

Sinteza i karakterizacija novih 1,2,3-triazolskih derivata harmina i kumarina

Toth, Maja

Master's thesis / Diplomski rad

2021

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Pharmacy and Biochemistry / Sveučilište u Zagrebu, Farmaceutsko-biokemijski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:163:132972>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-19**



Repository / Repozitorij:

[Repository of Faculty of Pharmacy and Biochemistry University of Zagreb](#)



Maja Toth

**Sinteza i karakterizacija novih 1,2,3-triazolskih
derivata harmina i kumarina**

DIPLOMSKI RAD

Predan Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu

Zagreb, 2021.

Ovaj diplomski rad prijavljen je na kolegiju Farmaceutska kemija 1 Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta i izrađen u Zavodu za farmaceutsku kemiju pod stručnim vodstvom dr. sc. Kristine Pavić.

Zahvaljujem se dr. sc. Kristini Pavić na ukazanoj pomoći, strpljenju i povjerenju u svakom koraku izrade ovog diplomskog rada.

Hvala zaposlenicima Zavoda za farmaceutsku kemiju i kolegici Ivani na pomoći i ugodnoj atmosferi u laboratoriju.

Zahvaljujem se svim svojim prijateljicama na pet divnih godina ispunjenih smijehom i lijepim uspomenama.

Najveća zahvala mojoj obitelji koja mi je pružala podršku kroz cijelo moje školovanje i vjerovala u mene kad je bilo najpotrebnije.

Rad je financiran sredstvima uspostavnog istraživačkog projekta *Derivati harmina kao potencijalni antimalarici* (UIP-2017-05-5160) Hrvatske zaklade za znanost.



KRATICE

A2780	humana stanična linija karcinoma bazalnih epitelnih stanica jajnika
A549	humana stanična linija adenokarcinoma alveolarnih bazalnih epitelnih stanica
ADMA	acetaldehid dimetil acetal
CuAAC	bakrom (I) katalizirana alkin-azid cikloadicija
DMF	<i>N,N</i> -dimetilformamid
DMSO	dimetilsulfoksid
DYRK1A	dvojno specifična fosforilacijom tirozina regulirana kinaza 1A
HBL-100	humana stanična linija epitelnih stanica dojke
HCT-116	humana stanična linija karcinoma epitelnih stanica debelog crijeva
HeLa	humana stanična linija karcinoma epitelnih stanica grlića maternice
Hep3B	humana stanična linija karcinoma hepatocita
HepG2	humana stanična linija karcinoma hepatocita
HIV	virus humane imunodeficijencije
Hsp90	protein toplinskog šoka 90 (eng. <i>heat shock protein 90</i>)
HT-29	humana stanična linija adenokarcinoma debelog crijeva
IR	infracrveno zračenje
MDA-MB-231	humana stanična linija adenokarcinoma dojke
MGC803	humana stanična linija karcinoma želuca
MS	masena spektrometrija
MW	mikrovalni reaktor
NMR	nuklearna magnetska rezonancija
OVCAR-3	humana stanična linija adenokarcinoma jajnika
PC3	humana stanična linija karcinoma prostate
SAR	odnos kemijske strukture i biološke aktivnosti
TEA	trietilamin
TFA	trifluorooctena kiselina
TLC	tankoslojna kromatografija
TMS	tetrametilsilan

TPSA	topološka ploština zone polarne površine
t_t	temperatura tališta
UV	ultraljubičasto zračenje

SADRŽAJ

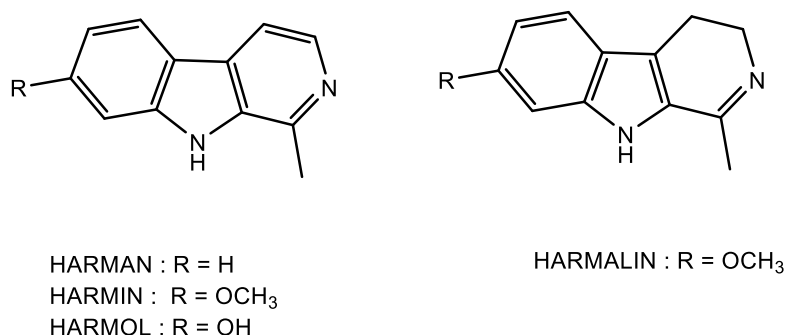
1. UVOD	1
1.1. β -Kربولini.....	2
1.1.1. Biološko djelovanje β -kربولina	4
1.2. <i>Click</i> kemija	6
1.2.1. Bakar kao katalizator.....	8
1.2.2. Rutenij kao katalizator.....	8
1.3. Hibridni lijekovi.....	9
1.4. Kumarini	10
1.4.1. <i>Click</i> derivati kumarina	10
2. OBRAZLOŽENJE TEME	13
3. MATERIJALI I METODE	16
3.1. Sinteza 4-klorkumarina 1a-c	19
3.1.1. Sinteza 4-klorkumarina 1a	19
3.1.2. Sinteza 6-metil-4-klorkumarina 1b	19
3.1.3. Sinteza 6-fluor-4-klorkumarina 1c	20
3.2. Sinteza 4-azidokumarina 2a-c	20
3.2.1. Sinteza 4-azidokumarina 2a	20
3.2.2. Sinteza 6-metil-4-azidokumarina 2b	21
3.2.3. Sinteza 6-fluor-4-azidokumarina 2c	21
3.3. Sinteza 1-metil-6-metoksi-2,3,4,9-tetrahidro-1 <i>H</i> -pirido[3,4- <i>b</i>]indol-2-evog trifluoracetata (3)	22
3.4. Sinteza 1-metil-6-metoksi-9 <i>H</i> -pirido[3,4- <i>b</i>]indola (4).....	22
3.5. Sinteza 1-metil-9 <i>H</i> -pirido[3,4- <i>b</i>]ind-6-ola (5).....	22
3.6. Sinteza 1-metil-6-(prop-in-1-iloksi)-9 <i>H</i> -pirido[3,4- <i>b</i>]indola (6).....	23
3.7. Sinteza 6-metoksi-1-metil-9-(prop-2-in-1-il)-9 <i>H</i> -pirido[3,4- <i>b</i>]indola (7)	23
3.8. Sinteza derivata harmina i kumarina 8a-b	23
3.8.1. Sinteza 4-(4-(((1-metil-9 <i>H</i> -pirido[3,4- <i>b</i>]indol-6-il)oksi)metil)-1 <i>H</i> -1,2,3-triazol- 1-il)-2 <i>H</i> -kromen-1-ona (8a).....	24

3.8.2. Sinteza 6-metil-4-(4-(((1-metil-9 <i>H</i> -pirido[3,4- <i>b</i>]indol-6-il)oksi)metil)-1 <i>H</i> -1,2,3-triazol-1-il)-2 <i>H</i> -kromen-2-ona (8b)	24
3.9. Sinteza derivata harmina i kumarina 9a-b	25
3.9.1. Sinteza 4-(4-((7-metoksi-1-metil-9 <i>H</i> -pirido[3,4- <i>b</i>]indol-9-il)metil)-1 <i>H</i> -1,2,3-triazol-1-il)-2 <i>H</i> -kromen-2-ona (9a).....	25
3.9.2. Sinteza 6-fluor-4-(4-((7-metoksi-1-metil-9 <i>H</i> -pirido[3,4- <i>b</i>]indol-9-il)metil)-1 <i>H</i> -1,2,3-triazol-1-il)-2 <i>H</i> -kromen-2-ona (9b)	26
4. REZULTATI I RASPRAVA.....	27
5. ZAKLJUČAK	42
6. LITERATURA.....	44
7. SAŽETAK/SUMMARY	48
8. PRILOZI	51
9. TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA	70

1. UVOD

1.1. β -Karbolini

β -Karbolini su velika skupina indolskih alkaloida, poznati kao „harmala“ alkaloidi, koji u svojoj strukturi posjeduju triciklički pirido-[3,4-*b*]indolski prsten te se s obzirom na zasićenost piridinskog prstena dijele na u potpunosti aromatizirane, dihidro- i tetrahidro- β -karboline. Najpoznatiji predstavnici su harman, harmin, harmalin i harmol (Slika 1). β -Karbolini izolirani su iz sirijske rutvice (*Peganum harmala*, L. Nitrariaceae) (Slika 2) koja se na području sjeverne Afrike i Bliskog Istoka koristila u razne svrhe, npr. kao emenagog, laktagog, antipiretik i abortiv, a pokazivala je i halucinogena svojstva. Ekstrakt sjemenki sirijske rutvice (Slika 3) se u sjeverozapadnoj Kini stoljećima koristio za liječenje karcinoma gastrointestinalnog trakta i malarije (Cao i sur., 2007). Drugi značajniji prirodni izvori β -karbolina su ljubičasta pasiflora (*Passiflora incarnata*, Passifloraceae), dušna loza (*Banisteriopsis caapi*, Malpighiaceae), zemaljski babin zub (*Tribulus terrestris*, Zygophyllaceae), pčelinje drvo (*Tetradium daniellii*, Rutaceae), Okinawa spužve (*Amphimedon* sp.), indonezijske spužve (*Acanthostrongylophora* sp.) i cjevaste spužve (*Haliclona* spp.) (Piechowska i sur., 2019; Kukula-Koch i Widelski, 2016; Franča i sur., 2014). Osim izolacijom iz biljaka, poznato je da se određeni β -karbolini mogu dobiti i sintetski iz triptofana ili triptamina i aldehida pomoću Pictet-Spenglerove reakcije (Gorki i sur., 2020; Cao i sur., 2007).



Slika 1. Strukture najpoznatijih β -karbolina



Slika 2. *Peganum harmala*, L. Nitrariaceae (preuzeto s https://www.eastafricanplants.senckenberg.de/root/index.php?page_id=47&id=8563#)



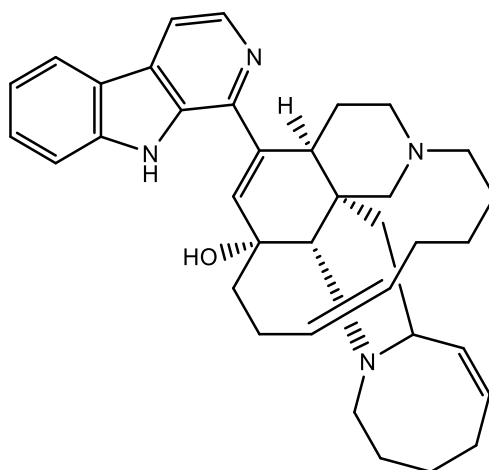
Slika 3. Sjemenke vrste *P. harmala* (preuzeto s <https://www.shutterstock.com/search/syrian+rue>)

1.1.1. Biološko djelovanje β -karbolina

β -Karbolini imaju visok afinitet za serotoninske, dopaminske, benzodiazepinske te imidazolinske receptore preko kojih ostvaruju sedativno, antikonvulzivno ili prokonvulzivno, anksiolitičko ili anksiogeno, halucinogeno i antidepresivno djelovanje. Također djeluju kao inhibitori monoamino oksidaze A što doprinosi anksiolitičkom i antidepresivnom učinku (Cao i sur., 2007).

β -Karbolini povezuju se s mehanizmom interkaliranja u DNA, inhibicijom sinteze DNA te inhibicijom enzima kao što su topoizomeraza I i II, protein kinaze DYRK1A, I κ B, PLK1, protein kinaze ovisne o ciklinu (CDK) te fosfodiesteraze (PDE) što rezultira citotoksičnim učinkom na različite humane stanične linije, primjerice na rak grlića maternice (HeLa), rak debelog crijeva (HT-29, HCT-116), rak pluća (A549) te epitelne stanice dojke (HBL-100). Osim prethodno navedenih farmakoloških djelovanja na središnji živčani sustav i rak, β -karbolini pokazuju i druga djelovanja, od kojih je za ovaj rad najvažnije antimalarijsko djelovanje (Cao i sur., 2007).

Osim ranije navedenih predstavnika skupine β -karbolina, kao spoj uzor za nove potencijalne antimalarijske lijekove pokazao se manzamin A. Manzamin A (Slika 4) ostvario je brže djelovanje i produljenu antiparazitsku aktivnost u odnosu na klorokin i artemisinin (Ang i sur., 2000).



Slika 4. Strukturna formula manzamina A

β -Karbolini inhibiraju protein toplinskog šoka 90 (Hsp90) kod vrsta roda *Plasmodium*. Proteini toplinskog šoka su vrlo konzervirani proteini (molekularni šaperoni) prisutni u svim organizmima pri normalnim temperaturama te su nužni za normalno funkcioniranje stanica

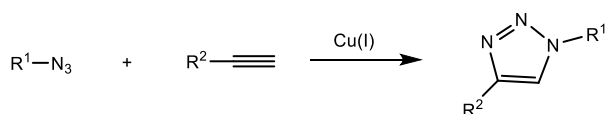
(Shrestha i sur., 2016). Njihova osnovna uloga je zaštita stanica od toksičnih učinaka uzrokovanih visokim temperaturama i stresom. Kod vrste *Plasmodium falciparum* Hsp90 omogućava otpornost parazita na temperaturne promjene tijekom transmisije s vektora na ljude te tako omogućava njegov daljnji razvoj i razmnožavanje. Inhibicijom Hsp90 postigla bi se dva rezultata: prvi je sprječavanje pravilnog slaganja i nastajanja funkcionalnih proteina čija je uloga razvoj rezistencije na klasične antimalarike čime bi se omogućilo nesmetano djelovanje istih, dok je drugi ometanje razvoja parazita. Iako postoji visok stupanj homologije između *PfHsp90* i humanih Hsp90, β -karbolini i njihovi derivati selektivno se vežu na one prisutne u parazitu te na taj način ne ugrožavaju čovjeka (Bayih i sur., 2016).

1.2. Click kemija

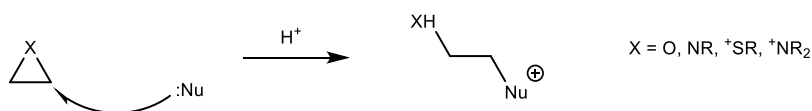
Termin „click kemija“ odnosi se na skupinu brzih, jednostavnih i regioselektivnih reakcija visokih iskorištenja te s vrlo malo onečišćenja. Četiri su glavne klasifikacije *click* reakcija identificirane do danas, a to su: cikloadicije, nukleofilno otvaranje prstena, karbonilna kemija nealdolnog tipa i adicije na višestruke C-C veze što je prikazano i na Shemi 1 (Hein i sur., 2008).

Cikloadicije

Bakrom katalizirana 1,3-dipolarna cikloadicija

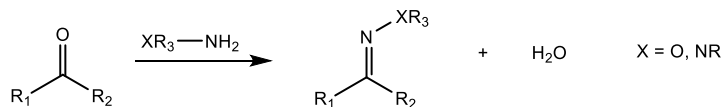


Nukleofilno otvaranje prstena

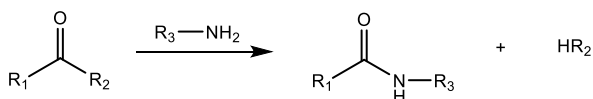


Karbonilna kemija nealdolnog tipa

Formiranje hidrazon/oksim etera

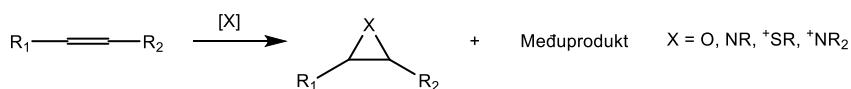


Formiranje amida/izouree



Adicije na višestruke C-C veze

Formiranje različitih tročlanih prstena



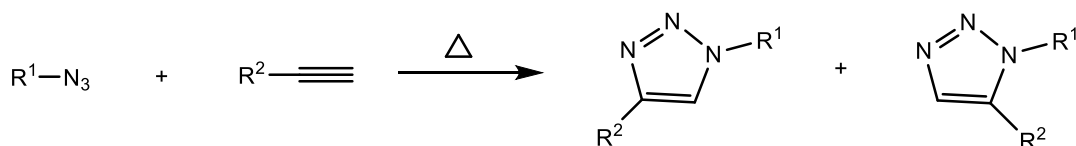
Određene Michaelove adicije



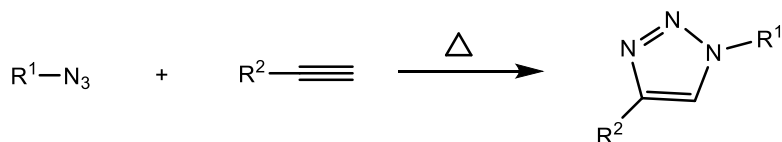
Shema 1. Glavne klasifikacije reakcija click kemije s odgovarajućim primjerima

Najpoznatija i najčešće korištena od prethodno navedenih je bakrovim (I) ionima katalizirana Huisgenova 1,3-dipolarna cikloadicija azida na terminalne alkine (CuAAC) pri čemu nastaju 1,4-disupstituirani 1,2,3-triazoli. Osim bakra, kao katalizatori se mogu koristiti i niklov (II) klorid (NiCl₂), platinski (II) klorid (PtCl₂), paladijev (II) klorid (PdCl₂) te rutenijevi (II) kompleksi. Nekatalizirana Huisgenova reakcija spora je i neselektivna, a kao produkt nastaje smjesa 1,4- i 1,5-disupstituiranih 1,2,3-triazolskih regioizomera. Katalizator Cu(I) osigurava brži tijek reakcije te selektivno nastajanje samo 1,4-disupstituiranog produkta kao što je prikazano na Shemi 2. Nadalje, 1,2,3-triazolski prsten inertan je na procese oksidacije, redukcije i hidrolize u bazičnim ili kiselim uvjetima, a smatra se bioizosterom amidne veze. Zbog toga CuAAC ima važnu ulogu u biokemiji, razvoju lijekova, kemiji polimera, itd. (Haldón i sur., 2015).

