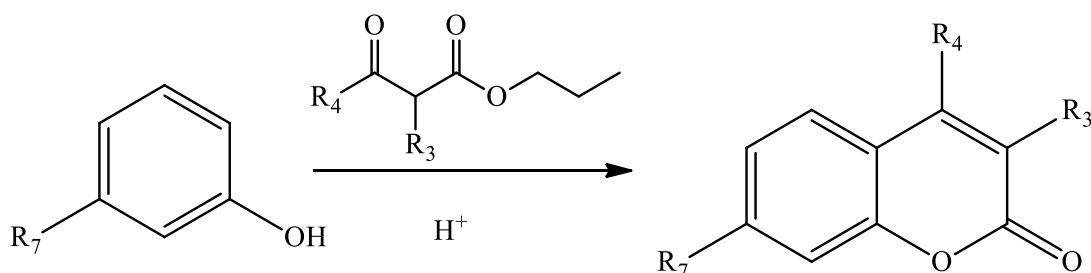


Shema 4. Perkin-ova reakcija

Ova klasična sinteza unaprijeđena je korištenjem bezvodnog natrijeva fluorida kao katalizatora. 3-ariloksikumarin, s različitim supstituentima, sintetiziran je modificiranom Perkin-Ogliarolo-ovom reakcijom, kondenzacijom odgovarajućih supstituiranih saliciladehida s natrijevim solima ariloksiocetenih kiselina.[9]

#### 2.1.4.2. Pechmann-ova reakcija

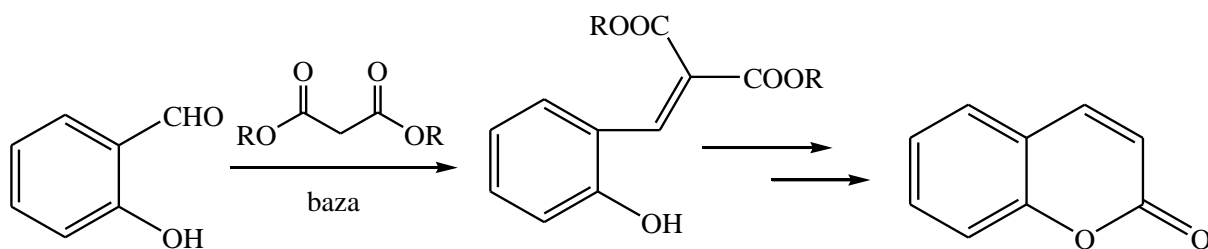
Pechmann i Duisberg su prvi put objavili sintezu kumarinskog prstena, dobivenog reakcijom kondenzacije fenola s  $\beta$ -ketoesterima uz prisustvo kiselih katalizatora (shema 5), 1883. godine. Ta reakcija je široko korištena u svrhu sinteze kumarina zbog jednostavne izvedbe i jeftinih početnih reagensa.[1] Kada se koriste aceto esteri i derivati, reakcija se često naziva Pechmann-Duisbergov-a. Ova se sinteza često koristi za dobivanje prirodnih kumarina i drugih benzopirona od biološke ili industrijske važnosti.[9]



Shema 5. Pechmann-ova reakcija

#### 2.1.4.3. Knoevenagel-ova reakcija

Kondenzacija aromatičnih aldehida ili ketona s aktivnim metilenskim spojevima u prisutnosti amonijaka ili amina je poznata kao Knoevenagel-ova reakcija (shema 6). Obično je katalizirana slabim bazama ili prikladnim kombinacijama amina i karboksilnih ili Lewisovih kiselina. Nadalje, kada se koriste malonska kiselina i piridin, sa ili bez tragova piperidina, reakcija se naziva Doebner-ovom modifikacijom.



Shema 6. Knoevenagel-ova reakcija

Veliki broj kumarina je sintetiziran pomoću ove metode, poput primjerice kumarin-3-karboksilne kiseline, amino- i alkilamino-kumarina, 3-acetilkumarina, krunastih etera 3-benzoilkumarina i novih premoštenih heterocikla povezanih s kumarinima.

Posljednjih godina klasična sinteza jednostavnih kumarina znatno je modificirana zbog njihove primjene u području medicinske kemije, u istraživanju strukture i aktivnosti ili u analitičkoj kemiji.[9] Novi derivati kumarina su sintetizirani korištenjem konvencionalnih i mikrovalovima potpomognutih reakcija. Prednosti u korištenju mikrovalova su kraće vrijeme reakcije, veća iskorištenja i jednostavniji postupci za pročišćavanje pripremljenog spoja. U reakcijama bez otapala uz mikrovalno zračenje znatno se smanjuje vrijeme reakcije, poboljšava konverzija i ponekad povećava selektivnost. Mikrovalno zračenje se koristi za izvođenje kemijskih reakcija bez zagađivanja okoliša i zato se smatra "zelenom" tehnologijom.[10]

## **2.2. Biološka aktivnost derivata kumarina**

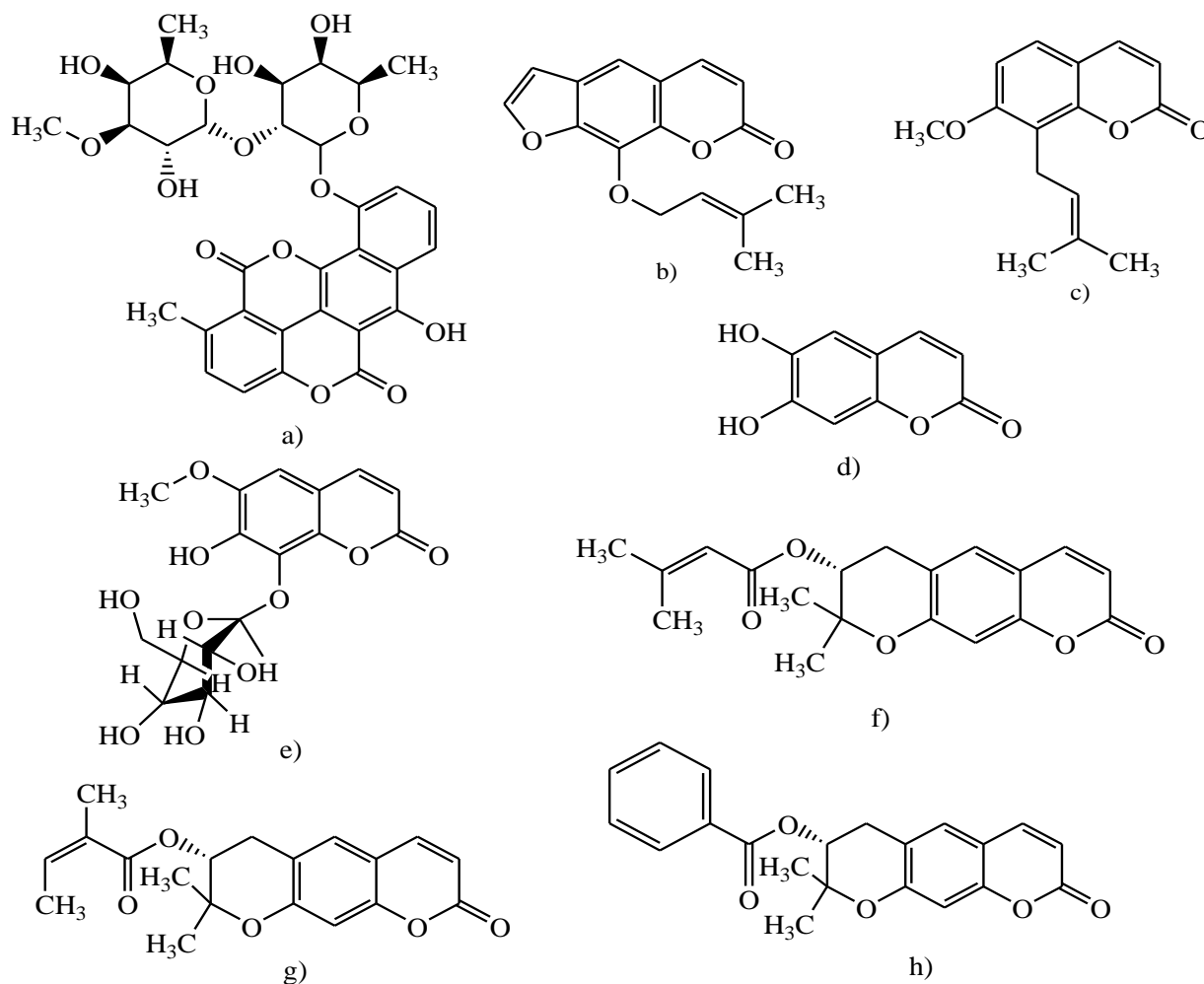
Derivati kumarina pokazuju mnoštvo bioloških aktivnosti, uključujući antikoagulacijsku, protuupalnu, antibakterijsku, antigljivičnu, estrogenu, dermalno fotosenzitirajuću, antimikrobnu, vazodilacijsku, djeluju kao antihelmintici (najčešće u probavnom sustavu), sedativi i hipnotici, a pokazuju i analgetsko i hipotermičko djelovanje. Ostale biološke aktivnosti uključuju inhibiciju agregacije krvnih pločica, antikancerogenu i anti- HIV aktivnost. Značajna je i prevencija od bolesti, modulacija rasta i antioksidacijska svojstva.[2]

### **2.2.1. Antikancerogena aktivnost**

Maligne bolesti su postale najveća opasnost za ljudsko zdravlje. Antikancerogena aktivnost je najvažnije svojstvo kumarina.[11] Kumarin i 7-hidroksikumarin inhibiraju proliferaciju mnoštva humanih staničnih linija *in vitro*, a pokazuju i aktivnost protiv nekoliko životinjskih tumora.[2] Kartreusin (slika 3.a) pokazuje antitumorsko svojstvo protiv mišje L1210, P388 leukemije i B16 melanoma.[6] Kumarin i njegovi metaboliti pokazuju antitumorsku aktivnost na nekoliko linija stanica tumora kod ljudi, pokazali su se kao inhibitori stanične proliferacije kod stanica želučanog karcinoma, a već je dokazana aktivnost kumarina protiv raka prostate, malignog melanoma i metastatskog renalnog staničnog karcinoma.[2] Imperatorin (slika 3.b) pokazuje antikancerogeno djelovanje, ostol (slika 3.c) je učinkovit u inhibiranju migracije i invaziji stanica tumora dojke, eskuletin (slika 3.d)

pokazuje antitumorsku aktivnost i smanjuje kultivirane primarne neurone od *N*-metil-D-aspartat toksičnosti. Fraksin (slika 3.e) pokazuje zaštitu protiv citotoksičnosti induciranu vodikovim peroksidom. Grandivitin (slika 3.f), agasilin (slika 3.g), agelinol-benzoat (slika 3.h) i ostol (slika 3.c) pokazuju citotoksičnu aktivnost protiv raka pluća stanične linije A549.[6] Lijekovi protiv tumora su djelotvorni, ali citotoksični i zato pokazuju nuspojave. Trenutno, kemoterapija, radioterapija i operacije nude najbolje rezultate za pacijente s tumorom i kombinacije tih terapija se uspješno primjenjuju kod određenih tipova raka, primjerice, Hodgkinov limfom, rak testisa i razne leukemije. Derivati kumarina ne koriste se samo u liječenju tumora već i za ublažavanje nuspojava uzrokovanih radioterapijom.[12]

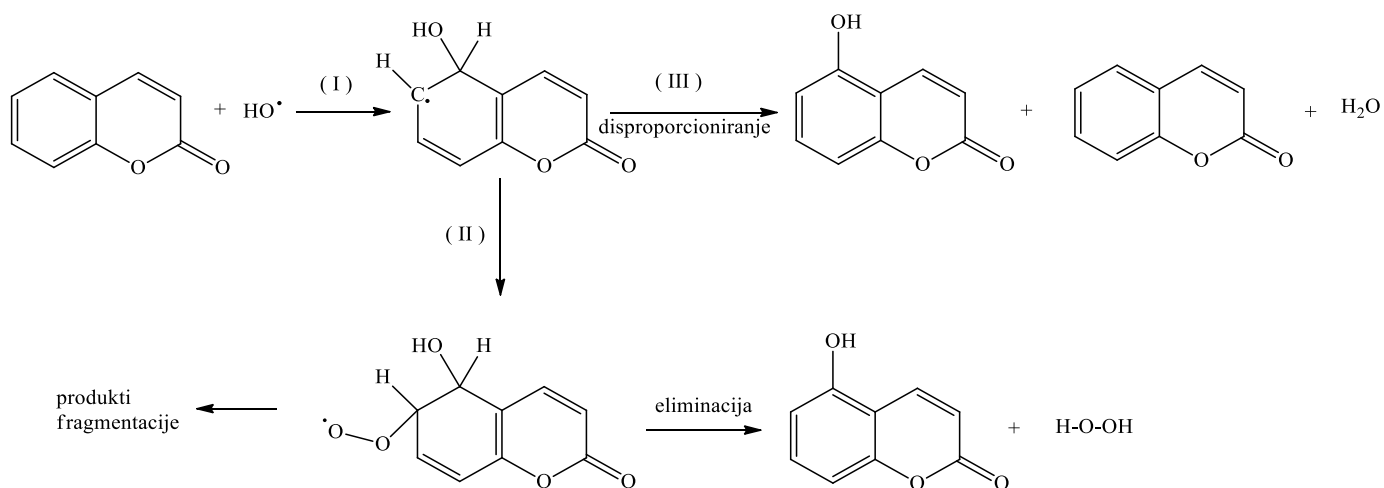
3''-Dimetilkartreusin novi je antitumorski antibiotik dobiven iz *Streptomyces chartreusis*.[6] Brojni derivati kumarina trenutno prolaze razna klinička ispitivanja vezana za liječenje limfoedema, raka dojke, karcinoma pluća i bubrega.[2]



Slika 3. Kumarini s antitumorskim djelovanjem: a) kartreusin; b) imperatorin; c) ostol; d) eskuletin; e) fraksin; f) grandivitin; g) agasilin; h) agelinol-benzoat

## 2.2.2 Antioksidativna aktivnost

Kumarini s hidroksilnim skupinama vezanima za benzenski dio prstena pokazuju sposobnost "hvatanja" slobodnih radikala (*radical scavening*), osobito reaktivnih kisikovih radikala i često se koriste kao inhibitori ciklooksigenaze i lipooksigenaze u upalnom ciklusu. Brojni kumarini utječu na stvaranje i hvatanje reaktivnih kisikovih (ROS) i dušikovih vrsta (RNS) i na taj način djeluju kao antioksidansi.[2] Hidroksilni radikal ( $\text{HO}^\bullet$ ) je jedan od kemijski najreaktivnijih tvari i može se naći u različitim medijima, ali zbog kratkog života (oko  $10^{-9}$  s u stani) otežana je njegova direktna detekcija. Neizravne metode detekcija sastoje se od uvođenja probe u medij. Reakcija probe s  $\text{HO}^\bullet$  dovodi do stvaranja mjerljivog signala tijekom dužeg vremena. Hidroksil-radikali mogu biti izazvani zračenjem (radiolizom vode) ili kemijski inducirani (Fenton reakcijom). Reakcijom kumarina (proba) s hidroksil radikalom nastaju hidroksikumarini. Na shemi 7. prikazani su glavni mehanizmi reakcije hidroksil- radikala s kumarinom. Reakcija I prikazuje dodavanje  $\text{HO}^\bullet$  na kumarin (adicija  $\text{HO}^\bullet$  u položaj C-5 na kumarinskoj jezgri) i stvaranje radikalnog adukta. Taj adukt reagira s molekulom kisika stvarajući peroksil-radikal (reakcija II). Peroksil-radikali podložni su fragmentaciji stvarajući brojne produkte ili eliminaciji dajući hidroksikumarine (5-hidroksikumarin). Radikalni adukt stvoren reakcijom I može također disproporcionirati stvarajući odgovarajuće hidroksikumarine.



