SINTEZA TIOSEMIKARBAZIDA NA BAZI KUMARINA KAO POTENCIJALNIH ANTIOKSIDANSA

Tomić, Marinko

Master's thesis / Diplomski rad

2016

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, Department of biology / Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Odjel za biologiju**

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:181:473600

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-09-01**

ODJEL ZA BIOLOGIJU
Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku

Repository / Repozitorij:

Repository of Department of biology, Josip Juraj Strossmayer University of Osijek

zir.nsk.hr

dabar
DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJI

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU

ODJEL ZA BIOLOGIJU

Diplomski sveučilišni studij Biologija i kemija; smjer: nastavnički

Marinko Tomić

SINTEZA TIOSEMIKARBAZIDA NA BAZI KUMARINA KAO POTENCIJALNIH ANTIOKSIDANASA

Diplomski rad

OSIJEK, 2016.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku Odjel za biologiju
Diplomski rad
Diplomski sveučilišni studij Biologija i kemija; smjer: nastavnički
Znanstveno područje: Prirodne znanosti
Znanstveno polje: Kemija

SINTEZA TIOSEMIKARBAZIDA NA BAZI KUMARINA KAO POTENCIJALNIH ANTIOKSIDANASA

Marinko Tomić

Rad je izrađen na Zavodu za primijenjenu kemiju i ekologiju Prehrambeno-tehnološkog fakulteta te na Odjelu za biologiju Sveučilišta Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku.
Mentor: Dr. sc. Valentina Pavić, doc.
Komentor: Dr. sc. Maja Molnar, doc.

Kratak sažetak diplomskog rada

Tiosemikarbazidi su skupina organskih spojeva koji pokazuju široki spektar bioloških aktivnosti, uključujući antibakterijsku, antifungalnu, antimalarijsku, antitumorsku i antioksidacijsku aktivnost. U kombinaciji s kumarinima, koji su također biološki aktivni spojevi, tiosemikarbazidi pokazuju značajnu antioksidacijsku aktivnost. Osim zbog svoje biološke aktivnosti, tiosemikarbazidi su danas vrlo zastupljeni u organskoj sintezi kao prekursori različith heterocikličkih spojeva, kao što su oksadiazoli, tiadiazoli, triazoli i tiazolidinoni. U radu je ispitivana antioksidacijska aktivnost sintetiziranih tiosemikarbazida, a prema dobivenim rezultatima zaključeno je kako tiosemikarbazidi imaju dobru antioksidacijsku aktivnost.

Broj stranica: 72
Broj slika: 36
Broj tablica: 3
Broj literaturnih navoda: 132
Jezik izvornika: hrvatski
Ključne riječi: kumarin, tiosemikarbazid, antioksidacijska aktivnost, DPPH metoda
Datum obrane: 20. srpnja 2016.
Stručno povjerenstvo za obranu:

1. **Dr.sc.** Valentina Pavić, **doc.**
2. **Dr.sc.** Maja Molnar, **doc.**
3. **Dr.sc.** Enrih Merdić, **red. prof.**

Rad je pohranjen u: u knjižnici Odjela za biologiju Sveučilišta Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku i u Nacionalnoj i sveučilišnoj knjižnici u Zagrebu, u elektroničkom obliku, te je objavljen na web stranici Odjela za biologiju.

BASIC DOCUMENTATION CARD

University Josip Juraj Strossmayer in Osijek MS thesis Department of Biology
Graduate university study programme in Biology and Chemistry Education
Scientific Area: Natural science
Scientific Field: Chemistry

SYNTHESIS OF COUMARIN BASED THIOSEMICARBAZIDES AS POTENTIAL ANTIOXIDANTS

Marinko Tomić

Thesis performed at Department of Applied Chemistry and Ecology, Faculty of Food Technology and at Department of Biology, University of Josip Juraj Strossmayer Osijek.
Supervisor: Ph.D. Valentina Pavić, Assistant Professor
Co-supervisor: Ph.D. Maja Molnar, Assistant Professor

Short abstract
Thiosemicarbazides are a group of organic compounds that exhibit a wide range of biological activities including antibacterial, antifungal, antimalarial, antitumor and antioxidant activity. In combination with the coumarins, which are also biologically active compounds, thiosemicarbazide exhibit significant antioxidant activity. Except for their biological activity, thiosemicarbazides are nowadays highly represented in organic synthesis as precursors of different heterocyclic compounds, such as oxadiazoles, thiadiazoles, triazoles and thiazolidinones. This paper presents evaluation of antioxidant activity of newly synthesized thiosemicarbazides and according to the results it was concluded that thiosemicarbazides have good antioxidant activity.

Number of pages: 72
Number of figures: 36
Number of tables: 3
Number of references: 132
Original in: Croatian
Key words: coumarin, thiosemicarbazide, antioxidant activity, DPPH method
Date of the thesis defence: July 20, 2016
Reviewers:

1. **Ph.D.** Valentina Pavić, **Assistant Professor**
2. **Ph.D.** Maja Molnar, **Assistant Professor**
3. **Ph.D.** Enrih Merdić, **Full Professor**

Thesis deposited in: Library of Department of Biology, University of J.J. Strossmayer Osijek and in National and University Library in Zagreb in electronic form. It is also disposable on the web site of Departmetnt of Biology, University of J.J. Strossmayer Osijek.

Zahvaljujem doc. dr. sc. Valentini Pavić koja je prepoznala moju zainteresiranost prema organskoj kemiji te mi omogućila izradu ovoga diplomskoga rada.

Zahvaljujem doc. dr. sc. Maji Molnar koja me uvela u svijet organske sinteze te što je cijelo vrijeme nesebično dijelila svoja znanja i vještine.

Zahvaljujem i svojim roditeljima koji su mi omogućili školovanje te prijateljima i kolegama koji su mi bili podrška i potpora sve ove godine studiranja.

SADRŽAJ

1. UVOD 1
1.1. Kumarini 1
1.1.1. Struktura i upotreba kumarina 1
1.1.2. Podjela kumarina 4
1.1.3. Derivati kumarina 5
1.1.4. Biološka aktivnost kumarina 10
1.1.5. Dobivanje kumarina 14
1.1.5.1. Biosinteza kumarina u biljkama 14
1.1.5.2. Kemijska sinteza kumarina 15
1.2. 7-Hidroksikumarin-4-octena kiselina 18
1.2.1. Hidrazidi karboksilnih kiselina 18
1.2.1.1. Dobivanje hidrazida 18
1.2.1.2. Svojstva i primjena hidrazida 19
1.3. Tiosemikarbazidi 20
1.3.1. Struktura i upotreba tiosemikarbazida 20
1.3.2. Sinteza tiosemikarbazida 21
1.3.3. Upotreba tiosemikarbazida 23
1.3.4. Biološka aktivnost tiosemikarbazida 26
1.4. Antioksidacijsko djelovanje 28
1.4.1. Oksidacijski stres 28
1.4.2. Antioksidansi i slobodni radikali 29
1.4.3. Metode određivanja antioksidacijske aktivnosti 31
1.4.3.1. DPPH (2,2-Difenil-pikrilhidrazil) metoda 32
1.4.3.2. Fosfomolibden metoda 33
1.5. Cilj i svrha rada 34
2. MATERIJALI I METODE 35
2.1. Opći podaci 35
2.2. Shematski prikaz zadatka 36
2.3. Metode 38
2.3.1. Sinteza tiosemikarbazida 38
2.3.1.1. Sinteza (7-hidroksi -2-okso-*2H*-kromen-4-il) octene kiselin 38
2.3.1.2. Sinteza metil (7-hidroksi-2-okso-2H-kromen-4-il) acetata 39

2.3.1.3. Sinteza 2-(7-hidroksi-2-okso-2*H*-1-benzopiran-4-il) acetohidrazida na bazi (7-hidroksi-2-okso-2*H*-kromen-4-il) octene kiseline 39
2.3.1.4. Sinteza 2-(2-(7-hidroksi-2-okso-2*H*-kromen-4-il)acetil)-*N*-supstituiranih- hidrazin-1-karbotioamida na bazi 2-(7-hidroksi-2-okso-2*H*-1-benzopiran-4-il) acetohidrazida 40
2.3.1.5. Sinteza etil [(4-metil-2-okso-2*H*-1-benzopiran-7-il)oksi]acetata (4-metil-2-okso-*2H*-kromen-7-iloksi) octene kiseline 40
2.3.1.6. Sinteza 2-[(4-metil-2-okso-2*H*-1-benzopiran-7-il)oksi] acetohidrazida (4-metil -2-okso-*2H*-kromen-7-iloksi) octene kiseline 41
2.3.1.7. Sinteza *N*-supstituiranih-2-{[(4-metil-2-okso-2*H*-kromen-7-il)oksi]acetil}hidrazin-1-karbotioamida (4-metil-2-okso-*2H*-kromen-7-iloksi) octene kiseline 41
2.3.2. Ispitivanje antioksidacijske aktivnosti 43
2.3.2.1. DPPH metoda 43
3. REZULTATI 44
3.1. Sintetizirani spojevi 44
3.1.1. 2-[(7-hidroksi-2-okso-2*H*-1-benzopiran-4-il)acetil]-*N*-metilhidrazin-1 karbotioamid (7a) 44
3.1.2. *N*-etil-2-[(7-hidroksi-2-okso-2*H*-1-benzopiran-4-il)acetil]hidrazin-1-karbotioamid (7b) 44
3.1.3. 2-[(7-hidroksi-2-okso-2*H*-1-benzopiran-4-il)acetil]-*N*-fenilhidrazin-1-karbotioamid (7c) 45
3.1.4. 2-[(7-hidroksi-2-okso-2*H*-1-benzopiran-4-il)acetil]-*N*-[(2,4,6 triklorofenil)metil]hidrazin-1-karbotioamid (7d) 45
3.1.5. 2-[(7-hidroksi-2-okso-2*H*-1-benzopiran-4-il)acetil]-*N*-(4-metilfenil)hidrazin-1-karbotioamid (7e) 45
3.1.6. 2-[(7-hidroksi-2-okso-2*H*-1-benzopiran-4-il)acetil]-*N*-(4-metoksifenil)hidrazin-1-karbotioamid (7f) 46
3.1.7. *N*-(4-bromofenil)-2-[(7-hidroksi-2-okso-2*H*-1-benzopiran-4-il)acetil]hidrazin-1-karbotioamid (7g) 46
3.1.8. *N*-metil-2-{[(4-metil-2-okso-2*H*-1-benzopiran-7-il)oksi]acetil}hidrazin-1-karbotioamid (5a) 47

3.1.9. *N*-etil-2-{[(4-metil-2-okso-2*H*-1-benzopiran-7-il)oksi]acetil}hidrazin-1-karbotioamid (5b) 47
3.1.10. 2-{[(4-metil-2-okso-2*H*-1-benzopiran-7-il)oxy]acetil}-*N*-fenilhidrazin-1-karbotioamid (5c) 47
3.1.11. 2-{[(4-metil-2-okso-2*H*-1-benzopiran-7-il)oksi]acetil}-*N*-(2,4,6-triklorofenil)hidrazin-1-karbotioamid (5d) 48
3.1.12. *N*-(4-metoksifenil)-2-{[(4-metil-2-okso-2*H*-1-benzopiran-7-il)oksi]acetil}hidrazin-1-karbotioamid (5e) 48
3.1.13. *N*-(4-klorofenil)-2-{[(4-metil-2-okso-2*H*-1-benzopiran-7-il)oksi]acetil}hidrazin-1-karbotioamid (5f) 48
3.2. Antioksidacijska aktivnost 49
4. RASPRAVA 50
4.1. Sinteza tiosemikarbazida 50
4.2. Antioksidacijska aktivnost 51
5. ZAKLJUČAK 54
6. METODIČKI DIO 55
7. LITERATURA 61

Popis oznaka, kratica i simbola

AA	*ascorbic acid* (askorbinska kiselina)
BHT	butilirani hidroksitoluen
DMSO	dimetilsulfoksid
DPPH	difenilprikrilhidrazil
HAT	*hydrogen atom transfer* (prijenos vodikovog atoma)
IUPAC	*International Union of Pure and Applied Chemistry* (Međunarodna unija za čistu i primijenjenu kemiju)
MAO	monoaminooksidaza
MS	maseni spektar
PTSC	poli-tiosemikarbazidi
R_f	faktor zaostajanja
RNS	*reactive nitrogen species* (reaktivne dušikove vrste)
ROS	*reactive oxygen species* (reaktivne kisikove vrste)
TLC	*thin-layer chromatography* (tankoslojna kromatografija)
TSC	*thiosemicarbazide* (tiosemikarbazid)
T_t	točka tališta

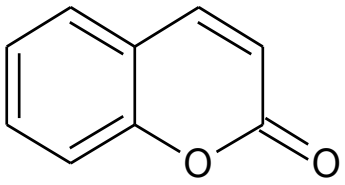
1. UVOD

1. UVOD

1.1. Kumarini

1.1.1. Struktura i upotreba kumarina

Kumarin (2*H*-1-benzopiran-2-on) i njegovi derivati su heterociklički spojevi s benzopironskom jezgrom, a sastoje se od benzenskog prstena kondenziranog s pironskim prstenom, dok se u prirodi nalaze i u kombinaciji s glikozidima (Kosuge i Conn, 1961) (Slika 1.). Zajedno s flavonoidima pripada velikoj skupini biološki aktivnih spojeva-benzopironima. Na sobnoj je temperaturi u obliku bijele kristalne tvari s točkom tališta 68-71 ºC (Rodrigues i sur., 2008), opće formule $C_9H_6O_2$. Topljiv je u organskim otapalima kao što su etanol, kloroform, dietileter i u uljima, ali je slabo topljiv u vodi (Lake, 1999). Kumarin karakterizira ugodan miris koji podsjeća na vaniliju, dok ga pojedini autori opisuju kao miris svježe pokošenog sijena (Liu i sur., 2010).



Slika 1. Struktura kumarina

Zahvaljujući svojoj raznolikosti i različitim svojstvima, kumarini su predmet brojnih svjetskih istraživanja. Posebno su značajni zbog izrazite biološke aktivnosti kao što je antioksidacijska, antibakterijska i antikancerogena aktivnost te brojne druge. Današnja farmaceutska industrija pokušava istražiti, a potom pomoću raznih metoda i sintetizirati brojne derivate kumarina zbog potencijalno pozitivnih svojstava na čovjekovo zdravlje. Koriste se kao antikoagulansi (Cravotto i sur., 2001), aditivi u prehrambenoj i kozmetičkoj industriji te u proizvodnji insekticida (O'Kennedy i Zhorenes, 1997). Kumarin je potentni rodenticid, štakori i drugi glodavci ga metaboliziraju do 3,4- kumarin epoksida koji je toksičan i izaziva unutarnje krvarenje te naposlijetku i uginuće. Ljudski ga organizam metabolizira do 7-hidroksikumarina koji je manje toksičan (Raters i Matissek, 2008).

Zbog svojih organoleptičkih svojstava kumarin je omiljen dodatak duhanskim aromama, a kao dodatak koristi se i u pastama za zube, sapunima, parfemima, ali i nekim alkoholnim pićima (Lake, 1999) te se koristi kao zaslađivač, pojačivač prirodnih ulja kao kod lavande te kao dodatak hrani u kombinaciji s vanilinom (Tyagi i sur., 2005). Velike količine se koriste kao dodaci gumi i plastičnim materijalima, kao i u bojama i sprejevima za neutralizaciju neugodnih mirisa (Lake, 1999).

Kumarini su spojevi široko zastupljeni u biljkama (tzv. sekundarni metaboliti) poput jagode, gospine trave, marelice, višnje, cimetovca, slatke djeteline i u brojnim drugim (Aslam i sur., 2010). U prirodi se najčešće pronalaze u biljkama iz porodica *Rutaceae* i *Umbelliferae* (Lacy i OKennedy, 2004). U prirodi je nađeno oko 500 spojeva, jednostavnih derivata kumarina koji se uglavnom nalaze u slobodnom obliku te vrlo mali broj u formi glikozida (Tamehareon i sur., 1987). Posebno visoka koncentracija kumarina zabilježena je u biljci lazarkinji (*Galium odoratum* L., *Rubiaceae*), datuljama (*Phoenix dactylifera* L., *Arecaceae*), bizonskoj travi *(Hierochloe odorata* L., *Poaceae*) te u cimetu (*Cinnamomum sp., Lauraceae*) (Liu i sur., 2010). Također, mogu biti i produkti metabolizma životinja ili se dobivaju sintetskim putem (Vogel,1820).

a)

b)

Slika 2. Prirodni izvori kumarina: a) lazarkinja (*Galium odoratum* L.) (web 1).; b) cimetovac (*Cinnamomum sp.)* (web 2).

Osim toga, kumarine nalazimo u većoj količini u nekim eteričnim uljima, osobito u ulju cimeta (7 000 ppm), ulju lista kineskog cimeta (kasije) (do 87 300 ppm)

(Lacy i OKennedy, 2004) te u različitim vrstama lavandinog (*Lavandula latifolia, Lavandula stoechas, Lavandula angustifolia)* (Guyot-Declerck i sur., 2002; Shimizu i sur., 1990) ulja.

Prvi put kumarin je izolirao A. Vogel još davne 1820. godine u Münchenu, iz plodova tropskog stabla nazvanog tonka-grah (eng. *tonka bean*), *Dypteryx odorata* Willd., porodica mahunarki (*Fabaceae*) (Vogel, 1820). Naziv je dobio prema lokalnoj karipskoj riječi „*kumarú*" što je naziv za drvo na jeziku južnoameričkih indijanaca iz Francuske Gvajane (Ojala, 2001). Kumarinski derivati pronađeni su u različitim dijelovima biljaka, najčešće u korijenu i kori, a rjeđe u stablu i lišću. Sadržaj ovih spojeva u različitim biljkama varira od 0,2 do 10 %, a u jednoj se biljci može pronaći i više tipova kumarinskih spojeva (Kuznecova, 1967).

Znanstvena su istraživanja pokazala da već vrlo male doze kumarina mogu značajno oštetiti jetra i bubrege (Vogel, 1820), posebno kod osjetljivih ljudi. Stoga, zbog moguće opasnosti po zdravlje, udio kumarina u hrani i zakonski je ograničen. Njegova koncentracija u prehrambenim proizvodima, u koje može dospjeti kao prirodna sastavnica nekih prirodnih aroma i biljnih ekstrakata, ograničena je na maksimalnih 2 mg/kg.

Tablica 1. Osnovna fizikalno-kemijska svojstva kumarina

KUMARIN	
Kemijski naziv (IUPAC)	2*H*-1-benzopiran-2-*on*
Kemijska formula	$C_9H_6O_2$
Molarna masa	
Točka tališta	71 ºC
Točka vrelišta	301 ºC
Gustoća	0,935 g/cm^3
Agregatno stanje	bezbojni prah
Topljivost	1,7 g/l (TH_2O = 20 ºC)
LD_{50}	293 mg/kg (štakori)

1.1.2. Podjela kumarina

Prema prisutnim supstituentima kumarini se mogu podijeliti na sljedeće grupe:

1. kumarini, hidroksikumarini i glikozidi kumarina (melilotozid)
2. hidroksi-, metoksi- (aloksi-) i metilenhidroksikumarini s:

    a) hidroksilnim ili alkoksilnim skupinama na benzenskom prstenu

    b) hidroksilnim ili alkoksilnim skupinama na *α*-pironskom prstenu

    c) hidroksi ili metoksikumarini alkilirani u benzenskom ili pironskom prstenu

3. furokumarini ili kumaron-*α*-pironi koji sadrže supstituente u benzenskom, furanskom ili pironskom prstenu

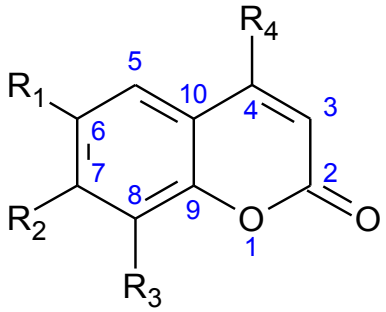
    a) derivati psoralena, tj. furokumarini kod kojih je furanska jezgra kondenzirana s kumarinom u položaju 6,7

    b) derivati angelicina, tj. furokumarini kod kojih je furanska jezgra s kumarinom u položaju 7,8

4. piranokumarini ili kromeno-*α*-pironi koji sadrže prsten 2,2-dimetilpirana, kondenziran s kumarinom u položaju 5,6 ili položaju 7,8, a sami mogu biti supstituirani u benzenskom prstenu ili nekoj od heterocikličkih jezgara
5. 3,4-benzokumarini
6. kumarini s benzofuranskim prstenom kondenziranim s kumarinom u položaju 3,4 (kumestrol)
7. složeniji spojevi u kojima dolazi kumarinski sustav (aflatoksini, novobiocin)

1.1.3. Derivati kumarina

S obzirom da na kumarinskom prstenu postoji 6 položaja na kojima se može vršiti supstitucija, poznato je mnoštvo različitih derivata kumarina (Slika 3.), bilo sintetičkih ili prirodnih, a takva strukturna raznolikost za posljedicu ima obilje različitih bioloških aktivnosti. Neki derivati kumarina su iz skupina tiosemikarbazida, tiazolidinona, Schiffovih baza, čalkona, pirazolina te tiazolidindiona. Prisutnost kumarinskih derivata u biljkama vrlo je učestala, a mnoge od tih biljaka upotrebljavaju se u tradicionalnoj medicini još od davnina (Ćavar i sur., 2009; Mata i sur. 1987).



Slika 3. Struktura nekih derivata kumarina

I) Herniarin R_1,R_3,R_4 = H, R_2 = OCH_3; **II) Eskuletin** R_1,R_2 = OH, R_3,R_4 = H; **III) Eskulin** R_1 = 6-glukozid, R_2 = OH, R_3,R_4 = H; **IV) Skopoletin** R_1 = OCH_3, R_2 = OH, R_3,R_4 = H; **V) Izoskopoletin** R_1 = OH, R_2 = OCH_3, R_3, R_4 = H; **VI) Umbeliferon** R_1,R_3,R_4 = H, R_2 = OH; **VII) Dihidrokumarin** R_1,R_2,R_3,R_4 = H; **VIII) 8-OAc-6-hidroksi-7-metoksi-4-metilokumarin** R_1 = OH, R_2 = OCH3, R3 = $COOCH_3$, R_4 = CH_3 (Zolek i sur., 2003)

Derivati kumarina koji se vrlo često javljaju u prirodi su umbeliferon (7-hidroksikumarin), eskuletin (6,7-dihidroksikumarin), herniarin (7-metoksikumarin), psoralen i imperatorin (Molnar, 2011).

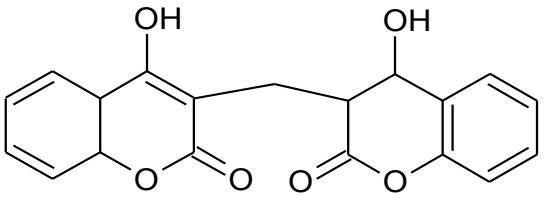
Uloga kumarina i njihovih derivata uistinu je raznolika. Neki inhibiraju rast, drugi pak stimuliraju klijanje sjemenja, a neki djeluju kao narkotici, sedativi i hipnotici. Fraksin, jedan od derivata kumarina uzrokuje paralizu centralnog živčanog sustava u žaba i miševa (Tohoku, 1935).