A. Huisgenova 1,3-dipolarna cikloadicija



B. Bakrom katalizirana 1,3-dipolarna cikloadicija



Shema 2. Sinteza 1,2,3-triazola 1,3-dipolarnom cikloadicijom azida i terminalnih alkina

1.2.1. Bakar kao katalizator

Postoji nekoliko metoda generiranja aktivnih bakrovih (I) iona.

Prva metoda podrazumijeva redukciju bakrovih (II) soli, npr. Cu(II) iona iz bakrovog (II) sulfata pentahidrata ($\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$) do Cu(I). Kao reducens najčešće se koristi natrijev askorbat. Prednosti ove metode su što je jeftina, ne zahtijeva inertnu atmosferu, može se provoditi u vodi što otklanja potrebu za zaštitom amino i hidroksilnih funkcionalnih skupina te je sigurna za okoliš. Glavni nedostatak metode je mogućnost redukcije Cu(II) do Cu^0 , no to se može spriječiti odgovarajućim omjerom reducensa i katalizatora i/ili dodatkom stabilizatora bakra (Haldón i sur., 2015; Hein i sur., 2008).

Druga metoda je izravno korištenje bakrovih (I) soli, npr. CuBr, CuI i CuCl što otklanja potrebu za reducensom. U ovom slučaju reakcija se mora provoditi u inertnoj atmosferi i u organskom otapalu zbog kojeg će možda biti potrebno uvesti zaštitne skupine i koristiti bazu. Pokazalo se da je korištenje odgovarajućih količina 2,6-lutidina i *N,N*-diizopropiletilamina kao baza smanjilo količinu nusprodukata (Hein i sur., 2008).

Treća metoda podrazumijeva oksidaciju metalnog bakra solima amina, no ova metoda ima brojne nedostatke kao što su produljeno vrijeme reakcije, skuplja je, potrebne su veće količine bakra i blago kisela sredina koja može utjecati na funkcionalne skupine reaktanata koje su osjetljive na kiselinu (Hein i sur., 2008).

Noviji pristup uključuje korištenje nanočestica bakra čije su prednosti veliki omjer površine i volumena čime je osiguran velik broj aktivnih mjesta po jedinici površine, pojačana reaktivnost te olakšana separacija i recikliranje koje minimizira kontaminaciju produkata (Haldón i sur., 2015; Hein i sur., 2008).

1.2.2. Rutenij kao katalizator

Rutenij se kao katalizator u *click* reakciji cikloadicije koristi kada se selektivno želi dobiti 1,5-disupstituirani 1,2,3,-triazol. Međutim, ne favoriziraju svi rutenijevi kompleksi nastajanje 1,5-izomera: kompleksi poput $\text{Ru}(\text{OAc})_2(\text{PPh}_3)_3$, $\text{RuCl}_2(\text{PPh}_3)_3$ i $\text{RuHCl}(\text{CO})(\text{PPh}_3)_3$ katalizirat će nastajanje 1,4-izomera. Jedino pentametilklopentadienilni kompleks $\text{Cp}^*\text{RuCl}(\text{PPh}_3)_2$ te nekoliko drugih Ru(II) katalizatora koji sadrže $[\text{Cp}^*\text{RuCl}]$ reakciju u potpunosti usmjeravaju

prema nastajanju 1,5-izomera. Za reakciju kataliziranu rutenijevim kompleksima mogu se koristiti polarna i nepolarna otapala, te ju je, ovisno o katalizatoru, preporučljivo provoditi u inertnoj atmosferi kako bi se spriječila razgradnja kompleksa. Za razliku od CuAAC reakcije koja je ograničena na terminalne alchine, RuAAC reakcija može se provoditi i s neterminalnim alkinima (Johansson i sur., 2016)

1.3. Hibridni lijekovi

Molekularna hibridizacija podrazumijeva spajanje dva ili više farmakofora, koji mogu biti prirodni ili sintetski, u jednu strukturu s ciljem stvaranja multifunkcionalnih hibridnih molekula poboljšanih svojstava. Neka od njih su modificirana selektivnost, bolja farmakokinetika i smanjen broj neželjenih nuspojava (Chu i sur., 2019).

Hibridizacija se sve češće koristi u razvoju novih multimodalnih lijekova čija mogućnost ciljanja više različitih meta može biti rješenje za borbu protiv rezistentnih multifaktorijalnih bolesti, kao i poboljšanje adherencije pacijenata.

Bolesti poput tuberkuloze, malarije, raka i gljivičnih infekcija predstavljaju velik javnozdravstveni problem pa se razvoj hibridnih lijekova usmjerio na njih. U usporedbi s klasičnim lijekovima korištenim za liječenje ovih bolesti, hibridni lijekovi pokazali su se superiornijima. Naime, spajanjem dva ili više farmakofora stvaraju se lijekovi manje toksičnosti, veće selektivnosti i sinergističkog učinka, stoga se može zaključiti da hibridni lijekovi predstavljaju budućnost za terapiju kompleksnih bolesti (Shaveta i Singh, 2016).

1.4. Kumarini

Kumarini ili benzopiran-2-oni su skupina prirodnih spojeva dobrih farmakoterapijskih svojstava. Pripadnici skupine variraju od jednostavnih pa sve do višesupstituiranih policikličkih kumarina. Kumarini su sekundarni metaboliti biljaka te su uglavnom netoksični. Prvi put su izolirani iz sjemenki biljke *Dipteryx odorata*, L. Fabaceae (Matosi sur., 2015). Zbog brojnih povoljnih farmakoloških učinaka kao što su, npr. antikancerogeno, antioksidativno, protuupalno, antimikrobno, antidepresivno i anksiolitičko djelovanje, kumarin i njihovi derivati pogodni su kandidati za molekularnu hibridizaciju (Sandhu i sur., 2014).

Pretpostavka je da će spajanje kumarina s drugim biološki aktivnim molekulama rezultirati terapeutima koji će se moći koristiti za liječenje kompleksnih multifaktorijalnih bolesti (Sandhu i sur., 2014).

1.4.1. Click derivati kumarina

Hibridi kumarina i artemisinina pokazali su antiproliferativno djelovanje na humane stanične linije hepatocelularnog karcinoma (HepG2 i Hep3B), karcinoma jajnika (A2780 i OVCAR-3), debelog crijeva (HT-29 i HCT-116) i dojke (MDA-MB-231). Pokazano je da nakupljanjem u mitohondrijima stanica karcinoma induciraju stvaranje reaktivnih kisikovih vrsta što rezultira apoptozom. Ovi hibridi također inhibiraju proliferaciju i zaustavljaju stanicu u G0/G1 fazi kod stanične linije HT-29 te suprimiraju migraciju tumorskih stanica. Analiza ovisnosti biološke aktivnosti o strukturi (SAR) ovih hibrida pokazala je da su supstitucija klorom na kumarinskom prstenu na položaju 3, metilnom skupinom na položaju 4 te uklanjanje poveznice između artemisinina i 1,2,3-triazola odgovorne za biološku aktivnost, dok su supstitucija etoksikarbonilom na položaju 3 te zamjena etera kao poveznice između kumarina i 1,2,3-triazola metilenskom skupinom dovele do drastičnog pada u aktivnosti (Zhang i Xu, 2019).

Hibridi kumarina i zidovudina pokazali su se kao potencijalni dualni inhibitori proteaze virusa humane imunodeficijencije (HIV) i reverzne transkriptaze. Istraživanje je pokazalo da konjugati sa supstituentima klorom, bromom, metoksi ili etoksi skupinom na kumarinu imaju i do tri puta veću inhibitornu aktivnost na HIV proteazu u odnosu na ritonavir i zidovudin. Nadalje, zbog prisutnosti zidovudina i kumarina u strukturi, konjugati se mogu vezati i na

nukleozidno i na nenukleozidno vezno mjesto reverzne transkriptaze te na taj način imati puno niže IC_{50} vrijednosti. *N*-Benzilni analozi u odnosu na prethodno navedene pokazali su manji inhibitorni učinak na HIV proteazu, no znatno veći na reverznu transkriptazu HIV-a (Olomola i sur., 2013).

Hibridi kumarina i 1,2,3-triazola pokazali su djelovanje na humane stanične linije adenokarcinoma prostate (PC3), karcinoma želuca (MGC803) te hepatocelularnog karcinoma (HepG2). Zamjena kumarina indolom, tiazolom ili oksazolom rezultirala je značajnim gubitkom aktivnosti, što sugerira da je kumarin nužan za citostatsko djelovanje. Hibridi s poveznicom na C7 kumarina pokazali su veću aktivnost od hibrida s poveznicom na C4. Molekule koje sadrže 1,2,4-triazol također pokazuju citostatsko djelovanje i već se godinama koriste u medicini. To su primjerice inhibitori aromataze anastrozol i letrozol. Zbog toga bi hibridi kumarina s 1,2,4-triazolom mogli biti potencijalni kandidati za citostatike kao i hibridi kumarina s drugim azolima, pirimidinom, iminom ili furoksanom (Zhang i Xu, 2019).

Hibridi kumarina i 1,2,3-triazola u jednom su istraživanju pokazali potencijalno antifungalno djelovanje na vrste *Candida albicans*, *Fusarium oxysporum* i *Aspergillus niger* te antioksidativno djelovanje. Triazolski prsten poveznica je između kumarina i supstituiranog benzenskog prstena. Aktivnost molekule mijenjala se s promjenom supstituenata na benzenskom prstenu vezanom na triazolski prsten, dok se kumarinski dio molekule nije mijenjao. Derivati koji su sadržavali klor u *meta*, *orto* ili *para* položaju supstituiranog benzenskog prstena pokazali su jednaku potentnost na *C. albicans* te jednaku ili veću potentnost naspram *F. oxysporum* u odnosu na mikonazol. Za procjenu antioksidativnog učinka kao standard korišten je butilhidroksitoluen te su svi derivati pokazali umjerenu aktivnost uz par iznimaka (Shaikh i sur., 2015).

Osim prethodno navedenog citostatskog i antifungalnog djelovanja, kumarinski triazoli pokazali su obećavajuću aktivnost na soj *P. falciparum* osjetljiv na klorokin (3D7) te soj rezistentan na klorokin (RKL9 i W2) (Chu i sur., 2019; Yadav i sur., 2018; Wei i sur., 2016).

Zbog prisutnosti kumarina u strukturi jedan od mogućih mehanizama antimalarijskog djelovanja je inhibicija DNA giraze (Bozorov i sur., 2019; Yadav i sur., 2018). DNA giraza je enzim koji pripada porodici topoizomeraza, a njena je uloga kataliziranje ATP-ovisnog negativnog supernamatanja dvostruke uzvojnice kružne molekule DNA (Reece i Maxwell, 1991). Plazmodij sadrži jedinstveni organel sličan kloroplastu zvan apikoplast koji je

esencijalan za njegovo preživljavanje, a u njemu se nalazi kružna DNA na koju djeluje spomenuti enzim (Girdwood i sur., 2015).

Kumarinski triazoli inhibicijom DNA giraze sprječavaju ATP-ovisno negativno supernamatanje, no mehanizam nije u potpunosti razjašnjen. Istraživanje iz 2018. godine ispitalo je djelovanje nekoliko *click* derivata kumarina na soj *P. falciparum* 3D7. Svim sintetiziranim spojevima zajednički strukturni elementi bili su kumarin i triazol, dok je treći element varirao. Spojevi koji su na triazolskom prstenu imali supstituente 7-klorkinolin, 3,4,5-trimetoksifenil, 2,4-difluorfenil ili 4-fluor-2-metilfenil pokazali su nezadovoljavajuće IC_{50} vrijednosti vjerojatno jer se nisu mogli vezati na vezno mjesto DNA giraze zbog steričkih smetnji. Kod spojeva sa supstituiranim benzenskim prstenom opaženo je da fluor u odnosu na klor umjereno povećava aktivnost spoja ako se nalazi u *orto* ili *para* položaju. Nadalje, spojevima kojima je kao treći element uveden alkilni lanac s polarnom skupinom poput metoksi-etanoata ili 2-hidroksietila značajno se povećala aktivnost što pokazuju i IC_{50} vrijednosti ($< 4 \mu\text{g/ml}$). Jedan od spojeva sadržavao je nesupstituirani triazol te je pokazao visoku aktivnost što daje naslutiti dodatno stvaranje vodikove veze s veznim mjestom enzima. Samo tri spoja imala su IC_{50} vrijednosti $< 2 \mu\text{g/ml}$ što se povezuje s prisutnošću elektron-donorske skupine u strukturi poput 5-dimetilfenilne ili 2,4-dimetoksifenilne skupine. Iz svega navedenog zaključilo se kako prisutnost elektron-donorskih i elektron-akceptorskih skupina, njihov položaj (*orto*, *meta* ili *para*) na benzenskom prstenu te steričko ometanje imaju važan utjecaj na antimalarijsko djelovanje *in vitro* (Yadav i sur., 2018).

2. OBRAZLOŽENJE TEME

Malarija je jedna od najopasnijih bolesti, a ujedno i najučestalija parazitska infekcija na svijetu s najvećom prevalencijom u Subsaharskoj Africi (Haldar i sur., 2007). Uzročnici malarije pripadnici su roda *Plasmodium* i dugo se smatralo da samo četiri vrste mogu inficirati čovjeka (*P. falciparum*, *P. vivax*, *P. malarie* i *P. ovale*), no zabilježeni su slučajevi zaraze i vrstom *P. knowlesi* (Singh i Daneshvar, 2013). Od prethodno navedenih *P. falciparum* odgovoran je za većinu zabilježenih slučajeva zaraze i smrtnih ishoda malarije. Bolest se prenosi ubodom komarca iz roda *Anopheles*, a simptomi poput povišene tjelesne temperature (39–41,5 °C), groznice, glavobolje, povraćanja i slabosti nastupaju otprilike nakon deset dana. U slučaju pogoršanja nastupit će hipoglikemija, metabolička acidoza, anemija, zatajenje bubrega, akutno respiratorno zatajenje pa čak i koma, stoga je potrebno što prije započeti liječenje (www.malariasite.com).

Prema procjenama Svjetske zdravstvene organizacije broj oboljelih 2019. godine iznosio je 229 milijuna s 409 000 smrtnih ishoda. Najveći postotak (94 %) zabilježen je u Africi. Najugroženija skupina su djeca mlađa od pet godina koja čine 60 % ukupnog broja umrlih u svijetu (www.who.int).

Nadalje, veliki problem predstavlja rezistencija parazita na postojeće antimalarike, posebice križna rezistencija na klorokin koji je korišten kao prva linija liječenja malarije te rezistencija na kombiniranu terapiju s artemisininom (Nsanjabana, 2019; www.who.int). Zbog svega navedenog razvoj novih antimalarika učinkovitih protiv rezistentnih sojeva prioritet je brojnih istraživanja u svijetu u koje je uključen i Zavod za farmaceutsku kemiju Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.

β -Karbolini, od kojih je najpoznatiji harmin, pokazuju obećavajuće antimalarijsko djelovanje povezano s inhibicijom proteina toplinskog šoka (Hsp90) kod vrsta roda *Plasmodium*.

Kumarin i njegovi derivati prirodni su spojevi niske toksičnosti i brojnih bioloških djelovanja, a za ovaj rad najvažnije antimalarijsko djelovanje povezano je s inhibicijom DNA giraze.

Cilj ovog rada je sinteza i karakterizacija novih hibrida harmina i kumarina kao potencijalnih antimalarika.

U sintezi hibrida harmina i kumarina korištena je Huisgenova 1,3-dipolarna cikloadicija azida na alkine (CuAAC), što znači da u strukturi sadrže 1,2,3-triazol kao poveznicu između β -karbolinskog i kumarinskog dijela molekule.

U daljnjim istraživanjima koja prelaze okvire ovog rada novosintetiziranim spojevima bit će ispitano antimalarijsko i citostatsko djelovanje.