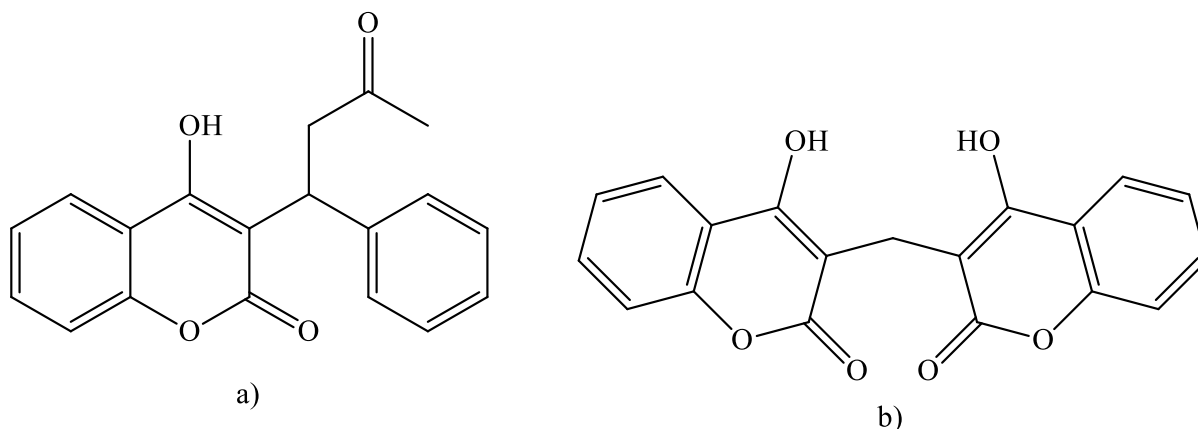
Shema 7. Glavni mehanizmi reakcije hidroksil-radikala s kumarinom

Reakcija HO<sup>•</sup> s kumarinom je regioselektivna. Glavni produkt hidroksiliranja je 5-hidroksikumarin, a najmanje nastaje 3-hidroksikumarina. Jedino 7-hidroksikumarin pokazuje fluorescenciju u vidljivom području s maksimumom od oko 450 nm.

Kumarin pokazuje dobru selektivnost prema HO<sup>•</sup> i omogućuje detekciju  $30 \times 10^{-9}$  mol dm<sup>-3</sup> HO<sup>•</sup> uz relativno niske koncentracije kumarina ( $10^{-5}$  mol dm<sup>-3</sup>).[13]

### 2.2.3. Antikoagulacijska aktivnost

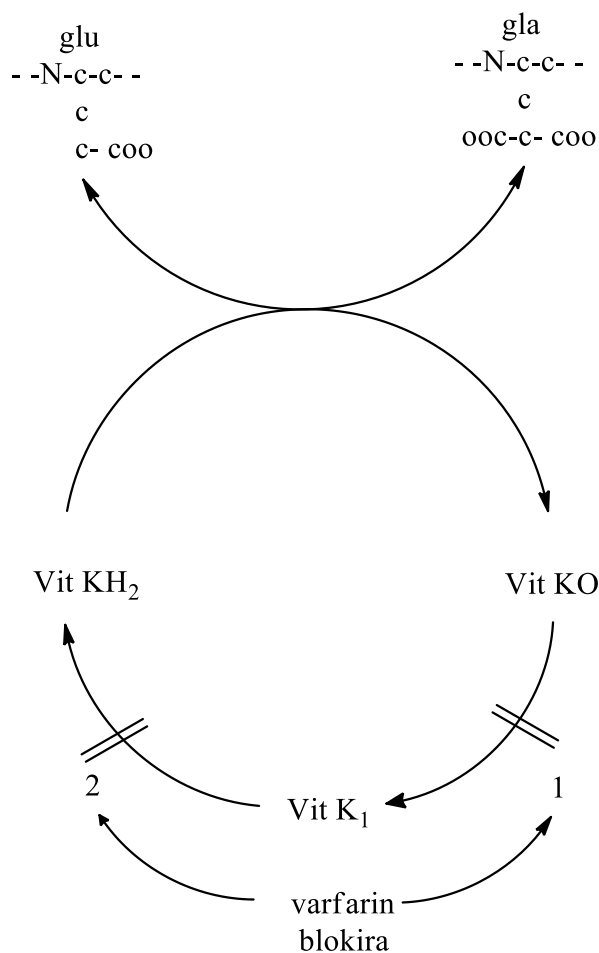
Vitamin K igra važnu ulogu u zgrušavanju krvi.[11] Varfarin (slika 4.a) i dikumarol (slika 4.b) su antagonisti vitamina K koji izazivaju antikoagulacijski učinak interferencijom s cikličkom interkonverzijom vitamina K i njegovih 2,3-epoksida (epoksid vitamina K).



Slika 4. Derivati kumarina koji pokazuju antiokoagulacijsku aktivnost:

a) varfarin i b) dikumarol

Da bi derivati kumarina bili djelotvorni antikoagulacijski agensi moraju  $\gamma$ -karboksilirati. Kumarini stvaraju svoj antikoagulacijski učinak inhibirajući ciklus pretvorbe vitamina K čime stvaraju jetrene produkte djelomično karboksilnih i dekarboksilnih proteina sa smanjenom prokoagulacijskom aktivnosti. Reakcija karboksilacije zahtijeva reducirani oblik vitamina K (vitamin KH<sub>2</sub>), molekularni kisik i ugljikov dioksid, i povezana je s oksidacijom vitamina KH<sub>2</sub> u epoksid vitamina K koji se prevodi u vitamin KH<sub>2</sub> u dva koraka reduktazom. Prvi, koji je osjetljiv na varfarin, reducira epoksid vitamina K u vitamin K<sub>1</sub>, dok drugi, relativno neosjetljiv na varfarin, reducira vitamin K<sub>1</sub> u vitamin KH<sub>2</sub> (shema 8). Liječenje s kumarinima (varfarinom) dovodi do iscrpljivanja vitamina KH<sub>2</sub>, čime se ograničava  $\gamma$ -karboksilacija vitamina K-ovisnih koagulacijskih proteina.[6]



1. KO reduktaza- osjetljiva na varfarin
2. K reduktaza- relativno rezistentna na varfarin

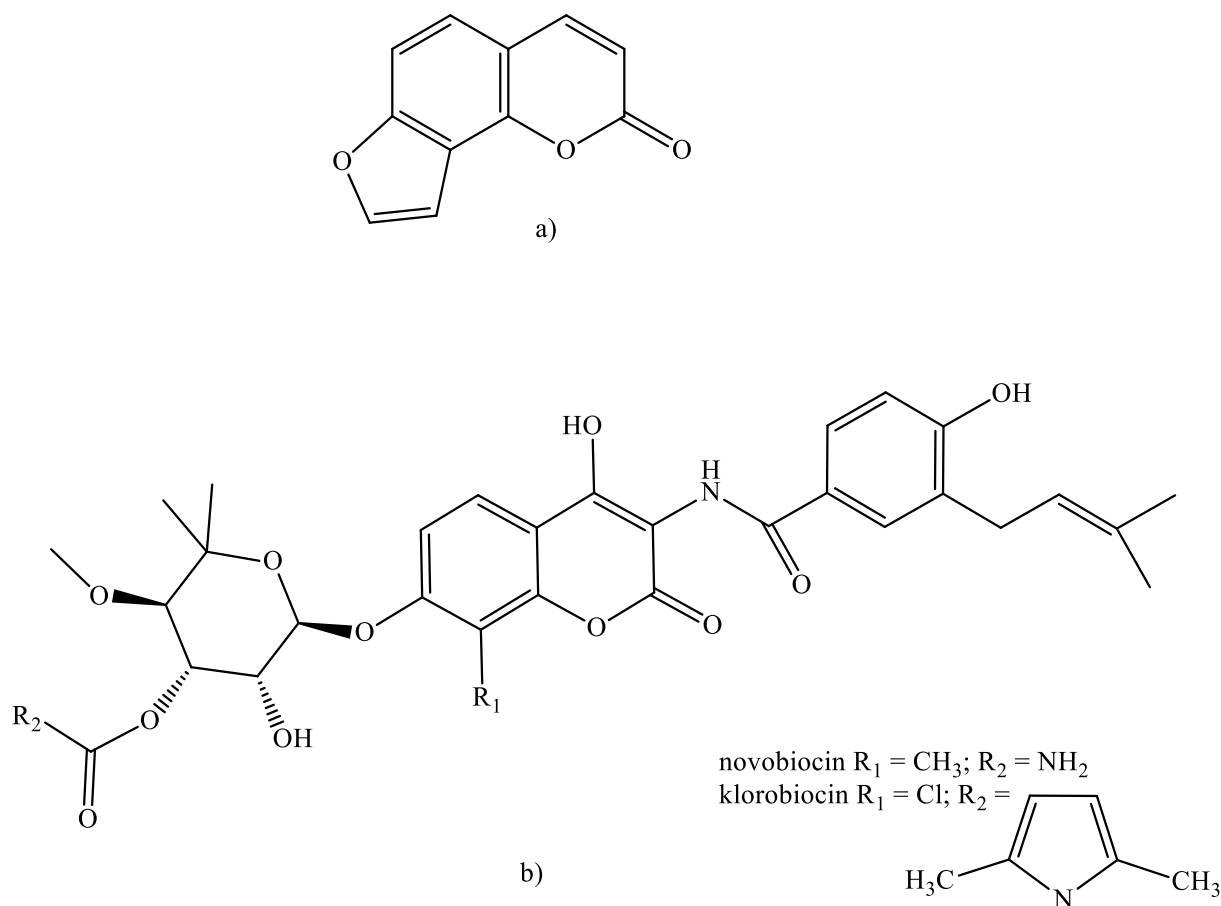
Shema 8. Djelovanje varfarina kao antikoagulansa

#### 2.2.4. Ostale biološke aktivnosti

Kumarin pokazuje sposobnost aktivacije makrofaga, pa postoji mogućnost upotrebe u tretmanima edema, osobito jer se kumarin pokazao dobrim u smanjenju oteklina nakon različitih trauma i bolesti kako kod ljudi tako i kod životinja. Kumarin smanjuje razinu glukoze u krvi, pa zbog imunomodulacijskih svojstava postoji mogućnost primjene u tretmanu bruceloze. Ostol (slika 2c) inhibira agregaciju krvnih pločica i sprečava progresiju hepatitisa C u hepatokarcinomu kod ljudi. Kolinin pokazuje negativan učinak na replikaciju DNA virusa hepatitisa B. Određeni dimeri kumarina, osobito oni koji sadrže hidrofobne skupine, pokazali su se kao potencijalni inhibitori HIV-1 integraze, dok je 5,7,4'-trihidroksi-4-stiril Kumarin pokazao značajnu antivirusnu aktivnost prema *Herpes simplex* virusu. Neki

prirodni i sintetički kumarini su inhibitori kolinesteraze, što bi moglo dobro doći u liječenju Alzheimerove, kao i Parkinsonove bolesti. Furanokumarini se koriste u fotokemoterapeutskim tretmanima za neke kožne bolesti, limfome i autoimune poremećaje. Neki imaju farmakološka svojstva i bez zračenja te su se pokazali djelotvornim u liječenju depresije, a i korisni su lijekovi u tretmanima multipleskleroze. Angelicin (slika 5.a) pokazuje anti-upalna, antipiretička (za smanjenje tjelesne temperature) i citotoksična svojstva na humane KB stanične linije, te antigljivično djelovanje (*Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans* i *Cladosporium cucumerinum*).

Novobiocin i klorobiocin (slika 5.b) su antibiotici prirodnog porijekla na bazi kumarina koji se ubrajaju u hidroksilirane kumarine, a inhibiraju DNA girazu i pokazuju široki spektar aktivnosti prema Gram-pozitivnim bakterijama, uključujući i *Staphylococcus* vrste otporne na meticilin.[2]



Slika 5. Struktura a) angelicina i b) novobiocina i klorobiocina



### 2.3. Kumarini kao antioksidansi

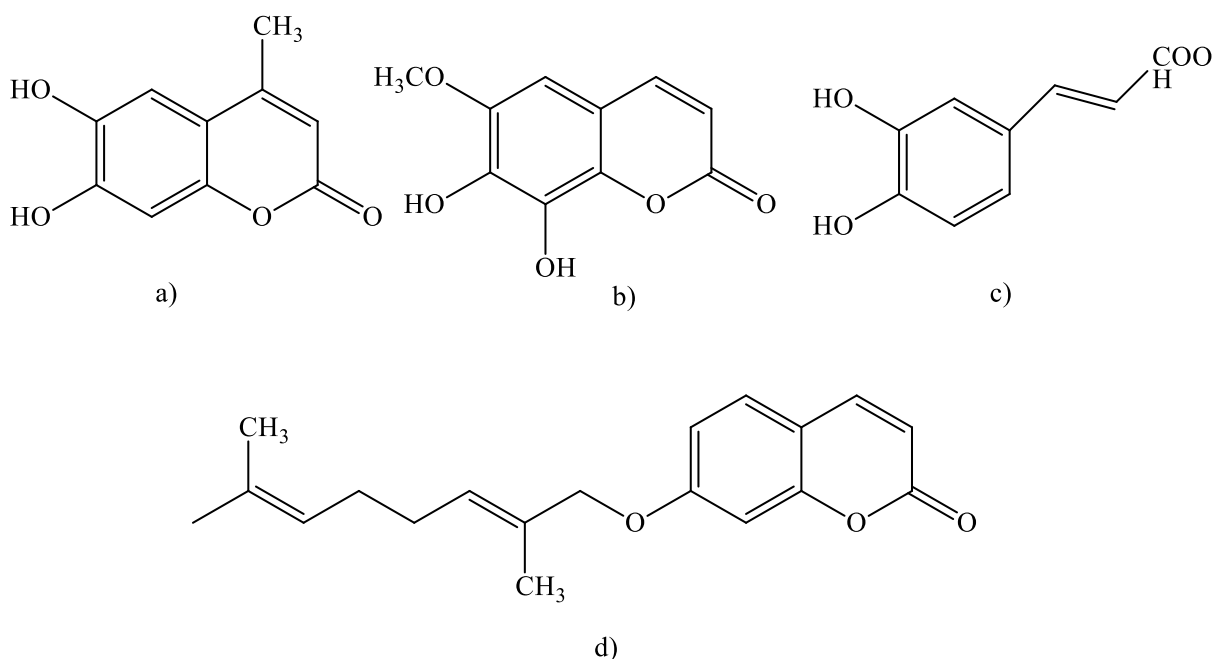
Slobodni radikali su atomi, molekule ili ioni s nesparenim elektronima, koji su vrlo reaktivni u kemijskim reakcijama s ostalim molekulama. U biološkom sustavu, slobodni radikali su često dobiveni iz molekula koje sadržavaju kisik, dušik i sumpor. Ovi slobodni radikali su dijelovi skupina molekula pod nazivom reaktivne kisikove vrste (ROS), reaktivne dušikove vrste (RNS) i reaktivne sumporne vrste (RSS). ROS uključuju slobodne radikale kao što su superoksidni anion, perhidroksilni radikal, hidroksilni radikal, dušikov oksid i druge vrste, poput vodikovog peroksida, singletnog kisika, hipokloritne kiseline i peroksinitrita. ROS nastaju tijekom staničnog metabolizma i funkcijske aktivnosti, te imaju važnu ulogu u staničnoj signalizaciji, ekspresiji gena i prijenosu iona. Međutim, prekomjerne količine ROS mogu imati štetne učinke na mnoge molekule uključujući proteine, lipide, RNA, DNA i ugljikohidrate jer su vrlo mali i vrlo reaktivni. Oštećene stanice funkcioniraju pogrešno, što može dovesti do daljnje eskalacije oksidativnog stresa. Simultani ionski disbalans i mitohondrijske disfunkcije mogu dovesti do smrti stanica. Stanice su obično u mogućnosti da se brane protiv ROS oštećenja korištenjem intracelularnih enzima kako bi ROS zadržali na niskoj razini. Međutim, u vrijeme stresa i disfunkcije stanica, ROS razine se mogu povećati dramatično i uzrokovati značajno oštećenje stanica u tijelu.