Dikumarol je derivat kumarina koji je strukturom sličan vitaminu K, a nalazi se u pokvarenoj djetelini i uzrokuje smrtonosna krvarenja stoke koja se njome hrani jer

inhibira produkciju vitamina K koji je važan kofator u sintezi različitih faktora zgrušavanja (faktor zgrušavanja II, VII, IX, X). Taj derivat kumarina upotrebljava se u medicini kao antikoagulans za sprječavanje tromboze u bolesnika sklonih stvaranju ugrušaka.

Dikumarol (Slika 4.) i srodni derivati, antagonisti vitamina K, poput varfarina, djelotvorni su otrovi za štakore. Krave koje jedu dikumarol imaju nenormalan protrombin koji, za razliku od normalnog, ne veže Ca^{2+} ione. Ta je razlika neko vrijeme bila zagonetna jer nenormalni protrombin ima isti broj aminokiselinskih ostataka, a rezultati analize aminokiselina nakon kisele hidrolize jednaki su kao i za nenormalni protrombin. Razgradnjom normalnog protrombina otkrilo se da molekula veže Ca^{2+} ione svojim *N*-terminalnim dijelom. Tada je pronađeno da je *N*-terminalni peptid nenormalnog protrombina bitno drukčije elektroforetski pokretljiv od analognog peptida iz normalne molekule. Istraživanja tih peptida nuklearnom magnetskom rezonancijom pokazala su da normalni protrombin sadrži dotad nepoznatu aminokiselinu γ-karboksiglutamat, a da nenormalnom protrombinu ta preinačena aminokiselina nedostaje. Naime, prvih deset ostataka glutamata u *N*-terminalnom području protrombina se karboksilira u γ-karboksiglutamat enzimskim sustavom koji ovisi o vitaminu K. Ta preinačena aminokiselina ostala je nezapažena dugo jer se γ-karboksi skupina gubi pri kiseloj hidrolizi dajući glutamat (Stryer, 1991).

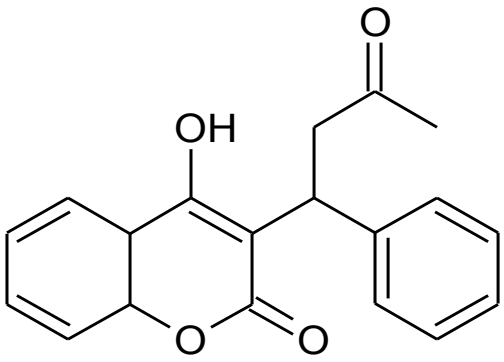
Dikumarol se koristi kod pojave krvnih ugrušaka i u oftalmologiji kod liječenja povišenog očnog tlaka (glaukoma) gdje svojim antikoagulativnim djelovanjem poboljšava cirkulaciju u kapilarama mrežnice (Horpurgo i Vallerio, 1951).



Slika 4. Struktura dikumarola

Još jedan antikoagulans s kumarinskom jezgrom je i varfarin ili 4-hidroksi-3-(3-okso-1-fenilbutil)-2*H*-kromen-2-on (Slika 5.) koji spada u skupinu 4-hidroksikumarina. Varfarin je prvobitno korišten kao otrov za štakore, ali su ga s vremenom zamijenili

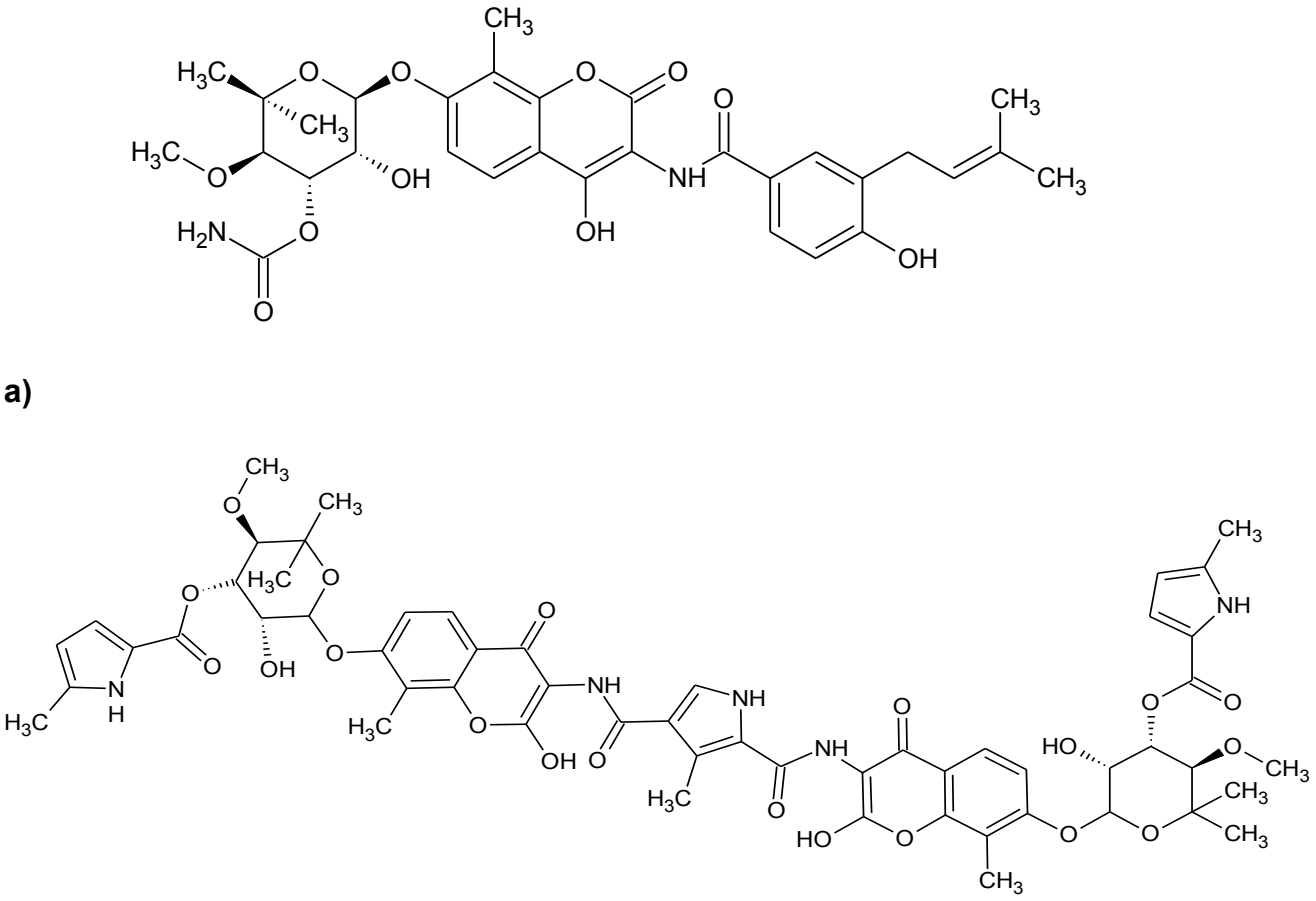
učinkovitiji i brži otrovi (Borges i sur., 2005). Prema djelovanju spada među antagoniste vitamina K, (*E*)-2-metil-3-(3,7,11,15-tetrametilheksadek-2-enil) naftalen-1,4-dion, koji je neophodan za normalnu sintezu faktora zgrušavanja II, VII, IX i X. Namirnice koje sadrže vitamin K (špinat, brokula, cvjetača) mogu stupiti u interakcije s varfarinom i smanjiti antikoagulativni učinak.



Slika 5. Struktura varfarina

Derivati kumarina s većim brojem hidroksilnih skupina pokazuju puno veću bakteriostatsku aktivnost od monohidroksikumarina. Antibiotik novobiocin (Slika 6a.) (5-hidroksi-6-(4-hidroksi-3-(4-hidroksi-3-(3-metilbut-2-enil)benzamid)-8-metil-2-okso-2*H*-kromen-7-iloksi)-3-metoksi-2,2-dimetil-tetrahidro-2*H*-piran-4-il karbamat), derivat 4,7-dihidroksi-8-metil kumarina, izoliran je 1957. godine iz bakterija *Streptomyces niveus* i *S. sphaeroides*. Primjenjuje se kao antibiotik za rezistentne stafilokoke (Trkovnik, 1970), ali su ga potisnuli penicilini otporni na penicilinazu koji imaju širi antibakterijski spektar (Kazcka i sur., 1956). Novobiocin se nekada koristio za liječenje tuberkuloze (Karah i sur., 2000), a poznato je da inhibira sintezu RNA.

Metabolički produkt bakterije *Streptomyces rishiriensis* je novije korišteni antibiotik kumermicin (Slika 6b.), slična sastava novobiocinu (Kawaguchi i sur., 1965).



a)

b)

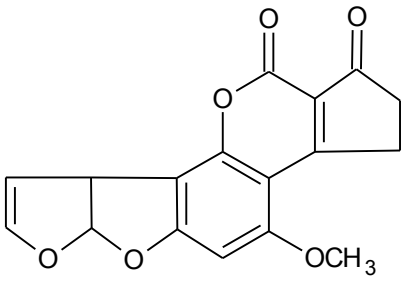
Slika 6. Struktura novobiocina (a) i kumermicina (b)

Dosta zanimljivi derivati su heterocikliči spojevi kumarina kondenzirani u položaju 3,4-kumarinskog sustava zbog svog utjecaja na biokemijske reakcije u pojedinim organizmima. Imaju dikumarinsku strukturu s kondenziranim ciklopentenom (aflatoksini B i M) ili s kondenziranim laktonom (aflatoksini G) (Butler, 1974). Nazivaju se aflatoksini (Slika 7.) te su produkt metabolizma nekih rodova plijesni (*Aspergillus flavus* i *Aspergillus parasiticus*) koje imaju kancerogeno djelovanje (Eaton i sur., 1994).

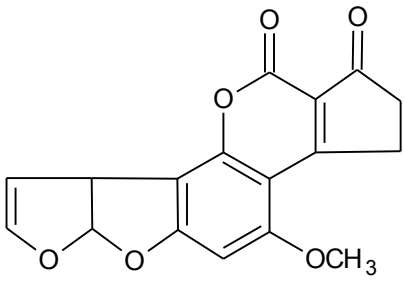
Ove se plijesni pojavljuju na uskladištenom kukuruzu, žitu i kikirikiju. Aflatoksini su lipofilni, termostabilni spojevi koji spadaju u skupinu mikotoksina. Osjetljivi su na UV-svjetlo pod kojim pokazuju karakterističnu plavu ili zelenu fluorescenciju prema kojoj su i dobili ime (B – blue → plava fluorescencija; G – green

→ zelena fluorescencija). Ljudi se mogu zaraziti direktno, konzumiranjem hrane kontaminirane navedenim plijesnima ili indirektno, konzumiranjem mlijeka životinja koje su hranjene plijesnivim krmivom. Osim u mlijeku, aflatoksini se mogu naći i u urinu i fekalijama (Mykkäneni sur., 2005). Aflatoksini mlijeka (M_1 i M_2) su hidroksilirani derivati aflatoksina B_1 i B_2. Izrazitu kancerogenost ima aflatoksin B_1, dok su aflatoksini G_1, B_2, M_1 slabije kancerogeni, a G_2 i M_2 nemaju dokazanu kancerogenost (De Long i sur., 1964).

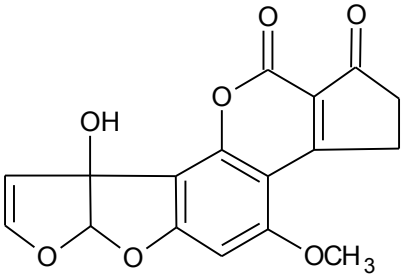
Mehanizam djelovanja aflatoksina zasniva se na inhibiciji proteina nukleinskih kiselina, važnih strukturnih biomolekula jer inhibiraju RNA polimerazu. Izrazita toksičnost i mutageno djelovanje posljedica su dvostruke veze u furanskom prstenu.



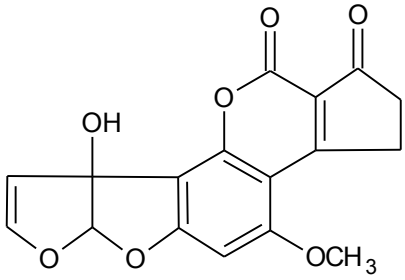
Aflatoksin B_1



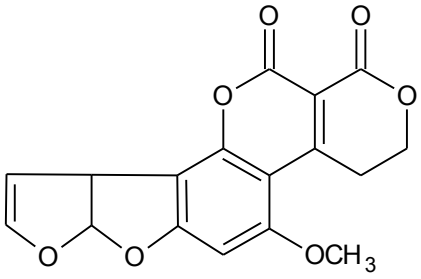
Aflatoksin B_2



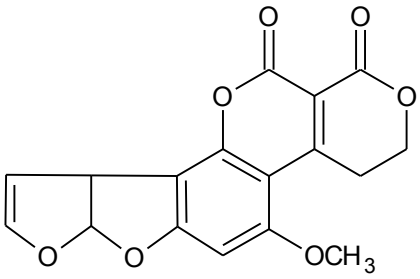
Aflatoksin M_1



Aflatoksin M_2



Aflatoksin G_1



Aflatoksin G_2

Slika 7. Struktura aflatoksina

1.1.4. Biološka aktivnost kumarina

Kumarini su, poput drugih flavonoida i polifenolnih spojeva, snažni antioksidansi kako u hidrofilnom, tako i u lipofilnom okolišu (Alves i sur., 1993). Osim što je dobar antioksidans, kumarin je inhibitor enzima te prekursor nekih toksičnih supstanci. Biljni ekstrakti koji sadrže derivate kumarina još se i danas primjenjuju u tradicionalnoj medicini.

Kumarini su vrlo aktivni spojevi pa tako oni s fenolnim hidroksilnim skupinama pokazuju sposobnost hvatanja slobodnih radikala (Čačić i Molnar, 2010a; Čačić i sur., 2010b; Čačić i sur., 2011), osobito reaktivnih kisikovih vrsta (Dighe i sur., 2010; Kalkambar, 2011) i često se koriste kao inhibitori ciklooksigenaze i lipoksigenaze u upalnom ciklusu (Kalkhambkar, 2011). Mnoštvo kumarina utječe na formaciju i hvatanje reaktivnih kisikovih (ROS) i dušikovih vrsta (RNS) i na taj način djeluju kao antioksidansi, što uključuje niz različitih molekularnih djelovanja i vjerojatno je povezano s njihovom strukturnom sličnošću s flavonoidima i benzofenonima (Ćavar i sur., 2009). 7-hidroksikumarin (umbeliferon) je snažan antioksidans koji spada u skupinu prirodnih kumarina, a pronalazimo ga u voću i povrću (Farshori i sur., 2011). Poznato je da ima antikancerogenu aktivnost (Kofinas i sur., 1998) te je inhibitor aldoza reduktaze (Okada i sur, 1995) i ksantin oksidaze (Mills i Bone 2000).

Kumarin i njegovi derivati su diljem svijeta prihvaćeni kao korisni lijekovi s brojnim biološkim ulogama (Bruhimann i sur., 2001) (Tablica 2.). Snažni su antikoagulansi (Buzariashvili i sur., 2003), antibiotici (novobiocin i njegovi analozi) (Chatterjea i sur.,1986), te imaju ulogu i u borbi protiv AIDS-a (Chavan, 2006; Kostova, 2005). Neki od njih mogu uzrokovati značajne promjene u regulaciji imunološkog odgovora, rastu stanica i diferencijaciji (Lacy i O'Kennedy, 2004). Njihova biološka svojstva povezana su s postojanjem laktonskog prstena, dvostruke veze u 3,4-položaju te različitim karakterom i položajem supstituenata. Tako se u sastavu poznatog antiinflamatornog, antipiretičkog i analgetskog lijeka diklofenaka nalazi kumarin.

Uistinu je širok raspon bioloških uloga kumarina te uopće ne iznenađuje zainteresiranost istraživanja ovoga područja. Zanimljivo je pak da su gotovo svi derivati kumarina biološki djelatni, tj. imaju mnogobrojne korisne funkcije. Brojni derivati kumarina djeluju na neke skupine enzima kao što su integraze, monoaminooksidaze (MAO), humane leukocit elastaze i HIV proteaze (Charitos i sur., 2001).

Zacijelo jedna od najvažnijih uloga kumarina jest njihova antikancerogena aktivnost (Bourinbaiar i sur., 1993) koja je dugo vremena bila nepoznata. Kumarin i 7-hidroksikumarin inhibiraju proliferaciju mnoštva humanih staničnih linija *in vitro* te se zajedno s ostalim metabolitima pokazao kao inhibitor stanične proliferacije kod

stanica želučanog karcinoma, a već je potvrđena njegova aktivnost protiv raka prostate, malignog melanoma i metastatskog renalnog staničnog karcinoma (Kostova, 2005).

Tablica 2. Biološko djelovanje kumarina i njihovih derivata (Molnar i Čačić, 2011)

Biološko djelovanje	**Izvor**
Antiinflamatorno djelovanje, *in vitro* i *in vivo*	(Ojala, 2001; O'Keneddy i Thornes, 1997; Sardari i sur., 2000; Silvan i sur., 1996)
Analgetsko djelovanje	(O'Keneddy i Thornes,1997)
Antifungalna aktivnost	(Sardari i sur., 1999; Farshori i sur., 2011)
Antiaritmičko djelovanje	(Sardari i sur., 2000)
Antihelmintska aktivnost	(O'Keneddy i Thornes, 1997)
Antihipertenzijska aktivnost	(Pandey i sur., 2004)
Antikancerogeno djelovanje	(Manojkumar i sur., 2009; Ojala, 2001)
Antikoagulacijsko djelovanje	(Kostova i sur., 2005; Ojala, 2001)
Antileukemijsko djelovanje	(Kotali i sur., 2008)
Antimalarijska aktivnost, *in vivo* i *in vitro*	(Ojala, 2001)
Antimikrobna aktivnost	(Kwon i sur., 1997; Ojala, 2001; Mohareb i sur., 2009;O'Keneddy i Thornes, 1997)
Antioksidacijska svojstva	(Čačić i Molnar, 2010a; Čačić i sur., 2010b; Čačić i sur., 2011)
Antipiretičko djelovanje	(O'Keneddy i Thornes, 1997)
Antiviralna aktivnost, *in vitro*	(Ojala, 2001; Pandey i sur., 2004)
Citostatički efekt, *in vivo*	(Ojala, 2001)
Diuretičko djelovanje	(O'Keneddy i Thornes, 1997)
Estrogensko djelovanje	(O'Keneddy i Thornes, 1997)
Hipnotički učinak	(O'Keneddy i Thornes, 1997)
Hipotermalno djelovanje	(O'Keneddy i Thornes, 1997)
Hipolipidemičko djelovanje	(Huang i sur., 1993)
Imunostimulacijsko djelovanje	(Sardari i sur., 2000)

Imunosupresivno djelovanje	(Sardari i sur., 2000)
Inhibicija gonadotropina	(Sardari i sur., 2000)
Inhibicija aldoza reduktaze u leći	(Okada i sur., 1995)
Inhibicija otpuštanja histamina	(Sardari i sur., 2000)
Inhibicija LDL oksidacije	(Natella i sur., 2010)
Inhibicija lipidne peroksidacije	(Roussaki i sur., 2010; Yun i sur., 2001)
Inhibicija DNA-giraze	(Sardari i sur., 2000)
Inhibicija enzimske aktivnosti u jetri, *in vitro*	(Ojala, 2001)
Inhibicija monoamin oksidaze, *in vitro*	(Ojala, 2001)
Inhibicija protein kinaze, *in vitro*	(Yang i sur., 1999)
Fotosenzibilizirajuća aktivnost, *in vivo*	(Ojala, 2001)
Kalcij antagonistička aktivnost, *in vitro* i *in vivo*	(Ojala, 2001; Sardari i sur., 2000; Abyshev i sur., 2006)
Koleretički učinak	(O'Keneddy i Thornes, 1997)
Narkotički učinak	(O'Keneddy i Thornes, 1997)
Regulacija rasta biljaka	(O'Keneddy i Thornes, 1997)
Smanjenje lomljivosti kapilara	(Sardari i sur., 2000)
Spazmolitička aktivnost	(O'Keneddy i Thornes, 1997)
Sprječavanje zubnog karijesa	(Sardari i sur., 2000)
Stimulacija respiracije	(O'Keneddy i Thornes, 1997)
Trovanje ribe	(Sardari i sur., 2000)
Tretiranje psorijaze	(Sardari i sur., 2000)
Tuberkulostatska aktivnost	(O'Keneddy i Thornes, 1997)
Urikozurično djelovanje	(O'Keneddy i Thornes, 1997)
Vazodilatacijski učinak	(O'Keneddy i Thornes, 1997)
Zaštita endotela	(O'Keneddy i Thornes, 1997)

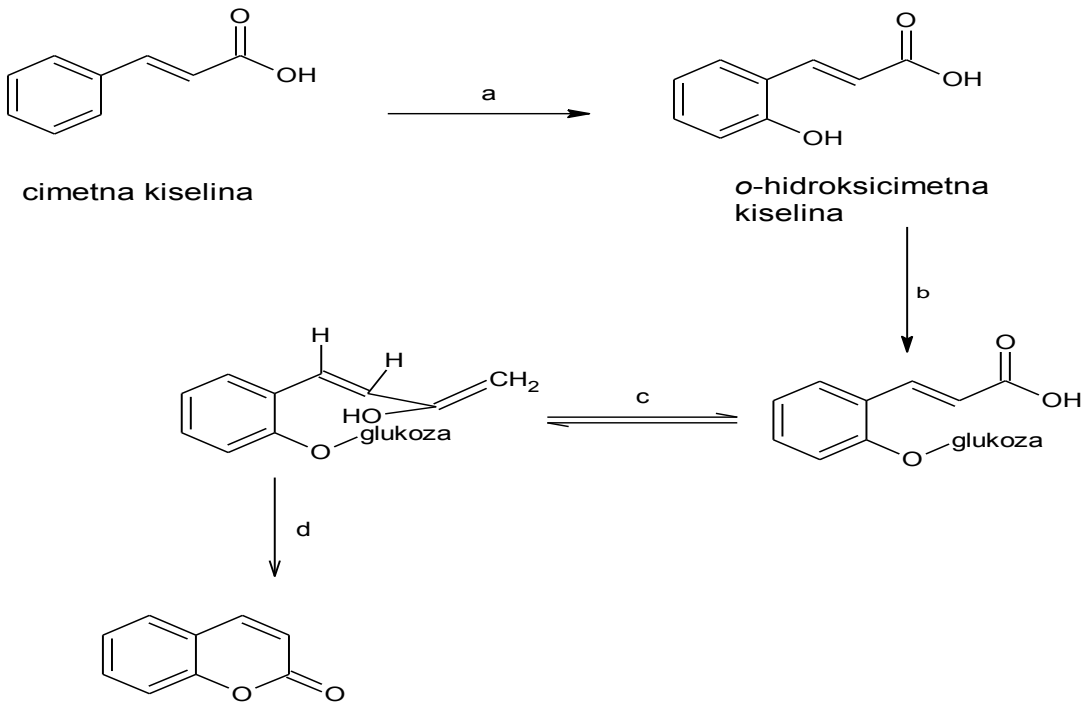
1.1.5. Dobivanje kumarina

1.1.5.1. Biosinteza kumarina u biljkama

Biosinteza kumarina specifična je za neka tkiva biljaka te se regulira tijekom razvoja. Inducira se kao odgovor na mnoštvo biotičkih i abiotičkih stresova, nedostatak nutrijenata i kemijske signale kao što su biljni hormoni i metaboliti, kao i ksenobiotici (Cabello-Hurtado i sur., 1998).