3. MATERIJALI I METODE

Tališta (t_r) su određena na Stuart SMP3 instrumentu (Barloworld Scientific, UK) i nisu korigirana. IR spektri snimljeni su na FT-IR UATR Two spektrometru (Perkin Elmer, SAD) uz Fourierovu transformaciju i prigušenu totalnu refleksiju. ^1H i ^{13}C NMR spektri snimljeni su na Bruker Avance III HD spektrometru (Bruker, SAD) kod 300 ili 400 MHz za ^1H te kod 75, 101 ili 151 MHz za ^{13}C jezgru. Uzorci su mjereni u DMSO- d_6 otopinama na 20 °C u NMR cijevicama promjera 5 mm. Kemijski pomaci dani su u ppm u odnosu na tetrametilsilan (TMS) kao unutarnji standard za ^1H , odnosno signal DMSO u ^{13}C spektru (39,51 ppm). Spektri masa snimljeni su na HPLC-MS/MS instrumentu (HPLC, Agilent Technologies 1200 Series; MS, Agilent Technologies 6410 Triple Quad, SAD). Ionizacija elektroraspršenjem (ESI) u pozitivnom ili negativnom modu korištena je kao tehnika ionizacije. Reakcije potpomognute mikrovalnim zračenjem provedene su u mikrovalnom reaktoru CEM Discover (CEM, SAD) u staklenoj epruveti.

Za tankoslojnu kromatografiju kao stacionarna faza upotrijebljene su silikagel staklene ploče 60 F₂₅₄ (Merck, Njemačka) te diklormetan/metanol (9,5:0,5, 9:1 i 7,5:2,5) kao pokretna faza. Za kromatografiju na koloni kao nepokretna faza korišten je silikagel veličine čestica 0,063–0,200 mm (Sigma-Aldrich, SAD) uz diklormetan/metanol (9,5:0,5 i 7,5:2,5 i 9:1) kao pokretne faze. Sloj aluminijevog (III) oksida (90 aktiviran, neutralan; 0.063–0.200 mm; Merck, Njemačka) nanesen je na silikagel tijekom kromatografije na koloni kako bi se eliminirala prisutnost Cu(I) iona u konačnim produktima. Analizirani spojevi detektirani su UV zračenjem ($\lambda = 254$ i 366 nm) i parama joda.

Sve kemikalije i otapala bili su *p. a.* čistoće. Harmin, acetaldehid dimetil acetal (ADMA), litijev karbonat, 10 % paladij na ugljenu (Pd/C), ledena octena kiselina, 4-hidroksikumarin, Celite® S i fosforov (V) oksiklorid (POCl₃) nabavljeni su od tvrtke Sigma-Aldrich (SAD), cezijev karbonat, propargil-bromid (80 %), 5-metoksitriptamin i trifluorocena kiselina (TFA) nabavljeni su od tvrtke Tokyo Chemical Industry (TCI, Japan), natrijev azid (NaN₃) i bromovodična kiselina (47 %) od tvrtke Merck (Njemačka), etil-acetat i metanol od tvrtke Honeywell (SAD), diklormetan (DCM) od Fischer Scientific (UK), dietil-eter od tvrtke ITW Reagents (Njemačka), natrijev klorid i bezvodni natrijev sulfat od tvrtke Gram-Mol (Hrvatska), natrijev hidroksid nabavljen je od tvrtke Kemika (Hrvatska), acetonitril od tvrtke CARLO ERBA Reagents (Francuska), apsolutni etanol od Acros Organics (SAD), trietilamin (TEA) i bakrov (II) acetat nabavljeni od tvrtke Alfa Aesar (SAD), dok je diklormetan nabavljen od tvrtke Thermo Fischer Scientific (SAD).

Bezvodni dimetilformamid (DMF) nabavljen je od tvrtke TCI i čuvan nad aktiviranim molekulskim sitima.

3.1. Sinteza 4-klorkumarina 1a-c

Opća metoda: Suspenziji odgovarajućeg 4-hidroksikumarina (1,028 mmol) u POCl₃ (1 mL) dokapan je polagano TEA (0,286 mL, 2,056 mmol). Reakcijska smjesa je miješana i refluksirana preko noći na 107 °C. Idući dan reakcija je prekinuta dodatkom 30 mL destilirane vode na ledenoj kupelji te je talog odsisan. Otopini taloga u smjesi etil-acetata i metanola dodan je aktivni ugljen te je suspenzija odsisana preko sloja dijatomejske zemlje (Celite®), a matičnica je uparena. Dobiveni produkt **1a-c** iskorišten je bez daljnjeg pročišćavanja u sintezi 4-azidokumarina **2a-c**.

3.1.1. Sinteza 4-klorkumarina 1a

Količina 4-hidroksikumarina: 0,167 g.

Iskorištenje: 0,093 g (50 %).

¹H NMR (DMSO-*d*₆, δ/ppm, *J*/Hz) 7,91-7,89 (dd, 1H, *J* = 1,49, 7,90 Hz), 7,78-7,73 (m, 1H), 7,52-7,46 (m, 2H), 6,95 (s, 1H).

¹³C NMR (DMSO-*d*₆, δ/ppm) 158,29, 152,45, 148,33, 133,63, 125,20, 125,12, 117,43, 116,79, 115,74.

3.1.2. Sinteza 6-metil-4-klorkumarina 1b

Količina 4-hidroksi-6-metilkumarina: 0,181 g.

Iskorištenje: 0,160 g (80 %).

¹H NMR (DMSO- *d*₆, δ/ppm, *J*/Hz) 7,67 (s, 1H), 7,57-7,55 (dd, 1H, *J* = 2,08, 8,43 Hz), 7,40-7,38 (d, 1H, *J* = 8.43 Hz), 6,90 (s, 1H), 2,42 (s, 3H).

¹³C NMR (DMSO-*d*₆, δ/ppm) 158,41, 150,61, 148,38, 134,61, 134,46, 124,70, 117,09, 116,61, 115,58, 20,30.

ESI-MS: 195,2 (M+1)⁺.

3.1.3. Sinteza 6-fluor-4-klorkumarina 1c

Količina 6-fluor-4-hidroksikumarina: 0,185 g.

Iskorištenje: 0,194 g (95 %).

^1H NMR (DMSO- d_6 , δ /ppm, J /Hz) 7,71-7,62 (m, 2H), 7,59-7,56 (dd, 1H, $J = 4,6, 9,1$ Hz), 7,03 (s, 1H).

^{13}C NMR (DMSO- d_6 , δ /ppm, J /Hz) 159,2-157,12 (d, $J_1 = 247,69$ Hz), 158,09, 148,85, 147,27, 121,02-120,78 (d, $J_2 = 23,75$ Hz), 119,10-119,01 (d, $J_3 = 7,12$ Hz), 118,74-118,65 (d, $J_3 = 9,3$ Hz), 116,81, 111,02-110,76 (d, $J_2 = 30,08$ Hz).

3.2. Sinteza 4-azidokumarina 2a-c

Opća metoda: Odgovarajući 4-klorkumarin **1a-c** (0,822 mmol) otopljen je u 2,5 mL suhog DMF-a. Nakon toga je u reakcijsku smjesu dodan natrijev azid (0,080 g, 1,233 mmol) te je miješano na sobnoj temperaturi 0,25–3 h. Reakcija je prekinuta dodatkom 30 mL destilirane vode te je talog odsisan i ispran vodom. Talog je zatim rastrljan u eteru i ponovno odsisan te je korišten u daljnjim reakcijama bez pročišćavanja.

3.2.1. Sinteza 4-azidokumarina 2a

Količina 4-klorkumarina **1a**: 0,093 g.

Trajanje reakcije: 0,25 h.

Iskorištenje: 0,132 g (86 %).

^1H NMR (DMSO- d_6 , δ /ppm, J /Hz) 7,74-7,68 (m, 2H), 7,46-7,44 (dd, 1H, $J = 0,92, 8,01$ Hz), 7,41-7,37 (td, 1H, $J = 1,06, 7,73, 7,83$ Hz), 6,43 (s, 1H).

^{13}C NMR (DMSO- d_6 , δ /ppm) 159,75, 153,00, 152,77, 133,36, 124,57, 123,19, 116,69, 114,56, 100,77.

3.2.2. Sinteza 6-metil-4-azidokumarina 2b

Količina 4-klor-6-metil-kumarina **1b**: 0,160 g.

Trajanje reakcije: 2 h.

Iskorištenje: 0,083 g (70 %).

IR (ATR): ν_{\max} 3053, 2299, 2253, 2183, 2121, 1769, 1692, 1600, 1564, 1488, 1423, 1371, 1319, 1252, 1187, 1150, 1024, 942, 917, 864, 832, 749, 718, 674, 617, 528 cm^{-1} .

^1H NMR (DMSO- d_6 , δ/ppm , J/Hz) 7,52-7,49 (s + d, 2H), 7,35-7,33 (d, 1H, $J = 8.26$ Hz), 6,39 (s, 1H), 2,37 (s, 3H).

^{13}C NMR (DMSO- d_6 , δ/ppm) 159,88, 152,66, 151,15, 134,18, 133,92, 122,71, 116,47, 114,23, 100,69, 20,29.

3.2.3. Sinteza 6-fluor-4-azidokumarina 2c

Količina 6-fluor-4-klorokumarina **1c**: 0,194 g.

Trajanje reakcije: 3 h.

Iskorištenje: 0,155 g (92 %).

IR (ATR): ν_{\max} 3062, 2165, 2128, 1705, 1613, 1567, 1491, 1441, 1372, 1327, 1254, 1219, 1134, 1022, 946, 873, 831, 773, 716, 677, 619, 588, 537 cm^{-1} .

^1H NMR (DMSO- d_6 , δ/ppm , J/Hz) 7,62-7,50 (m, 2H), 7,47-7,44 (dd, 1H, $J = 2,9, 8,7$ Hz), 6,52 (s, 1H).

^{13}C NMR (DMSO- d_6 , δ/ppm , J/Hz) 159,54, 159,21-156,81 (d, $J_1 = 238,1$ Hz), 151,93, 149,39, 120,79-120,54 (d, $J_2 = 22,33$ Hz), 118,95-118,86 (d, $J_3 = 9,57$ Hz), 115,65-115,56 (d, $J_3 = 9,57$ Hz), 108,90-108,64 (d, $J_2 = 24,61$ Hz), 101,73.

3.3. Sinteza 1-metil-6-metoksi-2,3,4,9-tetrahidro-1*H*-pirido[3,4-*b*]indol-2-evog trifluoracetata (**3**)

U epruveti za mikrovalnu sintezu suspendiran je 5-metoksitriptamin (0,2 g, 1,05 mmol) u 4 mL acetonitrila te je dodan ADMA (0,222 mL, 2,1 mmol) i TFA (0,156 mL, 2,1 mmol). Reakcijska smjesa grijana je 10 minuta na 110 °C u mikrovalnom reaktoru ($P = 75 \text{ W}$). Postupak je ponovljen tri puta nakon čega je sadržaj epruveta sjedinjen u tikvici od 100 mL te je dodano 50 mL etera i ostavljeno da kristalizira preko noći u hladnjaku. Talog je idući dan usitnjen na ultrazvučnoj kupelji, odsisan te ispran s acetonitriplom i eterom. Dobivena sol **3** ($\eta = 76 \%$, 0,791 g) korištena je u idućem reakcijskom koraku.

3.4. Sinteza 1-metil-6-metoksi-9*H*-pirido[3,4-*b*]indola (**4**)

Spoj **3** (0,100 g, 0,301 mmol), litijev karbonat (0,0445 g, 0,602 mmol) i 10 % Pd/C (0,0116 g) pomiješano je u 4 mL apsolutnog etanola u epruveti za mikrovalnu sintezu. Reakcijska smjesa grijana je u mikrovalnom reaktoru 20 minuta na 150 °C ($P = 75 \text{ W}$). Postupak je ponovljen šest puta. Sadržaj svih epruveta sjedinjen je u tikvici od 100 mL. Katalizator je odsisan preko dijatomejske zemlje (Celite®) te je matičnica uparena. Žuti talog usitnjen je u otopini natrijevog klorida (20 %) na ultrazvučnoj kupelji te je odsisan. Dobiveni spoj **4** ($\eta = 94 \%$, 0,359 g) korišten je u sljedećem reakcijskom koraku.

3.5. Sinteza 1-metil-9*H*-pirido[3,4-*b*]ind-6-ola (**5**)

Spoj **4** (0,100 g, 0,471 mmol) otopljen je u smjesi 2,5 mL ledene octene kiseline i 2 mL bromovodične kiseline (47 %). Reakcijska smjesa grijana je u mikrovalnom reaktoru 30 minuta na 150 °C ($P = 75 \text{ W}$). Postupak je ponovljen tri puta te je sadržaj epruveta sjedinjen i kiselina neutralizirana dodatkom otopine natrijeva hidroksida (5 %) do pH 8. Smjesa je ekstrahirana etil-acetatom ($3 \times 100 \text{ mL}$). Sakupljeni organski slojevi sušeni su nad bezvodnim natrijevim sulfatom, filtrirani i upareni. Nakon pročišćavanja kromatografijom na koloni uz pokretnu fazu diklormetan/ metanol (7,5:2,5) i rastrljavanja u eteru dobiven je fenol **5** ($\eta = 85 \%$, 0,238 g).

3.6. Sinteza 1-metil-6-(prop-in-1-iloksi)-9H-pirido[3,4-b]indola (6)

Fenol **5** (0,238 g, 1,201 mmol) otopljen je u 5 mL suhog DMF-a te je otopini dodan cezijev karbonat (0,548 g, 1,681 mmol) i 2 mL suhog DMF-a. Reakcijska smjesa propuhana je argonom kroz 20 minuta. Nakon toga je dodan propargil-bromid (80 %; 0,161 mL, 1,441 mmol), ponovno propuhano argonom te je miješano preko noći na sobnoj temperaturi u atmosferi argona. Dodatkom 50 mL destilirane vode reakcija je prekinuta, a reakcijska smjesa ekstrahirana je etil-acetatom (3 × 50 mL). Sakupljeni organski slojevi isprani su dva puta zasićenom otopinom natrijevog klorida, sušeni nad bezvodnim natrijevim sulfatom, filtrirani i upareni. Nakon pročišćavanja kromatografijom na koloni uz pokretnu fazu diklormetan/ metanol (9:1) i rastrljavanja u eteru dobiven je alkin **6** ($\eta = 67\%$, 0,190 g).

3.7. Sinteza 6-metoksi-1-metil-9-(prop-2-in-1-il)-9H-pirido[3,4-b]indola (7)

Otopini harmina (0,2 g, 0,942 mmol) u 5 mL suhog DMF-a dodan je 60 % natrijev hidrid u mineralnom ulju (0,06 g, 1,5 mmol). Reakcijska smjesa propuhana je argonom tijekom 15 minuta na sobnoj temperaturi, nakon čega je dodan 80% propargil-bromida (80 %; 0,3 mL, 2,69 mmol) te je ponovno propuhano argonom. Reakcijska smjesa je miješana 2 h na sobnoj temperaturi u atmosferi argona. Dodatkom 50 mL destilirane vode reakcija je prekinuta, a reakcijska smjesa ekstrahirana je etil-acetatom (3 × 50 mL). Sakupljeni organski slojevi zatim su isprani zasićenom otopinom natrijevog klorida, sušeni nad bezvodnim natrijevim sulfatom filtrirani i upareni. Nakon pročišćavanja kromatografijom na koloni uz pokretnu fazu diklormetan/ metanol (9,5 : 0,5) dobiven je alkin **7** ($\eta = 57\%$, 0,134 g).

3.8. Sinteza derivata harmina i kumarina 8a-b

Opća metoda: Otopini alkina **6** (0,038 g, 0,160 mmol) i odgovarajućeg 4-azidokumarina **2** (0,176 mmol) u metanolu (3,5 mL) dodan je Cu(II) acetat (0,01 mmol). Reakcijska smjesa miješana je na sobnoj temperaturi dva dana. Otapalo je upareno pod sniženim tlakom.

3.8.1. Sinteza 4-(4-(((1-metil-9H-pirido[3,4-*b*]indol-6-il)oksi)metil)-1H-1,2,3-triazol-1-il)-2H-kromen-1-ona (8a)

Količina reaktanta: 0,033 g 4-azidokumarina **2a**. Nakon pročišćavanja kromatografijom na koloni uz pokretnu fazu diklormetan/ metanol (9 : 1), dobiven je žuti talog koji je rastrljan u eteru i odsisan.

Iskorištenje: 0,043 g (63 %).

t_r 235,5–238,0 °C (raspad).

IR (ATR): ν_{\max} 3349, 3035, 1726, 1606, 1572, 1499, 1443, 1391, 1360, 1291, 1256, 1202, 1133, 1106, 1037, 1003, 944, 862, 808, 765, 701, 650, 616, 524 cm^{-1} .

^1H NMR (DMSO- d_6 , δ/ppm , J/Hz) 11,43 (s, 1H), 8,99 (s, 1H), 8,19-8,18 (d, 1H, $J = 5,33$ Hz), 7,98 (s, 1H), 7,94-7,92 (d, 1H, $J = 5,32$ Hz), 7,84-7,76 (m, 2H), 7,60-7,53 (m, 2H), 7,43-7,41 (t, 1H, $J = 7,69$ Hz), 7,31-7,28 (dd, 1H, $J = 2,45, 8,85$ Hz), 7,00 (s, 1H), 5,40 (s, 2H), 2,75 (s, 3H).

^{13}C NMR (DMSO- d_6 , δ/ppm) 159,47, 153,66, 151,87, 145,91, 143,89, 142,23, 136,91, 135,60, 135,10, 133,47, 126,75, 126,37, 125,47, 124,98, 121,37, 118,46, 117,19, 114,36, 112,85, 110,66, 105,33, 61,62, 20,36.