Dakle, oksidativni stres značajno doprinosi patogenezi upalnih bolesti, kardiovaskularnih bolesti, karcinomu, dijabetesu, Alzheimerove-ovoj bolesti, mreni, autizmu i starenju. Antioksidansi mogu biti molekule koje mogu neutralizirati slobodne radikale prihvaćanjem ili donacijom elektrona kako bi se uklonili nespareni radikali. Antioksidativne molekule mogu direktno reagirati s reaktivnim radikalima i uništiti ih, a mogu i postati novi slobodni radikali, koji su manje aktivni, dužeg vijeka trajanja i manje opasani od tih radikala koje neutraliziraju. U posljednjih nekoliko godina, istraživanje antioksidansa dramatično raste zbog potencijalne koristi u prevenciji bolesti. Većina prirodnih antioksidansa dolazi iz voća, povrća, začina, žitarica i bilja koji mogu pomoći u zaštiti stanica od oksidativnog stresa i smanjuju rizik od kroničnih bolesti.[14]

Antioksidativna svojstva ovise o kemijskoj strukturi spoja. Položaj hidroksilne skupine i ostale značajke u kemijskoj strukturi su važni za antioksidativnu aktivnost i hvatanje slobodnih radikala.[15] Kumarini s fenolnim hidroksilnim skupinama pokazuju sposobnost hvatanja slobodnih radikala osobito reaktivnih kisikovih vrsta (ROS). Mnoštvo kumarina utječe na stvaranje i hvatanje reaktivnih kisikovih (ROS) i dušikovih vrsta (RNS) i na taj način djeluju kao antioksidansi, što uključuje niz različitih molekularnih mehanizama

djelovanja.[2] Antioksidansi inhibiraju LDL peroksidaciju i tako postaju terapijska strategija u sprječavanju i eventualnom liječenju ateroskleroze i srodnih oboljenja u ljudi. U ljudskom tijelu enzimski i ne-enzimski antioksidansi mogu neutralizirati štetno djelovanje slobodnih radikala i radikalno induciranih staničnih i molekularnih oštećenja. Poremećaj ove osjetljive ravnoteže između slobodnih radikala i antioksidansa može dovesti do oštećenja stanica i aktivirati karcinogenezu.[16]

Eskuletin (slika 3.d) je antioksidativni derivat kumarina koji inhibira ciklooksigenazu i lipooksigenazu. Eskuletin i 4-metileskuletin (slika 6.a) sinergistički djeluju s  $\alpha$ -tokoferolom u obrani od citotoksičnosti izazvane hidroperoksidom linoleinske kiseline, pri čemu važnu ulogu ima ortho-kateholna skupina na kumarinu. Eskuletin, 4-metileskuletin, fraksetin (slika 6.b) i 3,4-dihidroksicimetna kiselina (slika 6.c) pokazuju aktivnost hvatanja slobodnih DPPH<sup>•</sup> radikala. Antioksidans auraptin (slika 6.d) dokazano posjeduje kemopreventivni učinak na kemijski induciranu karcinogenezu.[14] Fraksin (slika 3.e) pokazuje sposobnost hvatanja slobodnih radikala i štiti stanice od vodikovog peroksida, te od posredovanog oksidativnog stresa.[6]



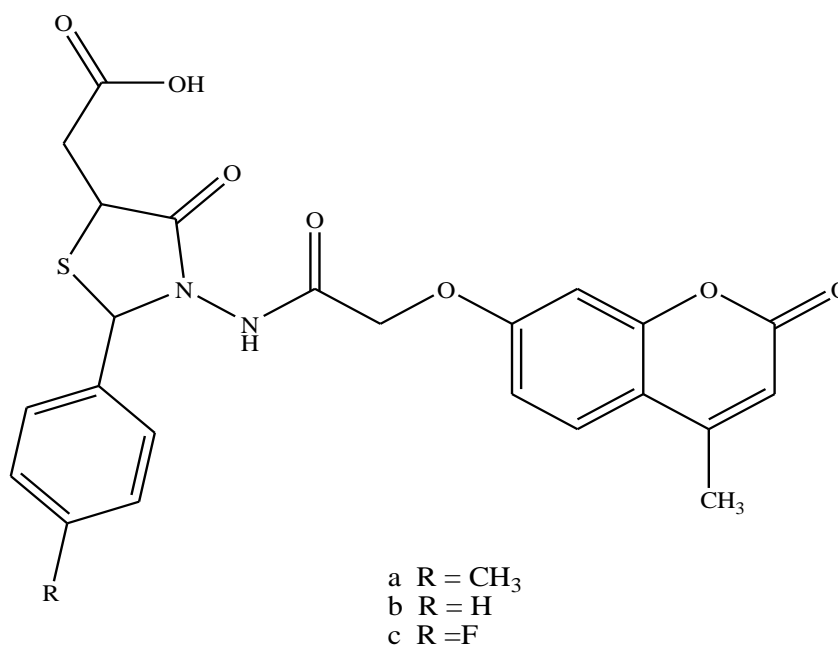
Slika 6. Strukture: a) 4-metileskuletina; b) fraksetina; c) 3,4-dihidroksicimetne kiseline;

d) auraptena

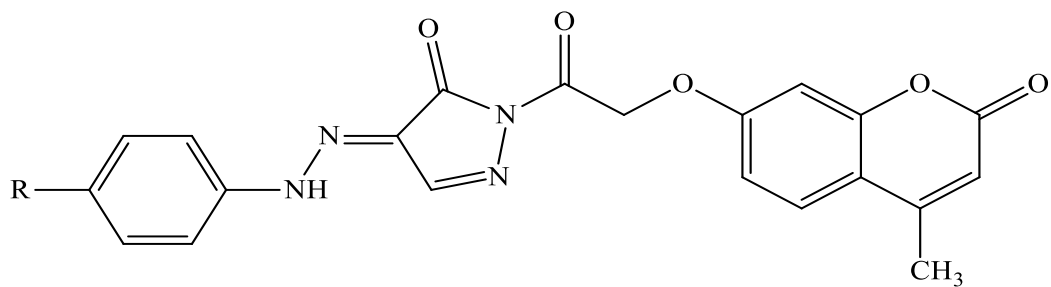
## 2.4. 7-hidroksi-4-metil kumarinski derivati

### 2.4.1. Biološka aktivnost

7-hidroksi-4-metilni derivati kumarina pokazuju antibakterijsku, antigljivičnu, antitumorsku, protuupalnu, antihipnotičku i antioksidativnu aktivnost.[17] Što se tiče antioksidativnih svojstava pokazuju jako vezivanje DPPH<sup>•</sup> radikala. U antigljivičnim testovima pokazuju aktivnost protiv gljivica *Aspergillus flavus*, *Aspergillus ochraceus*, *Fusarium graminearum* i *Fusarium verticillioides*. [18] 7-hidroksi-4-metil kumarinski derivati s pirazolskim, pirazolonskim, tiazolidin-4-onskim, 5-karboksimetil-4-tiazolidinonskim i 3-acetil-1,3,4-oksadiazolskim prstenom pokazuju antioksidativni i antitumorski potencijal. Spoj (b) na slici 7. je najbolji antioksidans jer ima najveću sposobnost hvatanja slobodnih radikala (95%). Taj spoj se može koristiti i kao sredstvo protiv tumora. Spoj (b) na slici 8. je dobar citotoksični agens protiv tumorskih stanica Daltonovog limfoma (DLA). Spojevi (b) na obje slike su vrlo dobri citotoksični agensi protiv Ehrlichov-ih tumorskih stanica (EAC).[16,19]



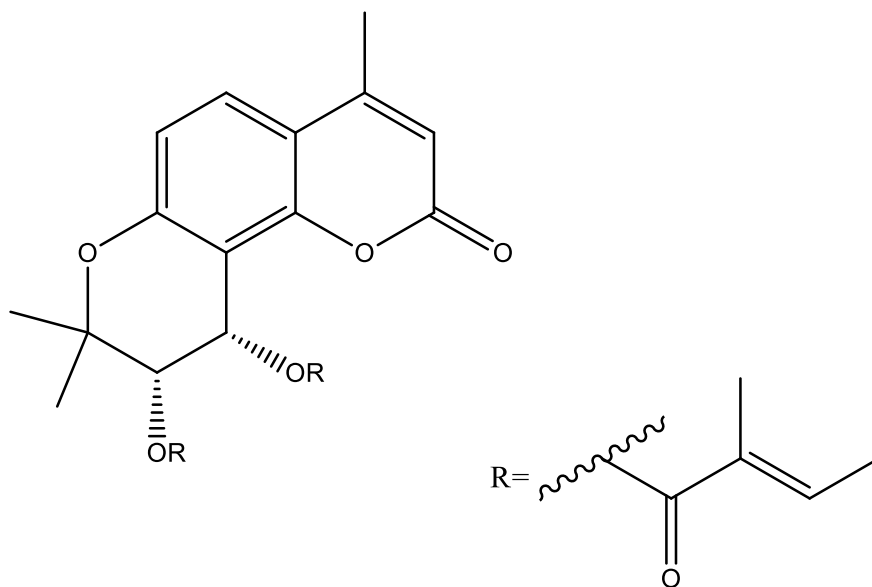
Slika 7. Struktura 2-fenil-3-(4-metilkumarinil-7-oksiacetamido)-5-karboksimetil-4-tiazolidinona.



- a R = CH<sub>3</sub>
- b R = H
- c R = F

Slika 8. Struktura 1-(4-metilkumarinil-7-oksiacetil)-3-metil-4-fenilhidrazono-2-pirazolin-5-ona

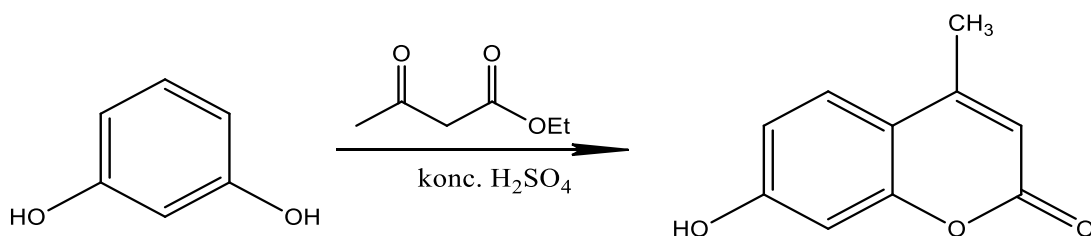
Spoj na slici 9. pokazuje inhibicijsku aktivnost protiv tumorskih stanica: HepG-2 (karcinom jetre), SGC-7901 (karcinom želuca) i LS174T (karcinom debelog crijeva). Posebno se pokazao djelotvoran protiv HepG-2 stanica.[20]



Slika 9. Struktura 4-metil-(3'S, 4'S)-*cis*-kellaktonskih derivata.

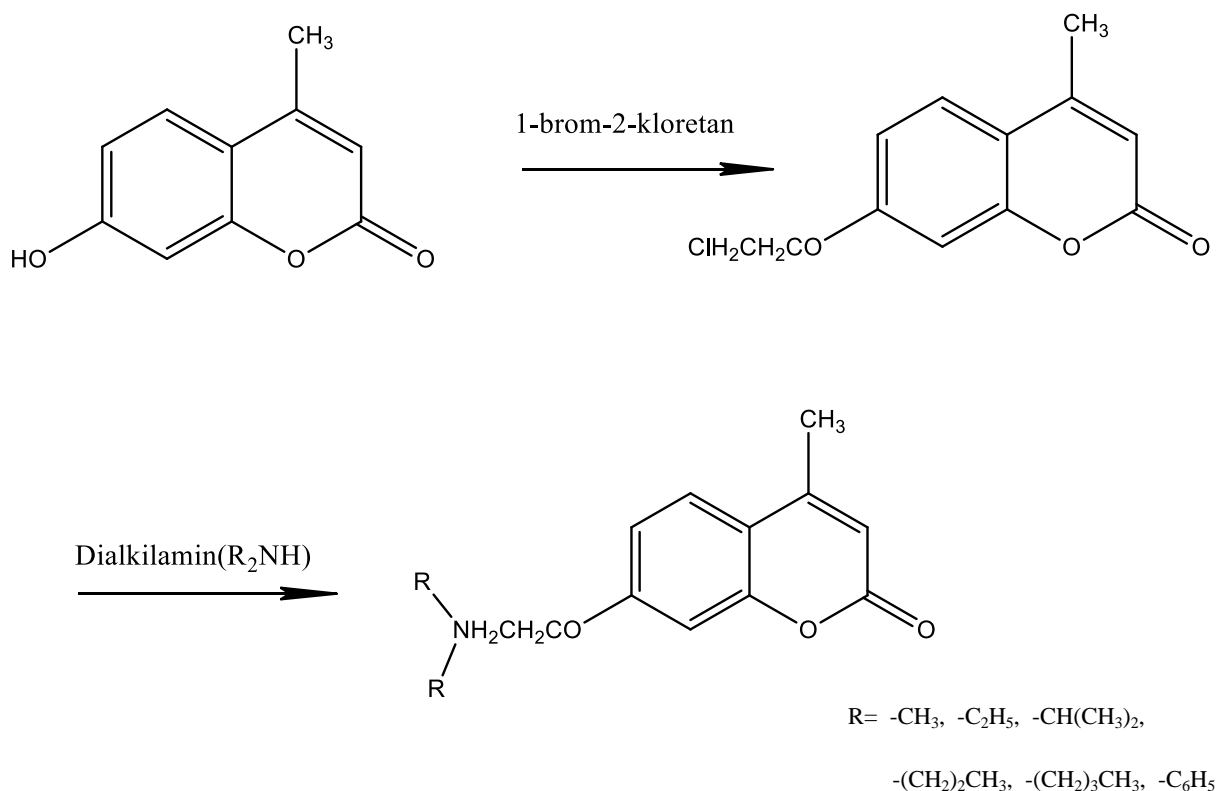
## 2.4.2. Sinteze kumarina

Za sintezu 7-hidroksi-4-metil kumarinske jezgre koristi se Pechmann-ova kondenzacija rezorcinola s etilacetoacetatom u prisutnosti koncentrirane sulfatne kiseline kao katalizatora (shema 9).[21]



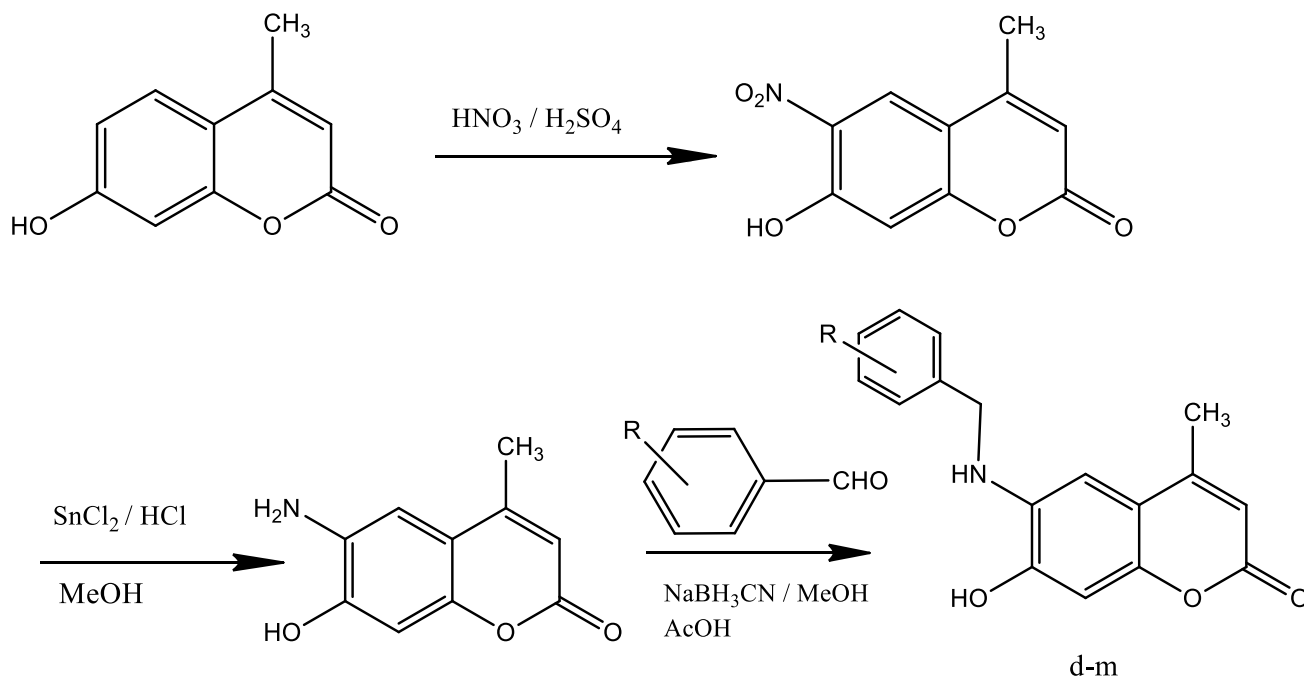
Shema 9. Sinteza 7-hidroksi-4-metil kumarinske jezgre.

