Odabrani termodinamički parametri antioksidacijske aktivnosti heterocikličkih spojeva na bazi kumarina

Gotal, Elena

Master's thesis / Diplomski rad

2020

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

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:182:237749

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-28**

Repository / Repozitorij:

Repository of the Department of Chemistry, Osijek



Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku
Odjel za kemiju
Diplomski sveučilišni studij kemije – istraživački smjer

Elena Gotal

Odabrani termodinamički parametri antioksidacijske aktivnosti heterocikličkih spojeva na bazi kumarina

Diplomski rad

Osijek, 2020.

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku
Odjel za kemiju
Diplomski sveučilišni studij kemije – istraživački smjer

Elena Gotal

Odabrani termodinamički parametri antioksidacijske aktivnosti heterocikličkih spojeva na bazi kumarina

Diplomski rad

Mentor: doc. dr. sc. Ana Amić

Osijek, 2020.

Zahvale

Mojoj mentorici, docentici Ani Amić. Kada bi barem postojalo više osoba poput Vas. Vaša susretljivost, predanost i volja odlike su zbog kojih mi je neizmjerno drago što sam Vas upoznala i radila s Vama. Hvala za vrijeme, prilike, savjete, nikad uskraćenu pomoć i podršku.

Mami i tati, Vaša snaga, požrtvovnost i ljubav moje su vječno uporište. Izvor hrabrosti za svaki sljedeći korak. Neprobojni balon sreće, smijeha i životne volje. Koliko Vas volim, nije nešto što može stati u par redova teksta. Reći ću samo, hvala što postojite! Zbog Vas sam ovdje, u mogućnosti napisati ove riječi i ostavljati tragove u svijetu.

Luciji, mojem sekoslavu. Ovaj diplomski je dar tebi. Pogledaj gore i pronađi najsjajniju zvijezdu. Tvoja je. Ako želimo, možemo!

Hvala teti Suzani, hvala Mei i Draženu, ali najviše hvala Uni! Za sva imaginarna putovanja vlakom u Osijek. Tvoja mašta i tvoj smijeh upotpunjuju ovaj svijet. Volim te, „debela"!

Baki Danici, za prvi fakultetski dan. Naočigled nepremostiv strah i nezaustavljive suze, ali tvoj poziv i tvoje riječi, osušile su oči i izbistrile pogled. Hvala!

Dedo, hvala za poruke, čestitke, šale i viceve, ali i ručne radove u čast ispunjavanja praznih rubrika Indeksa. Bez tebe, svijet bi bio monotono i neoriginalno mjesto. Tvoja kreativnost je tvoja supermoć!

Baki Mari koja više nije s nama, znaj da tvojim haljinama bojam svijet u vedrije boje.

Cori i Meri, nije vas moguće izostaviti. Moje najbolje i najvjernije prijateljice.

Anji, za velike snove, višesatne telefonske razgovore, ljepši horoskop, Pariz i kroasane.

Klaudiji, za strpljenje, najukusnije muffine, najduže kave i smijeh kao univerzalnu terapiju.

Petri i Sari, za prve tri nezaboravne godine. Uvijek vrijedne prisjećanja i prepričavanja.

Mateju, iako se više ne poznajemo, hvala! Zaslužio si mjesto među ovim retcima.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA **Diplomski rad**

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku
Odjel za kemiju
Diplomski studij kemije
Znanstveno područje: Prirodne znanosti
Znanstveno polje: Kemija

ODABRANI TERMODINAMIČKI PARAMETRI ANTIOKSIDACIJSKE AKTIVNOSTI HETEROCIKLIČKIH SPOJEVA NA BAZI KUMARINA

Elena Gotal

Rad je izrađen na: Odjelu za kemiju, Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku
Mentor: doc. dr. sc. Ana Amić

Sažetak

Kumarin (2*H*-1-benzopiran, 2*H*-kromen-2-on, 1,2-benzopiron) i derivati kumarina su bioaktivne fitokemikalije koje posjeduju važnu ulogu u razvoju antikoagulacijskih, protuupalnih, anti-HIV, antikancerogenih i antivirusnih lijekova. Dodatno, hidroksilkumarini su veoma snažni antioksidansi koji uspješno „hvataju" reaktivne kisikove vrste i sprječavaju radikalima uzrokovana biološka oštećenja i oksidativni stres. Cilj ovog preliminarnog istraživanja je bio teorijski ispitati antioksidacijski potencijal 51 heterocikličkog spoja na bazi kumarina, odnosno utvrditi vrijednosti reakcijskih entalpija povezanih s dva mehanizma antioksidacijske aktivnosti. Istraženi mehanizmi antioksidacijske aktivnosti su: prijenos atoma vodika (HAT) i prijenos elektrona praćen prijenosom atoma vodika (SET-PT). Za izradu rada je korišten programski paket MOPAC2012 i P7 metoda. Ispitivano je cijepanje O–H, N–H i C–H veza, utjecaj položaja OH– i drugih funkcionalnih skupina. Dobivenim rezultatima je utvrđeno kako Schiffove baze, oksadiazoli, tiosemikarbazidi i 4-tiazolidinoni s više OH– funkcionalnih skupina posjeduju bolje antioksidacijsko djelovanje.

Diplomski rad obuhvaća: 59 stranica, 23 slike, 7 tablica, 90 literaturnih navoda i 2 priloga
Jezik izvornika: hrvatski
Ključne riječi: kumarin, antioksidans, PM7, HAT, SET-PT

Stručno povjerenstvo za ocjenu:
1. doc. dr. sc. Martina Medvidović-Kosanović, predsjednica
2. doc. dr. sc. Ana Amić, mentorica i članica
3. doc. dr. sc. Martina Šrajer Gajdošik, članica
4. doc. dr. sc. Olivera Galović, zamjena članice

Rad prihvaćen:
Rad je pohranjen: u Knjižnici Odjela za kemiju, Franje Kuhača 20, Osijek

BASIC DOCUMENTATION CARD **Diploma Thesis**

Josip Juraj Strossmayer University of Osijek
Department of Chemistry
Graduate Study of Chemistry
Scientific Area: Natural Sciences
Field: Chemistry

SELECTED THERMODYNAMIC PARAMETERS OF ANTIOXIDANT ACTIVITY OF COUMARIN BASED HETEROCYCLIC COMPOUNDS

Elena Gotal

Thesis completed at: Department of Chemistry, Josip Juraj Strossmayer University of Osijek
Supervisor: Assist. Prof. Ana Amić, PhD

Abstract

Coumarin (2*H*-1-benzopyran-2-one, 2*H*-chromen-2-one, 1,2-benzopyrone) and coumarin derivatives are bioactive phytochemicals that have an important role in the development of anticoagulant, anti-inflammatory, anti-HIV, anticancer and antiviral drugs. Additionally, hydroxycoumarins are very powerful antioxidants that successfully scavenge reactive oxygen species and prevent radical induced biological damage and oxidative stress. The antioxidant potential of 51 heterocyclic compounds containing coumarin core was investigated theoretically. Reaction enthalpies related to two mechanisms of free radical scavenging were calculated. Studied mechanism were hydrogen atom transfer mechanism (HAT) and single electron transfer followed by proton transfer mechanism (SET-PT). Calculations were performed using MOPAC2012 PM7. Cleavage of O–H, N–H and C–H bonds was studied. The effect of the position of the hydroxyl group, as well as other functional groups, on the antioxidant activity was examined. Based on obtained results, Schiff bases, thiosemicarbazides, oxadiazoles and 4-thiazolidinones containing one or more OH– groups exhibit higher radical scavenging properties.

Thesis includes: 59 pages, 23 figures, 7 tables, 90 references, 2 appendices
Original in: croatian
Keywords: coumarin, antioxidants, PM7, HAT, SET-PT

Reviewers:
1. Assist. Prof. Martina Medvidović-Kosanović, PhD, chair
2. Assist. Prof. Ana Amić, PhD, supervisor and member
3. Assist. Prof. Martina Šrajer Gajdošik, PhD, member
4. Assist. Prof. Olivera Galović, PhD, substitute member

Thesis accepted:
Thesis deposited: at the Library of Department of Chemistry, Franje Kuhača 20, Osijek

Sadržaj

1. UVOD ……	1
2. LITERATURNI PREGLED ……..	2
2.1. Heterociklički spojevi ……	2
2.1.1. Kumarini……	2
2.1.1.1. Struktura i podjela kumarina……	3
2.1.1.2. Biološka aktivnost i medicinski značaj kumarina……	6
2.1.2. Schiffove baze – struktura i aktivnost…….	11
2.1.2.1. Biološka aktivnost i medicinski značaj Schiffovih baza……..	13
2.1.3. Tiosemikarbazidi – struktura i aktivnost…….	15
2.1.3.1. Biološka aktivnost i medicinski značaj tiosemikarbazida……	15
2.1.4. Oksadiazoli – struktura i aktivnost……..	18
2.1.4.1. Biološka aktivnost i medicinski značaj oksadiazola……	19
2.2. Antioksidacijska aktivnost……..	22
2.2.1. Oksidativni stres i slobodni radikali……	22
2.2.2. Antioksidansi…….....	24
2.3. Istraživanja antioksidacijske aktivnosti……...	26
2.3.1. Mehanizmi i termodinamički parametri antioksidacijske aktivnosti...	26
3. MATERIJALI I METODE…….	30
3.1. Računalni detalji – MOPAC2012^{TM} i PM7 metoda…….	30
3.2. Izračuni termodinamičkih parametara i mehanizmi reakcija za HAT i SET-PT……...	32
4. REZULTATI……..	34
5. RASPRAVA……...	47
6. ZAKLJUČAK…….	50
7. LITERATURNA VRELA……..	51
8. DODACI…….	56
8.1. Popis kratica……	56
8.2. Životopis…….	58

1. UVOD

Kumarini su aromatska skupina spojeva čiju jezgru čine benzen i α-pironski prsten. Do sada je identificirano oko 1300 kumarina s povoljnim biološkim djelovanjima poput protuupalnog, antikancerogenog, antimikrobnog i antivirusnog. Cilj ovoga rada bio je ispitati antioksidacijski potencijal 51 heterocikličkog spoja na bazi kumarina. Poseban naglasak je stavljen na kumarinsku jezgru unutar strukture spojeva, s obzirom da su kumarini polazišna točka za široki raspon primjene od kojih je najvažnije ono u medicinske svrhe. U prvom dijelu rada opisana su svojstva i struktura, biološko djelovanje (antikancerogeno, antihelminitičko, antibakterijsko, antivirusno) i medicinski značaj kumarina, tiosemikarbazida i oksadiazola. Osim toga, teorijski dio govori i o pojedinim mehanizmima antioksidacijske aktivnosti te o termodinamičkim parametrima istih. Drugi dio rada fokusiran je na materijale i metode potrebne za provedbu ovog preliminarnog istraživanja. Proučavani mehanizmi anti-oksidacijske aktivnosti bili su prijenos atoma vodika (engl. *Hydrogen Atom Tranfer*, HAT) i prijenos elektrona praćen prijenosom atoma vodika (engl. *Single Electron Transfer Followed by Proton Transfer*, SET-PT). Za izračune su korišteni MOPAC2012^{TM} programski paket i PM7 metoda, a rezultati su prikazani tablično uz pripadajuća objašnjenja. U ovoj preliminarnoj studiji naglasak smo stavili na termodinamiku cijepanja N–H, C–H i O–H veza. Stoga je antioksidacijska učinkovitost ispitivanih spojeva procjenjena na temelju izračunatih termodinamičkih parametara koje se odnose na cijepanje ove veze. Dobiveni rezultati uspoređeni su s dostupnom literaturom.

2. LITERATURNI PREGLED

2.1. Heterociklički spojevi

Heterociklički spojevi ili heterocikli jedna su od važnih skupina organskih kemijskih spojeva u kojima su pojedini ili svi atomi povezani u prsten s barem jednim heteroatomom, a uglavnom je riječ o dušiku, sumporu ili kisiku. Najčešći heterociklički spojevi su oni koji posjeduju peteročlani ili šesteročlani prsten s jednim od prethodno spomenutih heteroatoma – piridin, pirol, furan i tiofen. Brojni heterociklički spojevi zapravo su biokemijski materijal esencijalan za život, kao na primjer nukleinske kiseline, građene od dugih lanaca heterocikličkih jedinica te mnogi prirodno prisutni pigmenti, vitamini, antibiotici i halucinogeni također po strukturi heterociklički spojevi [1].

2.1.1. Kumarini

Kumarini (2*H*-1-benzopiran-2-on) predstavljaju skupinu polifenolnih spojeva prvi puta izoliranih iz tonka sjemena biljke *Dipteryx odorata* (Aubl.) Wild 1820. godine (Slika 1.). To su heterociklički spojevi koji sadrže kisik te se pojavljuju u slobodnom obliku ili u spoju s ugljikohidratom, primjerice glukozom. Karakterizirani su kao bezbojne, kristalične fitokemijske tvari topljive uglavnom u organskim otapalima, dok je njihova topljivost u vodi neznatna [2, 3].

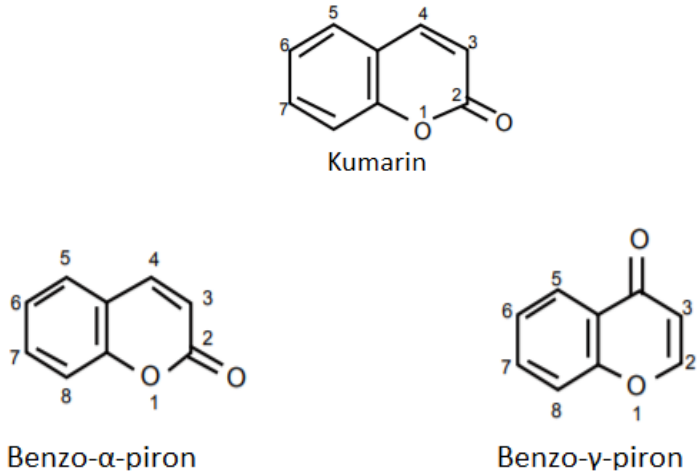


Slika 1. Tonka sjemenka (**1**) i biljka *Dipteryx odorata* (Aubl.) Wild (**2**) [4, 5].

2.1.1.1. Struktura i podjela kumarina

Za kumarinske derivate postoje različite klasifikacije. Mogu se kemijski klasificirati prema najčešćim jezgrama na jednostavne kumarine, složene kumarine i kumarine različitih struktura, a u Tablici 1. prikazani su neki česti supstituenti u strukturi derivata jednostavnih kumarina. Složeniji kumarini su obično povezani s drugim heterociklima pa ih stoga dijelimo na jednostavne kumarine, furanokumarine, dihidrofuranokumarine, piranokumarine (linearne i kutne), fenilkumarine i biskumarine. Jednostavnije varijante kumarina, poput 7-hidroksi-kumarina i 6,7-dihidroksikumarina su hidroksilirani, alkoksirani te alkilirani derivati početnog spoja, kumarina zajedno s njihovim glikozidima. Furanokumarini su građeni od peteročlanog furanoznog prstena povezanog s kumarinskom jezgrom, podijeljeni na linerani i kutni oblik s mogućnošću supstitucije na jednom ili oba preostala benzoidna položaja. S druge strane, piranokumarini su analozi furanokumarina, ali sa šesteročlanim prstenom [6, 7].

Kumarini posjeduju konjugirani sustav π elektrona i dio su obitelji benzopirona, biološki aktivnih spojeva, koji u svojoj strukturi imaju benzenski prsten kondenziran s pironskim prstenom (Slika 2.). Benzopironi se dijele na benzo-α-pirone i benzo-γ-pirone, a kumarini i flavonoidi su njihovi glavni predstavnici [8-10].

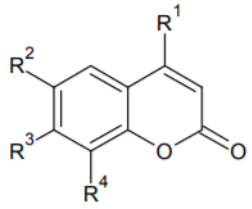


Slika 2. Struktura kumarina i njegovih derivata [2].

Kumarini supstituirani u pironskom prstenu uključuju 4-hidroksikumarin i tom podtipu ujedno pripada varfarin, sintetički spoj velike stabilnosti koja je rezultat proširenog sustava konjugiranih veza na bočnom lancu što dovodi do aromatizacije kumarinskog

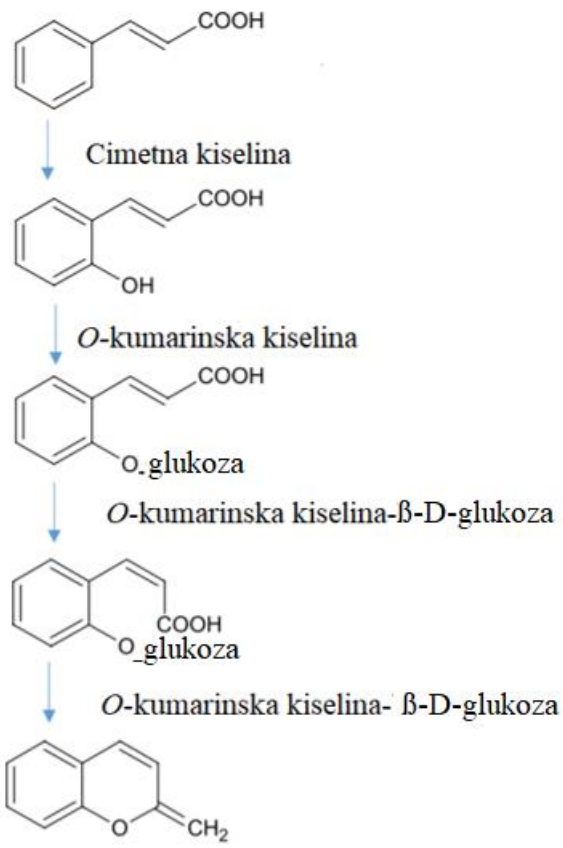
sustava. Zahvaljujući svojoj jednostavnoj strukturi kumarin je glavni predstavnik već spomenutih benzo-α-pirona, iako je sveopće prihvaćeno da je 7-hidroksikumarin matični spoj za one mnoge složenije kumarinske spojeve [6, 10].

Tablica 1. Prikaz supstituenata (**R^{1-4}**) u strukturi derivata jednostavnih kumarina [11].

	**R^1**	**R^2**	**R^3**	**R^4**
Kumarin	H–	H–	H–	H–
Umbeliferon	H–	H–	H–	H–
Eskuletin	H–	HO–	H–	H–
4-Metil-umbeliferon	CH_3–	H–	H–	H–
Skopoletin	H–	CH_3O–	H–	H–
Skoparon	H–	CH_3O–	CH_3O–	H–
Osthol	H–	H–	CH_3O–	–CH_2CH=$C(CH_3)_2$
Fraksetin	H–	CH_3O–	HO–	HO–

Kumarinska struktura je izvedena iz cimetne kiseline putem *orto*-hidroksilacije, odnosno *trans-cis* izomerizacije dvostruke veze bočnog lanca pomoću enzima izomeraze. Navedenim postupkom nastaje *O*-kumarinska kiselina koja na sebi ima vezanu glukozu. Uklanjanjem glukoze i laktonizacijom zatvara se pironski prsten i nastaje kumarin (Slika 3.). *Trans* oblik je stabilan i ne podliježe ciklizaciji, dok je s druge strane *cis* oblik iznimno nestabilan i uglavnom prelazi u *trans* konfiguraciju [11].