ESI-MS (m/z) 424,1 ($\text{M}+1$)⁺.

3.8.2. Sinteza 6-metil-4-(4-(((1-metil-9H-pirido[3,4-*b*]indol-6-il)oksi)metil)-1H-1,2,3-triazol-1-il)-2H-kromen-2-ona (8b)

Količina reaktanta: 0,035 g 4-azido-6-metilkumarina **2b**. Nakon pročišćavanja kromatografijom na koloni uz pokretnu fazu diklormetan/ metanol (9,5 : 0,5), dobiven je svijetložuti talog koji je prekrizaliziran iz etanola.

Iskorištenje: 0,024 g (34 %).

t_r 235,0–242,0 °C (raspad).

IR (ATR): ν_{\max} 3340, 3036, 1725, 1623, 1572, 1499, 1465, 1405, 1378, 1282, 1256, 1199, 1132, 1105, 1040, 1009, 945, 864, 807, 701, 610, 528 cm^{-1} .

^1H NMR (DMSO- d_6 , δ/ppm , J/Hz) 11,42 (s, 1H), 8,97 (s, 1H), 8,18-8,17 (d, 1H, $J = 5,28$ Hz), 7,98 (s, 1H), 7,93-7,92 (d, 1H, $J = 5,31$ Hz), 7,60-7,48 (m, 4H), 7,31-7,28 (dd, 1H, $J = 2,45$, 8,84 Hz), 6,95 (s, 1H), 5,40 (s, 1H), 2,75 (s, 3H), 2,34 (s, 3H).

^{13}C NMR (DMSO- d_6 , δ/ppm) 159,57, 151,85, 145,91, 143,87, 142,23, 136,94, 135,58, 135,11, 134,41, 134,35, 126,74, 126,38, 124,80, 121,38, 118,42, 117,00, 114,08, 112,85, 112,72, 110,71, 105,29, 61,60, 20,41, 20,37.

ESI-MS (m/z) 438,1 ($M+1$)⁺.

3.9. Sinteza derivata harmina i kumarina 9a-b

3.9.1. Sinteza 4-(4-((7-metoksi-1-metil-9H-pirido[3,4-b]indol-9-il)metil)-1H-1,2,3-triazol-1-il)-2H-kromen-2-ona (9a)

Otopini alkina **7** (0,040 g, 0,160 mmol) i 4-azidokumarina **2a** (0,036 g, 0,176 mmol) u metanolu (3,5 mL) dodan je Cu(II) acetat (0,01 mmol). Reakcijska smjesa miješana je na sobnoj temperaturi tri dana. Otapalo je upareno pod sniženim tlakom. Nakon pročišćavanja kromatografijom na koloni uz pokretnu fazu diklormetan/ metanol (9,5 : 0,5), dobiven je bijeli talog koji je rastrljan u eteru.

Iskorištenje: 0,03 g (43 %).

t_t 239,0–243,5 °C (raspad).

IR (ATR): ν_{\max} 3144, 3086, 3062, 2837, 1760, 1717, 1622, 1564, 1494, 1439, 1406, 1349, 1237, 1167, 1104, 1041, 948, 870, 813, 768, 646 cm^{-1} .

^1H NMR (DMSO- d_6 , δ/ppm , J/Hz) 8,78 (s, 1H), 8,21 (br, s, 1H), 8,12-8,10 (d, 1H, $J = 8,60$ Hz), 7,91-7,90 (d, 1H, $J = 4,71$ Hz), 7,76-7,72 (m, 2H), 7,56-7,53 (dd, 1H, $J = 0,95$, 8,70 Hz), 7,41-7,37 (m, 2H), 6,92-6,89 (m, 2H), 6,03 (s, 2H), 3,92 (s, 3H), 3,10 (s, 3H).

^{13}C NMR (DMSO- d_6 , δ /ppm, J /Hz) 160,62, 159,41, 153,57, 145,69, 144,74, 142,72, 141,18, 138,13, 133,37, 128,63, 125,40, 124,90, 122,40, 117,13, 114,52, 114,36, 112,34, 110,71, 109,47, 94,16, 55,66, 23,30.

ESI-MS (m/z) 438,1 ($M+1$) $^+$.

3.9.2. Sinteza 6-fluor-4-(4-((7-metoksi-1-metil-9H-pirido[3,4-b]indol-9-il)metil)-1H-1,2,3-triazol-1-il)-2H-kromen-2-ona (9b)

Smjesa alkina **7** (0,038 g, 0,154 mmol), 4-azido-6-fluorkumarina **2c** (0,034 g, 0,169 mmol) i bakrovog (II) acetata (0,01 mmol) u metanolu (1,5 mL) grijana je u mikrovalnom reaktoru 40 min na 70 °C ($P = 75$ W). Otapalo je upareno pod sniženim tlakom. Nakon pročišćavanja kromatografijom na koloni uz pokretnu fazu diklormetan/ metanol (9,5 : 0,5), i prekriztalizacije iz etanola dobiven je prljavo-bijeli talog.

Iskorištenje: 0,036 g (49 %).

t_f 235,0–237,0 °C (raspad).

IR (ATR): ν_{\max} 3441, 3127, 3072, 2955, 2836, 1728, 1628, 1574, 1490, 1461, 1440, 1406, 1348, 1301, 1256, 1235, 1197, 1163, 1041, 1025, 1008, 945, 887, 827, 728, 714, 611, 523 cm^{-1} .

^1H NMR (DMSO- d_6 , δ /ppm, J /Hz) 8,81 (s, 1H), 8,21-8,20 (d, 1H, $J = 5,18$ Hz), 8,12-8,11 (d, 1H, $J = 8,60$ Hz), 7,92-7,91 (d, 1H, $J = 5,17$ Hz), 7,65-7,61 (m, 3H), 7,39 (s, 1H), 7,01 (s, 1H), 6,92-6,90 (dd, 1H, $J = 2,17, 8,56$ Hz), 6,03 (s, 2H), 3,91 (s, 3H), 3,09 (s, 3H).

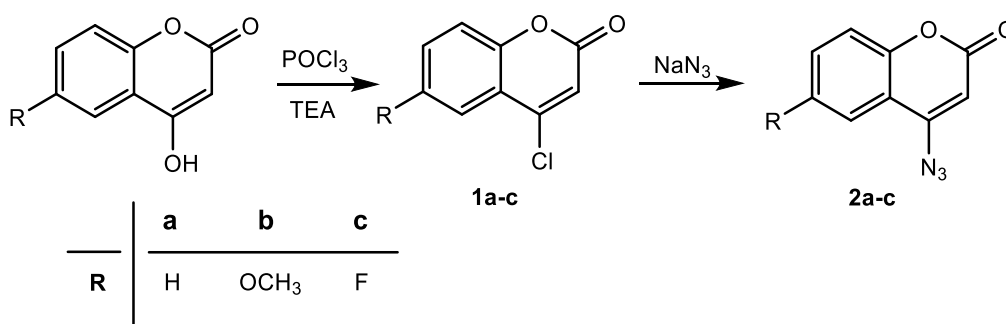
^{13}C NMR (DMSO- d_6 , δ /ppm, J /Hz) 160,62, 159,24, 158,79-157,19 (d, $J_1 = 235,40$ Hz), 150,02, 144,92, 144,75, 142,70, 141,15, 138,18, 134,73, 128,63, 124,77, 122,40, 120,80-120,63 (d, $J_2 = 29,19$ Hz), 119,31-119,25 (d, $J_3 = 8,63$ Hz), 115,24-115,18 (d, $J_3 = 10,88$ Hz), 114,52, 112,30, 111,41-111,24 (d, $J_2 = 24,99$ Hz), 111,24, 109,46, 94,14, 55,65, 23,27.

ESI-MS (m/z) 456,1 ($M+1$) $^+$.

4. REZULTATI I RASPRAVA

U ovom radu opisani ciljni spojevi su hibridni spojevi harmina koji preko 1,2,3-triazolske poveznice imaju vezan derivat kumarina. Harmin je glavni predstavnik skupine β -karbolina koji pokazuju širok spektar djelovanja. Za ovaj rad najvažnije antimalarijsko djelovanje posljedica je inhibicije Hsp90 kod vrsta roda *Plasmodium* čime se sprječava razvoj parazita te širenje infekcije (Bayih i sur., 2016). Zbog navedenog mehanizma djelovanja pretpostavlja se da bi β -karbolini mogli ostvariti sinergistički učinak s ostalim antimalaricima na koje postoji razvijena rezistencija, stoga su zanimljiv izbor za razvoj novih antimalarijskih lijekova (Bayih i sur., 2016). S druge strane, kumarin i njegovi derivati također pokazuju antimalarijsko djelovanje temeljeno na inhibiciji DNA giraze spomenutog parazita (Yadav i sur., 2018).

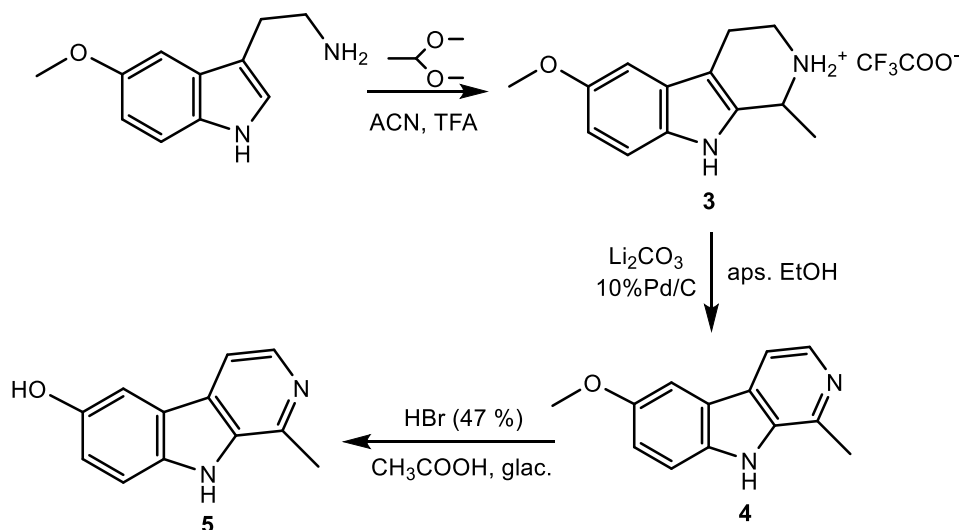
Sinteza novih hibrida harmina i kumarina započinje prevođenjem derivata kumarina u 4-azidokumarine (Shema 3). Reakcija se odvija u dva koraka. U prvom reakcijskom koraku mehanizmom nukleofilne supstitucije derivati 4-hidroksikumarina prevedeni su u 4-klorkumarine **1a-c** refluksiranjem u fosforovom (V) oksikloridu uz bazu trietilamin. Dobiveni 4-klorkumarini S_N2 reakcijskim mehanizmom pri sobnoj temperaturi dodatkom natrijevog azida u suhom DMF-u prevedeni su u konačne produkte azide **2a-c** koji su upotrijebljeni kao jedan od građevnih elemenata u Huisgenovoj reakciji cikloadicije. Sintetski postupak za sintezu 4-azidokumarina **2a-c** preuzet je iz rada (Zhao i sur., 2019).



Shema 3. Sinteza azida

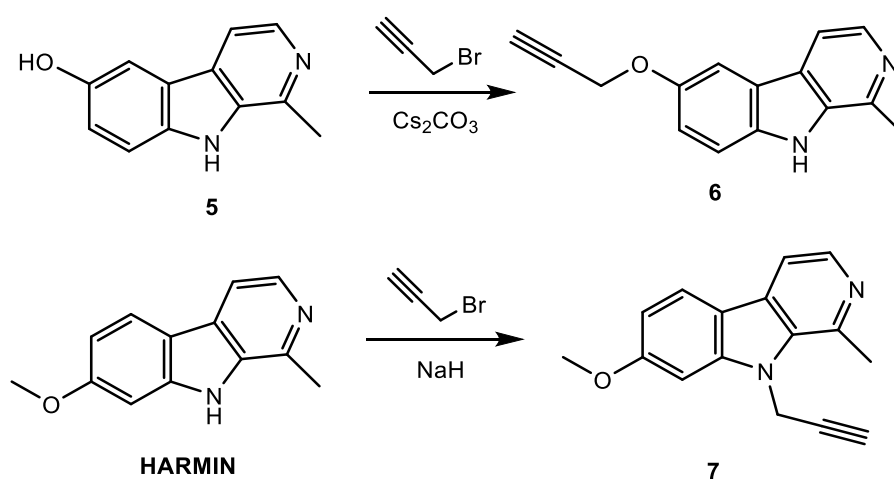
Nakon sinteze azida kumarina slijedi sinteza alkinilnih derivata harmina: *O*-propargiliranog β -karbolina na položaju 6 fenola **5** te *N*-propargiliranog harmina **7** koji je supstituiran na položaju 9 β -karbolinskog prstena. Propargilirani derivati harmina predstavljaju drugu vrstu građevnih elemenata u Huisgenovoj reakciji cikloadicije.

Fenol **5** sintetiziran je u tri reakcijska koraka prema prethodno objavljenom postupku (Shema 4) (Marinović i sur., 2021). Najprije je Pictet-Spenglerovom reakcijom sintetiziran tetrahidroksi- β -karbolin **3** iz 5-metoksitriptamina i ADMA. Dobiveni spoj zatim je u mikrovalnom reaktoru aromatiziran uz katalizator 10 % Pd/C do β -karbolina **4** koji na položaju 6 ima metoksi skupinu. U reakciji je korištena baza Li_2CO_3 jer je β -karbolin **3** bio u obliku soli. U zadnjem reakcijskom koraku fenol **5** je dobiven *O*-demetilacijom β -karbolina **4** uz HBr (47 %) i ledenu octenu kiselinu. Mehanizam reakcije je nukleofilna supstitucija kod koje se u prvom koraku protonira kisikov atom, a time nastaju povoljni uvjeti koji omogućavaju cijepanje eterske veze te vezanje metilne skupine na bromid. Zbog prisutnosti fenola **5** u obliku soli pri kiselim uvjetima potrebno je podesiti pH otopine do 9 dodatkom natrijeve lužine kako bi fenol prešao u oblik baze i postao topljiv u organskom otapalu. Ekstrakcijom etil-acetatom fenol će prijeći u organski sloj.



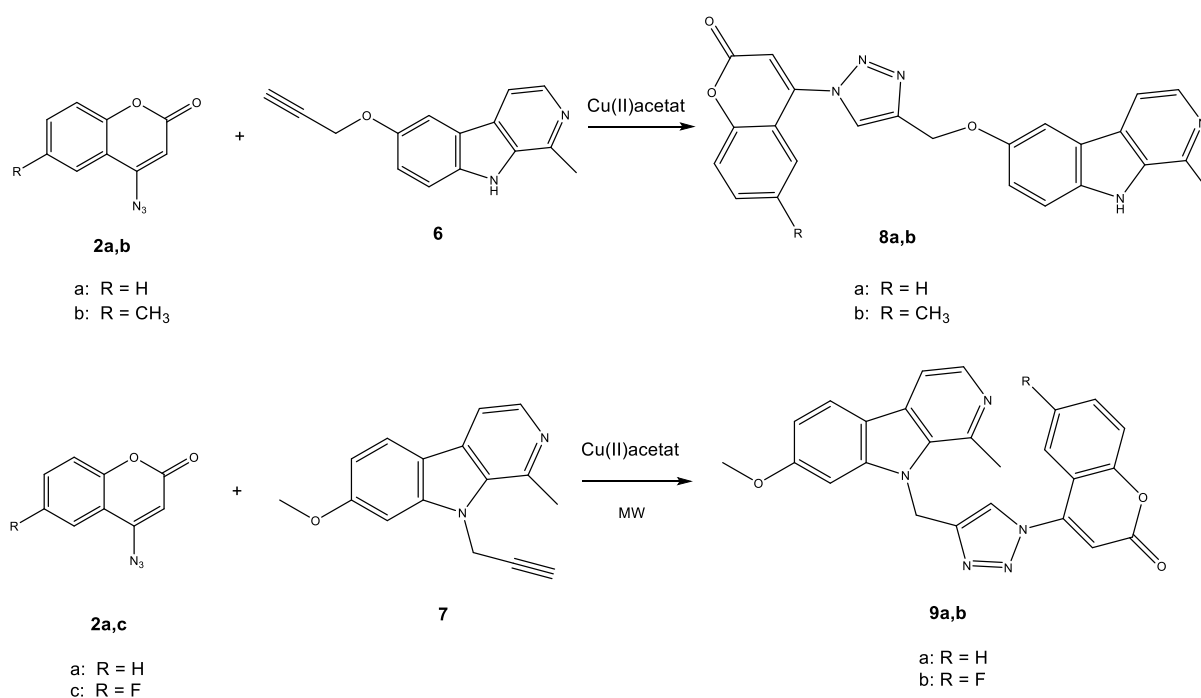
Shema 4. Sinteza fenola **5**

Harmin i fenol **5** prevedeni su Williamsonovom sintezom u alchine uz propargil-bromid (Shema 5). Dodatkom baze dolazi do deprotoniranja alkohola i nastajanja alkoksidnog intermedijera. Zbog bolje nukleofilnosti dobivenog intermedijera u odnosu na alkohol, ukupna reakcija i napad na propargil-bromid (alkilirajući reagens) u reakciji nukleofilne supstitucije čiji je produkt eter odvijali su se brže (Williamson, 1852). U reakciji s harminom kao baza korišten je natrijev hidrid, a alkilacija se odvijala na atomu dušika jer je zbog manje elektronegativnosti nukleofilniji od atoma kisika. Kako bi se, u slučaju harmola, reakcija odvila na atomu kisika, kao baza je korišten cezijev karbonat. Obje reakcijske smjese propuhane su argonom i reakcija se provodila u inertnoj atmosferi. Na taj način reakcijske smjese bile su zaštićene od oksidativnog učinka kisika iz zraka. Produkti **6** i **7** pročišćeni su kromatografijom na koloni i rastrižani u eteru, a predstavljaju drugi građevni element Huisgenove cikloadicije.