Reakcijom 7-hidroksi-4-metil kumarinske jezgre s različitim sekundarnim aminima (shema 10.) dobiveni su spojevi koji imaju afinitet za dopamin i za 5-HT receptor (serotonin receptor). Ovim sintetiziranim spojevima je ispitana antipsihotična aktivnost te pokazuju blokiranje dopaminskih i 5-HT receptora. Dokazano je da ti spojevi imaju antipsihotičko djelovanje uz opuštanje (relaksaciju) mišića bez velikih dodatnih nuspojava kao što je krutost u mišićima koja se javlja kod standardnih lijekova.[21]



Shema 10. Sinteza 7-(2-(*N,N*-dialkil)aminoetoksi)-4-metil kumarinskih derivata

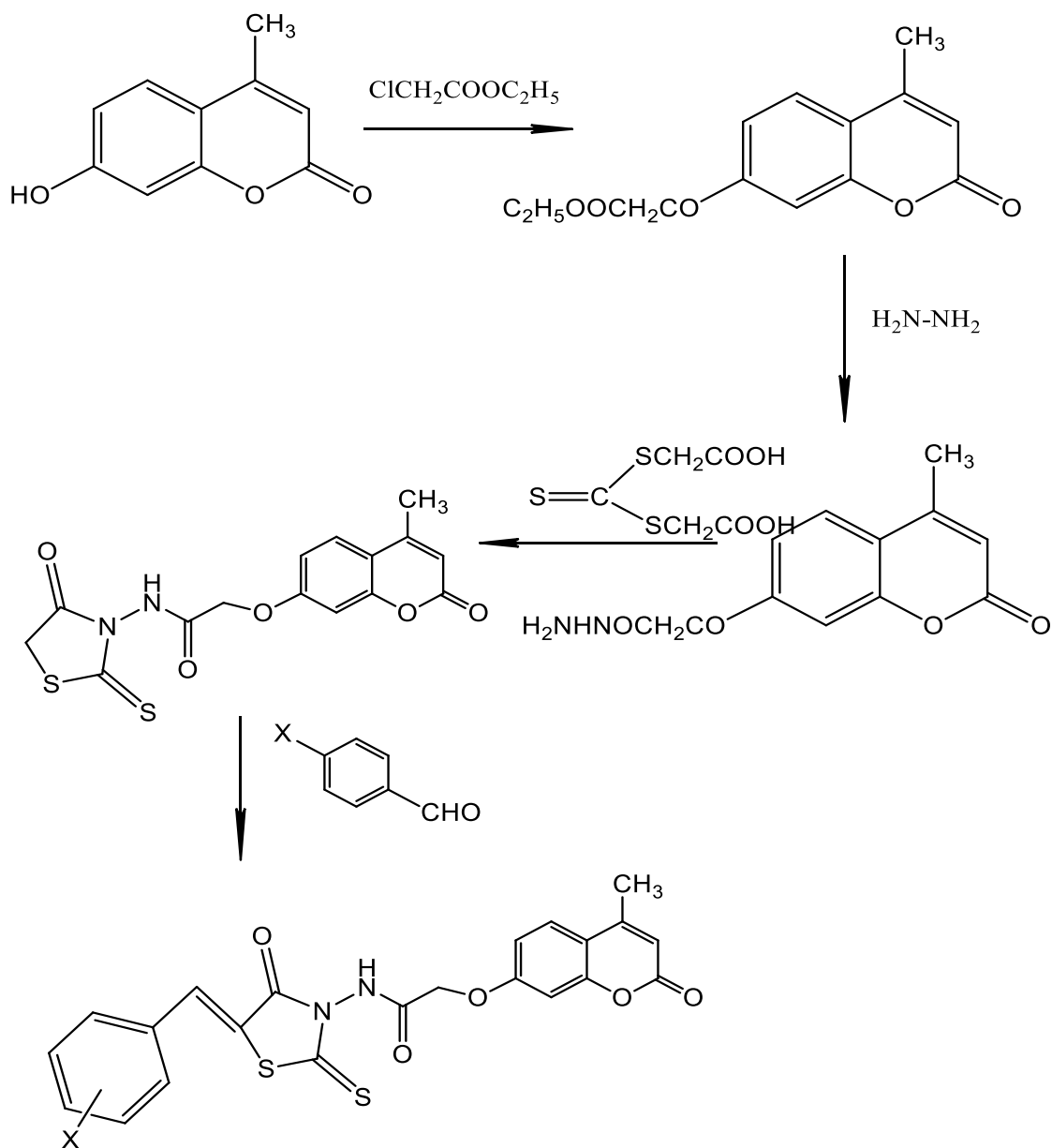
Na shemi 11. prikazana je sinteza 6-supstituiranih benzilamino-7-hidroksi-4-metil kumarinskih derivata koji su pokazali protuupalno djelovanje.[22]



- |   |                                |
|---|--------------------------------|
| d R= 4-OH                               | i R= 2-OCH <sub>3</sub> , 5-Br |
| e R= 4-NO <sub>2</sub>                  | j R= 3-OH, 4-OCH <sub>3</sub>  |
| f R= 4-N(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> | k R= 3-NO <sub>2</sub>         |
| g R= 4-NH-CO-CH <sub>3</sub>            | l R= 4-OH, 3-NO <sub>2</sub>   |
| h R= 4-Br                               | m R= 4-Cl, 3-NO <sub>2</sub>   |
| i R=2-OH, 5-Br                          |                                |

Shema 11. Sintaza 6-supstituiranih benzilamino-7-hidroksi-4-metil kumarinskih derivata

Na shemi 12. prikazana je sinteza derivata kumarina kojima je ispitana antibakterijska aktivnost. Spojevima n-v ispitano je djelovanje protiv *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* (gram-negativnim bakterijama), *Bacillus subtilis* i *Staphylococcus aureus* (gram-positivnih bakterija) pri koncentracijama od 0,1% do 0,2 %. Većina spojeva pri koncentraciji 0,1% pokazala su nisko antimikrobno djelovanje, ali pri koncentraciji od 0.2% su pokazali prosječnu aktivnost protiv gore navedenih bakterija.[17]



n	X= 4-N(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	s	X= 4-Br
o	X= 4-OH	t	X= 4-Cl
p	X= 4-OCH <sub>3</sub>	u	X= 2-NO <sub>2</sub>
r	X= 4-H	v	X= 4-NO <sub>2</sub>

Shema 12. Sinteza derivata kumarina s antibakterijskom aktivnošću

## 2.5. Metode za određivanje antioksidativne aktivnosti

### 2.5.1. Spektroskopske metode

Spektroskopske metode se oslanjaju na radikalske reakcije, kationske reakcije ili komplekse s antioksidativnim molekulama koje su u mogućnosti donirati vodikov atom.[23] Prednosti analitičkih tehnika su jednostavnost izvedbenog postupka, trajanje analize, biološka važnost i izvedba metode (osjetljivost, preciznost, točnost, granice detekcije). Određivanja koja se oslanjaju na fotometrijska mjerenja (DPPH, ABTS i FRAP testovi) su jednostavna i brza, a za izvođenje je potreban samo UV/Vis spektrofotometar, zbog čega se široko upotrebljava u antioksidativnim ispitivanjima.[24]

#### 2.5.1.1. DPPH metoda

Brza, jednostavna i jeftina metoda za mjerenje antioksidativnog kapaciteta koja uključuje korištenje slobodnih radikala 2,2-difenil-1-pikrilhidrazila (DPPH<sup>•</sup>). DPPH<sup>•</sup> ne dimerizira, kao što se događa kod većine slobodnih radikala. Metoda se koristi za testiranje sposobnosti spojeva u svrhu hvatanja slobodnih radikala ili kao donora vodika te za procjenu antioksidativnog djelovanja. DPPH metoda se temelji na redukciji DPPH<sup>•</sup>, stabilnog slobodnog radikala. Slobodni radikal DPPH<sup>•</sup> s neparnim elektronima daje maksimalnu apsorpciju pri 517 nm (ljubičasta boja). Kada antioksidansi reagiraju s DPPH<sup>•</sup>, stabilni slobodni radikal postaje sparen u prisutnosti donora vodika i reducira se u DPPH, a kao posljedica toga apsorbanacija se smanjuje i dolazi do nestanka ljubičaste boje (dekoloriranje). Dakle, smanjenje apsorbanacije linearno ovisi o koncentraciji antioksidansa. Učinak sredstva za vezanje DPPH je izračunat korištenjem sljedeće jednadžbe: DPPH vezujući učinak (%) ili postotak inhibicije =  $A_0 - A_1 / A_0 \times 100$ , gdje je  $A_0$  apsorbanacija kontrolirane reakcije, a  $A_1$  je apsorbanacija u prisustvu standarda.[23,24]

Spektrofotometrijska metoda s DPPH primijenjena je za određivanje antioksidacijske aktivnosti u voćnim sokovima i voćnim (guava) ekstraktima.[24]



### **2.5.1.2. ABTS metoda**

2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolin -6-sulfonska kiselina) radikal kation (ABTS<sup>•+</sup>) koji apsorbira pri 743 nm (plavkasto zelena boja) nastaje gubitkom elektrona preko atoma dušika iz ABTS. U prisutnosti Troloxa (standardni antioksidans) ili drugog vodik-donirajućeg antioksidansa, dušikov atom veže atom vodika, čime dolazi do dekoloriranja otopina. Spektrofotometrijska metoda temelji se na smanjenju apsorbancije ABTS radikal kationa i primjenjuje se za određivanje antioksidativne aktivnosti, primjerice u guava voćnim ekstraktima, u ekstraktima voća i povrća, u bezalkoholnim pićima, alkoholnim pićima, kavi i čaju.[24]

### **2.5.1.3. FRAP metoda**

FRAP metoda se osniva na redukciji antioksidansa 2,4,6-tri(2-piridil)-1,3,5-triazin kompleksnog željezovog iona (TPTZ). Vezanje Fe<sup>2+</sup> na ligand stvara vrlo intenzivnu tamnoplavu boju. Apsorbancija se može mjeriti testirajući količinu reduciranog željeza i može biti u korelaciji s količinom antioksidansa.

FRAP test ne mjeri tiolne antioksidanse, kao što je glutation. Metoda je karakterizirana brzom kinetikom (4-6 min), ali može doći do odstupanja. Neki polifenoli reagiraju mnogo sporije i zahtijevaju duže reakcijsko vrijeme za detekciju. Bakar ima prednost u odnosu na željezo u antioksidacijskom testu i kinetika reakcija s bakrom je brža nego u slučaju željeza.[24]

### **2.5.1.4. ORAC test**

Metoda mjeri antioksidativno vezanje kisika protiv peroksil-radikala. Fluorescein je korišten kao fluorescentna proba. Gubitak fluorescencije je pokazatelj opsega razgradnje, zbog reakcije s peroksil-radikalom. ORAC metoda se temelji na temperaturno osjetljivim reakcijama, stoga je bitna kontrola temperature. Antioksidativna aktivnost metanol ekstrakata guava voća određena je ORAC metodom.[24]

### **2.5.1.5. HORAC test**

HORAC test se temelji na određivanju antioksidativne sposobnosti protiv stvaranja hidroksil-radikala. U metodi se koristi Co(II) kompleks, a tehnika se oslanja na mjerenju metal-kelirajućeg djelovanja antioksidansa u uvjetima Fenton reakcija.[24]

#### **2.5.1.6. TRAP test**

TRAP test se temelji na određivanju antioksidativne sposobnosti hvatanja peroksil-radikala. Luminol-poboljšana kemiluminiscencija (CL) koristi se za praćenje reakcije koja uključuje peroksil-radikal. Luminol radikali (rezultat termičke razgradnje 2,2'-azobis(2-amidinopropan) dihidroklorida (AAPH)) daju CL signal. TRAP vrijednost je određena trajanjem vremenskog perioda u kojem uzorak suzbija kemiluminiscencijski signal, zbog prisutnosti antioksidansa.[24]

#### **2.5.1.7. PFRAP metoda**

PFTRAP metoda se temelji na sposobnosti reduciranja kalij fericijanida. Povećanje apsorpcije može se povezati sa smanjenom sposobnosti antioksidansa. Spojevi s antioksidativnim svojstvima reagiraju s kalij fericijanidom stvarajući kalij ferocijanidom. On reagira s željezovim trikloridom, dajući željezov ferocijanid, plavo obojeni kompleks, uz maksimalnu apsorbanciju na 700 nm.[24]

#### **2.5.1.8. CUPRAC test**

CUPRAC test se temelji na određivanju antioksidativne moći reduciranja bakra. Standardni antioksidansi su pomiješani s  $\text{CuSO}_4$  i neokuproinom. Nakon 30 minuta, apsorbancija se izmjeri na 450 nm. U testu,  $\text{Cu(II)}$  se reducira u  $\text{Cu(I)}$  djelovanjem elektron-donorskih antioksidansa.

CUPRAC analiza je gotova u nekoliko minuta za askorbinsku kiselinu, mokraćnu kiselinu, galnu kiselinu i kvercetin, a kod složenijih molekula zahtijeva 30-60 min.[24]

#### **2.5.1.9. Fluorimetrija**

Fluorescencija je emisija svjetlosti tvari koja je apsorbirala svjetlo ili drugo elektromagnetsko zračenje različite valne duljine. U većini slučajeva, emitirano svjetlo ima duže valne dužine, a time i manju energiju, nego apsorbirano zračenje. Fluorescentni test se koristi za određivanje antioksidacijskog sadržaja. Fluorescentna spektroskopija se primjenjuje za određivanje fenolnih spojeva u uljima. Fluorimetrijska metoda određivanja askorbinske kiseline temelji se na reakciji dehidroaskorbinske kiseline s *o*-fenilen diaminama. Intenzitet fluorescencije jako ovisi o pH vrijednosti, zato ta tehnika zahtijeva strogu kontrolu pH. Fluorescentnim testom izmjerena je brzina i opseg sterol oksidacije u lipidnom dvosloju.[24]

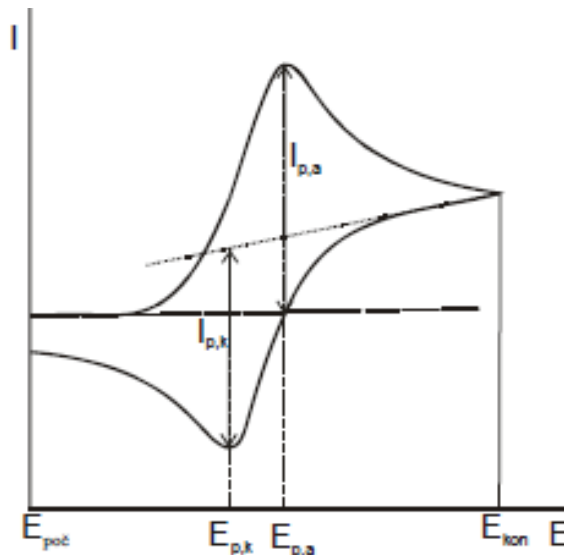
## 2.5.2. Elektrokemijske metode

Elektrokemijske metode se također primjenjuju za određivanje sadržaja antioksidansa i antioksidativne aktivnosti. Ciklička voltametrija i biamperometrija su najprimjenjivnije metode.[24]

### 2.5.2.1. Ciklička voltametrija

Ciklička voltametrija je vrsta potenciodinamičkih elektrokemijskih mjerenja. U cikličkim voltametrijskim eksperimentima potencijal radne elektrode povećava se linearno u ovisnosti o vremenu. Ciklički voltamogram (slika 10.) prikazuje ovisnost struje o naponu. Važni parametri dobiveni iz cikličkog voltamograma su intenzitet katodnog i anodnog vrha, potencijal anodne oksidacije i potencijal katodne redukcije. Ciklička voltametrija (CV), pokazuje da je prikladna metoda za kvantificiranje kapaciteta antioksidansa malih molekulskih masa kao što su krvne plazme, tkivni homogenati i biljni ekstrakti. Antioksidacijsko djelovanje suhih biljnih ekstrakta određeno je cikličkom voltametrijom sa staklastom ugljikovom radnom elektrodom. Zelenom čaju, crnom čaju, ružmarinu i kavi, testiran je ukupni antioksidativni kapacitet. Rezultati cikličko voltametrijskog određivanja antioksidativnog kapaciteta u heljdi pokazali su dobru korelaciju s podacima dobivenim spektrofotometrijskom metodom s ABTS<sup>•+</sup> i DPPH<sup>•</sup>.