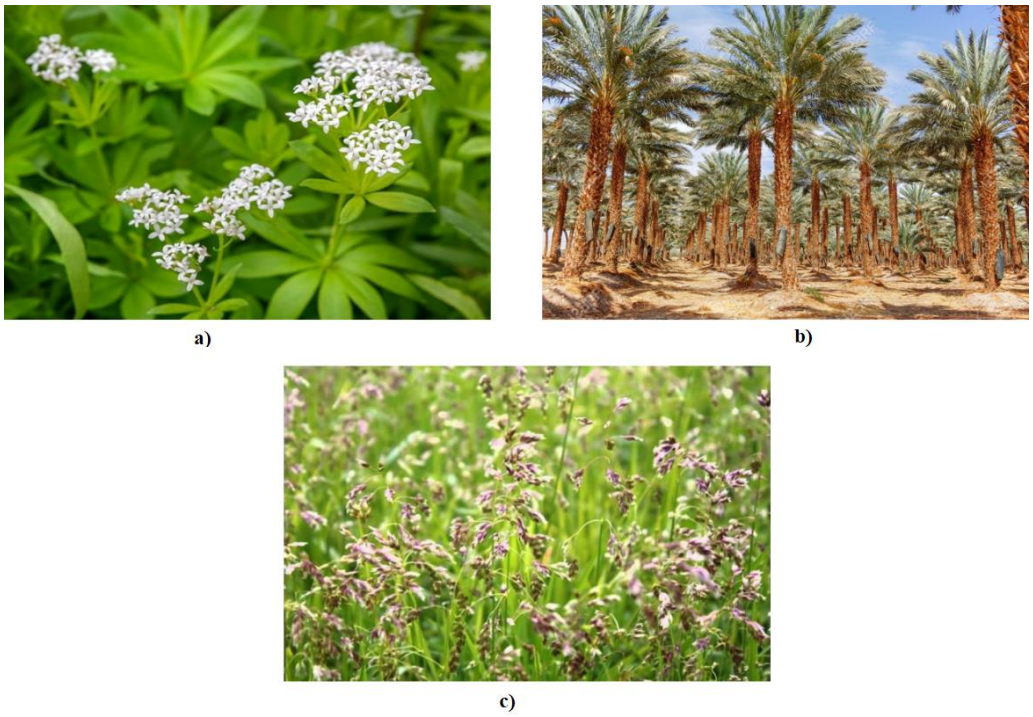
Kako je vidljivo na slici 3., glukoza je odlazeća skupina koja pomaže u *cis-trans* transformaciji, a enzim, *β*-glukozidaza, koji se nalazi u *Melilotus albus* (Medik.), specifično hidrolizira *cis*-glukozid. Osim toga, biosinteza kumarina je pokazala kako su svi derivati oksigenirani na položaju sedam. Tri najraširenija u prirodi su umbeliferon, eskuletin i skopoletin [11, 12].



Slika 3. Biosinteza kumarina [12].

Na stotine kumarina je izolirano iz prirodnih izvora, a pojedine biljne vrste poput jagoda, gospine trave, marelice, višnje i cimeta sadrže znatan udio ovih spojeva. Posebice se ističe cimet čiji je intenzivan miris rezultat visoke koncentracije kumarina, no potrebno je razlikovati „pravi“ kvalitetni cejlonski cimet (*Cinnamonum zeylanicum*) od kineskog cimeta (*Cinnamonum cassia*). Kineski cimet se dobiva od kore drveta *cassia* i posjeduje 20 000 puta veći udio kumarina što ga čini vrlo opasnim za zdravlje, a posebno je destruktivan učinak na jetrene stanice (hepatotoksični učinak) [13, 14].

Otprilike 500 spojeva, odnosno jednostavnih derivata kumarina, je pronađeno u prirodi. Najvećim dijelom se pojavljuju u slobodnom obliku, a nešto manji broj derivata se nalazi u obliku glikozida. Biljka lazarkinja (*Galium odoratum* L., slika 4. a), datulje (*Phoenix dactylifera* L., slika 4. b) i bizonska trava (*Hierochloe odorata* L., slika 4.c) su biljne vrste kod kojih je također uočena vrlo visoka koncentracija kumarina [15].



Slika 4. Lazarkinja (**a**), datulja (**b**) i bizonska trava (**c**) [16–18].

Zbog relativno jednostavne strukture kumarini i njihovi derivati su postali polazišna točka za široki raspon primjene. Najviše se ističe ona u industriji parfema zbog jedinstvenog i intenzivnog mirisa tonka sjemena koji podsjeća na vaniliju. Osim toga, različiti derivati se upotrebljavaju kao pojačivači arome duhana te u nekim alkoholnim pićima [7]. Uz to, primjenjuju se i u proizvodnji insekticida, kao dodatak pastama za zube i sapunima, a sve se češće koriste i kao zaslađivači, dodatak gumama i raznim plastičnim materijalima te aerosolima u svrhu neutralizacije neugodnih mirisa [15, 19].

2.1.1.2. Biološka aktivnost i medicinski značaj kumarina

Kumarin i njegovi derivati su pokazali široki spektar bioloških aktivnosti uključujući antitumorsko, antikancerogeno, antibakterijsko i protuupalno djelovanje, a imaju i sposobnost inhibicije enzima ugljične anhidraze (enzima koji katalizira pretvorbu ugljikova dioksida i vode u ugljičnu kiselinu i obratno). Ovi spojevi su poznati i po mogućnosti smanjivanja aktivnosti lipida, odnosno triglicerida. Posebno se ističu hidroksilkumarini, snažni antioksidansi koji imaju sposobnost uklanjanja reaktivnih kisikovih vrsta što je važna odlika s obzirom da se time sprječavaju različita biološka oštećenja stanica. Isto tako, derivati kumarina mogu imati značajnu ulogu u prevenciji bolesti povezanih sa starijom

životnom dobi, primjerice kod osteoporoze i povećanog rizika od kardiovaskularnih bolesti [12].

Djelovanje kumarina na stanice nalikuje mehanizmu djelovanja antikancerogenih lijekova, odnosno oni prekidaju diobu stanice. Međutim, osim što imaju potencijalni preventivni učinak na razvoj karcinoma, kumarin i njegovi derivati se mogu koristiti i u liječenju nuspojava izazvanih kemoterapijom i zračenjem. Antikancerogeno djelovanje kumarina, kako onih prirodnih pa tako i sintetskih derivata, je postalo predmet interesa mnogih istraživača. Nekoliko studija se fokusiralo na upotrebu jednostavnih kumarina poput 7-hidroksikumarina, 6-nitro-7-hidroksikumarina, skopoletina i eskuletina u liječenju raka. Spojevi su pokazali zadovoljavajuće antitumorsko djelovanje u nekoliko stadija razvoja raka putem raznih mehanizama – blokiranje staničnog ciklusa, induciranje stanične apoptoze[1], moduliranje receptora estrogena ili inhibiranje DNA-povezanih enzima (primjerice topoizomeraze). Osim toga, inhibiraju enzim telomerazu te aktivnost protein kinaze, ekspresiju onkogena ili induciraju apoptozu posredovanu kaspazom-9. Odgovorni su za suzbijanje širenja stanica raka zaustavljanjem staničnog ciklusa u točno određenoj fazi te utječu na aktivnost p-glikoproteina stanica raka. [11, 20, 21].

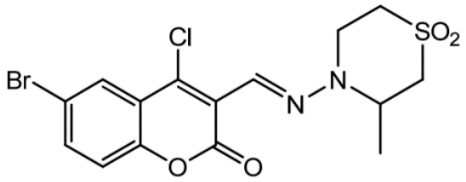
Nedavna istraživanja navode kako TRAIL[2] (engl. *Tumor necrosis Factor-Related Apoptosis-Inducing Ligand*) potiče apoptozu stanica raka bez toksičnog djelovanja na zdrave stanice, odnosno ne oštećujući zdravo tkivo. Endogeni TRAIL ima značajnu ulogu u imunološkom nadzoru i zaštiti od karcinoma. Istraživanja su pokazala kako kumarini mogu kontrolirati TRAIL-posredovanu apoptozu stanica raka [21].

Derivati kumarina osim citostatskih, mogu posjedovati i citotoksična svojstva. Marshall i sur. (1994) utvrdili su da kumarin i 7-hidroksikumarin mogu inhibirati rast staničnih linija ljudskog karcinoma. Riječ je o linijama A549 (pluća), ACHN (bubrezi), H727 (pluća), MCF7 (dojka) i HL-60 (leukemija). Osim toga, nekoliko kliničkih ispitivanja utvrdilo je antiproliferacijsko djelovanje kod karcinoma prostate, malignog melanoma te karcinoma bubrežnih stanica [22–24]. Kumarin je također pokazao citotoksični učinak na Hep2 stanice (engl. *Human epithelial type 2*) u ovisnosti o primjenjenoj dozi [25, 26].

Karcinom jajnika jedan je od vrlo čestih uzroka smrti žena širom svijeta. Najčešće se dijagnosticira u kasnim fazama i glavna prepreka u suzbijanju je rezistencija na lijekove.

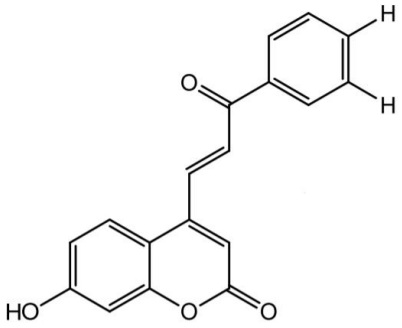
[1] Programirana stanična smrt.
[2] Ligand povezan s TNF-om (engl. *Tumor Necrosis Factor*), odnosno čimbenikom nekroze tumora.

Većina pacijenata razvije otpornost na lijekove bazirane na platini ili na paklitaksel[3]. Derivat kumarina RKS262 (Slika 5.) koristi se kao analog Nifurtimoksa, lijeka koji inducira citotoksične i antitumorske učinke u neuroblastomu *in vivo* i *in vitro*. Navedeni spoj je pokazao iznimno moćnu aktivnost u prevenciji karcinoma jajnika (OVCAR-3)[4], inače kemorezistentnog na lijekove na bazi platine [27–30].



Slika 5. Struktura derivata kumarina RKS262 [20].

Nadalje, Jamier i sur. (2014) su sintetizirali čalkon-kumarin derivate te utvrdili njihovo antikancerogeno djelovanje prema različitim staničnim linijama raka. Provedeno istraživanje ukazalo je kako 7-hidroksi-4-[(1*E*)-3-okso-fenilprop-1-en-il]-2*H*-kromen-2-on (Slika 6.) ima najbolje citotoksično djelovanje što se tiče karcinoma jajnika [31, 32].



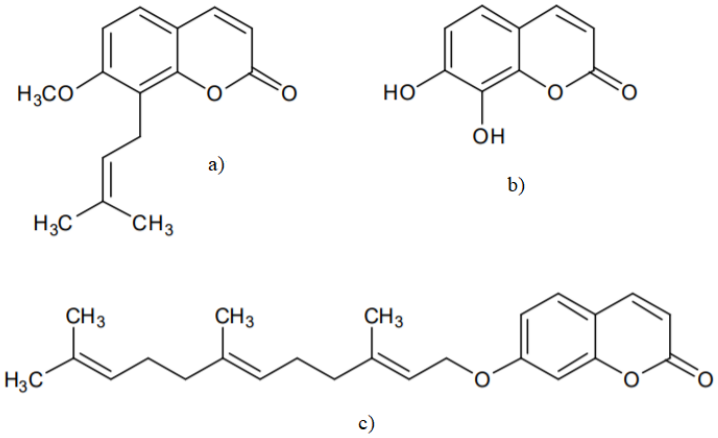
Slika 6. Struktura 7-hidroksi-4-[(1*E*)-3-okso-fenilprop-1-en-il]-2*H*-kromen-2-ona [32].

Osim u liječenju karcinoma jajnika, derivati kumarina su pokazali pozitivan učinak i u prevenciji karcinoma pluća. Poznata su dva tipa karcinoma pluća – SCLC (engl. *Small Cell Lung Cancer*) i NSCLS (engl. *Non-Small Cell Lung Cancer*). Liječenje NSCLS-a u

[3] Kemoterapijski lijek koj se primjenjuje u liječenju raka jajnika, raka dojke te raka pluća i Kaposijev sindrom.
[4] Stanična linija ljudskog epitelijalnog adenokarcinoma jajnika.

većini slučajeva ne uspijeva zbog neosjetljivosti napredne faze karcinoma na lijekove. Međutim, 7-metoksi-8-(3-metil-2-butenil)kumarin (osthol) (Slika 7. a) izoliran iz biljaka *Cnidium monnieri* L. i *Prangos ferulacea* L., inicijacijom apoptoze inhibirao je rast stanica karcinoma pluća (stanična linija A-549) [20].

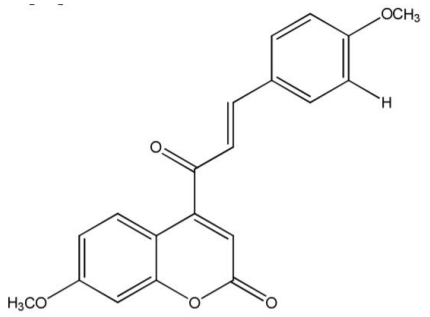
Wang i sur. (2013) su uspješno dokazali kako prirodno izolirani 7,8-dihidroksikumarin (dafnetin) (slika 4.b) inhibira proliferaciju A-549 stanične linije adenokarcinoma pluća te da suzbijanjem određenog signalnog puta inducira apoptozu, ovisno o koncentraciji [33]. Sukladno spomenutom, ističe se i umbeliprenin (slika 4. c) izoliran iz biljke *Ferula asafoetida* L. koji može inducirati apoptozu [33].



Slika 7. Struktura osthola (a) [23], dafnetina (b) [35] i umbeliprenina (c) [34].

Derivati cinamil-kumarina su posebno učinkoviti kada je riječ o staničnim linijama karcinoma dojke (MCF7) i jajnika (OVCAR). Jamier i sur. (2014) sintentizirali su seriju selektivnih nesteroidnih inhibitora 14-*β*-hidroksisteroida dehidrogenaze tip 1, enzima koji katalizira smanjenje „slabijeg“ estrogena – estrona (NADPH ovisnog) i nastanak „snažnijeg“ estrogena – estradiola. Najsnažnijim se pokazao spoj 7-metoksi-4-[(2*E*)-3-(4-metoksifenil)-prop-2-enoil]-2*H*-kromen-2-on (Slika 8.) [32, 35].

Li i sur. (2015) su utvrdili kako prirodni kumarin skopoletin, odnosno 6-metoksi-7-hidroksikumarin, u biljkama poput *Erycibe obtusifolia* Benth., *Aster tataricus* L. i *Foeniculum vulgare* Mill., posjeduje antikancerogeno djelovanje. Posebno je značajan u liječenju raka prostate (stanična linija LNCaP) inhibicijom ekspresije ciklina D1 koja je uzrokovala zaustavljanje staničnog ciklusa u fazi G2/M te induciranje rane i kasne apoptoze u staničnim linijama karcinoma [36].



Slika 8. Struktura 7-metoksi-4-[(2*E*)-3-(4-metoksifenil)prop-2-enoil]-2*H*-kromen-2-ona [35].

Kumarini se često koriste kao imunostimulacijski lijekovi u prevenciji kroničnih infekcija. Mehanizam djelovanja uključuje aktivaciju makrofaga[5] čime se potiče stanice na imunološki odgovor. Kod kronične bruceloze[6], *Brucella abortis* inficira makrofage i na taj način sprječava imunološki odgovor. Kada se kumarin primjenjuje kao imunostimulirajući lijek, sve indikacije koje upućuju na kroničnu brucelozu nestaju. Prethodno spomenuto ohrabrilo je znanstvenike na korištenje kumarina u liječenju ostalih infekcija poput mononukleoze, mikoplazmoze[7] i Q groznice[8] [37].

Glavna karakteristika krvi je njezina fluidnost unutar krvožilnog sustava te sposobnost brzog zgrušavanja u slučajevima ozljeda, odnosno kada je ista izložena neendotelnoj površini. Za vrijeme stvaranja intravaskularnog tromba, fibrilarni sustav djeluje na način da povrati fluidnost. Utvrđeno je kako konzumacija određenih namirnica, odnosno pridržavanje posebnog oblika uravnotežene prehrane s namirnicima bogatim kumarinom može spriječiti trombozu i krvarenja. Kumarin može djelovati kao antikoagulans koji blokira nekoliko koraka u koagulacijskoj kaskadi [11].

6,7-dimetoksikumarin je pokazao dobro antifungalno djelovanje protiv *Rhizoctonia solani* sa stopostotnom inhibicijom pri 250 μg/ml. Eskuletin (6,7-dihidroksikumarin)

[5] Vrsta leukocitnih stanica čovjeka. Vrši fagocitozu stranih čestica čime igra važnu ulogu u imunološkom sustavu.
[6] Zarazna bolest uzrokovana bakterijom *Brucella*. Do zaraze može doći izravnim dodirom s lučevinama zaraženih životinja, pijenjem nepasteriziranog kravljeg, kozjeg ili ovčjeg mlijeka itd.
[7] Mikoplazmoza je grupni izraz za zarazne bolesti uzrokovane mikroorganizmima (mikoplazme). Tri najbitnije vrste uzročnika su: *Mycoplasma gallisepticum, M. synoviae, M. meleagridis*.
[8] Akutna ili kronična bolest koju uzrokuje *Coxiella burnetti*. Inficira domaće i uzgajane životinje koje potom mogu postati glavni prijenosnici zaraze na ljude.

pokazao je nisku antimikrobnu aktivnost protiv bakterija *Bacillus megaterium*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* i *Salmonella enterica serovar typhimurium* te dobru do umjerenu aktivnost protiv *Staphylococcus aureus*. Skoparon (6,7-dimetoksikumarin) izoliran iz *Cedrelopsis grevei* Baill. je pokazao slabu antimikrobnu aktivnost protiv mikroorganizama *Enterococcus faecalis*, *P. aeruginosa*, *Salmonella typhi*, *Shigella sonnei*, *S. aureus*, *R. solani*. Neznatna antimikrobna aktivnost uočena je i u djelovanju skoparona na *Rigidoporus microporus* te *Sclerotium oryzae* [38–40].

Kumarini, prirodni i sintetički, posjeduju značajno antifungalno djelovanje kada je riječ o *Aspergillus* vrstama. Seselin je prirodni derivat kumarina izoliran iz vrste *Decatropis bicolor* Zucc. Potvrđen je kao snažno antifungalno sredstvo protiv *A. flavus* tijekom skladištenja kukuruza. Prirodni kumarini iz sjemena *Aegle marmelos* L., kao i njihovi sintetički analozi, također su značajni u borbi protiv gljivica. Guerra i sur. (2015) su potvrdili kako 6-nitro-7-hidroksikumarina djeluje antifungalno zbog utjecaja na strukturu gljivične stanične stjenke [41, 42]. Prema radu Holmesa i sur. (2008) jedan od mogućih razloga antiaflatoksične aktivnosti kumarina je strukturna sličnost intermedijerima aflatoksina. Iako je točan mehanizam kumarinskog djelovanja na biosintezu aflatoksina i dalje nepoznat, postoji još jedan potencijalan razlog za inhibiciju proizvodnje aflatoksina kumarinom – antioksidacijska aktivnost. Naime, mnogi inhibitori proizvodnje aflatoksina posjeduju antioksidacijsku aktivnost koja može interferirati sa spomenutim procesom. Iako je antifungalna aktivnost kumarina potvrđena brojnim istraživanjima, njegovo antiaflatoksično djelovanje još je u postupku ispitivanja [43].

2.1.2. Schiffove baze – struktura i aktivnost

Schiffove baze su spojevi koji posjeduju iminsku ili azometinsku (RHC=N–R1) funkcionalnu skupinu, s time da su R i R1 alkilne, arilne, cikloalkilne ili heterocikličke skupine s raznim mogućnostima supstituiranja. Spojevi su još poznati kao anili, imini ili azometini. Prisutnost nesparenog elektronskog para u sp^2 hibridiziranoj orbitali dušikovog atoma azometinske skupine odgovoran je za kemijsku i biološku važnost [44].

Schiffove baze nastaju kao kondenzacijski produkti primarnih amina s karbonilnim spojevima, a prvi ih je sintetizirao Hugo Schiff. Pripadaju skupini najčešće korištenih organskih molekula te imaju široki raspon primjene u brojnim poljima poput analitičke i anorganske kemije, kao i biokemije [45].

Dušikov atom u azometinu od velikog je značaja. Može biti uključen u stvaranje vodikove veze s aktivnim centrima sastavnica stanice te posredovati u staničnim procesima. Osim što posjeduju niz bioloških aktivnosti, Schiffove baze i derivati se također mogu koristiti kao katalizatori i intermedijeri u organskim sintezama, u pripravi boja i pigmenata ili kao stabilizatori polimera i inhibitori korozije. Metalni kompleksi, za razliku od slobodnih organskih spojeva, posjeduju bolju biološku aktivnost, što je dokazano implementacijom prijelaznih metala u Schiffove baze. Osobito je korisno ako se u blizini azometinske skupine nalaze –OH ili –SH funkcionalne skupine jer dolazi do formiranja peteročlanog ili šesteročlanog prstena s metalnim ionom [45, 46].

