Sinteza i spektroskopska karakterizacija konjugata kumarina i piridina te njihovih metalnih kompleksa

Buljubašić, Marijana

Master's thesis / Diplomski rad

2023

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:149:247478

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2025-03-21**

Repository / Repozitorij:

Repository of Faculty of Chemical Engineering and Technology University of Zagreb

Sveučilište u Zagrebu

Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije

Sveučilišni diplomski studij

Marijana Buljubašić

DIPLOMSKI RAD

Zagreb, 2023.

Sveučilište u Zagrebu

Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije

Sveučilišni diplomski studij

Marijana Buljubašić

DIPLOMSKI RAD

Sinteza i spektroskopska karakterizacija konjugata kumarina i piridina te njihovih metalnih kompleksa

Voditelj rada: prof. dr. sc. Silvana Raić-Malić

Članovi povjerenstva:

1. Prof. dr. sc. Silvana Raić-Malić
2. Prof. dr. sc. Tatjana Gazivoda Kraljević
3. Doc. dr. sc. Petar Kassal

Zagreb, 2023.

Ovaj rad je izrađen na Fakultetu kemijskog inženjerstva i tehnologije, Zavod za organsku kemiju pod stručnim vodstvom prof. dr. sc. Silvane Raić-Malić.

Zahvaljujem svojoj mentorici prof. dr. sc. Silvani Raić-Malić na predloženoj temi i prilici da izradom diplomskog rada steknem brojna nova i korisna znanja. Hvala na strpljenju, pomoći i korisnim savjetima.

Zahvaljujem i asistentu Silviu Jakopecu na stručnom vodstvu, strpljenju, motiviranju, pomoći i brojim savjetima bez kojih izrada ovog diplomskog rada ne bi bila moguća.

Hvala svim djelatnicima i kolegama sa Zavoda organske kemije na ugodnoj atmosferi i kolegijalnosti koja je učinila rad u laboratoriju zabavnim ☺

Veliko hvala roditeljima, prijateljima i osoblju CB Godot za strpljenje i podršku tijekom cijelog školovanja.

SAŽETAK RADA

Sinteza i spektroskopska karakterizacija konjugata kumarina i piridina te njihovih metalnih kompleksa

Kumarinski derivati imaju brojnu primjenu u medicini kao spojevi s antikoagulacijskim, antimikrobnim, antikancerogenim, antioksidativnim te antivirusnim djelovanjem. Cilj ovog rada bila je sinteza potencijalno biološki aktivnih konjugata kumarina i piridina te njihovih metalnih kompleksa. U tu su svrhu pripravljeni azidni kumarinski prekursori **1-6** dvostupanjskom sintezom primjenom reakcije Pechmannove ciklizacije i reakcijom supstitucije, dok su *O*-propargilirani eteri kumarina **7** i **8** dobiveni jednostupanjskom sintezom primjenom reakcije *O*-alkiliranja. Navedeni spojevi su korišteni u *klik* reakciji Huisgenove 1,3-dipolarne cikloadicije katalizirane bakrom(I) kako bi se pripravili spojevi **11-18** s 1,2,3-triazolnom premosnicom između kumarinske jezgre i piridinskog prstena. Konjugati kumarina i piridina korišteni su, kao ligandi, u sintezi kompleksa s Ru(II) **19-26**. Strukture dobivenih kumarinskih derivata i njihovih kompleksa potvrđene su spektroskopijom ^{1}H i ^{13}C NMR, IR i UV/Vis. Kristalna struktura kompleksa **24** određena je difrakcijom X-zraka u jediničnom kristalu. Antiproliferativno djelovanje ispitano je na staničnim linijama karcinoma jetre (HepG2), dojke (MCF7), gušterače (PANC1), debelog crijeva (RKO) te normalnoj staničnoj liniji (HEK293).

Ključne riječi: biološka aktivnost, Huisgenova 1,3-dipolarna cikloadicija, kumarin, metalni kompleksi, 1,2,3-triazol

SUMMARY

Synthesis and spectroscopic characterization of coumarin and pyridine conjugates and their metal complexes

Coumarin derivatives are widely used in medicine as compounds with anticoagulant, antimicrobial, anticancer, antioxidant and antiviral effects. The aim of this work was the synthesis of potentially biologically active conjugates of coumarin and pyridine and their metal complexes. For this purpose azide coumarin precursors **1-6** were prepared by two step synthesis using Pechmann cyclization reaction and substitution reaction, while the terminal alkynes *O*-propargylated ethers **7** and **8** were prepared by one step- *O*-alkylation reaction. These compounds were used in a copper(I) catalyzed Husigen 1,3-dipolar cycloaddition *click* reaction to prepare compounds **11-18** with a 1,2,3-triazole bridge between the coumarin core and the pyridine ring. Coumarin and pyridine conjugates were used as ligands in the synthesis of complexes **19-26** with Ru(II). The structures of the obtained coumarin derivatives and their complexes were confirmed by ^{1}H and ^{13}C NMR, IR and UV/VIS spectroscopy. The crystal structure of complex **24** was determined by single-crystal X-ray diffraction. Antiproliferative activity was evaluated on liver (HepG2), breast (MCF7), pancreatic (PANC1), colon (RKO) and normal cell lines (HEK293)

Keywords: biological activity, Husgen 1,3-dipolar cycloaddition, coumarin, metal complexes, 1,2,3-triazole

POPIS KRATICA

ACN – acetonitril

$AgClO_4$ – srebrov perklorat

DMF – dimetilformamid

DMSO – dimetilsulfoksid

HEK293 (engl. *Human embryonic kidney 293 cells*) – stanice ljudskog embrionalnog bubrega

HepG2 (engl. *Human hepatocellular carcinoma*) – stanična linija raka jetre

MCF7 (engl. *Michigan Cancer foundation-7*) – stanična linija raka dojke

NaN_3 – natrijev azid

PANC1 (engl. *Pancreas ductal adenocarcinoma*) – stanična linija raka gušterače

$POCl_3$ – fosforil-klorid

RKO (engl. *Human colorectal adenocarcinoma*) – stanična linija raka debelog crijeva

SADRŽAJ

1. UVOD 1

2. TEORIJSKI DIO 3

2.1. Kumarini i derivati kumarina 4

2.1.1. Sinteza kumarina 5

2.1.2. Reaktivnost kumarina 8

2.1.3. Metalni kompleksi kumarina 9

2.1.4. Biološka aktivnost kumarina 11

2.1.5. Fluorescencijska svojstva kumarina 14

2.2. Triazoli 15

2.2.1. Sinteza 1,2,3-triazola 16

2.2.1.1. Huisgenova cikloadicija 17

2.2.1.2. Cikloadicija azida i alkina katalizirana bakrom(I) (CuAAC) 18

2.2.2. Metalni kompleksi 1,2,3-triazola 20

2.2.3. Biološka aktivnost 1,2,3-triazola 22

2.3. Kumarinski konjugati 1,2,3-triazola 24

3. EKSPERIMENTALNI DIO 27

3.1. Opće napomene 28

3.2. Pregled sintetiziranih prekursora i liganada 29

3.2.1. Pregled sintetiziranih prekursora **1-9** 29

3.2.2. Pregled sintetiziranih liganada **11-18** 30

3.3. Priprava konjugata kumarina i piridina **11-18** 32

3.3.1. 7-hidroksi-4-((4-(piridin-2-il)-1*H*-1,2,3-triazol-1-il)metil)kumarin (**11**) 32

3.3.2. 7-metoksi-4-((4-(piridin-2-il)-1*H*-1,2,3-triazol-1-il)metil)kumarin (**12**) 32

3.3.3. 7-hidroksi-4-((4-(piridin-2-il)-1*H*-1,2,3-triazol-1-il)metil)kumarin (**13**) 33

3.3.4. 7-metoksi-4-((4-(piridin-2-il)-1H-1,2,3-triazol-1-il)metil)kumarin (**14**) 33

3.3.5. 7-metil-4-((4-(piridin-2-il)-1*H*-1,2,3-triazol-1-il)metil)kumarin (**15**) 33

3.3.6. 4-(4-(piridin-2-il)-1H-1,2,3-triazol-1-il)kumarin (**16**) 34

3.3.7. 4-((1-(piridin-2-ilmetil)-1*H*-1,2,3-triazol-4-il)metoksi)kumarin (**17**) 34

3.3.8. 7-((1-(piridin-2-ilmetil)-1*H*-1,2,3-triazol-4-il)metoksi)kumarin (**18**) 35

3.4. Pregled sintetiziranih metalnih kompleksa **10a-10d** te **19-26**..... 36

3.4.1. Pregled sintetiziranih metalnih kompleksa paladija(II) **10a-10d** 36

3.4.2. Pregled sintetiziranih metalnih kompleksa rutenija(II) **19-26**..... 37

3.5. Priprava metalnih kompleksa konjugata kumarina i piridina..... 40

3.5.1. Pokušaj priprave metalnih kompleksa Pd(II) 40

3.5.1.1. Pd(11)Cl_2 (**10a**)..... 40

3.5.1.2. Pd(12)Cl_2 (**10b**)..... 40

3.5.1.3. Pd(13)Cl_2 (**10c**)..... 40

3.5.1.4. Pd(16)Cl_2 (**10d***)*..... 40

3.5.2. Priprava metalnih kompleksa Ru(II) 41

3.5.2.1. [Ru(11)(*p*-cimen)Cl]ClO_4 (**19**)..... 41

3.5.2.2. [Ru(12)(*p*-cimen)Cl]ClO_4 (**20**)..... 41

3.5.2.3. [Ru(13)(*p*-cimen)Cl]ClO_4 (**21**)..... 42

3.5.2.4. [Ru(14)(*p*-cimen)Cl]ClO_4 (**22**)..... 43

3.5.2.5. [Ru(15)(*p*-cimen)Cl]ClO_4 (**23**)..... 43

3.5.2.6. [Ru(16)(*p*-cimen)Cl]ClO_4 (**24**)..... 44

3.5.2.7. [Ru(17)(*p*-cimen)Cl]ClO_4 (**25**)..... 44

3.5.2.8. [Ru(18)(*p*-cimen)Cl]ClO_4 (**26**)..... 45

4. REZULTATI I RASPRAVA 46

4.1. Sinteza liganada 47

4.2. Sinteza metalnih kompleksa 50

4.3. Spektroskopska i kristalografska karakterizacija spojeva 53

4.3.1. Spektroskopija NMR 53

4.3.2. Spektroskopija UV/Vis i fluorimetrija 60

4.3.3. Spektroskopija IR 62

4.3.4. Analiza kristalne strukture 64

4.4. Biološka ispitivanja 66

5. ZAKLJUČAK 68

6. LITERATURA 70

7. PRILOZI 79

8. ŽIVOTOPIS 106

1. UVOD

Biljke koje sadrže kumarinske derivate korištene su od doba tradicionalne medicine, a interes za kumarinima u modernoj medicini započeo je prije više od dva stoljeća. Krajem 19. stoljeća opisana je sinteza kumarina Perkinovom reakcijom te su od tada razvijene brojne metode klasične organske sinteze kumarina. Kumarini su od posebnog interesa zbog njihove strukture heterocikličkog α-pironskog prstena s kondenziranom benzenskom jezgrom. Kumarinska osnova je konjugirani sustav bogat elektronima čime im je omogućeno stupanje u interakcije s različitim molekulama. Od prirodnih kumarinskih derivata koje nalazimo u prirodi, do sintetskih kumarinskih derivata, ovi spojevi pokazuju raznu primjenu i svojstva od čega je najzanimljivija njihova biološka aktivnost. Utvrđeno je antikoagulacijsko, antimikrobno, antikancerogeno, antioksidativno, antiviralno te razna druga djelovanja.

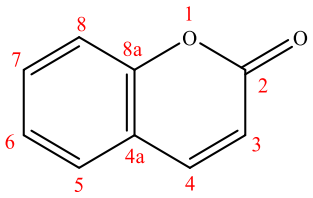
Usprkos napredcima moderne medicine, rak je danas učestala bolest te nisu razvijene metode sa stopostotnom učinkovitošću njegova izlječenja. Do pojave raka dolazi gubljenjem kontrole stanica nad dijeljenjem što rezultira nastankom abnormalne mase tkiva poznate kao tumor. Postignut je značajan napredak u razvoju novih lijekova i terapija koje olakšavaju i produljuju život pacijenata, no još uvijek se traži za novim rješenjima. Ustanovljeno je kako se kombiniranjem više bioaktivnih derivata dolazi do novih hibrida koji pokazuju zadovoljavajuća biološka djelovanja.

Sve je veći interes za primjenom *klik* reakcija u dizajnu novih biološki aktivnih tvari zbog lake dostupnosti sirovina, jednostavnosti reakcija, visokih iskorištenja i niskih troškova. Huisgenova 1,3-dipolarna cikloadicija katalizirana Cu(I) se pokazala vrlo efikasnom reakcijom za povezivanje azida i terminalnih alkina. Produkti reakcije su 1,4-disupstituriani 1,2,3-triazoli uz visoku regioselektivnost i iskorištenje. U okviru rada reakcijom cikloadicije azida i alkina katalizirane bakrom(I) sintetizirani su konjugati kumarina i piridina, dva značajna farmakofora, premoštena 1,2,3-triazolnom premosnicom koja također pokazuje biološku aktivnost. Time su dobivene nove molekule s potencijalnom biološkom aktivnošću. Koordinacijom s metalima nastoji se poboljšati farmakološke karakteristike te postići djelotvorna antitumorska aktivnost uz nisku toksičnost.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. Kumarini i derivati kumarina

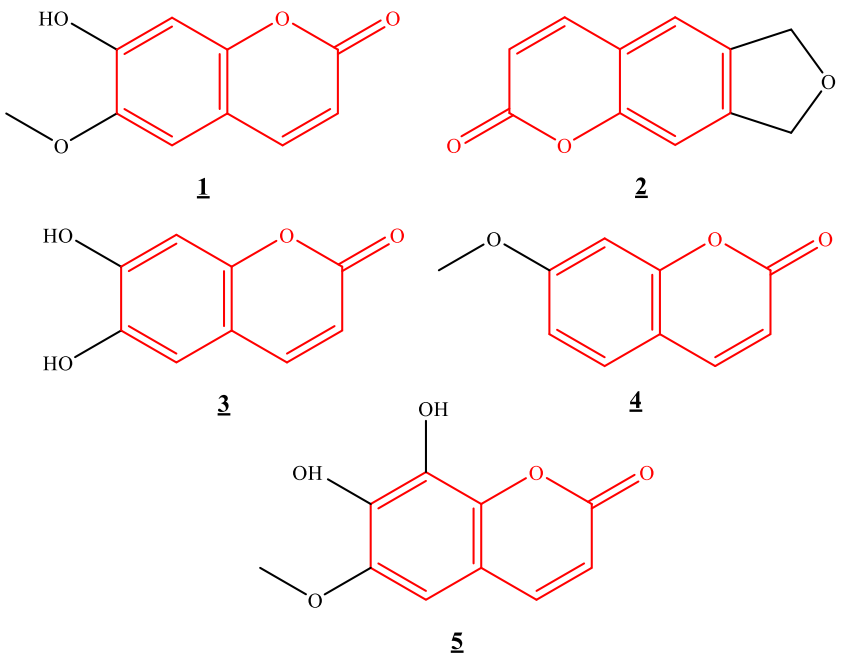
Kumarin (2*H*-kromen-2-on ili 2*H*-1-benzopiran-2-on)[1] je heterociklički spoj molekulske formule $C_9H_6O_2$. Na slici 1 prikazana je struktura kumarina.



Slika 1. Struktura kumarina

Derivati kumarina pripadaju skupini spojeva benzopironske strukture koja se sastoji od heterocikličkog α-pironskog prstena s kondenziranom benzenskom jezgrom. U strukturu je moguće uvesti supstituent na šest mogućih položaja, što omogućuje pripravu brojnih derivata. Konjugirani sustav bogat elektronima i dobra svojstva prijenosa naboja omogućuju im stupanje u interakcije s različitim molekulama i ionima zbog čega imaju raznovrsnu primjenu te se koriste parfemskoj industriji kao aditivi, industriji detergenata, kao laserska bojila te u medicini zbog antikoagulacijskog, antivirusnog, protuupalnog, antibakterijskog i antikancerogenog djelovanja.[2]

Spojevi kumarinske strukture široko su rasprostranjeni u prirodi te ih nalazimo u sastavu djeteline, lavande, cimeta, višnje, jagode i mnogih drugih biljaka, pri čemu daju miris biljkama, a također su pronađeni u metaboličkim produktima mikroorganizama i životinja. Uz izolaciju iz prirodnih izvora, kumarini se dobivaju sintetskim putem. Zanimanje za kumarinima započelo je prije više od dva stoljeća, a prvi je put izoliran 1820. godine iz biljke *Coumarouna odorata Aube*, po kojoj je i dobio ime.[3] U prirodi se u većim koncentracijama derivati kumarina nalaze u eteričnim uljima, poput ulja cimeta, ulja kineskog cimeta i lavandinog ulja. Biljke koje sadrže kumarinske derivate koristile su se u tradicionalnoj medicini prije više od tisuću godina.[4] U nastavku na slici 2 je struktura derivata kumarina izoliranih iz viših biljaka: skopoletin **1** (korijen i lišće koprive, radič), ajapin **2** (biljka suncokreta), eskuletin **3** (cikorija, mnoge ljekovite i otrovne biljke), herniarin **4** (*Herniaria glabra*) i fraksetin **5** (*Fraxinus rhynchophylla* i sjemenke *Datura stramonium*).[5]



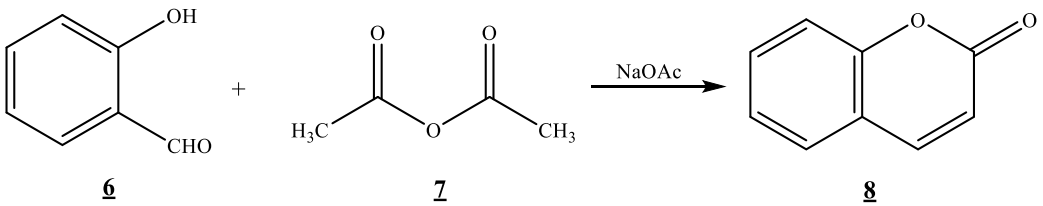
Slika 2. Struktura derivata kumarina izoliranih iz viših biljaka

2.1.1. Sinteza kumarina

Zbog izraženog biokemijskog i tehnološkog značaja kumarina te njegovih derivata, poznato je da se mogu izolirati iz prirodnih izvora ili dobiti sintetskim putem. Krajem 19. stoljeća opisana je sinteza kumarina Perkinovom reakcijom.[6] Od tada su razvijene brojne metode klasične organske sinteze kumarina koje obuhvaćaju već spomenutu Perkinovu reakciju, Pechmannovu kondenzaciju, Knoevenagelovu reakciju, Wittigovu reakciju te Kostanecki-Robinsovu reakciju.

Sve je veća osviještenost prema okolišu te se traže rješenja kojim bi se tijekom sinteze uštedio utrošak energije te izbjeglo korištenje štetnih reagensa. Tako je sve veći interes u primjeni tzv. *"zelene kemije"* čiji je cilj učinkovita sinteza produkata uz što veća iskorištenja pri malim utroškima energije i otapala, što rezultira manjom količinom nastalog otpada. Pristupi zelenoj sintezi kumarina obuhvaćaju sintezu potpomognutu mikrovalovima ili ultrazvukom, mehanokemijsku ili fotokemijsku sintezu. Sinteza potpomognuta mikrovalovima moderna je metoda zelene kemije koja omogućuje kraće vrijeme trajanja sinteze uz korištenje netoksičnih otapala, pri čemu se postiže velika selektivnost uz visoka iskorištenja.[7]

Perkinova reakcija prva je od metoda dobivanja kumarina sintetskim putem. Mehanizam obuhvaća reakciju aldolne kondenzacije, aromatskog *o*-hidroksibenzaldehida **6** i acetanhidrida **7** uz alkalnu sol (natrijev acetat, kalijev acetat ili trietilamin) kao katalizator pri povišenoj temperaturi. Pri tom nastaje *trans*-cimetna kiselina koja reakcijama izomerizacije i ciklizacije daje kumarin **8** kao konačni produkt (shema 1).[6]



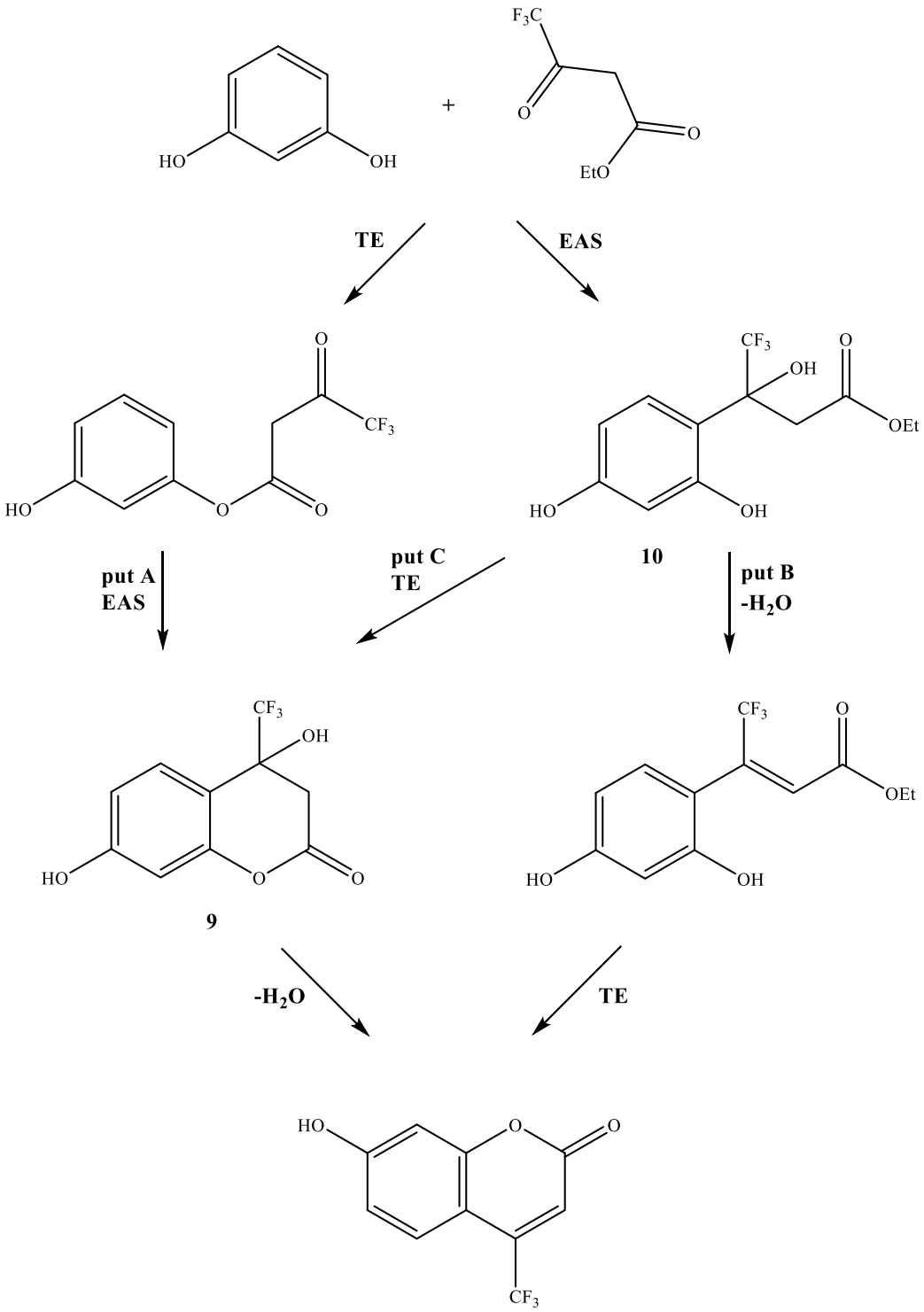
Shema 1. Sinteza kumarina Perkinovom reakcijom

Druga atraktivna metoda sinteze kumarina je Pechmannova kondenzacija. Reakciju su prvi put objavili Pechmann i Duisbergov 1883. godine te je često korištena zbog svoje jednostavnosti i uporabe jeftinih prekursora.[8] Pechmannova kondenzacija omogućuje sintezu kumarina reakcijom fenola sa β-ketoesterima. Za odvijanje reakcije potrebni su kiseli uvjeti uz katalitičko djelovanje Brønstedovih ili Lewisovih kiselina. Reakcija kondenzacija odvija se *"one-pot"* metodom te njen mehanizam nije do kraja razjašnjen, no poznato je da se odvija u tri stupnja koji uključuju:

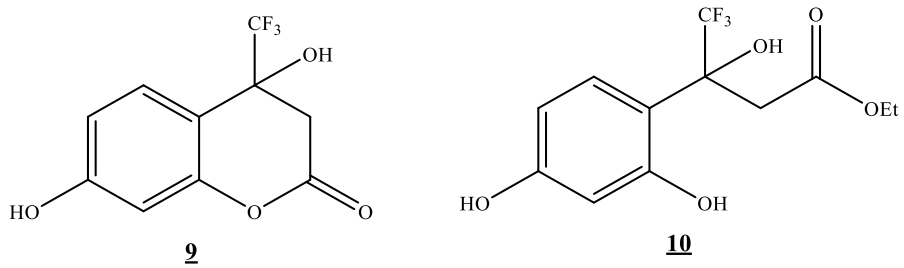
1. elektrofilnu aromatsku supstituciju (EAS),
2. reakciju transesterificiranja (TE, -EtOH) te
3. reakciju dehidratiranja (-H_2O).

Točan redoslijed kojim se odvijaju podjedini stupnjevi nije poznat. Predloženo je nekoliko mehanizama reakcije, na temelju kinetičkih eksperimenata za reakciju rezorcinola i etil-acetoacetata, no dosadašnja istraživanja nisu bila uspješna u dokazivanju mehanizma reakcije identifikacijom intermedijera.

U istraživanju Tyndalla i suradnika reakcija etil-4,4,4-trifluoroacetoacetata i rezorcinola s jodom kao katalizatorom u toluenu praćena je spektroskopijom NMR. Analizom signala u spektrima ^{19}F NMR utvrđeno je postojanje intermedijera **9** i **10** (slika 3), čim je potvrđen mehanizam nastajanja kumarina uz elektrofilnu aromatsku supstituciju i transesterifikaciju kao prvi korak u reakciji.[9] U nastavku na shemi 2 prikazani su mogući mehanizmi reakcijskih puteva u sintezi kumarina.



Shema 2. Mogući reakcijski putevi u sintezi kumarina Pechmannovom kondenzacijom



Slika 3. Struktura izoliranih intermedijera **9** *i* **10**

Daru i Stirling teoretski su proučili mehanizam Pechmannove reakcije za sintezu 7-hidroksi-4-metilkumarina te su utvrdili da su sva tri prethodno navedena puta sinteze kumarina jednakih vjerojatnosti odvijanja.[10]

2.1.2. Reaktivnost kumarina

Kumarinska strukturna jedinica sadrži kisikove heteroatome bogate elektronima te kondenzirani benzenski π-elektronski sustav. Navedene strukturne karakteristike omogućuju kumarinima izraženu reaktivnost te mogućnost stvaranja nekovalentnih međumolekulskh interakcija s biološkim metama, hidrofobnih interakcija, elektrostatskih interakcija, vodikovih veza te Van der Waalsovih sila. Također, struktura bogata elektronima omogućuje koordinaciju metalnih iona te stvaranje metalnih kompleksa.[11] Heterociklička struktura sadrži šest aktivnih mjesta pogodnih za odvijanje elektrofilne aromatske supstitucije što omogućuje postojanje brojnih derivata kumarina s brojnim primjenama, od čega je istaknuta primjena u medicini i biokemiji zbog antikoagulacijskog, antivirusnog, protuupalnog, antibakterijskog i antikancerogenog djelovanja. Kod kumarina reakcije aciliranja, nitriranja ili sulfoniranja, odnosno elektrofilne aromatske supstitucije uvijek se odvijaju na položaju C-6 na aromatskom prstenu.[12]

Kidwai i suradnici opisali su sintezu derivata kumarina po načelima zelene kemije. Dobiveni su kumarini fuzionirani s pirazolima, izoaksazolima i pirimidinima. Pri tom je sinteza provedena u vodenom mediju uz K_2CO_3 kao katalizator, čim je izbjegnuta primjena toksičnih reagensa i otapala. Korištenjem sinteze potpomognute mikrovalnim zračenjem, postignuti su visoki prinosi reakcija uz jednostavnu izolaciju iz vodenog medija.[13]

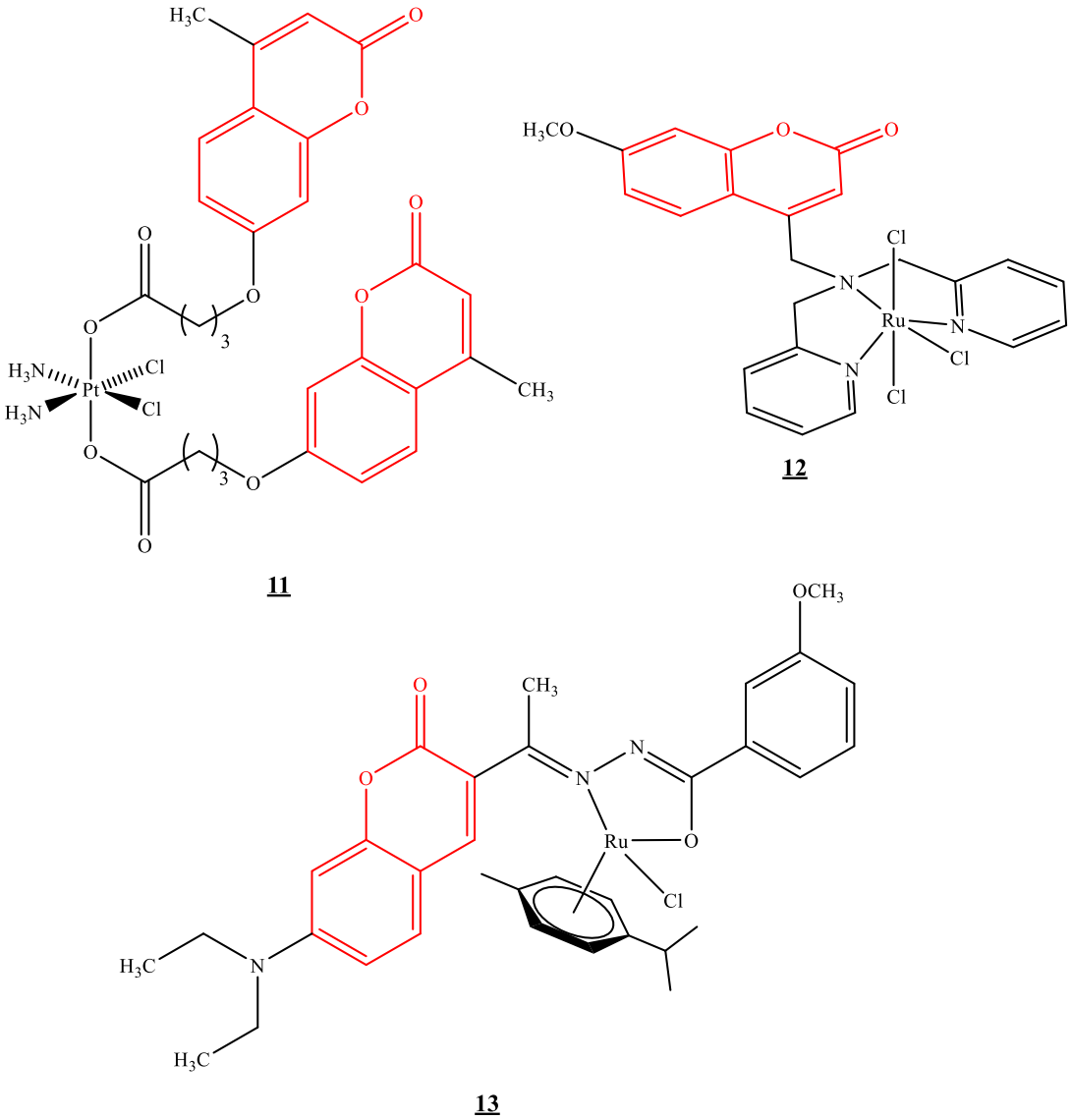
Pavić i suradnici proveli su sintezu hibrida harmina/β-karbolina i kumarina povezanih 1,2,3-triazolnom premosnicom. Sinteza je provedena cikloadicijom azida temeljenih na

harminu te kumarinskih i harminskih alkina uz bakar(I) kao katalizator. Rezultati pokazuju da hibridi harmina i kumarina pokazuju potencijal kao osnova za dizajn i sintezu novih citostatika s izraženim antitumorskim djelovanjem i niskom toksičnosti.[14]

2.1.3. Metalni kompleksi kumarina

Kumarinska jezgra izolirana iz prirodnih spojeva ili sintetizirana umjetnim putem pokazuje široki spektar biološke aktivnosti. Fizikalno-kemijska svojstva kumarina te njegova biološka aktivnost koordiniranjem s metalima daju metalne kompleksne znatno poboljšanih svojstava s aspekta farmakološke aktivnosti. Korištenjem kumarinskih liganda te metala kao što su kobalt, bakar, srebro, platina, cink, rutenij ili paladij, dobiveni su metalni kompleksi sa željenim svojstvima koja im omogućuju primjenu u medicini za liječenje raka te upotrebu kao fotosenzori u biološkim sondama.[15]

Balewski i suradnici dali su pregled metalnih kompleksa kumarina koji pokazuju antikoagulacijska, protuupalna, antioksidativna, antivirusna, antimikrobna te antikancerogena svojstva, a neki su pokazali inhibitorno djelovanje prema enzimima.[16] Na slici 4 prikazani su kompleksi **11**, **12** i **13** koji pokazuju antikancerogeno i antimikrobno djelovanje.



Slika 4. Struktura metalnih kompleksa **11**, **12** *i* **13** *s kumarinskom jezgrom*

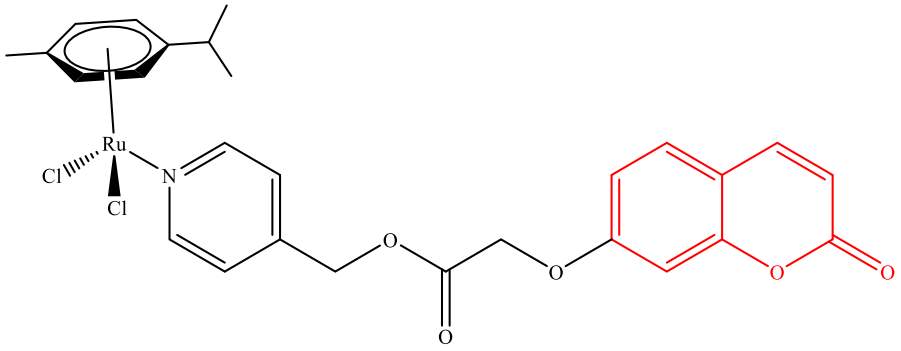
Wang i suradnici opisali su kompleks (**11**) platine(IV) s 7-hidroksikumarinskim ligandima. Ispitano je antitumorsko djelovanje kompleksa te je utvrđeno značajno citostatsko djelovanje. U tumorskim tkivima platina(IV) reducira se u ekvivalentnu količinu platine(II) što smanjuje oštećenje DNA molekula u zdravim stanicama te doprinosi selektivnom djelovanju.[17]

Gramni i suradnici opisali su kompleks (**12**) rutenija(III) s kumarinskim ligandom čiju strukturu su potvrdili kristalografski i masenom spektrometrijom. *In vitro* ispitivanja kompleksa pokazala su visoku citostatsku aktivnost na stanice raka vrata maternice uz vrijednost IC_{50} = 137 μM.[18]

Nongpiur i suradnici opisali su rutenijev(II) kompleks (**13**) te proveli ispitivanje antimikrobnog djelovanja. Rezultati ispitivanja pokazuju da navedeni kompleks ima visoku

aktivnost prema Gram-pozitivnim bakterijskim sojevima kao što su *Staphylococcus aureus* i *Bacillus thuringiensis*. Utvrđeno je da prisutnost elektron-donorskih skupina u strukturi kompleksa, poput OCH_3 ili $N(C_2H_5)_2$, poboljšava antimikrobno djelovanje.[19]

Zhao i suradnici opisali su tri „polusendvič“ kompleksa rutenija(II) i 7-hidroksikumarinskog liganda.[20] Kompleksi su pokazali veće citotoksično djelovanje protiv linija stanica raka koje su se koristile u testiranju nego slobodni ligandi. Najizraženiju citotoksičnost pokazao je kompleks **14** (slika 5). Povećana citotoksična aktivnost kompleksa ukazuje na kooperativni učinak metalnog iona i kumarinskog liganda te je utvrđeno da metalni kompleksi zaustavljaju stanični ciklus čime izazivaju smrt tumorskih stanica. Kompleksi mogu aktivirati ekspresiju Bax gena, inducirati oslobađanje citokroma C iz mitohondrija te aktivirati kaspazu-3 čime induciraju staničnu apoptozu mitohondrijskim putem. Istraživanje je pokazalo obećavajuće rezultate u dizajnu antitumorskih lijekova temeljenih na metalnim kompleksima Ru(II).



14

Slika 5. Struktura kompleksa **14**

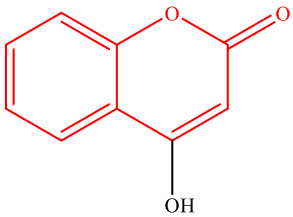
2.1.4. Biološka aktivnost kumarina

Kumarini su prirodni spojevi koji u svojoj strukturi sadrže šest položaja na kojima se može odviti supstitucija, što je uzrok strukturne raznolikosti kumarina te postojanja brojnih derivata. Kumarinski derivati često se nalaze u biljkama koje se koriste od davnina u tradicionalnoj medicini. Današnja istraživanja potvrdila su raznoliku biološku aktivnost kumarina i njegovih derivata koja obuhvaća antikoagulacijsko, antimikrobno, antifugalno, analgetsko, antikancerogeno, antioksidacijsko, estrogensko, diuretičko, inhibicijsko (inhibicija DNA-giraze, protein kinaze, enzimske aktivnosti u jetri i sl.), antiviralno te citostatsko djelovanje. Također, derivati kumarina nalaze se sve češće u formulacijama lijekova.

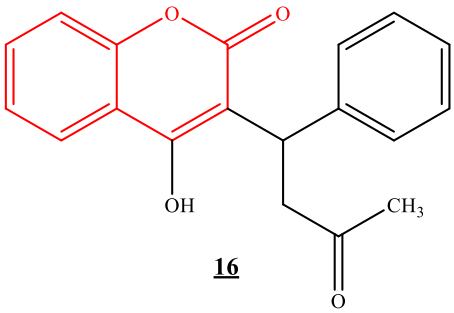
Biljni ekstrakti koji sadrže derivate kumarina koriste se kao biljni lijekovi te se danas istražuju njihova biološka svojstva. Utvrđeno je da kumarini supstituirani fenolnim skupinama pokazuju sposobnost hvatanja slobodnih radikala, posebno reaktivnih kisikovih vrsta. Veliki broj kumarina utječe na formiranje i hvatanje reaktivnih kisikovih radikala te na taj način djeluju kao antioksidansi. 7-hidroksikumarin **15** (slika 6) je prirodni derivat te ljudski metabolit koji ima važnu ulogu kao antioksidans u ljudskoj prehrani.[21]

Zgrušavanje krvi kod ljudi je jedan od vodećih problema koji može uzrokovati zastoj srca stvaranjem krvnih ugrušaka. Molekula vitamina K važno je koagulacijsko sredstvo u organizmu. Antikoagulacijsku aktivnost pokazuje varfarin **16**, molekula s kumarinskom prstenom (slika 6). Varfarin ima strukturu sličnu vitaminu K te inhibira zgrušavanje krvi blokiranjem enzima epoksid-reduktaze. Proces se odvija u jetri te je glavna uloga varfarina inhibicija stvaranja faktora koagulacije koji je ovisan o vitaminu K.[22] Varfarin je prvotno ušao u upotrebu pedesetih godina 20. stoljeća kao otrov za štakore, no istraživanja su utvrdila njegovu antikoagulacijsku aktivnost te se od šezdesetih godina 20. stoljeća koristi kao lijek za liječenje krvnih ugrušaka.

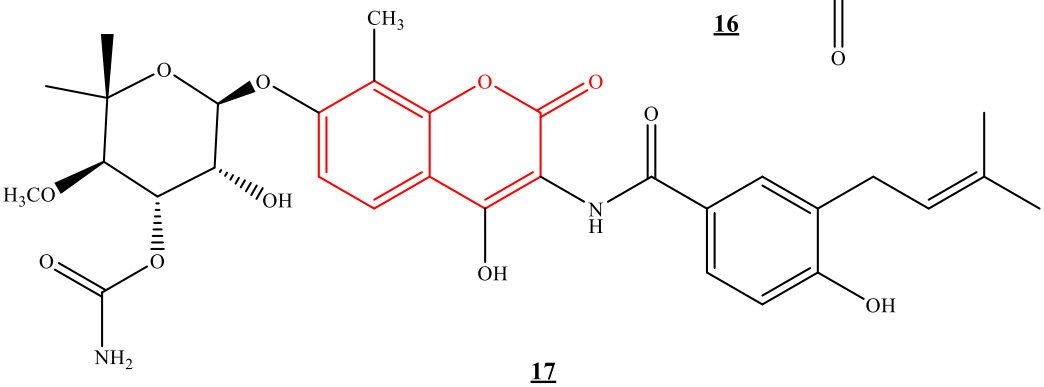
Zbog biološke aktivnosti, kumarini imaju veliki potencijal za kliničku upotrebu. Danas se u medicini koristi već spomenuti varfarin, acenokumarol, eskulin, himekromon, kumermicin A, novobiocin i klorobiocin. Acenokumarol se koristi u liječenju trombembolijskih oboljenja, eskulin za tretiranje hemeroida i rektalnih lezija, himerkromon u terapiji žuči i kao standard za fluorimetrijsko određivanje aktivnosti enzima.[23,24,25] Novobiocin **17** i klorobiocin **18** (slika 6) su antibiotici na bazi kumarina. Oni inhibiraju DNA-girazu te pokazuju širok spektar aktivnosti prema Gram-pozitivnim bakterijama.[26] Kumermicin A također se koristi kao antibiotik.