Voltametrija nudi niske granice detekcije i to zahtijeva vrlo nisku koncentraciju uzorka. Zbog niske cijene potrebne opreme, kao i jednostavnosti izvedbe, voltametrija nudi alternativu titrimetrijskim ili instrumentalnim metodama, posebno u kontroli kvalitete hrane. Ne zahtijeva komplicirano, skupu opremu i kvalificirano osoblje kao što je slučaj kod kromatografije, niti je mukotrpa i dugotrajna poput prethodno spomenutih instrumentalnih tehnika.[24]



Slika 10. Ciklički voltamogram

### 2.5.2.2. Biamperometrijska metoda

Biamperometrijska metoda se temelji na mjerenju protoka struje između dvije jednake radne elektrode polarizirane malom potencijalnom razlikom i uronjene u otopinu koja sadrži reverzibilni redoks par. Čest redoks par odabran u biamperometrijskoj metodi je  $\text{DPPH}^\bullet / \text{DPPH}$ . Antioksidansi reagiraju s  $\text{DPPH}^\bullet$  (radikalna forma) stvarajući  $\text{DPPH}$  (reducirani oblik). Intenzitet kao rezultat struje proporcionalan je zaostaloj koncentraciji  $\text{DPPH}^\bullet$  nakon reakcije s analitom (antioksidansom). Koriste se dvije identične Pt ili ugljik-staklaste radne elektrode na kojima se događa redukcija  $\text{DPPH}^\bullet$  radikala i oksidacija reduciranog obilka ( $\text{DPPH}$ ).

Elektroda 1:  $\text{DPPH}^\bullet + e^- \rightarrow \text{DPPH}$

Elektroda 2:  $\text{DPPH} \rightarrow \text{DPPH}^\bullet + e^-$

Redukcija  $\text{DPPH}^\bullet$  na elektrodi 1 dovodi do katodne struje, a oksidacija  $\text{DPPH}$  na elektrodi 2 stvara anodnu struju.

U biamerometriji, kontrolirani parametar je razlika potencijala između dvije identične radne elektrode. Svakim dodavanjem antioksidansa u otopinu koja sadrži redoks par  $\text{DPPH}^\bullet / \text{DPPH}$  smanjuje se koncentracija oksidiranog (radikal) oblika i povećava koncentracija reduciranog oblika i tako nastaje struja koja je proporcionalna koncentraciji antioksidansa. Metoda je primijenjiva za određivanje ukupnog antioksidativnog djelovanja u voćnim sokovima, čaju, vinu i kavi.

Još jedan redoks par koristi se u biamperometrijskoj metodi, a to je ABTS<sup>+</sup>/ ABTS.[24]

### **2.5.3. Kromatografske metode**

Kromatografske metode se primjenjuju za odvajanje i detekciju antioksidansa, a koriste se prije spektrofotometrijskih ili elektrokemijskih procjena ukupnog antioksidativnog djelovanja.[24]

#### **2.5.3.1. Plinska kromatografija**

Plinska kromatografija (GC) je česta vrsta kromatografije koja se koristi za razdvajanje i analizu spojeva koji isparavaju bez raspada. Mobilna faza je obično neki inertni plin kao što je helij ili dušik. Stacionarna faza je mikroskopski sloj tekućine ili polimera na inertnom čvrstom nosaču. Antioksidativna sposobnost kurkuma ulja određena je kromatografskom metodom. Kurkuma ulje i njegove frakcije su analizirane pomoću plinske kromatografije s plameno ionizacijskim detektorom i plinske kromatografije povezane s masenom spektrometrijom. Kurkuma ulje i njegove frakcije su zatim testirani na antioksidativnu aktivnost spektrofotometrijskom metodom.[24]

#### **2.5.3.2. HPLC**

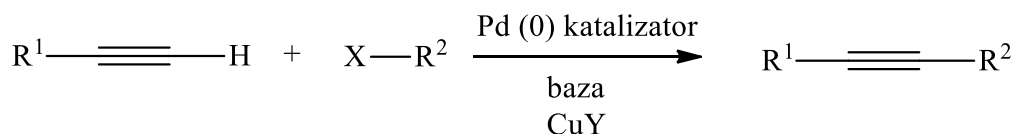
HPLC (tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti), upotrebljava različite vrste nepokretnih faza, pumpu koja pokreće mobilnu fazu i analit kroz kolonu, te detektor koji osigurava karakteristično vrijeme zadržavanja analita. Koristeći HPLC, antioksidativna aktivnost se temelji na radikal-vezujućoj 2,2'-azinobis-3-etilbenzotiazolin-6-sulfonskoj kiselini. Metoda je primijenjena za određivanje sadržaja antioksidansa u kavi.

Otopina ABTS radikal kationa je tamno plave boje, i bilo kakvo rashlađivanje rezultira gubitkom boje označenom s negativnim vrhom na HPLC-u.

HPLC metoda s fluorescentnim detektorom je razvijena za određivanje propil galata, butiliranog hidrokislanisola, terc-butilhidrokinona i oktil galata u jestivim uljima i hrani. Antioksidativna aktivnost ekstrakata iz kore odrasle biljke i ekstrakata iz korijena sadnica procijenjena je HPLC-om u kombinaciji s elektrokemijskom detekcijom.[24]

## 2.6. Sonogashira-ina reakcija

Otkrićem antivirusnog i antitumorskog djelovanja derivata kumarina težnja znanstvenika bila je optimirati i unaprijediti njihovu sintezu. Ubrzo je utvrđeno da reakcije potpomognute metalnim katalizatorima predstavljaju najefikasniji pristup stvaranju nove veze ugljik-ugljik.[25,26] Paladij kataliziranim reakcijama unakrsnog spajanja (Heck, Negishi, Suzuki, Sonogashira Stille, Tsuji-Trost) stvara se veza ugljik-ugljik kojom se molekule strukturno različitih reaktanata spajaju u novu kompleksniju molekulu. Danas se u svijetu Pd-katalizirane reakcije primjenjuju u određenom stupnju sintetskog procesa u proizvodnji gotovo 25% lijekova, a našle su primjenu u nano-tehnologijama i razvoju novih materijala. [27,28] Sonogashira-ina reakcija omogućuje sintezu supstituiranih alkina povezivanjem arilnih ili alkenilnih halogenida (ili triflata) i terminalnih alkina u prisutnosti paladija kao katalizatora, baze te bakrovog halogenida kao kokatalizatora (shema 13) [25,26] Omogućuje nastanak  $sp^2$ - $sp$  veze ugljik-ugljik i dobivanje enin- i arilalkin- konjugiranih veza koje se često susreću u prirodnim spojevima, farmaceuticima, biološki važnim molekulama, a predstavljaju i važne sintetske intermedijare.[29]

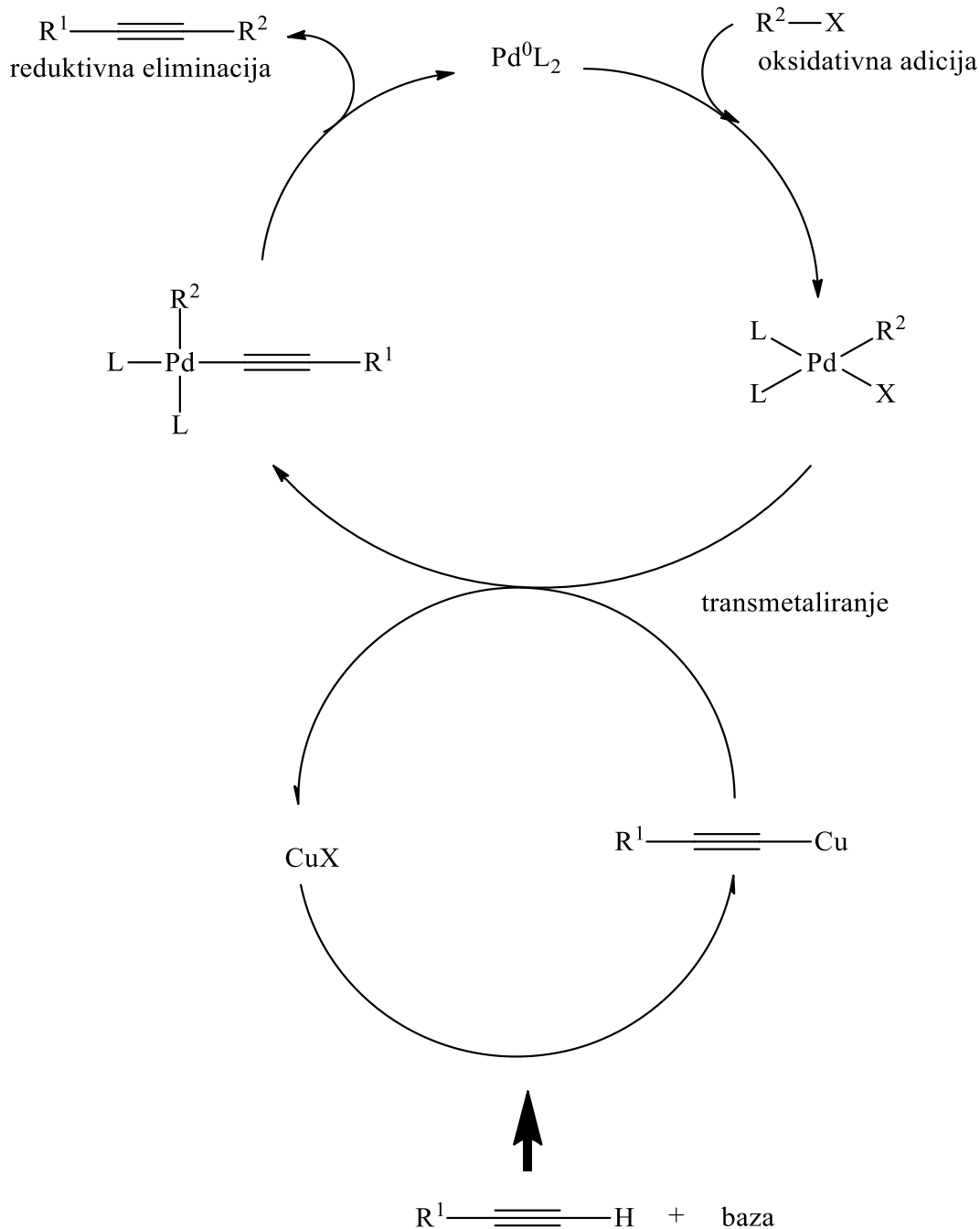


$R^1$  = aril, heteroaril, alkil  
 $R^2$  = aril, heteroaril, vinil  
 $X$  = I, Br, Cl, OTf  
 $Y$  = I, Br

Shema 13. Općeniti prikaz Sonogashira-ina reakcije

Mehanizam Sonogashira-ine reakcije (shema 14) temelji se na tri osnovna stupnja: oksidativna adicija, transmetaliranje i reduktivna eliminacija s time da nije u potpunosti razjašnjen. U prvom se stupnju na  $\text{Pd(0)L}_2$  kompleks (L = ligand) adira nezasićeni arilni ili vinilni halogenid, pri čemu nastaje planarni Pd(II) kompleks. Adicija je olakšana ako je smanjena elektronska gustoća na vezi C-X organohalogenida  $R^2\text{-X}$  zbog prisutnih elektron-odvlačećih supstituenata. U drugom stupnju dolazi do transmetaliranja nastalog paladijevog intermedijara. Dodatkom CuI dolazi do aktiviranja alkina, pri čemu nastaje bakrov-acetilid

koji reagira s paladijevim intermedijarom pri čemu nastaje kompleks paladija i alkin. Nakon reaktivne eliminacije regenerira se  $\text{Pd}(0)\text{L}_2$  kompleks i izolira se supstituirani alkin.[25]



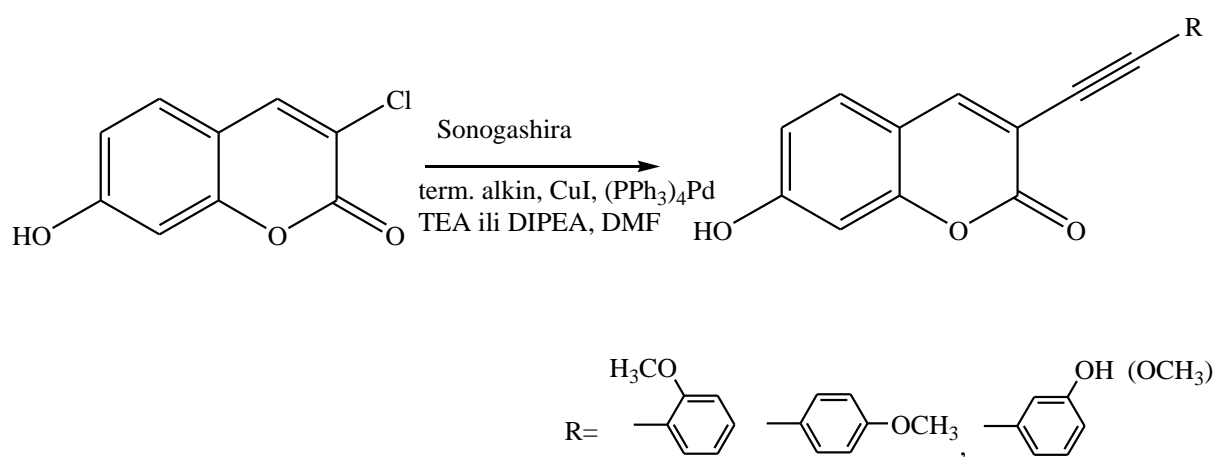
Shema 14. Mehanizam Sonogashira-ine reakcije.

Najčešće upotrebljavani paladijevi kompleksi su tris(dibenzilidenacetone)dipaladij ( $\text{Pd}_2(\text{dba})_3$ ) i bis(trifenilfosfin)paladij(II)-diklorid ( $\text{PdCl}_2(\text{PPh}_3)_2$ ) iz kojeg se redukcijom uz hidrazin dobije tetrakis(trifenilfosfin)paladij(0) ( $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$ ).  $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$  je fotosjetljiv i nestabilan u atmosferskim uvjetima. Njegovi nedostaci su otežano uklanjanje iz smjese produkata kao i povremena slaba reaktivnost koja je posljedica velikih liganada. Halogene

soli bakra koje se najčešće rabe kao kokatalizator su bakrov (I) jodid (CuI) i bakrov (I) bromid (CuBr). Kao baza se najčešće koriste trietilamin (Et<sub>3</sub>N), dietilamin (Et<sub>2</sub>NH), dipropilamin (Pr<sub>2</sub>NH) ili morfolin, dok se kao otapala najviše upotrebljavaju *N,N*-dimetilformamid (DMF), dimetilsulfoksid (DMSO), THF ili *N*-metilpirolidon (NMP).[30]

### 2.6.1 Sonogashira-ina reakcija u sintezi derivata kumarina

Aريلni ili alikilni supstituenti se na heterocikličke sustave mogu uvesti primjerice Sonogashira Pd-kataliziranim reakcijama. Sonogashira reakcijom 7-hidroksi-3-klorokumarina i terminalnih alkina u položaj 3 kumarinskog prstena uvedeni su feniletinilni supstituenti (shema 15). [27,28]



Shema 15. Sonogashira-ina reakcija u sintezi derivata kumarina



### 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.

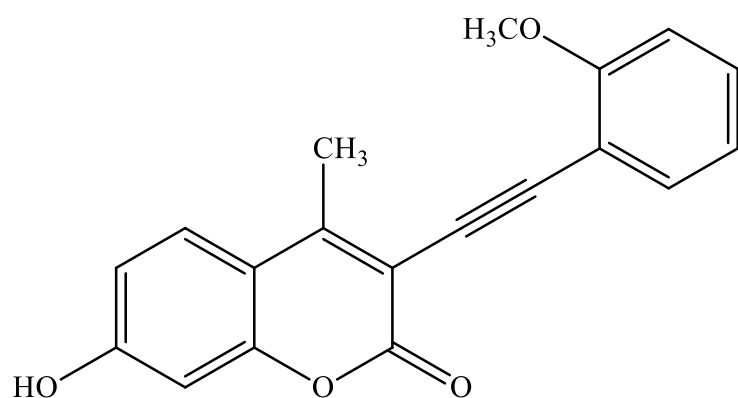
Tijek reakcije praćen je tankoslojnom kromatografijom (TLC), koja je provođena na pločama 60F-254 presvučenim slojem silikagela Merck u odgovarajućem sustavu otapala. Za detekciju izoliranih komponenata korištena je UV-svjetlost valne duljine 254 nm.