Spojevi su odigrali vrlo važnu ulogu u kontekstu razvoja koordinacijske kemije, ali su i prepoznati kao ključna točka u razvoju anorganske biokemije i optičkih materijala. Korišteni su kao sintoni[9] u pripravi velikog broja industrijskih i biološki aktivnih spojeva poput formazana, 4-tiazolidinona, benzoksazina i mnogih drugih, a sinteza se odvijala reakcijom zatvaranja prstena, cikloadicije i reakcijama supstitucije. Zbog navedenog, derivati su potaknuli brojne znanstvenike na dizajniranje novih heterocikličkih/aril Schiffovih baza u svrhu razvoja inovativne, okolišno prihvatljive tehnologije [45, 46].

Schiffove baze dobivene iz aromatskih aldehida, *ortho* supstituiranih s hidroksilnom skupinom, su u početku pobudile veliki interes znanstvenika zbog svoje sposobnosti da djeluju kao bidentatni ligandi za ione prijelaznih metala. Kasnije su razne studije, fokusirane na vezu između kvantitativne strukture i antitumorne aktivnosti Schiffovih baza dobivenih iz različito supstituiranih aromatskih amina i aldehida, utvrdile da najbolju korelaciju posjeduju azometini iz salicilaldehida. Isti spojevi su potvrđeni kao regulatori rasta biljaka te je ustanovljena njihova antimikrobna aktivnost [46].

Veliki broj različitih liganda Schiffovih baza se koristi u potenciometrijskim senzorima kao nosači kationa zbog iznimnih karakteristika poput selektivnosti, osjetljivosti i stabilnosti za specifične metalne ione poput Ag(II), Al(III), Co(II), Gd(III), Hg(II), Ni(II), Pb(II), Y(III) i Zn(II). Schiffove baze su se istraživale i zbog posjedovanja važnih katalitičkih svojstava. Naime, pokazali su katalitičku aktivnost u hidrogenaciji olefina, a primjenu pronalaze i u biomimetičkim katalitičkim reakcijama [46].

Zanimljiva primjena derivata Schiffovih baza je i kao učinkovitih inhibitora korozije, što se temelji na njihovoj sposobnosti spontanog formiranja jednoslojne zaštite na površini

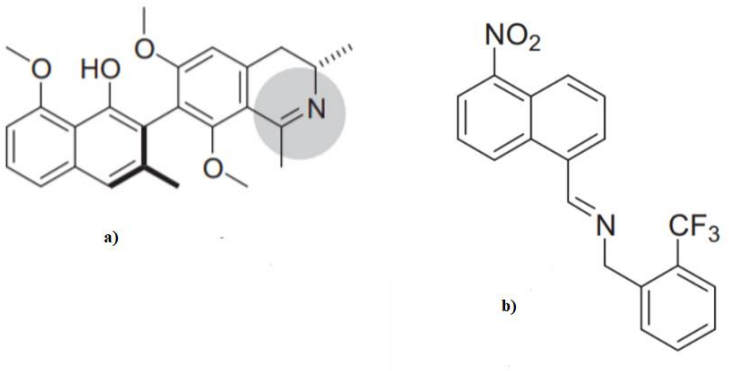
[9] Strukturni motiv dobiven diskonekcijom pri retrosintezi.

metala. Mnogi komercijalni inhibitori uključuju aldehide ili amine, no bolju učinkovitost, u većini slučajeva, duguju C=N vezi [46].

2.1.2.1. Biološka aktivnost i medicinski značaj Schiffovih baza

Biološka važnost Schiffovih baza odnosi se na protuupalno, analgetsko, antimikrobno, antikonvulzivno, antikancerogeno i antioksidacijsko djelovanje, no naglasak istraživanja je stavljen na antikancerogeno djelovanje ovih spojeva koje je rezultat njihove sposobnosti stvaranja metalnih kompleksa (primjerice s kobaltom). Ovi spojevi pokazuju i antivirusno, anti-HIV i antihelmintsko djelovanje, a poznato je još i kako baze dobivene iz 4-dimetilamin benzaldehida pokazuju antibakterijsko djelovanje [45].

Ancistrokladidin (Slika 9. a) je sekundarni metabolit biljaka iz porodica *Ancistrocladaceae* i *Dioncophyllaceae*, koji se pokazao djelotvornim antimalarikom za *P. falciparum*. Sintetizirana je i serija funkcionaliziranih Schiffovih baza, 5-nitroizokinolina i proučavano je njihovo *in vitro* djelovanje protiv *P. falciparum*, soja inače otpornog na klorokvin. Schiffova baza (Slika 9. b) pokazala se kao najučinkovitije antimalarijsko sredstvo među svim sintetiziranim derivatima 5-nitroizokinolina [46].



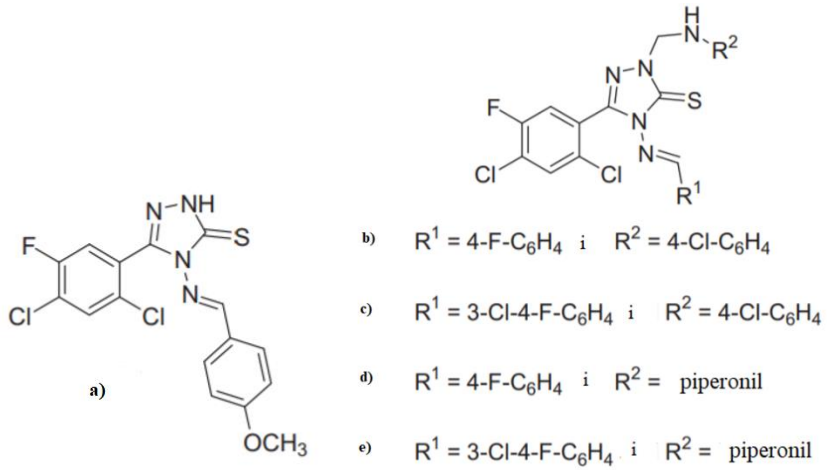
Slika 9. Prikaz struktura ancistrokladidina (a) i derivata 5-nitroizokinolina (b) [46].

Osim antimalarijskog djelovanja, pojedini derivati Schiffovih baza se ističu i kao obećavajuća antibakterijska sredstva. Primjer je *N*-(salicilidin)-2-hidroksianilin djelotvoran protiv bakterije *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv. Selektivnost navedenog spoja je provjerena eksperimentima na makrofagima. Prema utvrđenim rezultatima, ne postoji citotoksični efekt na makrofage čak ni u koncentraciji od 1000 μg/ml. Sintetizirana je i serija

spojeva 5-kloro-salicilaldehid, također derivata Schiffovih baza. Pokazali su se izuzetno aktivnima protiv barem jedne vrste bakterija korištenih u istraživanju, a *Pseudomonas fluorescence* jedan je od najosjetljivijih sojeva bakterija kada govorimo o djelovanju sintetiziranih derivata. Minimalna inhibitorna koncentracija (MIC) vrijednosti pojedinih spojeva varirale su između 2,5 i 5,2 μg/ml, a zanimljivo je napomenuti kako je MIC vrijednost za standardni lijek – kanamicin, protiv iste bakterijske vrste, iznosila 3,9 μg/ml [39, 46].

Pandeya i sur. (1999) proveli su studiju o djelovanju derivata na 28 klinički važnih različitih bakterija, koji su spokazali antibiotičko djelovanje protiv *E. coli*, *Enterococcus faecalis* i *Proteus shigelloides* [47]. Panneerselvam i sur. (2005) opisali su sintezu i *in vitro* antibakterijsko djelovanje 11 Schiffovih baza, derivata morfolina. Ispitani spojevi pokazali su se kao dobri agensi protiv *S. aureus*, *Micrococcus luteus*, *Streptococcus epidermis*, *Bacillus cereus* i *E. coli* [48].

Schiffove baze su učinkoviti agensi u borbi protiv gljivičnih oboljenja. *Alternaria brassicae* i *A. brassicicola* su fitopatogene gljive koje veoma snažno utječu na proizvodnju usjeva poput brokule, cvjetače, repe, kupusa i rotkvice. Učinkovito djelovanje protiv tih gljivica pokazao je spoj *N*-(saliciliden)-2-hidroksianilin. Osim toga, pojedini derivati Schiffovih baza su uspješno inhibirali rast *Botrytis cinerea* i *Colletotrichum lagenarium*, a Schiffove baze koje u svojoj strukturi sadrže 2,4-dikloro-5-fluoropentil ostatak (Slika 10.) pokazale su se značajnima u inhibiciji pojedinih klinički važnih gljivica: *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus flavus*, *Trichophyton mentagrophytes* i *Penicillium marneffei* [39, 46].



Slika 10. Strukture derivata Schiffovih baza koje sadrže 2,4-dikloro-5-fluoropentilni ostatak [39].

Pojedine studije bave se istraživanjem antivirusne aktivnosti Schiffovih baza. Tako su na primjer Sriram i sur. (2006) sintetizirali seriju spojeva na bazi abakavira i potom proučavali njihovo antivirusno djelovanje. Abakavir je nukleozidni analog, a koristi se za liječenje osoba oboljelih od humanog virusa imunodeficijencije (HIV), odnosno sindroma stečene imunodeficijencije (AIDS) i dostupan je pod komercijalnim imenom Ziagen. Neki od sintetiziranih spojeva su pokazali izvrsno djelovanje protiv HIV-1, što ukazuje na njihov potencijal primjene u sintezi novih anti-HIV-1 agenasa [40, 49].

Bhat i Al-Omar (2011) su ispitivali antikonvulzivnu i neurotoksičnu aktivnost serije Schiffovih baza. Svi novosintetizirani spojevi iz navedene serije posjeduju određenu aktivnost i manju toksičnost u odnosu na fenitoin (standardni lijek protiv epilepsije). Spoj koji je supstituiran nitro skupinom na *orto* položaju distalnog arilnog prstena posjeduje, u odnosu na preostale spojeve iz serije, najbolje antikonvulzivno djelovanje [50].

2.1.3. Tiosemikarbazidi – struktura i aktivnost

Tiosemikarbazidi predstavljaju skupinu najjednostavnijih hidrazinskih derivata tiokarbamatne kiseline, a prikazani su na slici 11. a. Kemijsko ponašanje navedenih spojeva slično je njihovim analozima – semikarbazidima (11. b), a razlikuju se po tome što je atom sumpora zamijenjen atomom kisika. Kemijska svestranost tiolne skupine je veća u odnosu na keto skupinu semikarbazida, a produkti poput semikarbazona i tiosemikarbazona (reakcija tiosemikarbazida s aldehidima ili ketonima) poznati su po antivirusnom i antiinfektivnom djelovanju [51, 52].



Slika 11. Strukturni prikaz tiosemikarbazida (**a**) i semikarbazida (**b**) [53, 54].

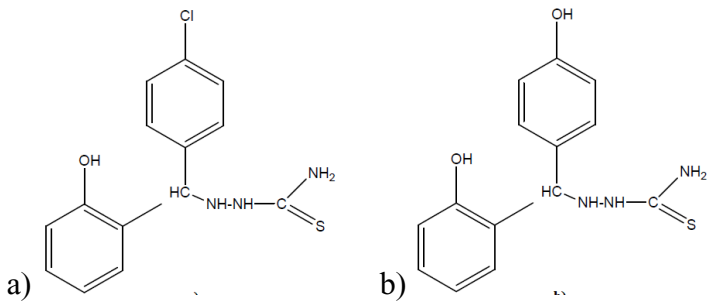
2.1.3.1. Biološka aktivnost i medicinski značaj tiosemikarbazida

Tiosemikarbazidi su intermedijeri za sintezu farmaceutskih i biološki aktivnih materijala što im i omogućava široku primjenu na području medicinske kemije. Iminska veza (–N=CH–) u ovim spojevima je iznimno korisna u organskoj sintezi, no najviše se ističe u

pripravi heterocikličkih spojeva, potom povezivanju s velikim brojem prijelaznih metala (Fe, Ni, Ag, Cu, Pt) u stabilne komplekse (poli-tiosemikarbazidi) i sintezi *β*-aminokiselina koje su uostalom i prepoznate kao potencijalno učinkovita antivirusna, antitumorna i protuupalna sredstva. Reakcije tiosemikarbazida sa spojevima koji u svojoj strukturi sadrže C=O i C=N skupinu je jedna od najvažnijih metoda za sintezu biološki aktivnih spojeva – triazola i tiazola. Općenito, tiosemikarbazidi se kondenziraju s aldehidima i ketonima za sintezu širokog spektra tiosemikarbazona. Mogu se koristiti i za izgradnju brojnih heterocikličkih spojeva i bioaktivnih molekula kao što su derivati tienopirimidin uree i 2-amino tiadiazola [51, 52].

Tiosemikarbazidi posjeduju vrlo zanimljiva biološka djelovanja poput antikancerogenog, anti-HIV, antibakterijskog, antivirusnog i antifungalnog. S obzirom na obilnu prisutnost u biljkama i jednostavnu sintezu, tiosemikarbazidi su interesna skupina u kontekstu terapijske primjene. Biološka aktivnost spojeva se posebno ističe sposobnošću tiosemikarbazida kao liganada da doniraju atome sumpora i dušika. Pozornost privlače učinkovitim djelovanjam protiv gripe, virusa malih boginja, gljivica, ali i karcinoma. Važni su i u industriji zbog antikorozivnog djelovanja [55].

Pojedini derivati tiosemikarbazida i tiosemikarbazona imaju odlična antibakterijska svojstva. Sheikhy i sur. (2012) su sintetizrali seriju spojeva te proučavali njihovo *in vitro* antibakterijsko djelovanje. Njihovo istraživanje je pokazalo da su neki od novosintetiziranih spojeva učinkoviti u borbi protiv *E. coli* i *S. aureus* [55, 56]. Umadevi i sur. (2013) su sintetizirali i ispitali antibakterijsko djelovanje 2-(4-klorofenil)(2-hidroksifenil)metiltio-semikarbazida (slika 12. a) i 2-(2-hidroksifenil)(4-hidroksifenil)metiltiosemikarbazida (slika 12. b). protiv *B. subtilis, S. aureus*, *S. typhi* i S. *dysentery* te odredili zonu inhibicije sintetiziranih derivata i standardnog lijeka ampicilina na odabrane sojeve bakterija [57].



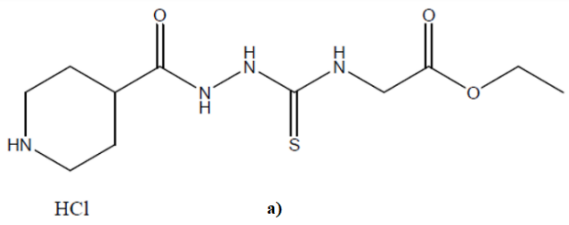
Slika 12. Strukturni prikaz derivata tiosemikarbazida [57].

Spoj b) se pokazao najučinkovitijim u borbi protiv *S. aureus*. Standardni lijek ampicilin nema utjecaja na gram negativne bakterije *S. typhi* i *S. dysentry*, dok su s druge strane svi sintetizirani derivati u tu svrhu djelotvorni [57].

Klayman i sur. (1983) su sintentizirali i istražili antimalarijsko djelovanje supstituiranih 1-[1-(2-piridil)etil]-3-tiosemikarbazida. Testiranjem na zaraženim miševima, spojevi su se pokazali kao bolji antimalarici, u odnosu na odgovarajuće tiosemikarbazone, u suzbijanju *Plasmodium berghei,* no s određenim posljedicama. Naime, povećana aktivnost utjecala je i na povećanje toksičnog učinka [58].

Proučavana je i serija novosintetiziranih derivata tiosemikarbazida u svrhu utvrđivanja antituberkuloznog djelovanja. Novosintetizirani 1-(4-okso-3-butil-3,4-dihidrokinazolin-2-il)-4-(supstituent) tiosemikarbazidi nastali su reakcijom 3-butil-2-hidrazin-kinazolin-4(3*H*)-ona s različitim metilnim esterima ditiokarbamatne kiseline, a pokazali su i*n vitro* aktivnost protiv *M. tuberculosis* [55].

Osim spomenutog, tiosemikarbazidi posjeduju i antikancerogenu aktivnost. Siwek i sur. (2013) su ispitali citotoksični učinak 4-etoksikarbonilmetil-1-(piperidin-4-karbonil)-tiosemikarbazid hidroklorida (Slika 13.) koristeći MTT[10] test. Uočeno je kako navedeni spoj uzrokuje smanjenje broja održivih stanica u receptoru pozitivnom na estrogen (stanična linija raka dojke MCF-7), kao i kod receptora negativnog na estrogen (stanična linija raka dojke MDA-MB-231) s IC_{50} vrijednostima sličnim vrijednostima standardnog lijeka klor-ambucilina [59, 60].



Slika 13. Strukturni prikaz derivata tiosemikarbazida [60].

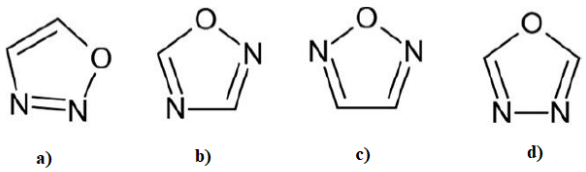
S obzirom na činjenicu da pojedini patogeni mogu razviti rezistenciju na antimikrobna sredstva, javlja se povećana potreba za otkrivanjem novih, učinkovitijih agenasa. Zani i sur. (2015) navode sintetičke fungicide kao jedno od najboljih rješenja u borbi protiv mikotoksina nastalih djelovanjem *Aspergillus* vrsta. Razvijene su inovativne

[10] Kolorimetrijski test za procjenu metaboličke aktivnosti stanice.

metode, a jedna od njih je kombinirano djelovanje sintetičkih tiosemikarbazida i kumarina koji su već pokazali široki spektar bioloških aktivnosti, a antifungalno je samo jedno u nizu [61].

2.1.4. Oksadiazoli – struktura i podjela

Oksadiazoli su heterocikličke molekule koje sadrže atom kisika i dva atoma dušika u svojoj strukturi. Ovisno o položaju dušika u prstenu, poznata su četiri izomera – 1,2,3-oksadiazol (Slika 14. a), 1,2,4-oksadiazol (Slika 14. b), 1,2,5-oksadiazol (Slika 14. c) i 1,3,4-oksadiazol (Slika 14. d) s time da je prvi navedeni nestabilan jer otvaranjem prstena tvori diazoketon tatutomer [62].



Slika 14. Strukturni prikaz izomera oksadiazola [62].

1,3,4-oksadiazol je najpoznatiji i najviše istraživan izomer. Nastaje iz furana supstitucijom dvije metilenske skupine (=CH) s dva dušika piridinskog tipa (–N=). Vrlo je slaba baza zbog induktivnog efekta dodatnog heteroatoma. Budući da dušik (piridinski tip) reducira dvije –CH skupine oksadiazola, smanjuje se aromatičnost konačnog oksadiazolnog prstena i on pokazuje svojstva konjugiranog diena. Osim toga, prsten je izuzetno otporan na elektrofilnu supstituciju zbog niske elektronske gustoće ugljikovog atoma. Ako dođe do promjene na elektron donorskim skupinama, supstitucija se odvija na dušiku. Iako je vjerojatnost za elektrofilnu supstituciju malena, za nukleofilnu supstituciju, ona se dodatno smanjuje, no i dalje postoji. Reakcija se može odviti na halogenom elementu, na taj način oksadiazolni prsten podliježe suptituciji – eliminirajući halogeni atom pomoću nukleofila. Poznate su i reakcije cijepanja prstena kod 1,3,4-oksadiazola, inače vrlo značajne u različitim područjima medicinske kemije jer vode razvoju novih, medicinski značajnih spojeva [63, 64].