Shema 5. Propargiliranje fenola **5** i harmina

Konačni produkti sintetizirani su Huisgenovom reakcijom 1,3-dipolarne cikloadicije katalizirane Cu(I) u kojoj kao reaktanti sudjeluju spojevi u obliku azida **2a-c** i alkina **6** i **7**. Reakcije za dobivanje spojeva **8a-b** i **9a** odvijale su se na sobnoj temperaturi te su trajale 1–2 dana, dok se reakcija za dobivanje spoja **9b** odvijala u mikrovalnom reaktoru (75 W, 70 °C) 40 minuta. Produkti su zatim pročišćeni kromatografijom na koloni uz aluminijev oksid čija je uloga bila zadržati bakrove ione. Shema 6 prikazuje završni korak sinteze ciljnih produkata.

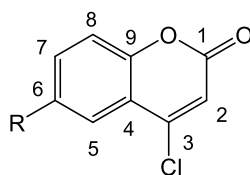


Shema 6. Sinteza novih derivata harmina

Tijek reakcija i čistoća produkata praćeni su tankoslojnom kromatografijom, a novi spojevi karakterizirani su analitičkim i spektroskopskim metodama (talište, IR, ¹H i ¹³C NMR, MS). Prisutnost triazolskog prstena u novosintetiziranim spojevima potvrđena je pojavom novog pika u ¹H NMR spektru na 8,5–9,0 ppm koji potječe od vodika prisutnog u prstenu.

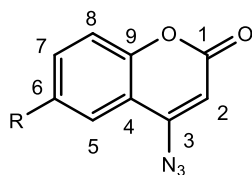
Analitički i spektroskopski podaci spojeva koji su sintetizirani u okviru ovog rada prikazani su u tablicama 1–5, a spektri svih spojeva u poglavlju Prilozi.

Tablica 1. Analitički i spektroskopski podaci te kemijski pomaci za spojeve u ^1H i ^{13}C NMR spektrima 4-klorokumarina **1a-c**.



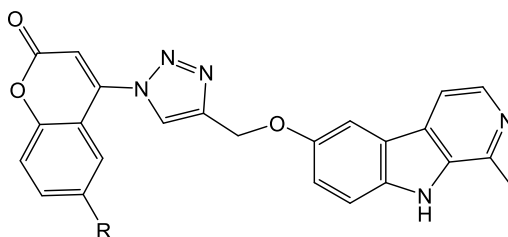
Spoj	1a	1b	1c
R	H	CH ₃	F
Molekulska formula	C ₉ H ₅ O ₂ Cl	C ₁₀ H ₈ O ₂ Cl	C ₉ H ₄ O ₂ FCl
M_r	180,58	194,61	198,58
ESI-MS	-	195,2 (M+1) ⁺	-
^1H NMR (DMSO-<i>d</i>₆, δ ppm, J/Hz)	7.91-7.89 (dd, 1H, 5, $J = 1.49, 7.90$ Hz), 7.77-7.73 (m, 1H, 7), 7.51-7.46 (m, 2H, 6, 8), 6.95 (s, 1H, 2)	7.67 (s, 1H, 5), 7.57-7.55 (dd, 1H, 7, $J = 2.08, 8.43$ Hz), 7.40-7.38 (d, 1H, 8, $J = 8.43$ Hz), 6.90 (s, 1H, 2), 2.42 (s, 3H, 10)	7.71-7.62 (m, 2H, 5, 8), 7.59-7.56 (dd, 1H, 7, $J = 4.6, 9.1$ Hz), 7.03 (s, 1H, 2)
^{13}C NMR (DMSO-<i>d</i>₆, δ ppm, J/Hz)	158.29 (1), 152.45 (9), 148.33 (3), 133.63 (7), 125.20, 125.12 (5, 6), 117.43 (4), 116.79 (8), 115.74 (2)	158.41 (1), 150.61 (9), 148.38 (3), 134.61 (6), 134.46 (7), 124.70 (5), 117.09 (4), 116.61 (8), 115.58 (2), 20.30 (10)	159.52-157.12 (d, 6, $J_1 = 247.69$ Hz), 158.09 (1), 148.85 (3), 147.27 (9), 121.02-120.78 (d, 7, $J_2 = 23.75$ Hz), 119.10-119.01 (d, 8, $J_3 = 7.12$ Hz), 118.74-118.65 (d, 4, $J_3 = 9.3$ Hz), 116.81 (2), 111.02-110.76 (d, 5, $J_2 = 30.08$ Hz)

Tablica 2. Analitički i spektroskopski podaci te kemijski pomaci u ^1H i ^{13}C NMR spektrima 4-azidokumarina **2a-c**.



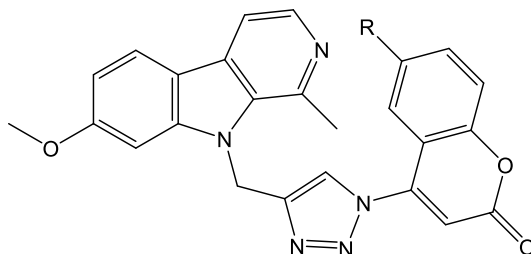
Spoj	2a	2b	2c
R	H	$^{10}\text{CH}_3$	F
Molekulska formula	$\text{C}_9\text{H}_5\text{O}_2\text{N}_3$	$\text{C}_{10}\text{H}_8\text{O}_2\text{N}_3$	$\text{C}_9\text{H}_4\text{O}_2\text{N}_3\text{F}$
M_r	187,17	201,19	205,15
IR (cm⁻¹)	-	3053, 2299, 2253, 2183, 2121, 1769, 1692, 1600, 1564, 1488, 1423, 1371, 1319, 1252, 1187, 1150, 1024, 942, 917, 864, 832, 749, 718, 674, 617, 528	3062, 2165, 2128, 1705, 1613, 1567, 1491, 1441, 1372, 1327, 1254, 1219, 1134, 1022, 946, 873, 831, 773, 716, 677, 619, 588, 537
^1H NMR (DMSO-<i>d</i>₆, δ ppm, <i>J</i>/Hz)	7,73-7,68 (m, 2H, 5, 7), 7,46-7,44 (dd, 1H, 8, <i>J</i> = 0,92, 8,01 Hz), 7,41-7,37 (td, 1H, 6, <i>J</i> = 1,06, 7,73, 7,83 Hz), 6,43 (s, 1H, 2)	7,52-7,49 (s+d, 2H, 5, 7), 7,35-7,33 (d, 1H, 8, <i>J</i> = 8,26 Hz), 6,39 (s, 1H, 2), 2,37 (s, 3H, 10)	7,62-7,50 (m, 2H, 5, 8), 7,47-7,44 (dd, 1H, 7, <i>J</i> = 2,9, 8,7 Hz), 6,52 (s, 1H, 2)
^{13}C NMR (DMSO-<i>d</i>₆, δ ppm, <i>J</i>/Hz)	159,75 (1), 153,00 (9), 152,77 (3), 133,36 (7), 124,57 (5), 123,19 (6), 116,69 (8), 114,56 (4), 100,77 (2)	159,88 (1), 152,66 (9), 151,15 (3), 134,18 (7), 133,92 (6), 122,71 (5), 116,47 (8), 114,23 (4), 100,69 (2), 20,29 (10)	159,54 (1), 159,21-156,81 (d, 6, <i>J</i> ₁ = 238,1 Hz), 151,93 (9), 149,39 (3), 120,79-120,54 (d, 7, <i>J</i> ₂ = 22,33 Hz), 118,95-118,86 (d, 8, <i>J</i> ₃ = 9,57 Hz), 115,65-115,56 (d, 4, <i>J</i> ₃ = 9,57 Hz), 108,90-108,64 (d, 5, <i>J</i> ₂ = 24,61 Hz), 101,73 (2)

Tablica 3. Analitički i spektroskopski podaci *O*-supstituiranih triazolskih derivata harmina **8a-b**.



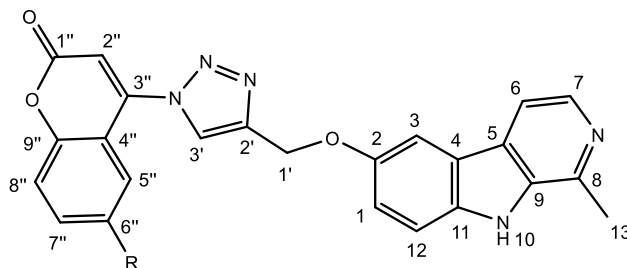
Spoj	8a	8b
R	H	CH ₃
<i>t_i</i> (°C)	235,5–238,0	235,0–242,0
Molekulska formula	C ₂₄ H ₁₇ O ₃ N ₅	C ₂₅ H ₁₉ O ₃ N ₅
<i>M_r</i>	423,13	437,46
IR (cm⁻¹)	3349, 3035, 1726, 1606, 1572, 1499, 1443, 1391, 1360, 1291, 1256, 1202, 1133, 1106, 1037, 1003, 944, 862, 808, 765, 701, 650, 616, 524	3340, 3036, 1725, 1623, 1572, 1499, 1465, 1405, 1378, 1282, 1256, 1199, 1132, 1105, 1040, 1009, 945, 864, 807, 701, 610, 528
ESI-MS (<i>m/z</i>)	424,1 (M+1) ⁺	438,1 (M+1) ⁺

Tablica 4. Analitički i spektroskopski podaci *N*-supstituiranih triazolskih derivata harmina **9a-b**.



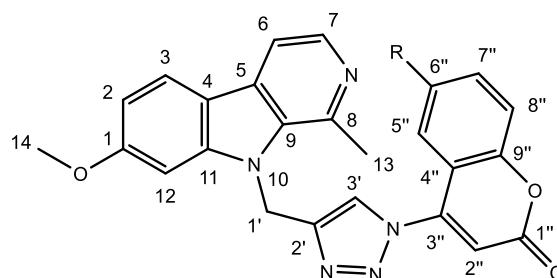
Spoj	9a	9b
R	H	F
t_f (°C)	239,0–243,5	235,0–237,0
Molekulska formula	C ₂₅ H ₁₉ O ₃ N ₅	C ₂₅ H ₁₈ O ₃ N ₅ F
M_r	437,46	455,45
IR (cm⁻¹)	3144, 3086, 3062, 2837, 1760, 1717, 1622, 1564, 1494, 1439, 1406, 1349, 1237, 1167, 1104, 1041, 948, 870, 813, 768, 646	3441, 3127, 3072, 2955, 2836, 1728, 1628, 1574, 1490, 1461, 1440, 1406, 1348, 1301, 1256, 1235, 1197, 1163, 1041, 1025, 1008, 945, 887, 827, 728, 714, 611, 523
ESI-MS (<i>m/z</i>)	438,1 (M+1) ⁺	456,1 (M+1) ⁺

Tablica 5. Kemijski pomaci u ^1H i ^{13}C NMR spektrima *O*-supstituiranih triazolskih derivata harmina **8a-b**.



Spoj	8a	8b
R	H	$^{10''}\text{CH}_3$
^1H NMR (DMSO- d_6 , δ ppm, J/Hz)	11,43 (s, 1H, 10), 8,99 (s, 1H, 3'), 8,19-8,18 (d, 1H, 7, $J = 5,33$ Hz), 7,98 (s, 1H, 3), 7,94-7,92 (d, 1H, 6, $J = 5,32$ Hz), 7,84-7,76 (m, 2H, 5'', 7''), 7,60-7,53 (m, 2H, 12, 8''), 7,43-7,41 (t, 1H, 6'', $J = 7,69$ Hz), 7,31-7,28 (dd, 1H, 1, $J = 2,45, 8,85$ Hz), 7,00 (s, 1H, 2''), 5,40 (s, 2H, 1'), 2,75 (s, 3H, 13)	11,42 (s, 1H, 10), 8,97 (s, 1H, 3'), 8,18-8,17 (d, 1H, 7, $J = 5,28$ Hz), 7,98 (s, 1H, 3), 7,93-7,92 (d, 1H, 6, $J = 5,31$ Hz), 7,60-7,48 (m, 4H, 12, 5'', 7'', 8''), 7,31-7,28 (dd, 1H, 1, $J = 2,45, 8,84$ Hz), 6,95 (s, 1H, 2''), 5,40 (s, 1H, 1'), 2,75 (s, 3H, 13), 2,34 (s, 3H, 10'')
^{13}C NMR (DMSO- d_6 , δ ppm)	159,47 (1''), 153,66 (3''), 151,87 (2), 145,91 (9''), 143,89 (2'), 142,23 (8), 136,91 (7), 135,60 (11), 135,10 (9), 133,47 (7''), 126,75 (4), 126,37 (3'), 125,47 (5''), 124,98 (6''), 121,37 (5), 118,46 (6), 117,19 (8''), 114,36 (4''), 112,85 (1, 12), 110,66 (2''), 105,33 (3), 61,62 (1'), 20,36 (13)	159,57 (1''), 151,85 (2), 145,91 (9''), 143,87 (2'), 142,23 (8), 136,94 (7), 135,58 (11), 135,11 (9), 134,41 (6''), 134,35 (7''), 126,74 (4), 126,38 (3'), 124,80 (5''), 121,38 (5), 118,42 (6), 117,00 (8''), 114,08 (4), 112,85, 112,72 (1, 12), 110,71 (2''), 105,29 (3), 61,60 (1'), 20,41, 20,37 (13, 10'')

Tablica 6. Kemijski pomaci u ^1H i ^{13}C NMR spektrima *N*-supstituiranih triazolskih derivata harmina **9a-b**.



Spoj	9a	9b
R	H	F
^1H NMR (DMSO- d_6 , δ ppm, J/Hz)	8,78 (s, 1H, 7), 8,21 (br, s, 1H, 7), 8,12-8,10 (d, 1H, 3, $J = 8,60$ Hz), 7,91-7,90 (d, 1H, 6, $J = 4,71$ Hz), 7,76-7,72 (m, 2H, 5'', 7''), 7,56-7,53 (dd, 1H, 8'', $J = 0,95, 8,70$ Hz), 7,41-7,37 (m, 2H, 12, 6''), 6,92-6,89 (m, 2H, 2, 2''), 6,03 (s, 2H, 1'), 3,92 (s, 3H, 14), 3,10 (s, 3H, 13)	8,81 (s, 1H, 3'), 8,21-8,20 (d, 1H, 7, $J = 5,18$ Hz), 8,12-8,11 (d, 1H, 3, $J = 8,60$ Hz), 7,92-7,91 (d, 1H, 6, $J = 5,17$ Hz), 7,65-7,61 (m, 3H, 5'', 7'', 8''), 7,39 (s, 1H, 12), 7,01 (s, 1H, 2''), 6,92-6,90 (dd, 1H, 2, $J = 2,17, 8,56$ Hz), 6,03 (s, 2H, 1'), 3,91 (s, 3H, 14), 3,09 (s, 3H, 13)
^{13}C NMR (DMSO- d_6 , δ ppm, J/Hz)	160,62 (1), 159,41 (1''), 153,57 (3''), 145,69 (9''), 144,74 (8), 142,72 (11), 141,18 (9), 138,13 (7), 133,37 (7''), 128,63 (5), 125,40 (3'), 124,90 (5'', 6''), 122,40 (3), 117,13 (8''), 114,52, 114,36 (4, 4''), 112,34 (6), 110,71 (2''), 109,47 (2), 94,16 (12), 55,66 (14), 23,30 (13)	160,62 (1''), 159,24 (1), 158,79-157,19 (d, 6'', $J_1 = 235,40$ Hz), 150,02 (3''), 144,92, 144,75 (2', 9''), 142,70 (8), 141,15 (11), 138,18 (7), 134,73 (9), 128,63 (5), 124,77 (3'), 122,40 (3), 120,80-120,63 (d, 7'', $J_2 = 29,19$ Hz), 119,31-119,25 (d, 8'', $J_3 = 8,63$ Hz), 115,24-115,18 (d, 4'', $J_3 = 10,88$ Hz), 114,52 (4), 112,30 (6), 111,41-111,24 (d, 5'', $J_2 = 24,99$ Hz), 111,24 (2), 109,46 (2''), 94,14 (12), 55,65 (14), 23,27 (13)