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 u odgovarajućem omjeru ili čisti diklormetan.

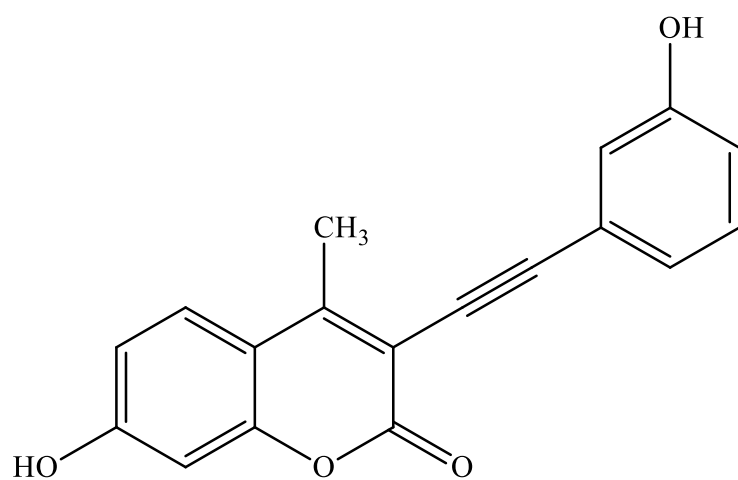
Spektri  $^1\text{H}$ - i  $^{13}\text{C}$ -NMR su snimljeni na spektrometru Bruker Avance 300 i 600 MHz. Svi su uzorci otopljeni u DMSO- $d_6$  i mjereni pri 298 K u NMR cjevčici promjera 5 mm. Kemijski pomaci ( $\delta$ ) u  $^1\text{H}$  i  $^{13}\text{C}$  NMR spektrima izraženi su u jedinicama ppm 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, inteziteta signala, multipliciteta signala i konstanti sprege H-H.

UV/Vis spektri snimljeni su na Varian Cary 50 spektrofotometru. Fluorescencijski emisijski spektri snimljeni su na Cary Eclipse spektrofotometru. U oba slučaja korištene su kvarcne kivete promjera 0,5 cm te volumena 3 cm<sup>3</sup>.

### 3.2. Pregled sintetiziranih spojeva



1



2

### 3.3. Priprava spojeva

#### 3.3.1. 7-hidroksi-3-klor-4-metil-3-(2-metoksifenil)etinil kumarin

Reakcijska smjesa 7-hidroksi-3-klor-4-metil kumarina (300 mg, 1,42 mmol), *ortho*-metoksifeniletina (0,28 mL, 2,14 mmol), tetrakistrifenilfosfinpaladija ((PPh<sub>3</sub>)<sub>4</sub>Pd) (164,5 mg, 0,14 mmol), bakrovog (I) jodida (53,8 mg, 0,28 mmol), trietilamina (0,4 mL, 2,85 mmol) u dimetilformamidu (10 mL) miješana je na sobnoj temperaturi tijekom 24 sata. Napredovanje reakcije praćeno je tankoslojnom kromatografijom. Nakon završetka reakcije otapalo je upareno pod sniženim tlakom, a sirovi produkt pročišćavan kromatografijom na koloni (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, zatim CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> : CH<sub>3</sub>OH = 80 : 1). Izolirana je frakcija s primjesom koja je ponovno pročišćavana kolonskom kromatografijom (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> : CH<sub>3</sub>OH = 150 : 1) pri čemu je izoliran čisti spoj **1** (m=26,6 mg, 6,10%, žuto ulje).

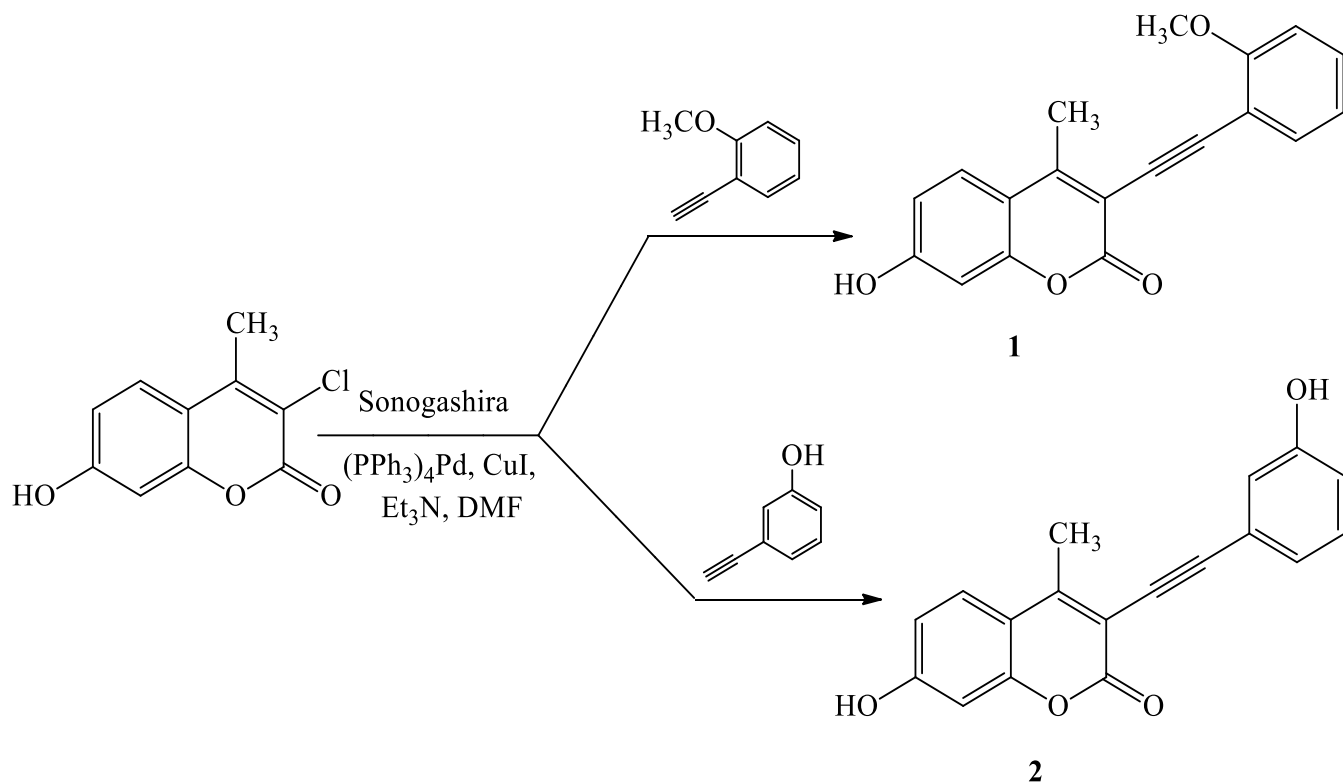
#### 3.3.2. 7-hidroksi-3-(3-hidroksifenil)etinil-3-klor-4-metil kumarin

Reakcijska smjesa 7-hidroksi-3-klor-4-metil kumarina (300 mg, 1,42 mmol), *meta*-hidroksifeniletina (0,23 mL, 2,14 mmol), tetrakistrifenilfosfinpaladija ((PPh<sub>3</sub>)<sub>4</sub>Pd) (164,5 mg, 0,14 mmol), bakrovog (I) jodida (53,8 mg, 0,28 mmol), trietilamina (0,4 mL, 2,85 mmol) u dimetilformamidu (10 mL) miješana je na sobnoj temperaturi tijekom 24 sata. Napredovanje reakcije praćeno je tankoslojnom kromatografijom. Nakon završetka reakcije otapalo je upareno pod sniženim tlakom, a sirovi produkt pročišćavan kromatografijom na koloni (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, zatim CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> : CH<sub>3</sub>OH = 60 : 1) pri čemu je izoliran čisti spoj **2** (m=222,5 mg, 48,76%, T<sub>t</sub> > 200°C).

## 4. REZULTATI I RASPRAVA

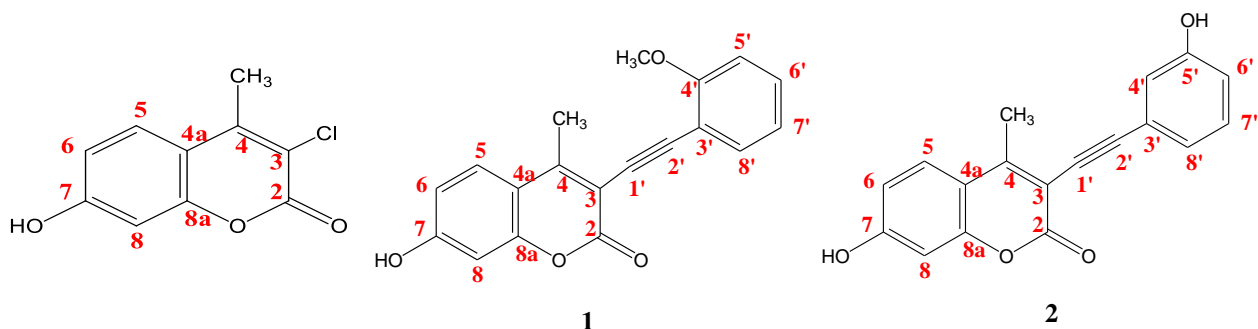
### 4.1. Sinteze spojeva

Sonogashira-inom reakcijom 7-hidroksi-3-klor-4-metil kumarina i terminalnih alkina uz tetrakistrifenilfosfinpaladij kao katalizator  $(PPh_3)_4Pd$ , CuI kao kokatalizator i uz bazu  $Et_3N$  u DMF-u pripravljeni su derivati kumarina **1** i **2** s hidroksi- i metoksi-feniletinilnim supstuentima u položaju 3 kumarinskog prstena (shema 1).



Shema 1. Sinteza spojeva **1** i **2**

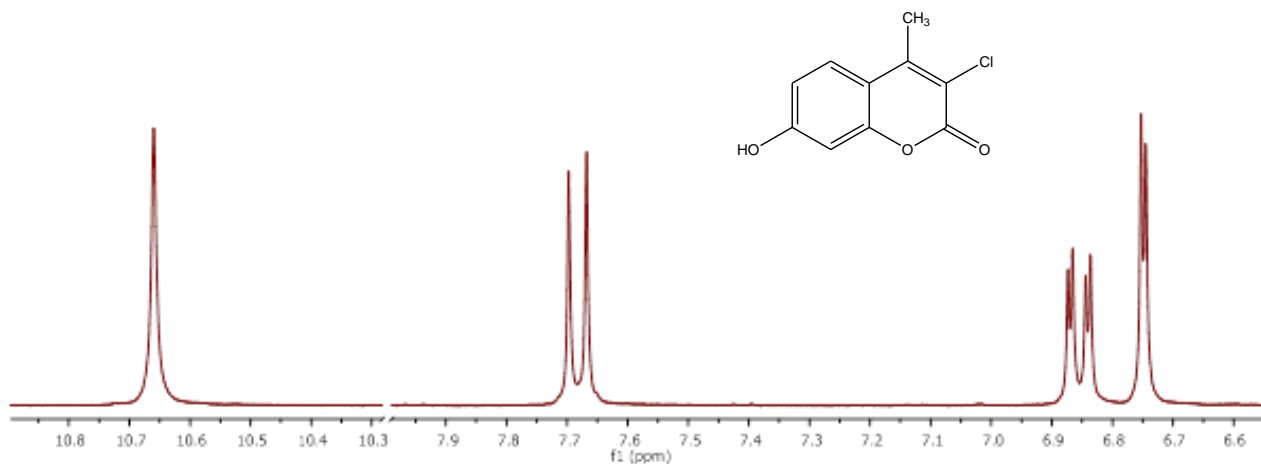
## 4.2. Strukturna karakterizacija spojeva $^1\text{H}$ i $^{13}\text{C}$ NMR spektroskopijom



Asigniranje  $^1\text{H}$  NMR spektara provedeno je na osnovu kemijskih pomaka, intenziteta signala, multipliciteta rezonancija te H-H konstanti sprega.

Spektri  $^1\text{H}$  NMR spojeva **1** i **2** 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.

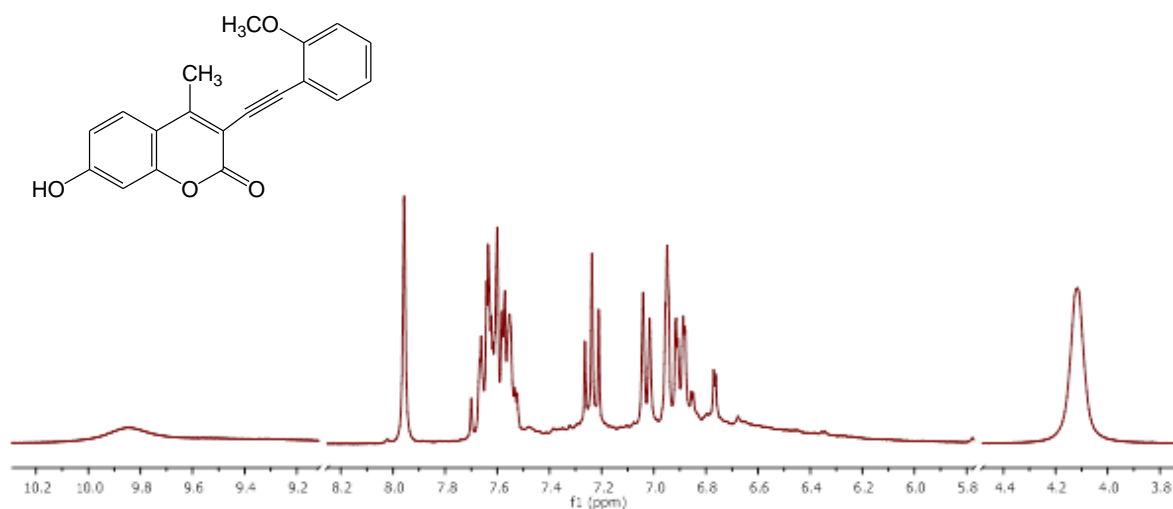
U  $^1\text{H}$  NMR spektru početnog spoja, 7-hidroksi-3-klor-4-metilkumarina (slika 1.) prisutni su signali: singlet za hidroksilni proton na 10,66 ppm intenziteta 1H, dublet intenziteta 1H za proton H-5 na 7,68 ppm ( $J = 8,8$  Hz), dublet dubleta za proton H-6 na 6,85 ppm intenziteta 1H, dublet intenziteta 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.  $^1\text{H}$  NMR spektar 7-hidroksi-3-klor-4-metilkumarina

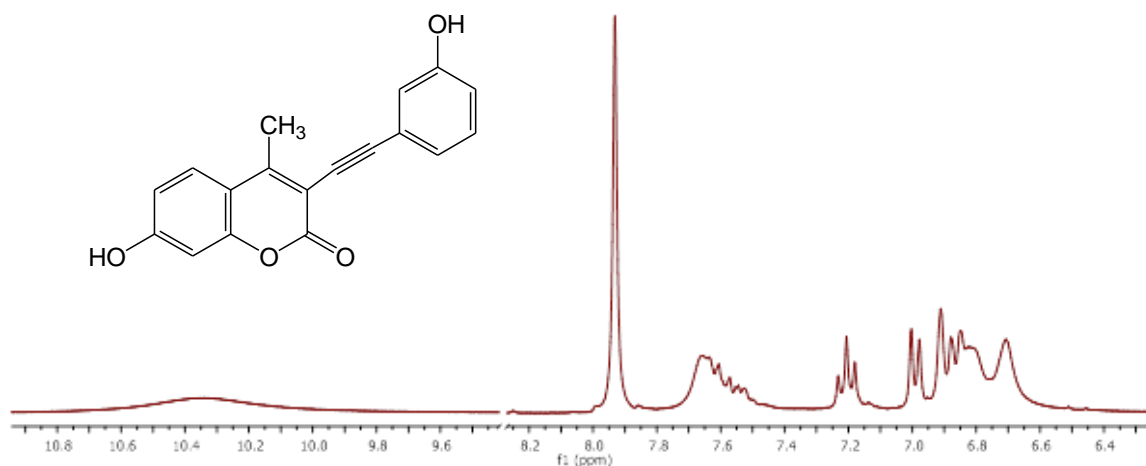
Usporedbom  $^1\text{H}$  NMR spektra početnog spoja (7-hidroksi-3-klor-4-metilkumarina) i spektra spoja **1** (slika 2.), uz signale za protone kumarinskog prstena prisutni su i novi signali

za fenilne protone u aromatskom području (H-5' 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.