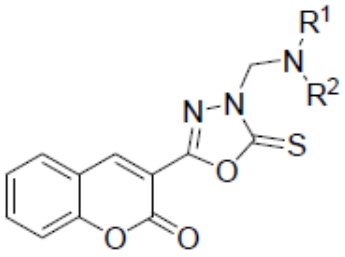
Iako se svojom primjenom u medicinskoj i faramceutskoj industriji ističe 1,3,4-oksadiazol, detaljno poznajemo svojstva još jednoga izomera – 1,2,4-oksadiazola. Naime,

1,2,4-oksadiazol je član obitelji azola[11], a poput 1,3,4-oksadiazola posjeduje široki spektar bioloških aktivnosti. Djeluje inhibitorno na aktivnost triptaze, posjeduje genotoksičnu i antitripanosomalnu te antihiperglikemijsku aktivnost [65].

2.1.4.1. Biološka aktivnost i medicinski značaj oksadiazola

Fenoli prošireni oksadiazolom s kumarinskom jezgrom su se pokazali djelotvorima za „hvatanje“ 2,2'-azinobis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfonata) kationskih radikala ($ABTS^{+}$) i inhibiciju oksidacije DNA uzrokovane 2,2'-azobis(2-amidinopropan hidrokloridom) (AAPH) i Cu^{2+}/glutationom (GSH). Dobiveni rezultati upućuju na inhibitorni učinak spomenutih spojeva u kontekstu Cu^{2+}/GSH inducirane oksidacije DNA. Utvrđeno je kako veći broj hidroksilnih skupina u spoju potiče inhibitorno djelovanje te kako prisutnost broma i klora inhibira DNA oksidaciju [64, 65].

Khan i sur. (2016) proučavali su oksadiazole (Slika 15.) kao inhibitore aldoza reduktaze (ALR2), kao i selektivnost u odnosu na aldoza reduktazu 1 (ALR1) u liječenju šećerne bolesti. Spoj b) se pokazao vodećim kandidatom u inhibiciji ALR1, koja je bila 17 puta jača inhibicija u odnosu na standardni inhibitor. Navedeni spoj posjeduje dugi alifatski (*n*-Bu) lanac kao supstituent. Zamjena *n*-butilne skupine s *para*-klorofenilnim prstenom vodi smanjenju aktivnosti, no čak i u tom slučaju, ona je 10 puta jača u usporedbi sa standardnim inhibitorom. Spojevi d) i g) su se iskazali kao najbolji selektivni inhibitori ALR2 [66].

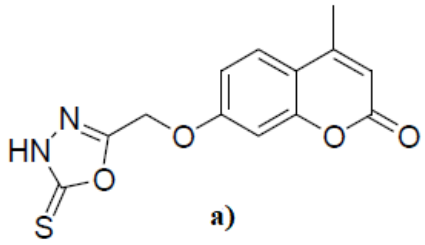


a R^1 = H, R^2 = CH_3
b R^1 = H, R^2 = n-Bu
c R^1 = H, R^2 = 4-CH_3-C_6H_4
d R^1 = H, R^2 = 2-Cl-C_6H_4
e R^1 = H, R^2 = 3-Cl-C_6H_4
f R^1 = H, R^2 = 4-Cl-C_6H_4
g R^1, R^2 = morfolin
h R^1, R^2 = C_6H_5

Slika 15. Strukturni prikaz kumarin-oksadiazol tion hibrida [66].

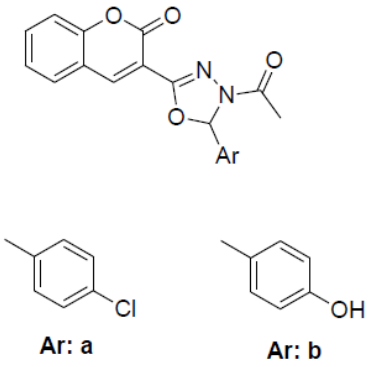
[11] Azoli su peteročlani heterociklički spojevi s dva ili tri atoma dušika. Čine veliku skupinu organskih spojeva i već su dugo predmet interesa zbog upotrebe u terapijske svrhe.

Spoj 4-metil-7-((5-tiokso-4,5-dihidro-1,3,4-oksadiazol-2-il)metoksi)-2*H*-kromen-2-on (Slika 16.) je pokazao visoki stupanj antioksidacijske aktivnosti, dosežući djelotvornost u „hvatanju“ slobodnih radikala od 94 % u odnosu na standard propil-galat[12] čija je djelotvornost 91 % [65].



Slika 16. Struktura 4-metil-7-((5-tiokso-4,5-dihidro-1,3,4-oksadiazol-2-il)metoksi)-2*H*-kromen-2-ona [65].

(3-(4-Acetil-5-fenil-4,5-dihidro-1,3,4-oksadiazol-2-il)-2*H*-kromen-2-on (Slika 17.) je proučavan u svrhu utvrđivanja antihelminitičkog djelovanja koristeći gliste, *Pheretima posthuma*. Primjena spojeva 4-kloro i 4-hidroksi (Slika 17.) uzrokovala je smrt ispitivanih parazita u iznimno kratkom vremenu. Otkrića su ukazala na obećavajuće djelovanje ovih spojeva kao lijekova u borbi protiv parazitskih helminitskih infekcija kod čovjeka [65].

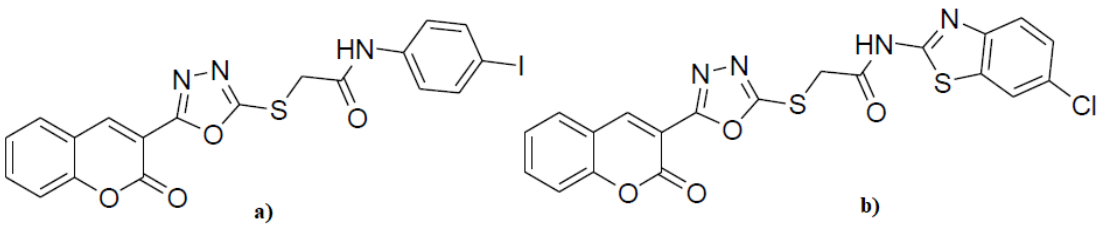


Slika 17. Prikaz potencijalnih antihelmintičkih kumarin-oksadiazol hibrida [65].

[12] Propilni ester galne kiseline koja je prirodni biljni fenolni spoj, ujedno i aditiv koji sprječava oksidaciju masti.

Bobade i sur. (2012) sintetizirali su seriju novih tiosupstituiranih derivata oksadiazola s kumarinskom jezgrom i ispitali antibakterijsko i antifungalno djelovanje. Derivati koji imaju elektron donorske skupine ili fluor direktno vezan za fenilni prsten su pokazali dobro antibakterijsko i antifungalno djelovanje. Utvrđeno je i značajno smanjenje u antimikrobnom djelovanju primjenom spojeva koji imaju elektron odvlačeće skupine u fenolnom prstenu [67].

N-(4-jodo-fenil)-2-[5-(2-okso-2*H*-kromen-3-il)-[1,3,4]oksadiazol-2-ilsulfanil]-acetamid (Slika 18. a) i *N*-(6-kloro-benzotiazol-2-il)-2-[5-(2-okso-2*H*-kromen-3-il)-[1,3,4] oksadiazol-2-ilsulfanil]-acetamid (Slika 18. b) su ispitivani zbog potencijalnog *in vitro* antituberkuloznog djelovanja koristeći Lowenstein-Jensen MIC metodu[13]. Potvrđen je viši stupanj mikobakterijske inhibitorne učinkovitosti (99 %) pri koncentraciji 12,5 µg/ml (MIC) te polovično mikobakterijsko djelovanje od onoga koje posjeduje standardni lijek [65].



Slika 18. Strukturni prikaz derivata oksadiazola s kumarinskom jezgrom [65].

Khan i Akhtar (2003) su ispitivali derivate oksadiazola s kumarinskom jezgrom u svrhu utvrđivanja analgetičkog i protuupalnog djelovanja. Jedan od ispitivanih spojeva je 7-((5-(etiltio)-1,3,4-oksadiazol-2-il)metoksi)-4-metil-2*H*-kromen-2-on, čija je protuupalna aktivnost uspoređivana sa standardnim lijekom indometacinom. Spoj se pokazao kao izvrsna alternativa indometacinu koja nije ulcerogena[14] pri koncentraciji od 60 mg/kg te je netoksična do koncentracije od 240-300 mg/kg. Nadalje, Khan i Akhtar. (2003) su proučavali analgetsko djelovanje 2-(kumarin-3-il)-5-aril-1,3,4-oksadiazola i 4-metil-7-(5-supstituiran-1,3,4-oksadiazol-2-ilmetoksi) kumarina. Derivati su pokazali djelotvornost

[13] Metoda koja podrazumijeva uporabu Lowenstein Jensen podloge korištene za izolaciju i uzgoj mikobakterija.
[14] Ulcer – otvoreni čir na vanjskoj ili unutarnoj površini tijela, uzrokovan pucanjem kože ili sluznice koja ne zarasta. Čirevi se kreću od manjih, bolnih u usnoj šupljini do ozbiljnijih koji oštećuju želudac i crijeva.

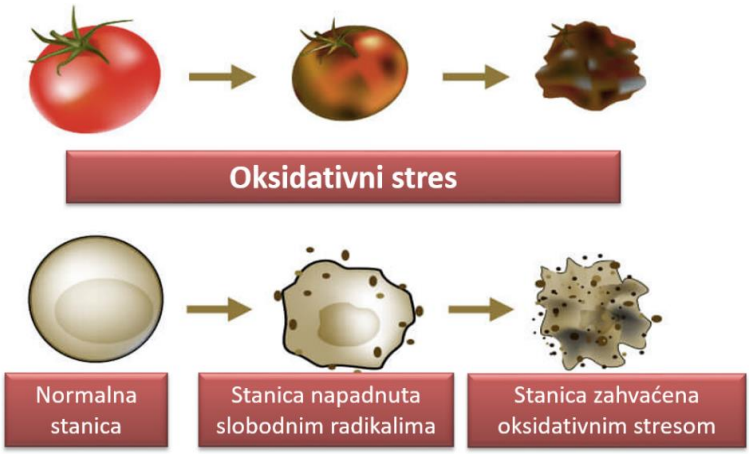
između 80 i 87 %, odnosno između 58 i 77 %, što je dobra vrijednost u odnosu na referetni lijek pentazocin (94,5 %) [65, 66].

2.2. Antioksidacijska aktivnost

Antioksidacijska aktivnost se često povezuje s biološkim materijalom pa se može definirati kao ograničena oksidacija nukleinskih kiselina, lipida ili proteina odnoso biološki značajnih makromolekula. Pri tome se blokira faza propagacije, odnosno napredovanja u oksidacijskim lančanim reakcijama. Antioksidansi mogu djelovati tako da izravno „hvataju" slobodne radikale (primarni antioksidansi) ili indirektno sprječavaju formiranje slobodnih radikala (sekundarni antioksidansi). Antioksidacijska aktivnost spoja ili ekstrakta može se određivati *in vitro*, ali i *in vivo*. *In vitro* određivanje antioksidacijske aktivnosti može se odvijati kao procjena sposobnosti „hvatanja" slobodnih radikala, potom procjena na temelju redukcije metalnih iona, inhibicije lipidne peroksidacije u plazmi i procjena koristeći stanične kulture u borbi protiv oksidacijskog stresa [68].

2.2.1. Oksidativni stres i slobodni radikali

Oksidativni stres (Slika 19.) je stanje nastalo zbog neravnoteže između količine slobodnih radikala i antioksidansa u tijelu. Slobodni radikali su molekule koje u svojoj strukturi sadrže nespareni elektron, zbog čega su vrlo reaktivni i vrlo lako stupaju u reakcije. S obzirom na kratko vrijeme poluživota, slobodni radikali imaju tendenciju za ubrzanom stabilizacijom pa se lančanim reakcijama povezuju s molekulama i atomima prisutnima u okolini, a rezultat su novi radikali. Završetak lančane reakcije, odnosno „neutralizacija" slobodnih radikala se može dogoditi u slučaju međusobne reakcije dvaju radikala koja daje neradikal, ali s obzirom na njihovu nestabilnost i na veoma nisku koncentraciju radikala u tkivima, takve su reakcije iznimno rijetke. Antioksidansi su molekule koje mogu donirati elektron ili proton slobodnom radikalu bez štetnih posljedica za vlastitu stabilnost. Nakon što prime elektron, slobodni radikali su stabilizirani i manje reaktivni [68, 69].



Slika 19. Prikaz utjecaja oksidativnog stresa na zdravu stanicu [70].

Reaktivne kisikove vrste (engl. *Reactive Oxygen Species,* ROS) (Tablica 2.) posebice superoksidni anion radikal ($O_2^{-\cdot}$), hidroksilni radikal ($\cdot OH$) i perhidroksilni radikal ($\cdot O_2H$), imaju snažan negativan učinak na biološke molekule [69].

Tablica 2. Reaktivne (radikalske i neradikalske) kisikove vrste [69].

Radikalske kisikove vrste	**Neradikalske kisikove vrste**
Hidroksilni, OH^-	Vodikov peroksid, H_2O_2
Superoksidni, $O_2^{\cdot -}$	Hipokloritna kiselina, HOCl
Peroksilni, RO_2^-	Ozon, O_3
Alkoksilni, RO^-	Singletni kisik, $^1\Delta gO_2$
Hidroperoksilni, HO_2^-	Peroksinitrit, $ONOO^-$

Oksidacija je posve normalan i prijeko potreban proces u našem tijelu, dok s druge strane, oksidacijski stres može dovesti do brojnih neželjenih problema (Slika 19.). U slučaju neuravnoteženog odnosa s antioksidansima, radikali uzrokuju oštećenja masnog tkiva, DNA i proteina u tijelu što može voditi ka razvoju dijabetesa, ateroskleroze, hipertenzije, bolesti srca, raka te neurodegenerativnih bolesti [69].

Postoje i egzogeni, odnosno vanjski izvori slobodnih radikala kojima smo svakodnevno izloženi i koji velikim dijelom doprinose procesu starenja. Riječ je o ozonu, određenim pesticidima, dimu cigarete, radijaciji, zagađenju ili kemikalijama, ali i alkoholu te hrani bogatoj šećerom i masnoćama koja pridonosi povećanoj proizvodnji slobodnih

radikala. Nadalje, neionizirajuće zračenje, jedan od izvora slobodnih radikala u organizmu, može uzrokovati hidrolizu vode i stvaranje hidroksilnih radikala. U neenzimskim reakcijama, s kisikom ili vodikovim peroksidom, mogu reagirati ioni prijelaznih metala poput Cu^{2+}, Co^{2+}, Ni^{2+} i Fe^{2+} pa tako ponovno dovesti do nastanka hidroksilnog radikala [69].

Literatura opisuje i djelovanje dušikovog monoksida, također radikala, koji u slučaju interakcije sa superoksidnim radikalom kao produkt daje peroksinitrit ($ONOO^-$). Peroksinitrit potom u prisutnosti Fe^{3+} iona, u fiziološkim uvjetima, veže jedan proton i daje peroksinitritnu kiselinu koja oslobađa dva radikala – hidroksilni i NO_2 radikal. Superoksidni radikal pripada grupi reaktivnih kisikovih vrsta i važan je čimbenik u nekoliko reakcija kataliziranih enzimima. U tom kontekstu je važno spomenuti superoksid-dismutazu, enzim čija je uloga katalizirati reakciju između vode i superoksidnog radikala. Prilikom te reakcije kao produkti nastaju kisik i vodikov peroksid koji će naposljetku biti uklonjen djelovanjem katalaze i peroksidaze. Nastaju dvije molekule vode i jedna molekula kisika [69].

2.2.2. Antioksidansi

Poznajemo brojne mehanizme koji mogu ublažiti oksidacijski stres i popraviti oštećene makromolekule. (Ne)enzimatski antioksidansi posjeduju važne uloge u kontekstu hvatanja slobodnih radikala i ROS-a. Antioksidanse definiramo kao prirodne ili sintetske tvari koje mogu spriječiti određena stanična oštećenja. Osim toga, možemo ih razlikovati s obzirom na mehanizam djelovanja ili prema aktivnosti za vrijeme lančanih reakcija radikala. Kada je riječ o mehanizmu djelovanja, antioksidansi su tvari koje mogu zaustaviti lančane reakcije, razlagati perokside, inaktivirati metalne ione ili „hvatati“ reaktivne kisikove vrste. Dok prema drugoj podjeli, antioksidansi mogu biti preventivni (spriječiti nastanak slobodnih radikala), enzimski (spriječiti lančane radikalske reakcije) ili stupiti u reakciju s novonastalim reaktivnim vrstama i djelovati stabilizirajuće – „hvatači slobodnih radikala“ [71].

Antioksidansi se mogu podijeliti u dvije klase – primarni ili engl. *chain-breaking* antioksidansi te sekundarni ili preventivni antioksidansi. Primarni antioksidansi su spojevi, uglavnom fenolne tvari, koje imaju sposobnost prekidanja lančanih reakcija slobodnih radikala u oksidaciji lipida i koji uglavnom djeluju kao donori atoma vodika i elektrona. Na slici 20. su prikazani mehanizmi primarnih antioksidansa, odnosno tri glavna puta pomoću kojih suzbijaju oksidacijske reakcije. Kao primarni antioksidansi (AH), djeluju po

mehanizmu prijenosa atoma vodika. Na slici 20. je prikazana reakcija antioksidansa s visoko reaktivnim lipidnim radikalom, alkoksi radikalom i peroksi radikalom. Prijenos protona na radikal dovodi do nastanka stabilnih derivata organskog lipida i radikala antioksidansa koji je stabilniji i manje dostupan za sudjelovanje u reakcijama propagacije (napredovanja). Primarni antioksidansi imaju jače afinitete za peroksi radikale od lipida pa pretežno i reagiraju s istima [72, 73]

$$L^{\bullet} + AH \rightarrow LH + A^{\bullet}$$
$$LO^{\bullet} + AH \rightarrow LOH + A^{\bullet}$$
$$LOO^{\bullet} + AH \rightarrow LOOH + A^{\bullet}$$

Slika 20. Mehanizmi djelovanja primarnih antioksidansa [72].

Sekundarni (preventivni) antioksidansi usporavaju brzinu oksidacije. Naime, oni ne pretvaraju slobodne radikale u stabilne molekule već se ponašaju kao kelatori za prooksidans ili katalizatorske ione metala. Osiguravaju atom vodika primarnim antioksidansima, razlažu hidroperokside u neradikalske vrste, deaktiviraju singletni kisik, apsorbiraju ultraljubičasto zračenje ili djeluju kao „hvatači“ kisika. Općenito poboljšavaju antioksidacijsku aktivnost primarnih antioksidansa [73].

Jedan od najistaknutijih prirodnih antioksidansa je vitamin C. Neophodan je za normalan rast i razvoj, a ujedno djeluje i kao kofaktor za nekoliko enzima važnih u postrtranslacijskoj hidroksilaciji kolagena, biosintezi karnitina, konverziji neurotransmitera dopamina u norepinefrin, amidaciji peptida i u metabolizmu tirozina. Vitamin C se ističe i kao snažan antioksidans s mogućnošću doniranja vodikovog atoma i formiranja relativno stabilnog askorbil slobodnog radikala. Vitamin E, C i β-karoten poznati su kao antioksidacijski vitamini koji utječu na smanjenje oksidativnih oštećenja i smanjuju rizik od kroničnih bolesti pa su kardiovaskularna oboljenja izravno povezana s neadekvatnim koncentracijama L-askorbinske kiseline, tokoferola i β-karotena [68]. Međutim, u prisutnosti redoks aktivnih iona (Cu, Fe) vitamin C se ponaša kao prooksidans, čime doprinosi formiranju hidroksilnih radikala koje mogu prouzročiti oksidaciju lipida, proteina ili DNA [74].

Antioksidacijski enzimi poput katalaze, superoksid dismutaze, glutation reduktaze, glutation peroksidaze te u biljkama askorbat peroksidaza i neenzimatski antioksidansi, uključujući glutation i askorbat, pokazuju iznimnu osjetljivost na oksidativni stres. Kako je

već prethodno spomenuto, antioksidansi mogu prevenirati nekontolirano nastajanje slobodnih radikala ili inhibirati njihove štetne interakcije [74].