Mnogo je hipoteza o nastanku kumarina i njegovih derivata u biljkama. Međutim, danas je poznato da jezgra jednostavnih kumarina nastaje iz cimetne kiseline čija se sinteza odvija po šikimatnom putu iz ugljikovodika ili pak spajanjem acetatnih jedinica (Slika 8.).

Prvo se odvija hidroksilacija benzenske jezgre u *orto*- položaju **(a)**, zatim se na kisik veže glukoza u *orto*- položaju **(b)** te dolazi do izomerizacije dvostruke veze bočnog lanca pomoću enzima izomeraze **(c)**. Ovim postupkom nastaje *o*-kumarinska kiselina na koju je vezana glukoza. Otcjepljenjem glukoze i laktonizacijom dolazi do zatvaranja pironskog prstena i nastanka kumarina **(d)**. Ovdje je glukoza prijenosna grupa koja pomaže pri *cis*-trans izomeriji.



Slika 8. Biosinteza kumarina u biljkama

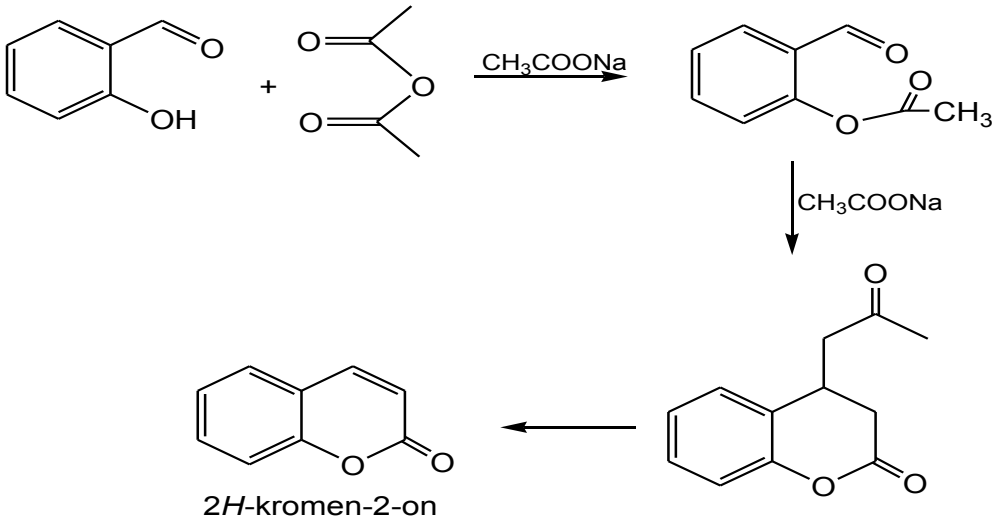
1.1.5.2. Kemijska sinteza kumarina

Povijest sintezekumarina seže do sredine 19. stoljeća kada je Perkin prvi puta sintetizirao kumarin, a reakcija i danas nosi njegovo ime.

Kumarini se mogu sintetizirati Perkinovom, Pechmannovom ili Knoevenagelovom reakcijom, kao i Wittigovom, Kostanecki-Robinsonovom i Reformatskyjevom reakcijom (Borges i sur., 2005).

Perkinova sinteza

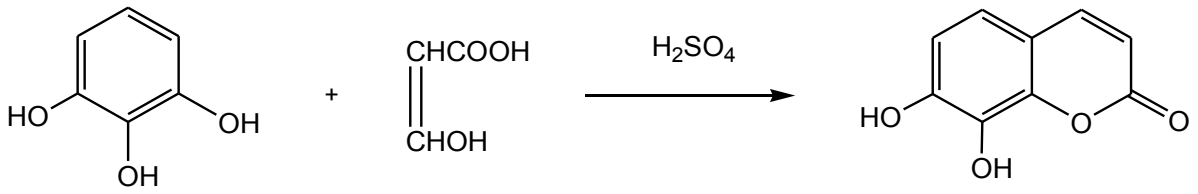
Perkinova reakcija (Slika 9.) podrazumijeva sintezu kumarina aldolnom kondenzacijom aromatskog *o*-hidroksibenzaldehida i anhidrida kiselina u prisutnosti alkalne soli ili kiseline (Borges i sur., 2005).



Slika 9. Perkinova sinteza

Pechmannova kondenzacija

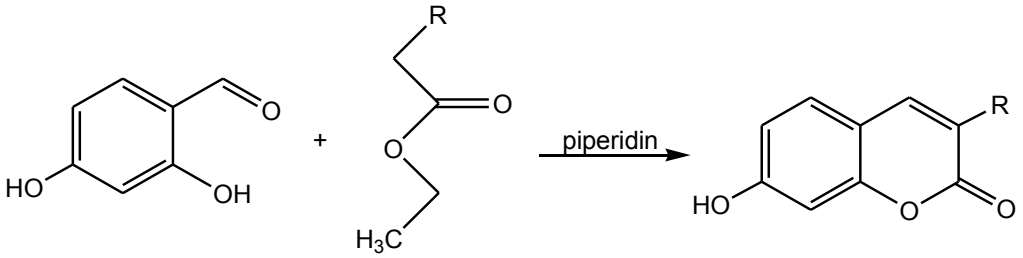
Reakcija se temelji na uzajamnom djelovanju fenola s jabučnom kiselinom ili β-ketoesterima (Slika 10.) u prisustvu sumporne kiseline ili drugih kondenzirajućih agenasa. Tijek reakcije ovisi o prirodi fenola, strukturi β-ketoestera te o kondenzirajućem agensu (Daru i Stirling 2011).



Slika 10. Pechmannova sinteza

Knoevenagelova sinteza

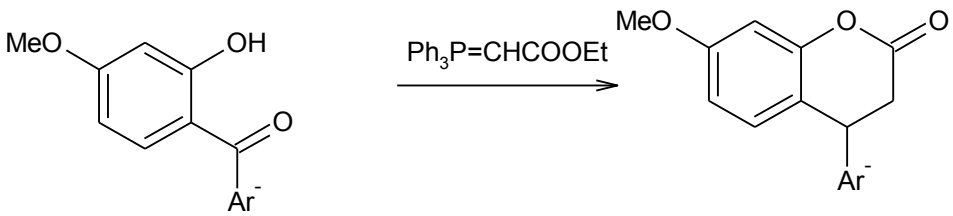
Ova metoda sinteze (Slika 11.) zasniva se na reakciji *o*-hidroksibenzaldehida s etil-malonatom, etil-acetatom ili etil-cijanoacetatom uz prisutnosti piperidina ili piridina. Reakcijom nastaju derivati kumarina (Jones 2004).



Slika 11. Knoevenagelova sinteza

Wittigova sinteza

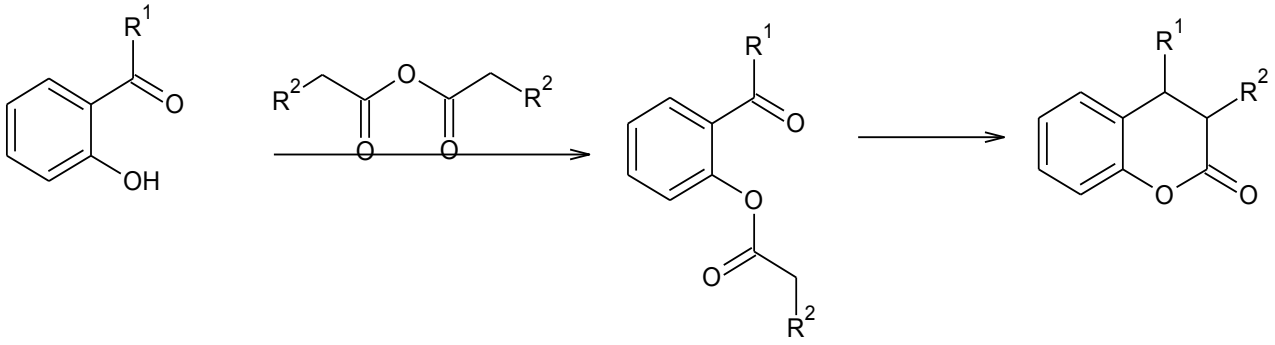
Sinteza kumarina utemeljena na Wittigovim reakcijama (Slika 12.) uključuje kondenzaciju 2-hidroksibenzofenona, etoksikarbonil-metilen-trifenilfosfina u apsolutnom benzenu. Metoksi- derivati 4-fenilkumarina su pripremljeni koristeći 2-hidroksi-4- metoksibenzofenon kao početni materijal (Garazd i sur., 2005).



Slika 12. Wittigova sinteza

Kostanecki-Robinsonova reakcija

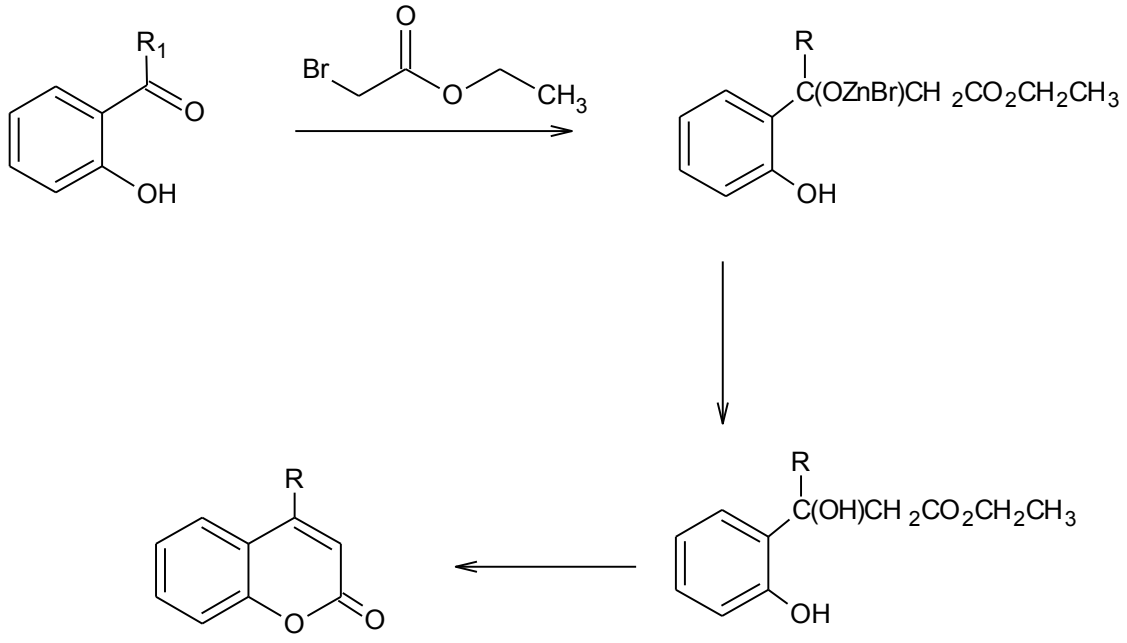
U Kostanecki-Robinsonovoj reakciji (Slika 13.) kumarini, najčešće 3- i 4-supstituirani kumarini, nastaju u reakciji acilacije *o*-hidroksiaril ketona s anhidridima alifatskih kiselina, nakon čega slijedi ciklizacija (Borges i sur., 2005).



Slika 13. Kostanecki-Robinsonova reakcija

Reformatskyjeva reakcija

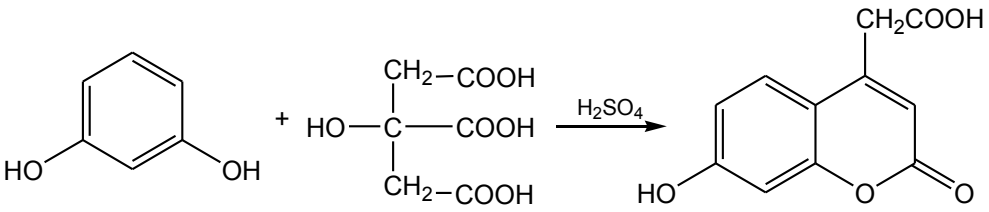
Kondenzacijom aldehida ili ketona s organocinkovim derivatima α-haloestera nastaju β-hidroesteri, a reakcija se naziva Reformatskyjeva reakcija (Slika 14.). U određenim uvjetima može doći do laktonizacije i nastanka kumarina (Molnar, 2011).



Slika 14. Reformatskyjeva reakcija

1.2. 7-Hidroksikumarin-4-octena kiselina

W. Baker i suradnici (1950) usavršili su metodu dobivanja 7-hidroksikumarin-4-octene kiseline iz limunske kiseline i rezorcinola, a kao katalizator je korištena koncentrirana sumporna kiselina. Na povišenoj temperaturi (60-75ºC) dolazi do stvaranja aceton dikarboksilne kiseline koja reagira s rezorcinolom (Slika 15.). Vrlo je važno da se prilikom dodavanja rezorcinola temperatura reakcijske smjese održava ispod 0 ºC jer ako temperatura prijeđe +5 ºC dolazi do stvaranja čitavog niza smolastih nusprodukata.

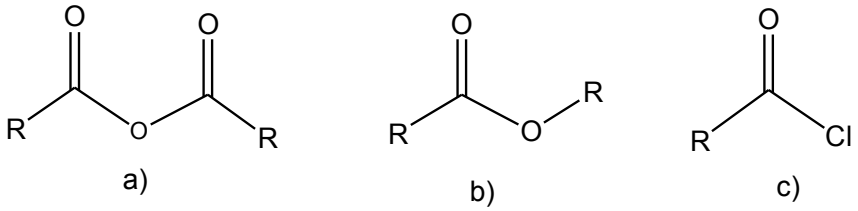


Slika 15. Dobivanje 7-hidroksikumarin-4-octene kiseline

1.2.1. Hidrazidi karboksilnih kiselina

1.2.1.1.Dobivanje hidrazida

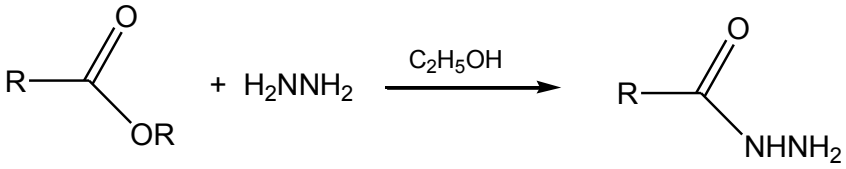
Hidrazidi nastaju reakcijom hidrazina s derivatima karboksilnih kiselina od kojih se najviše koriste anhidridi (RCH_2O_3R'), esteri (RCOOR') te kiselinski kloridi (RCOCl).



Slika 16. Anhidridi karboksilnih kiselina (a), esteri karboksilnih kiselina (b) i kloridi karboksilnih kiselina (c)

Hidrazidi mogu biti alifatski i aromatski, monoacil i diacil hidrazidi što ovisi o strukturi karboksilne skupine iz koje nastaju.

Hidrazidi karboksilnih kiselina dobivaju se reakcijom kiselinskih estera s hidrazinom u otopini etilnog alkohola, zagrijavanjem uz refluksiranje (Slika 17.). Reakciju je moguće provesti i pri sobnoj temperaturi pri čemu se kao otapalo koristi metanol (El-Ansary i sur., 1992).



Slika 17. Dobivanje hidrazida karboksilnih kiselina

1.2.1.2. Svojstva i primjena hidrazida

Neki od kiselinskih hidrazida na bazi kumarina fluoresciraju pod UV zračenjem te se mogu detektirati upotrebom UV lampe. Određivanje je moguće u području ultraljubičastog i vidljivog spektra. Također posjeduju svojstvo kemiluminiscencije, tj. emisije svjetla bez isijavanja topline što omogućava lakšu identifikaciju hidrazida (Lever, 1972).

Hidrazidi karboksilnih kiselina, posebno hidrazidi na bazi kumarina, posjeduju antifugalno i antibakterijsko djelovanje. Hidrazid maleinske kiseline se primjenjuje u području agrotehnike za inhibiciju klijanja, hidrazid izonikotinske kiseline ima razarajuće djelovanje na mikroorganizme pa je jedan od najznačajnijh tuberkulostatika. U prehrambenoj industriji neki hidrazidi se koriste kao analitički reagensi za određivanje sadržaja ugljikohidrata.

1.3. Tiosemikarbazidi

1.3.1. Struktura i upotreba tiosemikarbazida

Tiosemikarbazidi (TSC) (Slika 18b.) su dragocjeni gradivni blokovi peteročlanih heterocikla jer lako i na specifičan način ulaze u kemijske reakcije (Kappel i sur., 2004). Strukturom su slični semikarbazidima (Slika 18a.), osim što se na mjestu kisikova atoma nalazi sumpor, odakle i dolazi prefiks *tio*-.

Prisutnost dušika i sumpora kao dobrih donorskih atoma za nastajanje koordinacijske veze s metalnim kationima omogućuje tiosemikarbazonima i tiosemikarbazidima stvaranje stabilnih kompleksnih spojeva s većinom prijelaznih metala, što ih svrstava u dobro poznati razred izuzetno različitih bioloških aktivnosti (Suvarapu i Baek, 2015).

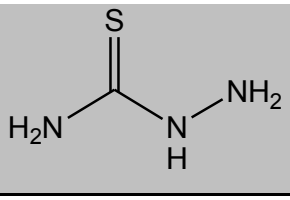
Karakterizira ih širok spektar bioloških aktivnosti te u kombinaciji s kumarinima pokazuju značajnu antioksidacijsku aktivnost (Šarkanj i sur., 2013). Osim bioloških značajki, važna je i njihova upotreba u industriji gdje potpomažu u suzbijanju korozije te u nautici gdje se koriste kao sredstva za premazivanje brodova radi sprječavanja stvaranja obraštajnih zajednica (algi) koje uzrokuju trajna oštećenja plovila (Zamani i sur., 2004). Tako je, primjerice, poznat mehanizam kojim tiosemikarbazidi djeluju kao značajni inhibitori korozije bakra u otopinama bogatim kloridnim ionima (Singh i sur., 2003). Nadalje, važnu ulogu imaju i u agronomiji kao aktivatori rasta biljaka čime zamjenjuju ulogu prirodnih fitohormona (Basak i sur., 2010).

a) **b)**

Slika 18. Kemijska struktura: a) semikarbazida

b) tiosemikarbazida

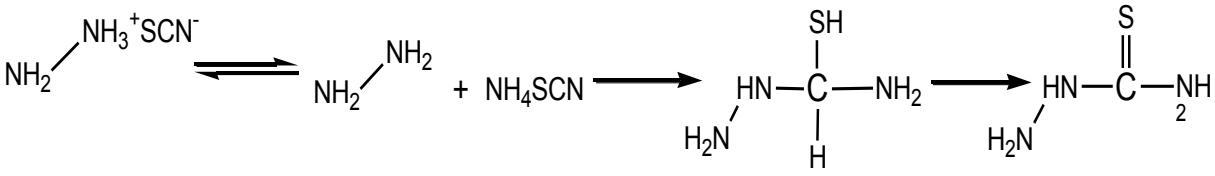
Tablica 3. Osnovna fizikalno-kemijska svojstva tiosemikarbazida

TIOSEMIKARBAZID (TSC)	
Kemijski naziv (IUPAC)	hidrazinkarbotioamid
Kemijska formula	CH_5N_3S
Molarna masa	91,14 g/mol
Točka tališta	180-182 °C
Točka vrelišta	-
Gustoća	1,38 g/cm^3 (20 °C)
	

Unatoč brojnim istraživanjima, tiosemikarbazidi su i dalje relativno nepoznata skupina organskih spojeva. Zahvaljujući širokom spektru bioloških aktivnosti, zaslužuju mnogo više pažnje te je daljnje istraživanje njihovih derivata ključan čimbenik u razvoju farmakološki aktivnih supstanci koje mogu pomoći u liječenju mnogih bolesti (Reshma i Avinash, 2013).

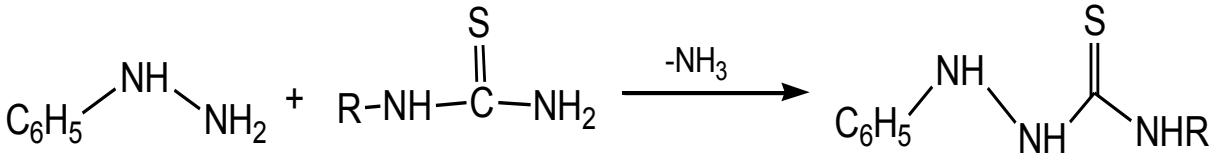
1.3.2. Sinteza tiosemikarbazida

Za prvu sintezu tiosemikarbazida zaslužni su Freund i Schander koji su davne 1896. godine sintetizirali tiosemikarbazid. Kasnije su tu reakciju zaštitili patentom. Proveli su sintezu (Slika 19.) koju i danas najčešće koristimo kod dobivanja tiosemikarbazida.



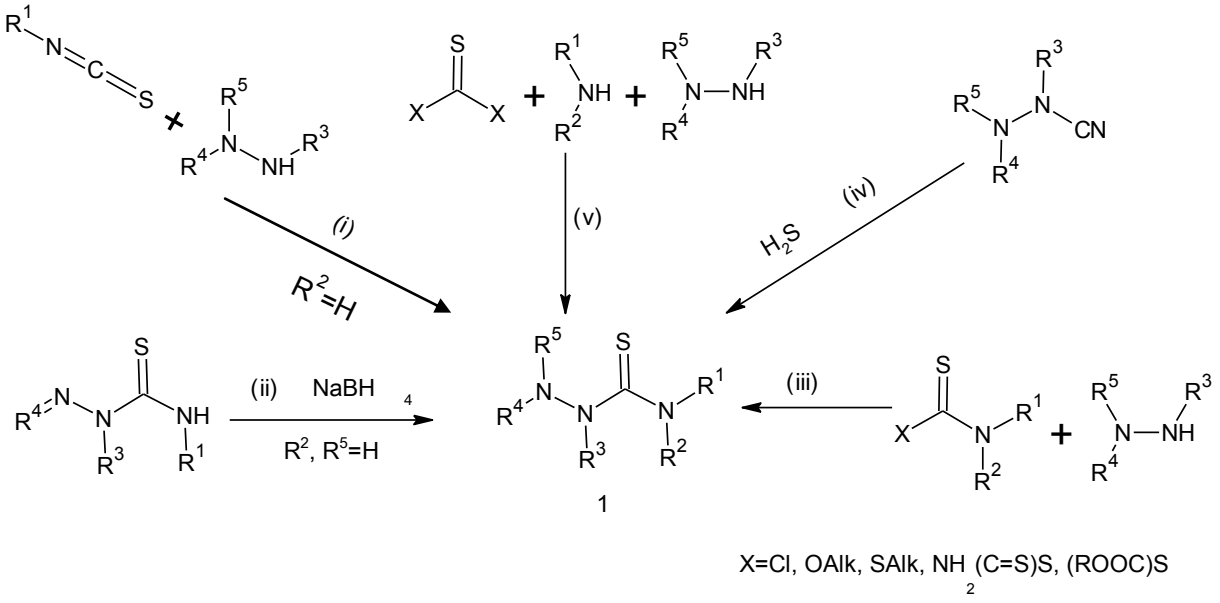
Slika 19. Sinteza tiosemikarbazida prema Freundu i Schanderu

Sinteza tiosemikarbazida može se provesti i miješanjem odgovarajućeg derivata tiouree, otopljene u alkoholu, uz dodatak malog suviška fenilhidrazina (Slika 20.). Otopina se refluksira 6 sati (Sandler i Karo, 1971).