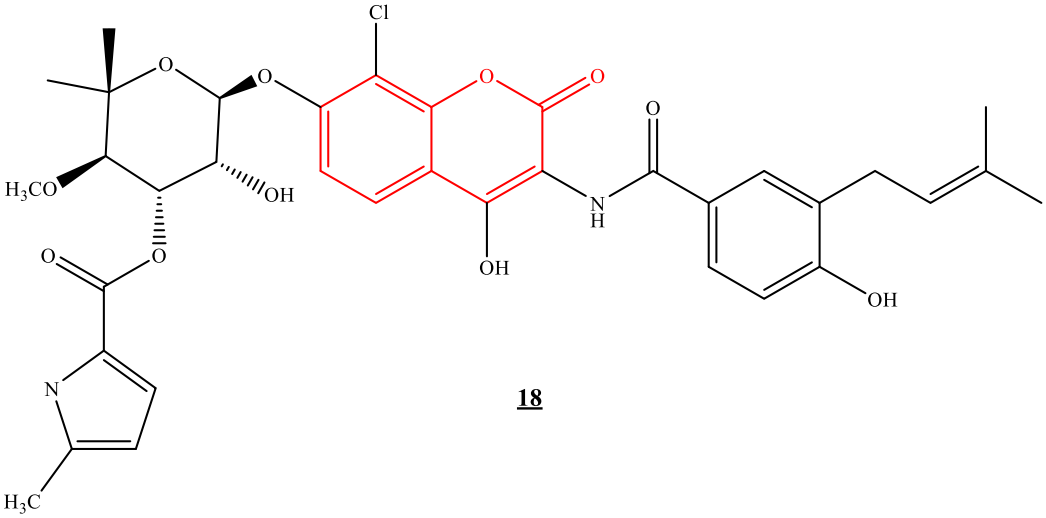
15



16



17



18

Slika 6. Struktura biološki aktivnih kumarinskih molekula 7-hidroksikumarina **15**, *varfarina* **16**, *novobiocina* **17** *i klorobiocina* **18**

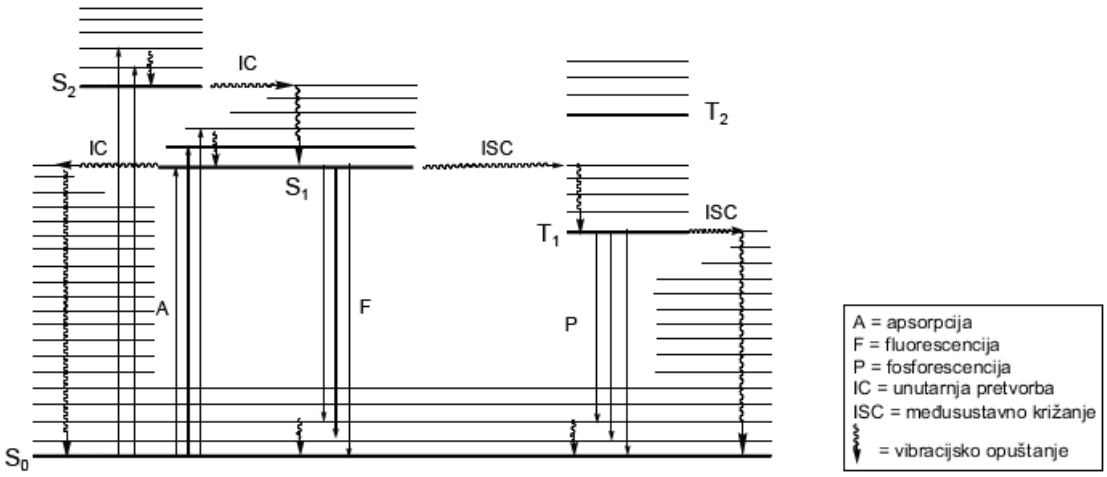
Jedno od važnijih bioloških svojstava kumarina i njegovih derivata jest antikancerogeno djelovanje. Kumarini pokazuju antitumorsku aktivnost na stanice karcinoma želudca, raka prostate, malignog melanoma i metastatskog renalnog staničnog karcinoma.[27] Utvrđeno je da kumarini ublažavaju nuspojave izazvane radioterapijom. Hibridizacija kumarina s drugim farmakoforima pokazuje njihov potencijal za primjenu u kliničkim ispitivanjima za suzbijanje karcinoma. Tako hibridi kumarina i furoksana pokazuju snažno antikancerogeno djelovanje *in vitro* protiv staničnih linija rezistentnih na lijekove, kao i *in vivo*.[28] Hibridi kumarina i uracila su uspješno inhibirali rast stanica raka dojke te pokazali izvrsno antibakterijsko djelovanje

protiv soja *Staphylococcus aureus*.[29] Iz navedenog se može zaključiti da hibridi kumarina imaju visoki potencijal za primjenu u razvoju novih kemoterapeutika protiv raka.

2.1.5. Fluorescencijska svojstva kumarina

Fluorescencija je svojstvo molekule ili tvari da emitira zračenje, odnosno fluorescira, prilikom izlaganja pobudi elektromagnetskim zračenjem. Pojava fluorescencije razlikuje se u odnosu na refleksiju svjetlosti jer fluorescentne tvari zrače svjetlošću druge boje, tj. druge valne duljine. S obzirom da je intenzitet fluorescencije karakteristična za pojedinu tvar, fluorescencija se koristi za kvalitativnu i kvantitativnu analizu. Spektrofluorimetrija je spektroskopska metoda analize uzorka. Princip metode jest pobuđivanje molekule zračenjem određene valne duljine, pri čemu molekula emitira zračenje neke druge valne duljine te se kao odziv dobiva emisijski spektar. Izlaganjem svjetlosnom zračenju, molekula apsorbira zračenje te prelazi iz osnovnog u pobuđeno elektronsko stanje. U pobuđenom stanju postoji nekoliko vibracijskih nivoa iz kojih se molekula neradijacijski relaksira u osnovni vibracijski nivo pobuđenog stanja. Ukoliko prilikom relaksacije iz pobuđenog stanja u osnovno dolazi do radijacijskog otpuštanja energije govorimo o fluorescenciji.[30]

Dijagram Jablonskog (slika 7) prikazuje elektronska stanja molekule te prijelaze među njima. Deblje horizontalne linije predstavljaju elektronska stanja, a tanje horizontalne linije vibracijske razine. Valovite strelice označavaju prijelaze bez zračenja koji se odvijaju kada prilikom relaksacije elektrona ne dolazi do emisije fotona. Ravne strelice označavaju prijelaze uz zračenje koji se odvijaju kada dolazi do emisije fotona pri povratku pobuđene molekule u osnovno stanje.[31]



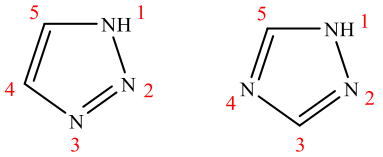
Slika 7. Dijagram Jablonskog [31]

Kumarini pokazuju svojstvo fluorescencije s rasponom valnih duljina emisije od 410 do 470 nm te pokazuju odlična spektroskopska svojstva. Kumarini male molekulske mase fluoresciraju plavom bojom i topljivi su u vodi. Koriste se za unutarstaničnu upotrebu kao fluorescentne probe te mogu ulaziti ili ne ulaziti u stanice, što ovisi o njihovoj strukturi te povećanjem naboja molekule elektronski nabijenija molekula manje je propusnosti u stanicu. Kvantni prinos fluorescencije iznosi im do 0.90, dok im se vrijednosti ekstinkcijskih koeficijenata kreće u rasponu od 10 000 do 40 000 te imaju Stoksove pomake do 160 nm. Kumarinski fluorofor široko se primjenjuje u dizajnu fluorescentnih kemosenzora. Zbog izvrsne biokompatibilnosti, jake i stabilne emisije te dobre strukturne fleksibilnosti, derivati kumarina pronalaze primjenu u razvoju fluorescentnih kemosenzora u području molekularnog prepoznavanja, molekularnog oslikavanja, označavanja DNK molekula, bioorganske kemije, analitičke kemije, kemije materijala te u biologiji i medicini.[32]

Nefluorescirajući kumarinski reagensi, 3-azidokumarini i terminalni alkini, uz prisustvo Cu^+ kao katalizatora u reakciji reakcije 1,3-dipolarne cikloadicije daju 1,2,3-triazolne produkte intenzivne fluorescencije. Blagi reakcijski uvjeti omogućuju sintezu širokog spektra kumarinskih boja. Azidi i alkini intertni su u biološkim sustavima stoga ova reakcija ima veliki potencijal u biokonjugaciji i biološkom oslikavanju.[33]

2.2. Triazoli

Triazoli se pojavljuju u dva izomerna oblika kao 1,2,3-triazoli te 1,2,4-triazoli (slika 8). Oni su aromatski heterociklički spojevi koji u strukturi sadrže tri atoma dušika. U peteročlanom prstenu svi atomi su sp^2 hibridizirani te sadrže šest delokaliziranih elektrona u π-molekulskim orbitalama.[34]

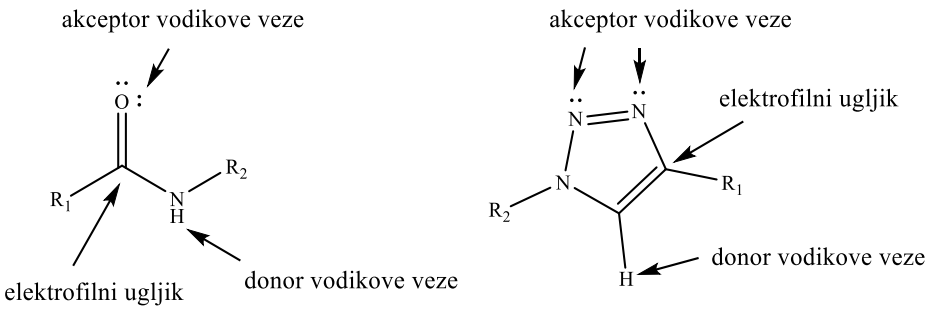


Slika 8. Struktura 1,2,3-triazola i 1,2,4-triazola

Ovisno o supstituciji imaju kisela ili bazična svojstva. U slučaju 1,4-disupstituiranih 1,2,3-triazola, atomi N-2 i N-3 su akceptori vodika (Lewisove baze).[35] Uglavnom se ponašaju kao slabe baze te podliježu reakcijama s elektrofilnim reagensima. Tri dušika u prstenu omogućuju koordinaciju metalnih iona, pri čemu stvaraju stabilne metalne komplekse.[36]

Strukturu 1,2,3-triazolnog prstena karakterizira visoki dipolni moment molekule koji iznosi 5.2-5.6 D. Fizikalno-kemijska svojstva omogućuju im stvaranje π-π interakcija s drugim aromatskim sustavima. Visoki dipolni moment i mogućnost stvaranja vodikovih veza pridonose vezanju za biomolekule, kao što su enzimi te druge biološke mete s kojima stvaraju π-interakcije. Pokazuju visoku stabilnost pri kemijskoj i metaboličkoj razgradnji, kao i inertnost prema oksidacijskim i redukcijskim uvjetima.[37] Zbog navedenih svojstava, često se koriste kao premosnica između farmakofora u razvoju lijekova. Također, 1,2,3-triazoli te njihovi derivati imaju primjenu u razvoju lijekova, biokonjugata, polimera, materijala te u industriji boja, inhibiranju korozije i u formulacijama agrokemikalija.[38]

Bioizosterija je pristup u razvoju lijekova kojim se modificira molekula kako bi se poboljšalo farmakološka svojstva i biološko djelovanje. Bioizosterna skupina definira se kao strukturna podjedinica sličnog oblika i dimenzija te sličnih fizikalnih svojstava i djelovanja.[39] Tako se u razvoju novih lijekova 1,2,3-triazoli mogu koristiti kao bioizosteri amida jer 1,4-disupstituirani 1,2,3-triazolni prsten oponaša amidnu vezu (slika 9). N-2 i N-3 atomi 1,2,3-triazola oponašaju akceptorska svojstva amidne veze zbog slobodnih elektronskih parova, dok C-3 vodik oponaša donorski vodik amidne veze. Dipolni moment triazola veći je od amidnog te su različite duljine veza.[40]



Slika 9. 1,4-disupstituirani 1,2,3-triazoli kao bioizosteri amida

2.2.1. Sinteza 1,2,3-triazola

Biološka aktivnost 1,2,3-triazolnog prstena i stupanje heterocikličkog prstena u interakcije s biološkim metama stvaranjem različitih veza omogućuje njegovu primjenu u brojnim lijekovima. Iz tog je razloga sinteza 1,2,3-triazolnih derivata važno područje istraživanja u sintetskoj kemiji. Početkom 21. stoljeća dolazi do razvoja "*klik* kemije" koja ubrzo postaje najpopularniji pristup u organskoj sintezi. Pojam "*klik* kemije" uvodi američki znanstvenik Sharpless sa svojim suradnicima 2001. godine kada je provedena sinteza 1,2,3-

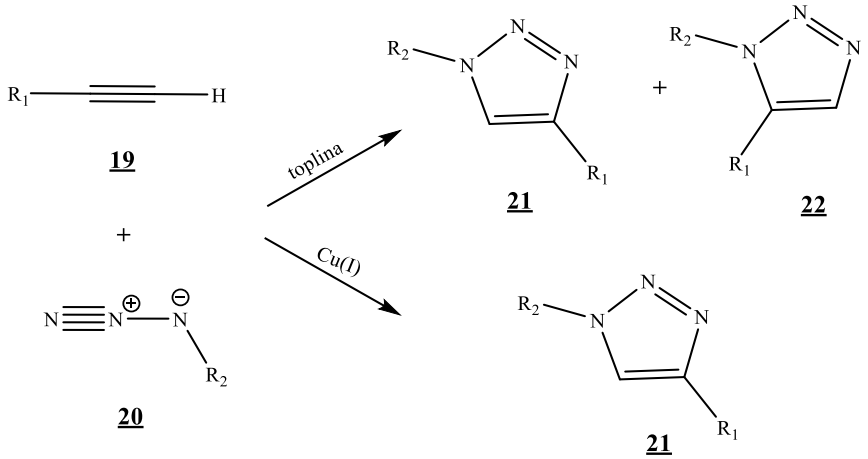
triazolnog prstena uz bakar(I) kao katalizator.[41] *Klik* reakcije obuhvaćaju širok raspon kemijskih reakcija u kojima nastaje veza ugljik-heteroatom te ih karakterizira:

1. visoka stereoselektivnost,
2. široka primjenjivost,
3. visoka iskorištenja,
4. provođenje u blagim uvjetima,
5. nastajanje lako uklonjivih nusprodukata,
6. pristupačnost polaznih reaktanata,
7. korištenje lako uklonjivih i netoksičnih otapala,
8. nastajanje stabilnih produkata koji se lako uklanjaju te
9. termodinamička povoljnost.

Često korištene *klik* reakcije su 1,3-dipolarna Diels-Alderova cikloadicija, reakcija nukleofilnog otvaranja epoksidnog i aziridinskog prstena, adicija na nezasićene ugljik–ugljik veze (oksidativno formiranje epoksida) i reakcije karbonilnih spojeva (sinteza uree, hidrazona i oksima).[42] Reakcije koje se koriste za sintezu 1,2,3-triazola su Huisgenova 1,3-dipolarna cikloadicija, azid-alkin cikloadicija katalizirana bakrom(I) (CuAAC) i rutenijem(II) (RuAAC). Prema načelima *zelene* kemije također se koristi sinteza potpomognuta mikrovalovima.

2.2.1.1. Huisgenova cikloadicija

Huisgenova 1,3-dipolarna cikloadicija je reakcija u kojoj dolazi do cikloadicije azida i alkina te kao konačni produkt nastaje 1,2,3-triazolni prsten.[43] Na shemi 3 dan je općeniti prikaz reakcije.

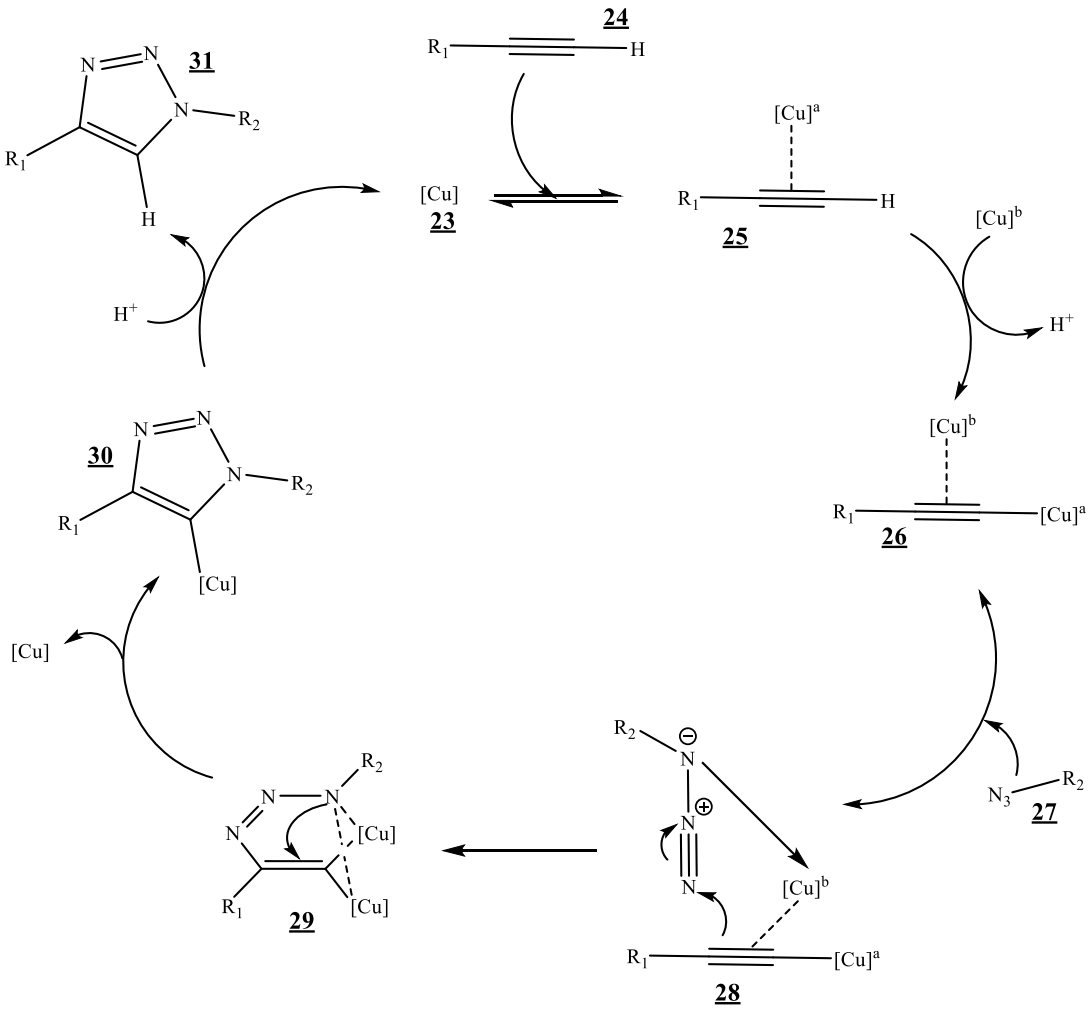


Shema 3. Općeniti prikaz Huisgenove cikloadicije

Huisgenova cikloadicija je reakcija dipolarofila **19** (alkin) i 1,3-dipola **20** (azid) u kojoj nastaju različito supstituirani peteročlani produkti **21** i **22**. Reakcija je spora ako se ne odvija u prisutnosti katalizatora zbog inertnosti i visoke stabilnosti polaznih reaktanata. Provođenjem reakcije uz dovođenje topline pri visokim temperaturama nastaje smjesa 1,4- (**21**) i 1,5-disupstituiranih (**22**) 1,2,3-triazolnih produkata koja se teško odvaja. Korištenjem bakra(I) kao katalizatora selektivno nastaje 1,4-disupstituirani 1,2,3-triazolni produkt (**21**) što se pokazalo kao vrlo učinkovita metoda sinteze.

2.2.1.2. Cikloadicija azida i alkina katalizirana bakrom(I) (CuAAC)

Regioselektivna sinteza 1,4-disupstituiranog triazolnog prstena provodi se reakcijom cikloadicije azida i alkina uz Cu(I) kao katalizator. Reakcija se može provoditi u organskom i vodenom mediju unutar širokog raspona pH-vrijednosti i temperatura što omogućuje široko područje primjene. Bakrovi(I) ioni se mogu dobiti direktno iz soli ili kompleksa bakra(I) te se najčešće koriste CuI ili CuBr u organskim otapalima i inertnoj atmosferi te kompleksi bakra(I) s različitim ligandima. Bakrovi(I) ioni također mogu nastati *in situ* reakcijom redukcijom bakrovih(II) soli uz dodatak redukcijskog sredstva u suvišku ili reakcijom koproporcioniranja između elementarnog bakra i soli bakra(II). Prednost *in situ* dobivanja bakrovih(I) iona jest što se uklanja potreba za inertnom atmosferom.[44] Na shemi 4 je prikazan je mehanizam reakcije CuAAC.

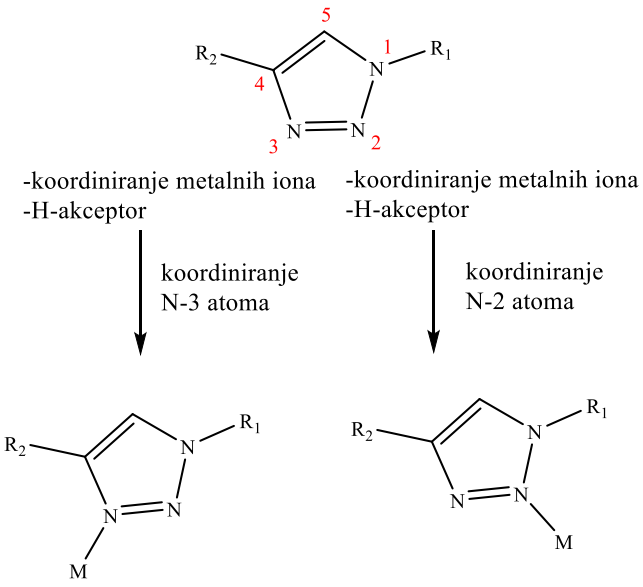


Shema 4. Mehanizam CuAAC reakcije [45]

U prvom koraku reakcije odvija se koordinacija alkina **24** sa bakrovim(I) ionom **23** pri čemu bakrov(I) ion tvori kovalentnu vezu s π-elektronima trostruke veze, a istovremeno dolazi do deprotoniranja terminalnog alkina te kao produkt nastaje π kompleks bakra(I) i acetilida **25**. Deprotoniranjem nastaje bakrov(I) acetilid **26**. Nastali međuprodukt **26** koordinira azid **27** te nastaje azid-acetilidni kompleks **28**. Nastanak šesteročlane metalocikličke strukture **29** uvjetovan je nukleofilnim napadom terminalnog dušika N-3 azida na atom ugljika C-4 kompleksa **28**. Pregradnjom šesteročlane metalocikličke strukture nastaje bakrov(I) triazolil (1,2,3-triazol supstituiran bakrom) **30**. Protoniranjem triazolila nastaje 1,4-disupstituirani 1,2,3-triazolni produkt **31**. Pretpostavlja se da azid i alkin nisu koordinirani istim bakrovim(I) ionom već da u reakciji sudjeluju bar dva iona jer se radi o reakciji drugog reda.

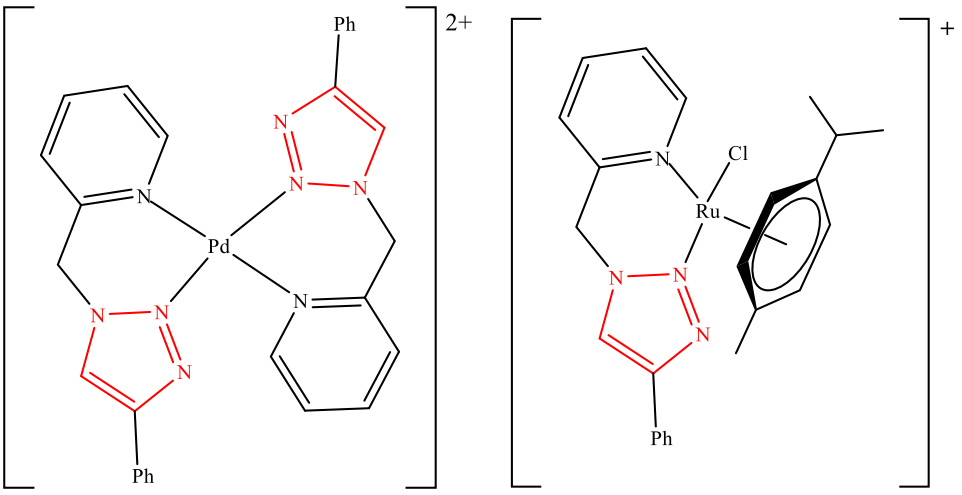
2.2.2. Metalni kompleksi 1,2,3-triazola

1,2,3-triazoli u svojoj strukturi sadrže tri atoma dušika od kojih dva sadrže slobodne elektronske parove koji mogu sudjelovati u vezanju metalnih iona.[46] Zbog navedenog svojstva i lakoće sinteze, sve je veći interes za primjenu 1,4-disupstituiranih 1,2,3-triazola dobivenih CuAAC reakcijom kao liganada u kompleksima prijelaznih metala.[47] Na slici 10 shematski su prikazane mogućnosti stvaranja metalnih kompleksa 1,2,3-triazolnih derivata.



Slika 10. Moguće koordinacije 1,4-disupstituiranih 1,2,3-triazola

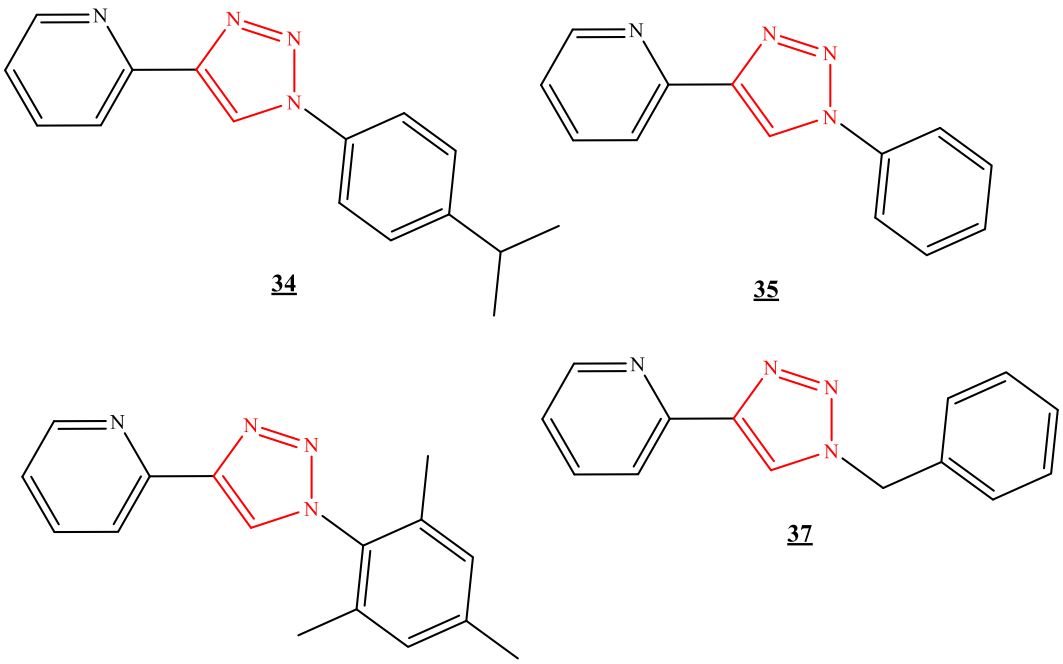
Urankar i suradnici istražili su koordinaciju 1,2,3-triazolnih liganada supstituiranih 2-pikolilnom skupinom u položaju N-1.[48] Utvrđeno je da ligandi tvore stabilnu koordinaciju na N-2 dušiku. Proveli su sintezu metalnih kompleksa Pt(II), Pd(II), Cu(II), Ru(II) te Ag(I). Na slici 11 prikazane su strukture kompleksa paladija(II) (**32**) i rutenija(II) (**33**). Strukture dobivenih kompleksa su potvrđene difrakcijom X-zraka na monokristalu. Računalnim metodama utvrđeno je da se dodatna stabilizacija kompleksa postiže delokalizacijom metalnih d-elektrona u π elektronski sustav piridina. U nastavku istraživanja ispitano je antiproliferativno djelovanje kompleksa **33** na stanične linije humanog plućnog karcinoma (A-549). Kompleks **33** pokazao je umjereno citostatsko djelovanje. [49,50]



32 **33**

*Slika 11. Sintetizirani kompleksi paladija(II) (**32**) i rutenija(II) (**33**)*

Schweinfurth i suradnici su *klik* kemijom sintetizirali ligande **34-37** čija se struktura sastoji od 1,2,3-triazolnog prstena supstituiranog piridinom u položaju C-4.[51] Na slici 12 prikazane su strukture liganada **34-37**.



34 **35** **36** **37**

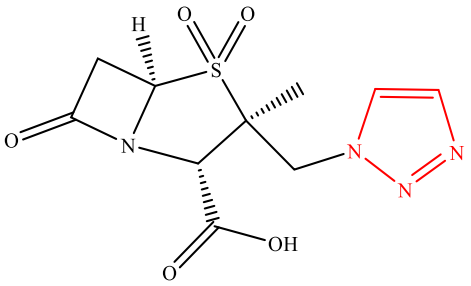
*Slika 12. Strukture 1,2,3-triazolnih liganada **34-37***

Ligandi su korišteni u sintezi metalnih kompleksa Pd(II) i Pt(II). Strukturna karakterizacija rendgenskom difrakcijom zračenja na monokristalu pokazuje da je veza metala i triazolnog dušika kraća u odnosu na vezu metala i piridinskog dušika. Analizom cikličkih voltamograma su utvrđeni veliki anodni pomaci liganada uzrokovani koordinacijom metala.

2.2.3. Biološka aktivnost 1,2,3-triazola

1,2,3-triazolni derivati široko su primjenjivani spojevi u industriji općenito, a posebno u industriji lijekova zbog njihove biološke aktivnosti. Iako nisu pronađeni u prirodnim spojevima, privlače veliku pažnju znanstvenika zbog utvrđenog antibakterijskog, antimikrobiološkog, antifugalnog, antimalarijskog, antivirusnog, analgetskog, protuupalnog te antitumorskog djelovanja.[51] Triazolni derivati se koriste u formulacijama lijekova, dok se sami 1,2,3-triazolni prsten koristi u procesu razvoja lijekova te kao poveznica između dva farmakofora.[52]

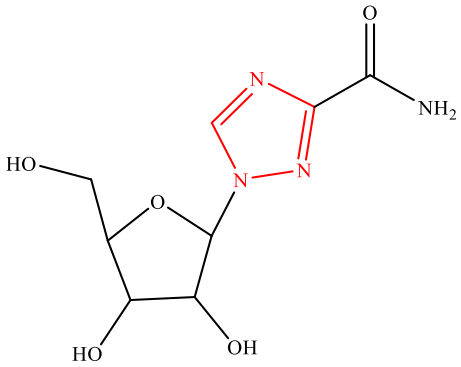
Tazobaktam (**38**) je poznati β-laktamski antibiotik koji je patentiran 1982. godine (slika 14). Djeluje kao inhibitor bakterijskog enzima beta-laktamaze. Lijek se primjenjuje u obliku natrijeve soli (tazobaktum natrij) kao aditiv antibioticima, da bi se smanjila bakterijska rezistencija prema antimikrobnim tvarima.[53]



38

Slika 14. Struktura tazobaktama **38**

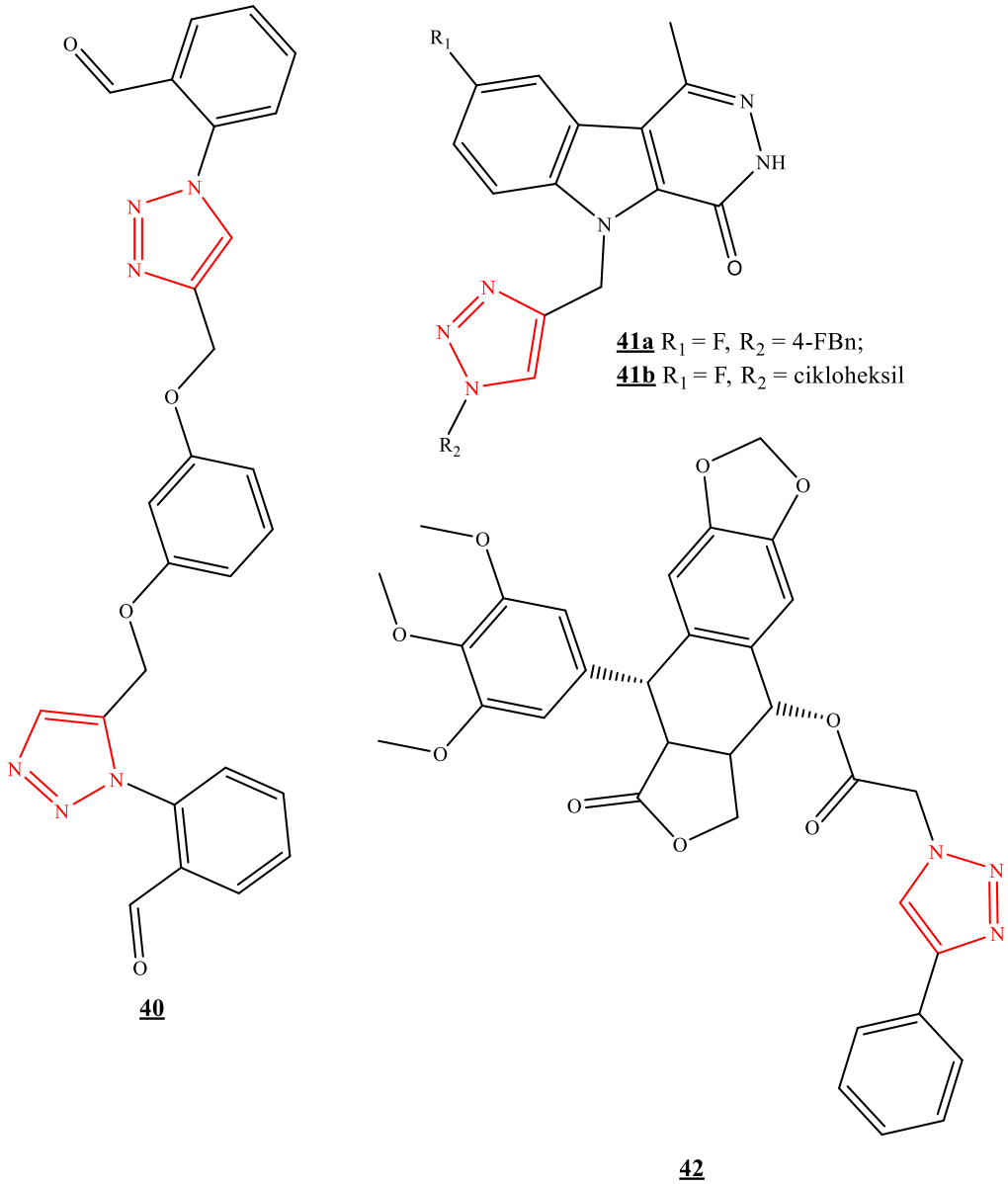
Ribavirin (**39**) je 1,2,4-triazolni derivat koji je patentiran 1971. godine (slika 15). Koristi se kao antivirusni lijek za liječenje infekcije RSV i hepatitisa C. Ispitivanja su pokazala da ima i široki spektar antivirusne aktivnosti protiv mnogih DNA i RNA virusa ugrađivanjem u RNA ili DNA molekulu izazivajući mutacije, što je smrtonosno za virus.[54]



39

Slika 15. Struktura ribavirina **39**

Xu i suradnici opisali su cistostatsko djelovanje 1,2,3-triazolnih derivata te mehanizam biološkog djelovanja. Istraženo je preko 170 hibrida, a spojevi **40-42** (slika 16) pokazali su značajno citostatsko djelovanje s vrijednostima IC_{50} u nanomolarnom području te aktivnost prema različitim stanicama raka.[55] Spoj **40** je bis-1,2,3-triazolni konjugat te pokazuje aktivnost prema staničnim linijama otpornima na lijekove i netoksičnost za astrocite, čime zadovoljava kriterije u liječenju bolesti središnjeg živčanog sustava. Spojevi **41a** i **41b** su konjugati 1,2,3-triazola i indola te su predvodne strukture za razvoj inhibitora prekomjerne ekspresije kinaza PI3, za koje je utvrđeno da su najčešći put aktivacije karcinoma kod ljudi. Spoj **42** također pokazuje citostatsko djelovanje, a u strukturi je moguće zamijeniti fenilni prsten heterocikličkim (poput piridina) te estersku poveznicu amidom bez utjecaja na aktivnost.



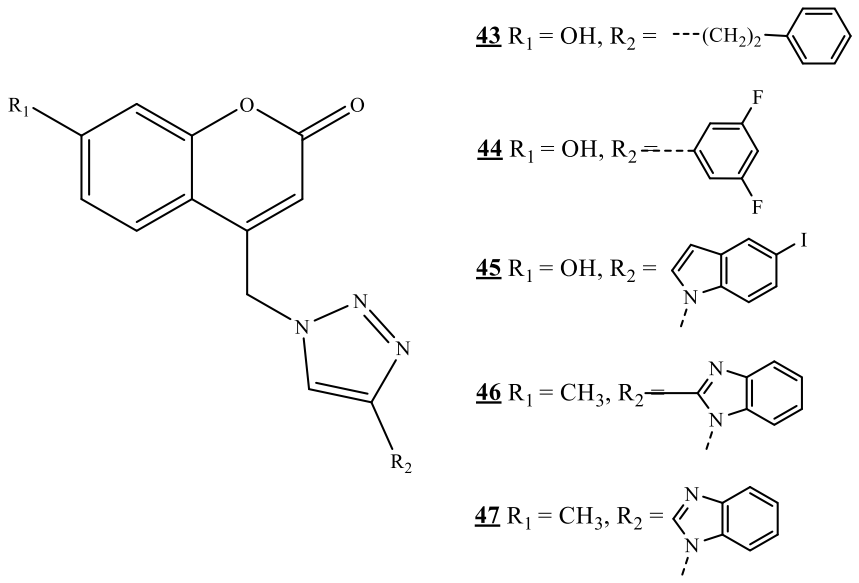
Slika 16. Strukture spojeva **40**, **41a**, **41b** *i* **42**

2.3. Kumarinski konjugati 1,2,3-triazola

Povezivanjem kumarina i 1,2,3-triazola kao premosnice dobiveni su kumarinski konjugati koji pokazuju značajnu biološku aktivnost.

Gazivoda-Kraljević i suradnici opisali su konjugate 1,2,3-triazola i kumarina s citostatskim i antibakterijskim djelovanjem. Derivati s kumarinom kao osnovnom strukturnom jedinicom supstituirani su u položaju C-4 1,2,3-triazolnim prstenom koji na C-4 sadrži alkilni, fenilni, alkilfenilni, ditiokarbamatni, benzensulfonamidni i benzofuzionirane heterocikličke podjedinice kao supstituente. Ispitano je *in vitro* biološko djelovanje te su

derivati s feniletilnim (**43**), 3,5-difluorofenilnim (**44**), 5-jodindolnim (**45**), 2-metilbenzimidazolnim (**46**) i benzimidazolnim (**47**) supstituentom pokazali značajno biološko djelovanje (slika 17). Antiproliferativna ispitivanja su se provodila na ljudskim staničnim linijama karcinoma pluća (A549), hepatocelularnog karcinoma (HepG2), adenokarcinoma gušterače (CFPAC-1), karcinoma vrata maternice (HeLa), kolorektalnog adenokarcinoma (SW620) i plućnih fibroblasta (WI38). Većina ispitivanih spojeva je pokazala inhibicijski učinak na stanične linije A549 i HeLa, no niti jedan od ispitivanih spojeva nije pokazao inhibicijski učinak na stanične linije SW620.[56]

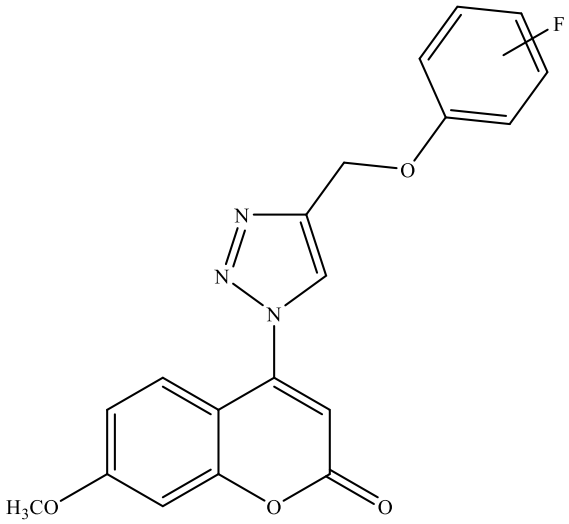


Slika 17. Strukture konjugata kumarina i triazola **43-47**

Konjugat benzimidazola i 7-metilkumarina s 1,2,3-triazolnom premosnicom (**46**) se pokazao kao najučinkovitiji, a najizraženije djelovanje pokazao je prema stanicama hepatocelularnog karcinoma (HepG2, IC_{50} = 0.9 μM) s visokom selektivnošću. Navedeni spoj uzrokuje staničnu smrt ranom apoptozom. Utvrđeno je da su heterociklička strukturna podjedinica i supstitucija kumarina na položaju 7 ključne za citotoksično djelovanje prema stanicama HepG2.

Zhang i suradnici opisali su niz konjugata 4-(1,2,3-triazol-1-il)kumarina te njihovo citostatsko djelovanje *in vitro* prema staničnim linijama karcinoma dojke (MCF-7), karcinoma debelog crijeva (SW480) i karcinoma pluća (A549). Većina sintetiziranih spojeva pokazala je cistostatsko djelovanje.[57] Ističe se spoj **48** supstituiran $–OCH_3$ skupinom u položaju C-4

kumarina te fluorfenilnom skupinom koje su akceptori vodikove veze. Navedeni spoj zaustavlja stanični ciklus u G2/M fazi i inducira apoptozu.



48

Slika 18. Struktura konjugata kumarina i piridina **48**

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. Opće napomene

Sva otapala sušena/pročišćavana su prema preporučenom postupku sušenja agensima i/ili destiliranjem preko molekulskih sita veličine 3 Å. Za tankoslojnu kromatografiju (TLC) korištene su ploče $60F_{254}$ prevučene slojem silikagela *Merck*, a za detekciju izoliranih komponenata korištena je UV svjetlost valne duljine 254 nm.

Kolonska kromatografija provedena je uz silikagel kao stacionarnu fazu (*Fluka*, 0.063-0.2 mm). Staklene kolone punjene su pod utjecajem gravitacije, a kao eluens je korištena odgovarajuća smjesa organskih otapala.

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

Spektri ^{1}H i ^{13}C NMR snimljeni su na spektrometru Bruker 300 i 600 MHz. Svi uzorci su otopljeni u naznačenim deuteriranim otapalima i mjereni pri 298 K. Kemijski pomaci (δ) u spektrima ^{1}H i ^{13}C NMR izraženi su u ppm u odnosu prema signalu DMSO na δ 2.50 ppm za ^{1}H i prema signalu DMSO δ 39.50 ppm za ^{13}C. Pojedine rezonancije pridružene su na temelju kemijskih pomaka, intenziteta signala, multipliciteta signala i H-H konstanti sprega.

Spektri IR snimljeni su na Bruker Alpha FT-IR spektrometru primjenom ATR u području valnih brojeva 4000-500 cm^{-1}.