2.3. Istraživanja antioksidacijske aktivnosti

Prilikom analize aktivnosti antioksidansa i pripadnog mehanizma djelovanja, važno je razlikovati pojmove antioksidacijske aktivnosti i antioksidacijskog kapaciteta. Naime, antioksidacijska aktivnost se odnosi na konstantu brzine reakcije između antioksidansa i oksidansa, dok antioksidacijski kapacitet mjeri količinu slobodnog radikala koji je neutraliziran, odnosno „uhvaćen“ pomoću antioksidansa. Primjer su mjerenja razina antioksidacijske aktivnosti/kapaciteta u hrani i biološkim tekućinama u svrhu smislene usporedbe sadržaja antioksidansa u namirnicama te dijagnoze i liječenja bolesti uzrokovanih oksidacijskim stresom [68].

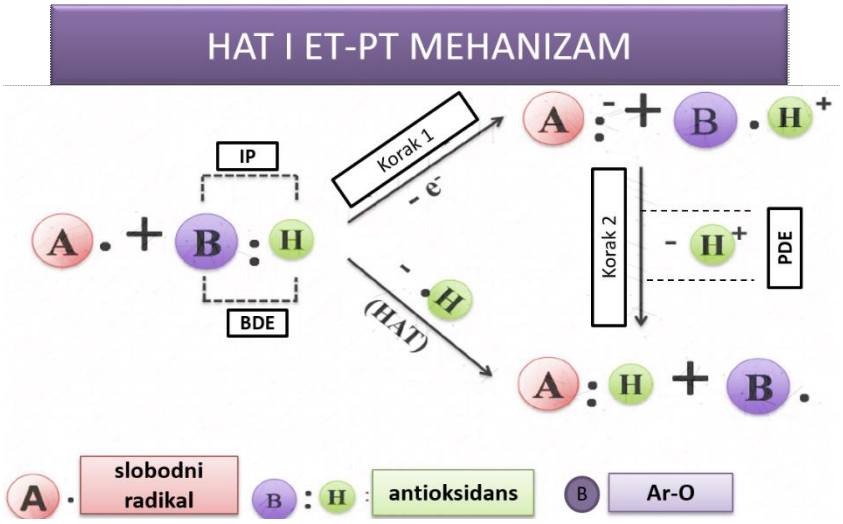
Tijekom odabira metode se mora uzeti u obzir parametar odgovora kako bi se uspješno procijenila antioksidacijska aktivnost uzorka. Spomenuti parametar može biti funkcija koncentracije supstrata ili koncentracija i potrebno vrijeme za inhibiciju definirane koncentracije ROS-a. Reakcijski mehanizmi antioksidacijskih spojeva su usko povezani s reaktivnošću i kemijskom strukturom slobodnih radikala, ali i s okolinom u kojoj se reaktivne vrste nalaze [68].

Većina testova antioksidacijske aktivnosti uključuje induciranje ubrzane oksidacije u prisutnosti promotora te kontrolu jedne ili više varijabli u ispitnom sustavu. Primjer su temperatura, koncentracija antioksidansa i pH. Oksidacijski mehanizmi se mogu promijeniti kada se modifikacije odvijaju na temelju jedne od spomenutih varijabli. Stoga je važno procijeniti intervale u kojima se dogodila kvantifikacija antioksidacijske aktivnosti jer se na taj način generiraju pouzdani rezultati [68, 72].

2.3.1. Mehanizmi i termodinamički parametri antioksidacijske aktivnosti

U literaturi postoji mnogo *in silico* metoda za procjenu učinkovitosti antioksidacijskih molekula prisutnih u brojnim matricama (biljni ekstrakti, krvni serum) koristeći odgovarajuće medije. *In silico* metode se mogu podijeliti u dvije glavne skupine. Jedna skupina se odnosi na mehanizme antioksidacijske aktivnosti utemeljene na prijenosu vodika (sa ili bez separacije naboja). Druga skupina se odnosi na mehanizme antioksidacijske aktivnosti utemeljene na formiranju radikalskog adukta [68].

Mehanizmi utemeljeni na reakciji prijenosa atoma vodika (HAT) ili reakciji prijenosa jednog elektrona (engl. *Single Electron Transfer*, SET) su dva najčešće ispitivana mehanizma antioksidacijske aktivnosti utemeljene na prijenosu vodika (slika 21.). Međutim, za ispitivanje antioksidacijskih svojstava uzoraka potrebno je primijeniti više od jedne metode ili mehanizma kako bi se dobili što točniji rezultati. Osim dva navedena, često se koriste mehanizam prijenosa jednog elektrona praćen prijenosom protona (engl. *Single Electron Transfer followed by Proton Transfer*, SET-PT), gubitak protona praćen prijenosom elektrona (engl. *Sequential Proton Loss Electron Transfer*, SPLET) i mehanizam spregnutog prijenosa protona i elektrona (engl. *Proton Coupled Electron Transfer*, PCET) te reakcija formiranja radikalskog adukta (engl. *Radical Adduct Formation*, RAF). Konačni rezultat je isti – inaktivacija slobodnih radikala, no ono što se razlikuje je kinetika reakcija. Koji od spomenutih mehanizama će se odvijati unutar danog sustava ovisi o strukturi i svojstvima antioksidansa, topljivosti i sustavu otapala [72, 75].



Slika 21. Prikaz pojedinačnih reakcija HAT i ET-PT (SET-PT) mehanizma [76].

U HAT mehanizmu dolazi do homolitičkog cijepanja veze i uglavnom je prefiran u plinovitoj fazi i nepolarnom mediju jer ne uključuje separaciju naboja. S druge strane, separacija naboja koja se odvija u SET-PT i SPLET mehanizmu čini ova dva puta pogodnijima za polarni medij. Entalpija disocijacije veze (engl. *Bond Dissociation Enthalpy,* BDE) i ionizacijski potencijal (engl. *Ionization Potential*, IP*)* su dva parametra koja karakteriziraju ove mehanizme i prema njima se može procijeniti antioksidacijski potencijal [72, 75].

HAT mehanizam podrazumijeva reakciju u kojoj se atom vodika prenosi s molekule antioksidansa (B:H) na radikal (A·), kao što je prikazano na slici 21. Kao rezultat nastaje molekula A:H (to je reducirani i time neutralizirani radikal A·) i radikal antioksidansa koji je manje reaktivan u odnosu na početnu radikalsku vrstu (B·) [77]. HAT reakcije su veoma brze, odnosno dovršene u nekoliko sekundi do nekoliko minuta. Prisutnost redukcijskog sredstva, uključujući metale, može predstavljati komplikaciju za HAT testove i dovesti do pogrešne, prividno visoke reaktivnosti. Ovdje je BDE glavni parametar za procjenu antioksidacijske aktivnosti i što je ova vrijednost niža, lakše će se odviti inaktivacija slobodnog radikala [78].

Metode bazirane na SET mehanizmu detektiraju sposobnost antioksidansa da donira elektron u svrhu redukcije nekog metala, spoja ili radikala, čime nastaje radikalski intermedijer (slika 21.). Relativna reaktivnost u SET metodama se prvenstveno temelji na deprotonaciji i ionizacijskom potencijalu reaktivne funkcionalne skupine pa je za procjenu antioksidacijskog djelovanja putem ovog mehanizma glavni parametar IP [77]. Važno je napomenuti da se SET i HAT gotovo uvijek odvijaju paralelno. Osim toga, određene komponente u tragovima i kontaminati (osobito metali) interferiraju sa SET metodama te su odgovorni za viosku varijabilnost, slabu reproducibilnost i konzistentnost rezultata [78].

In vitro testovi temeljeni na HAT mehanizmu uključuju analizu kapaciteta apsorbcije radikalskog kisika (engl. *Oxygen radical absorbance capacity*, ORAC), ukupni antioksidacijski parametar „hvatanja“ radikala (engl. *Total Radical-Trapping Antioxidant Parameter*, TRAP), analizu koristeći R-fikoeritrin kao fluorescentnu probu, test obezbojenja krocina uz uporabu 2,2'-azobis(2-amidinopropan) hidroklorida (AAPH) kao generatora radikala i test obezbojenja *β*-karotena [71]. *In vitro* metode bazirane na SET mehanizmu uglavnom posjeduju točno definirano vrijeme za određenu redoks reakciju i mjere termodinamičku pretvorbu (oksidaciju) tijekom utvrđenog vremenskog perioda. Riječ je o ABTS/TEAC[15], DPPH[16], Folin-Ciocalteu reagens, FRAP i CUPRAC testovima koji koriste različite kromogene redoks reagense s različitim standardnim potencijalom [72].

SET-PT je mehanizam koji se odvija u dva koraka. Prvi korak, karakteriziran IP, uključuje nastanak radikalskog kationa koji je ujedno početna vrsta za sljedeći korak mehanizma – deptoronaciju karakteriziranu entalpijom disocijacije protona (engl. *Proton*

[15] 2,2'-azinobis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfonata)/engl. *Trolox Equivalent Antioxidant Capacity*
[16] 2,2-difenil-1-piroksihidrazil

Dissociation Enthalpy, PDE). Za odvijanje mehanizma vrlo važnu ulogu igra otapalo. SET-PT je manje zastupljen u odnosu na HAT i PCET mehanizme zbog sporog odvijanja prvog koraka reakcije. Međutim, jednom kada se formira, radikalski kation vrlo lako gubi proton u drugom koraku. Mehanizam igra vrlo važnu ulogu u prevenciji oksidativnih oštećenja uzrokovanih visoko reaktivnim vrstama poput hidroksilnog radikala [75, 79]. Galano i sur. (2009) u svome radu opisuju važan utjecaj ovog mehanizma kao glavnog reakcijskog puta za reakcije gvanozina i hidroksilnog radikala [80].

SPLET mehanizam se također sastoji od dva koraka. U prvom dolazi do deprotonacije odgovarajućeg antioksidansa koje je praćeno nastankom aniona antioksidansa. Prvi korak je karakteriziran afinitetom za proton (engl. *Proton Affinity*, PA). U drugom koraku anion gubi elektron i taj korak je karakteriziran entalpijom transfera elektrona (engl. *Electron Transfer Enthalpy*, ETE). Štoviše, ne smije se zaboraviti ni izostaviti uloga otapala u ovim reakcijama. Očekivano je kako će SPLET mehanizam dominirati u vodi, ali ne i u lipidnoj fazi karakterističnoj za biološke sustave [75].

U slučaju RAF mehanizma, antioksidans neće ustupiti svoj proton već će formirati radikalski adukt sa slobodnim radikalom. Vrlo važnu ulogu u odvijanju reakcije igraju svojstva slobodnog radikala. Naime, elektrofilni slobodni radikali posjeduju najveći potencijal za sudjelovanje u ovoj vrsti reakcije. Reakcijski centar odgovarajućeg antioksidansa treba biti lako dostupan, dok bi slobodni radikal trebao biti male ili srednje veličine kako bi se izbjegle potencijalne steričke smetnje. Najveća vjerojatnost odvijanja RAF mehanizma je kod „hvatanja“ hidroksilnih radikala s kafeinom, melatoninom, hidroksibenzilnim alkoholom i karnozinom [75].

Mehanizmi „hvatanja“ slobodnih radikala uvelike ovise o svojstvima „uhvaćenih“ radikalskih vrsta. Stoga, osim reakcijske entalpije, izračuni promjene Gibbsove energije također predstavljaju kvantitet koji doprinosi razumijevanju ovih procesa [75].

3. MATERIJALI I METODE

3.1. Računalni detalji – MOPAC2012^{TM} i PM7 metoda

MOPAC2012^{TM} je semiempirijski, kvantno-kemijski program temeljen na *Dewar* i *Thiel* NDDO *(*engl. *Neglect of Diatomic Differential Overlap)* aproksimaciji. U ovome radu je korišten za izračun reakcijskih entalpija u plinovitoj fazi, odnosno za ispitivanje termodinamike cijepanja N–H, C–H i O–H veza [81].

Program donosi znatna poboljšanja u geometriji i energiji proteina, kristala, kokristala, metalnih klastera, anorganskih i ostalih kondenziranih faznih sustava u odnosu na prethodne verzije. MOPAC je izmijenjen novom i preciznijom parametrizacijom (PM7) za sve glavne skupine elemenata, ali i one prijelazne. Nova difuzna funkcija za PM7 značajno poboljšava predviđanja intermolekularnih interakcija. Eksperimentalni i *ab initio* podaci prikupljeni za više od 9000 spojeva su korišteni za razvoj PM7. MOPAC2012^{TM} s PM7 metodom predstavlja tek drugi veći napredak u metodologiji MOPAC-a od 1983. godine kada je objavljena PM3 metoda [81].

MOPAC je najčešće citirani semiempirijski program i posjeduje daleko više precizno objavljenih podataka u usporedbi s bilo kojim drugim računalnim programom. Korišten je za provjeru i ispravljanje grešaka u objavljenim eksperimentalnim podacima entalpija nastajanja [81].

MOPAC-ov linearni sustav skaliranja – MOZYME dopušta optimizaciju geometrije za do 15000 atoma (proteina), dok je konvencionalni MOPAC ograničen na otprilike 1500. PM7 pozicionira premošćujući vodikov atom na otprilike jednaku udaljenost između kisikovih atoma u anionima dikarboksilne kiseline poput aniona vodikovog diacetata i vodikovog maleata te u niklovom dimetilglioksimu, što je u skladu s eksperimentalnim viđenjima i DFT geometrijom (engl. *Density Functional Theory*). S AM1 i PM3 metodom je vodikov atom pogrešno prikazan. Sukladno tome, PM7 nudi velika poboljšanja u usporedbi s AM1 i PM3. Naime, semiempirijski izračuni plinovite faze koristeći PM3 metodu pogrešno predviđaju podatak o višoj slobodnoj energiji enolnog tautomera u odnosu na keto tautomer, dok s druge strane PM6 i PM7 ispravno predviđaju manju energiju enolnog oblika u plinovitoj fazi, što je konzistentno s DFT rezultatima i eksperimentalnim podacima [81].

Novi algoritam u MOPAC2012™ olakšava brzu procjenu svojstava za veliki broj pohranjenih molekula (lijekova), a jedno od njih je i pKa vrijednost. Brzina samog programa i preciznost koju pruža PM7 su posebno značajne u svrhu generiranja elektronskih opisa za ispitivanje kvantitativne veze između strukture i svojstava (engl. *Quantitative Structure-Activity Relationship,* QSAR). PM7 uključuje parametre za široki raspon elemenata što je više od bilo kojeg drugog semiempirijskog kvantnog kemijskog programa jer kako je već spomenuto, sve su glavne skupine elemenata i prijelazni metali do bizmuta sada parametrizirani. MOPAC2012™ može analizirati proširene molekule, odnosno ravnolančane polimere uključujući „*bucky*“ cijevčice[17] (jednodimenzionalno), površine (dvodimenzionalno) i kristale (trodimenzionalno) s periodičnim graničnim uvjetima (engl. *Periodic Boundary Condition,* PBC)[18]. Ovim su pristupom eliminirani problemi nepoželjnih „rubnih“ efekata i olakšan je izračun svojstava na proširenim sustavima što je inače nemoguće u ostalim kvantnim programskim paketima [81].

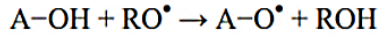
Svojstva koja je moguće odrediti spomenutim programom su ona termodinamička poput entalpije nastajanja, entropije, slobodne energije i toplinskog kapaciteta. Osim toga, moguće je odrediti i vibracijski (IR) spektar (uključujući izotopni efekt), dipolni moment, ionizacijski potencijal, parcijalni naboj, redoslijed veza, polarizacije ovisne o frekvenciji i hiperpolarizacije, pKa, molekularne orbitale, elektronsku gustoću, elekrostatički potencijal, prijelazna stanja i geometriju pobuđenog stanja [81].

Iako se primjenom drugih komercijalno dostupnih računalnih programa (na primjer Gaussian) mogu dobiti precizniji izračuni termodinamičkih parametara, njihov nedostatak je visoka cijena i dugo vrijeme izračuna, što ovisi o računalu, složenosti strukture spoja i računalnim detaljima (nivo teorije, bazni set, funkcional, utjecaj otapala). Termodinamički izračuni dobiveni uporabom PM7 metode su manje precizniji, međutim izračuni se brže odvijaju a dobiveni rezultati su slični onima dobivenima primjenom drugih računalnih programa. U ovoj preliminarnoj studiji smo se zbog brzine izračuna i ograničenog vremena odlučili za MOPAC programski paket.

[17] Nnocjevčica sastavljena od čistog ugljika s molekularnim rasporedom sličnim kao kod fulerena.
[18] Skup uvjeta koji se često koriste za aproksimaciju velikog (beskonačnog) sustava pomoću malenog dijela koji se naziva jedinična ćelija. Koriste se uglavnom u računalnim simulacijama i matematičkim modelima.

3.2. Izračuni termodinamičkih parametara i mehanizmi reakcija za HAT i SET-PT

Za izradu ovog diplomskog rada su ispitana dva mehanizma antioksidacijske aktivnosti – HAT (slika 22.) i SET-PT [79].



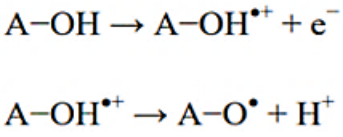
Slika 22. HAT mehanizam [79].

Kao što je prikazano na slici 22., HAT mehanizam karakteriziran je premještanjem protona s molekule antioksidansa (A–OH) na slobodni radikal (RO·), a pripadna BDE vrijednost se izračunala prema jednadžbi [**1**] [79]:

$$\mathrm{BDE} = H(\mathrm{A\text{-}O^{\bullet}}) + H(\mathrm{H^{\bullet}}) - H(\mathrm{A\text{-}OH}) \quad [1]$$

U jednadžbi [**1**] ***H***(AO·), ***H***(ROH), ***H***(A-OH) i ***H***(RO·) su entalpije radikala, molekule dobivene nakon donacije atoma vodika od molekule antioksidansa, potom entalpije početnog antioksidansa i slobodne radikalske vrste. Manje $\boldsymbol{H}_{\mathrm{BDE}}$ vrijednosti doprinose većoj sposobnosti antioksidansa da donira vodikov atom slobodnom radikalu [79].

SET-PT mehanizam odvija se u dva koraka prikazanima na slici 23. U prvom koraku dolazi do prijenosa elektrona prilikom čega iz antioksidansa nastaje radikal kation ($\mathrm{AOH^{\cdot +}}$), dok u drugom koraku radikalski kation gubi proton i nastaje radikal antioksidansa (AO·) [79].



Slika 23. SET-PT mehanizam [79].

Ovaj mehanizam je definiran termodinamičkim parametrima prikazanima jednadžbama [**2**] i [**3**]. IP je energija potrebna za otpuštanje elektrona, a ona karakterizira prvi korak SET-PT mehanizma. Računa se na način da se entalpija formiranja molekule

antioksidansa oduzme od sume entalpija fomiranja radikalskog kationa i elektrona. Drugi korak u kojem nastaje radikal antioksidansa je karakteriziran PDE vrijednosti, a ona se dobije oduzimanjem entalpije formiranja radikal kationa od sume entalpije formiranja radikala antioksidansa i atoma vodika [79]:

$$\mathrm{IP} = H(\mathrm{A\text{-}O}^{\bullet+}) + H(\mathrm{e}^{-}) - H(\mathrm{A\text{-}OH}) \qquad \textbf{[2]}$$

$$\mathrm{PDE} = H(\mathrm{A\text{-}O}^{\bullet}) + H(\mathrm{H}^{+}) - H(\mathrm{A\text{-}O}^{\bullet+}) \qquad \textbf{[3]}$$

Svi prethodno spomenuti mehanizmi antioksidacijske aktivnosti imaju isti produkt – neutraliziran radikal i stabilan radikal antioksidansa. Shodno tome, termodinamička ravnoteža je prikazana jednadžbom [**4**] u kojoj je vidljivo kako reakcijska entalpija BDE odgovara zbroju reakcijskih entalpija IP i PDE [79]:

$$\Delta_r H_{\mathrm{BDE}} = \Delta_r H_{\mathrm{IP}} + \Delta_r H_{\mathrm{PDE}} \qquad \textbf{[4]}$$

Može se reći kako postoji kompetativnost između ovih reakcija, ali isto tako postoji i mogućnost da se reakcije odvijaju paralelno [79].