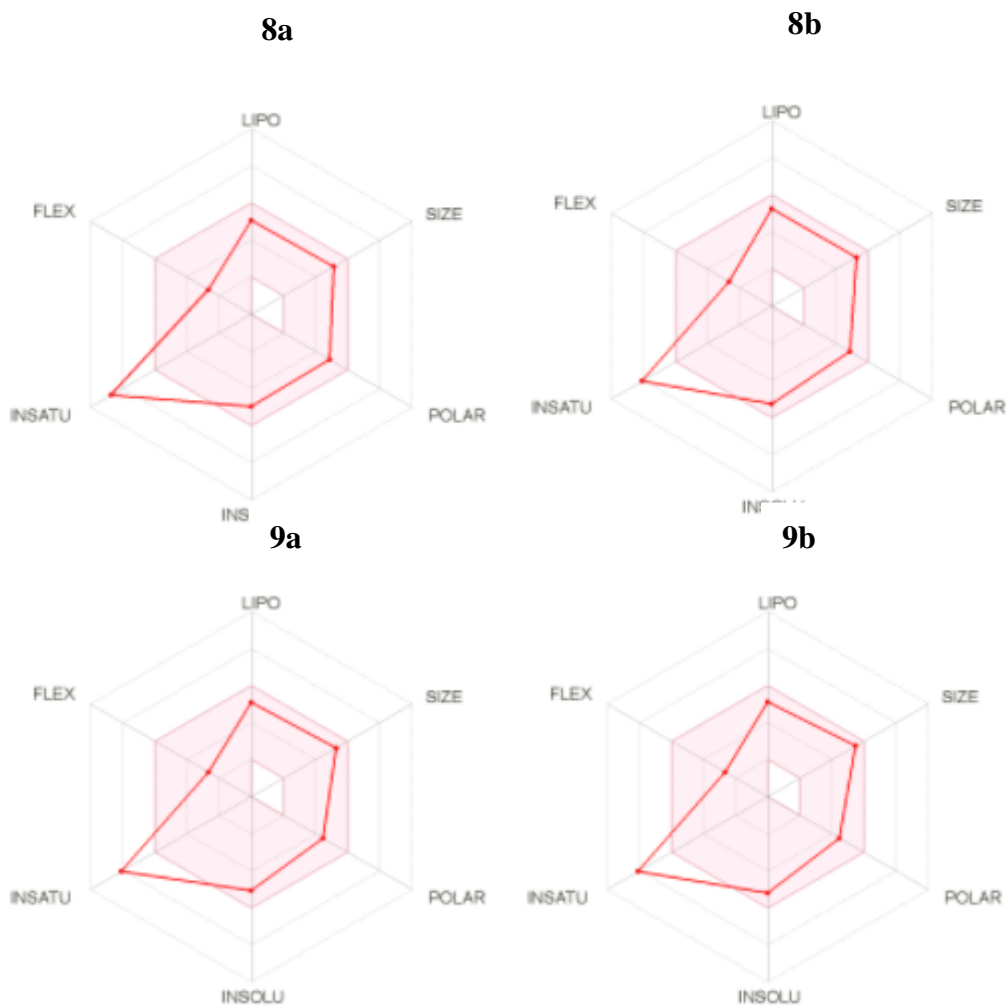
U svrhu predviđanja farmakokinetičkih karakteristika molekula i određivanja vrijednosti fizičko-kemijskih deskriptora upotrijebljene su besplatne *web aplikacije* SwissADME i Chemicalize (chemicalize.com; www.swissadme.ch). Oralna bioraspoloživost jedno je od najvažnijih farmakokinetičkih svojstava koje novოსintetizirana molekula mora zadovoljiti. Više je različitih algoritama koji na temelju fizičko-kemijskih parametara predviđaju oralnu bioraspoloživost molekule, no najpoznatiji od njih zasigurno su Lipinskijeva te Veberova pravila. Da bi molekula imala zadovoljavajuću oralnu bioraspoloživost, prema Lipinskiju, mora imati relativnu molekulsku masu manju od 500, broj donora vodikovih veza manji od 6, broj akceptora vodikovih veza maksimalno 10 te logaritam partijskog koeficijenta ($\log P$) manji od 5 (Lipinski i sur., 1997). Da bi se postigla zadovoljavajuća oralna bioraspoloživost prema Veberu, molekula ne smije imati više od 10 rotirajućih veza, polarnost površine određena zbrojem akceptora i donora vodikovih veza ne smije biti veća od 12, a topološka ploština zone polarne površine (TPSA) mora biti manja od 120 \AA^2 (Veber i sur., 2002). Parametri koji su izračunati za spojeve **8a-b** i **9a-b** prikazani su u Tablici 6.

Tablica 7. Pregled parametara izračunatih putem web aplikacije Chemicalize (chemicalize.com).

Spoj	8a	8b	9a	9b
Molekulska formula	$C_{24}H_{17}N_5O_3$	$C_{25}H_{19}N_5O_3$	$C_{25}H_{19}N_5O_3$	$C_{25}H_{18}N_5O_3F$
M_r	423,13	437,46	437,46	455,45
$\log P$	3,42	3,71	3,48	3,79
Broj donora vodikove veze	1	1	0	0
Broj akceptora vodikove veze	6	6	6	7
Zbroj donora i akceptora vodikovih veza	7	7	6	7
Broj rotirajućih veza	4	4	4	4
TPSA ^a (\AA^2)	98,83	98,83	87,97	87,97
Lipinskijeva pravila	4/4	4/4	4/4	4/4
Veberova pravila	3/3	3/3	3/3	3/3

Iz podataka prikazanih u Tablici 6 zaključuje se da spojevi kandidati zadovoljavaju Lipinskijeva i Veberova pravila, stoga bi se mogla očekivati dobra oralna bioraspoloživost istih.

SwissADME u obliku šesterokuta stvara jedinstveni grafički prikaz na temelju izračunatih parametara koji utječu na oralnu bioraspoloživost, a taj grafički prikaz naziva se *Bioavailability radar* (Slika 5) (Daina i sur., 2017).

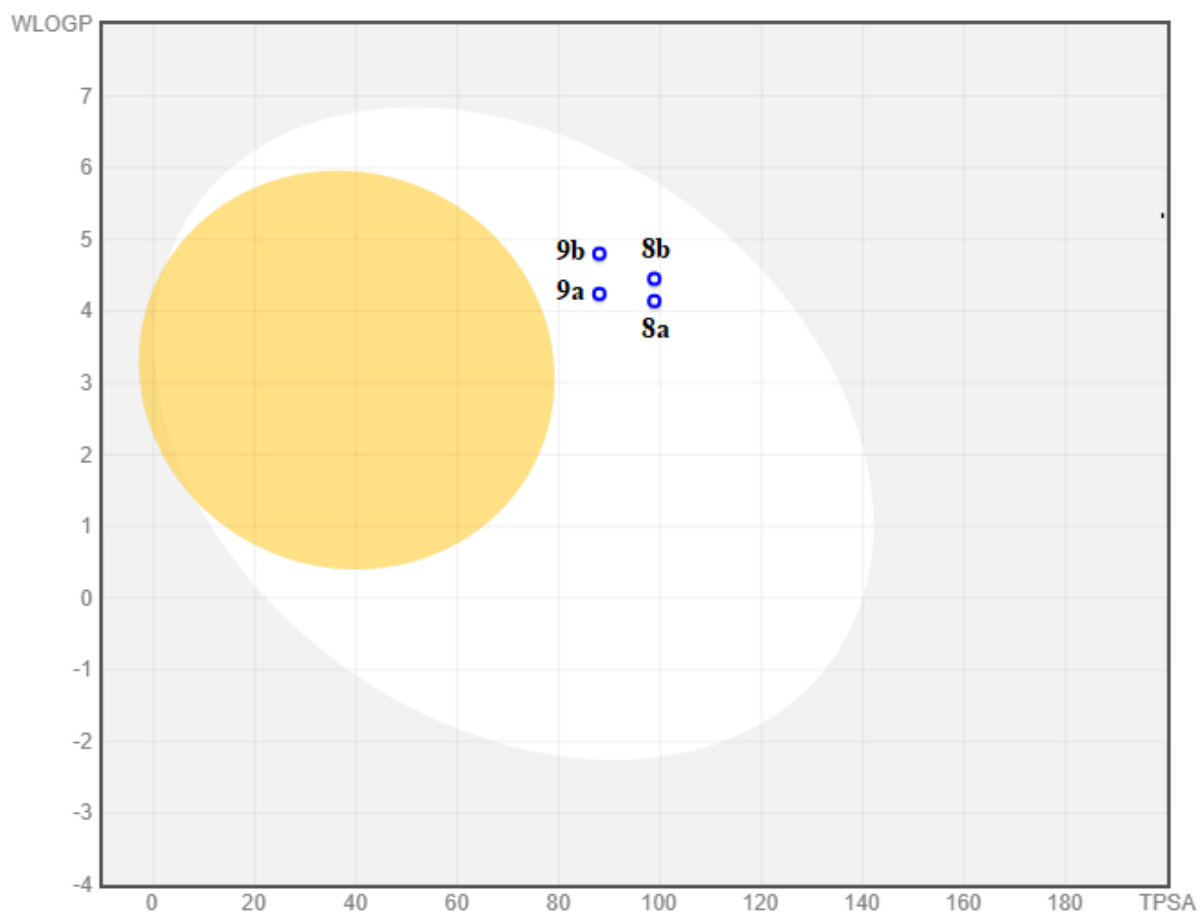


Slika 5. *Bioavailability radar* novosintetiziranih derivata harmina **8a-b** i **9a-b** (preuzeto s <http://www.swissadme.ch/>)

Ružičasto obojeno polje označava optimalan raspon vrijednosti za svaki parametar te pozitivno korelira s oralnom bioraspoloživošću, a svaki kut šesterokuta predstavlja jedan parametar. Parametar lipofilnosti molekule (LIPO) kvantificiran je vrijednošću $\log P$ izračunatog korištenjem programa XLOGP 3.2.2 i mora zadovoljiti vrijednosti između -0,7 i +5,0. Veličina molekule (SIZE) kvantificirana je vrijednošću molekulske mase koja mora biti između 150 i 500 g mol⁻¹. Polarnost molekule (POLAR) kvantificirana je vrijednošću TPSA koja mora biti u rasponu od 20 do 130 Å². Parametar netopljivosti molekule (INSOLU) kvantificiran je negativnom vrijednošću logaritma molarne topljivosti koja ne smije biti veća od 6, a izračunata je topološkom metodom Delaneyja ($\log S$). Parametar (INSATU) opisuje nezasićenost molekule koja je kvantificirana udjelom sp^3 hibridiziranih ugljikovih atoma u ukupnom broju atoma ugljika i njegova vrijednost ne smije biti niža od 0,25. Fleksibilnost molekule (FLEX) kvantificirana je brojem rotirajućih veza kojih ne smije biti više od 9 (Daina i sur., 2017).

Iz podataka prikazanih na Slici 5 vidljivo je da su svi novosintetizirani spojevi unutar optimalnog područja za 5 od 6 parametara. Parametar koji ne zadovoljava jer nije unutar optimalnog područja, a opisuje nezasićenost molekule, iznosi 0,08 za spoj **8a**, a 0,12 za spojeve **8b** i **9a-b**.

Boiled EGG model grafički je prikaz koji na temelju strukture molekule predviđa njene farmakokinetičke parametre, a stvoren je na web stranici SwissADME kao i prethodno spomenuti *Bioavailability radar*. U ovom grafičkom prikazu (Slika 6) molekule su označene plavim ili crvenim točkama. Plavom bojom program označava molekule koje su supstrati P-glikoproteina, a crvenom molekule koje nisu supstrati istog. P-glikoprotein prisutan je u endotelnim stanicama krvno-moždane barijere te epitelnim stanicama u gastrointestinalnom traktu, a obnaša ulogu efluksne pumpe (Fu, 2013). Informacija o tome je li molekula supstrat P-glikoproteina ili ne bitna je za procjenu mogućnosti prolaska molekule kroz gastrointestinalnu stijenku i krvno-moždanu barijeru. Molekuli koja se nalazi unutar bijelog polja na grafičkom prikazu predviđena je pasivna apsorpcija u GIT-u, dok se molekuli unutar žutog polja predviđa prolazak kroz krvno-moždanu barijeru (Daina i sur., 2017).



Slika 6. Boiled EGG model novosintetiziranih derivata harmina **8a-b** i **9a-b** (preuzeto s <http://www.swissadme.ch/>)

Iz podataka prikazanih na modelu *Boiled EGG* na Slici 6 može se zaključiti da su svi spojevi supstrati P-glikoproteina te će se prema predviđanjima pasivno apsorbirati kroz gastrointestinalnu stijenku, dok nijedan spoj neće prelaziti krvno-moždanu barijeru.

5. ZAKLJUČAK

U ovom radu opisana je sinteza novih 1,2,3-triazolskih hibrida harmina i kumarina. Sinteza i karakterizacija spojeva provedena je u sklopu istraživanja derivata harmina kao potencijalnih antimalarijskih lijekova koje se provodi na Zavodu za farmaceutsku kemiju Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Sintetizirani su i karakterizirani sljedeći spojevi koji do sada nisu bili opisani u literaturi:

- 4-(4-(((1-metil-9*H*-pirido[3,4-*b*]indol-6-il)oksi)metil)-1*H*-1,2,3-triazol-1-il)-2*H*-kromen-1-ona (**8a**),
- 6-metil-4-(4-(((1-metil-9*H*-pirido[3,4-*b*]indol-6-il)oksi)metil)-1*H*-1,2,3-triazol-1-il)-2*H*-kromen-2-ona (**8b**),
- 4-(4-((7-metoksi-1-metil-9*H*-pirido[3,4-*b*]indol-9-il)metil)-1*H*-1,2,3-triazol-1-il)-2*H*-kromen-2-ona (**9a**) i
- 6-fluor-4-(4-((7-metoksi-1-metil-9*H*-pirido[3,4-*b*]indol-9-il)metil)-1*H*-1,2,3-triazol-1-il)-2*H*-kromen-2-ona (**9b**).

Također su sintetizirani i spojevi koji su služili kao građevni elementi u sintezi ciljnih spojeva **8a-b** i **9a-b**, a to su kumarinskih azidi **2a-c** te *O*- i *N*-supstituirani propargilirani derivati harmina i fenola **5 – 6** i **7**. Fenol **5** je sintetiziran iz 5-metoksitriptamina.

Strukture svih novosintetiziranih spojeva potvrđene su uobičajenim analitičkim i spektroskopskim metodama (IR, ¹H i ¹³C NMR, MS), a spojevima je određena i temperatura tališta.

Ciljnim produktima **8a-b** i **9a-b** računski je opisana mogućnost oralne bioraspoloživosti pomoću nekoliko strukturnih parametara koji ujedno opisuju fizičko-kemijska svojstva istih.

Novosintetiziranim spojevima biološko djelovanje bit će ispitano u daljnjim istraživanjima koja prelaze okvire ovog rada.

6. LITERATURA

- Ang KKH, Holmes MJ, Higa T, Hamann MT, Kara UAK. In vivo antimalarial activity of the beta-carboline alkaloid manzamine A. *Antimicrob Agents Chemother*, 2000, 44, 1645-1649.
- Bayih AG, Folefoc A, Mohon AN, Eagon S, Anderson M, Pillai DR. In vitro and in vivo anti-malarial activity. *Malar J*, 2016, 15, 1-11.
- Bozorov K, Zhao J, Aisa HA. 1,2,3-Triazole-containing hybrids as leads in medicinal chemistry: A recent overview. *Bioorg Med Chem*, 2019, 27, 3511-3531.
- Cao R, Peng W, Wang Z, Xu A. β -Carboline alkaloids: biochemical and pharmacological functions. *Curr Med Chem*, 2007, 14, 479-500.
- Chemicalize, 2021., <https://chemicalize.com/welcome>, pristupljeno 21. 3. 2021.
- Chu XM, Wang C, Wang WL, Liang LL, Liu W, Gong KK, Sun KL. Triazole derivatives and their antiplasmodial and antimalarial activities. *Eur J Med Chem*, 2019, 166, 206-223.
- Daina A, Michielin O, Zoete V. SwissADME: a free web tool to evaluate pharmacokinetics, drug-likeness and medicinal chemistry friendliness of small molecules. *Sci Rep*, 7, 42717, 1-13.
- França PHB, Barbosa DP, da Silva DL, Ribeiro EAN, Santana AEG, Santos BVO, Barbosa-Filho JM, Quintans JSS, Barreto RSS, Quintans-Junior LJ, de Arujo-Junior JX. (2014.). Indole alkaloids from marine sources as potential leads against infectious diseases. *Biomed Res Int*, 2014, 375423, 1-12.
- Fu D. Where is it and how does it get there – intracellular localization and traffic of P-glycoprotein. *Front Oncol*, 2013, 3, 1-5.
- Girdwood SCT, Nenortas E, Shapiro TA. Targeting the gyrase of Plasmodium falciparum with topoisomerase poisons. *Biochem Pharmacol*, 2015, 95, 227-237.
- Gorki V, Walter NS, Singh R, Chauhan M, Dhingra N, Salunke DB, Kaur S. β -Carboline derivatives tackling malaria: biological evaluation and docking analysis. *ACS Omega*, 2020, 5, 17993-18006.
- Haldar K, Murphy SC, Milner DA, Taylor TE. Malaria: Mechanisms of erythrocytic infection and pathological correlates of severe disease. *Annu Rev Pathol*, 2007, 2, 217-249.
- Haldón E, Nicasio MC, Perez PJ. Copper-catalysed azide–alkyne cycloadditions. *Org Biomol Chem*, 2015, 13, 9528-9550.
- Hein CD, Liu XM, Wang D. Click chemistry, a powerful tool for pharmaceutical sciences. *Pharm Res*, 2008, 25, 2216-2230.