Slika 20. Dobivanje tiosemikarbazida dezaminacijom

Dosad objavljene metode sinteze tiosemikarbazida uključuju reakciju (Slika 21.) izoticijanata s hidrazinom (**i**), najčešće korištenu metodu sinteze, no nedostak je što je izotiocijanate teško skladištiti te rukovati s njima. Redukcija tiosemikarbazona natrijevim borohidridom (**ii**) je korisna reakcija za pripremu tiosemikarbazida samo ako je R^2=H mono-, di- i tri- supstituiran (ne tetra- ili penta- supstituiran). Reakcija hidrazina s reaktivnim derivatima tiokarbamatne kiseline (**iii**) još je jedna od metoda sinteze tiosemikarbazida. Reakcijom cijanohidrazina sa sumporovodikom (**iv**) nastaju mono- ili disuptituirani tiosemikarbazidi (R^1=R^2=H). Naposlijetku, reakcijom 1,2,4-triazola ili bis (imidazolil)metantiona s aminima, a zatim s hidrazinima mogu nastati di- i trisupstituirani tiosemikarbazidi (Katritzky i sur., 2006).



Slika 21. Putevi sinteze tiosemikarbazida

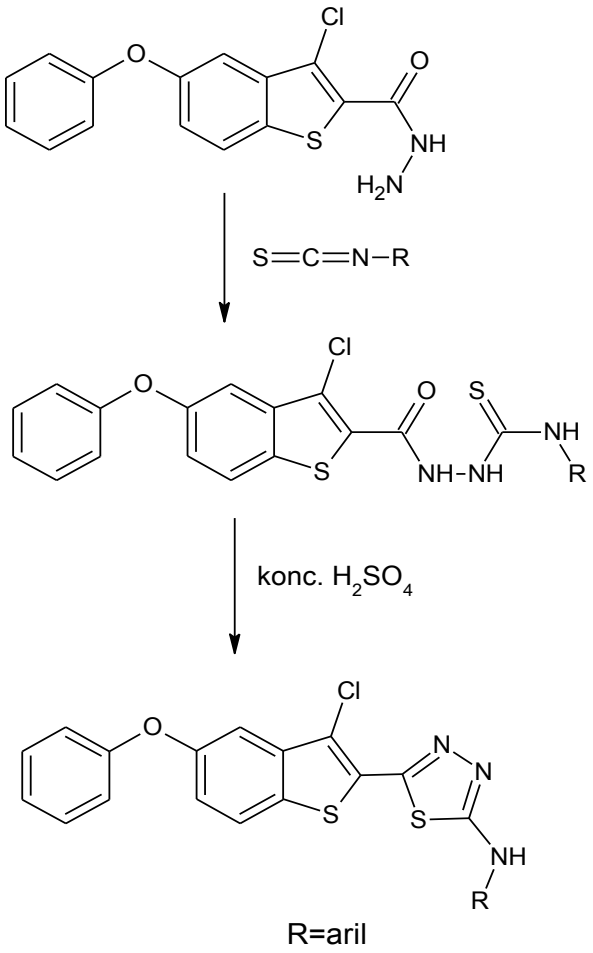
1.3.3. Upotreba tiosemikarbazida

TSC su značajni intermedijeri u pripremi različitih heterocikličkih derivata, između ostalog, 2,4-tiazola (Oruc i sur., 2004), 1,3,4-tiadiazola (Randhavane i sur., 2010) i 1,2,4-triazola (Shi i sur., 2011) te 1,3,4-oksadiazola (Rivera i sur., 2006). Derivati tiosemikarbazida imaju dobra antibakterijska svojstva (Reshma i Avinash, 2013). Štoviše, pokazuju širok spektar različitih bioloških aktivnosti, a eksperimenti *in vitro* su pokazali kako imaju značajnu ulogu u obrani od malarije, ameba i tripanosoma i to u malim koncentracijama koje nisu toksične za stanice sisavaca (Bhat i sur., 2008; Leite i sur., 2006).

Tiadiazoli su u početku korišteni u farmaceutskoj industriji zbog antibakterijskih svojstava dok im je kasnije primjena proširena pa su korišteni i kao protuupalna sredstva, pesticidi, boje i maziva te analitički reagensi (Vasoya i sur., 2005).

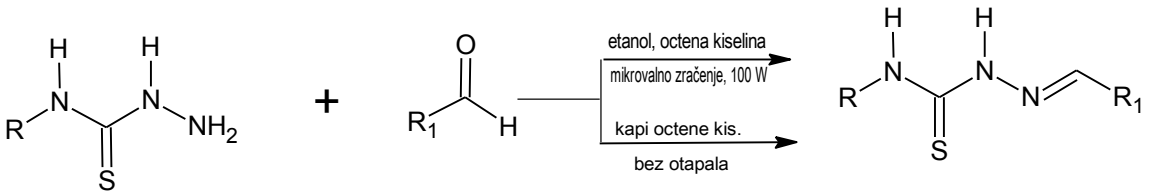
Jedna od metoda priprave 1,2,4 triazola je reakcija ciklizacije acilnih derivata tiosemikarbazida (npr. 1,2,4-triazol-1 octene kiseline i 1,2,4-triazol-4-octene kiseline) u alkalnom mediju (Wujec i sur., 2005).

Reakcijom 2-hidrazinokarbonil-3-kloro-5-fenoksi-benzo [b] tiofena s različito supstituiranim fenilnim izotiocijanatima dobiju se *N*-supstituirani derivati ariltiosemikarbazida. Derivati 1,3,4-tiadiazola dobiju se ciklizacijom ariltiosemikarbazida sumpornom kiselinom (Slika 22.) (Vasoya i sur., 2005).



Slika 22. *N*-supstituirani derivati ariltiosemikarbazida

Značajni derivati su i tiosemikarbazoni koji se mogu dobiti reakcijom tiosemikarbazida s aldehidima ili ketonima. Reakcijom aril- ili alkiltiosemikarbazida i različitih aldehida u etanolu kao otapalu, uz dodatak par kapi ledene octene kiseline, mogu se dobiti različiti tiosemikarbazoni (Slika 23.) značajnih bioloških svojstava. Reakcija može biti potpomognuta mikrovalnim zračenjem čime se vrijeme trajanja reakcije znatno skraćuje (Moretto dos Reis i sur., 2011).

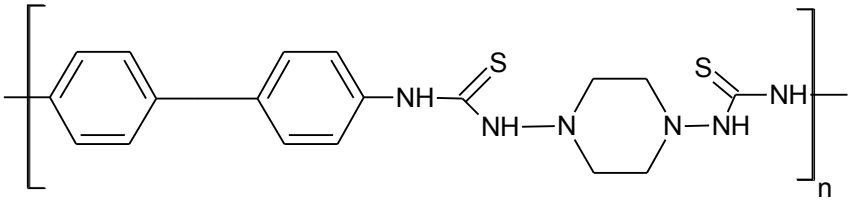


Slika 23. Dobivanje tiosemikarbazona

Tiosemikarbazidi mogu stvarati i metalne komplekse. Campbell i Tomić su još 1962. sintetizirali poli-tiosemikarbazide (PTSC) i u svom radu prikazali stvaranje

kemijskih kompleksa polimera sa željezom, niklom, srebrom, bakrom, srebrom i platinom (Campbell i Tomić, 1962.; Tomić i sur., 1962). Novija su istraživanja pokazala kako poli-tiosemikarbazidi (PTSC) (Slika 24.) mogu poslužiti za proizvodnju asimetričnih membrana kojima se prikuplja (ekstrahira) zlatov (III) ion iz razrijeđenih otopina. Svaka monomerna jedinica PTSC-a sadrži dvije tiosemikarbazidne skupine koje tvore koordinacojsko mjesto samoga polimera. Koordincijsko mjesto na PTSC-u također sadrži još neke kemijske skupine koje pridonose formiranju kompleksa sa zlatom, čime se sposobnost prikupljanja zlatovog (III) iona znatno povećava (Villalobos i sur., 2014). Općenito, poznato je kako N i S atomi imaju važnu ulogu u brojnim biomolekulama koje sadrže neki metal jer potpomažu koordinaciji metala na aktivno mjesto (Bagihallia i sur., 2009).

Sinteza metalnih kompleksa tiosemikarbazida je prilično jednostavna. Kompleksi s Co (II), Ni (II), Cu (II), Zn (II), Cd (II) i Hg (II) pripremaju se miješanjem otopine soli metala i tiosemikarbazidnih liganada u ključajućem alkoholu u molarnom omjeru 1:2. Nakon zagrijavanja u ključajućem alkoholu, kompleksni se spoj istaloži pomoću krutog natrijevog acetata. Dobiveni kompleks je netopljiv u organskim otapalima, osim u dimetilformamidu (svi kompleksi) i dimetilsulfoksidu (samo kompleks s niklom) (Setnescu i sur., 2004).



Slika 24. Struktura poli-tiosemikarbazida (PTSC)

Kompleksi tiosemikarbazida s bakrom imaju značajnu antikancerogenu aktivnost. Provođenjem brojnih eksperimenata na Rous sarkom virusu, dokazano je kako ti kompleksi inhibiraju aktivnost o RNA ovisnoj DNA polimeraze sprječavajući time nastanak samoga karcinoma u ljudskom organizmu. Smatra se kako se pozitivno nabijeni kompleks ($Cu(TSC)_2^{2+}$) veže za negativnu fosfatnu skupinu molekule DNA čime je deaktivira (Pillai i sur., 1977).

1.3.4. Biološka aktivnost tiosemikarbazida

Tiosemikarbazidi (TSC) imaju širok spektar bioloških aktivnosti. Prije svega, ističu se svojim antikancerogenim (Hu i sur., 2006), anti-HIV (Yogeeswari i sur., 2011), antituberkuloznim (Pitucha 2010), antiviralnim (Shipman i sur., 1981), antiprotozoičnim (Azam i Abid, 2010), antiepileptičkim (Jatav i sur., 2008) antidepresivnim (Klayman i sur., 1979), antimalarijskim (Yamaguchi i sur., 2009), antifungalnim (Siddiqui i Singh, 2003) i antibakterijskim (Siddiqui i Singh, 2003) svojstvima.

Također, TSC su značajni agensi u borbi protiv različitih vrsta parazita, kao što su *Plasmodium falciparum* (Wilson i sur., 1974), *Trypanosoma cruzi* (Greenbaum i sur., 2007), *Trypanosoma brucei rhodesiense* (Tenorio i sur., 2005) i *Toxiplasma gondii* (Reis i sur., 2011).

Osim toga, TSC utječu na aktivnost brojnih enzima, regulatora biokemijskih reakcija u živim organizmima. Tako je poznato da TSC, na bazi kumarina, imaju najbolji inhibicijski učinak na aktivnost enzima polifenol oksidaze. Inhibicijski učinak derivata kumarina najvjerojatnije je uzrokovan ireverzibilnom inhibicijom zbog formiranja veze tiosemikarbazidne skupine s bakrom u aktivnom središtu enzima čime se sprječava pristup kisika te kompeticijskom inhibicijom zbog sličnosti aromatskog prstena u strukturi derivata sa supstratom L-DOPA (Burić, 2011).

Zhang i sur. (2011) su sintetizirali seriju čalkona na bazi TSC te ustanovili da posjeduju snažnu antitumorsku aktivnost i antiproliferativno djelovanje na ljudski hepatocelularni karcinom jetre (HepG2).

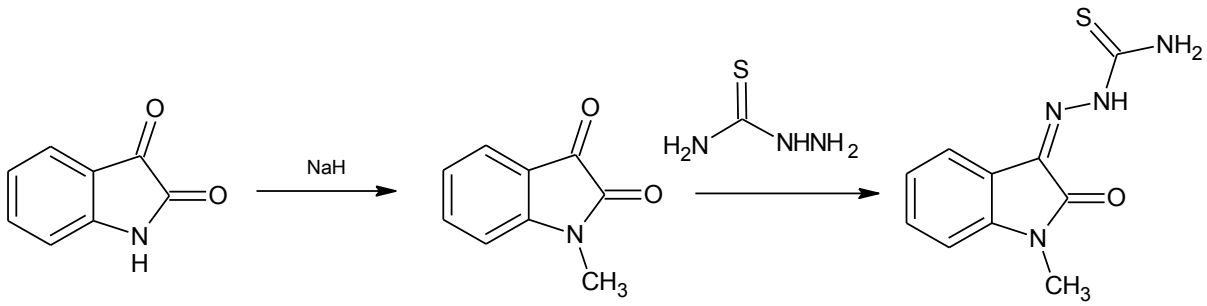
Sam mehanizam antikancerogenog djelovanja tiosemikarbazida je složen, a zasniva se na ihibiranju biosinteze molekule DNA. Smatra se da TSC sprječavaju i sintezu enzima ribonukleotid-difosfat reduktaze. Ovaj je enzim odgovoran za *de novo* konverziju ribonukleotid difosfata u deoksiribonukleotid difosfate, što je esencijalno za sintezu DNA i njezin popravak (Agrawal i sur., 1978; Miller i sur. 1998).

Biološka aktivnost tiosemikarbazida potječe od liganada, točnije supstituiranih dušikovih i sumpornih atoma. Naime, dokazano je da se u derivatima s dvostrukom –SH skupinom povećava antitumorska aktivnost. Od presudne je važnosti N-N-S

tridentatni sustav liganada koji značajno pridonosi antikancerogenim svojstvima tiosemikarbazida (Hu i sur., 2010).

Zahvaljujući C=S, -NH_2 i –NH- te nekim drugim funkcionalnim skupinama, tiosemikarbazidi su značajni antioksidansi, tj. pomažu stabilizaciju polimera protiv termalne oksidacije (Sabaa i Abdel-Naby, 1999). Antioksidacijska aktivnost ovih spojeva može se pripisati prisutnosti skupina C=S i –NH- koje mogu djelovati kao centri za hvatanje radikala (Setnescu i sur., 2004).

Tako je poznato da TSC inhibiraju enzim ribonukleotid reduktazu, na čemu se zasniva mehanizam djelovanja poznatih lijekova protiv karcinoma kao što su Triapin i Metisazon (Slika 25.) (Shefali i sur., 2014).



Slika 25. Sinteza Metisazona

Neki derivati, poput 1-(α-anilino-4-metilbenziliden) tiosemikarbazida su snažni supresori izlučivanja inzulina iz β-stanica Langerhansovih otočića jer uzrokuju njihovo propadanje (lizu stanica) (Campana i sur., 1990).

Tiosemikarbazidi su jedni od najjačih sintetičkih latirogena te se eksperimentalno koriste za poticanje osteolatirizma kod brojnih kralježnjaka. Osteolatirizam je degenerativni poremećaj koji uzrokuje deformaciju skeleta, propadanje tkiva te nenormalni rad srca kod nekih skupina kralježnjaka (Dasler i sur., 1970).

Tiosemikarbazid je koristan strukturni motiv koji ima potencijal prikazivanja kemijske funkcionalnosti biološki aktivnih molekula. Optimizacija strukture može rezultirati revolucionarnim otkrićima nove klase terapeutskih sredstava (Reshma i Avinash, 2013). Stoga, za očekivati je da će u budućnosti tiosemikarbazidi imati

značajniju primjenu u svakodnevnom životu, kao značajna aktivna tvar mnogobrojnih lijekova, no dotad će zasigurno proći još mnogo vremena.

1.4. Antioksidacijsko djelovanje

1.4.1. Oksidacijski stres

Oksidativni stres uzrokuje svako stanje u kojem se narušava homeostaza (Kawanishi i sur., 2001), a posljedica je prekomjernog nastajanja reaktivnih kisikovih vrsta (oksidansi, radikali) uslijed poremećaja u ravnoteži oksidacijsko-redukcijskih procesa u biološkim sustavima. Jednostavnije rečeno, oksidansi u biokemijskim sustavima imaju sposobnost predavanja elektrona, dok antioksidansi (reducensi) imaju sposobnost primanja elektrona. Uslijed prekomjernog stvaranja slobodnih radikala nastaje oksidacijski stres koji je uzrok i karakteristika brojnih bolesti i zdravstvenih poremećaja kao što su kardiovaskularne bolesti, neurodegenerativne bolesti, karcinomi, dijabetes, autoimune bolesti i mnoge druge. Oksidansi u organizmu nastaju kao produkt normalnih fizioloških procesa, proizvodnje energije, aktivacije fagocita, kontrakcije mišića, te izloženosti toksinima – duhanskom dimu, alkoholu i pesticidima (Pisochi i Pop, 2015). Različiti oblici zračenja, poput UV-zračenja, x-zraka, mikrovalova i ultrazvuka također potiču njihovo stvaranje (Sies, 1997).

Posljedice oksidacijskog stresa posebno su izražene u starijoj životnoj dobi za koju je i karakteristična povećana učestalost većine od navedenih bolesti. Posebno opsežna istraživanja provode se u proučavanju etiologije i patogeneze ateroskleroze koja je smatrana neizbježnim procesom starenja i degenerativnim procesom, a u zadnja dva desetljeća otkriveno je kako je jedan od vjerojatnih uzroka oksidacijski stres (Štefan i sur., 2007). U teoriji nastanka ateroskleroze početno oštećenje lipoproteina male gustoće (LDL čestice) uzrokuje stvaranje lipidnih peroksida, odnosno lipidnih radikala te dolazi do niza kaskadnih reakcija koje su vrlo vjerojatno jedan od uzroka aterosklerotskog procesa.

1.4.2. Antioksidansi i slobodni radikali

Antioksidansi su spojevi koji mogu odgoditi ili spriječiti oksidaciju lipida ili drugih molekula inhibirajući inicijaciju ili širenje lančanih reakcija (Velioglu i sur., 1998). Imaju veliku važnost u sprječavanju oksidativnog stresa i štite metabolizam od visoko reaktivnih kisikovih vrstakoje mogu uzrokovati degenerativne bolesti ili oštetiti stanice u ljudskom organizmu (Helen i sur. 2000). Ključna uloga antioksidanasa je hvatanje ili reagiranje sa slobodnim radikalima i sprječavanje propagacije lančane reakcije izazvane istima.

Antioksidacijska aktivnost nekog spoja pripisuje se njegovoj sposobnosti hvatanja kisikovih vrsta, inhibiciji reakcije oksidacije mikrosomalnih citokroma P450 i sprječavanju nastajanja ROS-ova. Da bi neka tvar bila dobar antioksidans mora sadržavati atom vodika kojeg može vrlo lako otpustiti i pritom tvoriti slobodni radikal koji mora biti stabilan i nereaktivan kako ne bi sudjelovao u koraku propagacije lančane reakcije (Malhotra i sur., 2008). Antioksidansi se mogu kategorizirati prema tome doniraju li slobodnim radikalima vodikov atom, hvataju li singlet kisika i sekundarne produkte lipidne oksidacije ili pak,djeluju li kao kelatori prijelaznih metala (Yeo i sur., 2010).

Reaktivne kisikove vrste (**R**eactive **O**xygen **S**pecies- ROS), tj. slobodni radikali su vrlo male molekule, kao što su superoksid O_2•-, hidroksil •OH, hidroperoksil HO_2•, peroksil LOO•, alkoksil LO•, alkil R•, triklorometil •CCl_3, tiil RS• (Djilas i sur., 2002), osobito reaktivni su superoksidni anion i hidroksilni radikal, a sve vrste reagiraju s lipidima, proteinima i DNA te pritom izazivaju ireverzibilne promjene njihove molekularne strukture. Prisutnost nesparenih elektrona čini ih vrlo reaktivnima. Nastaju uslijed nekompletne redukcije kisika ili oksidacijom vode u lancu transporta elektrona. Kontinuirano se generiraju u vrlo malim količinama prijenosom elektrona na molekulu kisika tijekom različitih fizioloških procesa kao što je stanično disanje, reakcije oksigenaza ili respiratorna erupcija tijekom procesa stanične imunosti. Reaktivne kisikove vrste mogu oštetiti biljne stanice, membrane i DNA uzrokujući jednostruke i dvostruke lomove DNA lanca, mogu dovesti do pojave karcinoma, ubrzati proces starenja ili dovesti do oksidativnog stresa.

Tkiva s velikom potrošnjom kisika i centralni živčani sustav posebno su podložni oksidativnom oštećenju u uvjetima oksidativnog stresa zbog prisutnosti

određenih aminokiselina, povišene koncentracije željeza, staničnih membrana bogatih polinezasićenim masnim kiselinama i niske koncentracije prirodnog antioksidansa glutationa u neuronima (Vukovic i sur., 2010). Osim reaktivnih vrsta kisika (ROS-ovi), postoje i reaktivne vrste dušika (RNS-ovi) kao što su peroksinitrit, te dušični monoksid (Pisochi i Pop, 2015). Slično kao i ROS-ovi, i RNS-ovi u stanicama pojedinih tkiva uzrokuju strukturne i funkcionalne promjene.

Većina komercijalno dostupnih antioksidanasa djeluje hvatajući slobodne radikale ili kelira metale. „Hvatači“ slobodnih radikala, kao tokoferoli, butilirani hidroksitoluen (BHT) i biljni fenoli inhibiraju lipidnu peroksidaciju reducirajući peroksilne i alkoksilne radikale u stabilne spojeve. Na taj način „hvatači“ slobodnih radikala mogu inhibirati lančanu reakciju i skraćivanje masnih kiselina, pri čemu se smanjuje formacija hlapljivih produkata raspadanja masnih kiselina (aldehidi i ketoni) koji uzrokuju kvarenje (Alamed i sur., 2009) i neugodan miris, kao i gubitak esencijalnih masnih kiselina (Bondet i sur., 1997). Osim što služe kao „hvatači“ slobodnih radikala, antioksidansi inaktiviraju katalizu metala keliranjem istih, reduciraju hidroperokside do stabilnih hidroksilnih derivata i djeluju sinergistički s drugim spojevima (Frankel i Finley, 2008).

Voće je bogat izvor polifenola, spojeva koji imaju značajno antioksidacijsko djelovanje koje se iskazuje hvatanjem slobodnih radikala te vezanjem metalnih iona, prekursora pri stvaranju slobodnih radikala (Rice-Evans i sur. 1997). Količinom polifenola se, između različitih vrsta voća, posebno ističe tamno obojeno bobičasto i jagodasto voće iz porodica *Ericaceae* (borovnice), *Rosaceae* (kupina, malina, trešnja, višnja, jagoda) te *Caprifoliaceae* (bobice bazge) (Määttä-Riihinen i sur. 2004a; Määttä-Riihinen i sur. 2004b). Najvažnije skupine polifenola prisutne u ovom voću su flavonoli, flavan-3-oli, antocijanini te proantocijanidini. Redovita konzumacija tog voća i njihovih proizvoda povezana je sa znatnim smanjenjem rizika od nastanka različitih bolesti krvožilnog sustava i malignih bolesti. Iz navedenoga, jasno je zaključiti koliko je važna uravnotežena i zdrava prehrana u očuvanju zdravlja.

Prema porijeklu, antioksidansi se mogu podijeliti na prirodne i sintetičke. Općenito, sintetički antioksidansi su spojevi fenolne strukture s različitim stupnjevima alkilne supstitucije, dok prirodni antioksidansi mogu biti fenolni spojevi (tokoferoli, flavonoidi i fenolne kiseline), spojevi dušika (alkaloidi, derivati klorofila, aminokiseline

i amini) ili karotenoidi kao što je askorbinska kiselina (Larson, 1988; Hall et Cuppett, 1997). Zbog nepoželjnog djelovanja pojedinih sintetičkih antioksidanasa nastoji se hranom, prije svega voćem i povrćem unijeti što više prirodnih antioksidanasa u organizam. Tako je već odavno poznata antioksidacijska aktivnost vitamina E, odnosno α-tokoferola koji slovi za jednog od najjačih prirodnih antioksidanasa (Burton i Ingold 1981). Nadalje, izrazita antioksidacijska aktivnost protiv slobodnog radikala singletnog kisika potvrđena je za β-karotene (Foote i sur. 1971).