Ako se reakcije ispituju s konkretnim radikalima, prema gore spomenutim mehanizmima, moguće je izračunati promjene reakcijskih entalpija. Jednadžbe od [**5–7**] prikazuju izračune entalpija ovih termodinamičkih parametara. Veličina ***H***(R·) predstavlja entalpiju ispitivanog radikala, ***H***(RH) se odnosi na njegovu molekulu [77]:

$$\Delta H_{\mathrm{BDE}} = H(\mathrm{AO}\cdot) + H(\mathrm{RH}) - H(\mathrm{AOH}) - H(\mathrm{R}\cdot) \qquad \textbf{[5]}$$

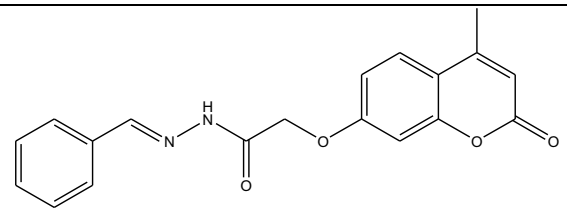
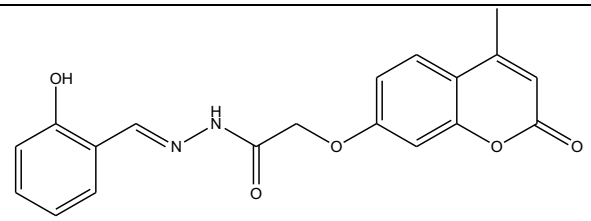
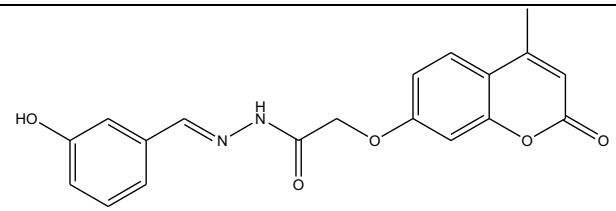
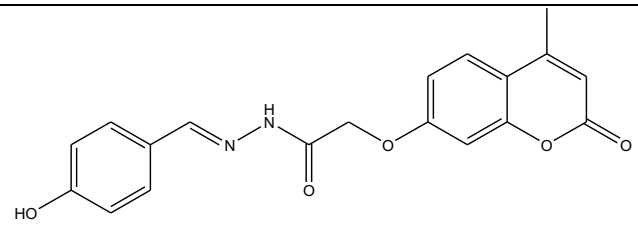
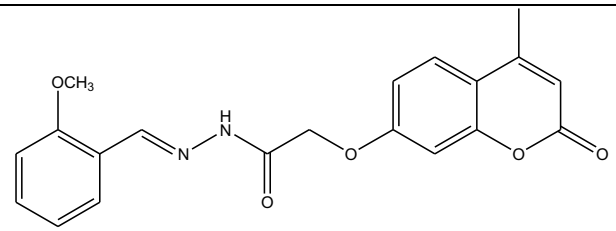
$$\Delta H_{\mathrm{IP}} = H(\mathrm{AOH}^{\cdot+}) + H(\mathrm{R}\cdot) - H(\mathrm{AOH}) - H(\mathrm{R}\cdot) \qquad \textbf{[6]}$$

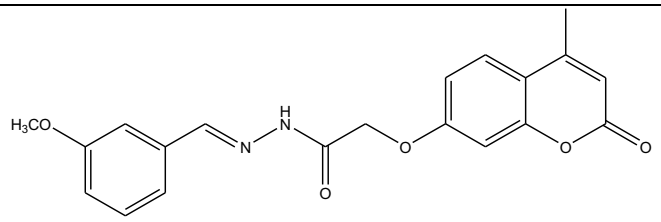
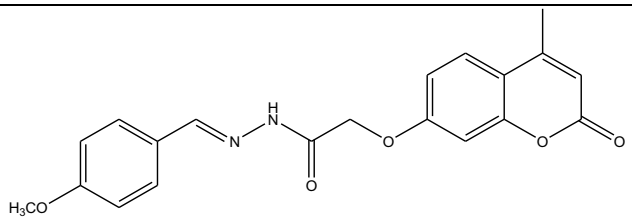
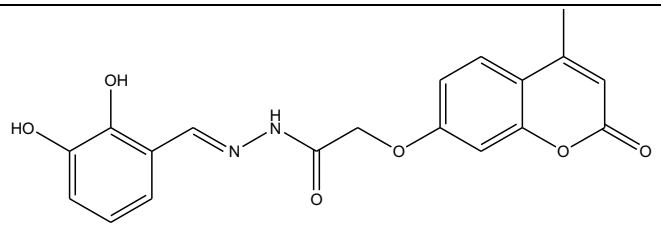
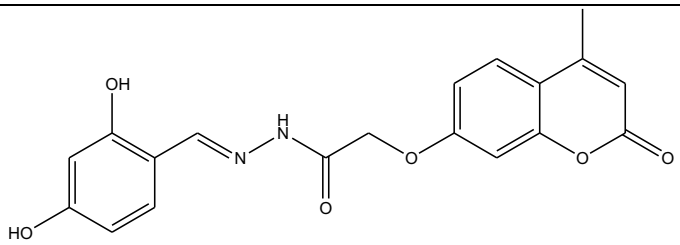
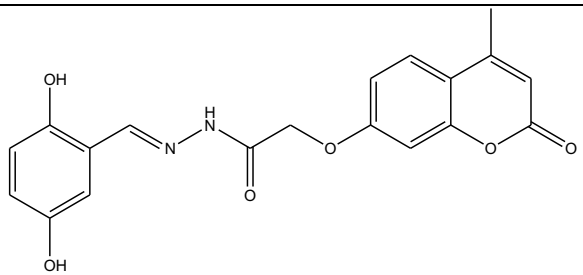
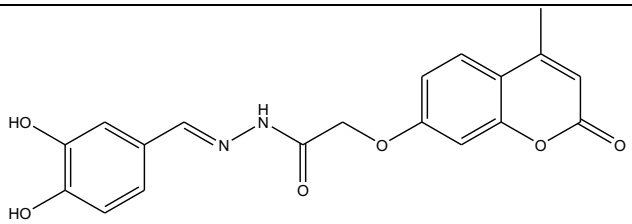
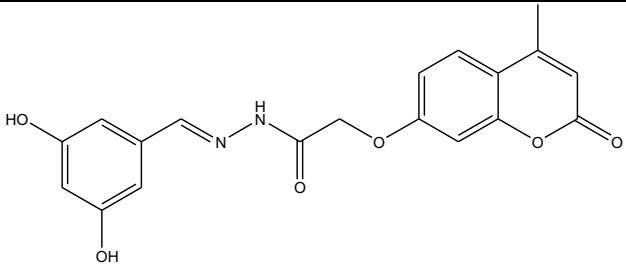
$$\Delta H_{\mathrm{PDE}} = H(\mathrm{AO}\cdot) + H(\mathrm{RH}) - H(\mathrm{AOH}^{\cdot+}) - H(\mathrm{R}\cdot) \qquad \textbf{[7]}$$

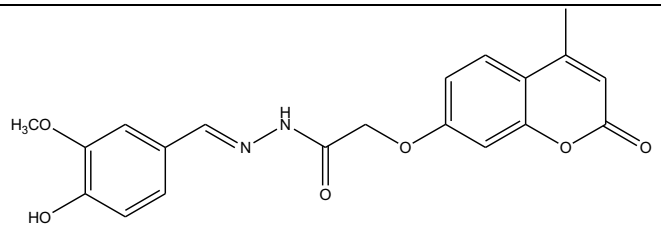
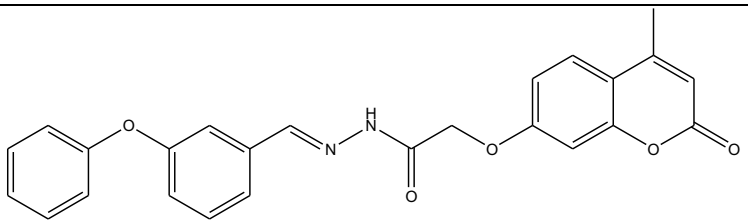
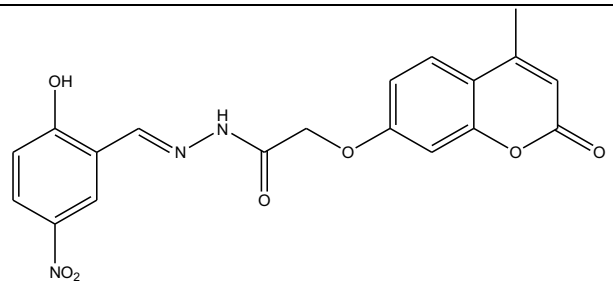
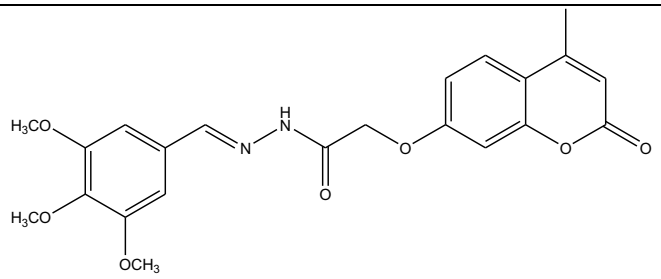
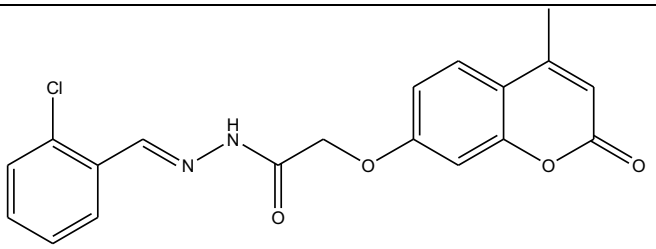
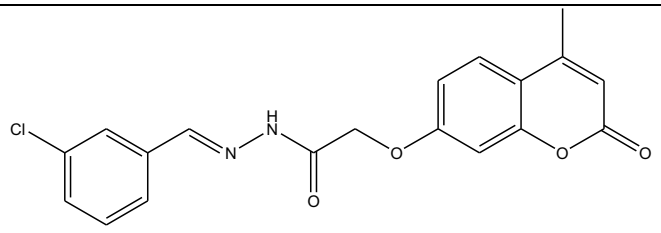
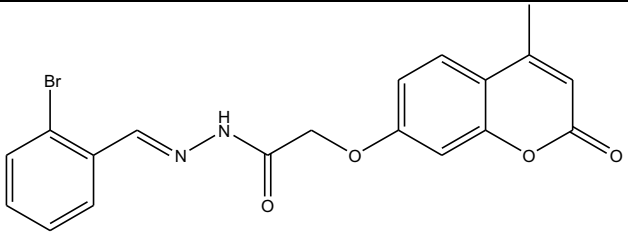
4. REZULTATI

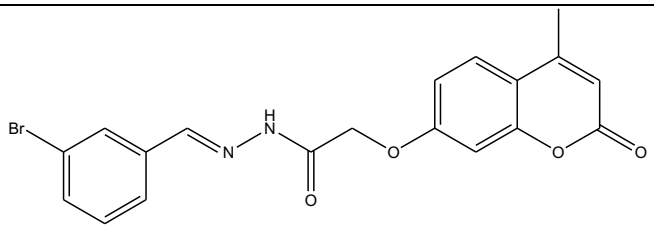
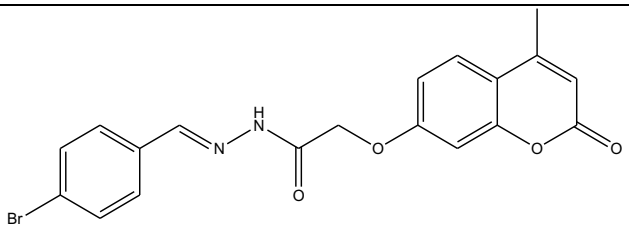
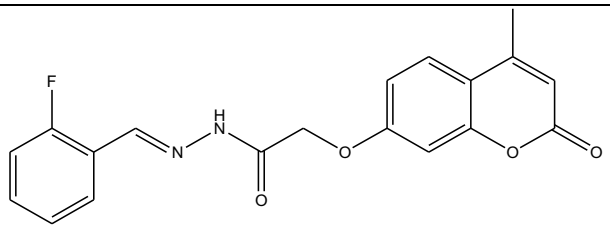
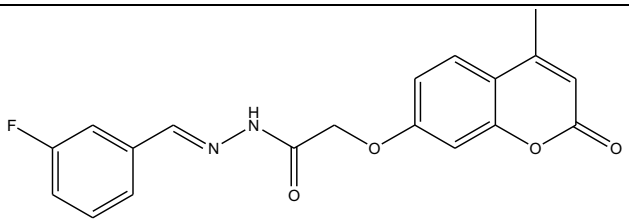
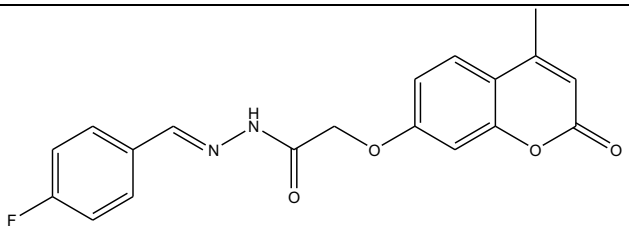
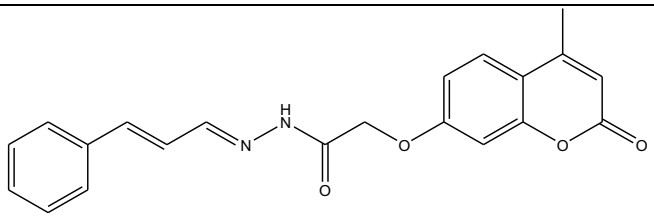
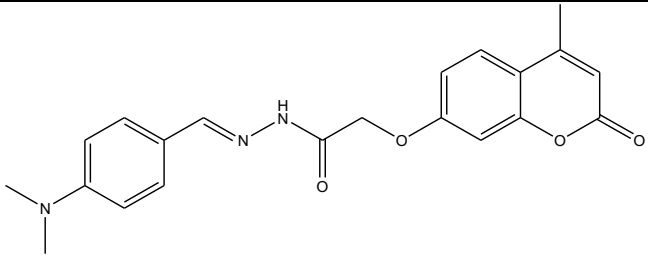
Struktura ispitivanih spojeva (1-51) i rezultati termodinamičkih izračuna prikazani su u nastavku (Tablice 3.-6.). Termodinamički izračuni odnose se na plinovitu fazu.

Tablica 3. Strukture ispitivanih Schiffovih baza (spojevi 1-26) i rezultati termodinamičkih izračuna. BDE (kcal/mol) se odnosi na vrijednost entalpije disocijacije veze, a IP (kcal/mol) na vrijednost ionizacijskog potencijala.

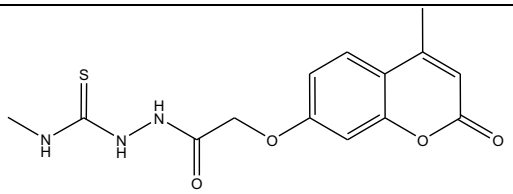
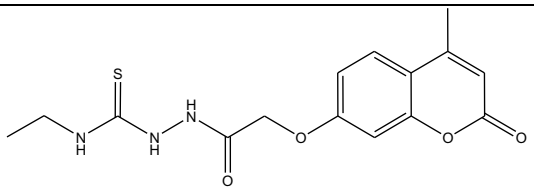
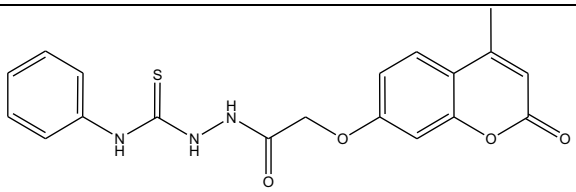
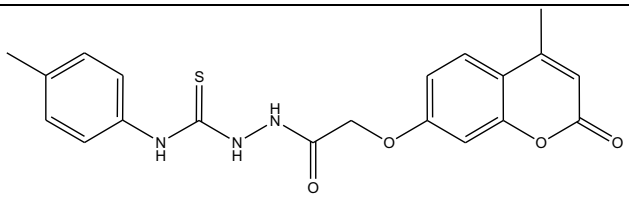
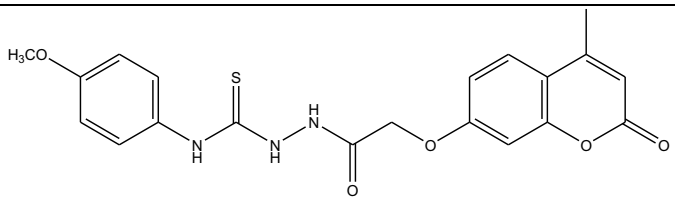
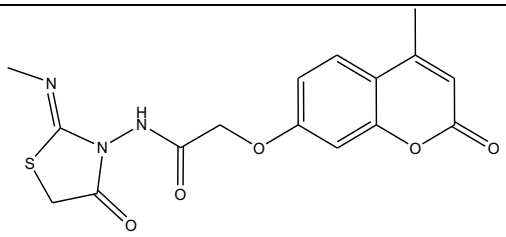
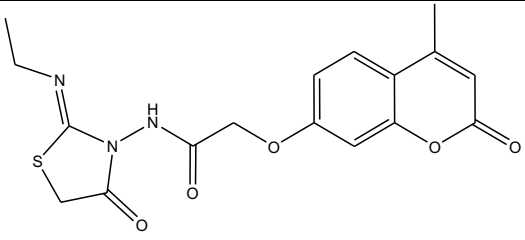
SPOJ	STRUKTURA SPOJA	BDE	IP
1		341,6	772,2
2		375,5	831,8
3		336,6	778,1
4		334,5	785,7
5		346,3	773,0

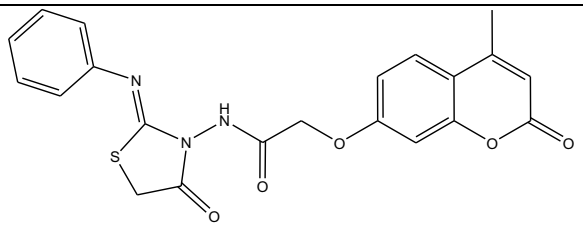
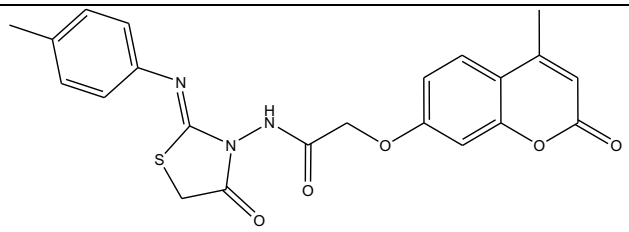
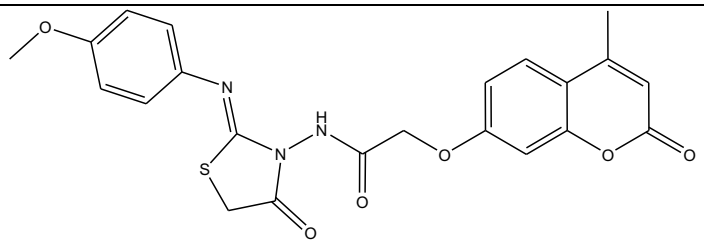
6		335,1	755,1
7		311,1	747,3
8		335,8	848,5
9		319,4	761,7
10		299,1	787,1
11		316,9	749,8
12		315,3	787,4

13		319,6	736,2
14		350,9	750,6
15		352,9	852,2
16		285,5	684,5
17		331,2	797,8
18		314,9	793,8
19		354,5	820,0