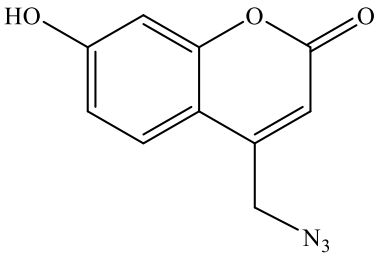
Difrakcija rendgenskog zračenja u monokristalu provedena je na Oxford difrakcijskom Xcalibur CCD difraktometru pomoću monokromatskog Cu-Kα (λ = 1.54184 Å) zračenja.

Spektri UV/Vis snimljeni su na Varian Cary 50 spektrofotometru, koristeći kvarcnu kivetu debljine 1 cm.

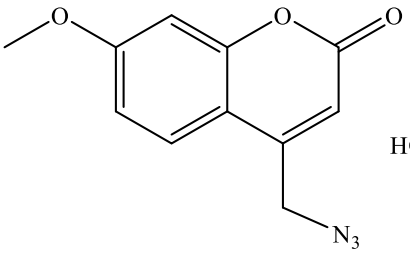
Sinteza spojeva **1-8**[58,59] te **9**[60] opisana je u literaturi.

3.2. Pregled sintetiziranih prekursora i liganada

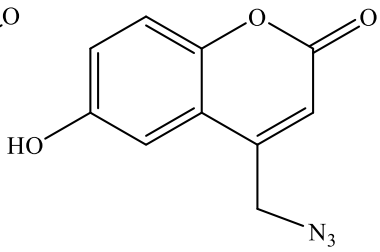
3.2.1. Pregled sintetiziranih prekursora 1-9



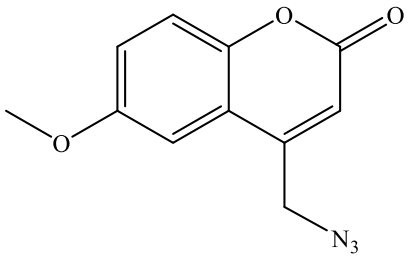
1



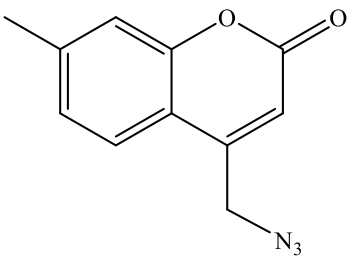
2



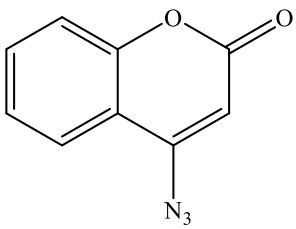
3



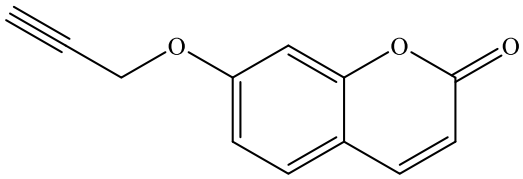
4



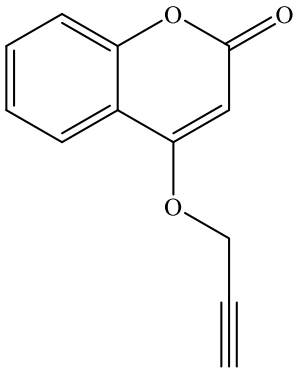
5



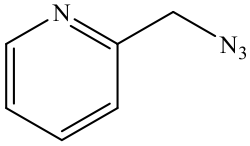
6



7

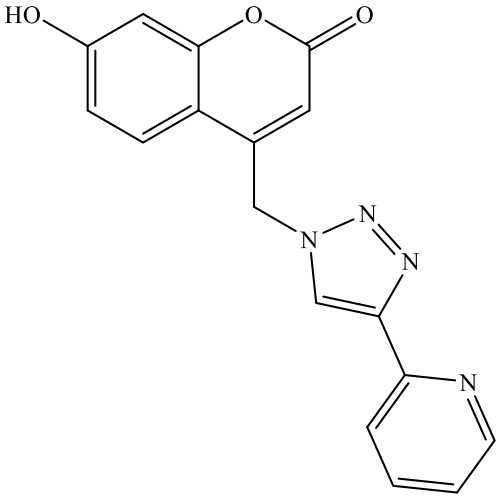


8

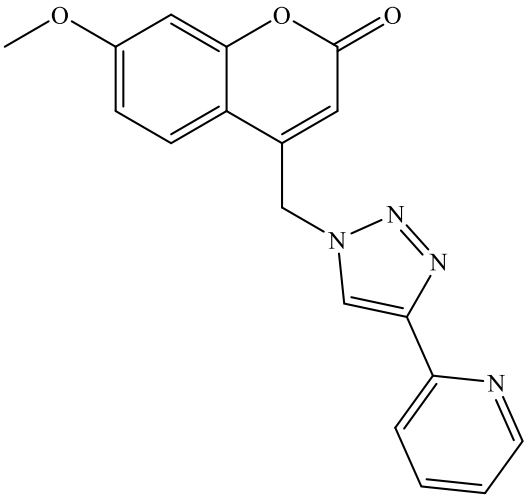


9

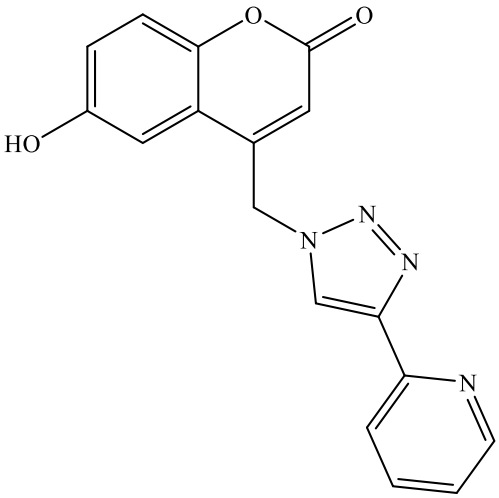
3.2.2. Pregled sintetiziranih liganada 11-18



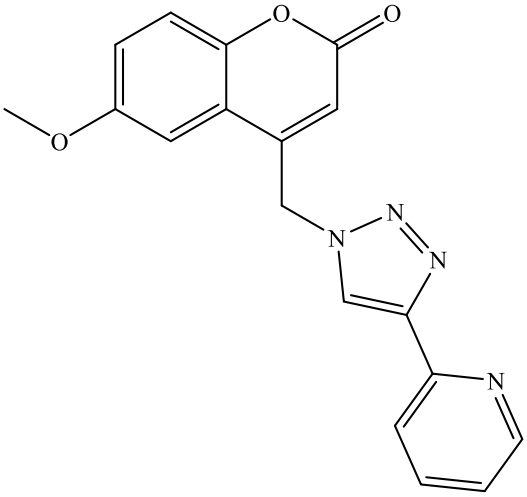
11



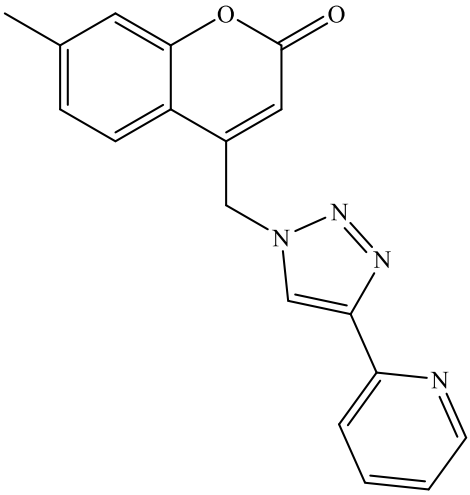
12



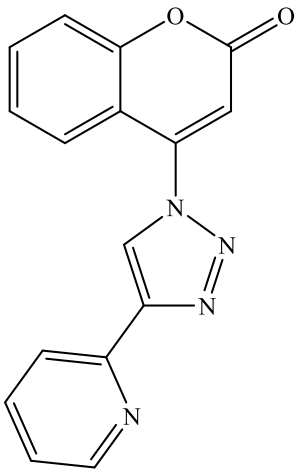
13



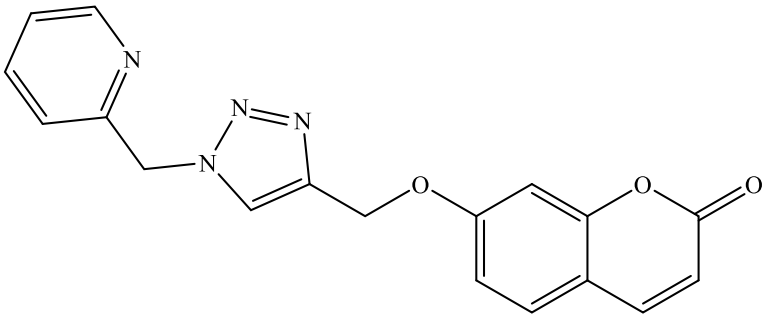
14



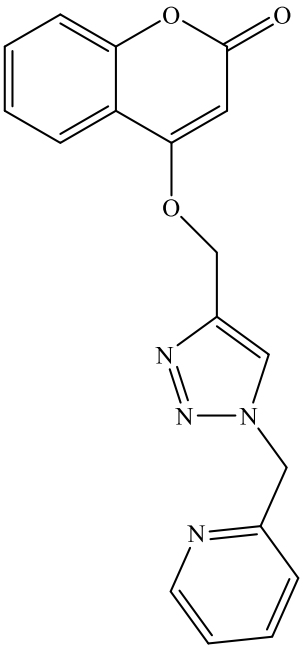
15



16



17



18

3.3. Priprava konjugata kumarina i piridina 11-18

3.3.1. 7-hidroksi-4-((4-(piridin-2-il)-1*H*-1,2,3-triazol-1-il)metil)kumarin (11)

4-(azidometil)-7-hidroksikumarin (**1**; 150 mg; 0.69 mmol; 1 ekv.) je otopljen u metanolu (5 ml) te je dodan bakrov(II) acetat monohidrat (14 mg; 0.07 mmol; 0.1 ekv.) i 2-etinilpiridin (70 µl; 0.69 mmol; 1 ekv.). Reakcijska smjesa je miješana 24 h pri sobnoj temperaturi. Napredak reakcije praćen je tankoslojnom kromatografijom. Otapalo je uklonjeno pri sniženom tlaku, a ostatak pročišćen kolonskom kromatografijom uz eluens diklormetan:metanol uz postupno povećavanje polarnosti sustava od 100:1 do 30:1. Izoliran je bijeli prah spoja **11** (121 mg; 55 %), t. t. > 200 °C. ^{1}H NMR (300 MHz, DMSO) δ 10.70 (bs, 1H, OH), 8.77 (s, 1H, H5-triaz.), 8.60 (d, J = 4.3 Hz, 1H, Ar-H), 8.06 (d, J = 7.9 Hz, 1H, Ar-H), 7.91 (td, J = 7.8, 1.7 Hz, 1H, Ar-H), 7.73 (d, J = 8.7 Hz, 1H, Ar-H), 7.44 – 7.27 (m, 1H, Ar-H), 6.85 (dd, J = 8.7, 2.2 Hz, 1H, Ar-H), 6.77 (d, J = 2.2 Hz, 1H, Ar-H), 5.98 (s, 2H, CH_2), 5.69 (s, 1H, Ar-H). ^{13}C NMR (151 MHz, DMSO) δ 161.61, 159.89, 155.12, 150.11, 149.63, 149.60, 147.63, 137.23, 126.01, 124.33, 123.15, 119.54, 113.17, 109.65, 109.39, 102.54, 49.42. IR (ATR): ν/cm^{-1} 3057, 1710, 1608, 1403, 1326, 1250, 1149, 1125, 1094, 1009, 841, 782.

3.3.2. 7-metoksi-4-((4-(piridin-2-il)-1*H*-1,2,3-triazol-1-il)metil)kumarin (12)

4-(azidometil)-7-metoksikumarin (**2**; 200 mg; 0.86 mmol; 1 ekv.) je otopljen u metanolu (5 ml) te je dodan bakrov(II) acetat monohidrat (17 mg; 0.09 mmol; 0.1 ekv.) i 2-etinilpiridin (87 µl; 0.86 mmol; 1 ekv.). Reakcijska smjesa je miješana 24 h pri sobnoj temperaturi. Napredak reakcije praćen je tankoslojnom kromatografijom. Otapalo je uklonjeno pri sniženom tlaku, a ostatak pročišćen kolonskom kromatografijom uz eluens diklormetan:metanol uz postupno povećavanje polarnosti sustava od 50:1 do 30:1. Izoliran je bijeli prah spoja **12** (46 mg; 16 %), t. t. > 200 °C. ^{1}H NMR (300 MHz, DMSO) δ 8.78 (s, 1H, H5-triaz.), 8.60 (dd, J = 4.7, 0.6 Hz, 1H, Ar-H), 8.06 (d, J = 7.9 Hz, 1H, Ar-H), 7.91 (td, J = 7.8, 1.7 Hz, 1H, Ar-H), 7.81 (d, J = 8.8 Hz, 1H, Ar-H), 7.36 (ddd, J = 7.4, 4.9, 1.1 Hz, 1H, Ar-H), 7.06 (d, J = 2.4 Hz, 1H, Ar-H), 7.02 (dd, J = 8.8, 2.5 Hz, 1H, Ar-H), 6.01 (s, 2H, CH_2), 5.80 (s, 1H, Ar-H), 3.87 (s, 3H, OCH_3). ^{13}C NMR (75 MHz, DMSO) δ 162.74, 159.76, 155.09, 149.92, 149.64, 149.60, 147.65, 137.25, 125.84, 124.33, 123.17, 119.54, 112.41, 110.76, 110.52, 101.14, 56.00, 49.44. IR (ATR): ν/cm^{-1} 1706, 1607, 1552, 1420, 1289, 1140, 1040, 872, 845, 788.

3.3.3. 7-hidroksi-4-((4-(piridin-2-il)-1*H*-1,2,3-triazol-1-il)metil)kumarin (13)

4-(azidometil)-6-hidroksikumarin (**3**; 200 mg; 0.92 mmol; 1 ekv.) je otopljen u metanolu (5 ml) te je dodan bakrov(II) acetat monohidrat (18 mg; 0.09 mmol; 0.1 ekv.) i 2-etinilpiridin (93 µl; 0.92 mmol; 1 ekv.). Reakcijska smjesa je miješana 24 h pri sobnoj temperaturi. Napredak reakcije praćen je tankoslojnom kromatografijom. Otapalo je uklonjeno pri sniženom tlaku, a ostatak pročišćen kolonskom kromatografijom uz eluens diklormetan:metanol = 100:1 uz postupno povećavanje polarnosti sustava od 100:1 do 20:1. Izoliran je bijeli prah spoja **13** (144 mg; 49 %), t. t. > 200 °C. ^{1}H NMR (300 MHz, DMSO) δ 9.87 (s, 1H, OH), 8.76 (s, 1H, H5-triaz.), 8.60 (d, J = 3.6 Hz, 1H, Ar-H), 8.06 (d, J = 7.7 Hz, 1H, Ar-H), 7.91 (t, J = 7.4 Hz, 1H, Ar-H), 7.45 – 7.33 (m, 1H, Ar-H), 7.31 (d, J = 8.9 Hz, 1H, Ar-H), 7.14 (s, 1H, Ar-H), 7.10 (d, J = 8.8 Hz, 1H, Ar-H), 5.98 (s, 3H, Ar-H i CH_2). ^{13}C NMR (75 MHz, DMSO) δ 159.63, 153.88, 149.64, 149.22, 147.67, 146.41, 137.26, 124.29, 123.18, 120.34, 119.56, 117.71, 117.68, 114.64, 109.07, 49.48. IR (ATR): ν/cm^{-1} 3159, 2934, 1670, 1569, 1440, 1240, 1172, 1034, 967, 857, 847, 783.

3.3.4. 7-metoksi-4-((4-(piridin-2-il)-1H-1,2,3-triazol-1-il)metil)kumarin (14)

4-(azidometil)-6-metoksikumarin (**4**; 200 mg; 0.86 mmol; 1 ekv.) je otopljen u metanolu (5 ml) te je dodan bakrov(II) acetat monohidrat (17 mg; 0.09 mmol; 0.1 ekv.) i 2-etinilpiridin (87 µl; 0.86 mmol; 1 ekv.). Reakcijska smjesa je miješana 24 h pri sobnoj temperaturi. Napredak reakcije praćen je tankoslojnom kromatografijom. Otapalo je uklonjeno pri sniženom tlaku, a ostatak pročišćen kolonskom kromatografijom uz eluens diklormetan:metanol = 50:1 uz postupno povećavanje polarnosti sustava od 50:1 do 30:1. Izoliran je bijeli prah spoja **14** (66 mg; 23 %), t. t. > 200 °C. ^{1}H NMR (300 MHz, DMSO) δ 8.80 (s, 1H, H5-triaz.), 8.60 (d, J = 4.2 Hz, 1H, Ar-H), 8.07 (d, J = 7.9 Hz, 1H, Ar-H), 7.91 (td, J = 7.7, 1.7 Hz, 1H, Ar-H), 7.42 (d, J = 9.0 Hz, 1H, Ar-H), 7.36 (td, J = 5.3, 1.0 Hz, 2H, Ar-H), 7.28 (dd, J = 9.0, 2.8 Hz, 1H, Ar-H), 6.06 (s, 2H, CH_2), 5.98 (s, 1H, Ar-H), 3.83 (s, 3H, OCH_3). ^{13}C NMR (75 MHz, DMSO) δ 159.49, 155.62, 149.65, 149.58, 149.47, 147.74, 147.42, 137.26, 124.37, 123.19, 119.56, 119.54, 117.88, 117.54, 114.56, 107.77, 55.84, 49.50. IR (ATR): ν/cm^{-1} 2984, 1709, 1679, 1571, 1468, 1425, 1253, 1156, 1029, 948, 866, 823, 783.

3.3.5. 7-metil-4-((4-(piridin-2-il)-1*H*-1,2,3-triazol-1-il)metil)kumarin (15)

4-(azidometil)-7-metilkumarin (**5**; 200 mg; 0.93 mmol; 1 ekv.) je otopljen u metanolu (5 ml) te je dodan bakrov(II) acetat monohidrat (18 mg; 0.09 mmol; 0.1 ekv.) i 2-etinilpiridin (94 µl;

0.93 mmol; 1 ekv.). Reakcijska smjesa je miješana 24 h pri sobnoj temperaturi. Napredak reakcije praćen je tankoslojnom kromatografijom. Otapalo je uklonjeno pri sniženom tlaku, a ostatak pročišćen kolonskom kromatografijom uz eluens diklormetan:metanol = 100:1 uz postupno povećavanje polarnosti sustava od 100:1 do 50:1. Izoliran je bijeli prah spoja **15** (210 mg; 71 %), t. t. > 200 °C. ^{1}H NMR (300 MHz, DMSO) δ 8.78 (s, 1H, H5-triaz.), 8.60 (d, J = 4.3 Hz, 1H, Ar-H), 8.06 (d, J = 7.9 Hz, 1H, Ar-H), 7.91 (td, J = 7.7, 1.7 Hz, 1H, Ar-H), 7.77 (d, J = 8.1 Hz, 1H, Ar-H), 7.36 (ddd, J = 7.4, 4.9, 0.9 Hz, 1H, Ar-H), 7.30 (s, 1H, Ar-H), 7.25 (d, J = 8.2 Hz, 1H) , Ar-H, 6.03 (s, 2H, CH_2), 5.92 (s, 1H, Ar-H), 2.42 (s, 3H, CH_3). ^{13}C NMR (75 MHz, DMSO) δ 159.48, 153.15, 149.62, 149.57, 149.52, 147.58, 143.43, 137.18, 125.57, 124.34, 124.26, 123.10, 119.47, 116.77, 114.62, 113.11, 49.32, 20.96. IR (ATR): ν/cm^{-1} 3077, 1719, 1621, 1556, 1446, 1317, 1143, 892, 848, 792.

3.3.6. 4-(4-(piridin-2-il)-1H-1,2,3-triazol-1-il)kumarin (16)

4-azidokumarin (**6**; 100 mg; 0.53 mmol; 1 ekv.) je otopljen u metanolu (5 ml) te je dodan bakrov(II) acetat monohidrat (11 mg; 0.05 mmol; 0.11 ekv.) i 2-etinilpiridin (54 µl; 0.53 mmol; 1 ekv.). Reakcijska smjesa je miješana 24 h pri sobnoj temperaturi. Napredak reakcije praćen je tankoslojnom kromatografijom. Otapalo je uklonjeno pri sniženom tlaku, a ostatak pročišćen kolonskom kromatografijom uz eluens etilacetat:*n*-heksan = 1:1. Izoliran je žuti prah spoja **16** (85 mg; 55 %), t. t. = 154 – 157 °C. ^{1}H NMR (300 MHz, DMSO) δ 9.27 (s, 1H, H5-triaz.), 8.74 – 8.63 (m, 1H, Ar-H), 8.17 (d, J = 7.9 Hz, 1H, Ar-H), 7.99 (td, J = 7.8, 1.7 Hz, 1H, Ar-H), 7.89 (dd, J = 8.1, 1.2 Hz, 1H, Ar-H), 7.83 – 7.73 (m, 1H, Ar-H), 7.64 – 7.55 (m, 1H, Ar-H), 7.51 – 7.40 (m, 2H, Ar-H), 7.10 (s, 1H, Ar-H). ^{13}C NMR (75 MHz, DMSO) δ 159.38, 153.54, 149.79, 148.78, 147.62, 145.85, 137.39, 133.40, 125.58, 124.94, 124.87, 123.61, 120.01, 117.05, 114.32, 110.83. IR (ATR): ν/cm^{-1} 3052, 1721, 1626, 1598, 1410, 1190, 1026, 938, 763.

3.3.7. 4-((1-(piridin-2-ilmetil)-1*H*-1,2,3-triazol-4-il)metoksi)kumarin (17)

4-(2-propiniloksi)kumarin (**7**; 200 mg; 1.00 mmol; 1 ekv.) je otopljen u metanolu (5 ml) te je dodan bakrov(II) acetat monohidrat (20 mg; 0.10 mmol; 0.1 ekv.) i 2-(azidometil)piridin (**9**; 95 mg; 1 mmol; 1 ekv.). Reakcijska smjesa je miješana 24 h pri sobnoj temperaturi. Napredak reakcije praćen je tankoslojnom kromatografijom. Otapalo je uklonjeno pri sniženom tlaku, a ostatak pročišćen kolonskom kromatografijom uz eluens diklormetan:metanol = 100:1 uz postupno povećavanje polarnosti sustava od 100:1 do 50:1. Izoliran je bijeli prah spoja **17**

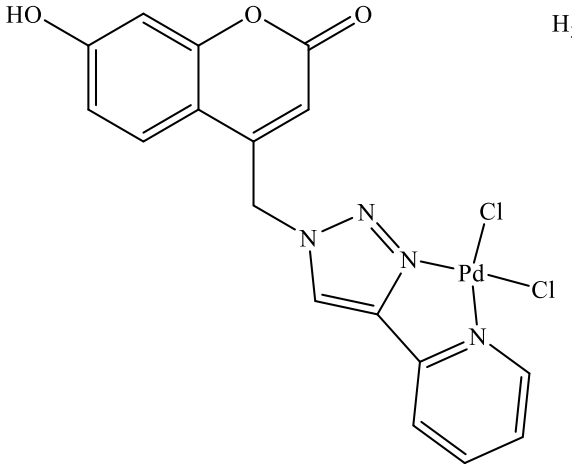
(211 mg; 63 %), t. t. = 141 – 144 °C. ^{1}H NMR (300 MHz, DMSO) δ 8.54 (d, J = 4.1 Hz, 1H, Ar-H), 8.36 (s, 1H, H5-triaz.), 7.99 (d, J = 9.5 Hz, 1H, Ar-H), 7.82 (td, J = 7.7, 1.7 Hz, 1H, Ar-H), 7.63 (d, J = 8.6 Hz, 1H, Ar-H), 7.40 – 7.26 (m, 2H, Ar-H), 7.16 (d, J = 2.3 Hz, 1H, Ar-H), 7.02 (dd, J = 8.6, 2.4 Hz, 1H, Ar-H), 6.30 (d, J = 9.5 Hz, 1H, Ar-H), 5.74 (s, 2H, CH_2), 5.28 (s, 2H, CH_2). ^{13}C NMR (75 MHz, DMSO) δ 161.10, 160.23, 155.28, 154.87, 149.43, 144.26, 142.02, 137.32, 129.48, 125.78, 123.25, 122.22, 112.91, 112.66, 112.56, 101.56, 61.62, 54.37. IR (ATR): ν/cm^{-1} 3076, 1717, 1622, 1384, 1253, 1186, 1109, 936, 847, 751.

3.3.8. 7-((1-(piridin-2-ilmetil)-1*H*-1,2,3-triazol-4-il)metoksi)kumarin (18)

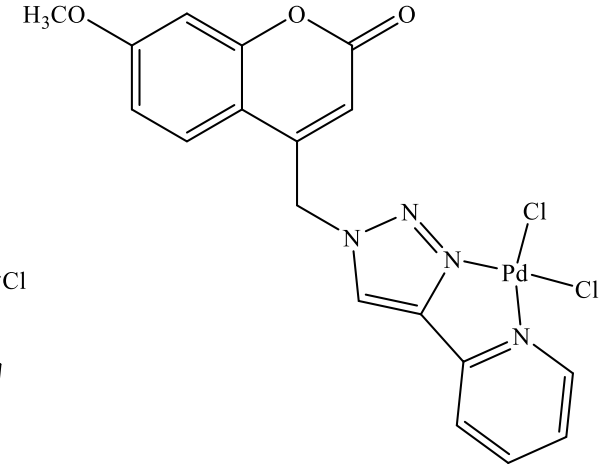
7-(2-propiniloksi)kumarin (**8**; 190 mg; 0.94 mmol; 1 ekv.) je otopljen u metanolu (5 ml) te je dodan bakrov(II) acetat monohidrat (19 mg; 0.09 mmol; 0.1 ekv.) i 2-(azidometil)piridin (**9**; 127 mg; 0.94 mmol; 1 ekv.). Reakcijska smjesa je miješana 24 h pri sobnoj temperaturi. Napredak reakcije praćen je tankoslojnom kromatografijom. Otapalo je uklonjeno pri sniženom tlaku, a ostatak pročišćen kolonskom kromatografijom uz eluens diklormetan:metanol = 100:1 uz postupno povećavanje polarnosti sustava od 100:1 do 50:1. Izoliran je bijeli prah spoja **18** (163 mg; 52 %), t. t. = 172 – 175 °C. ^{1}H NMR (300 MHz, DMSO) δ 8.55 (d, J = 4.1 Hz, 1H, Ar-H), 8.48 (s, 1H, H5-triaz.), 7.84 (t, J = 7.1 Hz, 1H, Ar-H), 7.74 (d, J = 7.7 Hz, 1H, Ar-H), 7.65 (t, J = 7.6 Hz, 1H, Ar-H), 7.46 – 7.25 (m, 4H, Ar-H), 6.17 (s, 1H, Ar-H), 5.77 (s, 2H, CH_2), 5.44 (s, 2H, CH_2). ^{13}C NMR (75 MHz, DMSO) δ 164.33, 161.51, 154.81, 152.74, 149.45, 141.03, 137.35, 132.78, 126.16, 124.19, 123.27, 122.85, 122.25, 116.44, 115.05, 91.33, 62.76, 54.41. IR (ATR): ν/cm^{-1} 3114, 1704, 1599, 1389, 1222, 1196, 1123, 996, 824, 757.

3.4. Pregled sintetiziranih metalnih kompleksa 10a-10d te 19-26

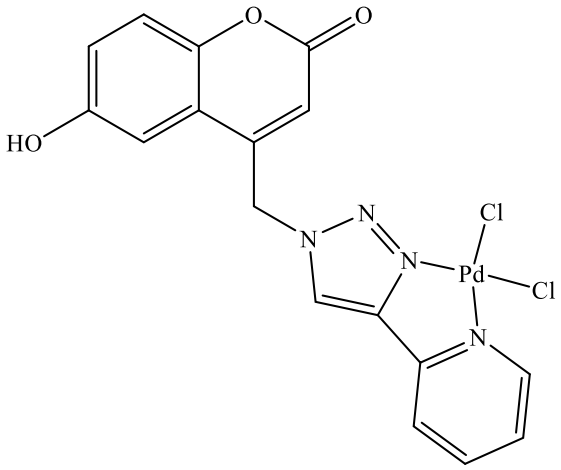
3.4.1. Pregled sintetiziranih metalnih kompleksa paladija(II) 10a-10d



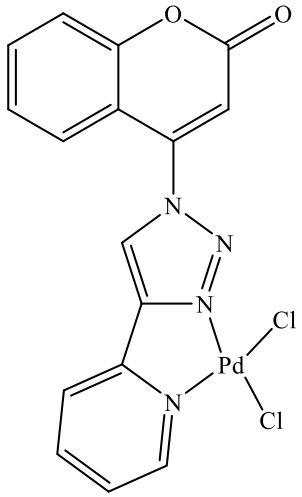
10a



10b

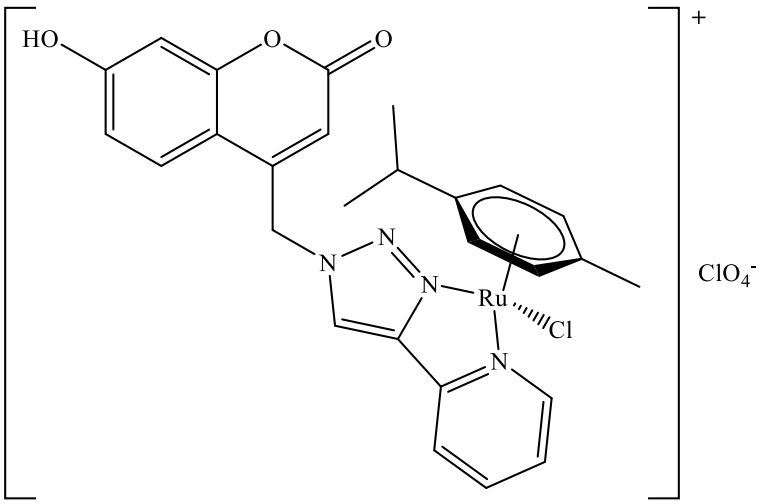


10c

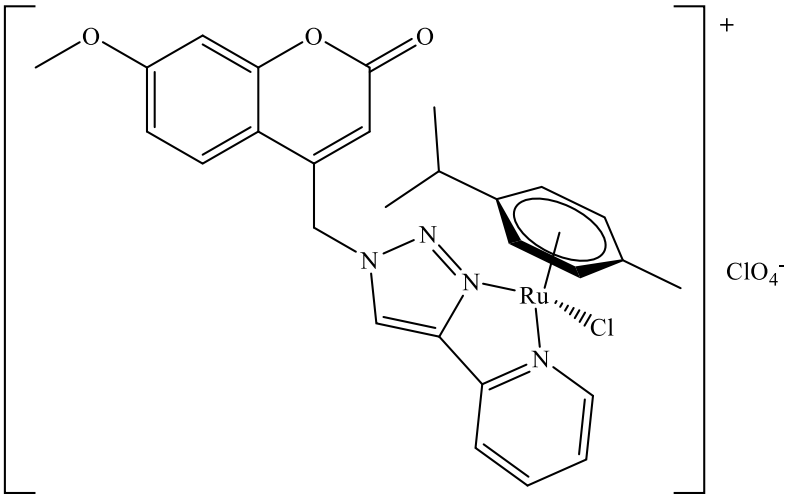


10d

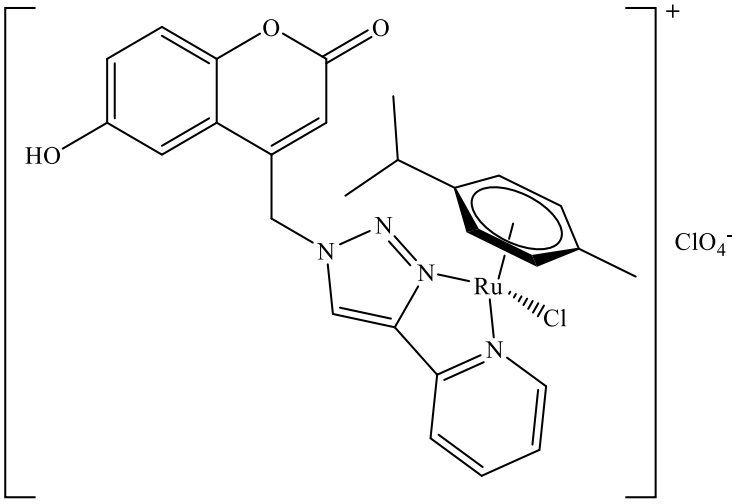
3.4.2. Pregled sintetiziranih metalnih kompleksa rutenija(II) 19-26



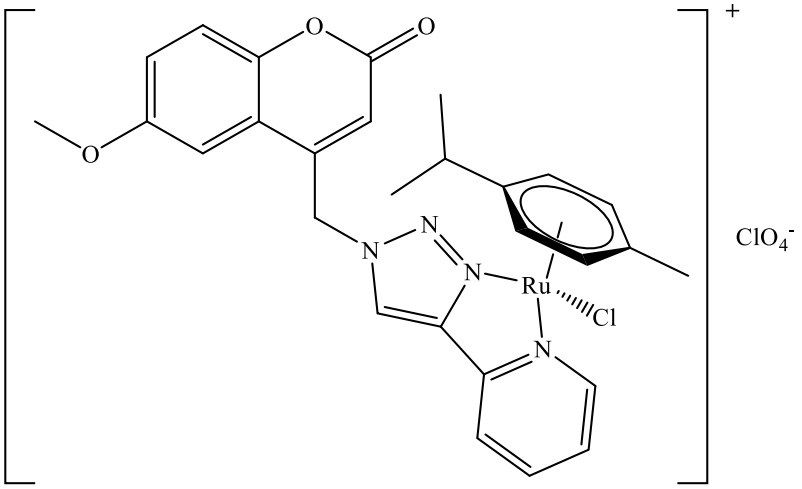
19



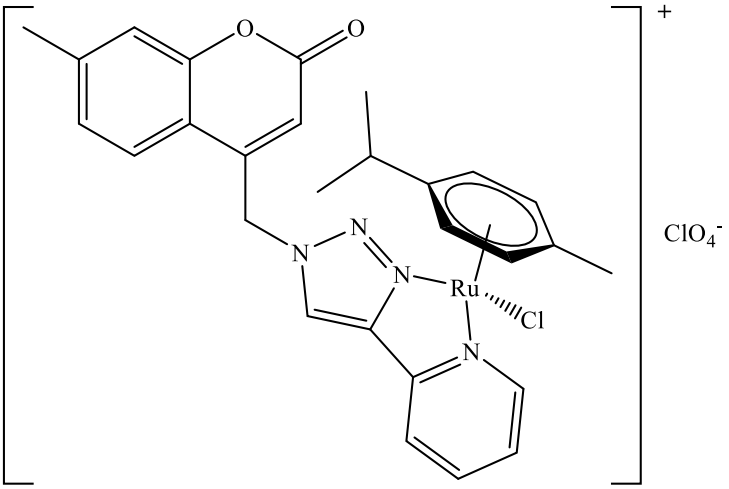
20



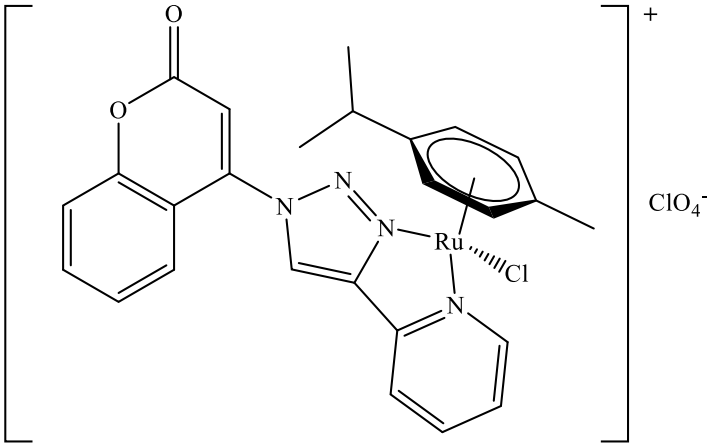
21



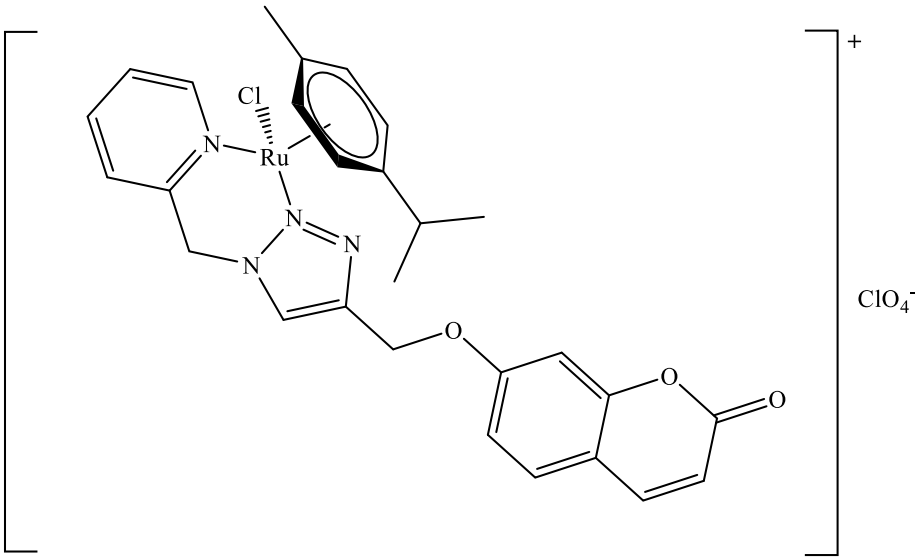
22



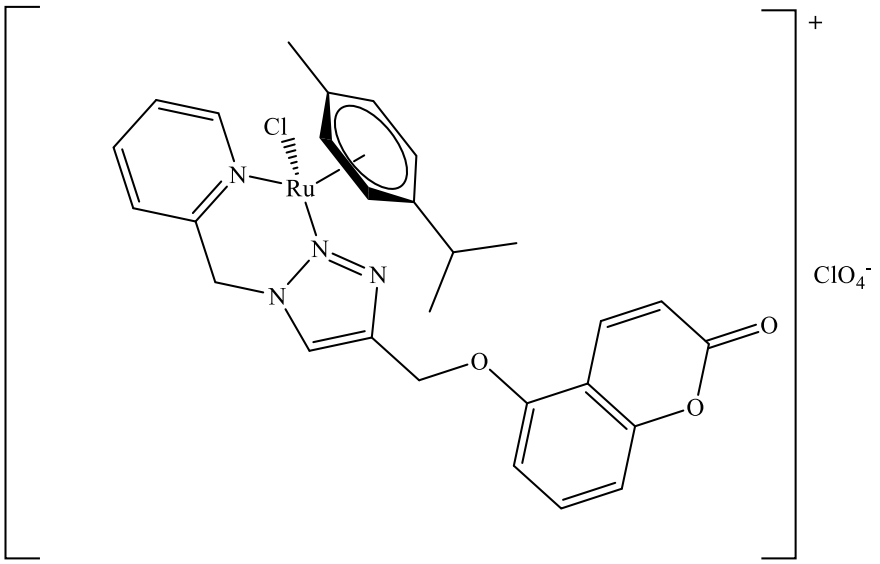
23



24



25



26

3.5. Priprava metalnih kompleksa konjugata kumarina i piridina

3.5.1. Pokušaj priprave metalnih kompleksa Pd(II*)*

3.5.1.1. Pd(11)Cl_2 (10a)

Ligand **11** (34 mg; 0.11 mmol; 1 ekv.) je otopljen u diklormetanu HPLC čistoće (5 ml) te je dodana ekvivalentna količina dikloro(1,5-ciklooktadien)paladija(II) (30 mg; 0.11 mmol; 1 ekv.). Reakcijska smjesa je miješana 3 h pri sobnoj temperaturi. Napredak reakcije praćen je tankoslojnom kromatografijom. Reakcijskoj smjesi je dodan *n*-heksan pri čemu taloži produkt reakcije. Talog je ispran diklormetanom te filtiran Buchnerovim lijevkom, nakon čega je sušen pod sniženim tlakom. Produkt je izoliran u obliku žutog praha. Spektar ^{1}H NMR spoja prikazan je na slici 41 (Prilozi).

3.5.1.2. Pd(12)Cl_2 (10b)

Ligand **12** (35 mg; 0.11 mmol; 1 ekv.) je otopljen u diklormetanu HPLC čistoće (5 ml) te je dodana ekvivalentna količina dikloro(1,5-ciklooktadien)paladija(II) (30 mg; 0.11 mmol; 1 ekv.). Reakcijska smjesa je miješana 3 h pri sobnoj temperaturi. Napredak reakcije praćen je tankoslojnom kromatografijom. Reakcijskoj smjesi je dodan *n*-heksan pri čemu taloži produkt reakcije. Talog je ispran diklormetanom te filtiran Buchnerovim lijevkom, nakon čega je sušen pod sniženim tlakom. Produkt je izoliran u obliku žutog praha.

3.5.1.3. Pd(13)Cl_2 (10c)

Ligand **13** (34 mg; 0.11 mmol; 1 ekv.) je otopljen u diklormetanu HPLC čistoće (5 ml) te je dodana ekvivalentna količina dikloro(1,5-ciklooktadien)paladija(II) (30mg; 0.11 mmol; 1 ekv.). Reakcijska smjesa je miješana 3 h pri sobnoj temperaturi. Napredak reakcije praćen je tankoslojnom kromatografijom. Reakcijskoj smjesi je dodan *n*-heksan pri čemu taloži produkt reakcije. Talog je ispran diklormetanom te filtiran Buchnerovim lijevkom, nakon čega je sušen pod sniženim tlakom. Produkt je izoliran u obliku žutog praha.

3.5.1.4. Pd(16)Cl_2 (10d*)*

Ligand **16** (31 mg; 0.11 mmol; 1 ekv.) je otopljen u diklormetanu HPLC čistoće (5 ml) te je dodana ekvivalentna količina dikloro(1,5-ciklooktadien)paladija(II) (30 mg; 0.11 mmol; 1 ekv.). Reakcijska smjesa je miješana 3 h pri sobnoj temperaturi. Napredak reakcije praćen je tankoslojnom kromatografijom. Reakcijskoj smjesi je dodan *n*-heksan pri čemu taloži produkt

reakcije. Talog je ispran diklormetanom te filtiran Buchnerovim lijevkom, nakon čega je sušen pod sniženim tlakom. Produkt je izoliran u obliku žutog praha. Spektar ^{1}H NMR spoja prikazan je na slici 40 (Prilozi).