Ljudski organizam posjeduje endogene antioksidativne sustave koji ga štite od štetnog utjecaja slobodnih radikala. Pritom su posebno važni antioksidativni sustavi poput enzima superoksid-dismutaze, glutation-peroksidaze, katalaze, te antioksidansi topljivi u mastima i vodi poput glutationa, vitamina E i C, karotenoida, vitamina A te koenzima Q10 (Pisoschi i Pop, 2015). Antioksidansi se mogu podijeliti u tri osnovne skupine. Jedna skupina antioksidansa onemogućuje samo nastajanje slobodnih radikala. To su primarni antioksidansi. Sekundarni antioksidansi su oni koji uništavaju već stvorene slobodne radikale, dok tercijarni popravljaju već nastala oštećenja stanica.

1.4.3. Metode određivanja antioksidacijske aktivnosti

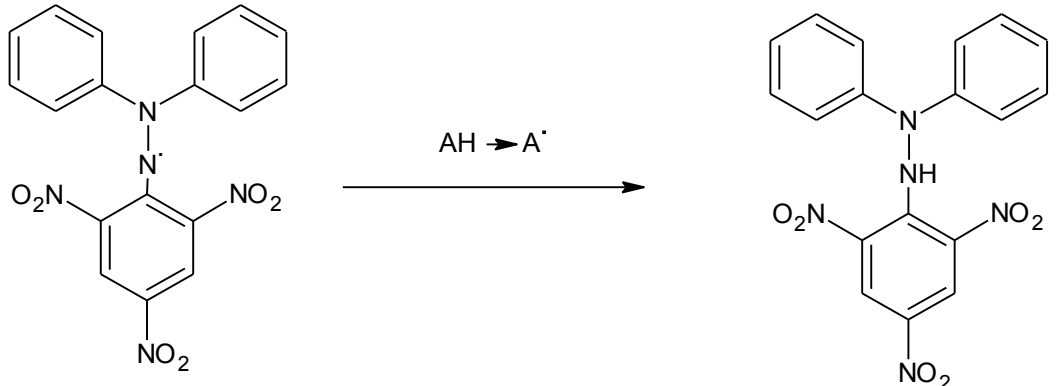
Radi određivanja antioksidacijske aktivnosti, razvijen je velik broj metoda koje se temelje na različitim mehanizmima djelovanja obrambenog sustava antioksidansa, poput uklanjanja ili inhibicije slobodnih radikala (Prakash i sur., 2001). Danas postoji mnoštvo protokola za određivanje antioksidacijske aktivnosti koji uključuju mnoštvo sustava za nastajanje slobodnih radikala kao i različite metode za poticanje oksidacije (Frankel i Finley, 2008). Antioksidansi mogu deaktivirati slobodne radikale na dva osnovna načina, prijenosom vodikovog atoma (hydrogen atom transfer- HAT) i prijenosom elektrona (single electron transfer-SET). Rezultat oba načina je isti, neovisno o mehanizmu, ali kinetika i potencijalne nusreakcije se razlikuju.

1.4.3.1. DPPH (2,2-Difenil-1-pikrilhidrazil) metoda

DPPH metoda je jednostavna i pogodna za određivanje antioksidacijske aktivnosti čistih spojeva, sokova voća i povrća ili ekstrakata (de Magalhães, 2007), kao i za određivanje antioksidacijske aktivnosti u namirnicama i biljnim proizvodima. Osim toga, upotrebljava se i za određivanje stupnja lipidne peroksidacije, a moguća je primjena za čvrste i tekuće uzorke zbog čega ima široku primjenu.

Ova se metoda temelji na redukciji stabilnog, tamnoljubičastog dušikovog radikala DPPH• koji zbog nesparenog elektrona pokazuje jaku apsorpciju u vidljivom dijelu elektromagnetskog spektra, a maksimum apsorpcije je na 517 nm. Sparivanjem elektronskog para stabilnog radikala DPPH• u prisutnosti elektron donora (antioksidans koji hvata slobodne radikale), ljubičasta se boja mijenja u žutu. Nastali spoj ima smanjeni intenzitet apsorpcije u vidljivom dijelu spektra, a rezultirajuće obezbojenje u stehiometrijskom je odnosu s brojem sparenih elektrona. Odnosno, sposobnost hvatanja slobodnih radikala određuje se mjerenjem pada apsorbancije pri 515-528 nm (Molnar, 2011; Duane 2010). DPPH metoda je vrlo brza i točna metoda (Prakash i sur., 2001).

Molekula 2,2-difenil-pikrilhidrazila je stabilni radikal zbog delokalizacije slobodnog elektrona kroz molekulu, stoga molekule ne dimeriziraju kao što je to slučaj kod većine slobodnih radikala.



DPPH (oks.) tamnoljubičasta boja

DPPH (red.) žuta boja

Slika 26. Difenilpikrazil (slobodni radikal) i difenilpikrilhidrazin

Delokalizacija elektrona kroz molekulu daje tamnoljubičastu boju koja se gubi dodatkom antioksidansa, kada iz slobodnog radikala, difenilpikrilhidrazila, nastaje

reducirani oblik, svijetložuti difenilpikrilhidrazin, gdje je ZH reducirani oblik, a $A^{\bullet}$ je slobodni radikal nastao u prvom koraku (Molyneux, 2004; Gacche i sur., 2006).

$$Z^{\bullet} + AH = ZH + A^{\bullet}$$

Prvi put ovu su metodu objavili Brand-Williams i suradnici (1995). Rezultati se mogu izraziti na nekoliko načina. DPPH metoda je ovisna o otapalu i pH vrijednosti, a jedan od parametara koji određuju reakciju je i sterička dostupnost zato što male molekule, koje imaju bolji pristup radikalskom mjestu, pokazuju relativno visoku antioksidacijsku aktivnost (de Magalhães, 2007). Zapravo, to znači da reakcijski mehanizam između antioksidansa i DPPH• ovisi, između ostaloga, i o strukturi samog antioksidansa (Bondet i sur., 1997). DPPH može reagirati s fenolnim spojevima putem prijenosa vodikovog atoma ili elektrona. DPPH u nepolarnim otapalima preferira oduzimanje vodika, dok u polarnim otapalima, kao što su etanol i metanol, prijenos elektrona je važniji korak u hvatanju DPPH radikala (Yeo i sur., 2010).

1.4.3.2. Fosfomolibden metoda

Ova je metoda razvijena za kvantitativno određivanje antioksidacijske aktivnosti. Zasniva se na redukciji Mo (VI) do Mo (V) pomoću antioksidanasa pri čemu dolazi do nastajanja zelenog kompleksa fosfat/Mo (V) u kiseloj sredini (Nićiforović i sur., 2011), koji ima maksimum apsorpcije pri 695 nm (Sowndhararajan i sur., 2011).

Fosfomolibden metoda je kvantitativna jer se antioksidacijska aktivnost izražava u broju ekvivalenata askorbinske kiseline ili *α*-tokoferola (Prieto i sur., 1999), a viša vrijednost apsorbancije predstavlja veću antioksidacijsku aktivnost (Sowndhararajan i sur., 2011).

1.5. Cilj i svrha rada

Cilj diplomskoga rada bio je sintetizirati seriju tiosemikarbazida na bazi kumarina s potencijalnim antioksidacijskim djelovanjem te kod navedenih derivata odrediti odnos strukture i antioksidacijske aktivnosti.

S obzirom da su tiosemikarbazidi skupina organskih spojeva koji pokazuju široki spektar bioloških aktivnosti, bilo je za očekivati da će pokazati i značajnu antioksidacijsku aktivnost zbog prisutnih funkcionalnih skupina koje su „hvatači“ ROS-a. Sintetizirani spojevi su pročišćeni do analitičke čistoće te im je određena antioksidacijska aktivnost pomoću DPPH metode.

2. MATERIJALI I METODE

2. MATERIJALI I METODE

2.1. Opći podaci

Sve kemikalije, korištene u eksperimentalnom dijelu rada, nabavljene su od komercijalnih dobavljača.

Za praćenje tijeka reakcije, kontrolu čistoće spojeva i preliminarnu identifikaciju produkata korištena je kromatografija na tankom sloju. HF_{254} fluorescentne silikagel ploče (Merck) korištene su kao stacionarna faza, a kao mobilna faza otopina sastava benzen : aceton : octena kiselina (8 : 1 : 1). Sustav otapala benzen : aceton : octena kiselina se pokazao najpogodnijim za sintetizirane tiosemikarbazide. Za detekciju kod tankoslojne kromatografije korišteno je UV svjetlo valnih duljina 254 i 365 nm.

Spojevi su karakterizirani R_f vrijednostima koje se računaju na sljedeći način:

$$R_f = d\ (spoj) / d\ (otapalo)$$

pri čemu je:

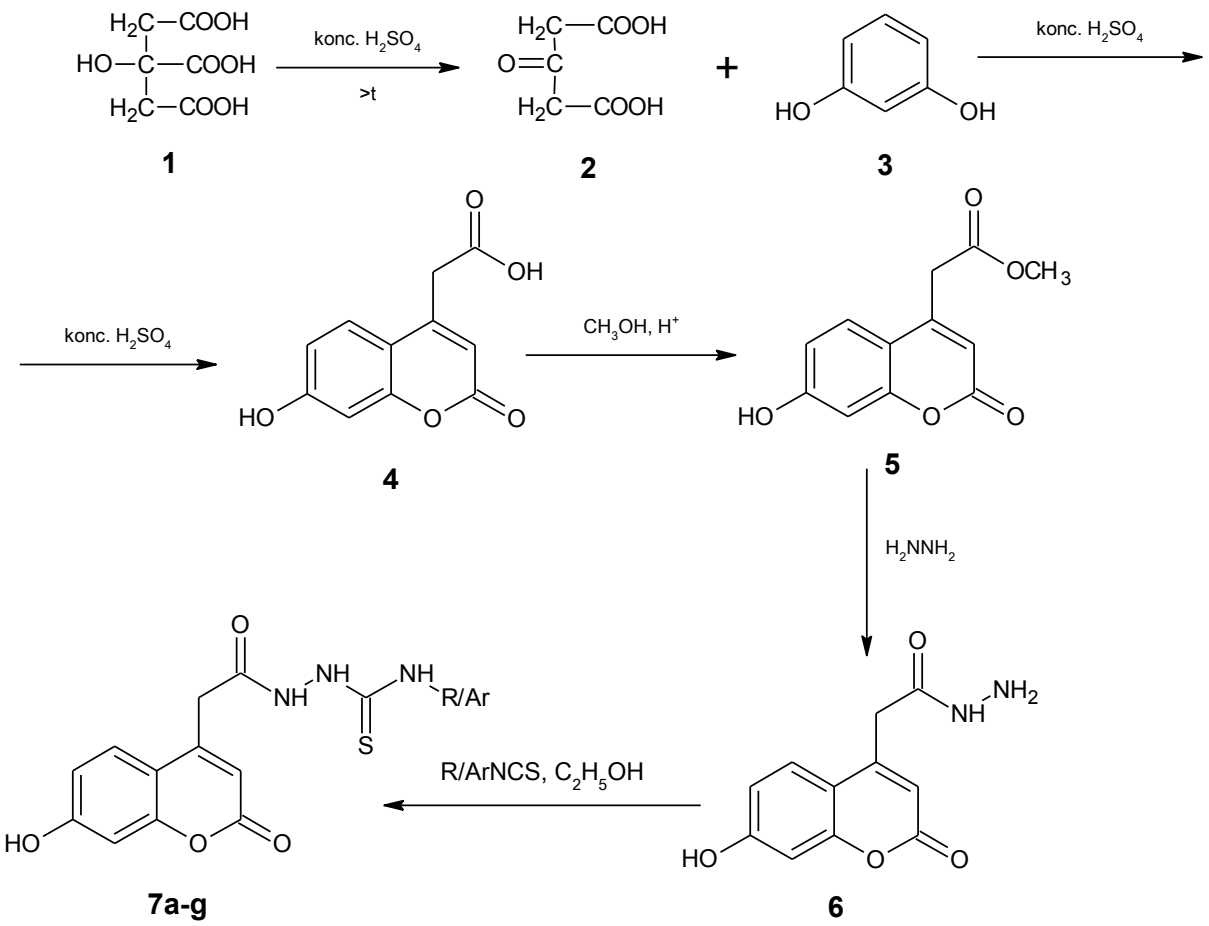
d (*spoj*) – duljina puta spoja na TLC ploči u određenom sustavu otapala (cm)

d (*otapala*) – duljina puta otapala na TLC ploči (cm)

Točke tališta određene su na uređaju *Electrothermal*.Maseni spektri snimani su na spektrometru masa LC-MS/MS (API 2000, Applied Biosystems). Spektroskopijom masa dobiveni su podaci o molekularnoj masi analiziranog spoja, a rezultati su prikazani u obliku *m/z* (odnos m/z je veličina karakteristična za svaku vrstu iona, a ako je za većinu iona z = 1, *m/z* predstavlja masu određenog iona).

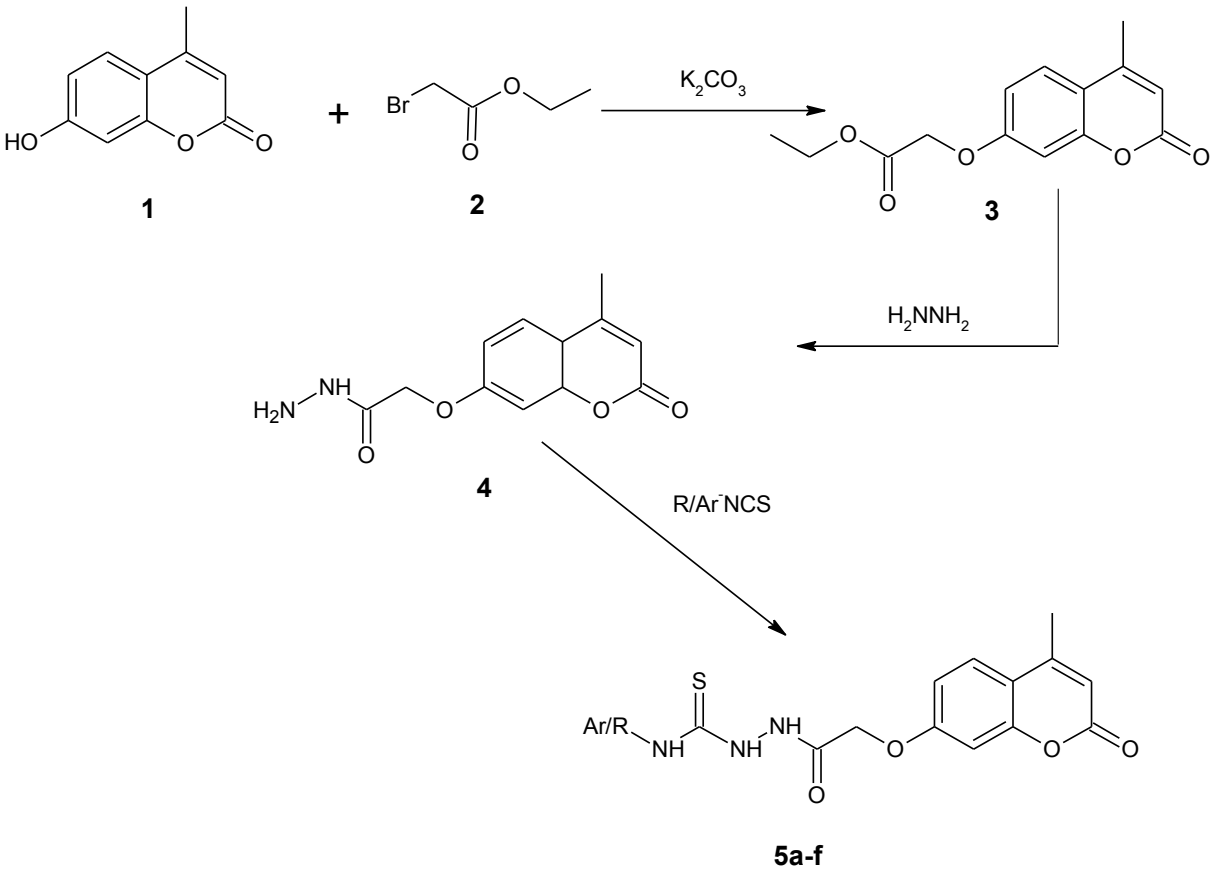
Apsorbancija je određene na Helios*γ* UV spektrofotometru (Thermo Spectronic).

2.2. Shematski prikaz zadatka



Slika 27. Shematski prikaz zadatka: limunska kiselina (**1**); acetondikarboksilna kiselina (**2**); rezorcinol (**3**); (7-hidroksi-2-okso-2*H*-kromen-4-il) octena kiselina (**4**); metilni ester (7-hidroksi-2-okso-2*H*-kromen-4-il) octene kiseline (**5**); 2-(7-hidroksi-2-okso-2*H*-kromen-4-il)acetohidrazid (**6**); 2-(2-(7-hidroksi-2-okso-2*H*-kromen-4-il)acetil)-*N*-supstituiranihidrazin-1-karbotioamid (**7a-g**)

7	R/Ar
a	CH_3
b	C_2H_5
c	fenil
d	2,4,6-triklorofenil
e	4-metilfenil
f	4-metoksifenil
g	4-bromofenil



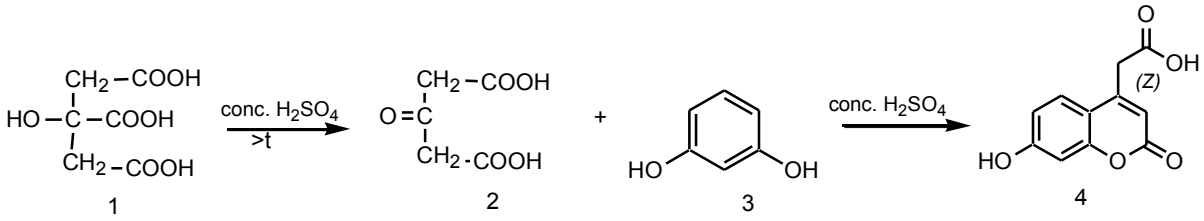
Slika 28. Shematski prikaz zadatka: 7-hidroksi-4-metilkumarin (**1**); etilbromoacetat (**2**); etil [(4-metil-2-okso-2*H*-1-benzopiran-7-il)oksi] acetat (**3**); 2-(4-metil-2-okso-2*H*-kromen-7-iloksi)acetohidrazid (**4**); *N*-supstituirani-2-{[(4-metil-2-okso-2*H*-kromen-7-il)oksi]acetil}hidrazin-1-karbotioamid (**5a-f**)

5	R/Ar
a	CH_3
b	C_2H_5
c	fenil
d	2,4,6-triklorofenil
e	4-metoksifenil
f	4-klorfenil

2.3. Metode

2.3.1. Sinteza tiosemikarbazida

2.3.1.1. Sinteza (7-hidroksi -2-okso-*2H*-kromen-4-il) octene kiseline



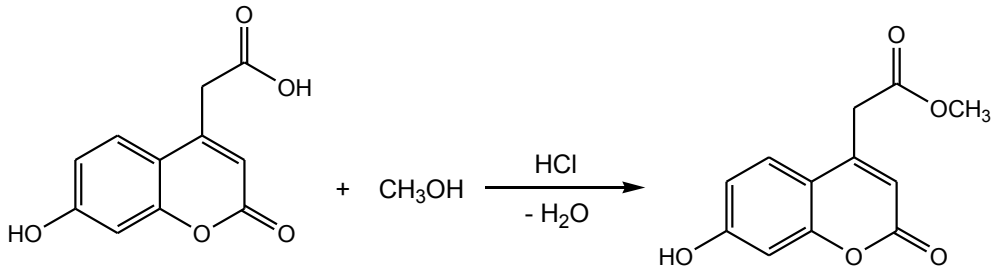
Slika 29. Sinteza (7-hidroksi -2-okso-*2H*-kromen-4-il) octene kiseline

Fino usitnjena limunska kiselina (**1**) (100 g) i koncentrirana sumporna kiselina (135 ml) su pomiješane i mućkane 30 minuta, zatim je reakcijska smjesa (**2**) zagrijavana na 60-70ºC. Temperatura je održavana tijekom pola sata (za to je vrijeme razvijan CO_2 kao nusprodukt). Potom je smjesa ohlađena na sobnu temperaturu, a zatim na –5ºC. Rezorcinol (**3**) (45 g) je dodavan tijekom pola sata pri konstantnoj temperaturi nižoj od +5ºC, a nakon toga je dodana koncentrirana sumporna kiselina (58 ml) u malim količinama u trajanju od 30 minuta. Na samom kraju, reakcijska je smjesa stavljena u hladnjak do sljedećeg dana.

Sljedećeg dana, tako pripremljena smjesa pažljivo je izlivena u smjesu vode i leda uz konstantno miješanje. Nastali su kristali filtrirani, isprani vodom pri čemu je nastao bijeli talog 7-hidroksikumarin-4-octene kiseline (**4**).

2.3.1.2. Sinteza metil (7-hidroksi-2-okso-2H-kromen-4-il) acetata

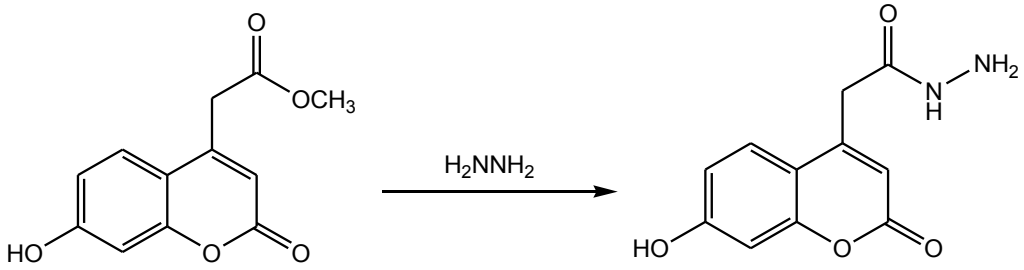
U metanolu (60 ml) je, uz dodatak koncentrirane klorovodične kiseline (5 -10 ml), otopljeno 10 g (7-hidroksi-2-okso-2*H*-kromen-4-il) octene kiseline. Reakcijska je smjesa zatim refluksirana 2-3 sata. Hlađenjem se, smjesa, odnosno ester kristalizirao, a dobiveni kristali su filtrirani u Büchnerovom lijevku, a potom prekristalizirani iz etanola.



Slika 30. Sinteza metil (7-hidroksi-2-okso-2*H*-kromen-4-il) acetata

2.3.1.3. Sinteza 2-(7-hidroksi-2-okso-2*H*-1-benzopiran-4-il) acetohidrazida na bazi (7-hidroksi-2-okso-2*H*-kromen-4-il) octene kiseline

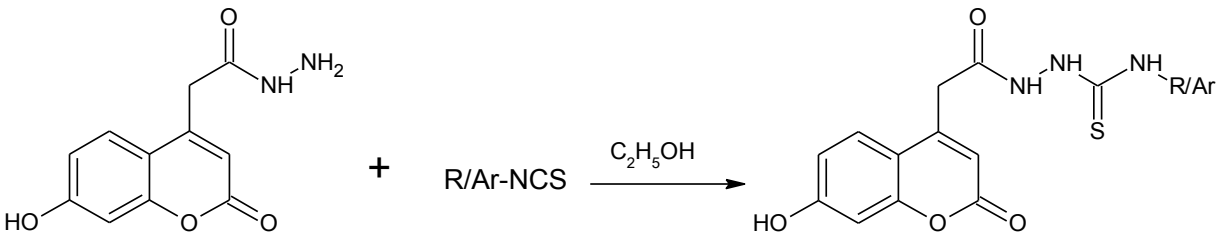
U metanolu (120 ml), uz dodatak 100% hidrazin hidrata (12 ml), otopljeno je 12,40 g metil (7-hidroksi-2-okso-2*H*-kromen-4-il) acetata. Reakcijska smjesa je ostavljena preko noći na temperaturi od 25ºC. Dobiveni je talog profiltriran, ispran u metanolu i prekristaliziran iz razrijeđene octene kiseline ili vode.