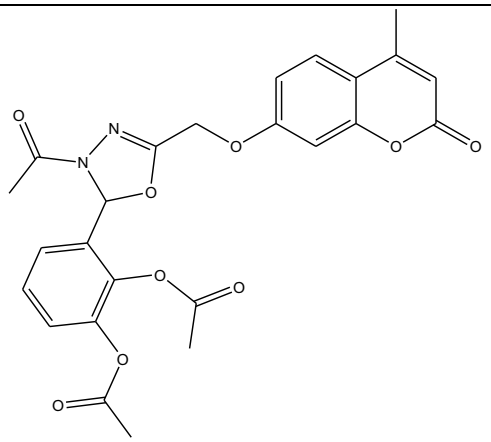
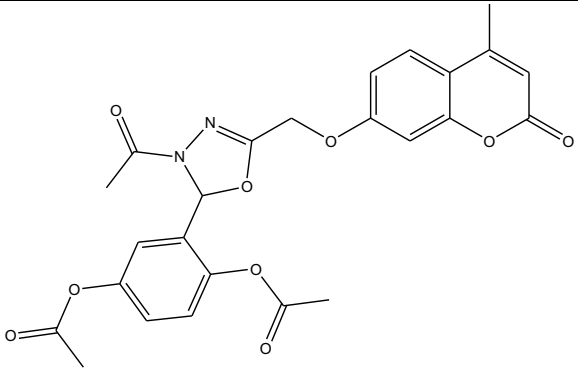
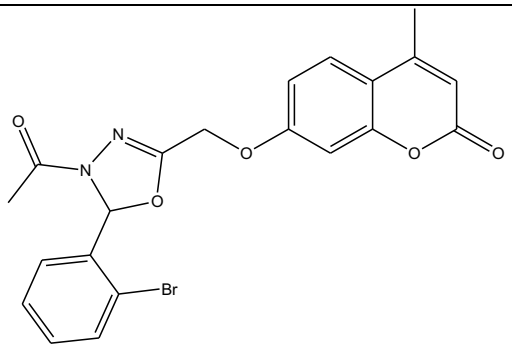
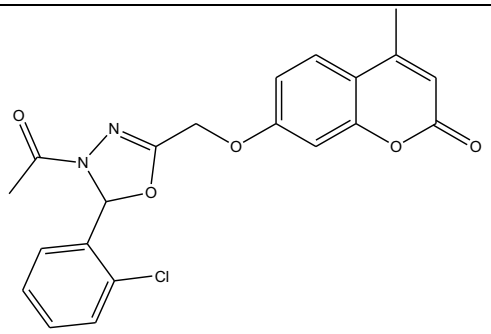
20		338,5	824,6
21		338,4	819,2
22		351,3	816,3
23		324,7	795,6
24		341,8	784,5
25		333,9	763,6
26		301,2	668,0

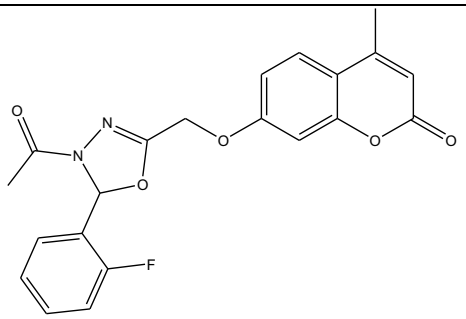
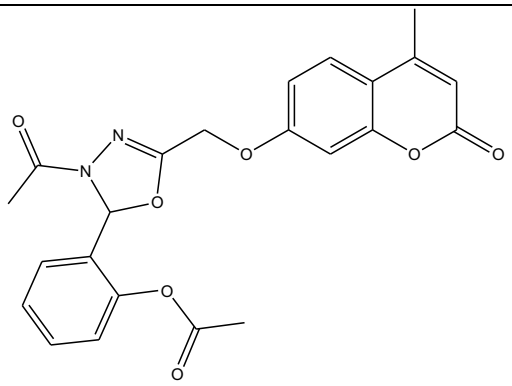
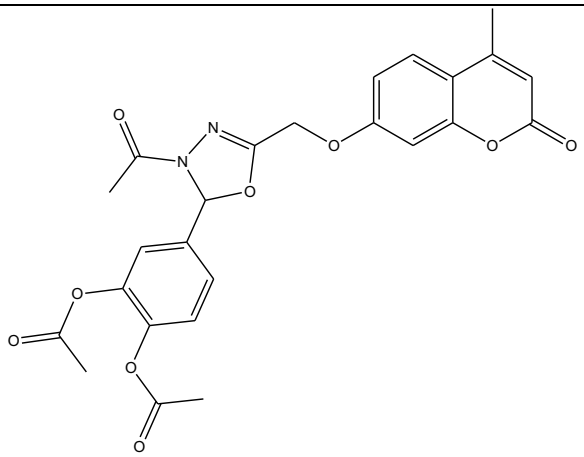
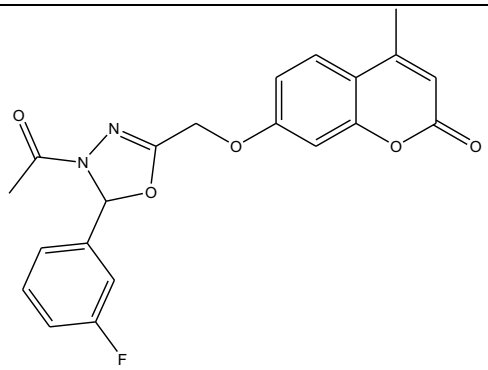
Tablica 4. Strukture ispitivanih tiosemikarbazida i tiazolidinona (spojevi 27-36) i rezultati termodinamičkih izračuna. BDE (kcal/mol) se odnosi na vrijednost entalpije disocijacije veze, a IP (kcal/mol) na vrijednost ionizacijskog potencijala.

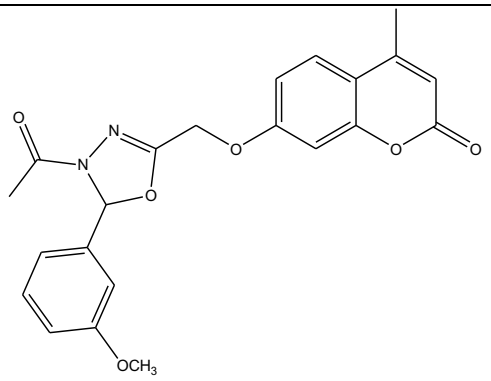
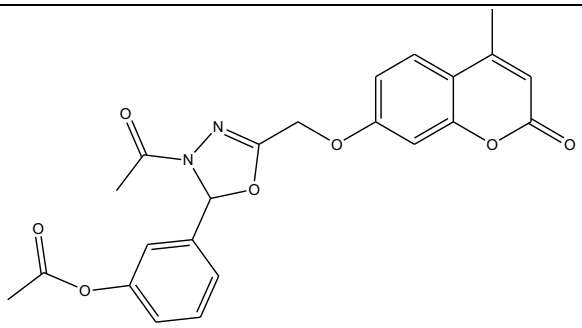
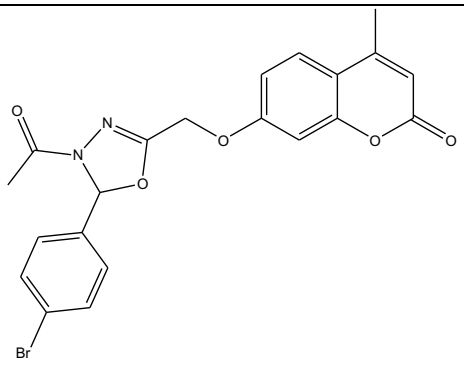
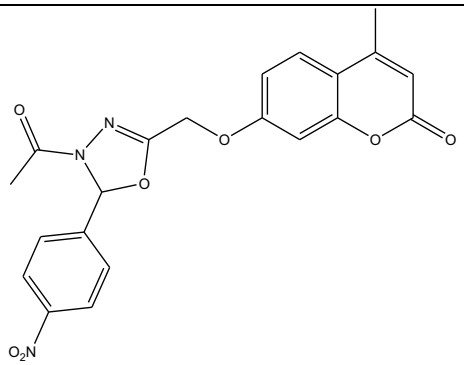
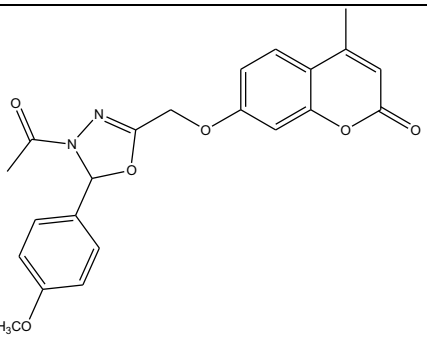
SPOJ	STRUKTURA SPOJA	BDE	IP
27		291,1	766,0
28		285,3	753,7
29		324,2	740,2
30		275,5	753,7
31		305,2	731,3
32		358,4	804,3
33		314,0	761,3

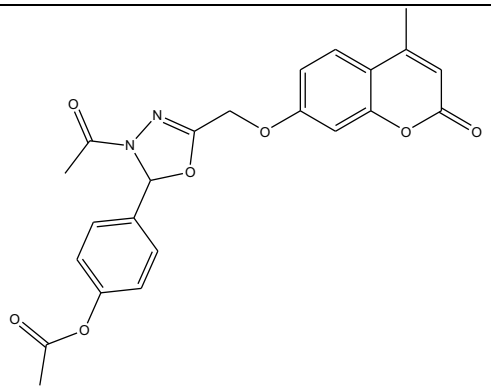
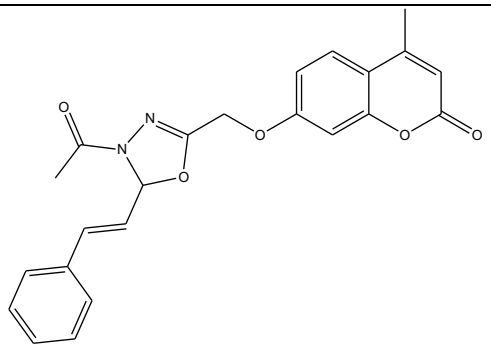
34		359,7	689,3
35		359,3	690,4
36		358,9	668,0

Tablica 5. Strukture ispitivanih oksadiazola (spojevi 37-51) i rezultati termodinamičkih izračuna. BDE (kcal/mol) se odnosi na vrijednost entalpije disocijacije veze, a IP (kcal/mol) na vrijednost ionizacijskog potencijala.

SPOJ	STRUKTURA SPOJA	BDE	IP
37		294,3	782,1
38		258,5	799,4
39		269,5	801,3
40		300,9	801,5

41		296,9	801,0
42		299,5	802,0
43		254,4	807,7
44		298,1	804,7

45		296,8	798,7
46		293,5	797,5
47		297,7	804,3
48		261,7	793,9
49		299,1	796,1

50		298,5	797,7
51		282,3	759,0

U tablici 6. dan je pregled broja (n) OH– i NH– skupina te broj (n) vicinalnih OH– skupina ispitivanih spojeva.

Tablica 6. Sumarni prikaz glavnih ispitivanih strukturnih karakteristika ispitivanih spojeva.

SPOJ	n-OH	n-vicinalne OH	n-NH
1	0	0	1
2	1	0	1
3	1	0	1
4	1	0	1
5	0	0	1
6	0	0	1
7	0	0	1
8	2	1	1
9	2	0	1
10	2	0	1
11	2	1	1
12	2	0	1
13	1	0	1
14	0	0	1
15	1	0	1
16	0	0	1
17	0	0	1
18	0	0	1
19	0	0	1
20	0	0	1
21	0	0	1
22	0	0	1
23	0	0	1
24	0	0	1
25	0	0	1
26	0	0	1
27	0	0	3

28	0	0	3
29	0	0	3
30	0	0	3
31	0	0	3
32	0	0	1
33	0	0	1
34	0	0	1
35	0	0	1
36	0	0	1
37	0	0	0
38	0	0	0
39	0	0	0
40	0	0	0
41	0	0	0
42	0	0	0
43	0	0	0
44	0	0	0
45	0	0	0
46	0	0	0
47	0	0	0
48	0	0	0
49	0	0	0
50	0	0	0
51	0	0	0

U tablici 7. dan je pregled usporedbe termodinamičkih izračuna za one spojeve (Schiffove baze, spojevi 2–4, 8–13 i 15) koji posjeduju i OH– i NH– skupinu.

Tablica 7. Usporedba rezultata izračuna BDE (kcal/mol) za spojeve koji sadrže OH– i NH– skupinu.

SPOJ	N–H BDE	O–H BDE
2	457,5	375,5
3	336,6	342,8
4	347,0	334,5
8	379,7	335,8
9	321,3	319,4
10	322,3	299,1
11	336,6	316,9
12	315,3	332,6
13	335,8	319,6
15	352,9	394,7

5. RASPRAVA

Kumarini su spojevi koji mogu smanjiti nastajanje slobodnih radikala u organizmu te stimulirati „hvatanje“ ROS-a što znači da imaju antioksidacijska svojstva važna za sprječavanje bioloških oštećenja, odnosno mogu se ponašati kao antioksidansi. Antioksidacijska aktivnost uključuje različite mehanizme na koje utječe i struktura antioksidansa, pa tako lokacija i vrsta supstituenta vezanog na aromatski prste ima značajan utjecaj na antioksidacijsku aktivnost spoja [82]. Naime, brojne studije utvrdile su postojanje strukturnih motiva neophodnih za antioksidacijsku aktivnost. Jedna od njih je broj i položaj OH– skupina. Naime, s brojem OH– skupina raste i anioksidacijski potencijal spoja. Kateholna struktura (vicinalne OH– skupine), osim što ima dvije OH– skupine, odgovorna je za stabilnost radikala i delokalizaciju elektrona, a ukoliko spoj sadrži više OH– skupina koje nisu vicinalne (na primjer na položaju 3 i 5) može doći i do formiranja intramolekularne vodikove veze kojom se postiže dodatna stabilizacija spoja. [83].

Osim toga, Mohajeri i sur. (2009) za vitamin C i E (jaki antioksidansi) navode da *p*-oblik orbitale kisikovog atoma delokalizira nespareni elektron što dovodi do stabilizacije i manje BDE vrijednosti. Suprotno, BDE vrijednosti vitamina B_3 i B_6 ukazuju na njihove poteškoće da doniraju atom vodika. Osim toga, utvrđeno je i kako *ortho*-dihidroksi skupina potiče sposobnost doniranja atoma vodika kafeinske kiseline i 3,4-dihidrobezojeve kiseline intramolekularnim vodikovim vezama koje smanjuju BDE vrijednost roditeljske molekule i stabilizira radikal nastao nakon vezanja vodika. Mohajeri i sur. navode kako su BDE vrijednosti mono-hidroksi derivata, uključujući *p*-kumarinsku kiselinu i *p*-hidrobenzojevu kiselinu, sve manje od 81,0 kcal/mol, dok su iste vrijednosti kod *ortho*-dihidroksiderivata poput kavene kiseline i 3,4-dihidrobenzojeve kiseline u rasponu od 71,2 do 74,4 kcal/mol. Smanjenje BDE vrijednosti općenito je rezultat prisutnosti druge (dodatne) hidroksilne skupine u prstenu [84].

Broj hidroksilnih skupina na kumarinskom prstenu je povezan i sa supresijskim učinkom ROS-a. Eskuletin i 4-metileskulentin imaju dvije hidroksilne skupine na benzenskom prstenu (Tablica 2.) i zbog toga su oba spoja učinkoviti „hvatači“ slobodnih radikala. Skopoletin, metoksi- supstituirani spoj, se pokazao nedovoljno učinkovitim u „hvatanju“ slobodnih radikala u odnosu na već spomenuti eskuletin, što je vjeovatno posljedica metoksi- supstitucije [82].

Kao što je prikazano u Tablici 6., pojedini ispitivani spojevi imaju samo OH– skupinu (2-4, 13, 15), pojedini spojevi imaju 2 OH– skupine (8-12), a pojedini spojevi imaju i vicinalne OH– skupine (8 i 11). Svi ovi spojevi su Schiffove baze, a za njih smo dobili bolje rezultate termodinamičkih izračuna. Nekoliko spojeva sadrži jednu (1–26, 32–36) ili više (27–31) NH– skupina, međutim izračunate BDE i IP vrijednosti nisu bile bolje u odnosu na Schiffove baze. Pojedini spojevi sadrže i OH– i NH– skupinu (Tablica 7., spojevi 2–4, 8–13 i 15). Radi se o Schiffovim bazama te se usporedbom dobivenih vrijednosti može zaključiti da je BDE cijepanja O–H veze ipak malo povoljnija u odnosu na BDE N–H veze. Spojevi 37-51 (oksadiazoli) ne sadrže ni OH– ni NH– skupinu te su kod njih određene BDE i IP vrijednosti cijepanja C–H veze. Rezultati nisu pokazali bolji antioksidacijski potencijal ovih spojeva, ali prema rezultatima nisu puno „lošiji“ u odnosu na spojeve s OH– i NH– skupinom.

Za određivanje sposobnosti „hvatanja“ ROS-a fenolnih antioksidansa ispituju se jakost O–H veze i sposobnost antioksidansa da donira elektron što zahtjeva izračun BDE i IP vrijednosti. Manja BDE, a veća IP vrijednost dovodi do povećane antioksidacijske aktivnosti. Mohajeri i sur. (2009) navode kako su vrijednosti BDE u plinovitoj fazi u rasponu od 69,9 do 104,0 kcal/mol za vitamine, odnosno 71,2 do 85,1 kcal/mol za fenolne kiseline, a usporedbom BDE vrijednosti vitamina E i vitamina C se dolazi do spoznaje kako se reduciranjem veličine heterocikličkog prstena poboljšava antioksidacijska aktivnost [84].

U našem preliminarnom istraživanju utvrđene su BDE vrijednosti četiri skupine spojeva s kumarinskom jezgrom (Tablice 3.–5.). Kod Schiffovih baza BDE vrijednosti su u rasponu od 285,5 do 375,5 kcal/mol, za tiosemikarbazide i 4-tiazolidinone te su vrijednosti između 275,5 i 358,9 kcal/mol, odnosno između 258,5 i 300,9 kcal/mol za oksadiazole što je gotovo dva puta više od vrijednosti koje su dobili Mohajeri i sur. (2009) u svojem istraživanju. Navedeno ukazuje kako su naši spojevi slabiji antioksidansi. Neučinkovitosti pridonosi i činjenica kako proučavani tiosemikarbazidi, 4-tiazolidinoni i oksadiazoli ne posjeduju niti jednu OH– skupinu, dok kod ispitivanih Schiffovih baza pet spojeva posjeduje jednu OH– skupinu, pet spojeva posjeduje dvije OH– skupine od kojih samo dvije baze imaju vicinalne OH– skupinu.

IP vrijednosti koje su dobili Mohajeri i sur. (2009) za vitamine i fenolne kiseline su u rasponu između 167,38 kcal/mol i 205,59 kcal/mol čime se dolazi do zaključka kako su i BDE i IP vrijednosti fenolnih kiselina manje od onih vitamina i stoga se navode kao učinkovitiji antioksidansi. Naša studija utvrdila je sljedeće IP vrijednosti: 684,5 – 852,2 kcal/mol za Schiffove baze, 668,0 – 804,3 kcal/mol za tiosemikarbazide i 4-tiazolidinone,

odnosno 782,1 – 807,7 kcal/mol za oksadiazole što je u pojedinim slučajevima gotovo četiri puta više nego u spomenutoj studiji i jasno upućuje na manju antioksidacijsku aktivnost spojeva ispitivanih spojeva [84]. Pregledom dostupne literature koja se odnosi na eksperimentalno određivanje antioksidacijske aktivnosti (uhvat DPPH) [85-90], vidimo da ova skupina spojeva nije pokazala značajniju antioksidacijsku aktivnost te je uočena antioksidacijska aktivnost bila povezana s brojem OH– skupina.

6. ZAKLJUČAK

Kumarini su heterociklički spojevi široko primjenjivi u različitim industrijskim granama, a posebno u svrhu razvoja lijekova zbog iznimno značajnih bioloških aktivnosti poput antikancerogene, antibakterijske i protuupalne. Pojedini kumarini (hidroksilkumarini) posjeduju snažno antioksidacijsko djelovanje što ih čini neophodnima za uklanjanje reaktivnih kisikovih vrsta i sprječavanje oštećenja bioloških makromolekula.