3.5.2. Priprava metalnih kompleksa Ru(II)

3.5.2.1. [Ru(11)(*p*-cimen)Cl]ClO_4 (19)

Ligand **11** (50 mg; 0.16 mmol; 2 ekv.) je otopljen u acetonu (3 ml) te je dodan smjesi dikloro(*p*-cimen)rutenij(II) dimera (48 mg; 0.08 mmol; 1 ekv.) i srebrovog(I) perklorata (32 mg; 0.16 mmol; 2 ekv.) otopljenih u acetonu (5 ml). Reakcijska smjesa je miješana 24 h pri sobnoj temperaturi. Napredak reakcije praćen je tankoslojnom kromatografijom. Otapalo je uklonjeno pri sniženom tlaku, a ostatak pročišćen kolonskom kromatografijom uz eluens diklormetan:metanol uz postupno povećanje polarnosti sustava diklormetan:metanol od 50:1 do 20:1. Izoliran je svijetlo žuti prah spoja **19** (57 mg; 53 %), t. t. > 200 °C.
^{1}H NMR (300 MHz, DMSO) δ 10.79 (s, 1H, OH), 9.47 (d, J = 5.6 Hz, 1H, H5-triazol), 9.30 (s, 1H, Ar-H), 8.31 – 8.12 (m, 2H, Ar-H), 7.70 (dt, J = 6.2, 2.7 Hz, 2H, Ar-H), 6.86 (dd, J = 8.7, 2.2 Hz, 1H, Ar-H), 6.80 (d, J = 2.2 Hz, 1H, Ar-H), 6.22 (m, 3H), 6.24 (dd, J = 19.1, 6.0 Hz, 2H, Ar-H *p*-cimen), 5.95 – 5.79 (m, 2H), 2.63 – 2.52 (m, J = 13.8, 6.9 Hz, 1H, izopropil CH *p*-cimen, zaklonjen sa DMSO), 2.15 (s, 3H, CH_3 *p*-cimen), 1.04 (d, J = 6.9 Hz, 3H, izopropil CH_3 *p*-cimen), 0.89 (d, J = 6.9 Hz, 3H, izopropil CH_3 *p*-cimen). ,^{13}C NMR (75 MHz, DMSO) δ 161.88, 159.72, 155.64, 155.21, 148.63, 147.56, 146.41, 140.17, 126.58, 126.04, 122.58, 113.31, 110.45, 109.04, 103.70, 102.67, 102.46, 85.90, 84.35, 83.53, 83.06, 51.44, 30.37, 22.15, 20.85, 18.10. IR (ATR): ν/cm^{-1} 3242, 2967, 1723, 1614, 1459, 1309, 1105, 1041, 839, 778.

3.5.2.2. [Ru(12)(*p*-cimen)Cl]ClO_4 (20)

Ligand **12** (50 mg; 0.15 mmol; 2 ekv.) je otopljen u acetonu (3 ml) te je dodan smjesi dikloro(*p*-cimen)rutenij(II) dimera (46 mg; 0.08 mmol; 1 ekv.) i srebrovog(I) perklorata (31 mg; 0.15 mmol; 2 ekv.) otopljenih u acetonu (5 ml). Reakcijska smjesa je miješana 24 h pri sobnoj temperaturi. Napredak reakcije praćen je tankoslojnom kromatografijom. Otapalo je uklonjeno pri sniženom tlaku, a ostatak pročišćen kolonskom kromatografijom uz eluens diklormetan:metanol uz postupno povećanje polarnosti sustava diklormetan:metanol od 50:1 do 20:1. Izoliran je žuti prah spoja **20** (66 mg; 63 %), t. t. = 155 - 158 °C. ^{1}H NMR (300 MHz, DMSO) δ 9.47 (d, J = 5.6 Hz, 1H, Ar-H), 9.31 (s, 1H, H5-triaz.), 8.30 – 8.17 (m, 2H, Ar-H),

7.80 (d, J = 8.9 Hz, 1H, Ar-H), 7.75 – 7.64 (m, 1H, Ar-H), 7.12 (d, J = 2.4 Hz, 1H, Ar-H), 7.05 (dd, J = 8.9, 2.5 Hz, 1H, Ar-H), 6.30 (q, J = 16.6 Hz, 2H, CH_2), 6.18 (d, J = 6.2 Hz, 1H, , Ar-H *p*-cimen), 6.06 (dd, J = 21.4, 6.1 Hz, 2H, Ar-H *p*-cimen), 5.94 (s, 1H, Ar-H, Ar-H *p*-cimen), 5.88 (d, J = 6.1 Hz, 1H, Ar-H), 3.89 (s, 3H, OCH_3), 2.57 (dd, J = 13.9, 7.0 Hz, 1H, izopropil CH *p*-cimen, preklopljen s DMSO), 2.15 (s, 3H, CH_3 *p*-cimen), 1.04 (d, J = 6.9 Hz, 3H, izopropil CH_3 *p*-cimen), 0.90 (d, J = 6.9 Hz, 3H, izopropil CH_3 *p*-cimen). ^{13}C NMR (75 MHz, DMSO) δ 162.96, 159.58, 155.65, 155.18, 148.56, 147.56, 146.42, 140.17, 126.62, 126.15, 125.87, 122.59, 112.63, 111.37, 110.17, 103.72, 102.45, 101.21, 85.89, 84.40, 83.52, 83.03, 56.10, 51.41, 30.37, 22.11, 20.88, 18.09. IR (ATR): ν/cm^{-1} 3098, 2973, 1722, 1605, 1461, 1392, 1289, 1090, 843, 786

3.5.2.3. [Ru(13)(*p*-cimen)Cl]ClO_4 (21)

Ligand **13** (50 mg; 0.16 mmol; 2 ekv.) je otopljen u acetonu (3 ml) te je dodan smjesi dikloro(*p*-cimen)rutenij(II) dimera (48 mg; 0.08 mmol; 1 ekv.) i srebrovog(I) perklorata (32 mg; 0.16 mmol; 2 ekv.) otopljenih u acetonu (5 ml). Reakcijska smjesa je miješana 24 h pri sobnoj temperaturi. Napredak reakcije praćen je tankoslojnom kromatografijom. Otapalo je uklonjeno pri sniženom tlaku, a ostatak pročišćen kolonskom kromatografijom uz eluens diklormetan:metanol uz postupno povećanje polarnosti sustava diklormetan:metanol od 50:1 do 20:1. Izoliran je žuti prah spoja **21** (65 mg; 60 %), t. t. = 154 - 157 °C.

^1H NMR (600 MHz, DMSO) δ 9.95 (s, 1H, OH), 9.47 (d, J = 5.7 Hz, 1H, Ar-H), 9.30 (s, 1H, H5-triaz.), 8.28 – 8.18 (m, 2H, Ar-H), 7.74 – 7.65 (m, 1H, Ar-H), 7.35 (d, J = 8.9 Hz, 1H, Ar-H), 7.17 (d, J = 2.7 Hz, 1H, Ar-H), 7.14 (dd, J = 8.9, 2.8 Hz, 1H, Ar-H), 6.31 (dd, J = 16.3, 0.8 Hz, 1H, CH_2), 6.21 (dd, J = 16.3, 0.7 Hz, 1H, CH_2), 6.19 – 6.16 (m, 1H, Ar-H *p*-cimen), 6.13 (s, 1H, Ar-H), 6.09 (d, J = 6.0 Hz, 1H, Ar-H *p*-cimen), 6.04 (d, J = 5.9 Hz, 1H, Ar-H *p*-cimen), 5.89 – 5.85 (m, 1H, Ar-H *p*-cimen), 2.58 – 2.51 (m, 1H, izopropil CH *p*-cimen), 2.16 (s, 3H, CH_3 *p*-cimen), 1.02 (d, J = 6.9 Hz, 3H, izopropil CH_3 *p*-cimen), 0.86 (d, J = 6.9 Hz, 3H, izopropil CH_3 *p*-cimen).^{13}C NMR (151 MHz, DMSO) δ 159.42, 155.66, 154.00, 147.92, 147.53, 146.42, 140.17, 126.56, 126.14, 122.58, 120.56, 117.87, 117.32, 115.29, 109.03, 103.79, 102.54, 85.75, 84.29, 83.60, 83.06, 51.43, 30.38, 22.15, 20.78, 18.10. IR (ATR): ν/cm^{-1} 3289, 3068, 2956, 1711, 1576, 1439, 1092, 857, 775.

3.5.2.4. [Ru(14)(*p*-cimen)Cl]ClO_4 (22)

Ligand **14** (50 mg; 0.15 mmol; 2 ekv.) je otopljen u acetonu (3 ml) te je dodan smjesi dikloro(*p*-cimen)rutenij(II) dimera (46 mg; 0.07 mmol; 1 ekv.) i srebrovog(I) perklorata (31 mg; 0.15 mmol; 2 ekv.) otopljenih u acetonu (5 ml). Reakcijska smjesa je miješana 24 h pri sobnoj temperaturi. Napredak reakcije praćen je tankoslojnom kromatografijom. Otapalo je uklonjeno pri sniženom tlaku, a ostatak pročišćen kolonskom kromatografijom uz eluens diklormetan:metanol = 50:1 uz postupno povećanje polarnosti sustava diklormetan:metanol od 50:1 do 20:1. Izoliran je žuti prah spoja **22** (53 mg; 51 %), t. t. = 137 - 140 °C.

^{1}H NMR (600 MHz, DMSO) δ 9.48 (d, J = 5.7 Hz, 1H, Ar-H), 9.32 (s, 1H, H5-triaz.), 8.30 – 8.17 (m, 2H, Ar-H), 7.70 (ddd, J = 7.4, 5.8, 1.9 Hz, 1H, Ar-H), 7.47 (m, 1H, Ar-H), 7.36 – 7.30 (m, J = 7.9, 2.5 Hz, 2H, Ar-H), 6.34 (s, 2H, CH_2), 6.18 (s, 1H, Ar-H), 6.15 (d, J = 6.3 Hz, 1H, Ar-H *p*-cimen), 6.10 (d, J = 6.1 Hz, 1H, Ar-H *p*-cimen), 6.01 (d, J = 6.2 Hz, 1H, Ar-H *p*-cimen), 5.89 (d, J = 6.2 Hz, 1H, Ar-H *p*-cimen), 3.85 (s, 3H, OCH_3), 2.60 – 2.52 (m, 1H, izopropil CH *p*-cimen), 2.15 (s, 3H, CH_3 *p*-cimen), 1.04 (d, J = 6.9 Hz, 3H, izopropil CH_3 *p*-cimen), 0.91 (d, J = 6.9 Hz, 3H, izopropil CH_3 *p*-cimen). ^{13}C NMR (75 MHz, DMSO) δ 159.33, 155.74, 155.67, 147.95, 147.59, 147.48, 146.48, 140.20, 126.62, 126.18, 122.62, 119.77, 118.07, 117.26, 115.58, 107.80, 103.77, 102.34, 85.87, 84.40, 83.58, 83.12, 55.94, 51.46, 30.40, 22.11, 20.87, 18.08. IR (ATR): ν/cm^{-1} 3106, 2958, 1711, 1575, 1461, 1422, 1243, 1076, 783.

3.5.2.5. [Ru(15)(*p*-cimen)Cl]ClO_4 (23)

Ligand **15** (50 mg; 0.16 mmol; 2 ekv.) je otopljen u acetonu (3 ml) te je dodan smjesi dikloro(*p*-cimen)rutenij(II) dimera (48 mg; 0.08 mmol; 1 ekv.) i srebrovog(I) perklorata (32 mg; 0.16 mmol; 2 ekv.) otopljenih u acetonu (5 ml). Reakcijska smjesa je miješana 24 h pri sobnoj temperaturi. Napredak reakcije praćen je tankoslojnom kromatografijom. Otapalo je uklonjeno pri sniženom tlaku, a ostatak pročišćen kolonskom kromatografijom uz eluens diklormetan:metanol uz postupno povećanje polarnosti sustava diklormetan:metanol od 50:1 do 20:1. Izoliran je svijetlo žuti prah spoja **23** (72 mg; 66 %), t. t. = 163 - 166 °C.

^{1}H NMR (600 MHz, DMSO) δ 9.47 (d, J = 5.7 Hz, 1H, Ar-H), 9.31 (s, 1H, H5-triaz.), 8.26 – 8.17 (m, 2H, Ar-H), 7.75 (d, J = 8.1 Hz, 1H, Ar-H), 7.70 (ddd, J = 7.4, 5.7, 1.7 Hz, 1H, Ar-H), 7.35 (s, 1H, Ar-H), 7.28 (dd, J = 8.1, 1.1 Hz, 1H, Ar-H), 6.34 (dd, J = 16.3, 0.7 Hz, 1H, CH_2), 6.28 (dd, J = 16.4, 0.8 Hz, 1H, CH_2), 6.18 (d, J = 6.4 Hz, 1H, izopropil CH *p*-cimen), 6.12 – 6.07 (m, 2H, Ar-H + izopropil CH *p*-cimen), 6.03 (d, J = 6.1 Hz, 1H, izopropil CH *p*-

cimen), 5.88 (d, J = 6.3 Hz, 1H, izopropil CH *p*-cimen), 2.60 – 2.51 (m, 1H, izopropil CH *p*-cimen), 2.44 (s, 3H, CH_3), 2.15 (s, 3H, izopropil CH_3 *p*-cimen), 1.04 (d, J = 6.9 Hz, 3H, izopropil CH_3 *p*-cimen), 0.89 (d, J = 6.9 Hz, 3H, izopropil CH_3 *p*-cimen). ^{13}C NMR (151 MHz, DMSO) δ 159.38, 155.66, 153.28, 148.31, 147.57, 146.44, 143.89, 140.18, 126.62, 126.16, 125.77, 124.42, 122.59, 117.00, 114.37, 113.97, 103.73, 102.46, 85.92, 84.39, 83.53, 83.06, 51.39, 30.38, 22.14, 21.09, 20.87, 18.10. IR (ATR): ν/cm^{-1} 3124, 2965, 1728, 1623, 1448, 1075, 883, 784.

3.5.2.6. [Ru(16)(*p*-cimen)Cl]ClO_4 (24)

Ligand **16** (50 mg; 0.17 mmol; 2 ekv.) je otopljen u acetonu (3 ml) te je dodan smjesi dikloro(*p*-cimen)rutenij(II) dimera (53 mg; 0.09 mmol; 1 ekv.) i srebrovog(I) perklorata (36 mg; 0.17 mmol; 2 ekv.) otopljenih u acetonu (5 ml). Reakcijska smjesa je miješana 24 h pri sobnoj temperaturi. Napredak reakcije praćen je tankoslojnom kromatografijom. Otapalo je uklonjeno pri sniženom tlaku, a ostatak pročišćen kolonskom kromatografijom uz eluens diklormetan:metanol uz postupno povećanje polarnosti sustava diklormetan:metanol od 50:1 do 20:1. Izoliran je narančasto žuti prah spoja **24** (32 mg; 28%), t. t. > 200 °C. Jedinični kristali kompleksa **24** pogodni za određivanje strukture difrakcijom rendgenskog zračenja u monokristalu dobiveni su polaganim isparavanjem otopine kompleksa u smjesi diklormetan:etanol = 5:1. ^{1}H NMR (300 MHz, DMSO) δ 9.86 (s, 1H, Ar-H), 9.56 (d, J = 5.6 Hz, 1H, H5-triaz.), 8.40 – 8.25 (m, 2H, Ar-H), 7.92 – 7.72 (m, 3H, Ar-H), 7.68 (d, J = 8.1 Hz, 1H, Ar-H), 7.54 (t, J = 7.6 Hz, 1H, Ar-H), 7.31 (s, 1H, Ar-H), 6.36 – 6.19 (m, 2H, izopropil CH *p*-cimen), 6.04 (dd, J = 12.4, 6.0 Hz, 2H, izopropil CH *p*-cimen), 2.86 – 2.66 (m, 1H, izopropil CH *p*-cimen), 2.15 (s, 1H, CH_3 *p*-cimen), 1.14 (s, 6H, izopropil CH_3 *p*-cimen). ^{13}C NMR (151 MHz, DMSO) δ 159.00, 155.85, 153.65, 147.22, 146.55, 145.08, 140.50, 134.01, 127.47, 126.70, 125.28, 124.57, 122.73, 117.47, 113.79, 113.16, 104.30, 102.38, 86.79, 85.05, 83.46, 83.22, 30.47, 22.20, 21.17, 18.08. IR (ATR): ν/cm^{-1} 3118, 3071, 2937, 1725, 1610, 1436, 1283, 1086, 944, 856, 768.

3.5.2.7. [Ru(17)(*p*-cimen)Cl]ClO_4 (25)

Ligand **17** (50 mg; 0.15 mmol; 2 ekv.) je otopljen u acetonu (3 ml) te je dodan smjesi dikloro(*p*-cimen)rutenij(II) dimera (46 mg; 0.07 mmol; 1 ekv.) i srebrovog(I) perklorata (31 mg; 0.15 mmol; 2 ekv.) otopljenih u acetonu (5 ml). Reakcijska smjesa je miješana 24 h pri

sobnoj temperaturi. Napredak reakcije praćen je tankoslojnom kromatografijom. Otapalo je uklonjeno pri sniženom tlaku, a ostatak pročišćen kolonskom kromatografijom uz eluens diklormetan:metanol = 50:1 uz postupno povećanje polarnosti sustava diklormetan:metanol od 50:1 do 30:1. Izoliran je žuti prah spoja **25**. Analizom spektara ^{1}H NMR utvrđeno je da dobiveni kompleks **25** nema zadovoljavajuću čistoću stoga se nije vršila daljnja analiza. Spektar ^{1}H NMR spoja prikazan je na slici 54 (Prilozi).

3.5.2.8. [Ru(18)(*p*-cimen)Cl]ClO_4 (26)

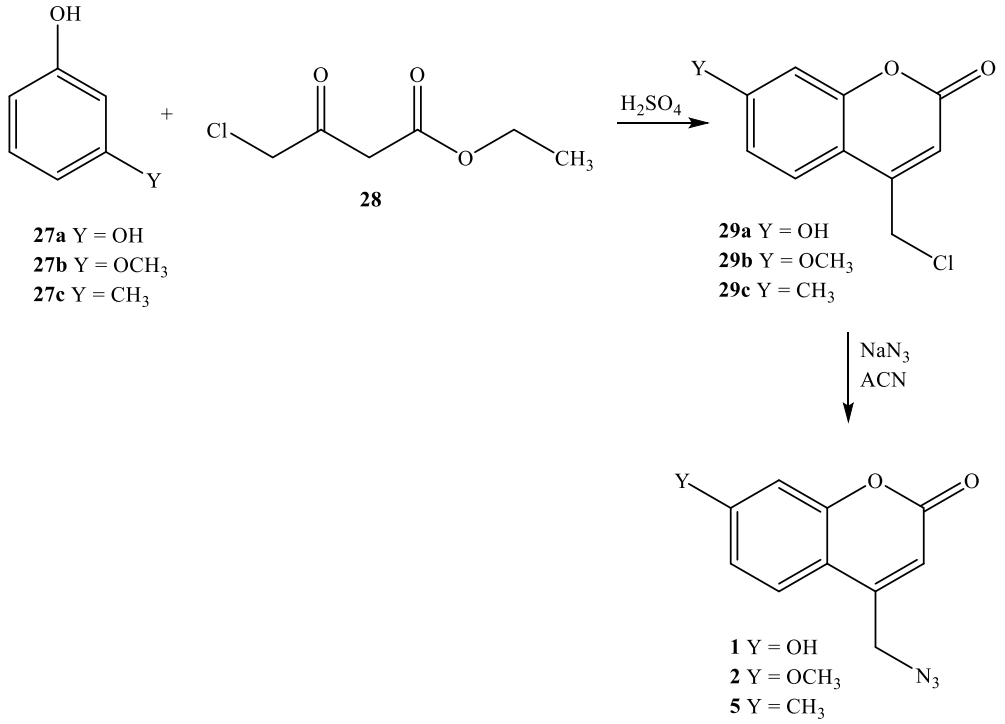
Ligand **18** (50 mg; 0.15 mmol; 2 ekv.) je otopljen u acetonu (3 ml) te je dodan smjesi dikloro(*p*-cimen)rutenij(II) dimera (46 mg; 0.07 mmol; 1 ekv.) i srebrovog(I) perklorata (31 mg; 0.15 mmol; 2 ekv.) otopljenih u acetonu (5 ml). Reakcijska smjesa je miješana 24 h pri sobnoj temperaturi. Napredak reakcije praćen je tankoslojnom kromatografijom. Otapalo je uklonjeno pri sniženom tlaku, a ostatak pročišćen kolonskom kromatografijom uz eluens diklormetan:metanol = 50:1 uz postupno povećanje polarnosti sustava diklormetan:metanol od 50:1 do 30:1. Izoliran je žuti prah spoja **26**. Analizom spektara ^{1}H NMR utvrđeno je da dobiveni kompleks **26** nema zadovoljavajuću čistoću stoga se nije vršila daljnja analiza. Spektar ^{1}H NMR spoja prikazan je na slici 55 (Prilozi).

4. REZULTATI I RASPRAVA

4.1. Sinteza liganada

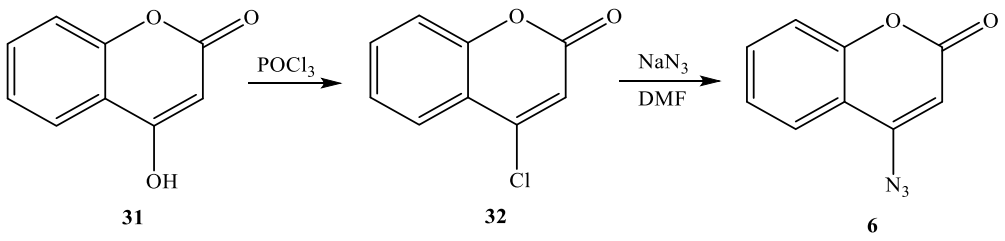
U ovom su radu višestupanjskom sintezom pripravljeni konjugati kumarina i piridina **11-18** povezani 1,2,3-triazolnom premosnicom te su korišteni, kao ligandi, u sintezi metalnih kompleksa **19-26**. Struktura pripravljenih spojeva potvrđena je primjenom spektroskopije ^{1}H i ^{13}C NMR, UV/Vis i IR, a kristalna struktura kompleksa **24** određena je difrakcijom rendgenskog zračenja u jediničnom kristalu.

Dvostupanjskom sintezom pripravljeni su azidni derivati kumarina različito supstituirani u položaju 6 i 7 potrebni za sintezu 1,2,3-triazolnih liganada. U prvom stupnju pripravljeni su supstituirani 4-klormetilkumarini **29a - 29c** i 4-klorkumarin **32**. Reakcijom Pechmannove ciklizacije *meta*-supstituiranih fenola **27a – 27c** i etil-4-kloracetoacetata **28** u kiselom mediju dobiveni su 4-klormetilkumarini **29a – 29c**[61,62] prema literaturno opisanim metodama. Supstituirani 4-azidometilkumarini dobiveni su reakcijom supstitucije 4-klormetilkumarina **27a – 27c** s natrijevim azidom u acetonitrilu (shema 1).



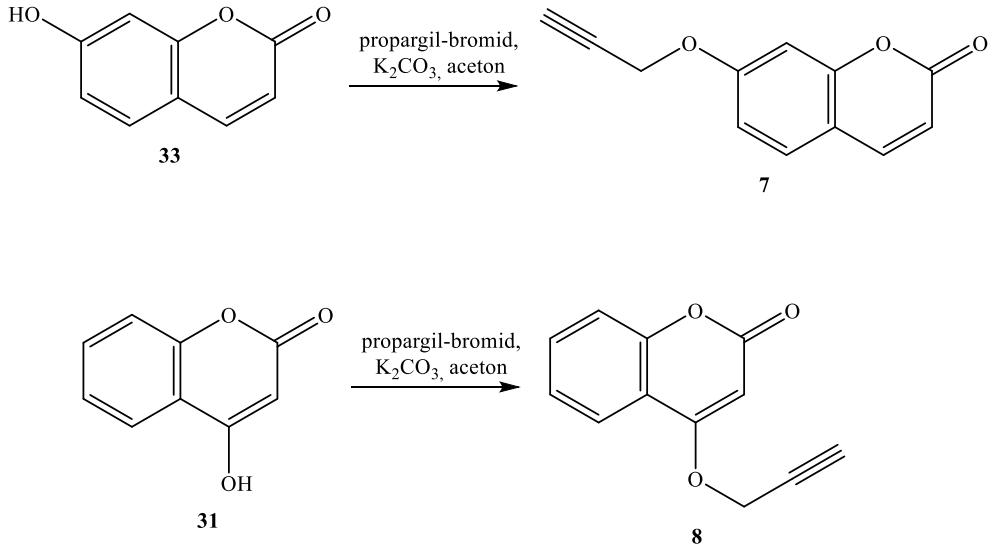
Shema 1. Sinteza spojeva **1**, **2** *i* **5**

4-azidokumarin **6** je dobiven dvostupanjskom sintezom počevši od 4-hidroksikumarina **31** primjenom metoda opisanih u literaturi.[59] U prvom stupnju provedena je reakcija kloriranja u fosforil-kloridu ($POCl_3$), uz nastanak 4-klorkumarina **32**. Reakcijom nukleofilne aromatske supstitucije 4-klorkumarina **32** s natrijevim azidom dobiven je 4-azidokumarin **6** (shema 2).



Shema 2. Sinteza spoja **6**

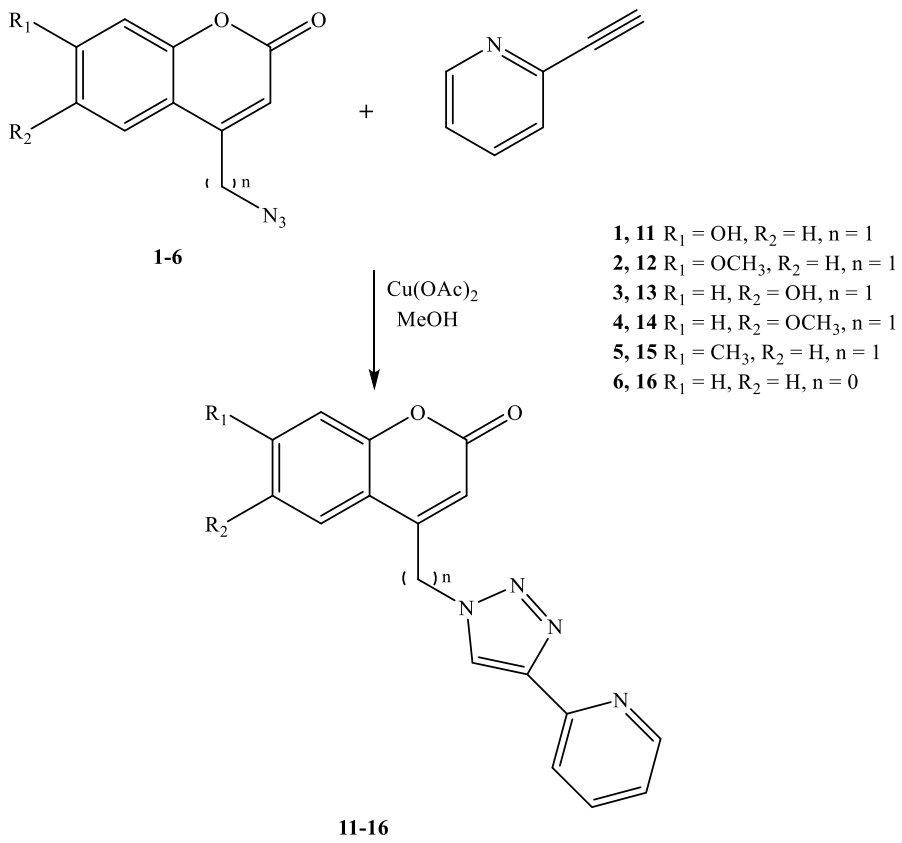
Terminalni alkini **7** i **8** potrebni za sintezu 1,2,3-triazolnih liganada pripravljeni su jednostupanjskom sintezom primjenom metoda opisanih u literaturi.[58] *O*-propargilirani kumarinski eteri **7** i **8** dobiveni su reakcijom 7-hidroksikumarina **33**, odnosno 4-hidroksikumarina **31**, s propargil-bromidom u acetonu. U reakciji *O*-alkiliranja kalijev karbonat je korišten kao baza (shema 3).



Shema 3. Sinteza spojeva **7** *i* **8**

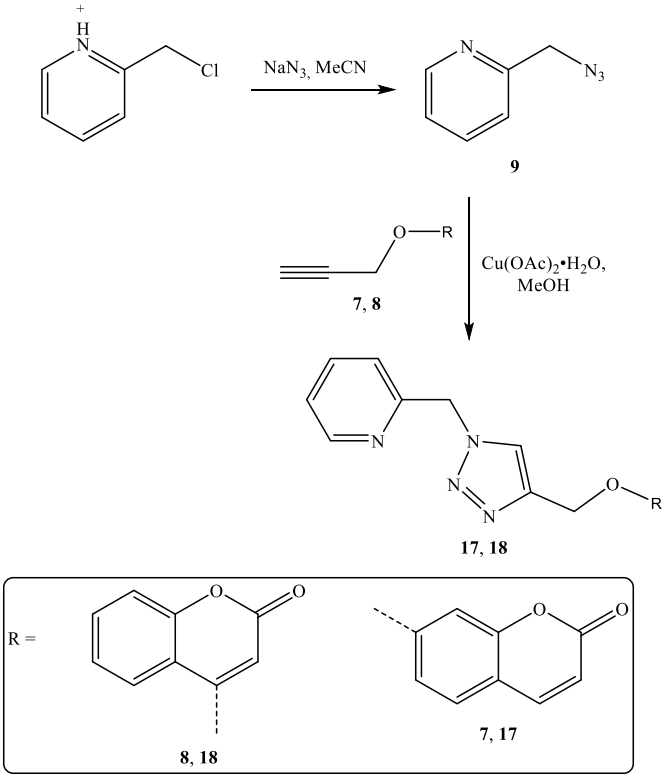
Ciljani konjugati kumarina i piridina premošteni 1,2,3-triazolnom premosnicom **11-18** dobiveni su reakcijom 1,3-dipolarne cikloadicije azida i alkina katalizirane bakrom(I) (CuAAC). Regioselektivnom reakcijom CuAAC nastaju 1,4-disupstituirani 1,2,3-triazolni derivati. Reakcije su provedene uz bakrov(II) acetat monohidrat u metanolu pri sobnoj temperaturi. Katalitički Cu(I) ion nastaje reducijom Cu(II) iona pomoću metanola.

Spojevi **11-16** pripravljeni su CuAAC reakcijom azidnih derivata kumarina **1-6** i 2-etinilpiridina. Produkti su izolirani u iskorištenjima 16 – 71 %, pri čemu iskorištenja ovisno o supstituciji kumarinskog prstena padaju u nizu CH_3 > H > OH > OCH_3 (shema 4).



Shema 4. Sinteza spojeva **11-16**

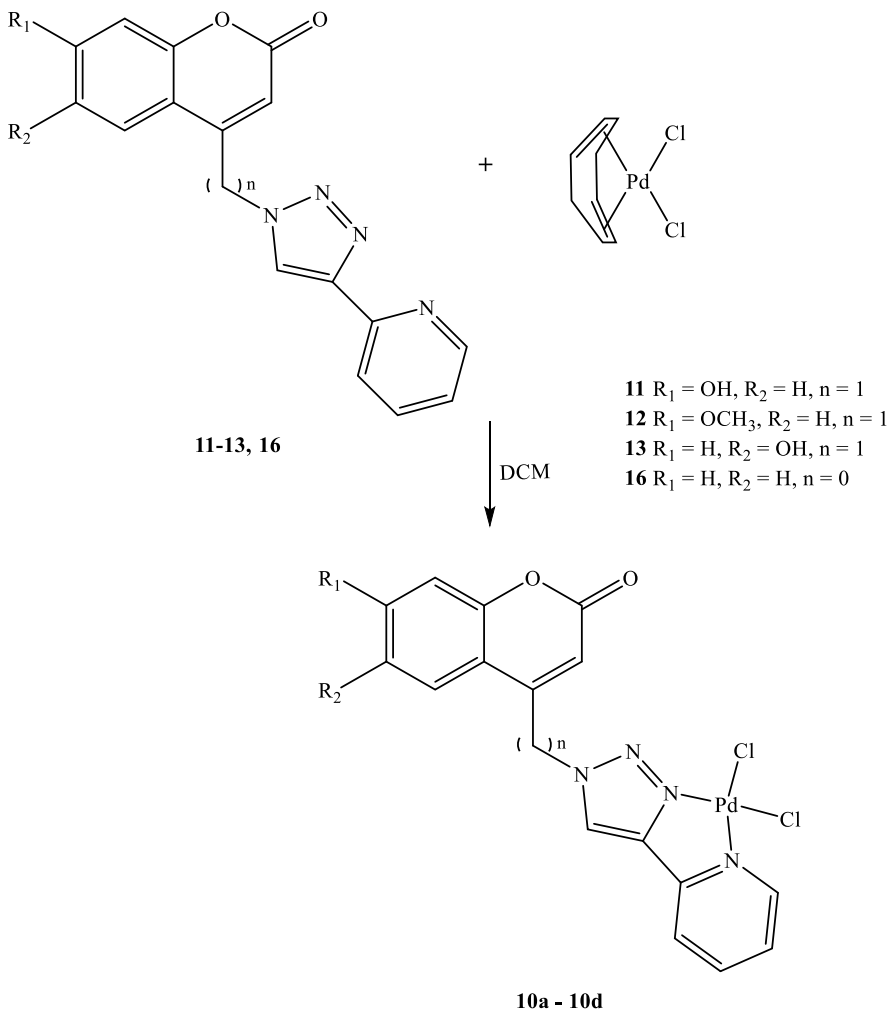
Kumarinski ligandi **17** i **18** s pikolilnim supstituentom u položaju N-1 triazolnog prstena pripravljeni su reakcijom cikloadicije *O*-propargiliranih kumarinskih etera **7** i **8** te 2-pikolilazida **9** (shema 5). 2-pikolilazid je dobiven reakcijom supstitucije 2-pikolil-klorida hidroklorida i natrijevog azida u acetonitrilu prema literaturno opisanom postupku.[60] Iskorištenja navedenih reakcija iznose η_{17} = 63% te η_{18} = 52%.



Shema 5. Sinteza spojeva **17** *i* **18**

4.2. Sinteza metalnih kompleksa

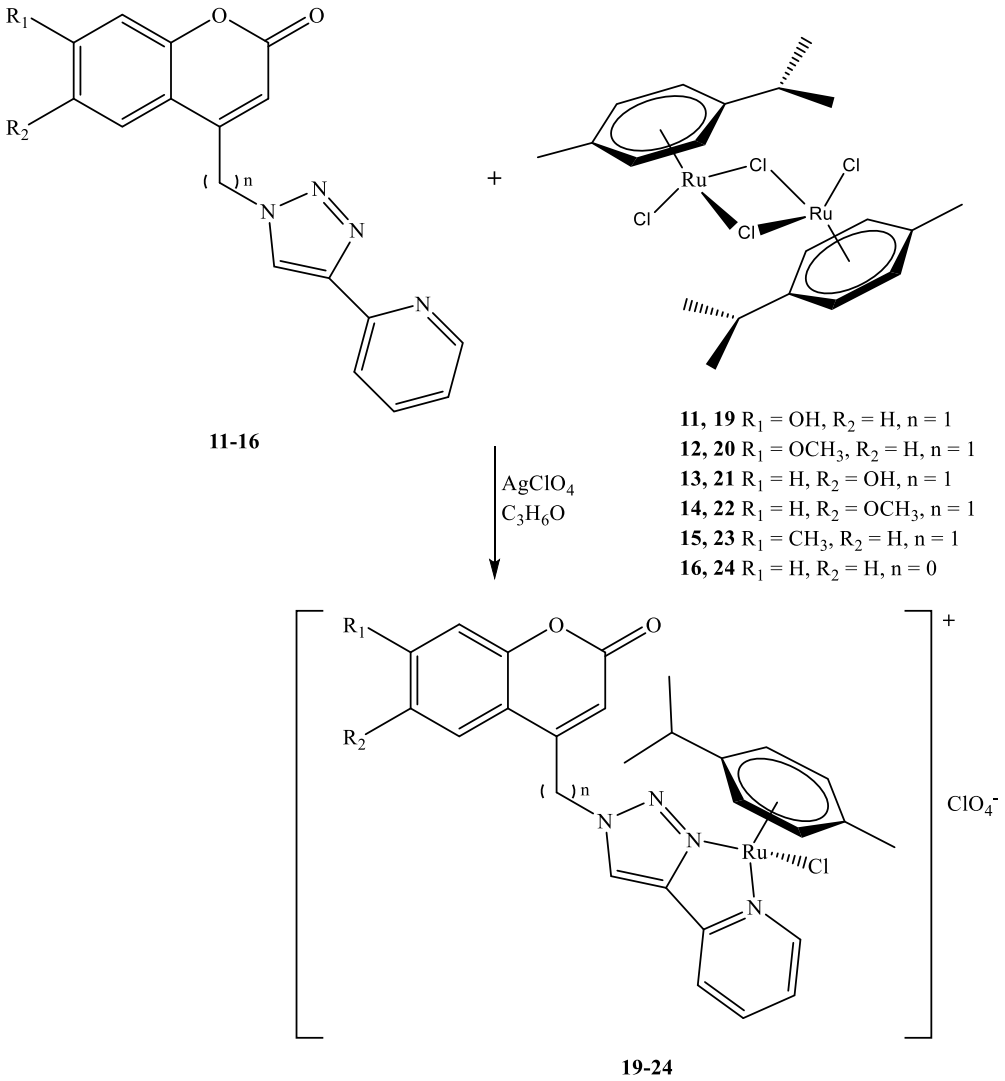
U nastavku istraživanja dobiveni ligandi korišteni su u sintezi Pd(II) kompleksa. Paladij(II) izabran je zbog sličnih svojstava kompleksa Pt(II) i Pd(II), kako bi se pripravili metalni kompleksi s potencijalnim antiproliferativnim djelovanjem.[63] Pokušao se je pripraviti kompleks paladija(II) s kumarinskim ligandima **11-13** i **16** (shema 6), pri čemu je pretpostavljena koordinacija Pd(II) s N-3 dušikovim atom 1,2,3-triazolnog prstena i dušikovim atomom piridinskog prstena. Dikloro(1,5-ciklooktadien)paladij(II) je korišten kao metalni prekursor u sintezi. Ligandi i metal pomiješani su u omjeru 1:1 u diklormetanu. Dobiveni produkt nije izoliran u zadovoljavajućoj čistoći, a dodatno se može pretpostaviti ravnoteža između slobodnog metalnog iona i metalnog kompleksa u otopini, no zbog loše topljivosti izoliranog produkta nije provedena detaljnija spektroskopska karakterizacija.



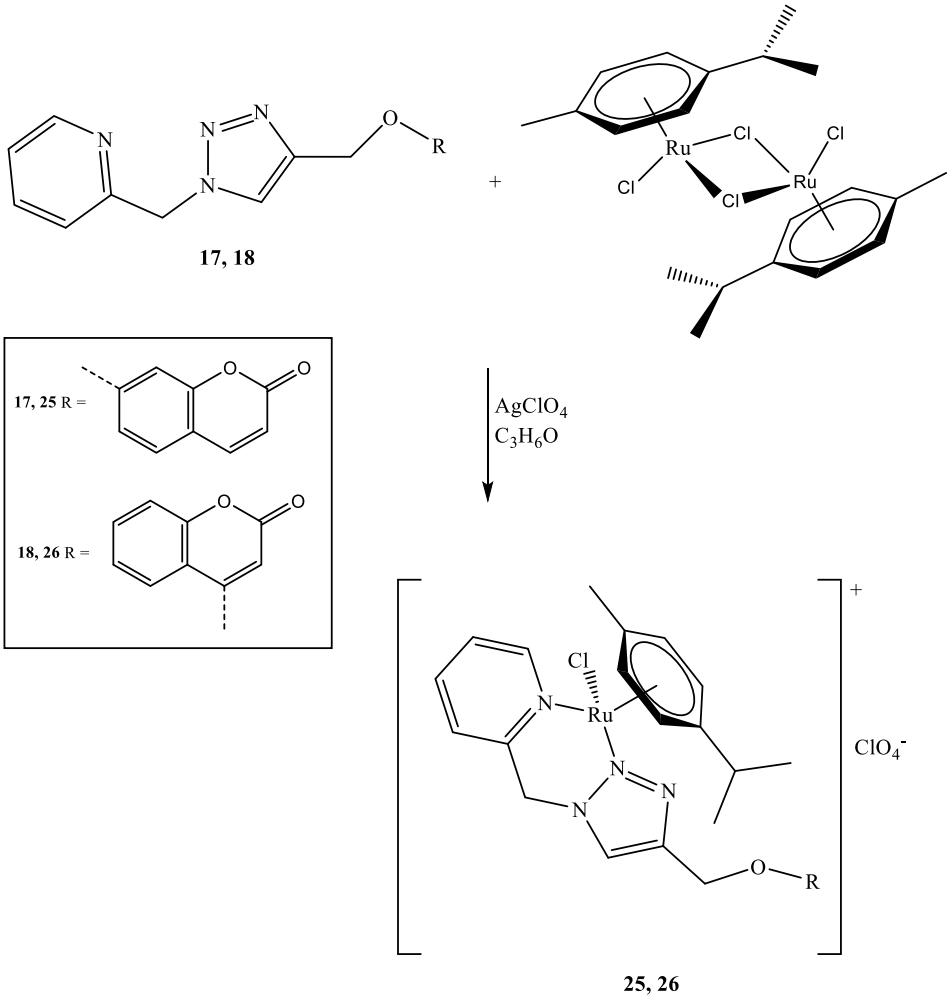
Shema 6. Sinteza kompleksa **10a – 10d**

Rutenijevi(II) kompleksi pokazali su obećavajuće protutumorsko djelovanje[20,48], pa su u nastavku istraživanja proučavani polusendvič kompleksi Ru(II). Kao metalni prekursor u reakciji kompleksiranja korišten je dikloro(*p*-cimen)rutenij(II) dimer, kompleksiranje je provedeno u prisutnosti srebrovog(I) perklorata ($AgClO_4$) koji je korišten za reakciju izmjene protuiona. Srebrov(I) perklorat izabran je zbog dobre topljivosti u acetonu te velikog protuiona koji pospješuje kristalizacijske eksperimente za dobivanje jediničnog kristala za određivanje kristalne strukture difrakcijom rendgenskog zračenja. Reakcija je provedena u molarnim omjerima liganada i metalnog prekursora 2:1 zbog toga što je diklor(*p*-cimen)rutenij(II) dimer. Omjer $AgClO_4$ i rutenijevog(II) dimera iznosio je 2:1, a u prvom stupnju reakcije dolazi do disocijacije dimera te izmjene kloridnog i perkloratnog iona pri čemu je zamijećen nastanak karakterističnog bijelog taloga srebrovog(I) klorida. Reakcijom su izolirani metalni kompleksi **19 - 24** u kojima je rutenij(II) bidentatno koordiniran N-3 dušikom 1,2,3-triazolne premosnice i dušikovim atomom piridinskog prstena (shema 7).

Metalni kompleksi izolirani su u obliku žutih krutina. Iskorištenja reakcija kompleksiranja iznose 28 – 66 %. Isti postupak korišten je za sintezu kompleksa kompleksa **25** i **26** iz liganada **17** i **18** prema shemi 8, no kompleksi nisu uspješno izolirani u čistom obliku.