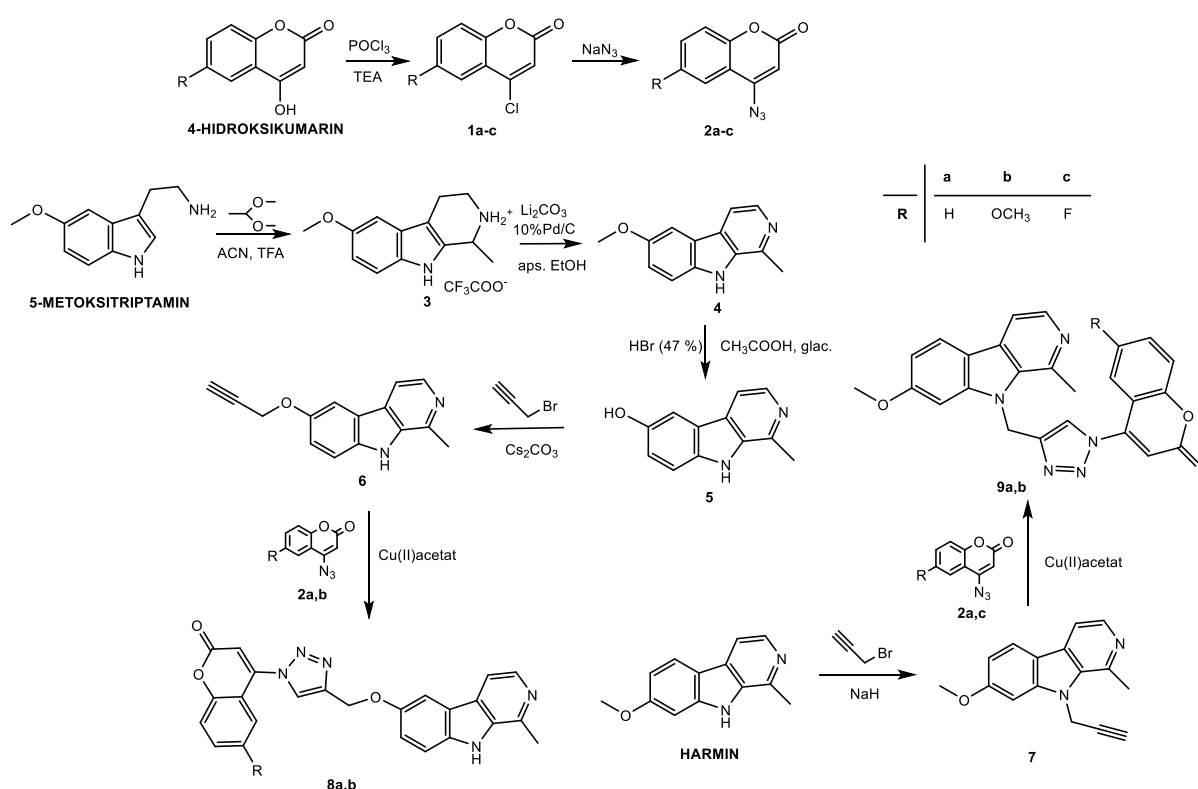
- Johansson JR, Beke-Somfai T, Stalsmede AS, Kann N. Ruthenium-catalyzed azide alkyne cycloaddition reaction: scope, mechanism, and applications. *Chem Rev*, 2016, 116, 14726-14768.
- Kukula-Koch WA, Widelski J. Alkaloids. U: Pharmacognosy. McCreath SB, Delgoda R, urednici, Massachusetts, Academic Press, 2017, str. 163-198.
- Lipinski CA, Lombardo F, Dominy BW, Feeney PJ. Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. *Adv Drug Delivery Rev*, 1997, 23, 3-25.
- Malaria site, 2018., <https://www.malariasite.com/malarial-fever/>, pristupljeno 21. 3. 2021.
- Marinović M, Poje G, Perković I, Fontinha D, Prudencio M, Held J, de Carvalho LP, Tandarić T, Vianello R, Rajić Z. Further investigation of harmicines as novel antiplasmodial agents: synthesis, structure-activity relationship and insight into the mechanism of action, 2021, *in preparation*
- Matos MJ, Santana L, Uriarte E, Abreu OA, Molina E, Yordi EG. Coumarins - an important class of phytochemicals. U: Phytochemicals - isolation, characterisation and role in human health. Rao AV, Rao LG, urednici, London, IntechOpen, 2015, str. 114-140.
- Nsanzabana C. Resistance to artemisinin combination therapies (ACTs): Do not forget the partner drug! *Trop Med Infect Dis*, 2019, 4, 1-11.
- Olomola TO, Klein R, Mautsa N, Sayed Y, Kaye PT. Synthesis and evaluation of coumarin derivatives as potential dual-action HIV-1 protease and reverse transcriptase inhibitors. *Bioorg Med Chem*, 2013, 21, 1964-1971.
- Piechowska P, Zawirska-Wojtasiak R, Mildner-Szkudlarz S. Bioactive β -Carbolines in food: a review. *Nutrients*, 2019, 11, 1-10.
- Reece RJ, Maxwell A. DNA gyrase: structure and function. *Crit Rev Biochem Mol Biol*, 1991, 26, 335-375.
- Sandhu S, Bansal Y, Silakari O, Bansal G. Coumarin hybrids as novel therapeutic agents. *Bioorg Med Chem*, 2014, 22, 3806-3814.
- Shaikh MH, Subhedar DD, Khan FAK, Sangshetti JN, Shingate BB. 1,2,3-Triazole incorporated coumarin derivatives as a potential antifungal and antioxidant agents. *Chin Chem Lett*, 2016, 27, 295-301.
- Shaveta SM, Singh P. Hybrid molecules: The privileged scaffolds for various pharmaceuticals. *Eur J Med Chem*, 2016, 124, 500-536.

- Shrestha L, Bolaender A, Patel HJ, Taldone T. Heat Shock Protein (HSP) Drug discovery and development: targeting heat shock proteins in Disease. *Curr Top Med Chem*, 2016, 16, 2753-2764.
- Singh B, Daneshvar C. Human infections and detection of Plasmodium knowlesi. *Clin Microbiol Rev*, 2013, 26, 165-184.
- SwissADME, 2021., <http://www.swissadme.ch/>, pristupljeno 21. 3. 2021.
- Veber DF, Johnson SR, Cheng HY, Smith BR, Ward KW, Kopple KD. Molecular properties that influence the oral bioavailability of drug candidates. *J Med Chem*, 2002, 45, 2615-2623.
- Wei H, Ruan J, Zhang X. Coumarin-chalcone hybrids: promising agents with diverse pharmacological properties. *RSC Adv*, 2016, 6, 10846-10860.
- Drug resistance in malaria, 2001, <https://www.who.int/csr/resources/publications/drugresist/malaria.pdf>, pristupljeno 2. 7. 2021.
- WHO Malaria, 2021., https://www.who.int/health-topics/malaria#tab=tab_1, pristupljeno 21. 3. 2021.
- Williamson A. On etherification. *Q J Chem Soc*, 1852, 4, 229-239.
- Yadav N, Agarwal D, Kumar S, Dixit AK, Gupta RD, Awasthi SK. In vitro antiplasmodial efficacy of synthetic coumarin-triazole analogs. *Eur J Med Chem*, 2018, 145, 735-745.
- Zhang L, Xu Z. Coumarin-containing hybrids and their anticancer activities. *Eur J Med Chem*, 2019, 181, 111587, 1-19.
- Zhao JW, Wu ZH, Guo JW, Huang MJ, You YZ, Liu HM, Huang LH. Synthesis and anti-gastric cancer activity evaluation of novel triazole. *Eur J Med Chem*, 2019, 181, 111520, 1-13.

7. SAŽETAK/SUMMARY

Sinteza i karakterizacija novih 1,2,3-triazolskih derivata harmina i kumarina

Ovaj rad dio je istraživanja provedenog na Zavodu za farmaceutsku kemiju Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu koji obuhvaća dizajn, sintezu te biološku evaluaciju derivata harmina s potencijalnim antimalarijskim djelovanjem. Cilj ovog rada bila je sinteza i karakterizacija novih 1,2,3-triazolskih hibrida harmina i kumarina. Sinteza je započeta prevođenjem derivata kumarina do odgovarajućih azida **2a-c** prema dolje navedenoj shemi. Harmin i fenol **5** dobiven iz 5-metoksitriptamina zatim su prevedeni u odgovarajuće alkine **6** i **7** u reakciji s propargil-bromidom. Bakar(I)-kataliziranom reakcijom alkin-azid cikloadicije u kojoj su početni reaktanti bili alkini **6** i **7** te azidi **2a-c** dobiveni su konačni produkti **8a-b** i **9a-b**.

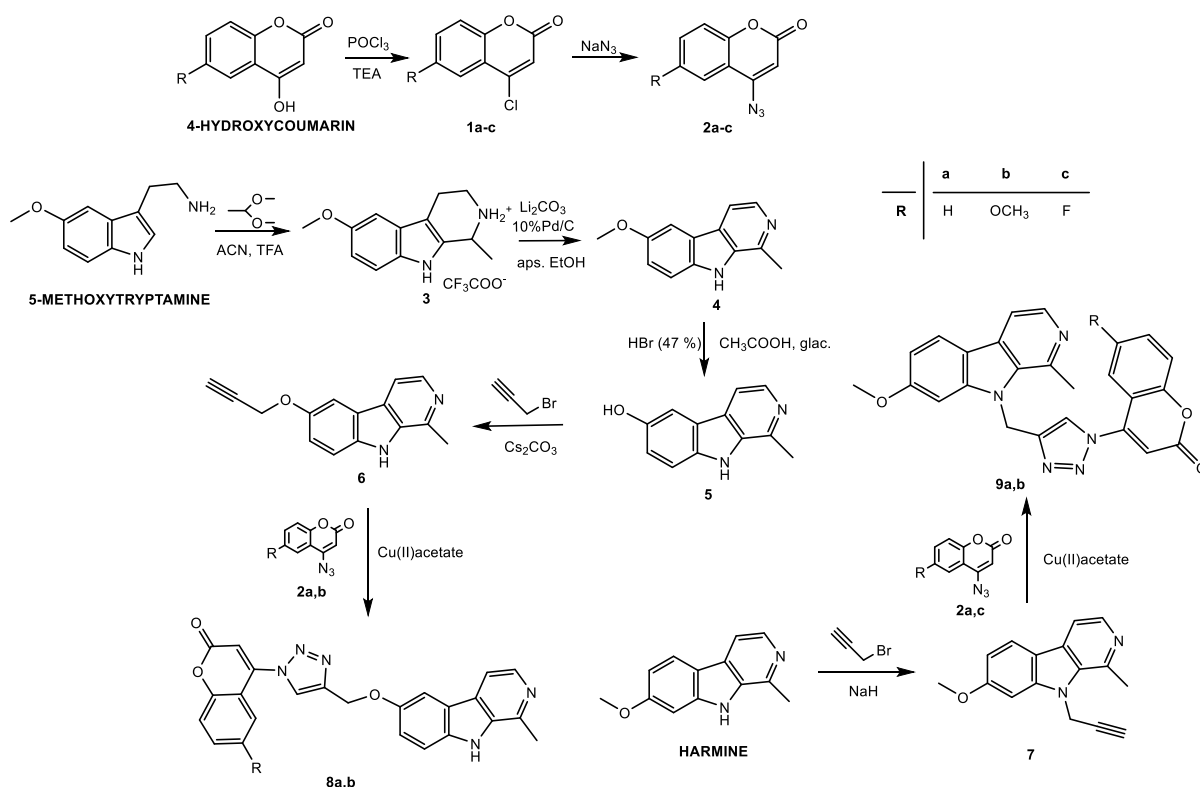


Strukture svih novosintetiziranih spojeva potvrđene su spektroskopskim metodama (IR, ^1H i ^{13}C NMR, MS) te im je određena temperatura tališta. Sva četiri konačna produkta zadovoljavaju Lipinskijeva i Veberova pravila, a web alat SwissADME im predviđa dobru oralnu bioraspodivnost. Biološko djelovanje novosintetiziranih derivata bit će ispitano u daljnjim istraživanjima.

Ključne riječi: harmin, kumarin, 1,2,3-triazol, sinteza, *click* kemija

Synthesis and characterization of novel harmine and coumarin 1,2,3-triazole derivatives

This paper is a part of ongoing research at the Department of Medicinal Chemistry, Faculty of Pharmacy and Biochemistry, University of Zagreb, which includes design, synthesis, and biological evaluation of novel harmine derivatives as potential antimalarial drugs. The aim of this diploma thesis was the synthesis and characterization of novel harmine 1,2,3-triazole derivatives comprising coumarin in their structure. Synthesis began with transformation of coumarin derivatives to azides **2a-c** shown in set out below scheme. Both harmine and phenol **5**, which was generated from 5-methoxytryptamine, were transformed into alkynes **6** and **7** in the reaction of alkylation using propargyl bromide. The copper(I)-catalyzed alkyne-azide cycloaddition, in which alkynes **6** and **7**, and coumarin derivatives **2a-c** were used, resulted in the formation of the final compounds **8a-b** (*O*-derivatives) and **9a-b** (*N*-derivatives).

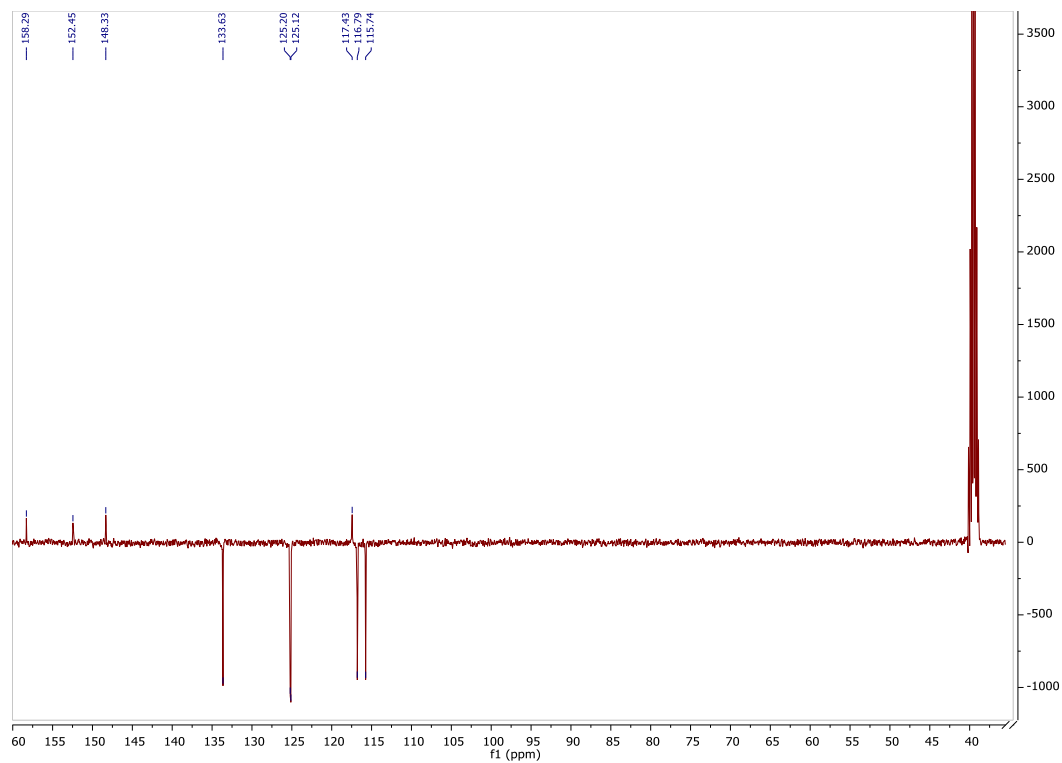
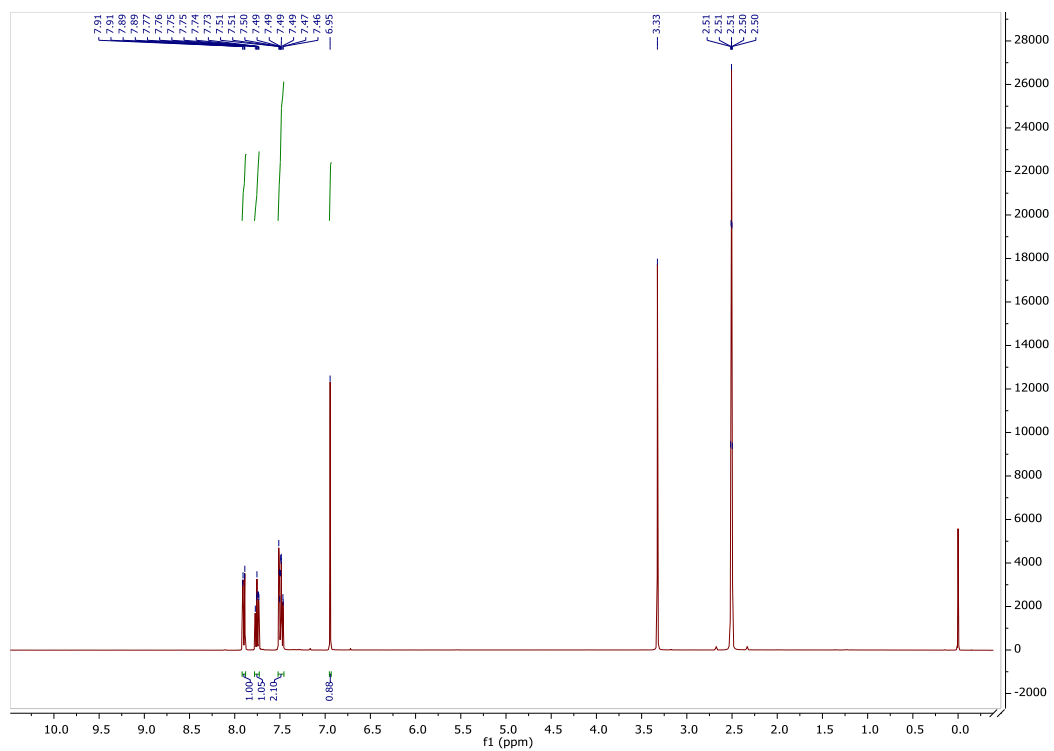
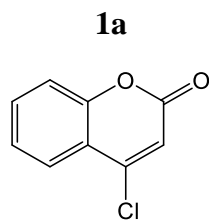


Structures of the newly synthesized compounds were confirmed using spectroscopic methods (IR, ^1H and ^{13}C NMR, MS), while melting points were determined for solid compounds. All four novel derivatives fulfill all the Lipinski's and Veber's criteria for good oral bioavailability of potential drugs. SwissADME web tool predicts good oral bioavailability as well. Biological activity of the newly synthesized compounds will be examined in further studies.