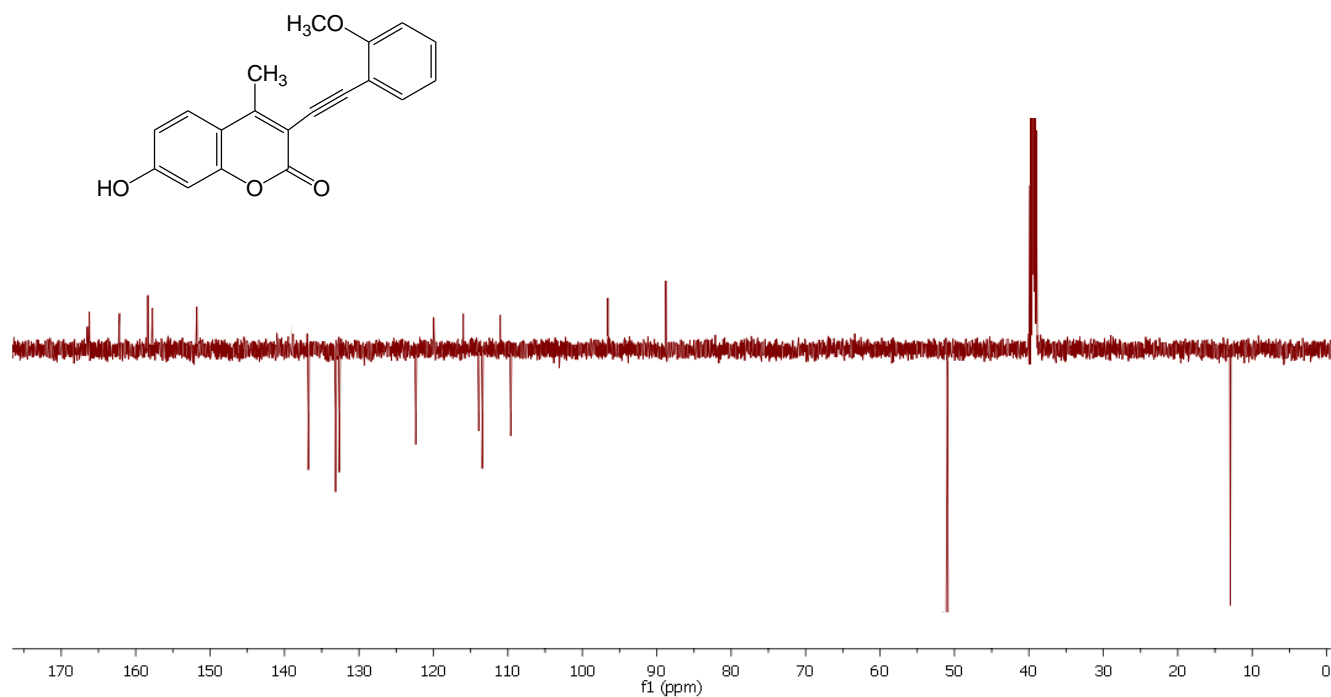
Slika 2. <sup>1</sup>H NMR spektar spoja 1

U <sup>1</sup>H NMR spektru spoja 2 (slika 3.) pored signala za protone kumarinskog prstena prisutni su signali za protone fenilnog supstituenta u položaju 3 kumarina u aromatskom području (H-4' na 7,98 ppm; H-6' na 7,62 ppm; H-7' na 7,24 ppm; H-8' na 6,85 ppm) i signal za hidroksilni proton u *m*-položaju fenilnog supstituenta na 9,85 ppm.



Slika 3. <sup>1</sup>H NMR spektar spoja 2

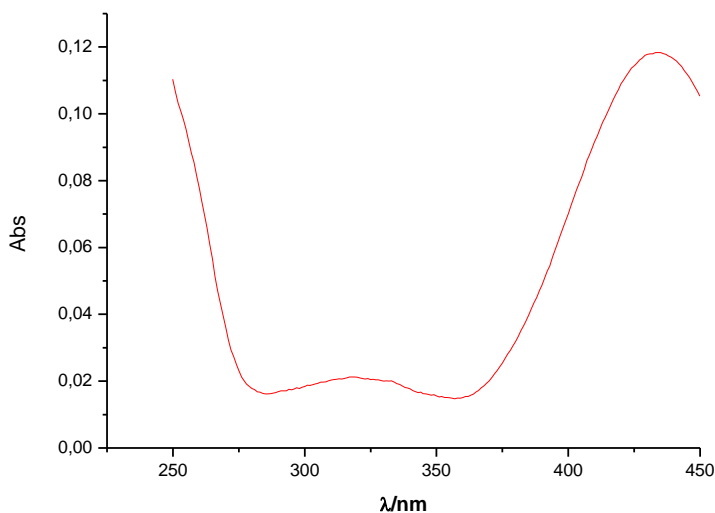
U  $^{13}\text{C}$  NMR spektru spoja **1** (slika 4.) prisutni su signali kumarinskog prstena u aromatskom području (C-4 na 164,8 ppm; C-7 na 162,2 ppm; C-2 na 158,8 ppm; C-8a na 151,6 ppm; C-4 na 132,4 ppm; C-4a na 120,0 ppm; C-6 na 113,1 ppm; C-3 na 111,3 ppm i C-8 na 110,0 ppm) i signal za metilni 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.



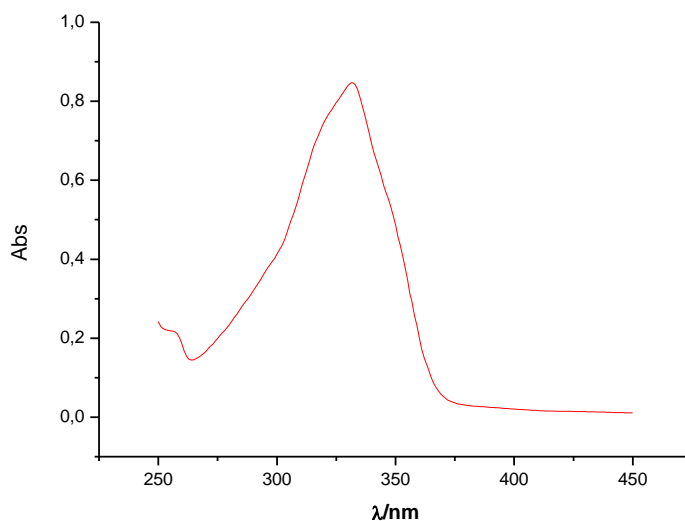
Slika 4.  $^{13}\text{C}$  NMR spektar spoja **1**

### 4.3. Spektroskopska karakterizacija spojeva UV/Vis i fluorimetrijskom spektroskopijom

Derivati kumarina **1** i **2** su spektroskopski okarakterizirani UV/Vis i fluorimetrijskom spektroskopijom, te su im određeni maksimumi apsorbancije, 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** ima izraženi maksimum na 435 nm (slika 5.), dok spoj **2** pokazuje maksimum apsorbancije na 332 nm (slika 6.).



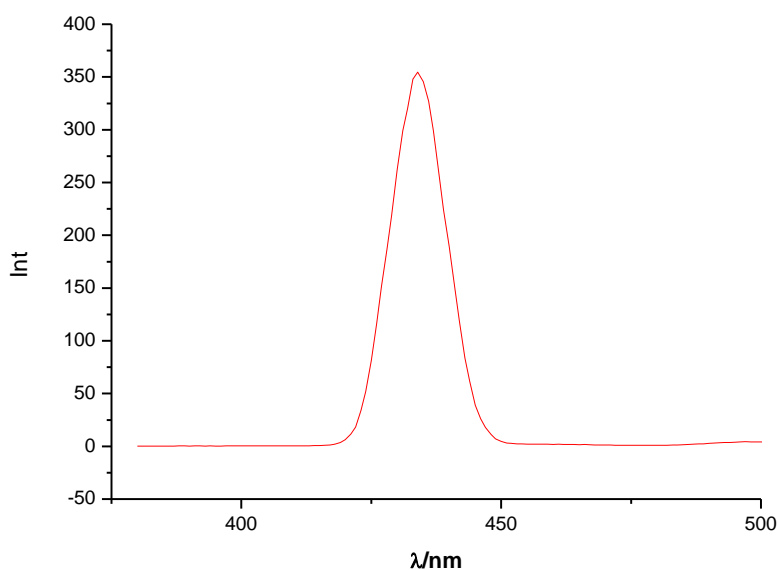
Slika 5. UV/Vis spektar spoja **1** ( $c = 2,0 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$ )



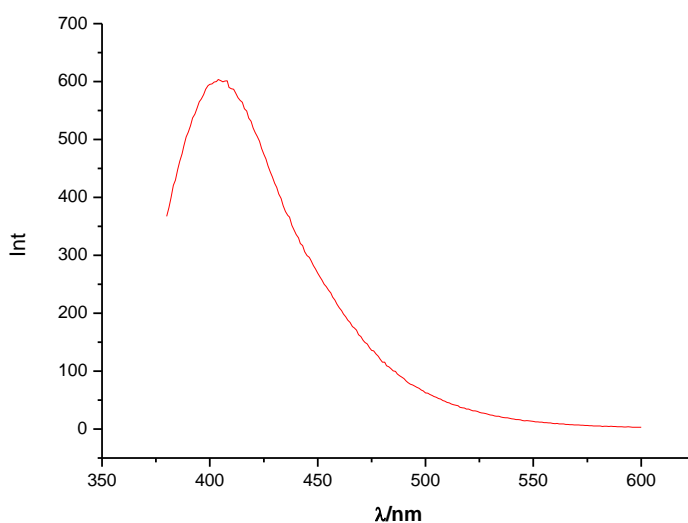
Slika 6. UV/Vis spektar spoja **2** ( $c = 2,0 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$ )



Fluorimetrijska spektroskopska ispitivanja provedena su zbog visoke osjetljivosti metode pri koncentraciji  $1 \times 10^{-6} \text{ mol dm}^{-3}$  za spoj **1** i za spoj **2** pri  $1 \times 10^{-8} \text{ mol dm}^{-3}$  u metanolu. Otopine pripremljenih spojeva su pobuđene svjetlošću valne duljine ekscitacije ( $\lambda_{\text{ex}}$ ) koja odgovara valnoj duljini maksimuma apsorpcije ( $\lambda_{\text{max}}$ ). Na slikama 7 i 8 su prikazani emisijski fluorimetrijski spektri spojeva snimani pri danoj koncentraciji u metanolu. Spoj **1** pokazuje najveći intenzitet emisije pri valnoj duljini 430 nm (slika 7.), dok spoj **2** pokazuje najveći intenzitet emisije pri valnoj duljini 410 nm.



Slika 7. Emisijski spektar spoja **1** ( $c = 1 \times 10^{-6} \text{ mol dm}^{-3}$ )



Slika 8. Emisijski spektar spoja **2** ( $c = 1 \times 10^{-8} \text{ mol dm}^{-3}$ )

#### 4.4. *In silico* analiza (PASS)

Biološka aktivnost spoja se može definirati kao interakcija spoja s biološkom metom u eksperimentalnoj metodi (*in vitro*), u životinjskom organizmu u predkliničkim ispitivanjima (*in vivo*) ili u ljudskom organizmu u kliničkim ispitivanjima.[31]

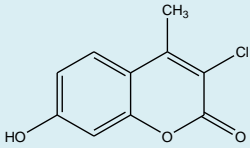
Osim toga, u novije vrijeme se rabi i *in silico* analiza koja podrazumijeva predviđanje i simulaciju biološke aktivnosti spojeva sofisticiranim kompjuterskim programima i algoritmima na temelju velike baze podataka enzima i drugih meta lijekova te drugih biološki aktivnih tvari. Takav način analize može značajno skratiti eksperimentalna istraživanja u laboratoriju, a samim time je i puno ekonomičniji.[32]

Predviđanje spektra aktivnosti spojeva (PASS, eng. Prediction of Activity Spectra for Substances) je računalni program koji može predvidjeti više od 3750 učinaka farmakoloških supstanci i biokemijske mehanizme na temelju strukturne formule tvari s prosječnom toksičnosti od 95 %. Primjenjuje se u predviđanju biološke aktivnosti kod sinteze i istraživanja novih lijekova, medicinskoj kemiji, određivanju odnosa strukture i aktivnosti (SAR) i medicini. Prednosti PASS metode su u tome što su kao ulazni podatak potrebne samo 2D strukture. Parametri ove metode predstavljaju biološki prostor i svojstva molekula u biološkom prostoru, za razliku od mnogih drugih deskriptora, koji odražavaju strukturna svojstva molekula. Mogu se koristiti za grupiranje spojeva prema svojim biološkim svojstvima, a ne prema njihovoj strukturnoj sličnosti. Predviđanja su brza, proračun spektra biološke aktivnosti za 10 000 spojeva na običnom računalu može trajati 5 minuta.[33]

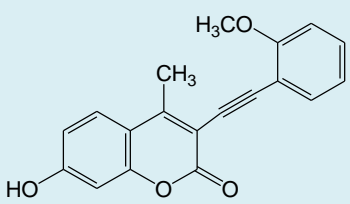
Predviđanja vjerojatnih bioloških meta i farmakoloških djelovanja (Tablice 1-3) izrađene su web-servisom PASS [34] koji se temelji na identifikaciji substrukturnih značajki tipičnih za aktivne molekule.