Shema 7. Sinteza kompleksa **19-24**

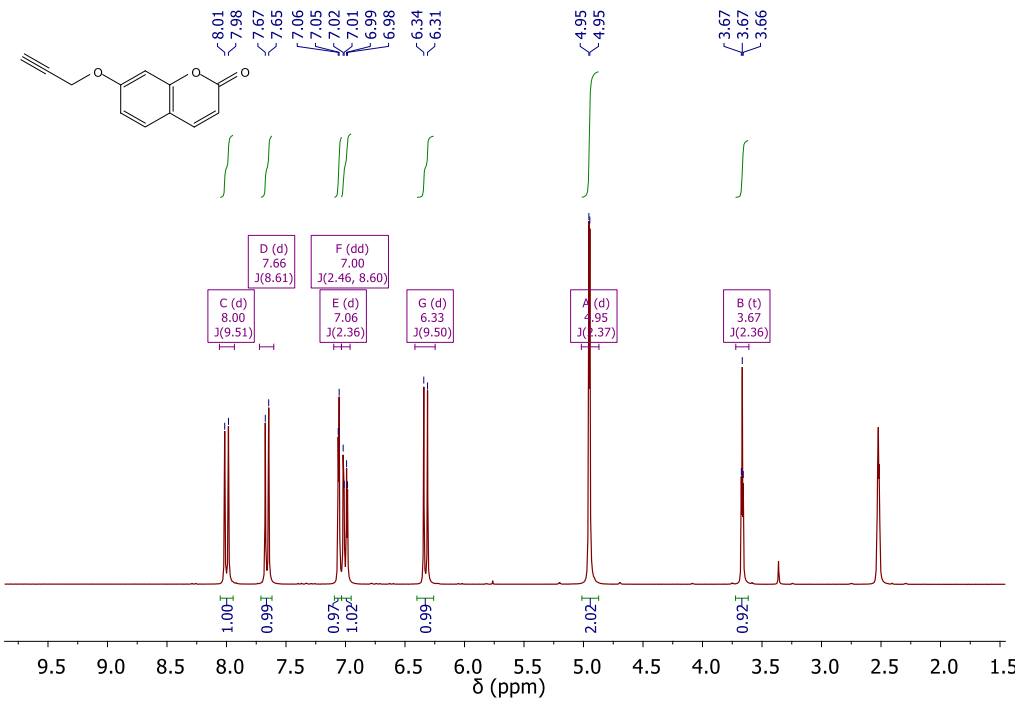


Shema 8. Sinteza kompleksa **25** *i* **26**

4.3. Spektroskopska i kristalografska karakterizacija spojeva

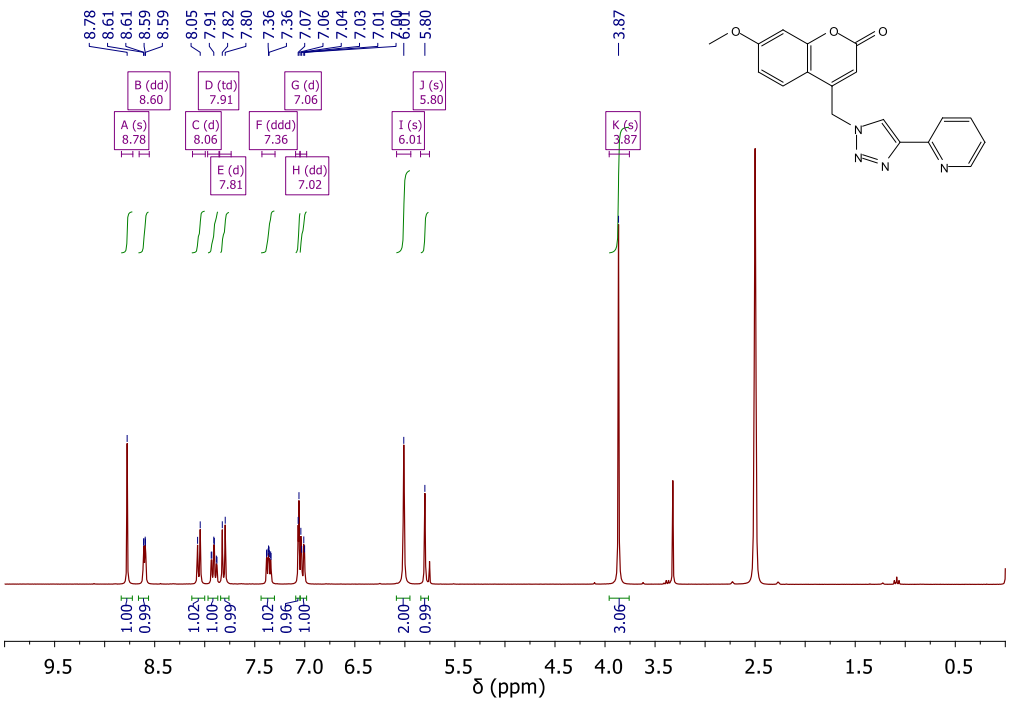
4.3.1. Spektroskopija NMR

Strukture pripravljenih spojeva potvrđene su spektroskopijom ^{1}H i ^{13}C NMR. Analizom ^{1}H NMR spektara prekursora **5** i **6** vidljivi su kemijski pomaci koji odgovaraju aromatskim protonima kumarinske jezgre u područjima od 8 do 6.40 ppm. U ^{1}H NMR spektru prekursora **5** vidljiv je signal CH_2 protona pocijepanih u dublet na 4.84 ppm te signal CH_3 protona pocijepanih u singlet na 2.41 ppm. Uspoređujući spektre spojeva **29** i **32** te **5** i **6** vidljivo je da azidna skupina u molekuli zasjenjuje protone metilenske premosnice, tako smanjujući njihov kemijski pomak. U spektrima terminalnih alkina **7** i **8**, uz karakteristične signale kumarinske jezgre, pojavljuju se signali protona propargilnog supstituenta pri kemijskim pomacima od 4.95 i 3.67 ppm. Signal metinskog protona cijepa se u triplet dok se signal metilenskog protona cijepa u dublet, s konstantom sprege od 2.37 Hz.

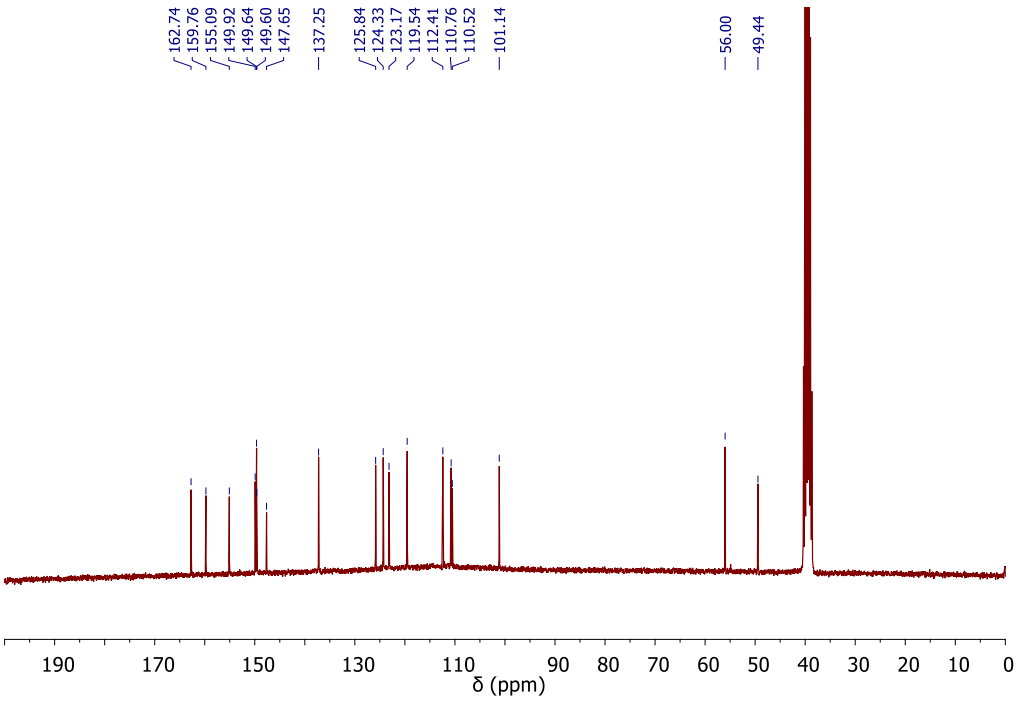


Slika 1. Spektar ^{1}H NMR prekursora **7** *u DMSO-d_6*

U spektrima ^{1}H NMR spojeva **11-18** vidljivi su signali aromatskih protona u području od 8.80 do 5.60 ppm. Nastanak 1,2,3-triazolnog prstena potvrđen je karakterističnim intenzivnim singletom H-5 protona koji rezonira pri kemijskom pomaku od ~ 8.50 ppm. U molekuli **16** najveći je kemijski pomak triazolnog H5-protona čiji je signal na 9.27 ppm. U spektrima liganada **11** i **13** prisutan je signal protona hidroksilne skupine na 10.70 i 9.87 ppm, dok spektri derivata **12** i **14** sadrže signal protona metoksi skupine na 3.87 i 3.83 ppm. Signali metilnih protona liganda **15** pojavljuju se pri 2.42 ppm. U spektrima liganada **11-15** prisutni su signali protona metilenske premosnice pri ~ 6 ppm. Molekule **17** i **18** pokazuju signale alifatskih protona u području od 5.77 do 5.28 ppm. U spektrima ^{13}C NMR pojavljuju se signali karakteristični za aromatske i alifatske ugljikove jezgre te ugljikove jezgre 1,2,3-triazolnog prstena pri kemijskim pomacima od 137 (C-4) i 125 (C-5) ppm.



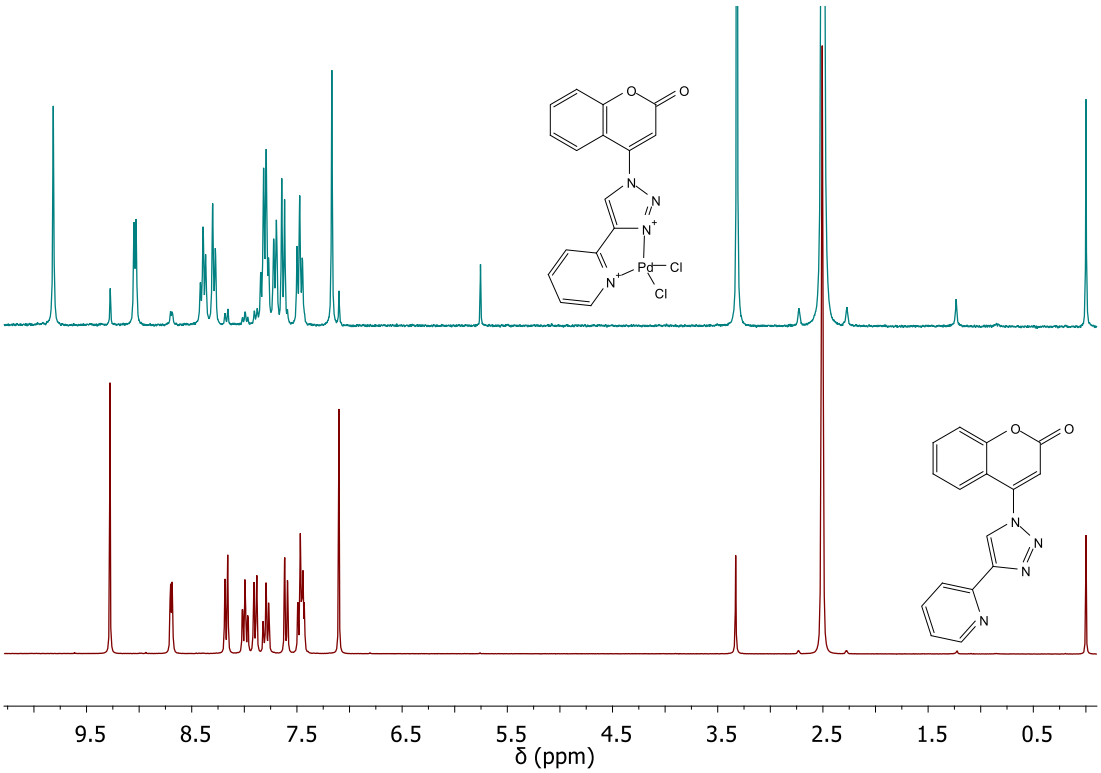
Slika 2. Spektar ^{1}H NMR spoja **12** *u DMSO-d_6*



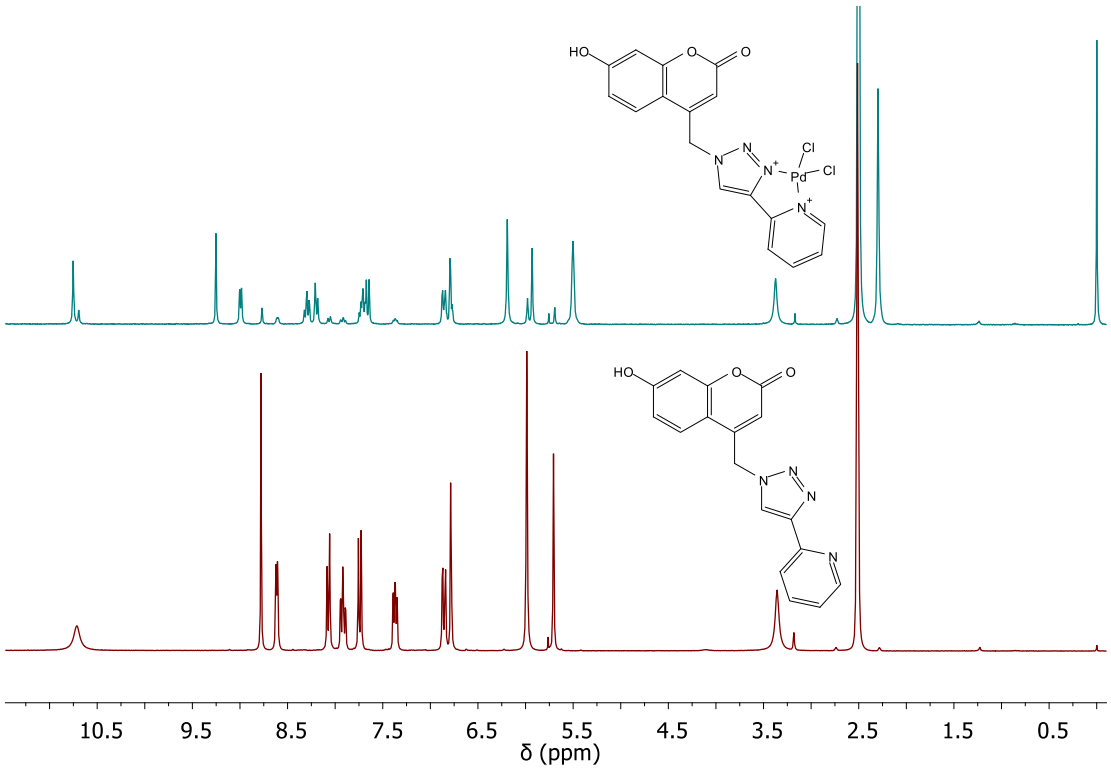
Slika 3. Spektar ^{13}C NMR spoja **12** *u DMSO-d_6*

Kompleksiranjem liganada **11-13** te **16** s diklor(1,5-ciklooktadien)paladijem(II) očekivan je nastanak ML kompleksa paladija(II) s navedenim ligandima bidentatnom koordinacijom metalnog iona preko N-3 triazola i piridinskog dušikovog atoma. Usporedbom protonskih spektara NMR vidljivo je da dolazi do koordinacije metalnog iona, pri čemu dolazi do

odsjenjena protona liganada s naglaskom na proton H-5 triazolnog prstena te *ortho*-piridinski proton. U spektru produkta također su prisutne rezonancije koje odgovaraju protonima liganda, što bi moglo biti posljedica raspada kompleksa reakcijama izmjene zbog slabe veze metal-ligand ili nemogućnosti pročišćavanja produkta prekristalizacijskim metodama (slika 4). Iste spektralne karakteristike uočene su u primjeru Pd(II) kompleksa s ligandom **11** (slika 5).



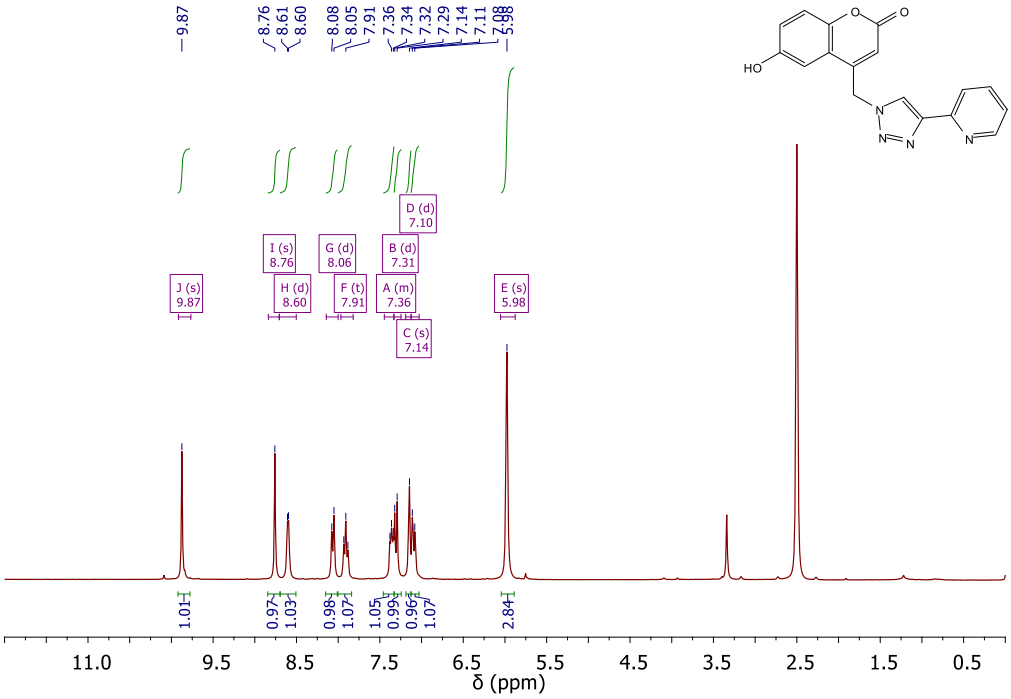
Slika 4. Spektar ^{1}H NMR kompleksa s ligandom **16** *s Pd(II) u DMSO-d_6*



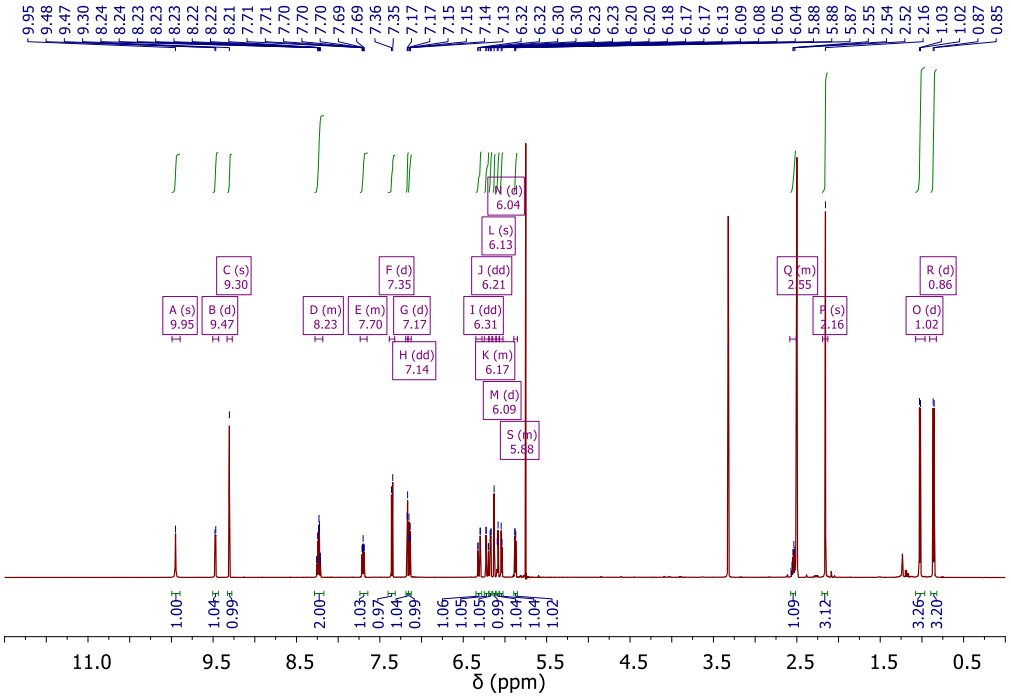
Slika 5. Spektar ^{1}H NMR kompleksa liganda **11** *s Pd(II) u DMSO-d_6*

U spektrima ^{1}H NMR kompleksa **19-24** prisutni su signali aromatskih protona u području od 9.90 do 6.10 ppm. Karakteristični signali za H-5-triazolni proton pojavljuju se u području od 9.56 do 9.30 ppm. U spektrima kompleksa **19** i **21** signali hidroksilnih skupina rezoniraju pri 10.79 i 9.95 ppm, a kod kompleksa **20** i **22** signali metoksi skupina na 3.89 i 3.85 ppm. Također su prisutni signali protona metilenske premosnice pri kemijskom pomaku od ~ 6.20 ppm. U tom području se također pojavljuju signali aromatskih protona *p*-cimenske kape u području od 6.00 do 5.70 ppm i alifatskih izopropilnih protona u području 2.90 do 0.90 ppm. U spektru kompleksa **20** signal metinskih protona izopropilne skupine prekriven je signalom otapala DMSO-a na 2.55 ppm.

Usporedbom spektara ^{1}H NMR liganada i kompleksa vidljivo je da koordinacijom Ru(II) iona dolazi do odsjenjena protona liganada (slika 6 i 7). Uvođenjem metala u strukturu karakteristični singlet H-5-protona 1,2,3-triazolnog prstena pomiče se za $\Delta\delta$ = 0.80 ppm prema nižem polju. Signali aromatskih protona također se pomiču prema području viših frekvencija. U spektrima ^{13}C NMR kompleksa prisutni su signali pri kemijskim pomacima od 86, 84, 83, 30, 22, 21 i 18 ppm koji odgovaraju aromatskim i alifatskim ugljicima *p*-cimenske kape.



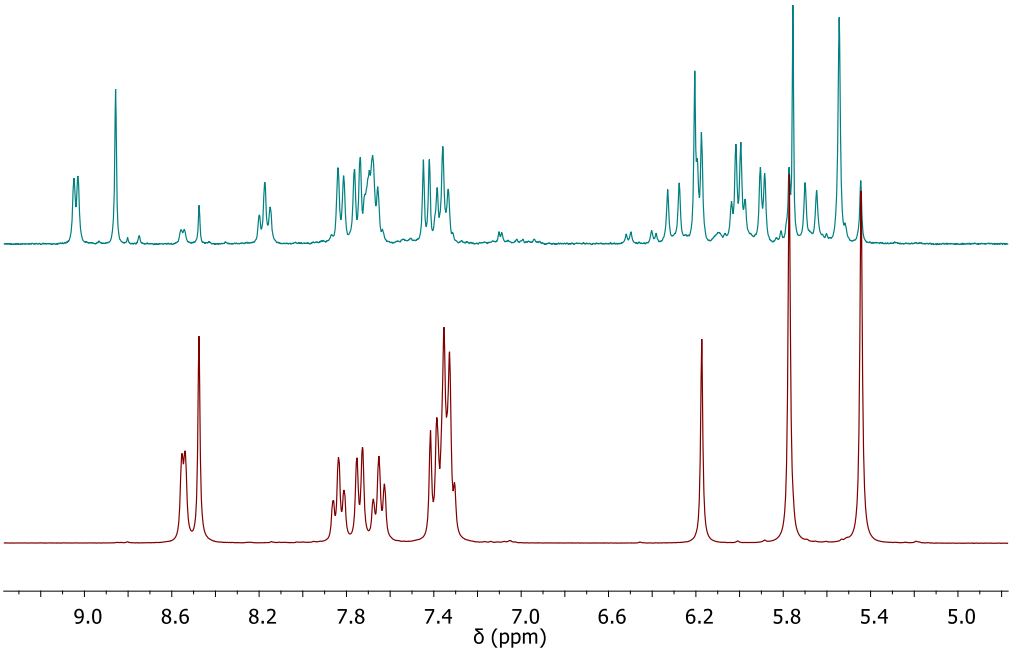
Slika 6. Spektar ^{1}H NMR liganda **13** *u DMSO-d_6*



Slika 7. Spektar ^{1}H NMR kompleksa **21** *u DMSO-d_6*

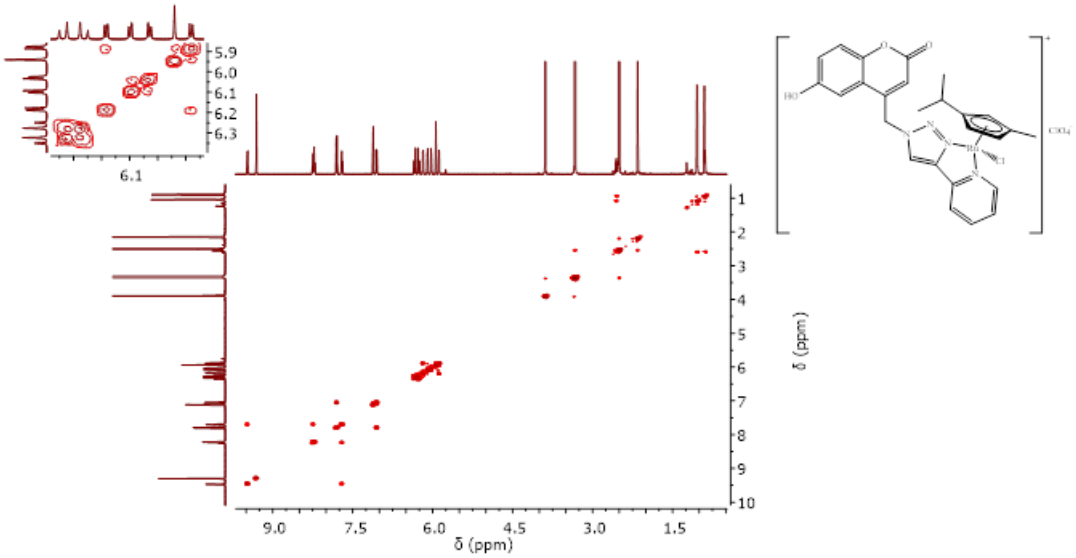
Na slici 8 je ^{1}H NMR spektar kompleksa **26** i liganda **18**. Iz spektra kompleksa su u području 6.4 – 5.4 ppm vidljivi signali dubleta CH_2 skupine i *p*-cimenske kape, ali i signali čiji

kemijski pomaci odgovaraju ligandu, što znači da izolirani spoj nije čisti kompleks već smjesa kompleks-ligand. To nam govori da veza M-L nije toliko jaka jer je kompleks u ravnoteži sa ligandom. Uzrok tome može biti što kompleks **26** ima drugačiju koordinaciju od sintetiziranih kompleksa **19-24**. Kod kompleksa **19-24** rutenij(II) koordinira N-3 1,2,3-triazolnog prstena i N piridinskog prstena stvarajući pri tome peteročlani prsten poveznice 1,2,3-triazola, piridina i metala, dok kod kompleksa **25** i **26** rutenij(II) koordinira N-2 1,2,3-triazolnog prstena i N piridinskog prstena stvarajući pri tome šesteročlani prsten poveznice 1,2,3-triazolnog prstena, piridina i metala. U šesteročlanom prstenu nastalom koordiniranjem metala i liganda nalazi se i CH_2 skupina s onemogućenom rotacijom koja se geminalno cijepa u dublet s konstantom sprege od J = 16 Hz.



Slika 8. ^{1}H NMR spektar kompleksa **26** *(gore) i liganda* **18** *(dolje) u DMSO-d_6*

Za kompleks **21** snimljen je dvodimenzionalni spektar ^{1}H-^{1}H COSY NMR (slika 9). Iz istaknutog područja vidljiva su sprezanja aromatskih protona *p*-cimenske kape s konstantom sprezanja od *J* = 6.0 Hz, a dodatno se cijepaju i protoni metilenske premosnice s geminalnom konstantom sprege (*J* = 6.9 Hz). Takvo geminalno cijepanje zamijećeno je kod Ru(II) kompleksa konjugata 2-pikolila i 1,2,3-triazola, kojima se α-metilenski protoni cijepaju zbog ograničene rotacije α-CH_2 protona. Kako u dobivenim kompleksima α-metilenski protoni nisu dio kelatnog prstena, pretpostavljena je ograničena rotacija navedenih protona zbog volumenoznosti koordinirajuće skupine s vezanim Ru(II) ionom koji sadrži *p*-cimensku kapu.

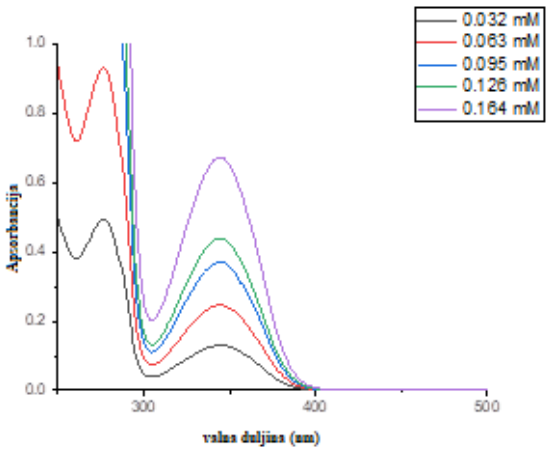


Slika 9. COSY NMR spektar kompleksa **21**

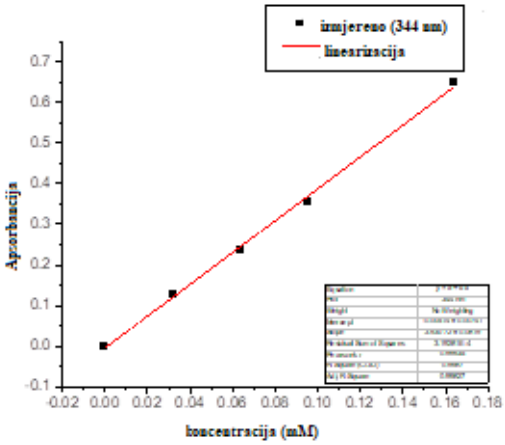
4.3.2. Spektroskopija UV/Vis i fluorimetrija

Spektroskopske karakteristike liganda **14** i kompleksa **22** istražene su primjenom spektroskopije UV/Vis i fluorimetrije. Spektri su snimljeni u ACN-u dodavanjem ishodnih otopina liganada i kompleksa u DMSO-u, uz uvjet da je udio DMSO-a u ACN manji od 1 %.

Spektri UV/Vis liganda **14** su snimljeni pri različitim koncentracijama (slika 10). Apsorpcijski maksimum spoja **14** je na valnoj duljini od 354 nm te je vidljivo da apsorbancija linearno raste povećanjem koncentracije kao što je vidljivo na slici 10. U navedenom rasponu koncentracija spoj ne agregira u otopini.

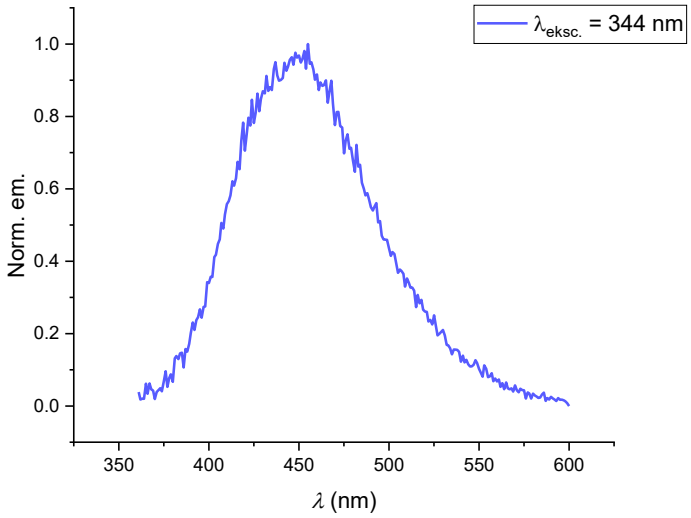


Slika 10. Apsorpcijski spektri liganda **14** *u ACN*



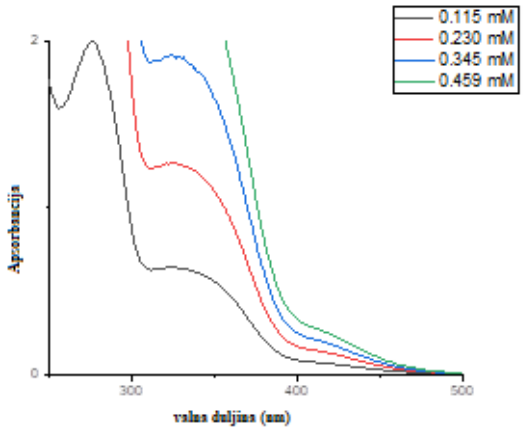
Slika 11. Baždarni pravac za spoj **14**

Emisijski spektar spoja **14** snimljen je uz pobudu na pri λ_{max} (slika 12). Emisijski spektar sadrži maksimum emisije pri valnoj duljini od 455 nm. Stokesov pomak definiran je kao razlika apsorpscijskog i emisijskog maksimuma, koji u ovom slučaju iznosi 101 nm što znači da ligand ima dobra fotofizikalna svojstva.

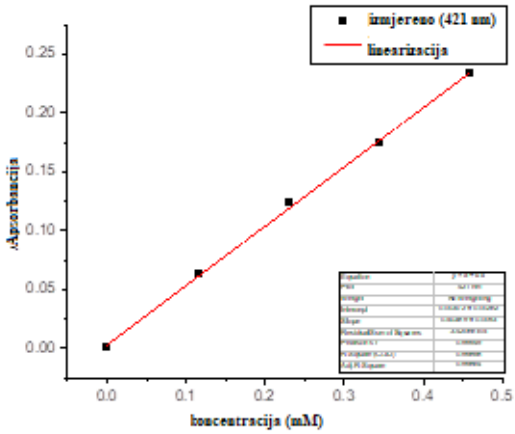


Slika 12. Emisijski spektar spoja **14**

Spektri UV/Vis kompleksa **22** također su snimani pri različitim koncentracijama (slika 13). Iz spektra je vidljiv linearni trend povećanja apsorpcijskog maksimuma s povećanjem koncentracije, ukazujući da kompleks ne agregira u otopini. Apsorpcija na oko 421 nm objašnjava žuto-narančastu boju kompleksa. Ta apsorpcijska vrpca posljedica je *d-d** prijelaza karakterističnog za Ru(II) komplekse.



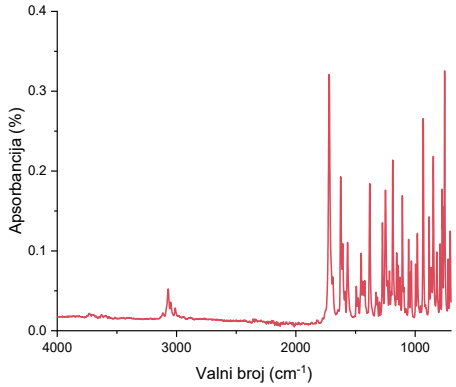
Slika 13. Apsorpcijski spektar kompleksa **22**



Slika 14. Baždarni pravac za spoj **22**

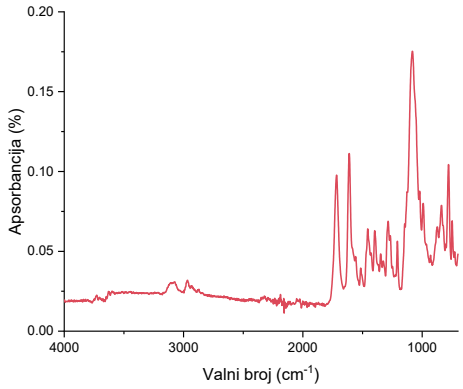
4.3.3. Spektroskopija IR

IR-spektri su snimljeni za sve pripravljene ligande **11-18** te za komplekse **19-24**. U spektrima liganada **11** i **13** vidljive su vrpce na 3057 cm^{-1} i 3159 cm^{-1} koje odgovara istezanju O-H veze. Analogno tome vrpce istezanja O-H veze su vidljive na 3242 cm^{-1} te na 3289 cm^{-1} kod kompleksa **19** i **21** pripravljenih od liganada **11** i **13**. U području od 1721-1670 cm^{-1} za ligande **11-18** vidljive su vrpce istezanje C=O veze, dok su iste za komplekse **19-24** vidljive u području 1728-1711 cm^{-1}. Spektar liganda **16** prikazan je na slici 15. U spektru je vidljiva vrpca istezanja C-H veze na 3052 cm^{-1} te istezanja C=O veze na 1721 cm^{-1}. Istezanja 1,2,3-triazolne jezgre za C=C i N=N istezanja su prisutna na 1626 i 1410 $cm^{-1.}$ U području otiska prsta prisutni su signali koji odgovaraju savijanjima aromatskih C=C, C-C te C-N veza. Karakteristični signali C-N savijanja su vidljivi na 938 i 763 cm^{-1}.



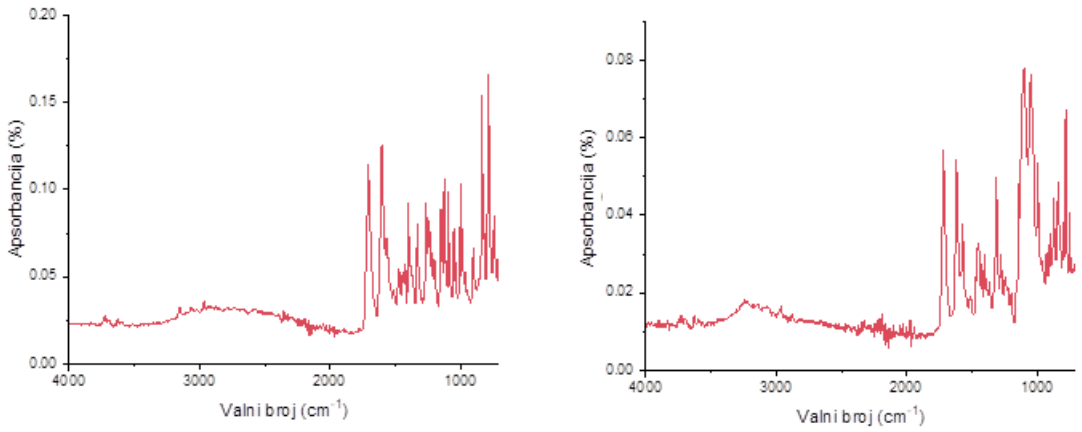
Slika 15. Spektar IR liganda **16**

Na slici 16 prikazan je spektar IR kompleksa **20**. Dvije vrpce na 3098 i 2973 cm^{-1} odgovaraju istezanjima C-H veze. Karakteristični signali istezanja C=O veze te C=C i C=N veze 1,2,3-triazolne jezgre pojavljuju se na 1722, 1605 te 1461 cm^{-1}. U području otiska prsta prisutni su signali koji odgovaraju savijanjima aromatskih C=C, C-C te C-N veza, premoštenja s 1,2,3 triazolnim prstenom te *p*-cimenske kape.



Slika 16. Spektar IR kompleksa **20**

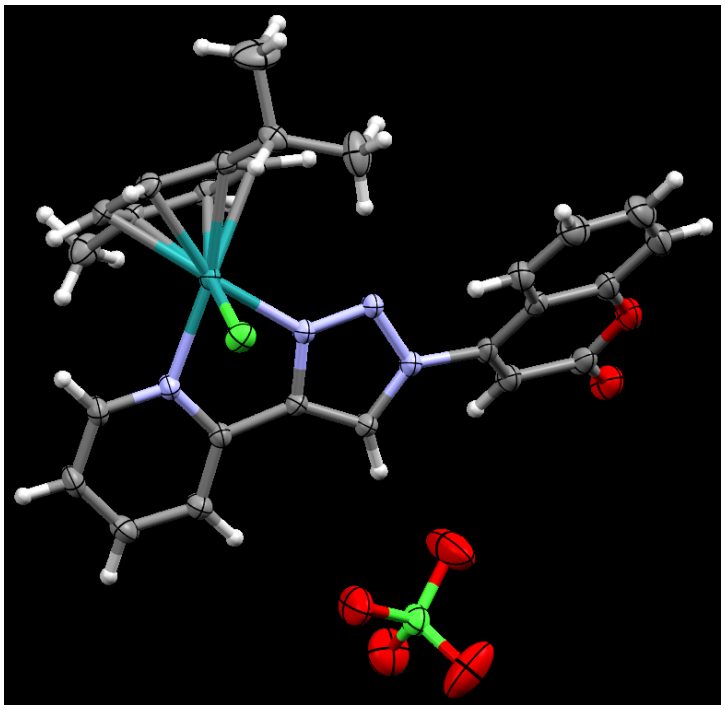
Na slici 17 dana je usporedba spektara IR liganda **11** te njegovog kompleksa **19**. U spektru IR kompleksa pojavljuje se vrpca na 2967 cm^{-1} te dolazi do pomaka karakterističnih vrpca istezanja za C=O, C=C i C=N skupine prema većim valnim brojevima. Promjene su vidljive i u području otiska prsta gdje kod kompleksa dolazi do pomaka vrpci prema nižim valnim brojevima.



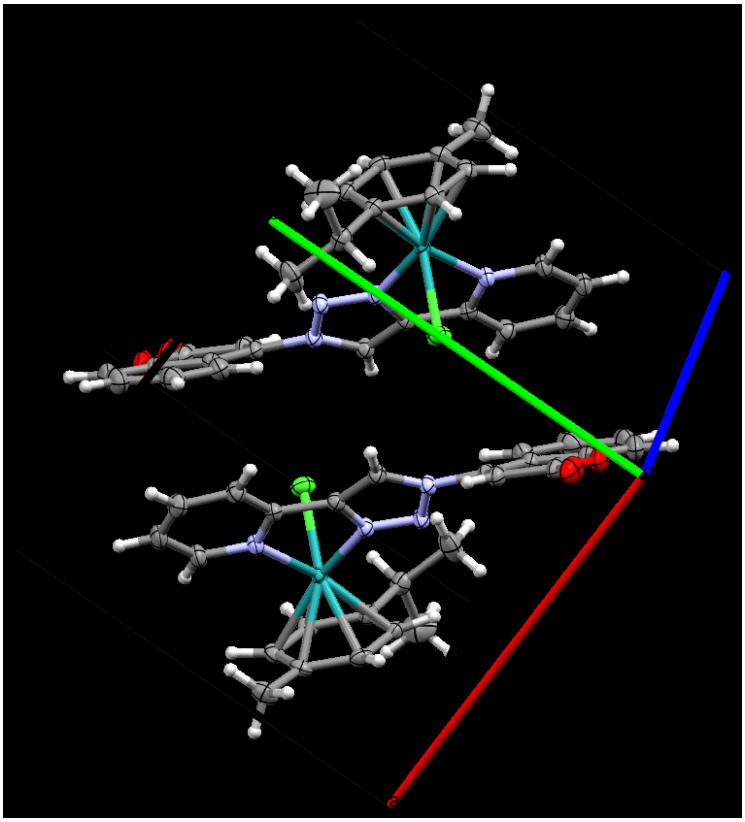
Slika 17. Spektar IR liganda **11** *(lijevo) i kompleksa* **19** *(desno)*

4.3.4. Analiza kristalne strukture

Kristalna struktura kompleksa **24** određena je difrakcijom rendgenskog zračenja u jediničnom kristalu. Ligand **16**, kojemu je kumarinski prsten povezan s piridinom preko 1,2,3-trazolne premosnice vezane direktno na položaj C-4 benzopiran-2-onske jezgre, bidentatno koordinira Ru(II) ion preko N_{Py} i N-3_{Tz}. Perklorat je protuion. Geometrija „klavirskog stolca“ sastoji se od *p*-cimenske aromatske kape kao sjedišta te klora i liganda **16** kao nogama. Duljine veza između liganda i metalnog iona iznose 2.046 Å (N_{Tz}–Ru) i 2.215 Å (N_{Py}–Ru), slično prije opisanim srodnim strukturama.[64] Ravnine kumarinskog prstena i koordinirajuće skupine tvore kut od 38.4°. Kompleks kristalizira u P $\bar{1}$ prostornoj grupi, s dvije jedinke u kristalnoj ćeliji.