Slika 31. Sinteza 2-(7-hidroksi-2-okso-2*H*-1-benzopiran-4-il) acetohidrazida

2.3.1.4. Sinteza 2-(2-(7-hidroksi-2-okso-2*H*-kromen-4-il)acetil)-*N*-supstituiranih-hidrazin-1-karbotioamida na bazi 2-(7-hidroksi-2-okso-2*H*-1-benzopiran-4-il) acetohidrazida

Smjesa 2-(7-hidroksi-2-okso-2*H*-1-benzopiran-4-il) acetohidrazida (0,01 mol) (**1**) i određenog aromatskog ili alifatskog izotiocijanata (0,01 mol) u 20 mL etanola je zagrijavana uz refluksiranje od 3 sata. Po završetku reakcije, reakcijska smjesa je ohlađena. Nastala krutina (tiosemikarbazid) (**7a-g**) je filtrirana na Büchnerovom lijevku, a zatim prekristalizirana iz etanola.

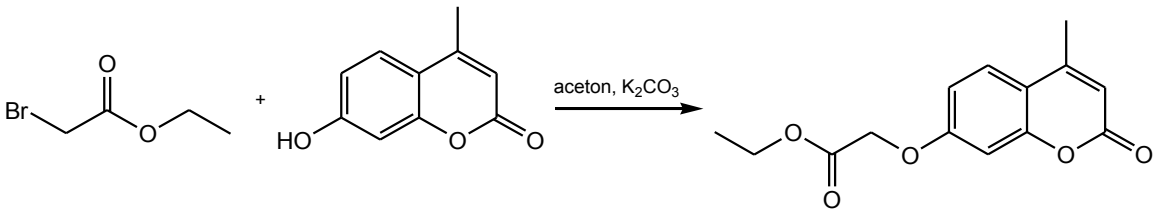


1 **7a-g**

Slika 32. Sinteza 2-(2-(7-hidroksi-2-okso-2*H*-kromen-4-il)acetil)-*N*-supstituiranih-hidrazin-1-karbotioamida na bazi 2-(7-hidroksi-2-okso-2*H*-1-benzopiran-4-il) acetohidrazida

2.3.1.5. Sinteza etil [(4-metil-2-okso-2*H*-1-benzopiran-7-il)oksi]acetata (4-metil-2-okso-*2H*-kromen-7-iloksi) octene kiseline

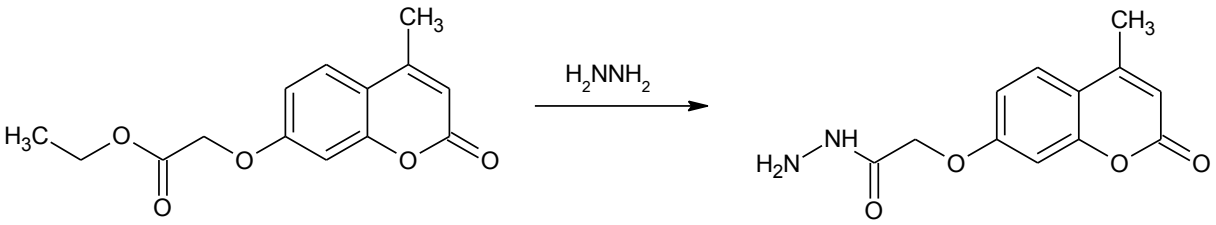
Smjesa 7-hidroksi-4-metil-2*H*-kromen-2-ona (0,11 mol), bezvodnog kalijevog karbonata (0,11 mol) i etilbromacetata (0,11 mol) u suhom acetonu (200 ml) refluksirana je uz neprekidno miješanje 12 sati. Dobiveni produkt je filtriran i prekristaliziran iz etanola.



Slika 33. Sinteza etil [(4-metil-2-okso-2*H*-1-benzopiran-7-il)oksi]acetata (4-metil-2-okso-*2H*-kromen-7-iloksi) octene kiseline

2.3.1.6. Sinteza 2-[(4-metil-2-okso-2*H*-1-benzopiran-7-il)oksi] acetohidrazida (4-metil -2-okso-*2H*-kromen-7-iloksi) octene kiseline

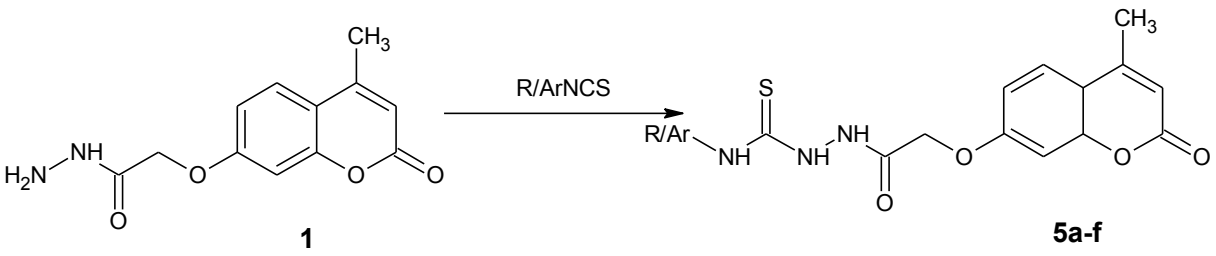
U etanolu (120 ml) uz dodatak 100% hidrazin hidrata (12 ml) otopljeno je 12,40g etil [(4-metil-2-okso-2*H*-1-benzopiran-7-il)oksi]acetata (4-metil-2-okso-*2H*-kromen-7-iloksi) octene kiseline. Reakcijska smjesa je ostavljena preko noći na temperaturi od 25ºC. Dobiveni talog je filtriran, ispran u metanolu i prekristaliziran iz razrijeđene octene kiseline ili vode.



Slika 34. Sinteza 2-[(4-metil-2-okso-2*H*-1-benzopiran-7-il)oksi] acetohidrazida (4-metil -2-okso-*2H*-kromen-7-iloksi) octene kiseline

2.3.1.7. Sinteza *N*-supstituiranih-2-{[(4-metil-2-okso-2*H*-kromen-7-il)oksi]acetil}hidrazin-1-karbotioamida (4-metil-2-okso-*2H*-kromen-7-iloksi) octene kiseline

Smjesa 2-[(4-metil-2-okso-2*H*-1-benzopiran-7-il)oksi] acetohidrazida (4-metil -2-okso-*2H*-kromen-7-iloksi) octene kiseline (0,01 mol) (**1**) i određenog aromatskog ili alifatskog izotiocijanata (0,01 mol) u 20 mL etanola je zagrijavana uz refluksiranje 3 sata. Po završetku reakcije, reakcijska je smjesa ohlađena. Nastala krutina (tiosemikarbazid) (**5a-f**) je profiltrirana na Büchnerovom lijevku, a zatim prekristalizirana iz etanola.



Slika 35. Sinteza *N*-supstituiranih-2-{[(4-metil-2-okso-2*H*-kromen-7-il)oksi]acetil}hidrazin-1-karbotioamida (4-metil-2-okso-*2H*-kromen-7-iloksi) octene kiseline

2.3.2. Ispitivanje antioksidacijske aktivnosti

2.3.2.1. DPPH metoda

Mjerenje antioksidacijske aktivnosti DPPH metodom izvedeno je prema modificiranoj metodi, prema Wu i sur., 2007. Budući da su sintetizirani spojevi slabo topljivi u organskim otapalima kao što su metanol i etanol, u ovom je eksperimentalnom radu kao pogodno otapalo korišten DMSO (dimetilsulfoksid) (Taskova i sur., 2003).

Postupak:

0,75 mL DMSO otopine sintetiziranog spoja (0,2 mM) pomiješano je s 0,75 mL DMSO otopine DPPH radikala (0,2 mM), tako da je konačna koncentracija DPPH radikala i sintetiziranog spoja bila 0,1 mM. Smjesa je dobro promiješana i inkubira na sobnoj temperaturi 30 minuta. Nakon inkubacije izmjerena je apsorbancija pri λ = 517 nm. Kao kontrola korištena je 0,1 mM otopina DPPH radikala, a kao standard askorbinska kiselina. Sva mjerenja su provedena u tri paralele. Sposobnost hvatanja slobodnih DPPH radikala je izračunata prema sljedećoj formuli:

$$\%\ hvatanja\ DPPH\ radikala = \frac{Ab + As - Am}{\mathrm{Ab}} \mathrm{x}\ 100$$

gdje su:
Ab – apsorbancija 0,1 mM DMSO otopine DPPH radikala pri λ = 517 nm; *As* – apsorbancija 0,1 mM DMSO otopine čistog testiranog spoja pri λ = 517 nm (slijepa proba spoja); *Am* – apsorbancija 0,1 mM DMSO otopine smjese testiranog spoja i DPPH radikala pri 517 nm.

3. REZULTATI

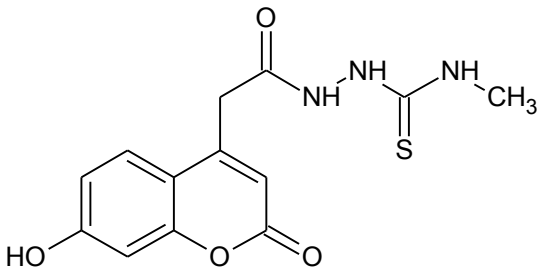
3. REZULTATI

3.1. Sintetizirani spojevi

3.1.1. 2-[(7-hidroksi-2-okso-2*H*-1-benzopiran-4-il)acetil]-*N*-metilhidrazin-1-karbotioamid (7a)

T_t=>300 ºC, I=42 %, R_f=0,3437, Boja: bijela

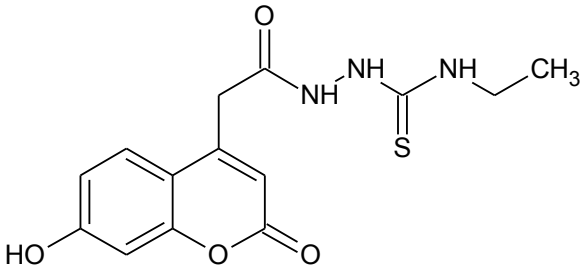
MS *m/z*: 306,10 [M-H^+] , (M=307,332)



3.1.2. *N*-etil-2-[(7-hidroksi-2-okso-2*H*-1-benzopiran-4-il)acetil]hidrazin-1-karbotioamid (7b)

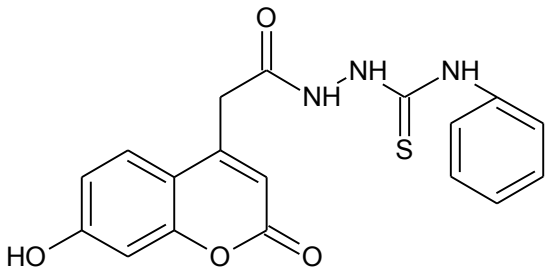
T_t= 282 ºC, I=91 %, R_f=0,3437, Boja: bijela

MS *m/z*: 320,10 [M-H^+] , (M=321,35)



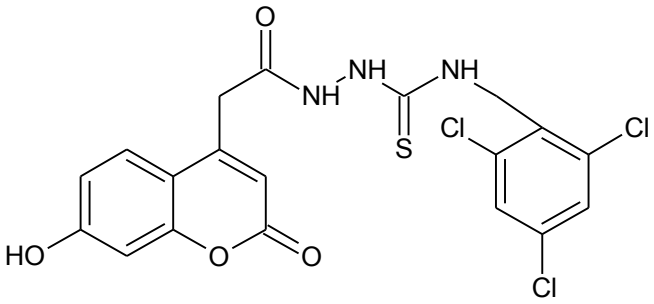
3.1.3. 2-[(7-hidroksi-2-okso-2*H*-1-benzopiran-4-il)acetil]-*N*-fenilhidrazin-1-karbotioamid (7c)

T_t= 207 ºC, I=82 %, R_f=0,7813, Boja: bijela
MS *m/z*: 368,10 [M-H^+] , (M=369,39)



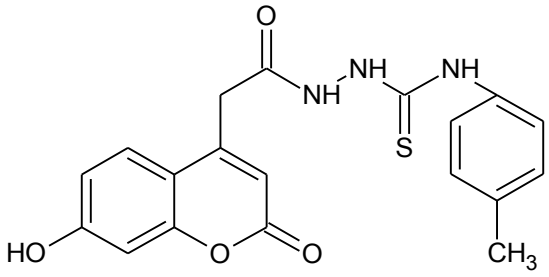
3.1.4. 2-[(7-hidroksi-2-okso-2*H*-1-benzopiran-4-il)acetil]-*N*-[(2,4,6 triklorofenil)metil]hidrazin-1-karbotioamid (7d)

T_t= 159 ºC, I=87 %, R_f=0,3281, Boja: bijela
MS *m/z*: 472,10 [M-H^+] , (M=472,729)



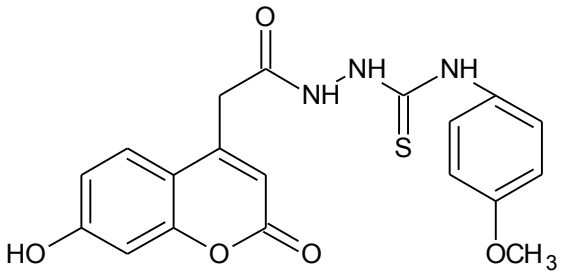
3.1.5. 2-[(7-hidroksi-2-okso-2*H*-1-benzopiran-4-il)acetil]-*N*-(4-metilfenil)hidrazin-1-karbotioamid (7e)

T_t=186 ºC, I=73 %, R_f=0,2968, Boja: bijela
MS *m/z*: 382,20 [M-H^+], (M=383,42)



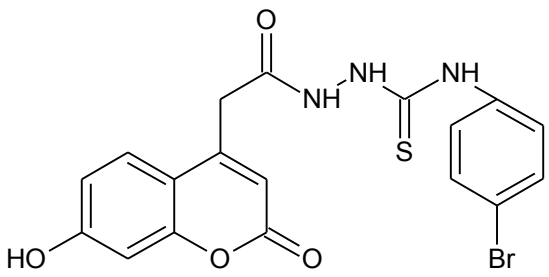
3.1.6. 2-[(7-hidroksi-2-okso-2*H*-1-benzopiran-4-il)acetil]-*N*-(4-metoksifenil)hidrazin-1-karbotioamid (7f)

T_t=236 ºC, I=81 %, R_f=0,3437, Boja: bijela
MS *m/z*: 398,10 [M-H^+], (M=399,42)



3.1.7. *N*-(4-bromofenil)-2-[(7-hidroksi-2-okso-2*H*-1-benzopiran-4-il)acetil]hidrazin-1-karbotioamid (7g)

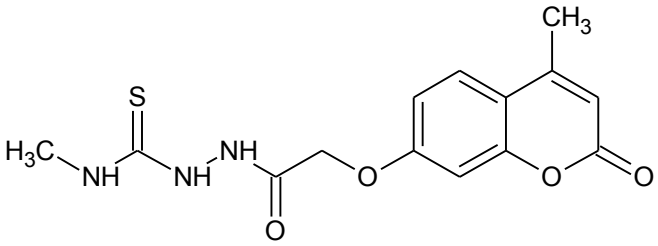
T_t=, I=44 % R_f=0,2968, Boja: bijela
MS *m/z*: 448,20 [M-H^+], (M=448,29)



3.1.8. *N*-metil-2-{[(4-metil-2-okso-2*H*-1-benzopiran-7-il)oksi]acetil}hidrazin-1-karbotioamid (5a)

T_t=, I=46 %, R_f=0,2656, Boja: bijela

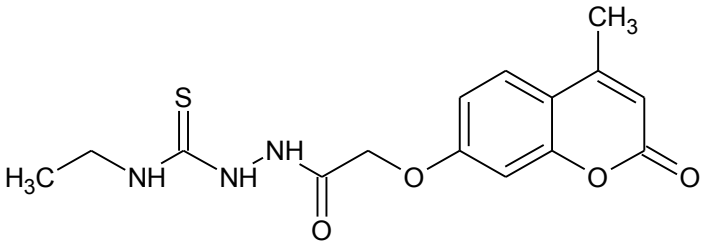
MS *m/z*: 320,20 [M-H^+], (M=321,35)



3.1.9. *N*-etil-2-{[(4-metil-2-okso-2*H*-1-benzopiran-7-il)oksi]acetil}hidrazin-1-karbotioamid (5b)

T_t=, I=46 %, R_f=0,328, Boja: bijela

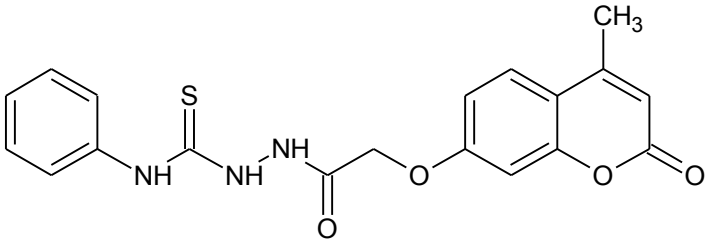
MS *m/z*: 334,20 [M-H^+] , (M=335,38)



3.1.10. 2-{[(4-metil-2-okso-2*H*-1-benzopiran-7-il)oxy]acetil}-*N*-fenilhidrazin-1-karbotioamid (5c)

T_t=, I=86 % R_f=0,4844, Boja: bijela

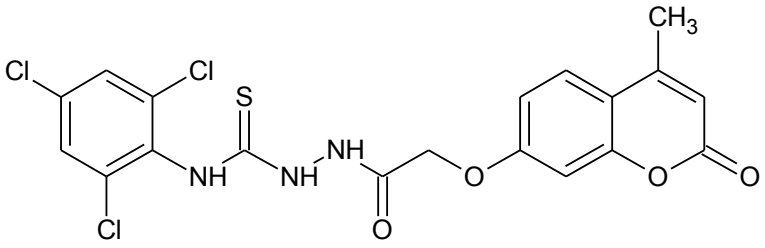
MS *m/z*: 382,64 [M-H^+], (M=383,42)



3.1.11. 2-{[(4-metil-2-okso-2*H*-1-benzopiran-7-il)oksi]acetil}-*N*-(2,4,6-triklorofenil)hidrazin-1-karbotioamid (5d)

T_t=, I=84 % R_f=0,5625, Boja: bijela

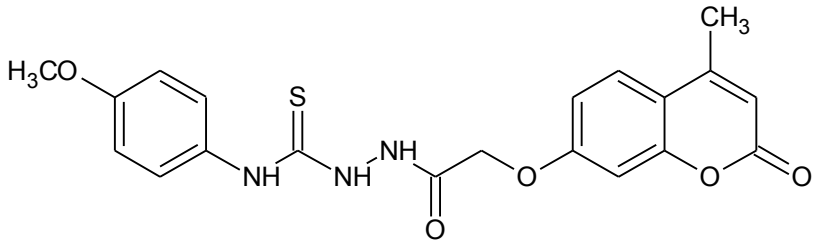
MS *m/z*: 484,30 [M-H^+], (M=486,756)



3.1.12. *N*-(4-metoksifenil)-2-{[(4-metil-2-okso-2*H*-1-benzopiran-7-il)oksi]acetil}hidrazin-1-karbotioamid (5e)

T_t=, I=52 % R_f=0,4688, Boja: bijela

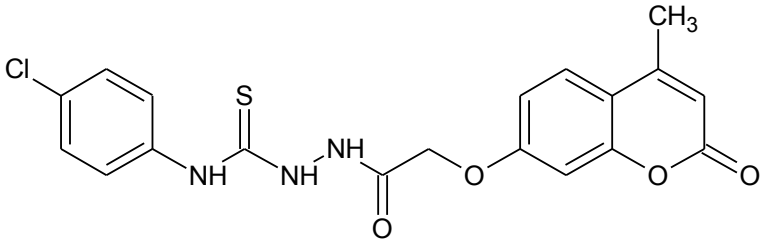
MS *m/z*: 412,10 [M-H^+], (M=413,45)



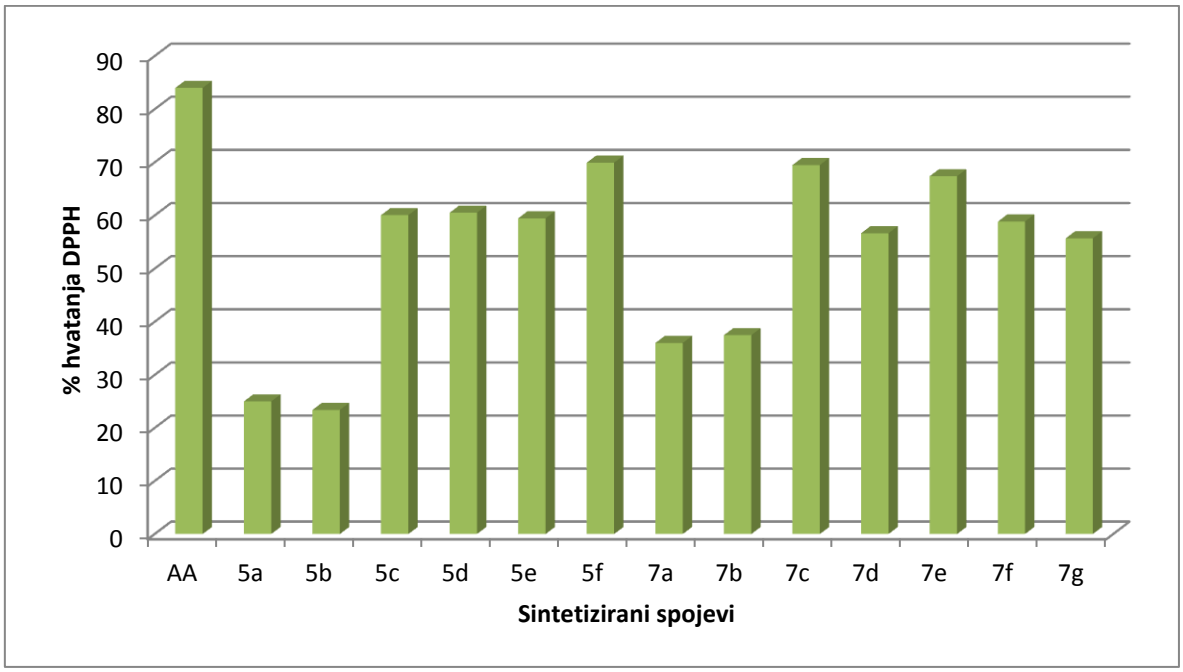
3.1.13. *N*-(4-klorofenil)-2-{[(4-metil-2-okso-2*H*-1-benzopiran-7-il)oksi]acetil}hidrazin-1-karbotioamid (5f)

T_t=, I=77 %, R_f=0,9218, Boja: bijela

MS *m/z*: 417,50[M-H^+], (M=417,86)



3.2. Antioksidacijska aktivnost



Slika 36. Antioksidacijska aktivnost tiosemikarbazida izražena kao % hvatanja DPPH radikala, određena spektrofotometrijski

4. RASPRAVA

4. RASPRAVA

4.1. Sinteza tiosemikarbazida

Dosad objavljene metode sinteze tiosemikarbazida uključuju reakciju izoticijanata s hidrazinom, najčešće korištenu metodu sinteze koja je primijenjena i u ovome radu (Katritzky i sur., 2006). Za sintezu ciljanih spojeva najprije je bilo potrebno sintetizirati prekursore istih. Za prvu seriju spojeva (**7a-g**) najprije se limunska kiselina tretira koncentriranom H_2SO_4 prilikom čega nastaje acetondikarboksilna kiselina koja u reakciji s rezorcinolom daje (7-hidroksi-2-okso-2*H*-kromen-4-il) octenu kiselinu, prvi značajni prekursor u sintezi tiosemikarbazida. Esterifikacijom navedene kiseline u metanolu nastaje metilni ester (7-hidroksi-2-okso-2*H*-kromen-4-il) octene kiseline iz kojega, uz dodatak hidrazina nastaje 2-(7-hidroksi-2-okso-2*H*-kromen-4-il) acetohidrazid. Reakcijom različitih izoticijanata s 2-(7-hidroksi-2-okso-2*H*-kromen-4-il) acetohidrazidom nastaju krajnji željeni produkti, odnosno tiosemikarbazidi (**7a-g**) supstituirani na položaju 4 kumarinske jezgre. (Slika 27.).