Spektar bioloških djelovanja početnog spoja 7-hidroksi-3-klor-4-metilkumarina i sintetiziranih spojeva **1** i **2** 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
0,933	0,005	agonist membranskog integriteta	0,675	0,006	antiparazitik
0,925	0,007	CYP2C12 supstrat	0,670	0,003	stimulans vezanja 5- hidroksitriptamina
0,915	0,004	inhibitor klordekon-reduktaze	0,666	0,004	antihelmintik
0,880	0,006	antiseboreik	0,682	0,025	inhibitor dehidro-L-gulonat-dekarboksilaze
0,856	0,006	inhibitor aldehid-oksidge	0,666	0,009	inhibitor ekspresije MMP9
0,859	0,014	inhibitor ubikvinol-citokrom-c-reduktaze	0,665	0,009	inhibitor NADPH-ferihemoprotein-reduktaze
0,829	0,002	akarikid (pesticid)	0,666	0,013	CYP2A supstrat
0,822	0,004	inhibitor nitrat-reduktaze	0,659	0,008	antimutagenik
0,787	0,003	Antihelmintik	0,661	0,012	inhibitor 4-nitrofenol 2-monooksigenaze
0,786	0,004	inhibitor tetrahidroksinaftalen-reduktaze	0,685	0,037	CYP2J2 supstrat
0,773	0,010	inhibitor ekspresije JAK2	0,673	0,029	inhibitor 5-O-(4-kumaroil)-D-kvinat-3'-monooksigenaze
0,771	0,009	inhibitor arilsulfat-sulfotransferaze	0,643	0,005	inhibitor vitamin-K-epoksid-reduktaze
0,767	0,010	inhibitor faktora D	0,652	0,014	inhibitor pumpi
0,765	0,014	inhibitor ekspresije HIF1A	0,648	0,013	CYP3A1 supstrat
0,762	0,017	inhibitor NADPH peroksidaze	0,656	0,022	inhibitor oksidoreduktaze
0,746	0,005	UGT1A6 supstrat	0,667	0,035	inhibitor glutamil endopeptidaze II
0,738	0,002	CYP2A5 supstrat	0,655	0,025	inhibitor fosfataze
0,737	0,005	opći anestetik	0,633	0,004	CYP2C18 supstrat
0,729	0,005	CYP2A4 supstrat	0,643	0,018	CYP3A2 supstrat
0,754	0,033	CYP2J supstrat	0,628	0,009	inhibitor otpuštanja 5-hidroksitriptamin
0,741	0,024	inhibitor permeabilnosti membrane	0,621	0,003	inhibitor cistationin beta-sintaze
0,714	0,007	inhibitor histidin-kinaze	0,627	0,010	inhibitor ekspresije AR
0,711	0,005	inhibitor p-benzokinon-reduktaze	0,625	0,010	CYP2A1 supstrat
0,715	0,014	inhibitor alkan 1-monooksigenaze	0,638	0,025	inhibitor 2-dehidropantoat-2-reduktaze
0,708	0,009	CYP2B5 supstrat	0,618	0,005	GST M supstrat
0,702	0,009	CYP2A6 supstrat	0,616	0,004	CYP2G1 supstrat
0,702	0,013	CYP2B6 supstrat	0,638	0,027	inhibitor glutation tiolesteraze
0,697	0,009	inhibitor inzulizina	0,636	0,026	stimulans rada bubrega
0,697	0,012	inhibitor peroksidaze	0,613	0,005	inhibitor aril-alkohol dehidrogenaze

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

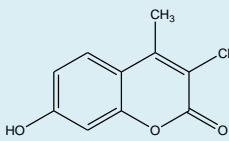
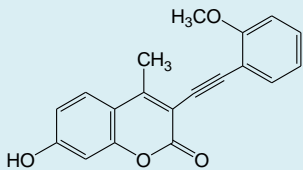
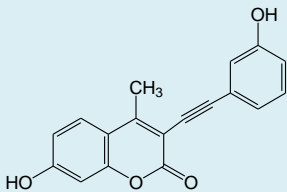
					
Pa	Pi	aktivnost	Pa	Pi	aktivnost
0,909	0,009	agonist integriteta membrane	0,672	0,010	CYP1A2 supstrat
0,904	0,011	CYP2C12 supstrat	0,688	0,027	fibrinolitik
0,891	0,010	inhibitor aspulvinon-dimetilaliltransferaze	0,674	0,021	inhibitor ekspresije JAK2
0,879	0,005	inhibitor aldehid-oksidade	0,664	0,016	inhibitor peroksidaze
0,857	0,010	inhibitor klordekon-reduktaze	0,655	0,008	CYP2A11 supstrat
0,827	0,013	antiekcematik	0,652	0,006	antiseptik
0,793	0,002	antagonist neurotransmitera	0,652	0,013	inhibitor 4-nitrofenol-2-monooksigenaze
0,796	0,005	CYP2A6 supstrat	0,643	0,008	antimutagenik
0,796	0,007	CYP1A supstrat	0,638	0,005	inhibitor 1-acilglicerol-3-fosfat-O-aciltransferaze
0,789	0,008	CYP2B6 supstrat	0,638	0,005	CYP2E1 supstrat
0,782	0,007	CYP2B supstrat	0,637	0,004	CYP2C18 supstrat
0,761	0,008	CYP2A supstrat	0,632	0,008	inhibitor otpuštanja histamina
0,755	0,004	inhibitor ekspresije MMP9	0,616	0,011	CYP1A1 supstrat
0,736	0,004	inhibitor otpuštanja 5-hidroksitriptamina	0,609	0,009	UGT1A6 supstrat
0,738	0,008	CYP2C8 supstrat	0,608	0,010	inhibitor p-benzokinon-reduktaze
0,732	0,010	inhibitor nitrat- reduktaze	0,609	0,012	CYP2C19 supstrat
0,723	0,010	CYP2C9 supstrat	0,610	0,015	stimulans MAP kinaze
0,716	0,007	inhibitor inzulizina	0,595	0,005	koleretik
0,717	0,018	inhibitor ekspresije HIF1A	0,591	0,003	inhibitor MAO
0,729	0,032	antiseboreik	0,647	0,063	inhibitor permeabilnosti membrana
0,744	0,052	inhibitor ubikvinol-citokrom-c- reduktaze	0,603	0,021	regulator metabolizma masti

**Tablica 3.** Najvjerojatnije ljudske i virusne biološke mete i učinci predviđeni PASS-om za spoj 2.

Pa	Pi	aktivnost	Pa	Pi	aktivnost
0,939	0,005	CYP2C12 supstrat	0,726	0,006	inhibitor kolestanetriol-26-monooksigenaze
0,932	0,005	agonist membranskog integriteta	0,764	0,045	inhibitor ubikvinol-citokrom-c reduktaze
0,900	0,004	inhibitor aldehyd-oksidadze	0,725	0,009	inhibitor peroksidaze
0,893	0,005	antiekcematik	0,720	0,008	CYP1A2 supstrat
0,880	0,005	CYP2B supstrat	0,718	0,013	inhibitor oskidoreduktaze
0,851	0,004	CYP2A6 supstrat	0,711	0,008	CYP2B5 supstrat
0,860	0,017	inhibitor aspulvinon dimetilaliltransferaze	0,705	0,006	CYP2A4 supstrat
0,841	0,013	inhibitor klordekon reduktaze	0,709	0,016	CYP2C supstrat
0,833	0,005	CYP1A supstrat	0,697	0,005	CYP2F1 supstrat
0,832	0,006	CYP2B6 supstrat	0,694	0,008	inhibitor pumpi
0,826	0,005	CYP2A supstrat	0,692	0,008	CYP2E supstrat
0,801	0,004	antimutagenik	0,690	0,008	CYP1A1 supstrat
0,783	0,002	antagonist neurotransmitera	0,694	0,023	inhibitor dehidro-L-gulonat-dekarboksilaze
0,783	0,008	inhibitor alkan-1-monooksigenaze	0,669	0,002	inhibitor MAO A
0,778	0,004	antiseptik	0,679	0,020	inhibitor ekspresije JAK2
0,793	0,020	antiseboreik	0,667	0,011	Stimulator ekspresije HMOX1
0,776	0,006	CYP2C8 supstrat	0,659	0,005	antihelmitik
0,776	0,007	inhibitor nitrat-reduktaze	0,661	0,008	CYP2A11 supstrat
0,761	0,004	inhibitor ekspresije MMP9	0,663	0,011	inhibitor 4-nitrofenol 2-monooksigenaze
0,771	0,022	inhibitor metilenetetrahidrofolat-reduktaze	0,653	0,010	stimulans MAP-kinaze
0,750	0,004	inhibitor p-benzokinon-reduktaze	0,644	0,007	UGT1A6 supstrat
0,758	0,015	inhibitor ekspresije HIF1A	0,644	0,009	CYP2E1 supstrat
0,742	0,004	inhibitor aril-alkohol-dehidrogenaze	0,644	0,016	regulator metabolizma masti
0,741	0,005	inhibitor inzulizina	0,652	0,025	inhibitor glutation-tiolesteraze
0,741	0,009	CYP2C9 supstrat	0,662	0,039	fibrinolitik

Usporedbom spektara predviđenih bioloških djelovanja PASS-om početnog spoja 7-hidroksi-3-klor-4-metilumarina i sintetiziranih spojeva **1** i **2** (Tablica 4) može se uočiti da svi spojevi pokazuju veliku vjerojatnost aktivnosti kao agonisti membranskog integriteta, supstrati CYP2C12, inhibitori kordekon-reduktaze, inhibitori aldehid-oksidge i djeluju kao antiekcemati.

**Tablica 4.** Najvjerojatnije ljudske i virusne biološke mete i učinci predviđeni PASS-om ( $P_a > 0,786$ ) za početni spoj i spojeve **1** i **2**.

								
Pa	Pi	aktivnost	Pa	Pi	aktivnost	Pa	Pi	aktivnost
0,933	0,005	agonist membranskog integriteta	0,909	0,009	agonist membranskog integriteta	0,939	0,005	CYP2C12 supstrat
0,925	0,007	CYP2C12 supstrat	0,904	0,011	CYP2C12 supstrat	0,932	0,005	agonist membranskog integriteta
0,915	0,004	inhibitor kordekon-reduktaze	0,891	0,010	inhibitor aspulvinon-dimetilaliltransferaze	0,900	0,004	inhibitor aldehid-oksidge
0,880	0,006	antiseboreik	0,879	0,005	inhibitor aldehid-oksidge	0,893	0,005	antiekcematik
0,856	0,006	inhibitor aldehid-oksidge	0,857	0,010	inhibitor kordekon-reduktaze	0,880	0,005	CYP2B supstrat
0,859	0,014	inhibitor ubikvinol-citokrom-c-reduktaze	0,827	0,013	antiekcematik	0,851	0,004	CYP2A6 supstrat
0,829	0,002	akarikid (pesticid)	0,793	0,002	antagonist neurotransmitera	0,860	0,017	inhibitor aspulvinon dimetilaliltransferaze
0,822	0,004	inhibitor nitrat-reduktaze	0,796	0,005	CYP2A6 supstrat	0,841	0,013	inhibitor kordekon reduktaze
0,787	0,003	Antihelminetik	0,796	0,007	CYP1A supstrat	0,833	0,005	CYP1A supstrat
0,786	0,004	inhibitor tetrahidroksinaftalen-reduktaze	0,789	0,008	CYP2B6 supstrat	0,832	0,006	CYP2B6 supstrat

## 5. ZAKLJUČCI

- Sonogashira-inom reakcijom 7-hidroksi-3-klor-4-metilkumarina s arilacetenima uz Pd-katalizator sintetizirani su 3-aril-7-hidroksi-4-metilkumarinski derivati **1** i **2**.
- Strukture novopripremljenih spojeva **1** i **2** potvrđene su  $^1\text{H}$  i  $^{13}\text{C}$  NMR spektroskopijom.
- Derivati kumarina **1** i **2** su spektroskopski okarakterizirani UV/Vis i fluorimetrijskom spektroskopijom, te su im određeni maksimumi apsorbancije, molarni ekstinkcijski koeficijenti i valne duljine emisije.
- *In silico* analiza (PASS) ukazuje da svi spojevi pokazuju veliku vjerojatnost aktivnosti kao agonisti membranskog integriteta, supstrati CYP2C12, inhibitori kordekon-reduktaze, inhibitori aldehid-oksidade i djeluju kao antiokcematici.
- Antiosidativna aktivnost novosintetiziranih spojeva ispitat će se cikličkom voltametrijom.

## 6. LITERATURA

- [1] K. Ajay Kumar, N. Renuka, G. Pavithra, G. V. Kumar, *J. Chem. Pharm. Res.*, 2015, **7**, 67-81.
- [2] M. Molnar, M. Čačić, *Croat. J. Food Sci. Technol.*, 2013, **3**, 55-64.
- [3] R.S. Keri, S. Budagumpi, R. K. Pai, R. G. Balakrishna, *Eur. J. Med. Chem.*, 2014, **78**, 340-374.
- [4] C. Kontogiorgis, A. Detsi, D. Hadjipavlou-Litina, *Expert Opin. Ther. Patents*, 2012, **22**, 1744-7674.
- [5] M. João Matos, L.Santana, E. Uriarte, O. A. Abreu, E. Molina, E. Guardado Yordi, *Phytochemicals - Isolation, Characterisation and Role in Human Health*, 2015, **1**, 113-140.
- [6] K. N. Venugopala, V. Rashmi, B. Odhav, *BioMed. Res. Int.*, 2013, **2013**, 1-14.
- [7] R. M. Mathur, *Trans. Faraday Soc.*, 1958, **54**, 1609-1612.
- [8] S. Kumar Chaudhuri, S. Roy, S. Bhar, *J. Org. Chem.*, 2012, **8**, 323-329.
- [9] F. Borges, F. Roleira, N. Milhazes, L. Santana, E. Uriarte, *Curr. Med. Chem.*, 2005, **12**, 887-916.
- [10] Monga P.K., Sharma D., Dubey A., *E-International Scientific Research Journal*, 2012, **4**, 2094-1749.
- [11] L. Xu, X.-Y. Zhao, Y.-L. Wu, W. Zhang, *Atlantis Press*, 2015, **9**, 135-138.
- [12] P. K. Jain, H. Joshi, *J. Appl. Pharm. Sci*, 2012, **2**, 236-240.
- [13] G. Louit, S. Foley, J. Cabillic, H. Coffigny, F. Taranc, A. Valleix, J. P. Renault, S. Pin, *Radiat. Phys. Chem.*, 2005, **72**, 119-124.
- [14] I. Kostova, S. Bhatia, P. Grigorov, S. Balkansky, V.S. Parmar, A.K. Prasad, L. Saso, Coumarins as Antioxidants, *Curr. Med. Chem.*, 2011, **18**, 3929-3951.
- [15] Shanthi V., Ramesh M., Srimai V., Srinivas P., Parthasarathy T., *Modern Chemistry*, 2013, **1**, 8-17.
- [16] R.G. Shinde, A.A. Khan, A. Barik, *International Journal of Medical and Applied sciences*, 2014, **3**, 165-184.
- [17] N.T. Cong, H.T. Nhan, L.V. Hung, T.D. Thang, P.-C. Kuo, *Molecules*, 2014, **19**, 13577-13586.
- [18] B. Šarkanj, M. Molnar, M. Čačić, L.Gille, *Food Chem.*, 2013, **139**, 488-495.
- [19] P. Manojkumar, T.K. Ravi, G. Subbuchettiar, *Acta Pharm.*, 2009, **59**, 159-170.
- [20] L. Ren, X. Du, M. Hu, C. Yan, T. Liang, Q. Li, *Molecules*, 2013, **18**, 4158-4169.
- [21] Arora P., Das S., Arora N., Gawai A., Baghel U.S., *International Journal of Pharmacy & Life Sciences*, 2010, **1**, 113-118.



- [22] R. El-Haggar, R. I. Al-Wabli, *Molecules*, 2015, **4**, 5374-5391.
- [23] Tailor C.S., Goyal A., *American Journal of Ethnomedicine*, 2014, **1**, 244-249.
- [24] A. M. Pisoschi, G.P. Negulescu, *Biochem. Anal. Biochem.*, 2011, **1**, 1-10
- [25] Agrofoglio L.A., Gillaizeau I., Saito Y., *Chem. Rev.*, 2003, **103**, 1875–1916.
- [26] Chinchilla R., Nájera C., *Chem. Soc. Rev.*, 2011, **40**, 5084–5121
- [27] M. Sahu et al. *Int. J. Pharm. Chem. Sci.* 2013, **2**, 1159.
- [28] T. Gazivoda Kraljević et al. *Tetrahedron Lett.* 2012, **53**, 5144
- [29] M.K. Samantaray, M.M. Shaikh, P. Ghosh, *J. Organomet. Chem.*, 2009, **694**, 3477–3486.
- [30] Agrofoglio L.A., *Chem. Rev.*, 2003, **103**, 1875–1881.
- [31] A. Lagunin, D. Filimonov, V. Poroikov, *Current Pharmaceutical Design*, 2010 (16) **1703**.
- [32] H. R. Noori; R. Spanagel, *In Silico Pharmacology*, 2013 (1) **1**.
- [33] <http://genexplain.com/pass>, 28.6.2016.
- [34] <http://www.pharmaexpert.ru/passonline/index.php>, 28.6.2016.

## **ŽIVOTOPIS**

Rođena sam u Zagrebu 5. veljače 1995. godine. Osnovnu školu završila sam 2009. godine u Zagrebu, a potom sam upisala i završila 3. gimnaziju u Zagrebu. 2013. godine upisala sam Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, smjer Primijenjena kemija. Stručnu praksu sam odradila na Institutu Ruđer Bošković, Zavod za kemiju materijala od 1. do 30.09.2015.