Slika 18. Kristalna struktura kompleksa **24**. Prostorna grupa P $\bar{1}$, a = 11.38 Å, b = 11.49 Å, c = 11.83 Å, α = 62.21°, β = 81.66°, γ = 74.40°, V = 1318.46 Å^3, Z = 2, Z'= 1, R = 3.23.



Slika 19. Kristalno pakiranje u kristalu kompleksa **24**

4.4. Biološka ispitivanja

Sintetiziranim kumarinskim derivatima **11-16** te njihovim kompleksima **19-24** ispitano je antiproliferativno djelovanje na stanične linije HEK293 (normalne embrionalne stranice bubrega), HepG2 (heptocelularni karcinom), MCF7 (karcinom dojke), PANC1 (karcinom gušterače) i RKO (kolorektalni karcinom). Antiproliferativno djelovanje određeno je MTT testom (3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazolijev bromid), a podaci su prikazani u tablici 1. Cisplatina je korištena kao referentni lijek s kliničkom primjenom u liječenju brojnih vrsta karcinoma, kao što su karcinom testisa, jajnika, grlića maternice, dojke, jednjaka te pluća.[65] Dodatno je ispitano djelovanje metalnog prekursora dikloro(*p*-cimen)rutenija(II).

*Tablica 1. Antiproliferativno djelovanje liganada **11-16** te njihovih metalnih kompleksa **19-24** prema stanicama HEK293 (normalne embrionalne stranice bubrega), HepG2 (heptocelularni karcinom), MCF7 (karcinom dojke), PANC1 (karcinom gušterače) i RKO (kolorektalni karcinom)*

	IC_{50} (μM)[a]				
SPOJ	**HEK293**	**HepG2**	**MCF7**	**PANC1**	**RKO**
11	>100	>100	>100	>100	>100
12	13.75±5.71	31.50±12.22	93.06±4.00	41.12±9.75	91.96±8.93
13	39.16±7.99	>100	77.18±4.77	>100	>100
14	25.41±9.57	>100	35.20±4.03	33.80±3.50	>100
15	26.76±9.57	>100	>100	>100	>100
16	43.84 ±8.18	>100	34.16±2.72	52.29±8.34	**2.91±2.20**
19	>100	>100	>100	>100	>100
20	>100	85.42±14.15	>100	**8.57±4.03**	>100
21	47.85±12.52	83.80±12.04	>100	**16.54±5.03**	74.99±9.32
22	20.84±7.39	83.90±9.02	36.55±4.09	89.87±7.15	>100
23	13.07±11.67	26.49±5.15	23.86±9.73	59.98±6.47	69.82±0.36
24	1.52±0.02	82.67±15.71	>100	90.10±10.31	>100
Ru	>100	>100	>100	>100	>100
cisplatina	1.33±0.85	3.85±2.55	8.34±2.05	9.91±4.09	3.69±1.87

[a]inhibicijska koncentracija ili koncentracija spoja potrebna za inhibiciju proliferacije tumorskih stanica za 50%. Podaci predstavljaju srednju vrijednost IC_{50} (1×10^{-6} mol dm^{-3}) vrijednost tri neovisna eksperimenta ± SD (IC_{50} μM ± SD)

Antiproliferativno djelovanje izraženo je kao vrijednost IC_{50}. Iz navedenih vrijednosti vidljivo je da metalni prekursor ne pokazuje antiproliferativno djelovanje jer su za sve navedene stanične linije karcinoma te normalne ljudske stanice vrijednosti IC_{50} veće od 100 μM. Uspoređujući vrijednosti IC_{50} za ispitivane kumarinske derivate vidljivo je konjugat kumarina i pikolila **16** s 1,2,3-triazolom direktno povezanim na kumarin pokazuje najsnažnije inhibitorno djelovanje (IC_{50} = 2.91±2.20 μM) prema staničnoj liniji RKO, izraženije u odnosu na referentni spoj, cisplatinu (IC_{50} = 3.69±1.87 μM). Navedeni spoj ima manju toksičnost na normalne HEK293 stanice. Među kompleksima kumarina s Ru(II), kompleks **20** pokazuje najnižu vrijednost IC_{50} u iznosu od 8.57±4.03 μM prema staničnoj liniji PANC1, što je također niže od inhibitorne vrijednosti cisplatine te ne pokazuje toksičnost na zdrave stanice.

Iz odnosa strukture i aktivnosti spojeva vidljivo je da spojevi **11** i **19** sa 7-OH supstituentom ne pokazuju toksičnost prema zdravim ljudskim stanicama, no nisu pokazali aktivnost ni prema stanicama karcinoma, dok spojevi **13** i **21** s 6-OH supstituentom uzrokuju umjerenu toksičnost prema zdravim ljudskim stanicama te relativno nisko inhibitorno djelovanje. Spojevi **12** i **20** supstituirani sa 7-OCH_3 skupinom pokazuju nisku aktivnost te nisku toksičnost za liganade (**12**) i netoksičnost za komplekse (**20**) prema zdravim stanicama te pokazuju najistaknutije citostatsko djelovanje prema staničnoj liniji PANC1, dok 6-OCH_3 supstituirani derivati **14** i **22** pokazuju toksičnost prema zdravim ljudskim stanicama i nisko antiproliferativno djelovanje. Derivat **15** s 7-CH_3 supstituentom pokazuje visoku toksičnost prema zdravim ljudskim stanicama te nisko citostatsko djelovanje. Kumarinski derivat **16** s nesupstituiranim kumarinskim prstenom pokazuju najbolje citostatsko djelovanje te relativno nisku toksičnost prema zdravim ljudskim stanicama, dok kompleks **24** pokazuje izrazito visoku toksičnost i nisku aktivnost.

5. ZAKLJUČAK

- Pechmannovom ciklizacijom pripravljeni su 4-klormetilkumarini **29a-29c**, koji su prevedeni u 4-azidometilkumarine **1**, **2**, **5** reakcijom supstitucije s natrijevim azidom. Reakcijom kloriranja 4-hidroksikumarina u fosforil-kloridu uz nastanak 4-klorkumarina reakcijom nukleofilne aromatske supstitucije s natrijevim azidom nastaje 4-azidokumarin **6**. Terminalni alkini **7** i **8** dobiveni su reakcijom *O*-alkiliranja 7-hidroksikumarina **33**, odnosno 4-hidroksikumarina **31** s propargil-bromidom uz kalijev karbonat kao baze.

- Ciljani konjugati kumarina i piridina premošteni 1,2,3-triazolnom premosnicom **11-18** dobiveni su 1,3-dipolarnom cikloadicijom azida i alkina kataliziranom bakrom(I), uz regioselektivno nastajanje 1,4- i 4,1-disupstituiranih 1,2,3-triazolnih derivata **11-18**. Reakcije su provedene uz bakrov(II) acetat monohidrat u metanolu, pri čemu katalitički Cu(I) ion nastaje redukcijom Cu(II) iona pomoću otapala metanola.

- Strukture pripravljenih spojeva potvrđene su spektroskopskim metodama NMR ^{1}H i ^{13}C, IR te UV/Vis.

- Kumarinski derivati **11-18** korišteni su, kao ligandi, u sintezi metalnih kompleksa, uz metalni prekursor diklor(*p*-cimen)rutenij(II) te su dobiveni polusendvič kompleksi s Ru(II). Kompleksi su okarakterizirani u otopini spektroskopijom ^{1}H i ^{13}C NMR i UV/Vis. Difrakcijom rendgendskog zračenja u jediničnom kristalu određena je kristalna struktura kompleksa **24**.

- Provedena su antiproliferativna ispitivanja kumarinskih derivata **11-16** te njihovih kompleksa s Ru(II) **19-24** na stanične linije HEK293, HepG2, MCF7, PANC1 i RKO. Konjugat kumarina i pikolila **16** s 1,2,3-triazolom direktno povezanim na kumarin pokazuje najsnažnije inhibitorno djelovanje (IC_{50} = 2.91±2.20 μM) na kolorektalni karcinom (RKO). Kompleksima kumarina s Ru(II) **20** ima izraženo antiproliferativno djelovanje (IC_{50} = 8.57±4.03 μM) na karcinom gušterače (PANC1) i netoksičan učinak na normalne HEK293 stanice.

6. LITERATURA

1. P.K. Jain, H. Joshi, Coumarin: Chemical and pharmacological profile, *Journal of Applied Pharmaceutical Science,* 2012., 236-240.

2. W. Zhang, Z. Li, M. Zhou, F. Wu, X. Hou, H. Luo, H. Liu, X. Han, G. Yan, Z. Ding, R. Li, Synthesis and biological evaluation of 4-(1,2,3-triazol-1-yl)coumarin derivatives as potential antitumor agents, *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters* 24, 2014., 799-807.

3. K. Aslam, M.K. Khosa, N. Jahan, S. Nosheen, Synthesis and applications of coumarin, *Pakistan Journal of Pharmaceutical Sci*ence 23, 2010., 449-454.

4. S. Ćavar, F. Kovač, M. Maksimović, Synthesis and antioxidant activity of selected 4-methylcoumarins, *Food Chem*istry 117, 2009., 135–142.

5. E. Bourgaud, A. Hehn, R. Larbat, S. Doerper, E. Gontier, S. Kellner, U. Matern, Biosynthesis of coumarins in plants: a major pathway still to be unravelled for cytochrome P450 enzymes*, Phytochemistry Reviews 5*, 2006., 293-308.

6. W.H. Perkin, On the artifical production of coumarin and formation of its homologues, *Journal of the Chemical Soc*iety 1868, 21, 53-63.

7. A. Daştan, A.. Kulkarni, B. Török, Environmentally benign synthesis of heterocyclic compounds by combined microwave-assisted heterogeneous catalytic approaches, *Green Chemistry* 14, 2012., 17-37.

8. H. Von Pechmann, C. Duisberg, Berichte der Dtsch. *Chemischen Gesellschaft* 16 (2), 1883., 2119–2128.

9. S. Tyndall, K.F. Wong, M.A. VanAlstine-Parris, Insight into the Mechanism of the Pechmann Condensation Reaction Using NMR, *The Journal of Organic Chemistry 80, 2015., 8951-8953.*

10. J. Daru, A. Stirling, Mechanism of the Pechmann reaction: a theoretical study, *The Journal of Organic Chemistry* 76, 2011., 8749–8755.

11. S.M. Sethna, N.M. Shah, The Chemistry of Coumarins, *Chemical Reviews* 36, 1945., 1-62.

12. R.M. Mathur, Diamagnetism of substituted coumarins and the reactivity of coumarin nucleus, *Transactions of the Faraday Society* 54, 1958., 1609-1612.

13. M. Kidwai, P. Rastogi, S. Rastogi, Reaction of Coumarin Derivatives with Nucleophiles in Aqueous Medium, *Zeitschrift fur Naturforsch* 63b, 2008., 71-76.

14. K. Pavić, M. Beus, G. Poje, L. Uzelac, M. Kralj, Z. Rajić, Synthesis and Biological Evaluation of Harmirins, Novel Harmine–Coumarin Hybrids as Potential Anticancer Agents, *Molecules* 26, 2021., 6490.

15. M. Grazul, E. Budzisz, Biological activity of metal ions complexes of chromones, coumarins and flavones, *Coordination Chemistry Reviews* 253, 2009., 2588-2598.

16. L. Balewski, S. Szulta, A. Jalinska, A. Kornicka, A Mini-Review: Recent Advances in Coumarin-Metal Complexes With Biological Properties, *Frointiers in Chemistry* 9, 2021., 781779

17. Q. Wang, Y. Chen, G. Li, Z. Liu, J. Ma, M. Liu, Synthesis and Evaluation of Bi-functional 7-hydroxycoumarin Platinum(IV) Complexes as Antitumor Agents*, Bioorganic and Medicinal Chemistry*27, 2019., 2112–2121.

18. L. Gramni, N. Vukea, A. Chakraborty, W.J. Samson, L.M.K. Dingle, B. Xulu, Anticancer Evaluation of Ruthenium(III) Complexes with N-Donor Ligands Tethered to Coumarin or Uracil Moieties*, Inorganica Chimica Acta 492*, 2019., 98–107.

19. C.G.L. Nongpiur, L. Dkhar, D.K. Tripathi, K.M. Poluri, W. Kaminsky, M.R. Kollipara, Half-sandwich Platinum Group Metal Complexes Containing Coumarin-N-Acylhydrazone Hybrid Ligands: Synthesis and Biological Evaluation Studies, *Inorganica Chimica Acta 525*, 2021., 120459.

20. J. Zhao, D. Zhang, W. Hua, W. Li, G. Xu, S. Gou, Anticancer Activity of Bifunctional Organometallic Ru(II) Arene Complexes Containing a 7-Hydroxycoumarin Group, *Organometallics* 37, 2018., 441−447.

21. N.N. Farshori, M.R. Banday, A. Ahmad, A.U. Khan, A. Rauf, 7-Hydroxy-coumarin derivatives: synthesis, characterization and preliminary antimicrobial activities, *Medicinal Chemistry Research 20*, 2011., 535-541.

22. W. Ageno, A.S. Gallus, A. Wittkowsky, M. Crowther, E.M. Hylek, G. Palareti, Oral anticoagulant therapy: Antithrombotic Therapy and Prevention of Thrombosis, *Chest* 141, 2012., e44S-e88S.

23. A. Trailokya, Acenocoumarol in Thromoembolic Disorders, *Cardiovascular Pharmacology* 4:4, 2015, 157, doi:10.4172/2329-6607.1000157

24. E.R. Rios, N.F. Rocha, E.T. Venancio, B.A. Moura, M.L. Feitosa, G.S. Cerqueira, P.M. Soares, D.J. Woods, F.C. de Sousa, L.K. Leal, M.M. Fontles, Mechanisms involved in the gastroprotective activity of esculin on acute gastric lesions in mice. *Chemical-Biological Interactions* 188(1), 2010., 246-254., doi: 10.1016/j.cbi.2010.07.020

25. Y. F. Mustafa, N.T. Abdulaziz,, Biological potentials of hymecromone-based derivatives: A systematic review, *Systematic Reviews in Pharmacy* 11, 2020., 438-452.

26. D.C. Hooper, J.S. Wolfson, G.L. McHugh, M.B. Winters, M.N. Swartz, Effects of Novobiocin, Coumermycin Al, Clorobiocin, and Their Analogs on Escherichia coli DNA Gyrase and Bacterial Growth, *Antimicrobial agents and Chemothempy* 22, 1982., 662-71.

27. I. Kostova, Synthetic and natural coumarins as cytotoxic agents, *Current Medicinal Chemistry – Anti-Cancer Agents 5*, 2005., 29-46.

28. L. Zhang, Z. Xu, Mini-review: Coumarin-containing hybrids and their anticancer activities, *European Journal of Medicinal Chemistry* 181, 2019., 111587., doi: 10.1016/j.ejmech.2019.111587.

29. M. Sanduja, J. Gupta, H. Singh, P.P. Pagare, A. Rana, Uracil-coumarin based hybrid molecules as potent anti-cancer and anti-bacterial agents, *Journal of Saudi Chemical Society* 24, 2020., 251-266.

30. D.A. Skoog, D.M. West, F.J. Holler, Fundamentals of Analytical Chemistry, 9th edition, 1963., 760-773.

31. I. Odak, I. Škorić, Organska fotokemija – principi i primjena, *Fakultet Kemijskog Inženjerstva i Tehnologije*, Zagreb, 2017.

32. D. Cao, Z. Liu, P. Verwilst, S. Koo, P. Jangjili, J. S. Kim, W. Lin, Coumarin-Based Small-Molecule Flourescent Chemosensors, *Chemical Reviews* 119, 2019., 10403–10519.

33. K. Sivakumar, F. Xie, B.M. Cash, S. Long, H.N. Barnhill, Q. Wang, A Fluorogenic 1,3-Dipolar Cycloaddition Reaction of 3-Azidocoumarins and Acetylenes, *Organic Letters* 24, 2004., 4603–4606.

34. T. Eicher, S. Hauptmann, The Chemistry of Heterocycles, Second Edition, Wiley, 2003.

35. W.S. Horne, M.K. Yadav, C.D. Stout, M.R. Ghadiri, Heterocyclic peptide backbone modifications ina n alpha-helical coiled coil, *Journal of the American Chemical Society* 126, 2004., 1536.

36. G. Aromí, L.A. Barrios, O. Roubeau, P. Gamez, Triazoles and tetrazoles: Prime ligands to generate remarkable coordination materials, *Coordination Chemistry Reviews*, 255(5-6), 2011., 485-546.

37. A.H. Kategaonkar, P.V. Shinde, S.K. Pasale, B.B. Shingate, M.S. Shingare, Synthesis and biological evaluation of new 2-chloro-3-((4-phenyl-1H-1,2,3-triazol-1-yl)methyl)quinoline derivatives via click chemistry approach, *European Journal of Medical Chemistry* 45(7), 2010., 3142–3146.

38. J. Huo, H. Hu, M. Zhang, X. Hu, M. Chen, D. Chen, Z. Wen, A mini review of the synthesis of poly-1,2,3-triazole-based functional materials. *RSC Advances*, 7(4), 2017., 2281-2287.

39. S.P. Sethy, C.P. Meher, S. Biswal, U. Sahoo, S.K. Patro, The role of bioisosterism in molecular modification and drug design: a review, *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical* Research 3, 2013., 61–87.

40. J. Hou, X. Liu, J. Shen, G. Zhao, P.G. Wang, The impact of click chemistry in medicinal chemistry, *Expert Opinion on Drug Discovery* 7, 2012., 489-501.

41. V.V. Rostovtsev, L.G. Green, V.V. Fokin, K.B. Sharpless. A Stepwise Huisgen Cycloaddition Process: Copper(I)-Catalyzed Regioselective Ligation of Azides and Terminal Alkynes. *Agewandte Chemie International Edition* 41, 2002., 2596-2599.

42. J.E. Moses, A.D. Moorhouse, The growing application of click chemistry, *Chemical Society Reviews* 8, 2007.

43. M.M. Heravi, M. Tamimi, H. Yahyavi, T. Hosseinnejad, Huisgen's Cycloaddition Reactions: A Full Perspective, *Current Organic Chemistry* 20 (999):1-1, 2015, doi: 10.2174/1385272820666151217183010

44. S. Neumann, M. Biewend, S. Rana, W.H. Binder, The CuAAC: Principles, Homogeneous and Heterogeneous Catalysts, and Novel Developments and Applications, *Macromolecular Rapid Coummunications* 41(1), 2020., e1900359.

45. B. T. Worell, J. A. Malik, V. V. Fokin, Direct evidence of a dinuclear copper intermediate in Cu(I)-catalyzed azide-alkyne cycloadditions, *Science* 340, 2013., 457-460.

46. J.T. Simmons, J.R. Allen, D.R. Morris, R. J. Clark, C.W. Levenson, M.W. Davidson, L. Elliott, Organometallic complexes with 1,2,3-triazole-derived ligands, *Organometallic Chemistry* 39, 2014., 1−25.

47. P.A. Scattergood, A. Sinopoli, P.I. Elliott, Photophysics and photochemistry of 1,2,3-triazole-based complexes, *Coordination Chemistry Reviews* 350, 2017., 136-154.

48. D. Urankar, B. Pinter, A. Pevec, F. De Proft, I. Turel, J. Kosmrlj, Click-Triazole N_2 Coordination to Transition-Metal Ions Is Assisted by a Pendant Pyridine Substituent, *Inorganic Chemistry* 49, 2009.,4820–4829, doi: 10.1021/ic902354e

49. D. Schweinfurth, R. Pattacini, S. Strobela, B. Sarkar, New 1,2,3-triazole ligands through click reactions and their palladium and platinum complexes, *Dalton Transactions* 42, 2009., 9291-7.

50. I. Bratsos, D. Urankar, E. Zangrando, P. Genova-Kalou, J. Kosmrlj, E. Alessioa, 1-(2-Picolyl)-substituted 1,2,3-triazole as novel chelating ligand for the preparation of ruthenium complexes with potential anticancer activity, *Dalton Transactions* 19, 2011., 5188-5199.

51. B. Zhang, Comprehensive review on the anti-bacterial activity of 1,2,3-triazole hybrids, *European Journal of Medicinal Chemistry* 168, 2019., 357-372.

52. G. Sandip, S.R. Maujan, V.S. Pore, Click Chemistry: 1,2,3-Triazoles as Pharmacophores, *Chemistry – An Asian Journal* 6(10), 2011., 2696-718.

53. Y. Yang, B.A. Rasmussen, D.M. Shlaes, Class A beta-lactamases—enzyme-inhibitor interactions and resistance, *Pharmacology and Therapeutics* 83 (2), 1999., 141-151.

54. A.M. Ortega-Prieto, J. Sheldon, A. Grande-Pérez, H. Tejero, J. Gregori, J. Quer, J.I. Esteban, E. Domingo, C. Perales, J. Vartanian, Extinction of hepatitis C virus by ribavirin in hepatoma cells involves lethal mutagenesis, *Plos One* 8, 2013., 8(8):e71039.

55. Z. Xu, S.J. Zhao, Y. Liu, 1,2,3-Triazole-containing hybrids as potential anticancer agents: Current developments, action mechanisms and structure-activity relationships, *European Journal of Medicinal Chemistry* , 2019., 1 83:111700.

56. T.Gazivoda Kraljević, A. Harej, M. Sedić, S.K. Pavelić, V. Stepanić, D. Drenjančević,

J. Talapko, S. Raić-Malić, Synthesis, in vitro anticancer and antibacterial activities and in silico studies of new 4-substituted 1,2,3-triazole–coumarin hybrids, *European Journal of Medicinal Chemistry* 124, 2016., 794-808.

57. W. Zhang, Z. Li, M. Zhou, F. Wu, X. Hou, H. Luo, H. Liu, X. Han, G. Yan, Z. Ding, R. Li, Synthesis and biological evaluation of 4-(1,2,3-triazol-1-yl)coumarin derivatives as potential antitumor agents, *Molecules*, 2018., 23(9): 2281.

58. D.J. Fu, P. Li, B.W. Wu, X.X. Cui, C.B. Zhao, S.Y. Zhang, Molecular diversity of trimethoxyphenil-1,2,3-triazole hybrids as novel colchicine site tubulin polymerization inhibitors*, European Journal of Medicinal Chemistry* 165, 2019., 309-322.

59. J.W. Zhao, Z.H. Wu, J.W. Guo, M.J. Huang, Y.Z. You, H.M. Liu, L.H. Huang, Synthesis and anti-gastric cancer activity evaluation of novel triazole nucleobase analogues containing steroidal/coumarin/quinoline moieties, *European Journal of Medicinal Chemistry* 181, 2019., 111520.

60. T. Wang, C. Wang, S. Zhou, J. Xu, W. Jiang, L. Tan, J. Fu, Nanovalves-Based Bacteria-Triggered, Self-Defensive Antibacterial Coating: Using Combination Thrapy, Dual Stimuli-Responsiveness and Mutliple Relase Modes for Treatment of Implant-Associated Infections, *Chemistry of Materials* 29, 2017., 8325-8337.

61. A. Bistrović, N. Stipaničev, T. Opačak-Bernardi, M. Jukić, S. Martinez, Lj. Glavaš-Obrovac, S. Raić-Malić, Synthesis of 4-aryl-1,2,3-triazoyl appended natural coumarin-related compounds with antiproliferative and radical scavenging activities and intracellular ROS production modification, *New Journal of Chemstry* 41, 2017., 7531-7543.

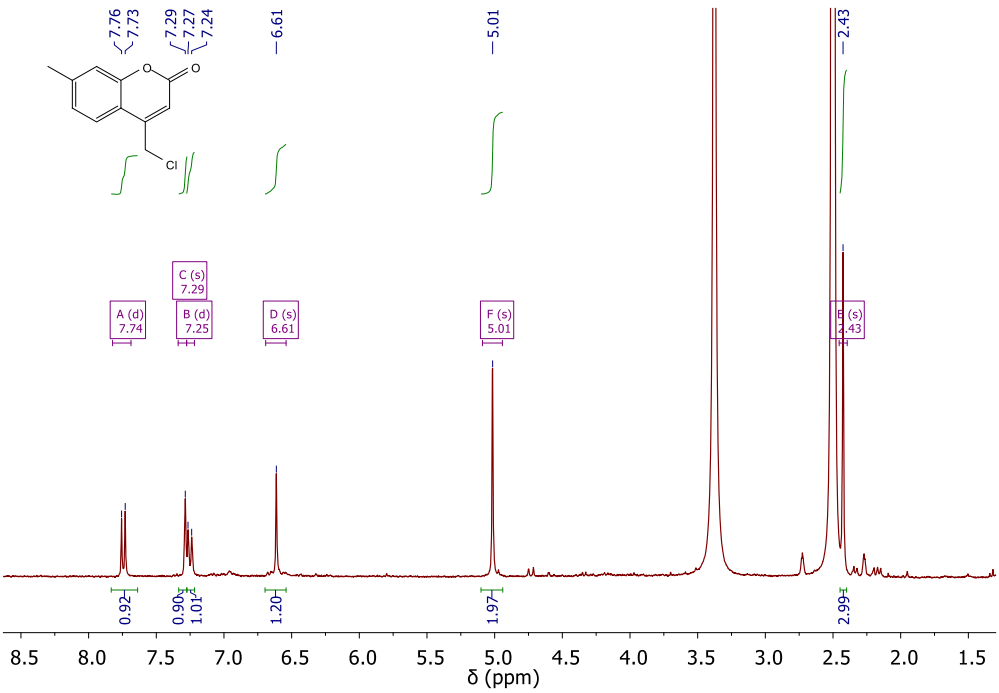
62. Y.C. Duan, Y.C. Ma, E. Zhang, X.J. Shi, M.M. Wang, X.W. Ye, H.M. Liu, Design and synthesis of novel 1,2,3-triazole-dithiocarbamate hybrids as potential anticancer agents, *European Journal of Medicinal Chemistr*y, 2013., 62:11-9. doi: 10.1016/j.ejmech.2012.12.046.

63. M. Vojtek, M.P.M. Marques, I. Ferreira, H. Mota-Filipe, C. Diniz, Anticancer activity of palladium-based complexes against triple-negative breast cancer, *Drug Discovery Today* 24, 2019., 1044-1058.

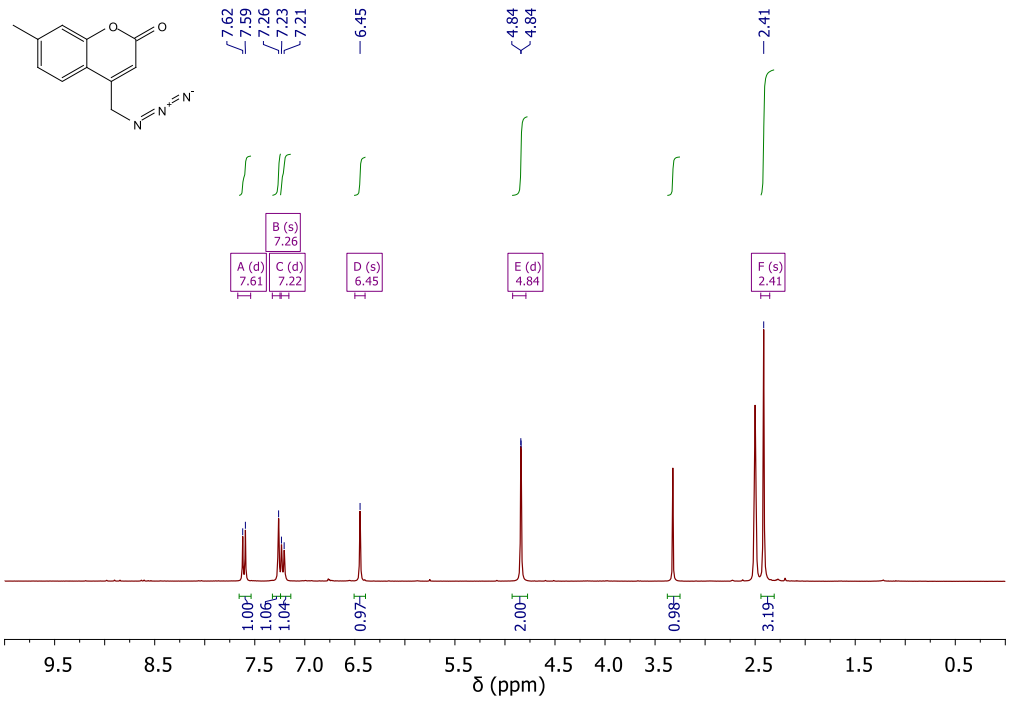
64. A. Muley, K.S. Karumban, P. Gupta, S. Kumbhakar, B. Giri, R. Raut, A. Misra, S. Maji, Synthesis, structure, spectral, redox properties and anti-cancer activity of Ruthenium(II) Arene complexes with substituted Triazole Ligands, *Journal of Organometallic Chemistry* 954-955, 2021., 122074.

65. N. Devarajan, R. Manjunathan, S. K. Ganesan, Tumor hypoxia: The major culprit behind cisplatin resistance in cancer patients, *Critical Reviews in Oncology/Hematology* 162, 2021, 103327.

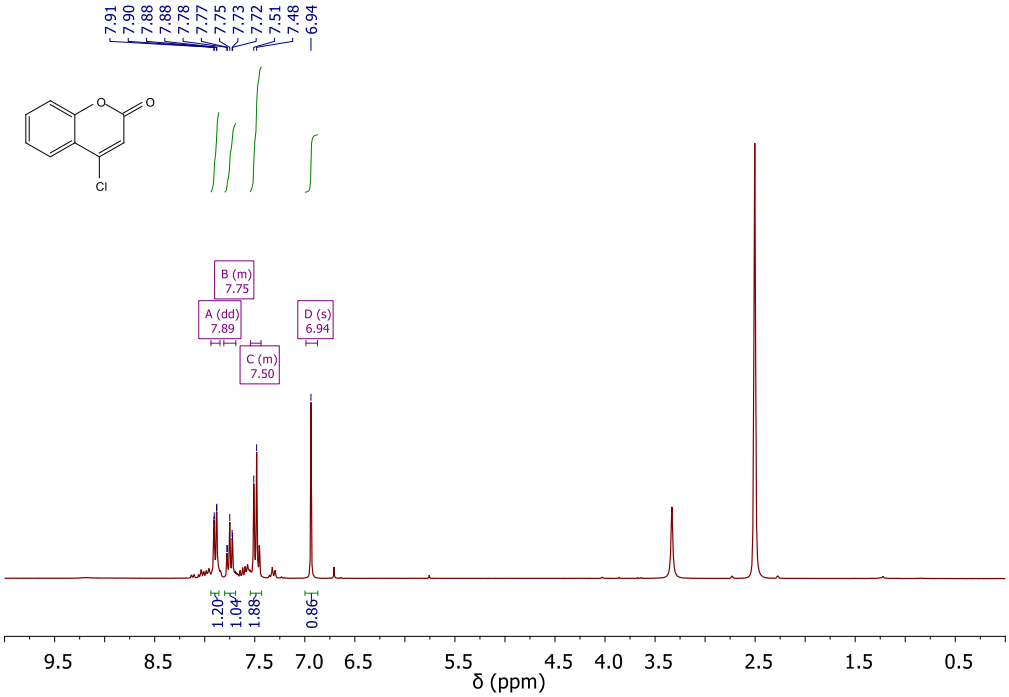
7. PRILOZI



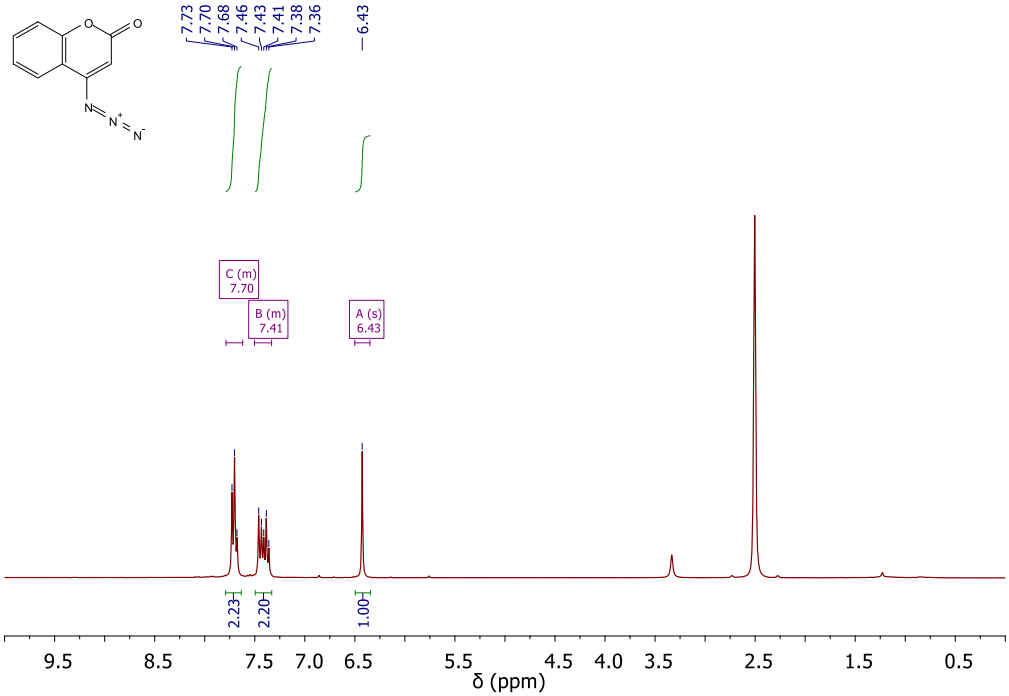
Slika 23. Spektar ^{1}H NMR spoja **29c**



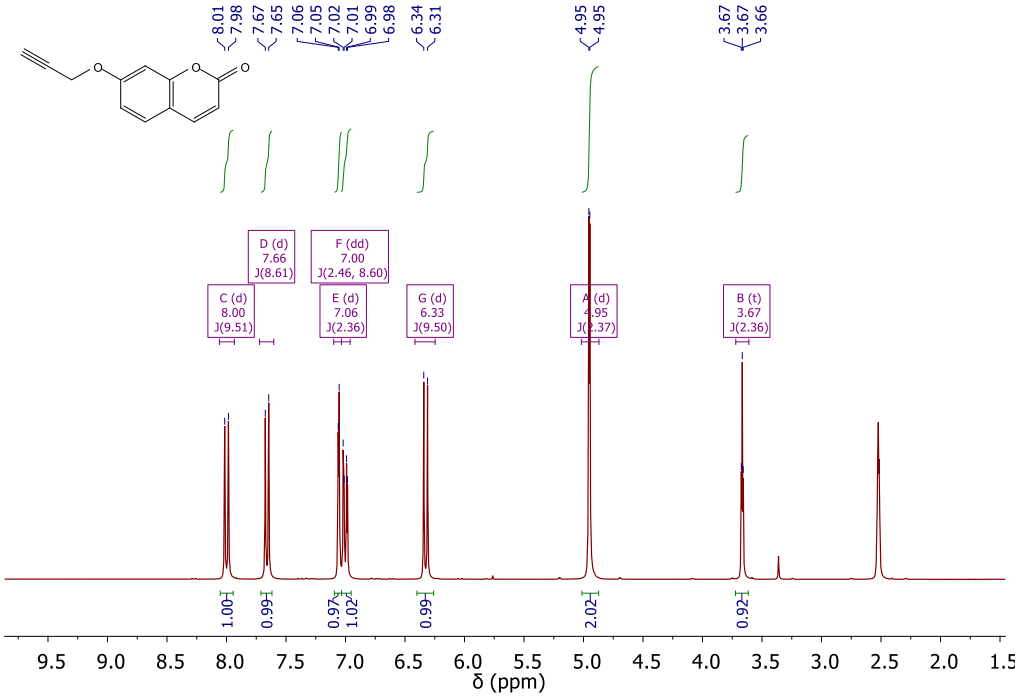
Slika 20. Spektar ^{1}H NMR spoja **5**



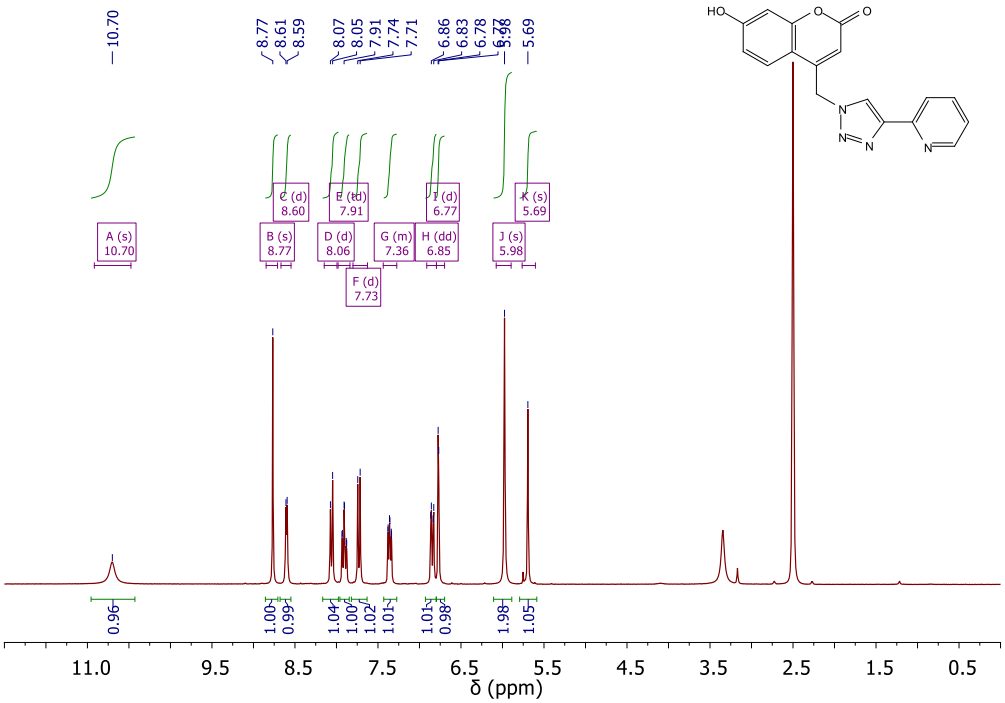
Slika 21. Spektar ^{1}H NMR spoja **32**



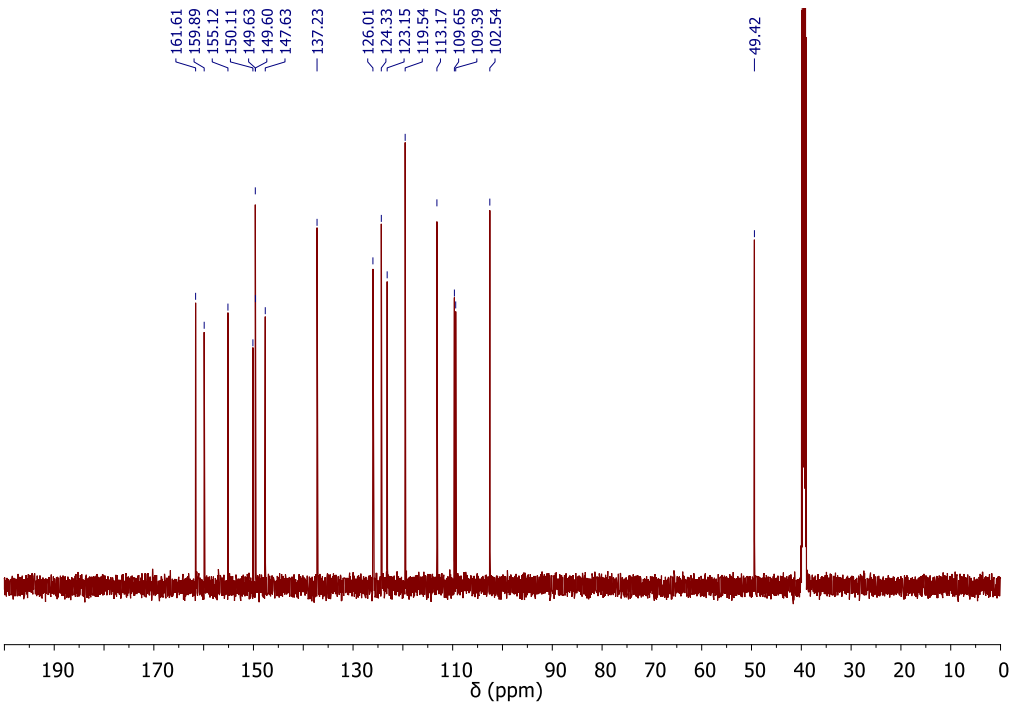
Slika 22. Spektar ^{1}H NMR spoja **6**



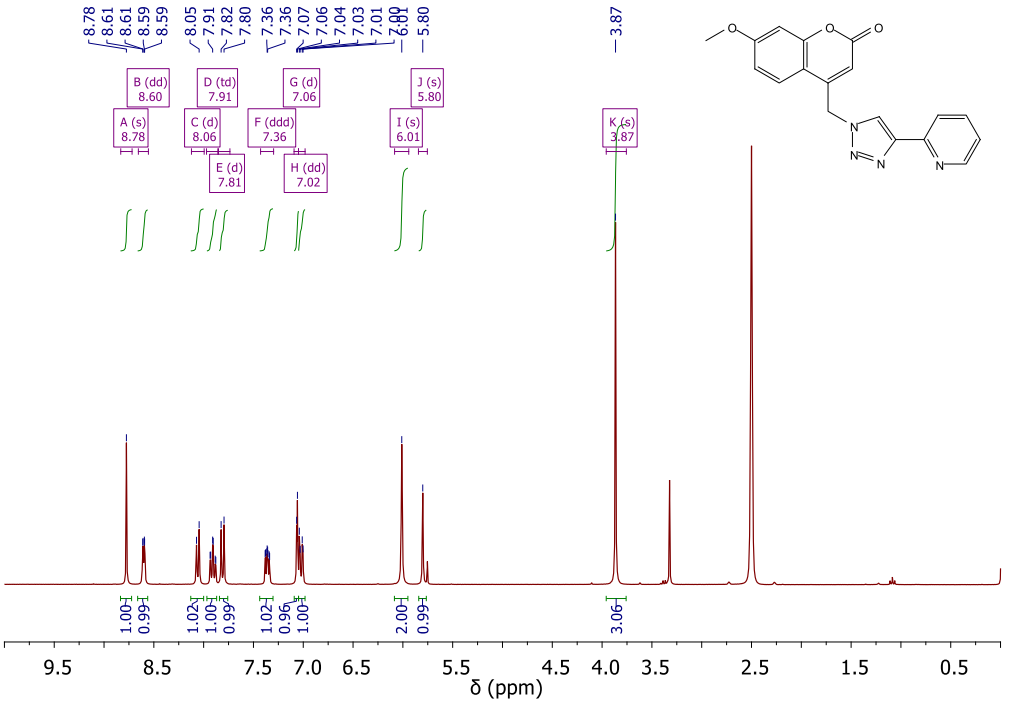
Slika 23. Spektar ^{1}H NMR spoja **7**



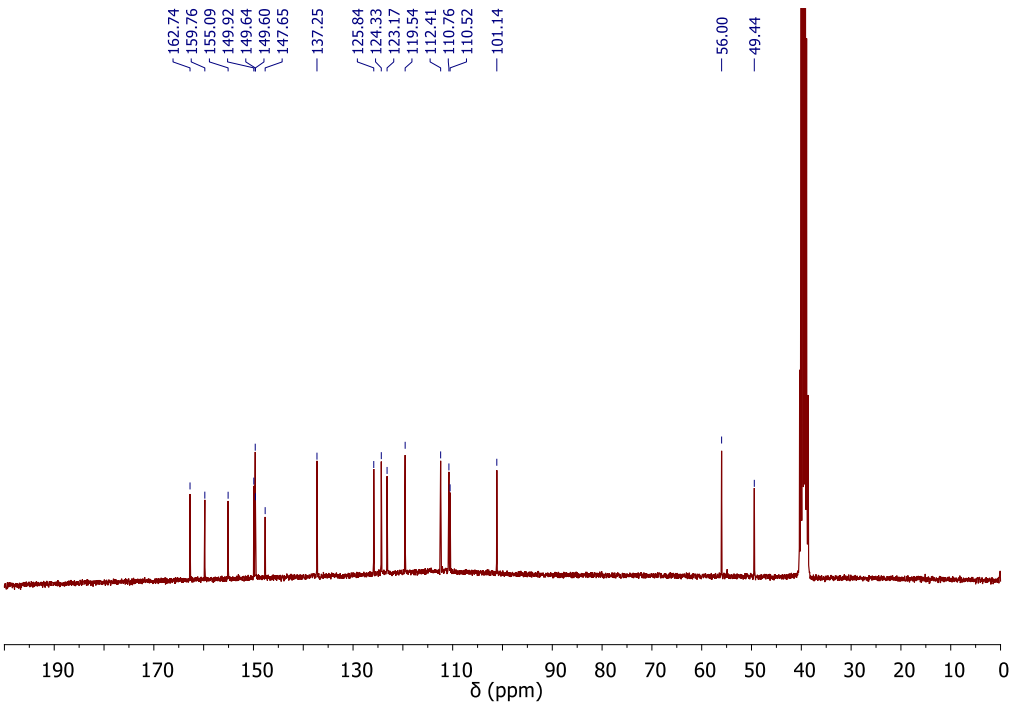
Slika 24. Spektar ^{1}H NMR spoja **11**