U drugoj seriji spojeva (**5a-5f**) tretiranjem rezorcinola s etil acetoacetatom u prisutnosti sumporne kiseline dobiven je 7-hidroksi-4-metilkumarin koji je u daljnjoj reakciji s etilbromoacetatom uz K_2CO_3 dao etil [(4-metil-2-okso-2*H*-1-benzopiran-7-il)oksi] acetat. Reakcijom estera s hidrazin hidratom dobiven je 2-(4-metil-2-okso-2*H*-kromen-7-iloksi) acetohidrazid (Satyanarayana i sur., 2008) koji je poslužio kao polazni supstrat za sintezu ciljanih *N*-supstituiranih-2-{[(4-metil-2-okso-2*H*-kromen-7-il)oksi]acetil}hidrazin-1-karbotioamida (**5a-f**) supstituiranih u položaju 7 kumarinske jezgre (Slika 28.).

U reakciji dobivanja tiosemikarbazida s određenim supstituentima dobiveni su tiosemikarbazidi s alkilnim i arilnim skupinama kao supstrati za određivanje antioksidacijske aktivnosti.

Tijek svih reakcija provedenih u ovom radu praćen je tankoslojnom kromatografijom. Izostanak točke za polazni spoj, hidrazid, ukazao je na završetak reakcije. Reakcije su uglavnom trajale 3-4 sata, uz refluks. Reakcije s pojedinim izotiocijanatima, kao što su 4-bromofenilizotiocijanat ili pak 4-klorofenilizotiocijanat su išle znatno sporije te su se odvijale dulje od 4 sata. TLC je također bila prvi indikator

čistoće dobivenih spojeva. R_f vrijednosti dobivenih spojeva su se razlikovale od polaznih spojeva, hidrazida, i međusobno, a karakterizacija spoja pomoću samo jedne R_f vrijednosti već je u ovom koraku ukazala na čistoću spoja. Nepročišćene spojeve bilo je potrebno pročistiti iz etanola. Tek kad su se spojevi pokazali čistima (jedna R_f vrijednost) na TLC-u, uslijedila je daljnja karakterizacija spojeva.

Nakon pročišćavanja i sušenja spojeva, slijedilo je određivanje točaka tališta. Točke tališta novih spojeva su se u pravilu razlikovale od polaznog spoja, tj. hidrazida, kao i međusobno. Prije određivanja točaka tališta od presudne je važnosti spoj dobro posušiti kako se ne bi dobile niže točke tališta od stvarnih. Osim toga, za nedovoljno čiste spojeve, dobiju se točke tališta različite od točaka tališta čistog spoja. Usporedbom točaka tališta spojeva koji su već bili poznati iz literature (Satyanarayana i sur. 2008; Ahluwalia i sur., 1983) također je potvrđeno da su dobiveni željeni spojevi, što je korisna metoda identifikacije spojeva.

Nakon provjere čistoće na TLC-u i određivanja točaka tališta, slijedila je spektrometrija masa. Spektri masa tiosmikarbazida pokazivali su molekularne ione za sve novosintetizirane spojeve što ukazuje da su željeni spojevi dobiveni. Rezultati spektara masa poklapali su se s molarnim masama dobivenih spojeva čime je, uz mjerenje točaka tališta, nedvojbeno dokazano da dobiveni spojevi uistinu pripadaju tiosemikarbazidima.

4.2. Antioksidacijska aktivnost

Biološka aktivnost tiosemikarbazida potječe od liganada, točnije supstituiranih dušikovih i sumpornih atoma. Zahvaljujući C=S, $-NH_2$ i –NH- te nekim drugim funkcionalnim skupinama, tiosemikarbazidi su značajni antioksidansi, tj. pomažu stabilizaciju polimera protiv termalne oksidacije (Sabaa i Abdel-Naby, 1999). Stoga je bilo za pretpostaviti kako će se sintetizirani spojevi pokazati kao dobri antioksidansi. Antioksidacijska aktivnost tiosemikarbazida, prije svega, može se pripisati prisutnosti sumpora (C=S) (Nikolaides i sur., 1988), iako je očito da supstitucija na fenilnom prstenu također ima vrlo značajan učinak. Osim toga, izrazita antioksidacijska aktivnost se može pripisati otpuštanju elektrona i potom vodikova atoma iz tiosemikarbazidne molekule pri čemu nastaje rezonancijom stabilizirana struktura.

Antioksidacijska aktivnost određena je pomoću DPPH metode. DPPH je slobodni radikal koji može reagirati putem prijenosa vodikovog atoma ili elektrona, a mehanizam uvelike ovisi o otapalu. DPPH u nepolarnim otapalima reagira putem oduzimanja vodika, dok je u polarnim otapalima, kao što su etanol i metanol, dominirajući mehanizam prijenos elektrona, nakon kojeg slijedi prijenos vodika (Yeo i sur., 2010). Budući da je korišteno otapalo DMSO, u kojem je topljivost sintetiziranih spojeva dobra, jako polarno otapalo, bilo je za pretpostaviti da je mehanizam hvatanja DPPH radikala putem prijenosa elektrona, nakon kojega slijedi prijenos vodika.

Prema antioksidacijskoj aktivnosti, izraženoj kao % hvatanja DPPH radikala, ispitani tiosemikarbazidi mogu se svrstati u 3 skupine. Prva skupina su spojevi koji pokazuju dobru (> 40%), druga skupina oni koji pokazuju umjerenu (20-40%), dok su treća skupina spojevi koji ne pokazuju antioksidacijsku aktivnost.

Iz dobivenih rezultata (Slika 36.), vidljivo je da najbolju antioksidacijsku aktivnost pokazuje spoj **5f** (69,94 %DPPH) koji je supstituiran 4-klorofenilnom skupinom. U obje serije spojeva TSC s fenilnim prstenom bez supstituenata (**5c**, **7c**) pokazali su izuzetnu antioksidacijsku aktivnost (**5c**-60 %DPPH; **7c**-69,49 %DPPH) koja je ipak nešto izraženija kod serije spojeva supstituiranih na položaju 4 kumarina gdje je navedeni TSC (**7c**) najjači antioksidans. Također, kao izuzetni antioksidansi pokazuju se tiosemikarbazidi s arilnom skupinom (**5c-f**, **7c-g**), odnosno različitim supstituentima na fenilnom prstenu kao što su 4-metoksifenilna (**5e**, **7f**) ili pak tolilna skupina (**7e**). Uspoređujući obje serije spojeva, u prvoj seriji značajniju antioksidacijsku aktivnost imaju spojevi gdje je na fenilni prsten supstituirana metilna (**7e**) ili 4-metoksi (**7f**) skupina (**7e** > **7f** > **7d** > **7g**), dok su se u drugoj seriji spojeva kao bolji antioksidansi pokazali spojevi kod kojih su na fenilni prsten vezani halogeni elementi, *p*-Cl > 2,4,6-$(Cl)_3$ > 4-OCH_3 (**5f** > **5d** > **5e**).

S druge pak strane, tiosemikarbazidi s alkilnom skupinom (metil-**5a**, **7a**; etil-**5b**, **7b**) pokazuju umjerenu aktivnost. Uspoređujući serije spojeva s alkilnom skupinom (**5a-b**, **7a-b**), zamijećena je značajna korelacija unutar svake, tj. antioksidacijska aktivnost spojeva s metilnom i etilnom skupinom unutar iste serije ima podjednake vrijednosti. Razlika je pak u tome što u seriji spojeva s alkilnom

skupinom (**7a-b**) TSC s etilnom skupinom (**7b**) pokazuje neznatno veću antioksidacijsku aktivnost, dok u seriji spojeva (**5a-b**) veću antioksidacijsku aktivnost pokazuje TSC supstituiran metilnom skupinom (**5a**). TSC s alkilnom skupinom (**7a-b**), pokazuju znatno veću antioksidacijsku aktivnost od TSC-a (**5a-b**), što znači da supstitucija u položaju 4 kumarinske jezgre s ovim skupinama pogoduje povećanju antioksidacijske aktivnosti. Ako se usporedi supstitucija s arilnim skupinama obje serije spojeva, trend nije isti kao prethodno opisani. Nijedan tiosemikarbazid ne pokazuje veću antioksidacijsku vrijednost od standarda, odnosno askorbinske kiseline (AA).

Zbog širokog spektra bioloških aktivnost, prije svega antioksidacijske aktivnosti, tiosemikarbazidi će biti značajni predmet daljnjega istraživanja, kako kemijske, tako i farmaceutske industrije.

5. ZAKLJUČAK

5. ZAKLJUČAK

Na temelju dobivenih rezultata istraživanja, mogu se izvesti sljedeći zaključci:

- Kondenzacijom hidrazida (**4**) s izotiocijanatima dobiveni su tiosemikarbazidi, supstituirani različitim skupinama, alikilnim i arilnim, u položaju 7 kumarinske jezgre, a vrijeme same reakcije ovisi o primijenjenom izotiocijanatu.

- Kondenzacijom hidrazida (**6**) s izotiocijanatima dobiveni su tiosemikarbazidi, supstituirani različitim skupinama, alikilnim i arilnim, u položaju 4 kumarinske jezgre, a vrijeme same reakcije ovisi o primijenjenom izotiocijanatu.

- Struktura i čistoća 13 sintetiziranih spojeva potvrđena je različitim metodama.

- Najbolja aktivnost hvatanja DPPH radikala utvrđena je kod tiosemikarbazida s različitim supstituentima na fenilnom prstenu (**5f** > **7e** > **5d** > **5e** > **7f** > **7d** > **7g).**

- Dobra antioksidacijska aktivnost utvrđena je kod tiosemikarbazida s arilnom skupinom (**5c-f**, **7c-g**).

- Umjerena aktivnost hvatanja DPPH radikala utvrđena je kod tiosemikarbazida s alkilnom skupinom (metil-**5a**, **7a**; etil-**5b**, **7b**).

- Tiosemikarbazidi **5f** i **7c**, zbog izrazite antioksidacijske aktivnosti, odličan su model za daljnu sintezu novih, učinkovitijih sredstava s antioksidacijskom aktivnošću.

6. METODIČKI DIO

6. METODIČKI DIO

Priprema za izvođenje nastave

<table>
<tr><td colspan="2">Predmetni učitelj: Marinko Tomić</td><td>odjel</td><td>nadnevak</td></tr>
<tr><td colspan="2">Nastavni predmet: Kemija</td><td>Međupredmetna povezanost:
Biologija</td><td rowspan="2">4. razred gimnazije</td><td rowspan="2">2015./2016.</td></tr>
<tr><td colspan="2">Nastavna jedinica: ARENI: Struktura benzena i aromatičnost; Nomenklatura arena</td></tr>
<tr><td colspan="5">KLJUČNI POJMOVI: areni, benzenski prsten, nezasićenost, polinuklearni aromatski ugljikovodici, rezonancijske strukture, delokalizirani elektroni, poliklorirani bifenili</td></tr>
<tr><td>CILJ</td><td colspan="4">Upoznati se s građom i nomenklaturom aromatskih ugljikovodika (arena) te s njihovim predstavnicima u svakodnevnom životu.</td></tr>
<tr><td rowspan="3">POSTIGNUĆA</td><td colspan="4">Naučiti kako su građene molekule aromatskih ugljikovodika (sadrže benzenski prsten) te se upoznati s IUPAC-ovom nomenklaturom istih. Uspoređujući strukturne formule različitih spojeva, prepoznati koji su aromatični te o čemu ovisi stabilnost nekoga spoja.</td></tr>
<tr><td colspan="4">Primjena polinuklearnih aromatskih ugljikovodika u svakodnevnom životu, prvenstveno u prehrani (voće) kao jakih antioksidanasa (kumarin, tiosemikarbazid). Ukazati na važnost kontrolirane prehrane te zdravoga načina života (naglasiti izrazito kancerogene spojeve u cigaretnom dimu te štetnost hrane s roštilja).</td></tr>
<tr><td colspan="4">Razviti sposobnosti sigurnoga i urednoga rukovanja kemijskim priborom i kemikalijama tijekom izvođenja pokusa. Razraditi logičko razmišljanje te uspostavljanje uzročno-posljedičnih veza.</td></tr>
</table>

ISHODI UČENJA: učenik će biti sposoban

1. Opisati građu aromatskih ugljikovodika (arena)

1.1. Navesti odakle potječe naziv „aromatski ugljikovodici“ (R1)

1.2. Objasniti kemijsku strukturu arena (R1)

1.3. Definirati pojam „aromatičnost“ na primjeru nekih organskih molekula (koristeći strukturne formule toluena, kumarina, cikloheksana i benzo[*a*]pirena- izbaciti uljeza) (R1)

2. Upoznati se s građom benzena

2.1. Objasniti pojam „aromatičnosti“ te četverovalentnost ugljika na samome benzenu (R2)

2.2. Navesti tko je zaslužan za nastanak prve strukture molekule benzena (Kekulé-ov model) (R1)

2.3. Samostalno napisati strukturnu i molekulsku formulu benzena (R1)

2.4. Analizirati i definirati rezonancijsku strukturu benzena te stabilnost samoga benzenskog prstena uzrokovanu raspodjelom π elektrona preko čitavog prstena (R3)

3. Objasniti princip nomenklature arena

3.1. Pomoću IUPAC-ove nomenklature imenovati pojedine aromatske spojeve (R1)

3.2. Razumjeti položaj supstituenata u benzenskom prstenu (*orto-, meta-* i *para-* položaj) (R2)

3.3. Koristeći strukturnu formulu kumarina objasniti princip nomenklature aromatskih ugljikovodika s više benzenskih prstena (R2).

4. Usporediti korisnu i štetnu primjenu arena u svakodnevnom životu

4.1. Definirati najvažnije predstavnike polinuklearnih aromatskih ugljikovodika u cigaretnom dimu i mesu pečenom na roštilju (R1)

4.2. Razlikovati oksidanse i antioksidane te princip po kojem funkcioniraju u biološkim sustavima (R2)

4.3. Samostalno spoznati i argumentirati koje su važnosti zdrave ishrane (navesti koja je hrana bogata aromatskim ugljikovodicima, poput kumarina i tiosemikarbazida koji su snažni antioksidansi) (R1)

4.4. Analizirati kako nekontroliranom ishranom može doći do različitih bolesti, npr. karcinoma (uzrok su areni, poput polikloriranog bifenila ili benzo[*a*]pirena) (R2).

TIP SATA: obrada/ upoznavanje novih sadržaja, vježbanje, ponavljanje

Etape nastavnog sata (artikulacija)	**SOCIJALNI OBLICI RADA:**
Uvodni dio: Na samom početku sata, učenici će pomoću par usmenih pitanja ponoviti gradivo s prethodnog sata (alkini).	frontalni individualni grupni rad

Glavni dio:

Što mislite, zbog čega je pušenje štetno, što se zapravo nalazi u cigaretnom dimu?- uvodno pitanje u glavni dio.

Ovisno o dobivenim odgovorima (treba očekivati da će neki učenici i znati odgovor na to pitanje), prilagoditi tijek sata. Definirati aromatske ugljikovodike te pokušati uz pomoć strukturnih formula različitih spojeva objasniti pojam „aromatičnosti“.

Nacrtati strukturu benzena na ploču te raspraviti s učenicima na što ih podsjeća prikazani spoj, jesu li se već susretali s njim negdje (pretpostavka je da će učenici znati o kojem je spoju riječ te da će većini on predstavljati „simbol“ za kemiju prolongiran različitim ilustracijima na društvenim mrežama ili pak u medijima). Na temelju prikazane strukture (na ploči) analizirati benzen.

Spomenuti povijesni razvoj molekule benzena (Kekulé-ov model), na osnovu izbrojanih atoma izvesti molekulsku formulu benzena. Detaljno pojasniti aromatičnost na primjeru benzena i važnost delokaliziranih elektrona te njihov utjecaj na stabilnost samoga spoja. Na primjeru rezonancijskih struktura učenicima predočiti kako su elektroni u elektronskom oblaku u stalnom „pokretu“.

Izvodeći učenike pred ploču, krenuvši od najjednostavnijih spojeva (npr. metil benzen), obraditi osnove IUPAC-ove nomenklature arena. Nakon toga, slijedi upoznavanje učenika s nekim predstavnicima arena. Ukratko opisati ulogu nekih od njih (kao što je dioksin iz skupine polikloriranih bifenila) te ukazati na posljedice pušenja i nezdrave ishrane (roštilj). Nadalje, spomenuti učenicima „korisne“ arene iz voća, spojeve s više benzenskih prstena, koji djeluju kao snažni antioksidansi (kumarini) te ukazati na važnost uravnotežene prehrane.

Podijeliti učenike u 4 grupe, a nastavnik će iz svake skupine odabrati učenika koji će izvesti pokus. Postupak pokusa je u Prilogu 1.

Završni dio:

Na temelju pokusa zaključiti koja su najosnovnija svojstva benzena (arena). Pokus će biti odlična uvertira u sljedeći sat (obrada Arena je predviđena u više nastavnih sati) kada je predviđena detaljna obrada fizikalnih i kemijskih svojstva arena kroz razne eksperimentalne zadatke.

NASTAVNE METODE:

metoda praktičnog rada, razgovora, usmenog izlaganja, pisanja

NASTAVNA SREDSTVA I POMAGALA

- slike
- pribor i kemikalije
- kompjutor, projektor, ppt, ploča ,nastavni listići

IZVORI ZA PRIPREMANJE NASTAVNIKA

D. Stričević, B. Sever; Temelji organske kemije; Profil, 2008., Zagreb

POTREBNO PRIPREMITI (posuđe, tvari):

Navedeno u Prilogu 1.

ZADACI ZA UČENIKE S POSEBNIM POTREBAMA:

1. Navedi odakle potječe naziv „aromatski ugljikovodici”?

2. Napiši strukturnu i molekulsku formulu benzena! Kakav je omjer ugljika i vodika u molekuli benzena?

3. Prilikom izvođenja pokusa, na što trebamo pripaziti ukoliko koristimo benzen?

4. Kako su raspoređeni elektroni u molekuli benzena?

5. Navedi barem jednog predstavnika polinuklearnih aromatskih ugljikovodika!

6. Koja je uloga antioksidanasa u biološkim sustavima?

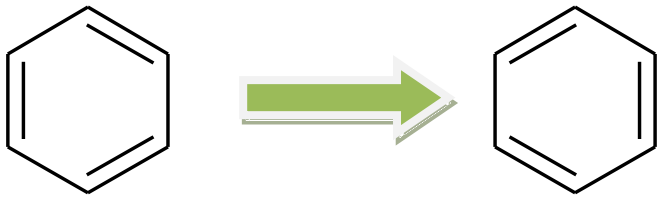
Prikaz sadržaja na školskoj ploči, plakatu, projekciji, nastavnim listićima:

ARENI-uvod

ARENI (aromatski ugljikovodici)- nezasićeni ciklički ugljikovodici

- spojevi s mirisom, aromom (npr. kumarin- miris vanilije ili pokošenog sijena)

AROMATIČNOST: stabilnost spojeva koji u svojoj strukturi imaju nezasićeni prsten od 6 C atoma ⟶ **BENZENSKI PRSTEN**



REZONANCIJA BENZENA

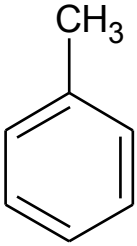
OPĆA FORMULA:

C_6H_6

- Kekulé-ov model (1865.)

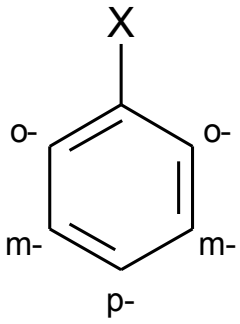
IMENOVANJE:

-imena vezanih supstituenata navode se abecednim redom, npr.

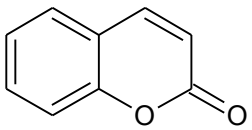


metil**benzen** (toluen)

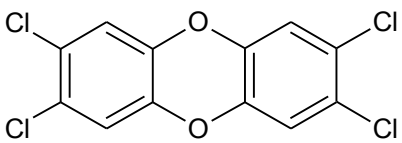
Položaj supstituenata u benzenskom prstenu u odnosu na supstituent X:



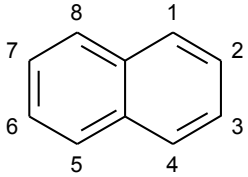
Spojevi s više benzenskih prstena:



a) kumarin



b) dioksin



c) naftalen

PRILOG 1

Pokus 1.

POKUS SMIJE IZVODITI SAMO NASTAVNIK ILI UČENIK KOJEM JE NASTAVNIK DAO DOPUŠTENJE.

Pribor i kemikalije:

epruveta, gumeni čep, stalak za epruvete, čaša, kartuša, porculanska zdjelica, treščica, šibice, voda, benzen

Postupak:

U epruvetu se ulije 4 do 5 mL vode i 1 do 2 mL benzena. Začepi se gumenim čepom, snažno promućka i odloži u stalak za epruvete. Nakon kratkog vremena izdvoje se dva sloja.

U kojem se sloju nalazi voda, a u kojem benzen? Argumentirajte svoj odgovor!

Epruveta e zatim odčepi i pažljivo stavi u čašu s vodom prethodno zagrijanom do vrenja. Sadržaj epruvete izlije se u porculansku zdjelicu i površini tekućine prinese zapaljena treščica.

Koje je boje benzen? Kojom bojom plamena gori?

.

7. LITERATURA

7. LITERATURA

Abid M, Azam A. 2005. *Bioorg. Med. Chem.* 13:2213–2220.

Agrawal KC, Sartorelli AC. 1978. The chemistry and biological activity of alpha -(N)-heterocyclic carboxaldehyde thiosemicarbazones. *Prog. Med. Chem.*, 15:321-56.

Ahluwalia VK, Anand S, Goyal M, Neghipur GA: 1983. Synthesis of N-benzilidene derivates of 7-hydroxy-4-methyl (or phenyl) coumarin as potential fungicides and bactericides. *Journal of Antibacterial and Antifungal Agents* 11:622-626.

Alamed J, Chaiyasit W, McClements DJ, Decker EA. 2009. Relationships between free radical scavenging and antioxidant activity in foods. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 57:2969-2976.

Alves AJ, Leite ACL, Santana D ,Beltrao TM, Coelho MRD. 1993. Synthesis of 2-thiazolinone as potential antiprotozoal activity. *Il Farmaco* 48:1167.