U ovom prelimilarnom istraživanju, primjenom semiempirijskog, kvantnog programskog paketa MOPAC2012^{TM} i PM7 metode utvrđene su vrijednosti termodinamičkih parametara BDE i IP za heterocikličke spojeve s kumarinskom jezgrom – Schiffove baze, tiosemikarbazide, oksadiazole i 4-tiazolidinone. Istražena su dva mehanizma antioksidacijske aktivnosti, HAT i SET-PT. Ovo su kompetetivni mehanizmi, s time da je SET-PT preferiran u polarnom mediju, dok se HAT većinom odvija u nepolarnom mediju. Izračuni su napravljeni za plinovitu fazu zbog čega je preferirani mehanizam HAT. Ispitana je termodinamika cijepanja O–H, C–H i N–H veza te utjecaj položaja OH– i drugih funkcionalnih skupina (ako ih ima) na antioksidacijsko djelovanje.

Dobiveni rezultati pokazuju izrazito nepovoljnu BDE vrijednost te najmanje dvostruko veću IP vrijednost u odnosu na BDE vrijednost za sve ispitivane spojeve. Rezultati time pokazuju da ispitivani kumarinski derivati nemaju visoku antioksidacijsku aktivnost, što je vjerojatno posljedica nedostatka strukturnih motiva karakterističnih za superiornu antiokisdacijsku aktivnost, poput OH– funkcionalnih skupina. Možemo zaključiti i da se antioksidacijska aktivnost najvjerojatnije ne odvija putem ispitivanih mehanizama. Kako bi se utvrdio potencijalni mehanizam antioksidacijske aktivnosti ovih spojeva, potrebna su dodatna istraživanja koja bi se fokusirala na druge lokacije antioksidacijske aktivnosti, druge mehanizme i druge programske pakete.

7. LITERATURNA VRELA

[1] https://www.britannica.com/science/heterocyclic-compound, (7. 8. 2020.)

[2] K. Rohini, P.S. Srikumar, *J. Thermodyn. Catal*. **5** (2014), 1-3.

[3] J. Bruneton, *Pharmagognosy, Pyhtochemistry, Medical Plants 2nd Edition*. Intercept, Hampshire UK, 1999.

[4] https://www.scmp.com/magazines/post-magazine/article/1372797/spice-market-tonka-bean, (7. 8. 2020.)

[5] https://www.saintlucianplants.com/cultivated/diptodor/diptodor.html, (7. 8. 2020.)

[6] P.K. Jain, H. Joshi, *J. Appl. Pharm. Sci.* **2** (2012), 236-240.

[7] M.J. Matos, L. Santana, E. Uriarte, O.A. Abreu, E. Molina, E.G. Yordi, *Coumarins – An Important Class of Phytochemicals*, 2015, 113-140.

[8] T. Ojala, *Biological Screening of Plant Coumarins*, PhD Thesis, University of Helsinki, Helsinki, 2001.

[9] A. Lacy, R. O'Kennedy, *Curr. Pharm. Des*. **10** (2004), 3797-3811.

[10] J.R. Merchant, H.K. Desai, *Indian J. Chem*. **11** (1973), 342.

[11] P. Matilla, J. Hellström, R. Törrönen, *J. Agric. Food Chem*. **54** (2006), 7193-7199.

[12] R.E. Wildman, *Handbook of nutraceuticals and functional foods 2nd Edition*, CRC Press, Boca Raton, Florida, 2016.

[13] K. Aslam, M.K. Khosa, N. Jahan, S. Nosheen, *Pak. J. Pharm. Sci*. **23** (2010), 449-454.

[14] K. Abraham, F. Wöhrlich, O. Lindtner, G. Heinemeyer, A. Lampen, *Mol. Nutr. Food Res*. **54** (2010), 228-239.

[15] B. Liu, T. Raeth, T. Beuerle, L. Beerhues, *Plant. Mol. Biol*. **72** (2010), 17-25.

[16] https://biljemdozdravlja.com/lazarkinja-ljekovitost-caj-prirodni-lijekovi/, (7. 8. 2020.)

[17] https://www.123rf.com/photo_98050832_plantation-of-phoenix-dactylifera-commonly-known-as%C2%A0date%C2%A0or%C2%A0date-palm-trees-in-arava-and-negev-deser.html, (7. 8. 2020.)

[18] https://www.123rf.com/photo_98050832_plantation-of-phoenix-dactylifera-commonly-known-as%C2%A0date%C2%A0or%C2%A0date-palm-trees-in-arava-and-negev-deser.html, (7. 8. 2020.)

[19] B.G. Lake, *Food. Chem. Toxicol*. **37** (1999), 423-453.

[20] J. Klenkar, M. Molnar, *J. Chem. Pharm. Res*. **7** (2015), 1223-1238.

[21] T. Nasr, S. Bondock, M. Youns, *Eur. J. Med. Chem*. **76** (2014), 539-548.

[22] M.E. Marshall, K. Kervin, C. Benefield, A. Umerani, S. Albainy-Jenei, Q. Zhao, M.B. Khazaeli, *J. Cancer Res. Clin. Oncol*. **120** (1994), 3-10.

[23] J.H. Mohler, L.G. Gomella, E.D. Crawford, L.M. Glode, C.D. Zippe, W.R. Fair, M.E. Marshall, *Prostate* **20** (1992), 123-131.

[24] R.D. Thornes, L. Daly, G. Lynch, B. Breslin, H. Browne, H.Y. Browne, T. Corrigan, P. Daly, G. Edwards, E. Gaffney, J. Henley, T. Henley, F. Keane, F. Lennon, N. McMurray, S. O'Louglin, M. Shine, A. Tanner, *J. Cancer Res. Clin. Oncol*. **120** (1994), S32-S34.

[25] M.E. Marshall, K. Butler, A. Fried, *Mol. Biother*. **3** (1991), 170-178.

[26] S. Mirunalini, K. Deepalakshmi, J. Manimozhi, *Biomed. Aging Pathol.* **4** (2014), 131-135.

[27] N. Borhani, M. Manoochehri, S.S. Gargari, M.G. Novin, A. Mansouri, M.D. Omrani, *Clin. Ovarian Cancer Other Gynecol. Malig*. **7** (2014), 18-23.

[28] M.A. Musa, L.D.V Badisa, L.M Latinwo, T.A. Patterson, A.M. Owens, *Anticancer. Res*. **32** (2012), 4271-4276

[29] C. He, D. Liu, W. Lin, *Biomater*. **36** (2015), 124-133.

[30] B.A. Weaver, *Mol. Bio. Cell* **25** (2014), 2677-2681.

[31] K.R. Singh, S.T. Lange, K.K. Kim, *Invest. New Drugs*. **29** (2011), 63-72.

[32] V. Jamier, W. Marut, S. Valente, C. Chereau, C.N. Chouzenoux, H. Lemarechal, B. Weill, G. Kirsch, C. Jacob, F. Batteux, *Anticancer Agents Med. Chem*. **14** (2014), 963-974.

[33] Y. Wang, C.F. Li, L.M. Pan, Z.L. Gao, *Exp. Clin. Cancer Res*. **30** (2011), 1-7.

[34] N. Khaghanzadeh, Z. Mojtahedi, M. Ramezani, N. Erfani, A. Ghaderi, *DARU J. Pharm. Sci*. **20** (2012), 69-74.

[35] https://www.hormone.org/your-health-and-hormones/glands-and-hormones-a-to-z/hormones/estrogen, (7. 8. 2020.)

[36] C. Li, C. Han, H. Zhang, J.S. Wu, B. Li, *Trop. J. Pharm. Res*. **14** (2015), 611-617.

[37] J. Hirsh, J.E. Dalen, D.R. Anderson, L. Poller, H. Bussey, J. Ansell, D. Deykin, *Chest*. **119** (1998), 8S-21S.

[38] G. Tegos, F.R. Stermitz, O. Lomovskaya, K. Lewis, *Antimicrob. Agents Chemother.* **46** (2002), 3133-3141.

[39] S. Chakthong, P. Weaaryee, P. Puangphet, W. Mahabusarakam, P. Plodpai, S.P. Voravuthikunchai, A. Kanjana-Opas, *Phytochemistry*. **75** (2012), 108-113.

[40] M. Willcox, G. Bodeker, P. Rasanavo, *Traditional medicinal plants and malaria*, CRC Press, Paris, 2004.

[41] F.Q.S. Guerra, R.S. Aquino de Araújo, J. Pereira de Sousa, F. de Oliveira Pereira, F.J.B. Mendonça, J.M. Barbosa-Filho, E. de Oliveira Lima, *Evid. Based Complement Alternat. Med*. **2015** (2015), 1-8.

[42] R.A. Holmes, R.S. Boston, G.A. Payne, *Appl. Microbiol. Biotechnol*. **78** (2008), 559-572.

[43] A. Mazumder Salahuddin, M. Shahar Yar, R. Mazumder, G.S. Chakraborthy, M.J. Ahsan, M.U. Rahman, *Synth. Commun*. **47** (2017), 1805-1847.

[44] A. Kajal, S. Bala, S. Kamboj, N. Sharma, V. Saini, *J. Catal*. **2013** (2013), 1-14.

[45] M.A. Ashraf, K. Mahmood, A. Wajid, *IPCBEE* **10** (2011), 1-7.

[46] C.M. da Silva, D.L. da Silva, L.V. Modolo, R.B. Alves, M.A. de Resende, C.V.B Martins, A. de Fátima, *J. Adv. Res*. **2** (2011), 1-8.

[47] S.N. Pandeya, D. Sriram, G. Nath, E. de Clercq, *IL Farmaco*. **54** (1999), 624-628.

[48] P. Panneerselvam, R.R. Nair, G. Vijayalakshmi, E.H. Subramanian, S.K. Sridhar, *Eur. J. Med. Chem*. **40** (2005), 225-229

[49] D. Sriram, P. Yogeeswari, N.S. Myneedu, V. Saraswat, *Bioorg. Med. Chem. Lett*. **16** (2006), 2127-21289.

[50] M.A. Bhat, M.A. Al-Omar, *Acta Pol. Pharm.* **68** (2011), 375-380.

[51] S. Sardari, S. Feizi, A.H. Rezayan, P. Azerang, S.M. Shahcheragh, G. Ghavami, A. Habibi, *Iran. J. Pharm. Res*. **16** (2017), 1128-1140.

[52] https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/aldrich/t33405?lang=en&region=HR, (8. 8. 2020.)

[53] https://en.wikipedia.org/wiki/Thiosemicarbazide#/media/File:Thiosemicarbazide.png, (8. 8. 2020.)

[54] https://en.wikipedia.org/wiki/Semicarbazide#/media/File:Semicarbazide.png, (8. 8. 2020.)

[55] S. Singhal, S. Arora, S. Agarwal, R. Sharma, N. Singhal, *World J. Pharm. Pharm. Sci*. **2** (2013), 4661-4681.

[56] M. Sheikhy, A.R. Jalilian, A. Novinrooz, F. Motamedi-Sedeh, *JBiSE*. **5** (2012), 39-42.

[57] P. Umadevi, K. Deepti, I. Srinath, G. Vijayalakshmi, M. Tarakaramji, *J. Pharm. Pharm. Sci*. **4** (2012), 379-383.

[58] D.L. Klayman, J.P. Scovil, J.F. Bartosevich, J. Bruce, *J. Med. Chem*. **26** (1983), 35-39.

[59] J. Carmichael, W. DeGraff, A. Gazdar, J. Minna, J. Mitchell, *Cancer Res*. **47** (1987), 936-942.

[60] A. Siwek, P. Staczek, M. Wujec, K. Bielawski, A. Bielawska, P. Paneth, *J. Mol. Model*. **19** (2013), 1319-1324.

[61] C. Zani, F.M. Restivo, M. Carcelli, D. Feretti, G. Pelosi, D. Rogolino, F. Degola, S. Galati, F. Bisceglie, A. Buschini, *J. Public Health Res*. **4** (2015), 185-189.

[62] A. Mazumder Salahuddin, M. Shahar Yar, R. Mazumder, G.S. Chakraborthy, M.J. Ahsan, M.U. Rahman, *Synth. Commun*. **47** (2017), 1805-1847.

[63] S. Musmade Deepak, R. Pattan Shashikant, Y.S. Manjunath, *Int. J. Pharm. Chem*. **5** (2015), 11-20.

[64] A. Pace, S. Buscemi, A. Palumbo Piccionello, I. Pibiri, *Adv. Heterocycl. Chem*. **116** (2015), 1-364.

[65] N.S.A. Razak, J. Jamalis, S. Chander, R.A. Wahab, D.P. Bhagwat, T.K. Smith, M. Sankaranarayanan, *Mini Rev. Org. Chem*. **17** (2020), 1-15.

[66] M.S.Y. Khan, M. Akhtar, *Indian J. Chem*. **42B** (2003), 900-904.

[67] V.D. Bobade, S.V. Patil, N.D. Gaikwad, *J. Chem. Res*. **36** (2012), 25-28.

[68] https://www.intechopen.com/books/antioxidants/antioxidant-compounds-and-their-antioxidant-mechanism, (8. 8. 2020.)

[69] S. Gamulin, Z. Kovač, M. Marušić, *Patofiziologija VII. izdanje*, Medicinska naklada, Zagreb, 2011.

[70] https://modroizeleno.com/naucna-medicina/slobodni-radikali-antioksidansi-i-oksidativni-stres/, (8. 8. 2020.)

[71] A. Mišković, „Antioksidacijske metode: metoda ORAC“, Završni rad, Sveučilište u Splitu, Kemijsko-tehnološki fakultet, Split, 2016.

[72] R. Apak, S. Gorinstein, V. Böhm, K.M. Schaich, M. Özyürek, K. Güçlü, *Pure Appl. Chem*. **85** (2013), 957-998.

[73] S. Sehwag, M. Das, *RRJoFST.* **2** (2013), 1-10.

[74] https://www.intechopen.com/books/vitamin-c/vitamin-c-an-antioxidant-agent, (8. 8. 2020.)

[75] Z. Marković, *J. Serbian Soc. Comput. Mech*. **10** (2016), 135-150.

[76] N. Liang, D.D. Kitts, *Molecules* **19** (2014), 19180-19208.

[77] D.S. Dimić, „Eksperimentalno i teorijsko ispitivanje odnosa struktura-antiradikalska aktivnost odabranih neurotransmitera, njihovih prekursora i metabolita“, doktorska disertacija, Sveučilište u Beogradu, Fakultet za fizikalnu kemiju, Beograd, 2018.

[78] R.L. Prior, X. Wu, K. Schaich, *J. Agric. Food Chem*. **53** (2005), 4290-4302.

[79] N. Filipović, *Computational Bioengineering and Bioinformaticics*, Spriger Nature Switzerland AG, Švicarska, 2020.

[80] A. Galano, J.R. Alvarez-Idaboy, *Org. Lett*. **11** (2009), 5114-5117.

[81] http://openmopac.net/MOPAC2012brochure.pdf, (9. 8. 2020.)

[82] G.B. Bubols, D. da Rocha Vianna, A. Medina-Remón, G. von Poser, R.M. Lamuela-Raventos, V.L. Eifler-Lima, S.C. Garcia, *Mini Rev. Org. Chem*. **13** (2013), 318-334.

[83] S.P. Kazaić, *Arh. Hig. Rada. Toksikol*. **55** (2004), 279-290.

[84] A. Mohajer, S. Somayeh Asemani, *J. Mol. Struct*. **930** (2009), 15-20.

[85] M. Čačić, M. Molnar, *Z. Naturforsch.* **66b** (2011), 177-83.

[86] M. Čačić, M. Molnar, B. Šarkanj, E. Has-Schon, V. Rajković, *Molecules* **15** (2010), 6795-6809.

[87] M. Čačić, M. Molnar, I. Strelec, *HETEROCYCLES* **83** (2011), 1553-1566.

[88] B. Šarkanj, M. Čačić, M. Molnar, L. Grille, *Food Chem*. **139** (2013), 488-495.

[89] A.A. Al-Amiery, Y.K. Al-Majedy, A.A.H. Kadhum, A.B. Mohamad, *PLoS One* **10** (2015), e0132175.

[90] M. Molnar, A. Amić, V. Pavić, T. Kovač, M. Kovač, E. Has-Schon, *Turk. J. Chem.* **42** (2018), 146-157.

8. DODACI

8.1. Popis kratica

ACHN stanična linija humanog karcinoma bubrega

ALR1 aldoza reduktaza 1

ALR2 aldoza reduktaza 2

APS 2,2'-azobis(2-amidinopropan hidroklorid)

BDE entalpija disocijacije protona (engl. *Bond Dissociation Enthalpy*)

CUPRAC redoks redukcija između CUPRAC reagensa i antioksidansa (engl. *CUPric Reducing Antioxidant Capacity*)

DPPH 2,2-difenil-1-piroksihidrazil

ETE entalpija transfera elektrona (engl. *Electron Transfer Enthalpy*)

FRAP metoda mjerenja redukcije željeza u plazmi (engl. *Ferric Reducing Antioxidant Power*)

GSH glutation

HAT mehanizam prijenosa atoma vodika (engl. *Hydrogen Atom Transfer*)

HIV humani virus imunodeficijencije

IP ionizacijski potencijal (engl. *Ionization Potential*)

LNCaP stanična linija karcinoma prostate

MIC minimalna inhibitorna koncentracija

MTT kolorimetrijski test za procjenu metaboličke aktivnosti stanice

NSCLS karcinom ne-malih stanica pluća

ORAC kapacitet apsorpcije kisikovih radikala (engl. *The Oxygen Radical Apsorbance Capacity*)

OVCAR stanična linija karcinoma jajnika

PA protonski afinitet (engl. *Proton Affinity*)

PBC periodički granični uvjeti (engl. *Periodic Boundary Condition*)

PCET spregnuti prijenos elektrona i protona (engl. *Proton Coupled Electron Transfer*)

RAF reakcija građenja radikalskog adukta (engl. *Radical Adduct Formation*)

ROS reaktivne kisikove vrste (engl. *Reactive Oxygen Spec*ies)

SCLC karcinom malih stanica pluća

SET mehanizam prijenosa jednog elektrona (engl. *Single Electron Transfer*)

SET-PT mehanizam prijenosa elektrona praćen prijenosom protona (engl. *Single Electron Transfer-Proton Transfer)*

TEAC metoda mjerenja antioksidacijskog kapaciteta u odnosu na troloks (engl. *Trolox Equivalent Antioxidant Capacity*)

TRAIL faktor nekroze tumora (engl. *Tumor necrosis factor-Related Apoptosis-Inducing Ligand*)

TRAP parametar procjene ukupnog antioksidacijskog „hvatanja“ radikala **(**engl. *Total Radical Antioxidant Parameter*)

QSAR kvantitativna veza strukture i svojstava (engl. *Quantitative structure-property relationship*)

8.2. Životopis

Osobni podaci	
Ime i prezime	**Elena Gotal**
Datum i mjesto rođenja	11. 1. 1997, Virovitica
Adresa	Petra Preradovića 51, 33410 Suhopolje
e-mail	gotal551@icloud.com
Obrazovanje	
2018. – 2020.	**Diplomski sveučilišni studij kemije; istraživački smjer** Sveučilište J. J. Strossmayera u Osijeku, Odjel za kemiju, Ulica Cara Hadrijana 8/A, 31000 Osijek
2015. – 2018.	**Preddiplomski sveučilišni studij kemije** Sveučilište J. J. Strossmayera u Osijeku, Odjel za kemiju, Ulica Cara Hadrijana 8/A, 31000 Osijek Završni rad: Biološka aktivnost spojeva s oksadiazolskom jezgrom mentor: doc.dr.sc. Martina Šrajer Gajdošik, neposredna voditeljica: dr.sc. Ana Amić
2011. –2015.	**Gimnazija Petra Preradovića Virovitica, opći smjer**
Aktivnosti i sudjelovanja	
veljača 2020.	XIII. Susret mladih kemijskih inženjera (SMLKI), Zagreb

studeni 2019.	23. Smotra Sveučilišta Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku
studeni 2019.	*3rd Mini-Symposium of Medicinal and Pharmaceutical Chemistry Croatian Chemical Society,*
rujan 2018.	17. Ružičkini dani „Danas znanost – sutra industrija“
Osobne vještine	
Materinski jezik	Hrvatski
Strani jezici	Engleski – aktivno u govoru i pismu Njemački – pasivno u govoru i pismu
Računalne vještine	MS Office sustav, služenje internetom i mailom