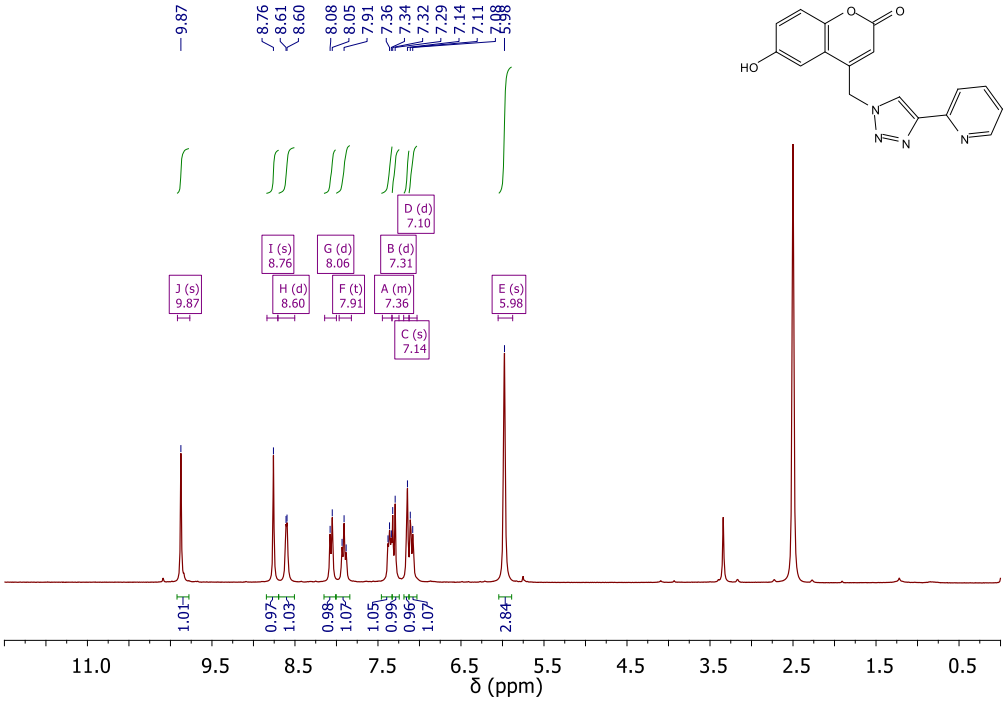
Slika 25. Spektar ^{13}C NMR spoja **11**



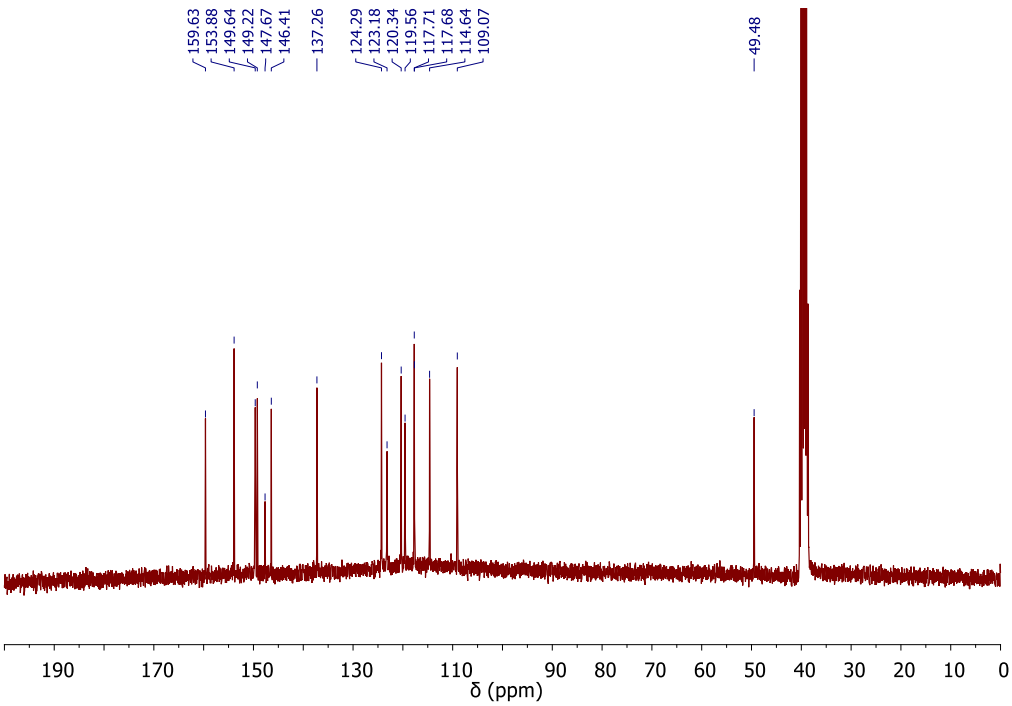
Slika 26. Spektar ^{1}H NMR spoja **12**



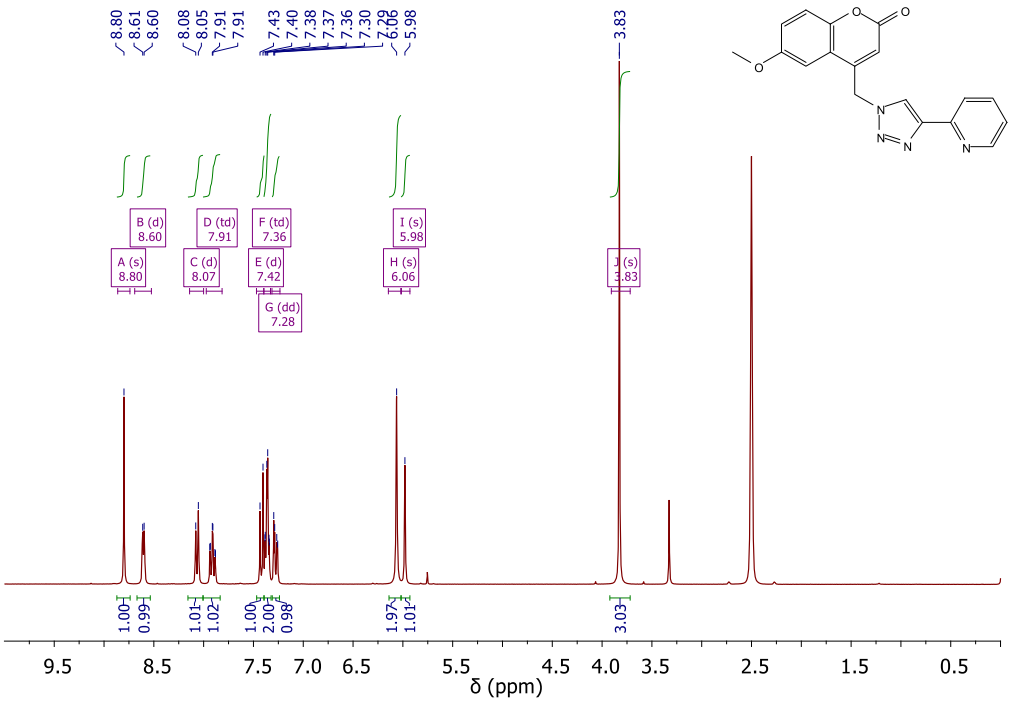
Slika 27. Spektar ^{13}C NMR spoja **12**



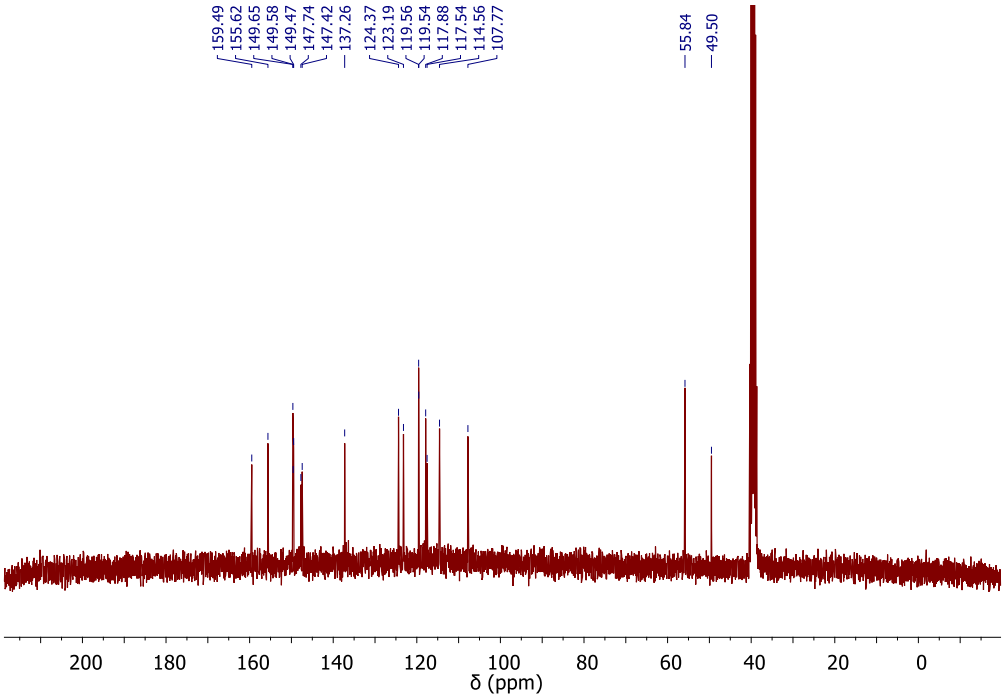
Slika 28. Spektar ^{1}H NMR spoja **13**



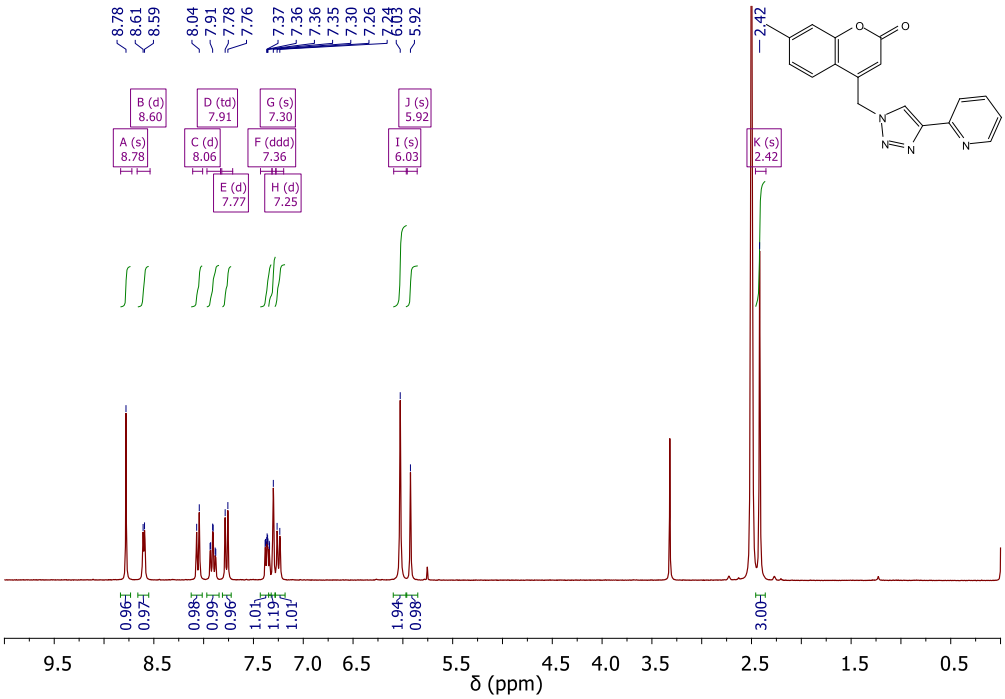
Slika 29. Spektar ^{13}C NMR spoja **13**



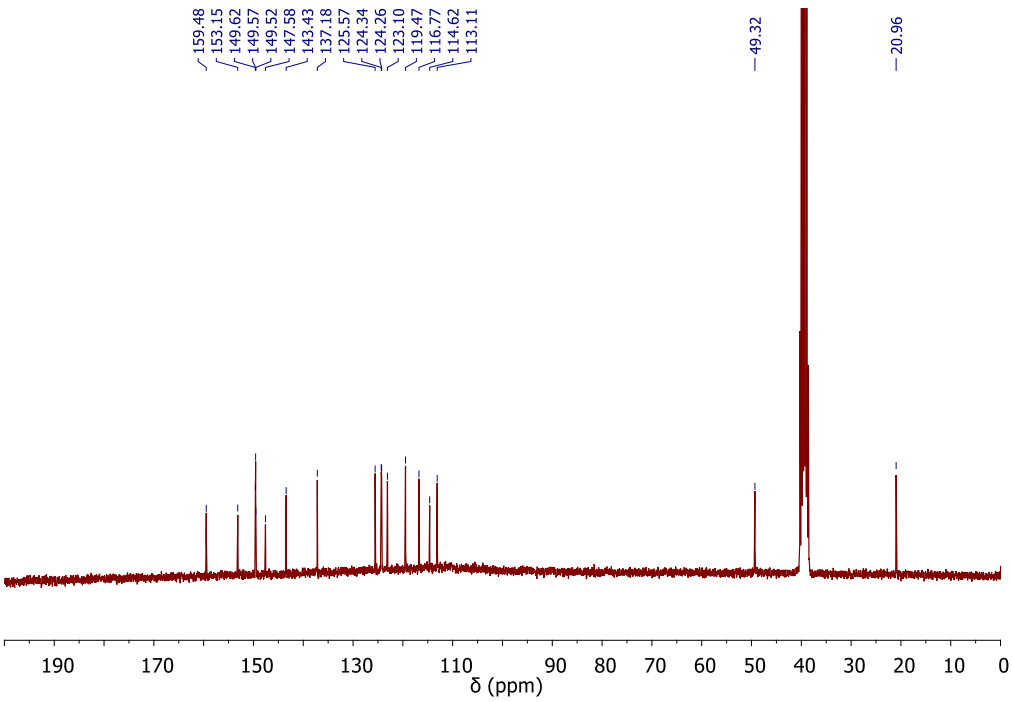
Slika 30. Spektar ^{1}H NMR spoja **14**



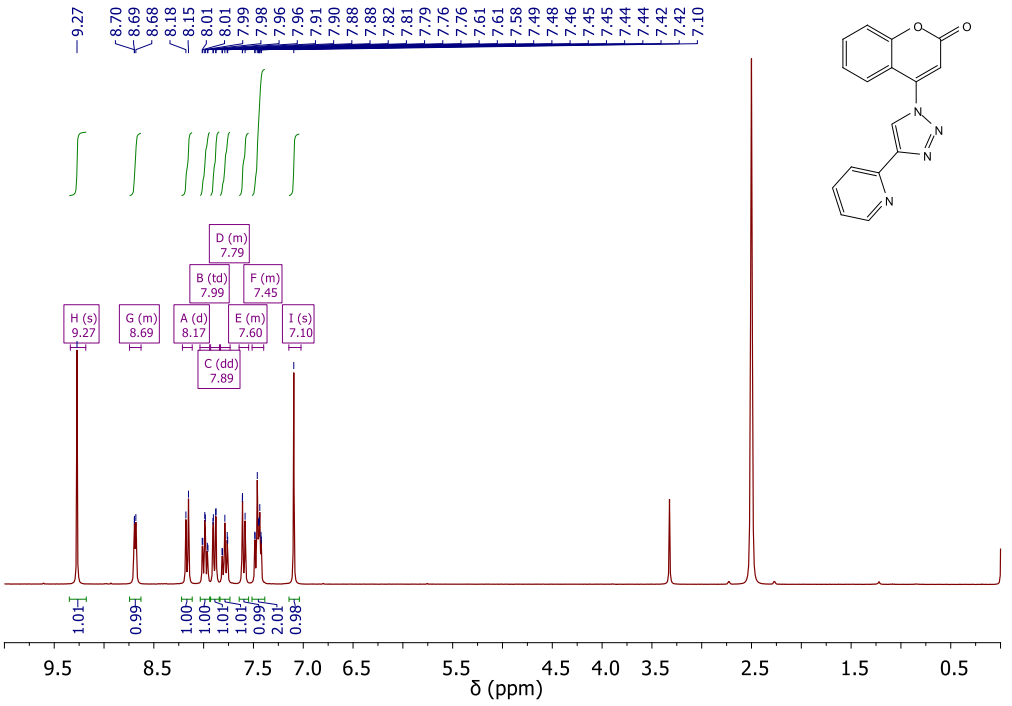
Slika 31. Spektar ^{13}C NMR spoja **14**



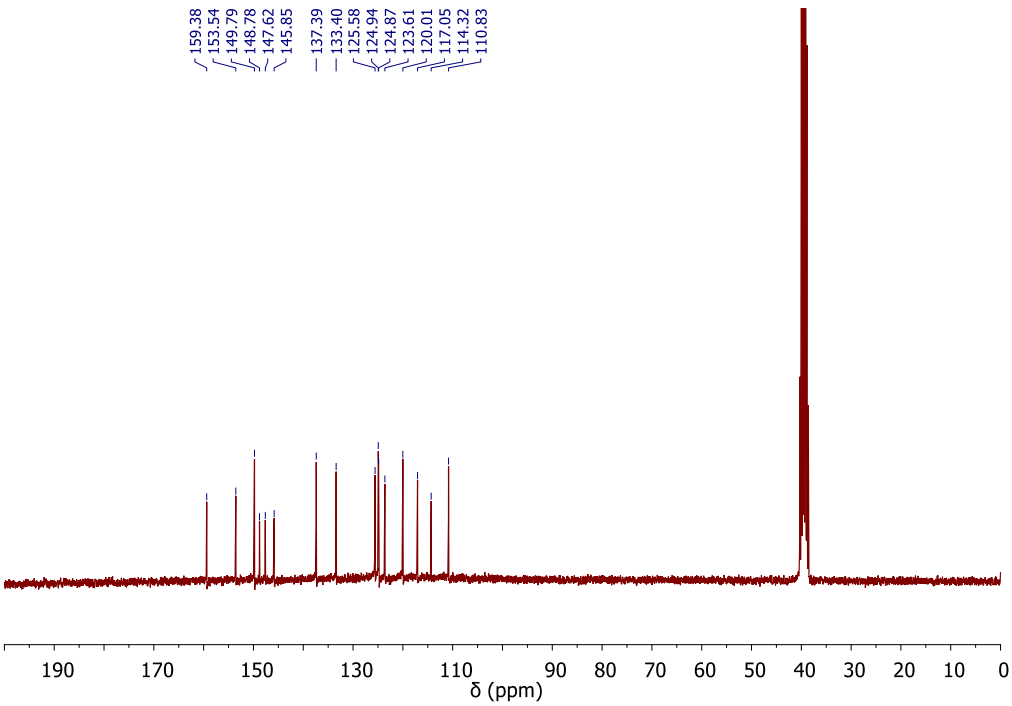
Slika 32. Spektar ^{1}H NMR spoja **15**



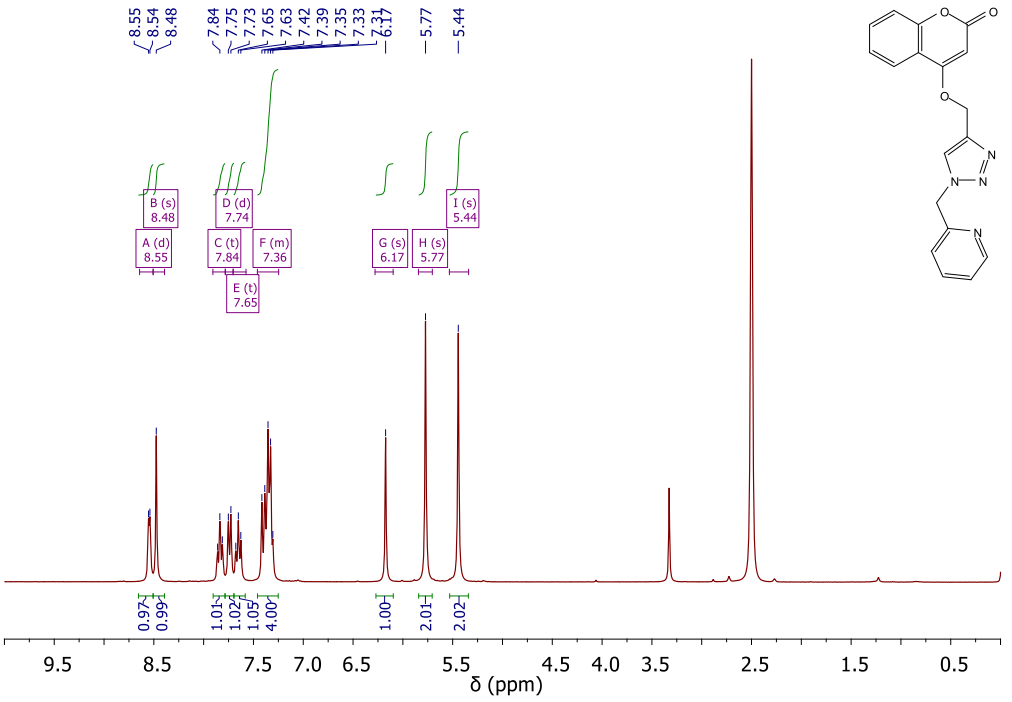
Slika 33. Spektar ^{13}C NMR spoja **15**



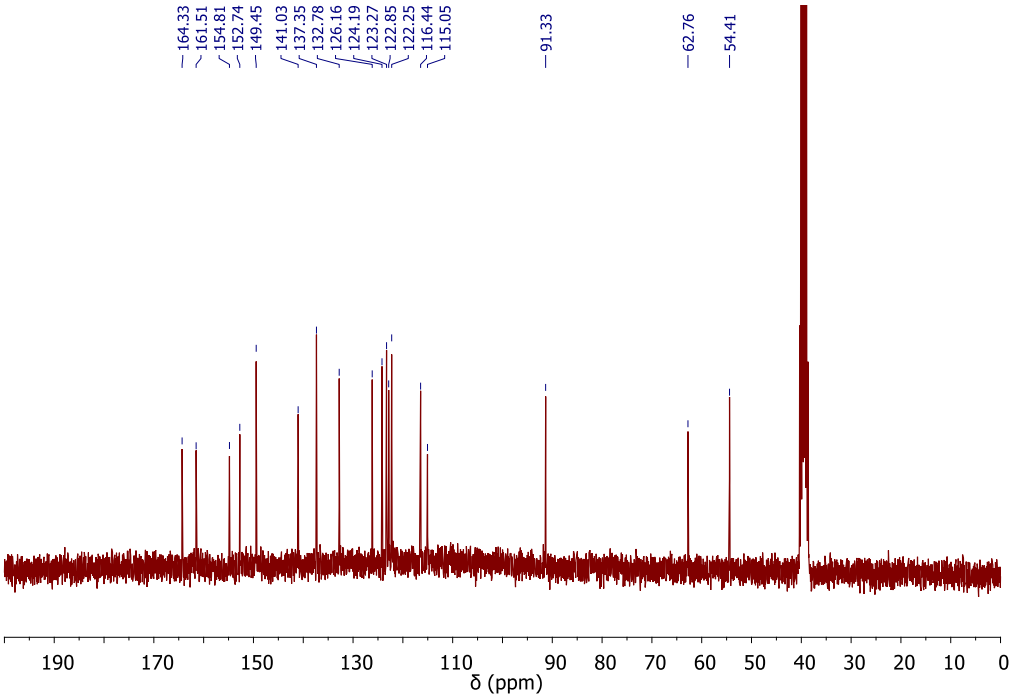
Slika 34. Spektar ^{1}H NMR spoja **16**



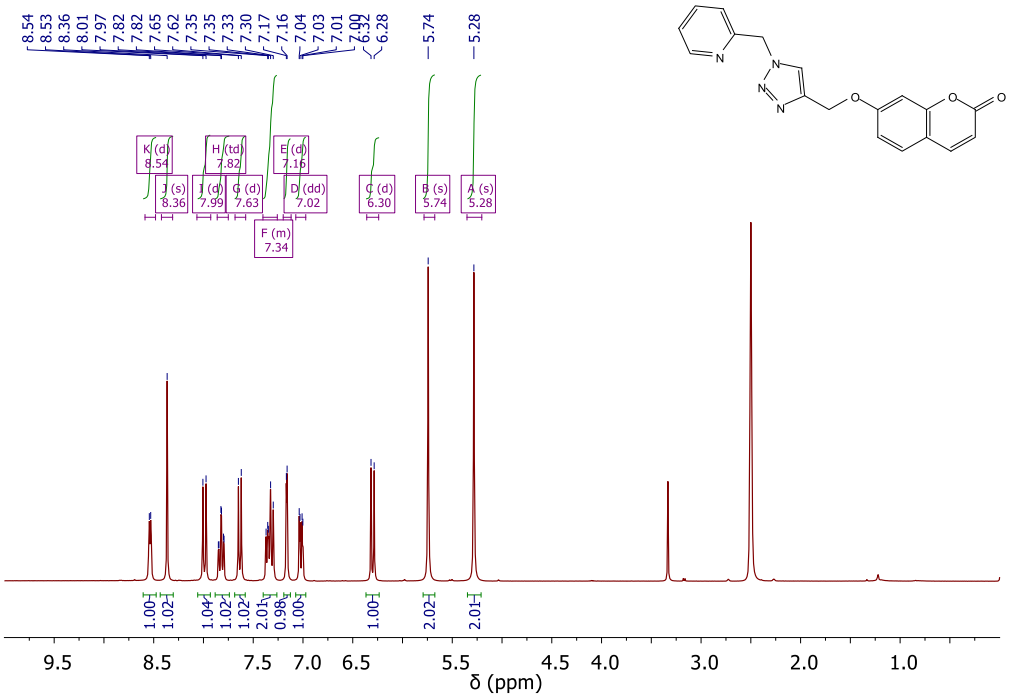
Slika 35. Spektar ^{13}C NMR spoja **16**



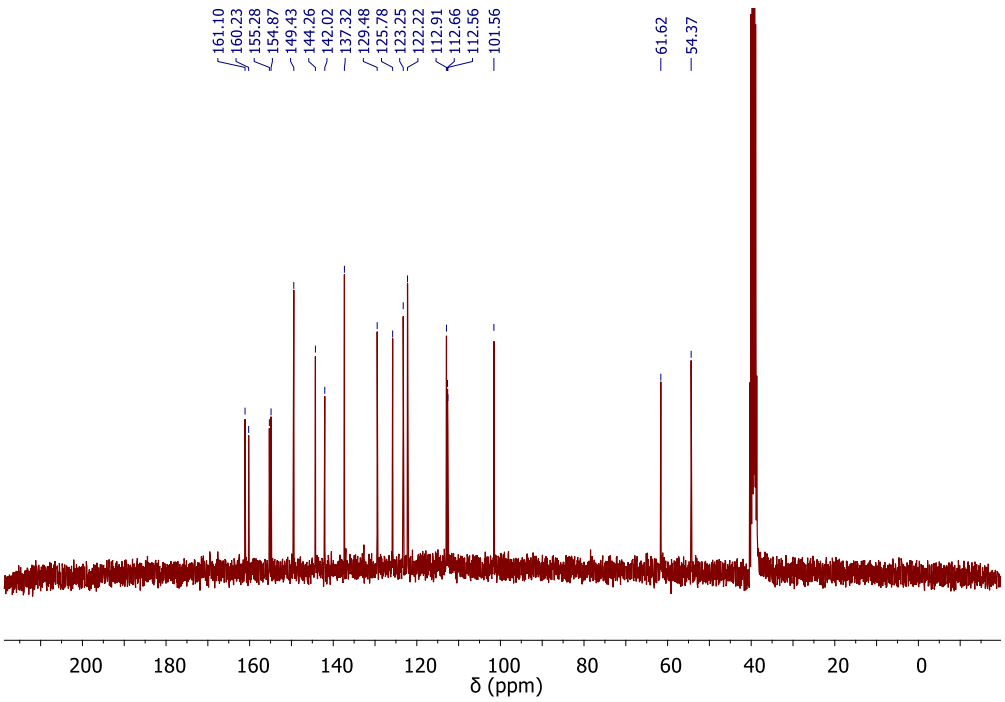
Slika 36 Spektar ^{1}H NMR spoja **18**



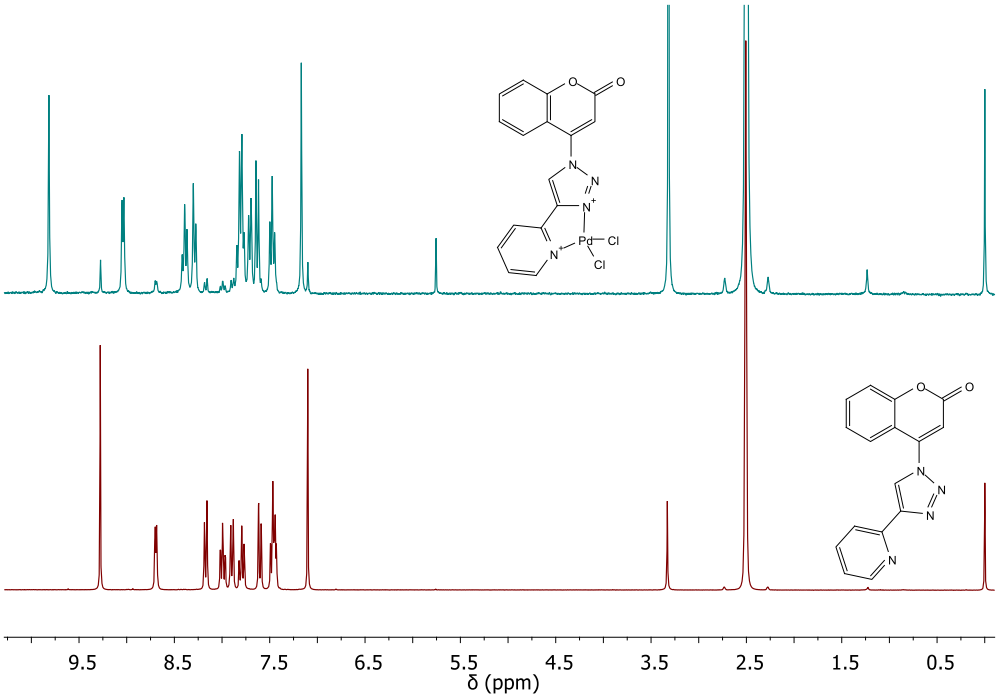
Slika 37. Spektar ^{13}C NMR spoja **18**



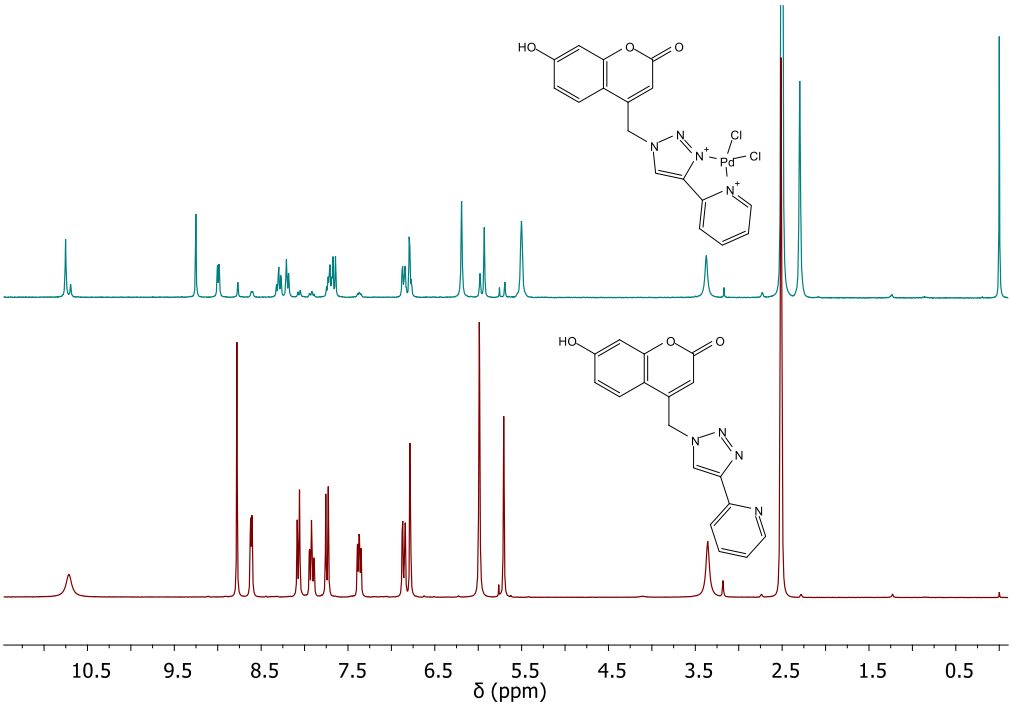
Slika 38. Spektar ^{1}H NMR spoja **17**



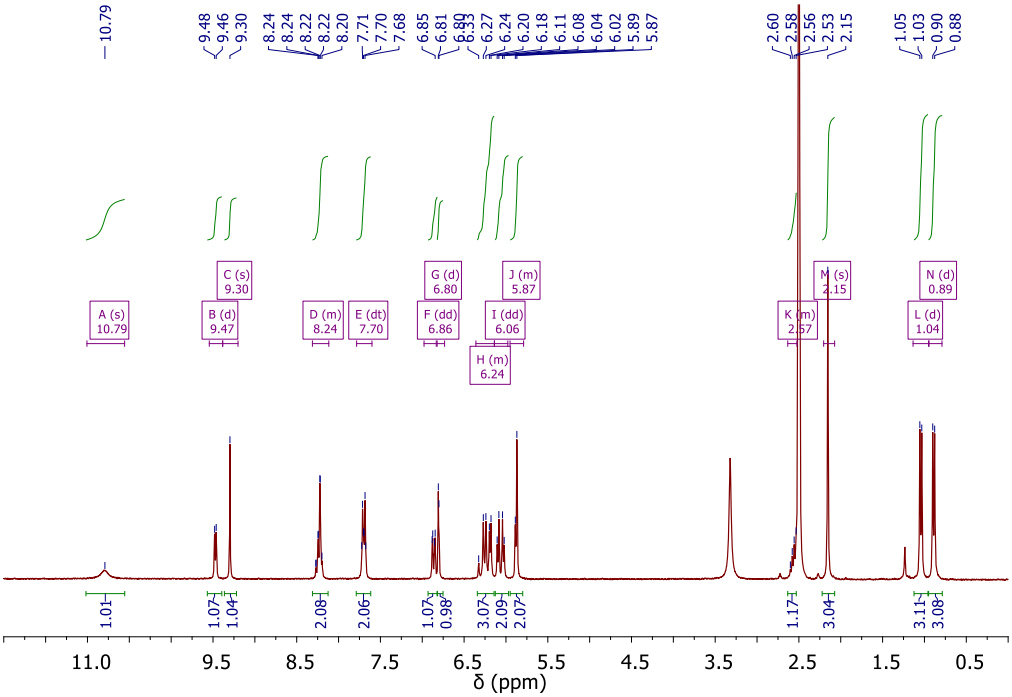
Slika 39. Spektar ^{13}C NMR spoja **17**



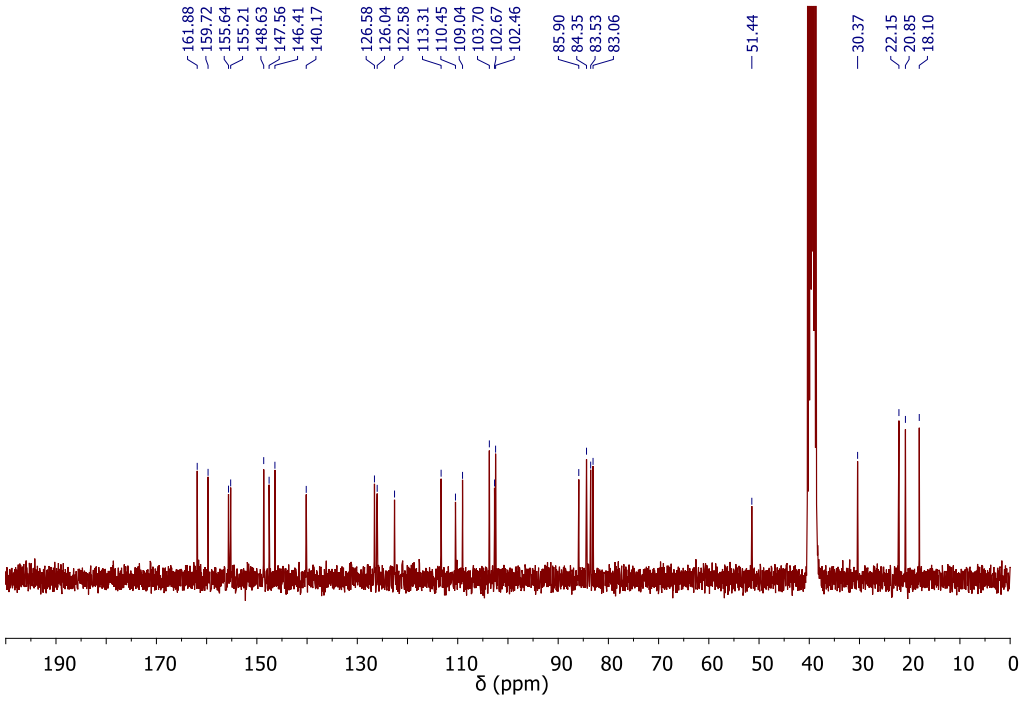
Slika 40. Spektar ^{1}H NMR kompleksa **10d** *i liganda* **16**



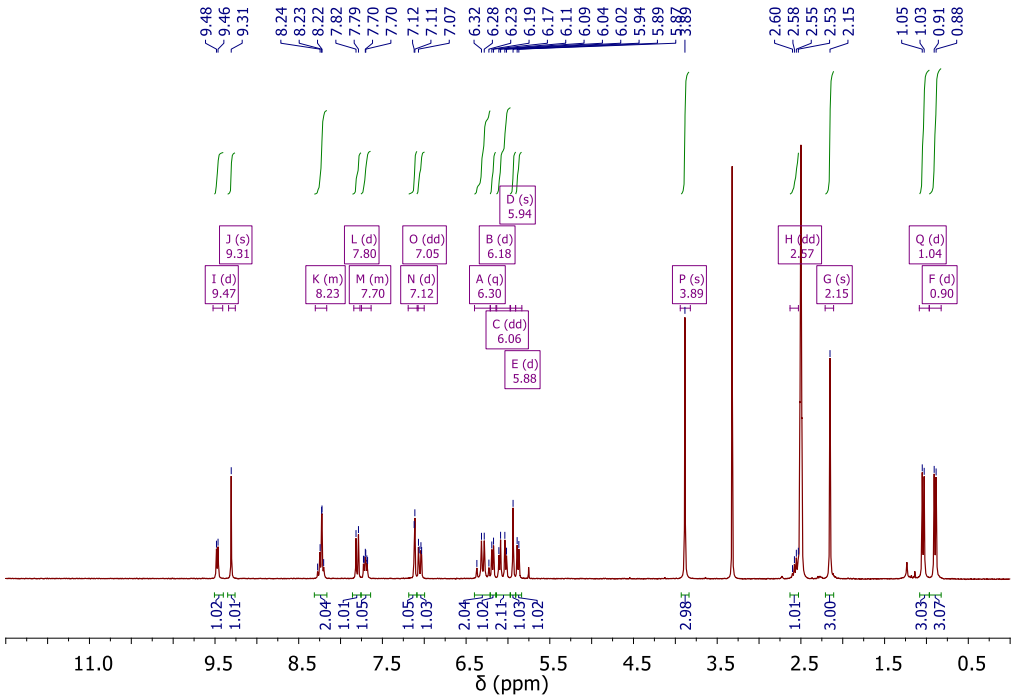
Slika 41. Spektar ^{1}H NMR kompleksa **10a** *i liganda* **11**