Antolovich M, Prenzler PD, Patsalides E, McDonald S, Robards K. 2002. Methods for testing antioxidant activity. *Analyst* 127:183-198.

Aslam K, Khosa MK, Jahan N, Nosheen S. 2010. Synthesis and applications of coumarin. *Pak. J. Pharm. Sci.* 23:449-454.

Bagihallia GB, Patila S A, Badami PS. 2009. Synthesis, physicochemical investigation and biological studies of zinc(II) complexes with 1,2,4-triazole Schiff bases. *Journal of the Iranian Chemical Society*, 6:259–270.

Baker W, Haksar CN, McOmie JF. 1950. Flourescent reagents. Acyl chlorides and acyl hydrazides. *Journal of the Chemical Society* 170–173.

Basak P, Gangopadhyay, S.De, M.G.B.Drew, Gangopadhyay PKW. 2010. *Inorg. Chim. Acta* 363:1495.

Bhat AR, Athar F, Van Zyl RL, Chen CT, Azam A. 2008. Synthesis and biological evaluation of novel 4-substituted 1-{[4-(10,15,20-triphenylporphyrin-5 yl)phenyl]methylidene} Thiosemicarbazides as new class of potential antiprotozoal agents. *Chem. Biodivers. 5*:764-776.

Bondet V, Brand-Williams W, Berset C. 1997. Kinetics and mechanisms of antioxidant activity using the DPPH free radical method. *Lebensmittel-Wissenschaft & Technologie* 30:609-615.

Borges F, Roleira F, Milhazes N, Santana L, Uriarte E. 2005. Simple Coumarins and Analogues in Medicinal Chemistry: Occurrence, synthesis and biological activity. *Current Medicinal Chemistry* 12:887–916.

Bourinbaiar AS, Tan X, Nagomy R. 1993. Inhibitory effect of coumarins on HIV-1 replication and cell-mediated or cell-free viral transmission. *Acta Virol.* 37:241-250.

Brand-Williams W, Cuvelier ME, Berset C. 1995. Use of free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensmittel-Wissenschaft & Technologie* 28:25-30.

Bruhimann CF, Ooms A, Carrupt B, Testa M, Catto F, Leonetti C, Altomare A, Carotti J. 2001. *Med. Chem.* 44:3195.

Burton GW, Ingold KU. 1981. Antioxidation of biological molecules. 1. The antioxidant activity of vitamin E and related chain-breaking phenolic antioxidants in vitro. *J. Am. Chem. Soc.* 103:6472-6477.

Butera RA, Waldeck DH, Wagner EP. 2013. Determining g-factors with Electron Paramagnetic Resonance Rev. Chem 1430

Butler WH 1974. *Mycotoxins.* Elsevier Scientific, Amsterdam.

Buzariashvili MM, Tsitsagi I, Mikadze M, Dzhaparidze A, Dolidze. 2003. Sakartvelos Mecnierebata Akademiis Macne. *Kimiis Seria* 29(3-4)242.

Cabello-Hurtado F, Durst F, Jorrin JV, Werck-Reichhart D: Coumarins in Helianthus tuberosus. 1998. Characterization, induced accumulation and biosynthesis. *Phytochemistry* 49:1029-1036.

Campana M, Laborie C, Barbier G, Assan R, Milcent R. 1991. Synthesis and cytotoxic on islets of Langerhans of benzamide thiosemicarbazone derivates. *Eur J Med Chem* 26:273-278.

Campbell TW, Tomic EA. 1962. Polythiosemicarbazides. 1. Preparation and properties of polymers and some simple metallic chelates. *J. Polym. Sci.* 62:379–386.

Charitos C, Kokotos G, Tzougraki C. 2001. Bifunctional Coumarin Derivate in Solution and Solid Phase. *J. Heterocyclic Chem*. 38:153.

Chatterjea JK, Singh I, Jha Y, Prasad S. 1986. *Ind. J. Chem.* 25B(8), 796.

Cravotto G, Nano GM, Palmisano G, Tagliapietra S. 2001. An asymmetric approach to coumarin anticoagulants via hetero-Diels–Alder cycloaddition. *Tetrahedron: Asymmetry* 12:707–709.

Čačić M, Molnar M. 2010a. Design, synthesis and characterization of some novel 3-coumarinyl-5aryliden-1,3-thiazolidine-2,4-diones and their antioxidant activity. *Z. Naturforsch* 66b:177 – 183.

Čačić M, Molnar M, Šarkanj B, Has-Schön E, Rajković V. 2010b. Synthesis and antioxidant activity of some new coumarinyl-1,3-thiazolidine-4ones. *Molecules* 15: 6795-6809.

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

Dasler W, Wang HLS, Norton TB, McCoy FD. 1970. Cataractogenic and lathyrogenic effects of IV-phenyl+hydrazinopropionitriles and related compounds in rats. *Proc. Sot. Exp. Biol. Med.* 135:1-5.

De Long H, Vles O, Van Pelt JG 1964. *Nature*. London, 202, 466.

de Magalhães LMA. 2007. Development of automatic methods based on flow techniques for evaluation of antioxidant capacity in pharmaceutical and food products. *Disertacija*, Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto.

Dighe NS, Pattan SR, Dengale SS, Musmade DS, Shelar M, Tamb, V, Hole MB. 2010. Synthetic and pharmacological profiles of coumarins: A review. Arch*. Appl. Sci. Res.* 2:65-71.

Djilas S, Čanadanović-Brunet JM, Četković GS. 2002. Antioxidants in food. *Chemical Industries* 56:105-112.

Eaton DL, Groopman JD 1994. *The Toxicology of Aflatoxins.* Academic Press, New York, 383-426pp.

El-Ansary SE, Aly EI, Halem MA. 1992. *Egypt. Journal Pharn. Science*, 2:379–390.

Farshori NN, Banday MR, Ahmad A, Khan AU, Rauf A. 2011. 7-Hydroxy-coumarin derivatives: synthesis, characterization and preliminary antimicrobial activities. *Med. Chem. Res.* 20:535-541.

Frankel EN, Finley JW. 2008. How to standardizethe multiplicity of methods to evaluate natural antioxidants. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 56:4901-4908.

Gacche RN, Gond DS, Dhole NA, Dawane BS. Coumarin Schiff-bases: As antioxidant and possibly anti-inflammatory agents. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry* 21:157–161.

Garazd MM, Garazd YaL, Khilya VP. 2005. Neoflavones 2: Methods for synthesizing and modifying 4-arylcoumarins. *Chemistry of Natural Compounds* 3:245–271.

Greenbaum DC , Mackey ZV, Hansell E , Doyle P, Caffrey CR, Lehrman J, Rosenthal PJ, McKerrow JH, Gut J, Chibale K . *J. Med. Chem.* 47:3212.

Guyot-Declerck C, Renson S, Bouseta A, Collin S. 2002. Floral quality and discrimination of *Lavandula stoechas, Lavandula angustifolia*, and *Lavandula angustifolia×latifolia honeys*. *Food Chem* 79:453–459.

Hall CA, Cuppett SL. 1997. Structure-activities of natural antioxidants. In *Antioxidant Methodology In Vivo and In Vitro Concepts* 2-29.

Helen A, Rajasree CR, Krishnakumar K, Augusti KT. 2000. Antioxidant effect of onion oil (*Allium sativum* L.) on the damage induced by nicotine in rats as compared to alphatocopher. *Tox Lett* 116:61-68.

Horpurgo, Vllerio. 1951. *Ann. Oculist* 184, 545.

Hu K, Yang ZJ, Pan SS, Xu HJ, Ren J. 2010. *Eur. J. Med. Chem.* 45:3453-3458.

Hu W, Zhou C, Xia X. 2006. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 16 :2213–2218.

Jatav V, Mishra P, Kashaw S, Stables J. 2008. *Eur.J. Med. Chem.* 48:1945.

Kalkhambkar RG. 2011. Synthesis and biological activities of novel ethers of quinolinone linked with coumarins. *Monatsh. Chem.* 142:305–315.

Kappel J C, Yokum T S, Barany G. 2004. *J. Comb. Chem. 6*:746.

Karah N, Terzioglu N, Gursoy A. 2000. *Drug res.* 50:167-172.

Katritzky AR, Niveen MK, Gromova AV. 2006. Preparations of diversely substituted thiosemicarbazides and *N*-hydroxythioureas. *ARKIVOC* 226-236.

Kawaguchi H, Naito T, Tsukiura H. 1965. Studies on Coumermycin, A new antibiotic. *J. Antibiot.*, Tokyio, Ser. A18 (1), 11.

Kawanishi S, Hiraku Y, Oikawa S. 2001. Mechanism of guanine-specific DNA damage by oxidative stress and its role in carcinogenesis and aging. *Mut Res J* 488:65-76.

Kazcka i sur. 1956. *Amer. Chem. Soc.*78:4125.

Klayman DL, Scovill JP, Bartosevich JF, Mason CJ. 1979. *J . Med.Chem.* 22:1367.

Kofinas C, Chinou I, Loukis A, Karvala C, Roussakis C, Maillard M, Hostettmann K. 1998. Cytotoxic coumarins from the aqueous parts of Terdyliim apulum and their effects on non small cell bronchial carcinoma cell line. *Planta Med* 64:174–176.

Kostova I. 2005. Synthetic and natural coumarins as cytotoxic agents. *Curr. Med. Chem. Anti Canc. Agents* 5:29-46.

Kuznecova HA. 1967. *Prirodnie kumarini i furokumarini.* Nauka, Lenjingrad.

Lacy A, O'Kennedy R. 2004. Studies on coumarins and coumarin-related compounds to determine their therapeutic role in the treatment of cancer. *Curr. Pharm. Des.* 10:3797-3811.

Lake BG. 1999. Coumarin metabolism, toxicity and carcinogenicity: Relevance for human risk assessment. *Food Chem. Toxicol.* 37:423-453.

Larson RA. 1988. The antioxidants of higher plants. *Phytochemistry 27* 4:969-978.

Leite AC, Lima RS, Moreira DR, Cardoso MV, Gouveia de Brito AC, Farias dos Santos LM, Hernandes MZ, Kiperstok AC, Lima RS, Soares MB. 2006. Synthesis, docking, and in vivo activity of thiosemicarbazones, aminoacyl-thiosemicarbazides and acyl-thiazolidones against *Trypanosoma cruzi*. *Bioorg. Med. Chem. 14*:3749-3757.

Lever M. 1972. *Analytical Biochemistry*, 47:273-279.

Liu B, Raeth T, Beuerle T, Beerhues L. 2010. A novel 4-hydroxycoumarin biosynthetic pathway. *Plant Mol. Biol.* 72:17–25.

Lunagariya J, Bhavasar D 2014. *Coumarin as a Potential Pharmacophore in Medicinal Chemistry.*

Määttä-Riihinen KR, Kamal-Eldin A, Törrönen AR. 2004a. Identification and quantification of phenolic compounds in berries of *Fragaria* and *Rubus* species (Family *Rosaceae*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 52:6178-6187.

Määttä-Riihinen KR, Kamal-Eldin A, Mattila PH, González-Paramás AM, Törrönen AR. 2004b. Distribution and content of phenolic compounds in eighteen scandinavian berry species. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 52:4477-4486.

Malhotra S, Shakya G, Kumar A, Vanhoecke BW, Cholli AL, Raj HG, Saso L, Ghosh B, Bracke ME, Prasad AK, Biswal S, Parmar VS. 2008. Antioxidant, antiinflammatory and antiinvasive activities of biopolyphenolics. *Arkivoc* vi:119-139.

Mata R, Calzada F, Garcia MR, Reguero MT. 1987. Chemical studies on mexican plants used in traditional medicine, III: New 4-phenylcoumarins from Exostema caribaeum. *J. Nat. Prod.* 50:866-871.

Mata R, Calzada F, del Rosario Garcia M. 1988. Chemical studies on mexican plants used in traditional medicine, VI. Additional new 4-phenylcoumarins from Exostema caribaeum. *J. Nat. Prod.* 51:851-856.

Miller MC, Stineman CN, Vance JR, West DX, Hall IH. 1998. The cytotoxicity of copper (II) complexes of 2-acetyl-pyridyl-4N-substituted thiosemicarbazones. *Anticancer Res*. 18: 4131-4139.

Mills S, Bone K. 2000. Principles and practice of phytotherapy. Churchill Livingstone, Edinburgh

Molnar M, Čačić M. 2011. Biološka aktivnost derivata kumarina-pregledni rad. *Croat. J. Food Sci. Technol.* 3(2):55-64.

Molyneux P. 2004. The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. *Songklanakarin Journal of Science and Technology* 26:211-219.

Moretto dos Reis C, Sousa Pereira D, de Oliveira Paiva R, Ferreira Kneipp L, Echevarria A. 2011. Microwave-Assisted Synthesis of New *N1,N4*-Substituted Thiosemicarbazones. *Molecules. 16*:10668-10684.

Nevagi Reshma J, Dhake Avinash S. 2013. Antibacterial activity of thiosemicarazide derivates. *Der pharma Chemica* 5(2):45-49.

Nićiforović N, Mihailović V, Mladenović M, Solujić S, Stanković M, Ivanović D. 2011. Antioksidativna aktivnost tri biljne vrste roda *Verbascum*. *XVI Savetovanje o biotehnologiji*-Zbornik radova 16:563-567.

O'Kennedy R, Zhorenes R. 1997. *Coumarins: Biology, applications and mode of action*. Chichester: John Wiley and Sons.

Ojala T. 2001. *Biological screening of plant coumarins*, disertacija. Faculty of Science, University of Helsinki, Helsinki.

Okada Y, Miyauchi N, Suzuki K, Kobayashi T, Tsutsui C, Mayuzumi K, Nishibe S, Okuyama T. 1995. Search for naturally occurring substances to prevent the complications of diabetes. II. Inhibitory effect of coumarin and flavonoid derivatives on bovine lens aldose reductase and rabbit platelet aggregation. *Chem Pharm Bull* 43:1385–1387.

Oruc EE, Rollas S, Kandemirli F, Shvets N, Dimoglo AS. 2004. *J. Med. Chem,* 47:6760.

Pedersen JZ, Oliveira C, Incerpi S, Kumar V, Fiore AM, De Vito P, Prasad AK, Malhotra SV, Parmar VS, Saso L. 2007. Antioxidant activity of 4-methylcoumarins. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* 59:1721–1728.

Pillai CK, Nandi US, Levinson N. 1997. Interaction of DNA with Anti-Cancer Drugs: Copper-Thiosemicarbazide System. *Bioinorganic Chemistry* 7:151-157.

Pisoschi AM, Pop A. 2015. The role of antioxidants in the chemistry of oxidative stress: a Review. *European Journal of Medicinal Chemistry* 97:55-74.

Pitucha M, Polak B, Swatko-Osso M, Popiolek L, Ginalskac G. 2010. *Croat. Chem. Acta 83*:299–306.

Prakash A, Rigelhof F, Miller E. 2001. Antioxidant activity. *Medallion Laboratories Analytical Progress* 19:2. http://www.medlabs.com/Downloads/Antiox_acti_.pdf.

Prieto P, Pineda M, Aguilar M. 1999. Spectrophotometric quantitation of antioxidant capacity through the formation of a phosphomolybdenum complex: Specific application to the determination of vitamin E1. *Analytical Biochemistry* 269**:**337–341.

Randhavane PV, Narwade SK, Saji G, Karale BK. 2010. *Indian J.Chem.* 49B:89.

Raters M, Matissek R. 2008. Analysis of coumarin in various foods using liquid chromatography with tandem mass spectrometric detection. *European Food Research and Tehnology* 227:637-642.

Reis CM, Pereira DS, Oliveira Paiva R, Kneipp LF, Echevarria A. 2011. *Molecules* 11*:*10668.

Rice-Evans C, Miller NJ, Paganga G. 1997. Antioxidant properties of phenolic compounds. *Trends in plant science* 2:152-159.

Rivera NR, Balsells J, Hansen KB. 2006. Synthesis of 2-amino-5-substituted-1,3,4-oxadiazoles using 1,3-dibromo-5,5-dimethylhydantoin as oxidant. *Tetrahedron Lett*. 47:4889–4891.

Rodrigues RF, Tashima AK, Pereira RMS, Mohamed RS, Cabral FA. 2008. Coumarin solubility and extraction from emburana (*Torresea cearensis*) seeds with supercritical carbon dioxide. *Journal of Supercritical Fluids* 43:375-382.

Sabaa MW, Abdel-Naby AS. *Polym Degrad Stab* 1999:64:185.

Sandler SR, Karo W. 1971. *Organic fuctional group preparations*, *Academic press*, New York and London, 191-194.

Satyanarayana VSV, Sreevani P, Sivakumar A, Vijayakumar V. 2008. Synthesis and antimicrobial activity of new Schiff bases containing coumarin moiety and their spectral characterization. *ARKIVOC* xvii:221-233.

Setnescu R, Barcutean C, Jipa S, Setnescu T, Negoiu M, Mihalcea I, Dumitrub M, Zaharescub T. 2004. The effect of some thiosemicarbazide compounds on thermal oxidation of polypropylene. *Polymer Degradation and Stability* 85:997-1001.

Shefali A, Shilpi A, Shailey S. 2014. Anticancer activities of thiosemicarbazides/thiosemicabazones: A review. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences* 6 9.

Shi ZC, Zhao ZG, Liu XL, Chen Y. 2011. *Chinese Chem. Lett.* 22 :405.

Shih M-H, Su Y-S, Wu C-L. 2007. Synthesis of aromatic substituted hydrazino-thiazole derivates to clarify structural characterization and antioxidant activity between 3-arylsydnonyl and aryl substituted hydrazino-thiazoles. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin* 55:1126-1135.

Shimizu M, Shogawa H, Matsuzawa T, Yonezawa S, Hayashi T, Arisawa M, Suzuki S, Yoshizaki M, Morita N, Ferro E, Basualdo I, Berganza LH. 1990. Anti-inflammatory constituents of topically applied crude drugs. IV. Constituents and antiinflammatory effect of Paraguayan crude drug "alhucema" (*Lavandula latifolia* Vill.). *Chem. Pharm. Bull* 38:2283-2284.

Shipman C, Smith SH, Drach JC, Klayman DL. 1981. *Antimicrob. Agents Chemother.* 19:682–685.

Siddiqui N, Singh O. 2003. *Indian. J. Pharm. Sci.*, 423-25.

Sies H. 1997. Oxidative stress: Oxidants and antioxidants. *Experimental Physiology* 82:291-295.

Singh MM, Rastogi RB, Upadhyay BN, Yadav M. 2003. Thiosemicarbazide, phenyl isothiocyanate and their condensation product as corrosion inhibitors of copper in aqueous chloride solutions. *Materials Chemistry and Physics* 80:283-293.

Sowndhararajan K, Siddhuraju P, Manian S. 2011. Antioxidant and free radical scavenging capacity of the underutilized legume, *Vigna vexillata* (L.) A. Rich. *Journal of Food Composition and Analysis* 24:160–165.

Stryer L 1991. *Biokemija*. Školska knjiga, Zagreb.

Šarkanj B, Molnar M, Čačić M, Gille L. 2013. 4-Methyl-7-hydroxycoumarin antifungal and antioxidant activity enhancement by substitution with thiosemicarbazide and thiazolidinone moieties. *Food Chemistry*, 139:488-495.

Šarkanj B. 2007. Sinteza i dizajn novih tiadiazina s kumarinskom jezgrom. *Diplomski rad*. Prehrambeno-tehnološki fakultet, Osijek.

Tamehareon P, Anukarahanata T, Bhamarapravati N.1987. *Cancer Res.* 38:2185.

Tarek A. Yousef, Farid A. Badria, Shabane E. Ghazy, Ola A. El-Gammal, Gaber M. Abu El-Reash. 2011. In vitro and in vivo antitumor activity of some synthesized 4-(2-pyridyl)-3-Thiosemicarbazides derivates. *International Journal of Medicine and Medical Sciences* 3(2):37-46

Taskova R, Mitova M, Mikhova B, Duddeck H. 2003. Bioactive phenolics from *Carthamus lanatus* L. *Zeitschrift für Naturförschung C: Mycologia* 54:375-377.

Tenorio RP, Carvalho CS, Pessanha CS, Lima JG, Faria AR, Alves AJ, de Melob AJS, Goesa AJS. 2005. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 15:2575.

Tohoku I 1935. *J. Exp. Med*. 25:454.

Tomic EA, Foldi VS, Campbell TW. 1962. Polythiosemicarbazides. 2. Effect of chemical structure on chelating properties – structure of chelates. *J. Polym. Sci.* 62:387–399.

Trkovnik M 1970. *Glasnik Hem. i Tehnol.BIH*: 18

Tyagi YK, Kumar A, Raj HG, Vohra P, Gupta G, Kumari R. 2005. Synthesis of novel amino and acetyl amino-4-methylcoumarins and evaluation of their antioxidant activity. *Eur. J. Med. Chem.* 40:413– 420.

Vasoya SL, Paghdar DJ, Chovatia PT, Joshi HS. 2005. Synthesis of some New Thiosemicarbazide and 1,3,4-Thiadiazole Heterocycles Bearing Benzo[b]Thiophene Nucleus as a Potent Antitubercular and Antimicrobial Agents. *Journal of Sciences, Islamic Republic of Iran 16(1):33-36.*

Velioglu YS, Mazza G, Gao L, Oomah BD. 1998. Antioxidant activity and total phenolics in selected fruits, vegetables, and grain products. *J Agric Food Chem* 46:4113-4117.

Villalobos LF, Yapici T, Peinemann KV. 2014. Poly-thiosemicarbazide membrane for gold recovery. *Separation and Purification Technology* 136:94-104.

Vogel A. 1820. Darstellung von Benzoesäure aus der Tonka-Bohne und aus denMeliloten- oder Steinklee – Blumen. *Annalen der Physik* 64:161–166.

Vukovic N, Sukdolak S, Solujic S, Niciforovic N. 2010. An efficient synthesis and antioxidant properties of novel imino and amino derivates of 4-hydroxy coumarins. *Archives of Pharmacal Research* 33:5-15.

Wilson HR, Revankar GR, Tolman RL. 1974. *J. Med. Chem.* 17:760.

Wujec M, Pitucha M, Dobosz M, Kosikowska U, Malm A. 2004. Synthesis and potential antimycotic activity of 4-substituted-3-(thiophene-2-yl-methyl)- _2-

Yamaguchi MU, Barbosa da Silva AP, Ueda-Nakamura T, Filho PBD, Conceicao da Silva C, Nakamura CV. 2009. *Molecules* , 14:1796.

Yeo JD, Jeong MK, Park CU, Lee J. 2010. Comparing antioxidant effectiveness of natural and synthetic free radical scavengers in thermally-oxidized lard using DPPH method. *Journal of Food Science* 75:C258-262.

Yogeeswari P, Banerjee D, Bhat P, Thomas A, Srividya M, Sriram D. 2011. *Eur. J.*

Zamani K, Faghihi K, Bagheri S, Kalhor M. 2004. *Indian J. Chem*. 43B: 2716.

Zhang HJ, Quian Y, Zhu DD, Yang XG, Zhu HL. 2011. Synthesis, molecular modeling and biological evaluation of chalcone thiosemicarbazide derivates as novel anticancer agents. *European Journal of Medicinal Chemistry* 46:4702-4708.

Zolek T, Paradowska K, Wawer I. 2003. 13C CP MAS NMR and GIAO-CHF calculations of coumarins. *Solid State Nucl. Magn. Reson.* 23:77–87.

Web izvor:

1. http://ljekovitobilje.weebly.com/lazarkinja-asperula-odorata.html

2. http://www.getwellnatural.com/cinnamon-cinnamomum-loureiru.aspx