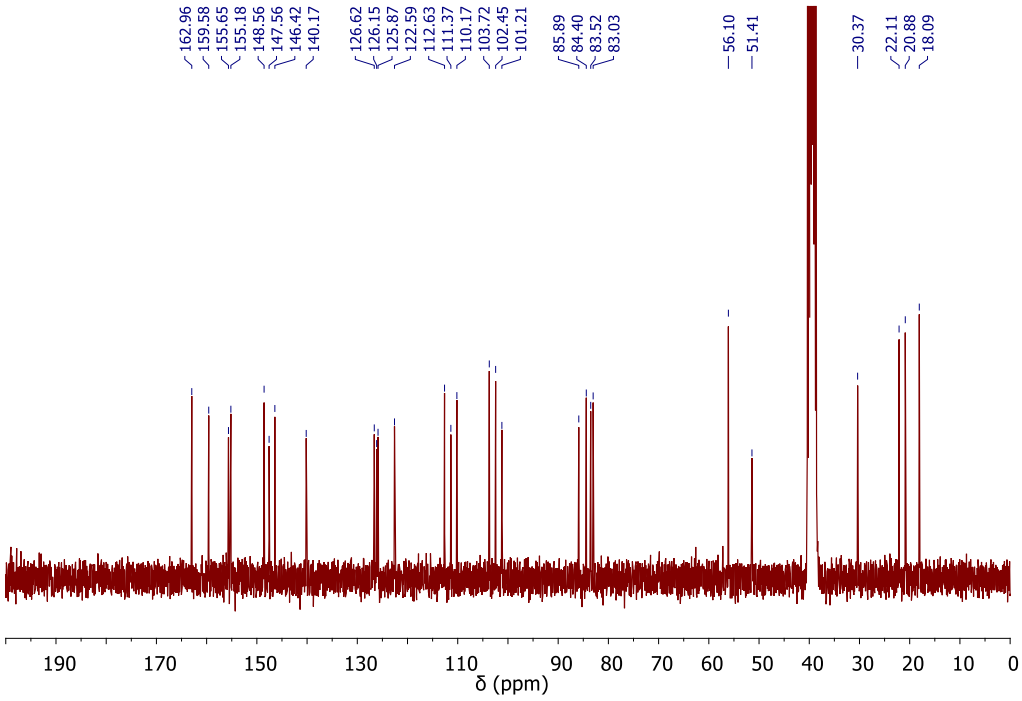
Slika 42. Spektar ^{1}H NMR kompleksa **19**



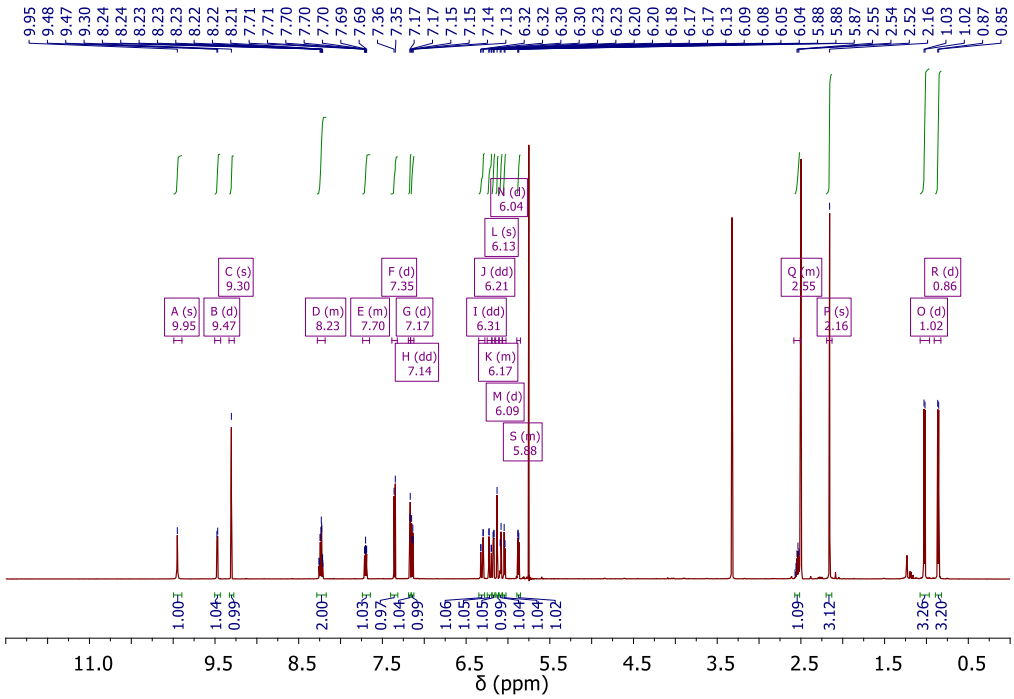
Slika 43. Spektar ^{13}C NMR kompleksa **19**



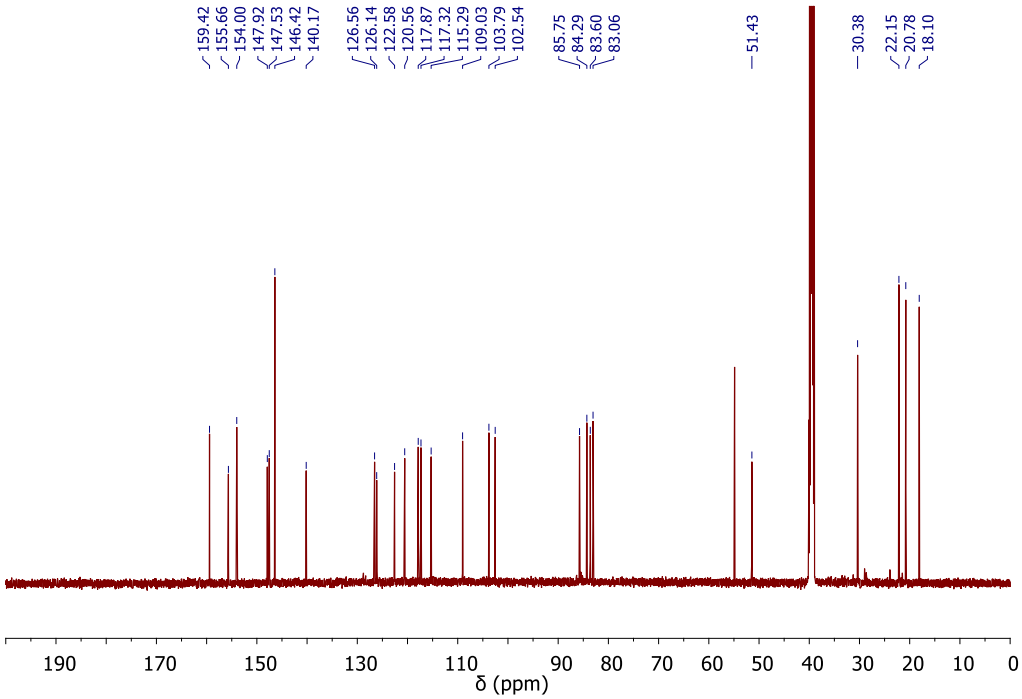
Slika 44. Spektar ^{1}H NMR kompleksa **20**



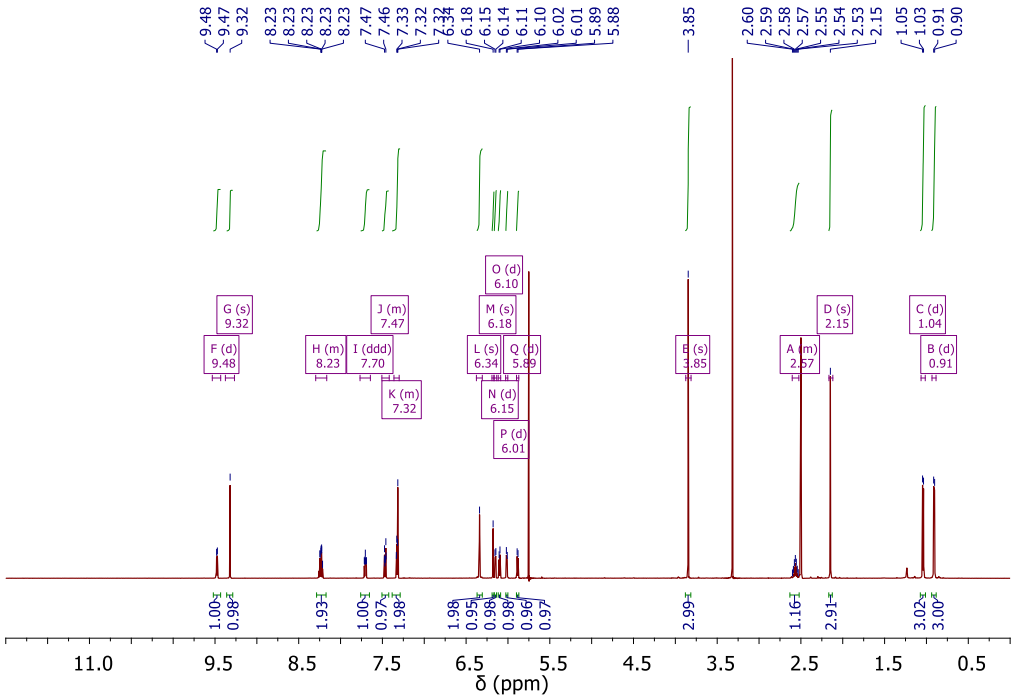
Slika 45. Spektar ^{13}C NMR kompleksa **20**



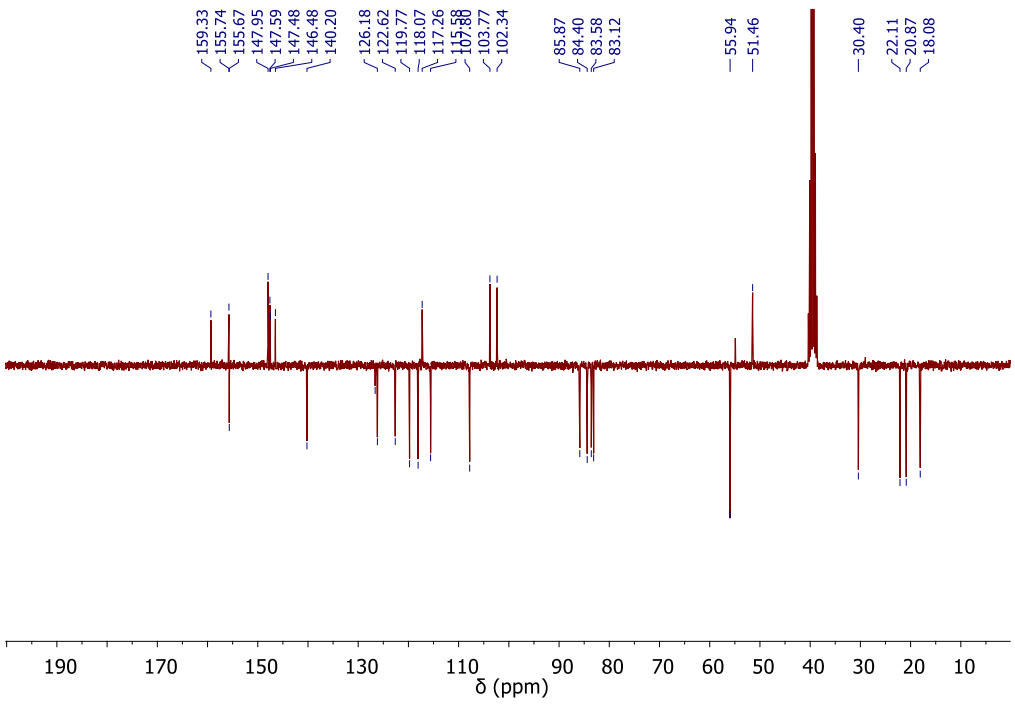
Slika 46. Spektar ^{1}H NMR kompleksa **21**



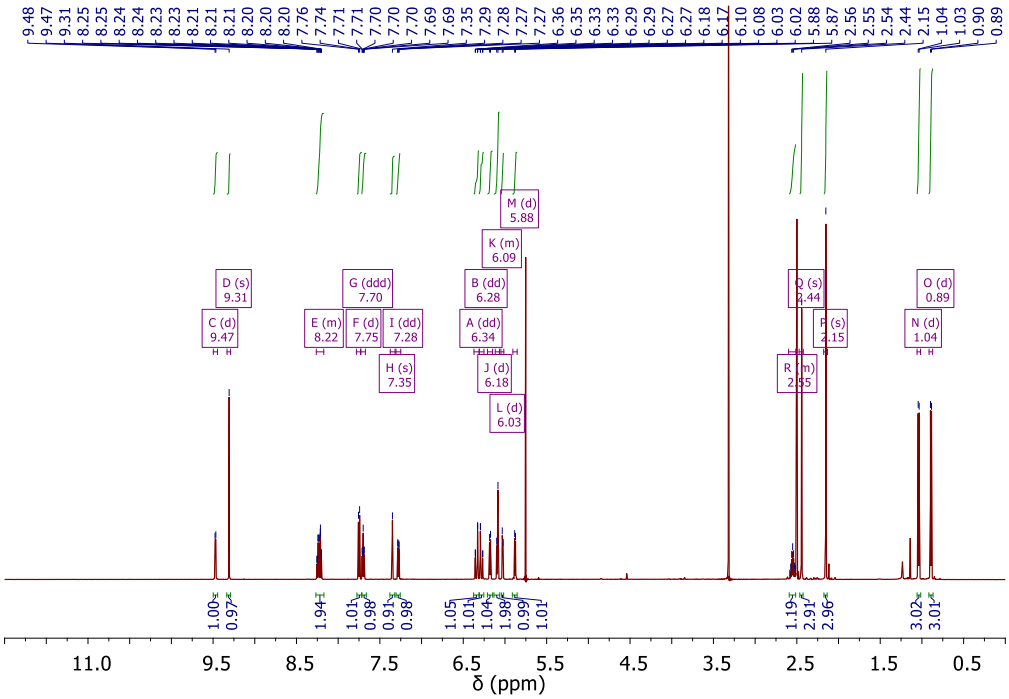
Slika 47. Spektar ^{13}C NMR kompleksa **21**



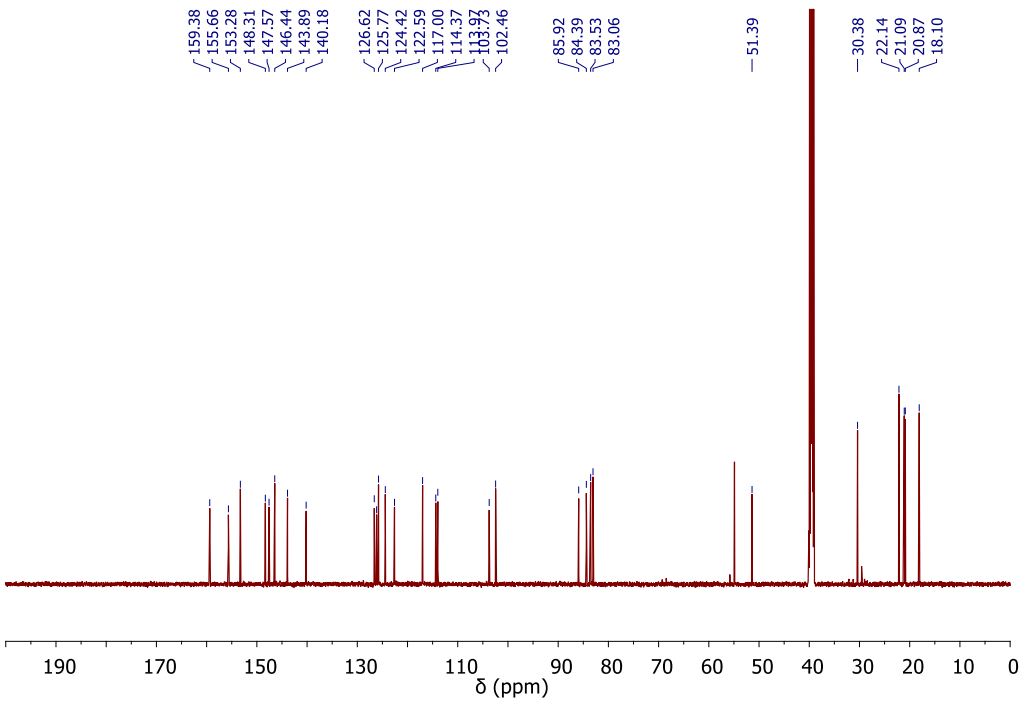
Slika 48. Spektar ^{1}H NMR kompleksa **22**



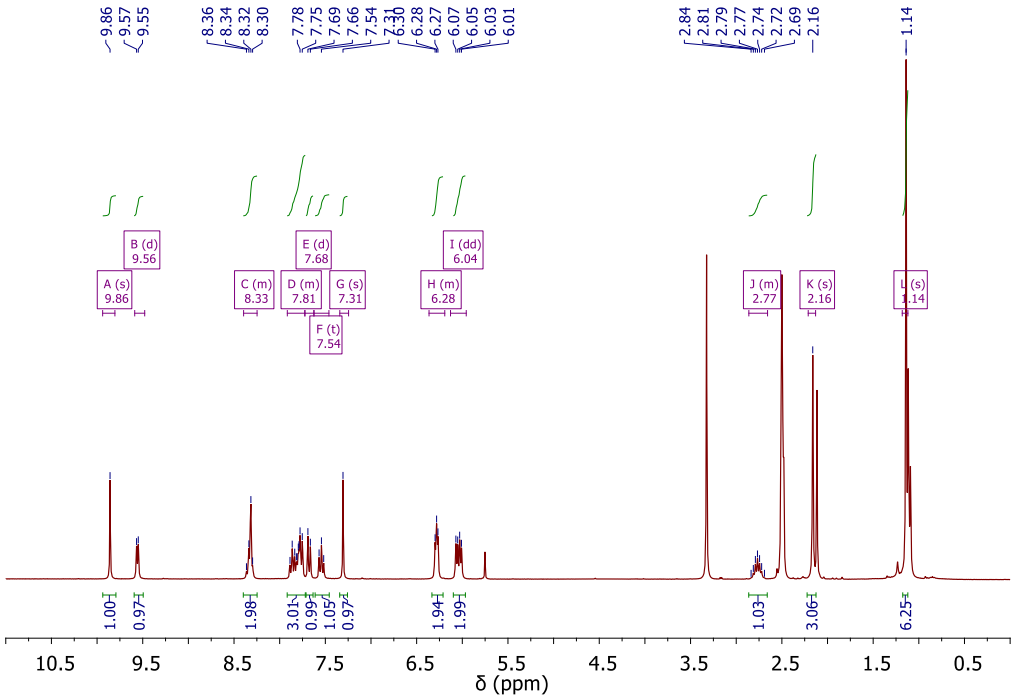
Slika 49. Spektar ^{13}C NMR kompleksa **22**



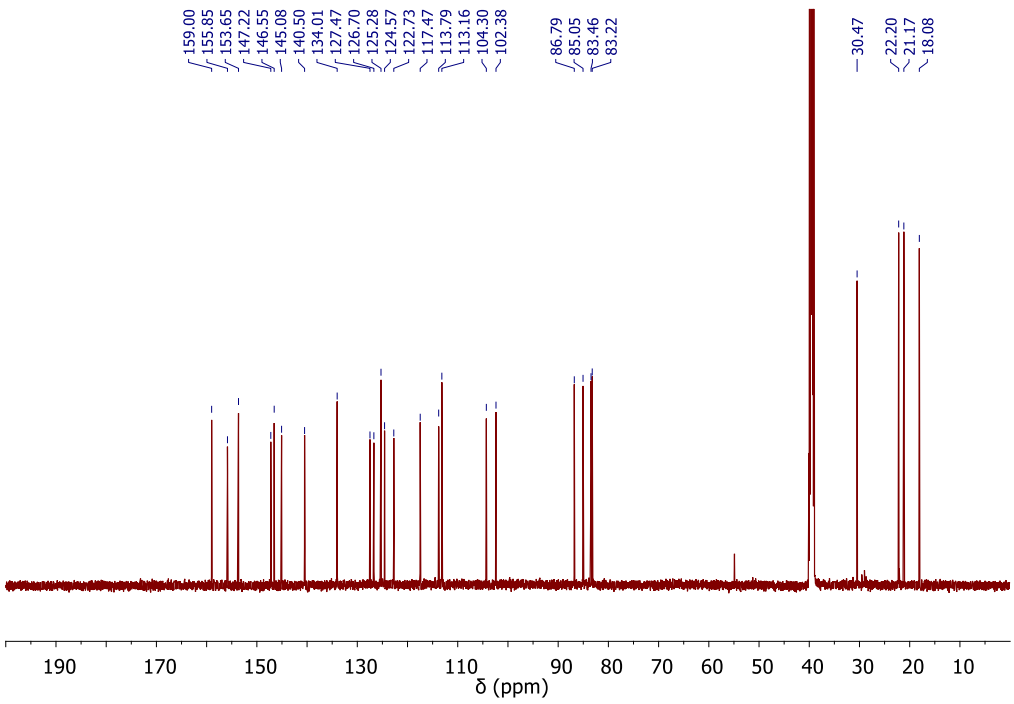
Slika 50. Spektar ^{1}H NMR kompleksa **23**



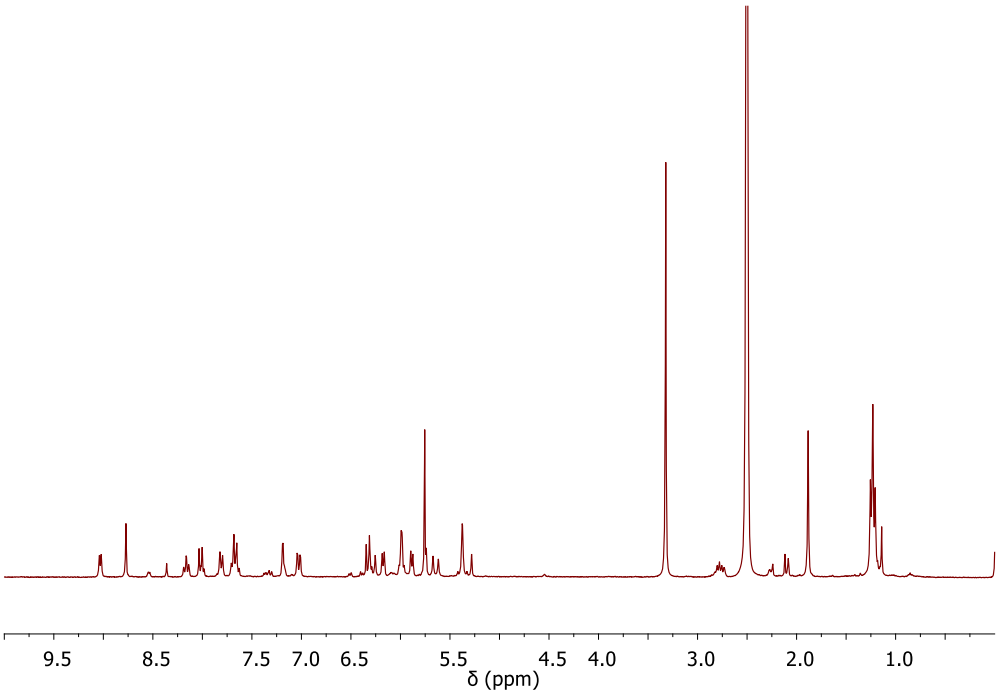
Slika 51. Spektar ^{13}C NMR kompleksa **23**



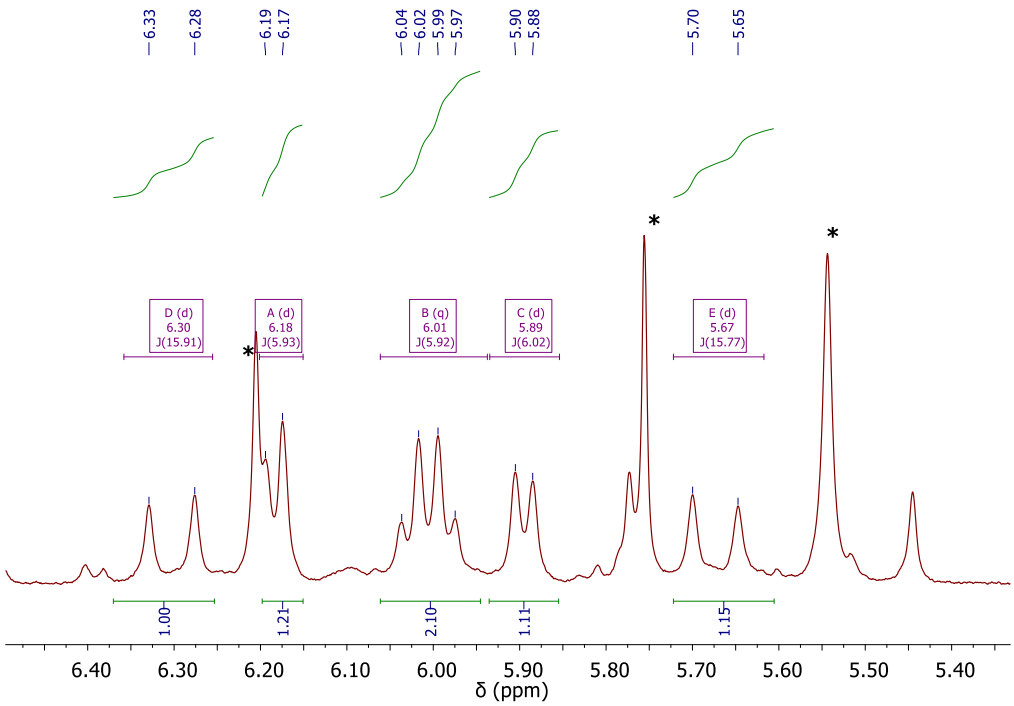
Slika 52. Spektar ^{1}H NMR kompleksa **24**



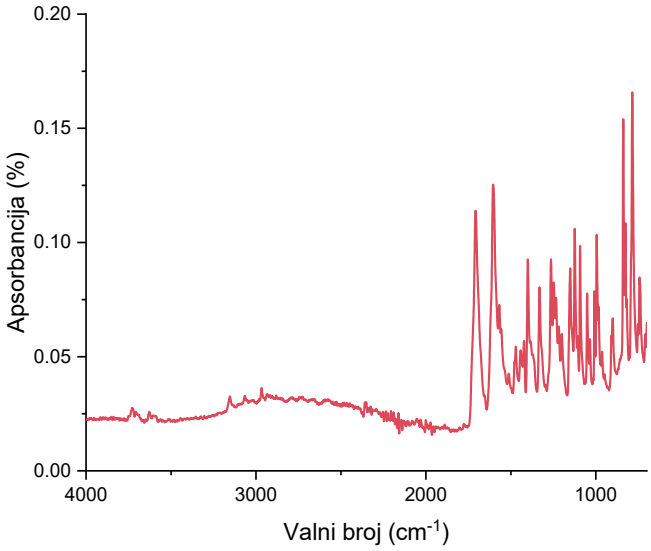
Slika 53. Spektar ^{13}C NMR kompleksa **24**



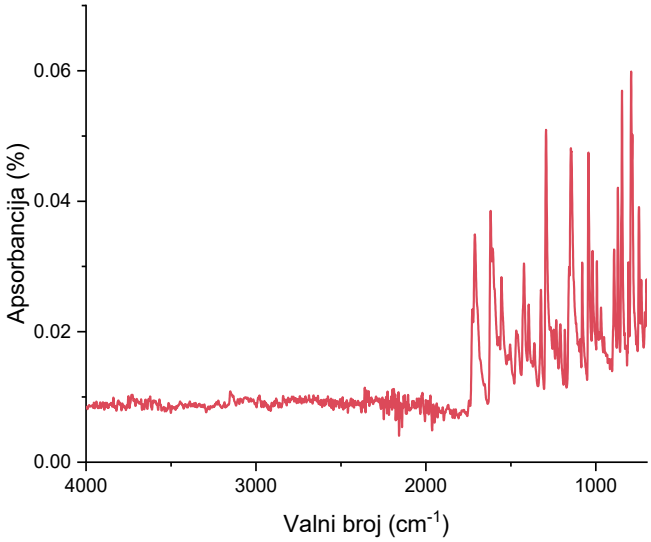
Slika 54. Spektar ^{1}H NMR kompleksa **25**



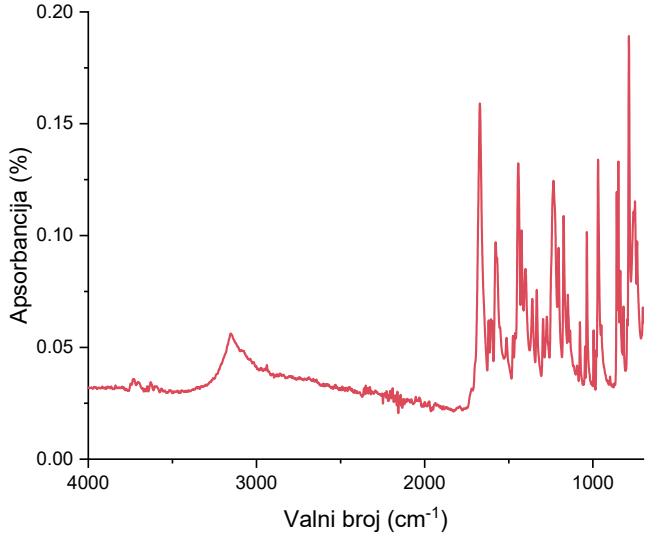
Slika 55. Spektar ^{1}H NMR kompleksa **26**



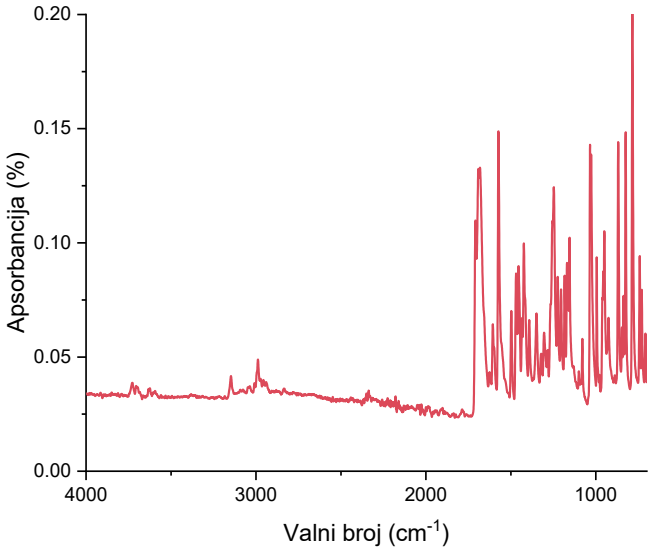
Slika 56. Spektar FTIR spoja **11**



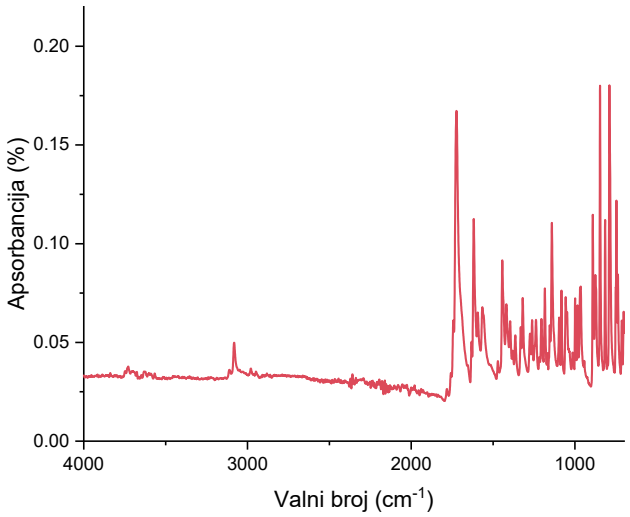
Slika 57. Spektar FTIR spoja **12**



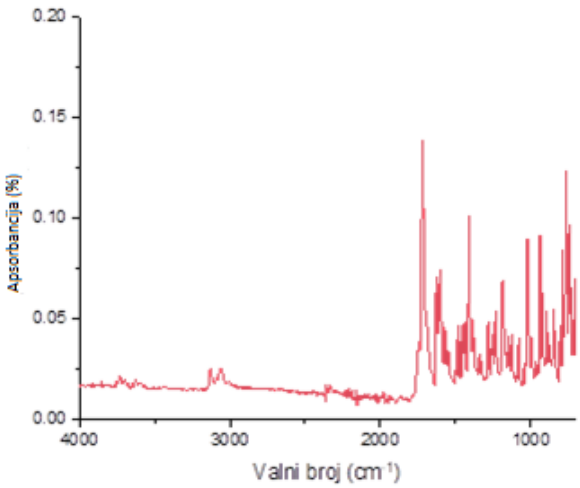
Slika 58. Spektar FTIR spoja **13**



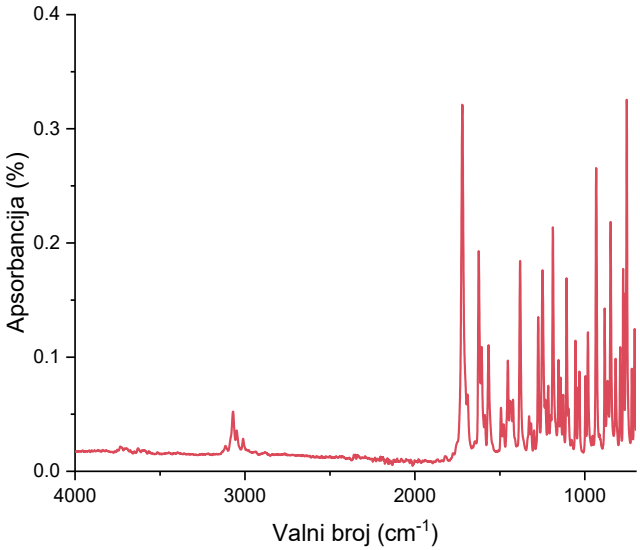
Slika 59. Spektar FTIR spoja **14**



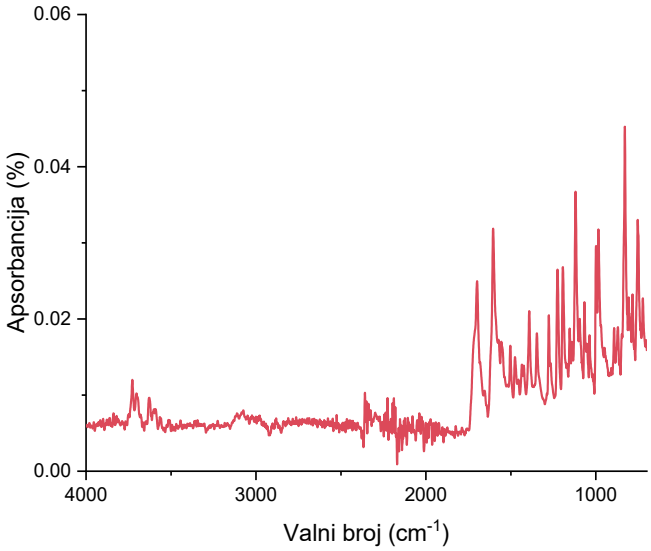
Slika 60. Spektar FTIR spoja **15**



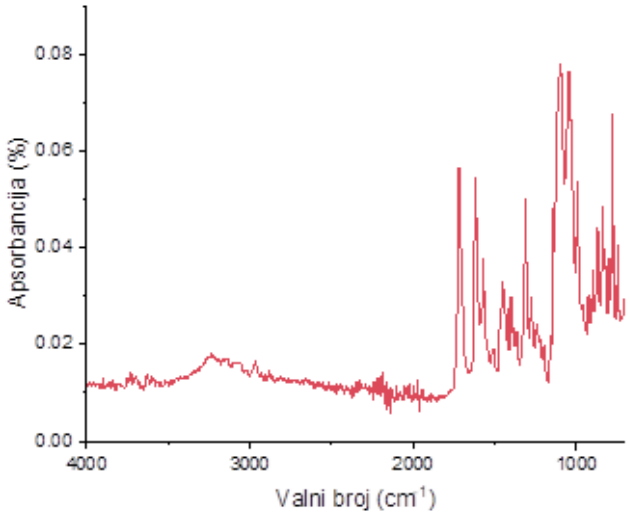
Slika 61. Spektar FTIR spoja **16**



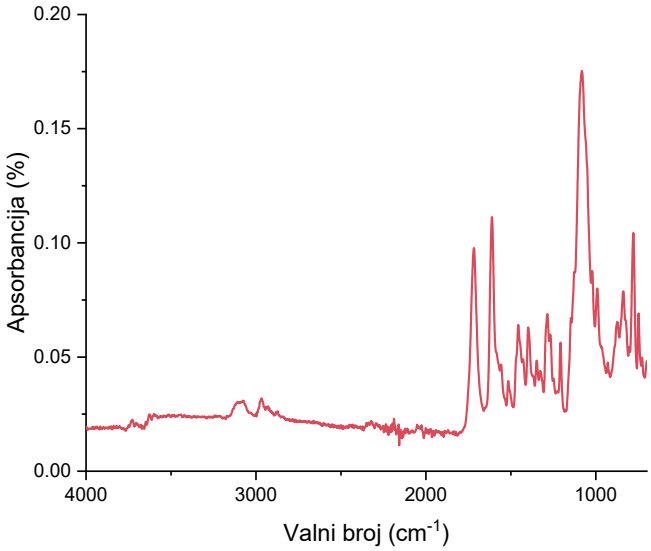
Slika 62. Spektar FTIR spoja **17**



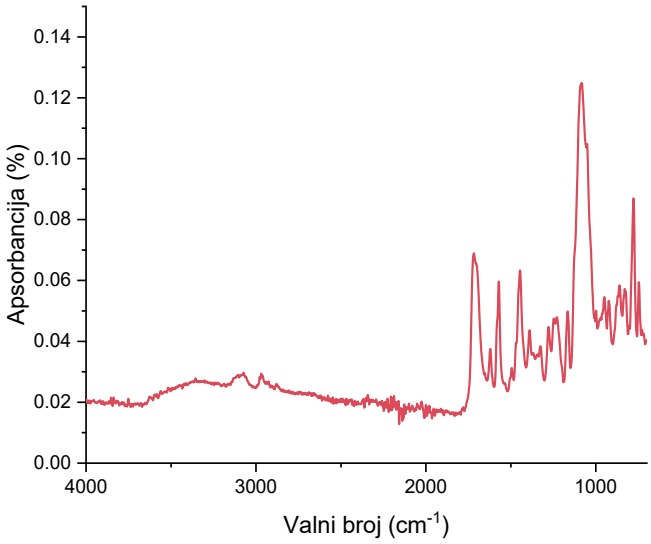
Slika 63. Spektar FTIR spoja **18**



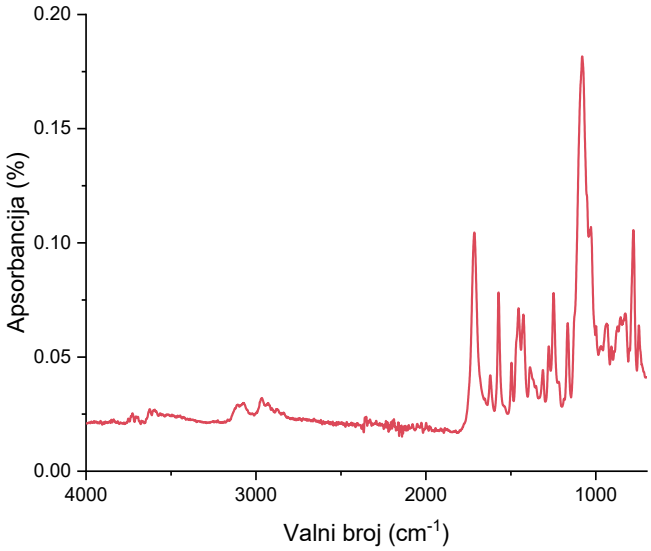
Slika 64. Spektar FTIR kompleksa **19**



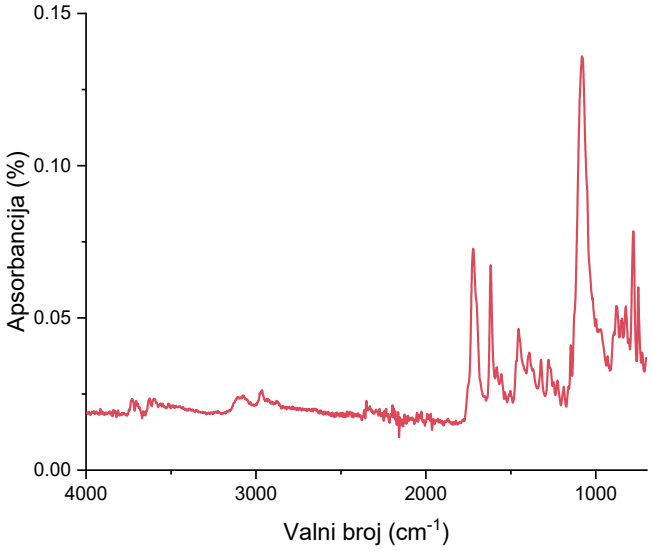
Slika 65. Spektar FTIR kompleksa **20**



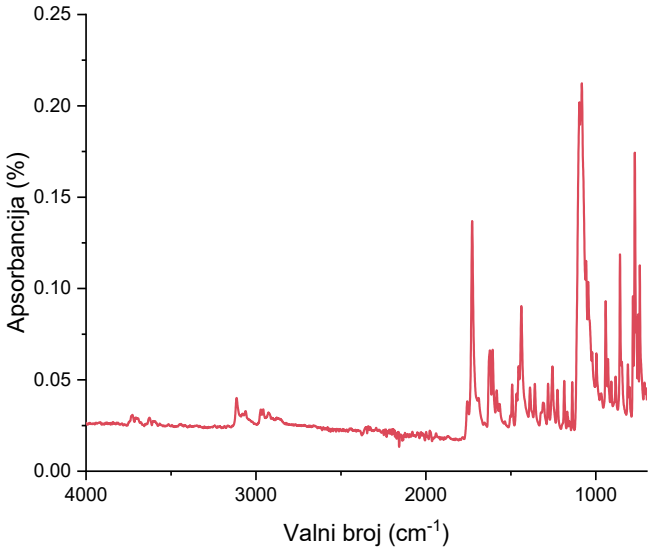
Slika 66. Spektar FTIR kompleksa **21**



Slika 67. Spektar FTIR kompleksa **22**



Slika 68. Spektar FTIR kompleksa **23**



Slika 69. Spektar FTIR kompleksa **24**

8. ŽIVOTOPIS

Marijana Buljubašić [redacted] Od 2003. do 2011. pohađala je Osnovnu školu Bariše Granića Meštra u Baškoj Vodi, nakon čega 2011. upisuje opću gimnaziju u Srednjoj školi fra Andrije Kačića Miošića u Makarskoj. Maturirala je 2016. godine s odličnim uspjehom te iste godine upisuje Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije (smjer Kemijsko inženjerstvo). Stručnu praksu u sklopu preddiplomskog studija odradila je na Institutu Ruđer Bošković u Laboratoriju za kemijsku i biološku kristalografiju. Završni rad radila je na Zavodu za organsku kemiju pod nazivom Sinteza i spektroskopska karakterizacija Schiffovih baza *N*-supstituiranih benzimidazola kao potencijalnih senzora za metalne katione i pH u otopinama pod mentorstvom dr. sc. Marijane Hranjec u sklopu projekta Istraživanje antioksidativnog djelovanja benzazolskog skeleta u dizajnu novih antitumorskih agenasa. Sa posterom na temu završnog rada 2022. godine sudjeluje na XIV. Susretu mladih kemijskih inženjera u Zagrebu (M. Fančović, M. Buljubašić, A. Beč, M. Hranjec. (2022). Sinteza i spektroskopska karakterizacija *N*-supstituiranih benzimidazola kao potencijalnih senzora za pH u vodenim otopinama, FKIT, postersko priopćenje).