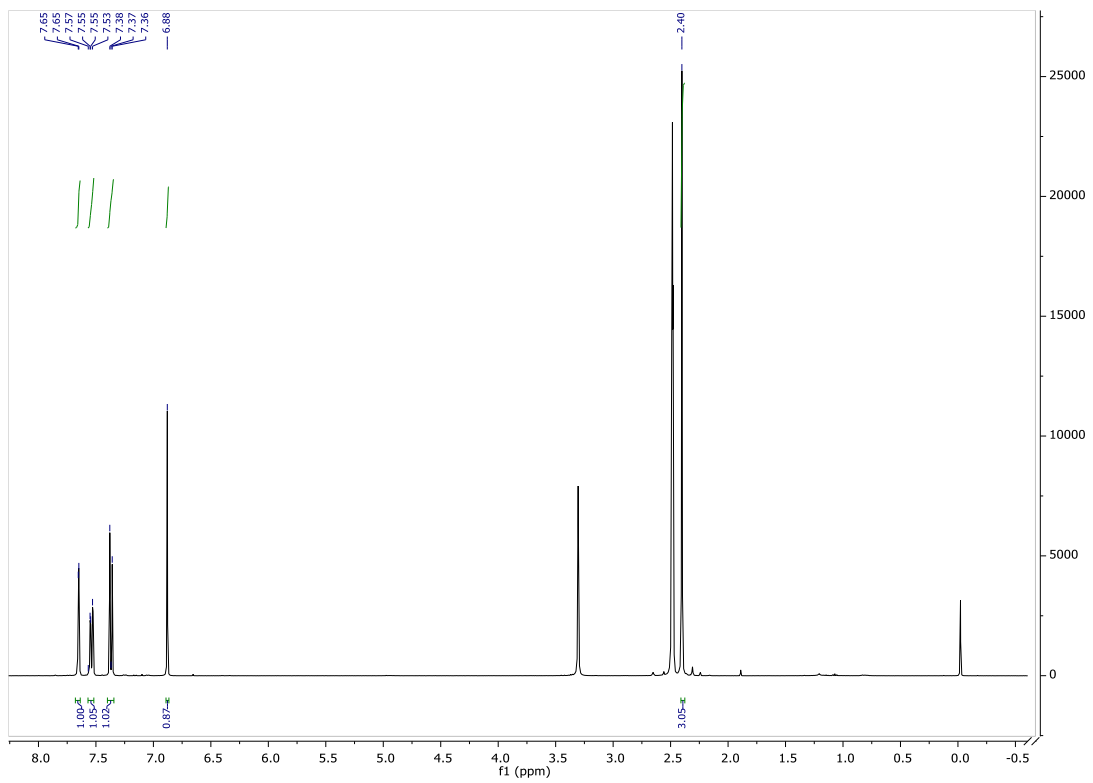
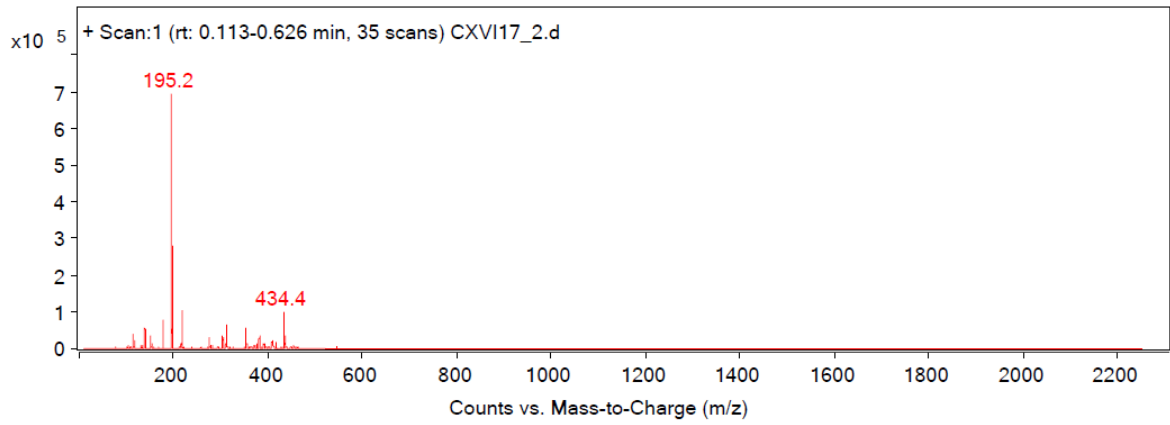
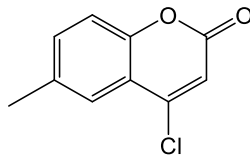
Keywords: harmine, coumarin, 1,2,3-triazole, synthesis, click chemistry

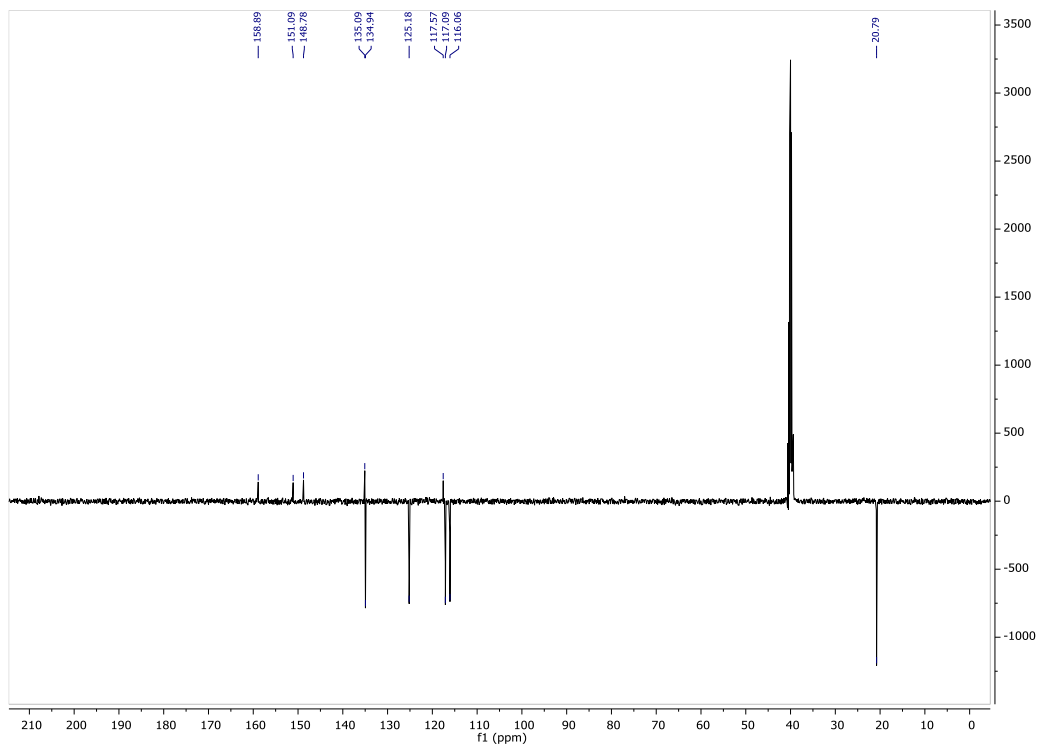
8. PRILOZI

U priložima su prikazani snimljeni IR, MS, ^1H i ^{13}C NMR spektri nekih prekursora te krajnjih produkata.

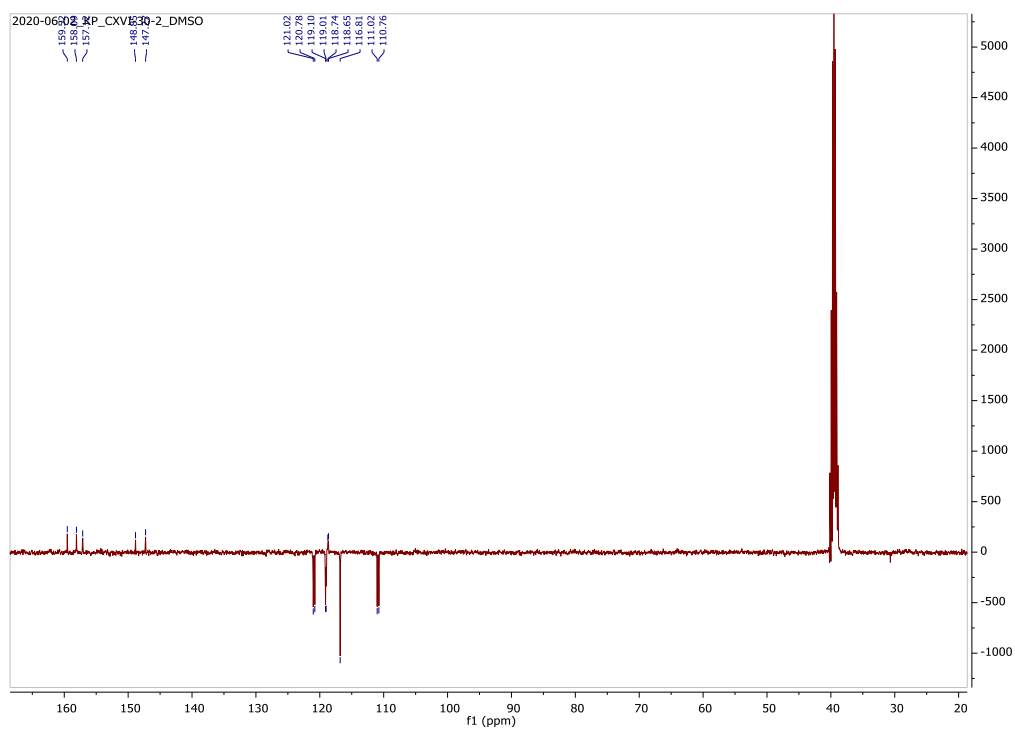
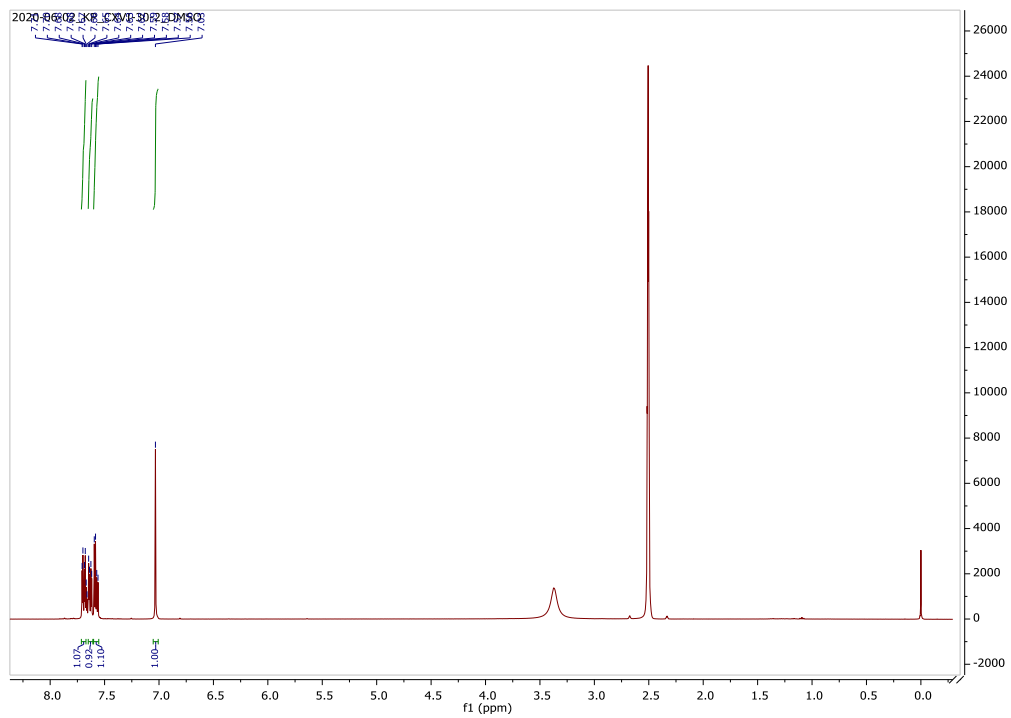
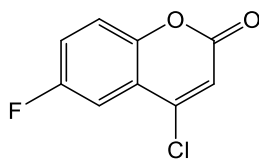


1b

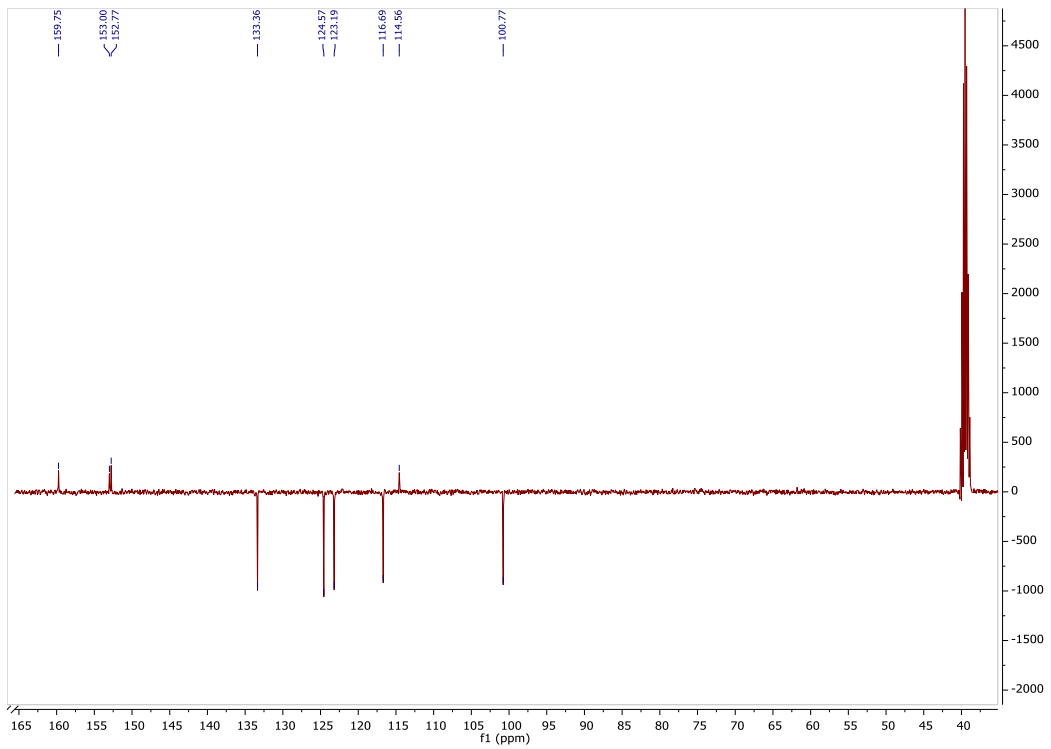
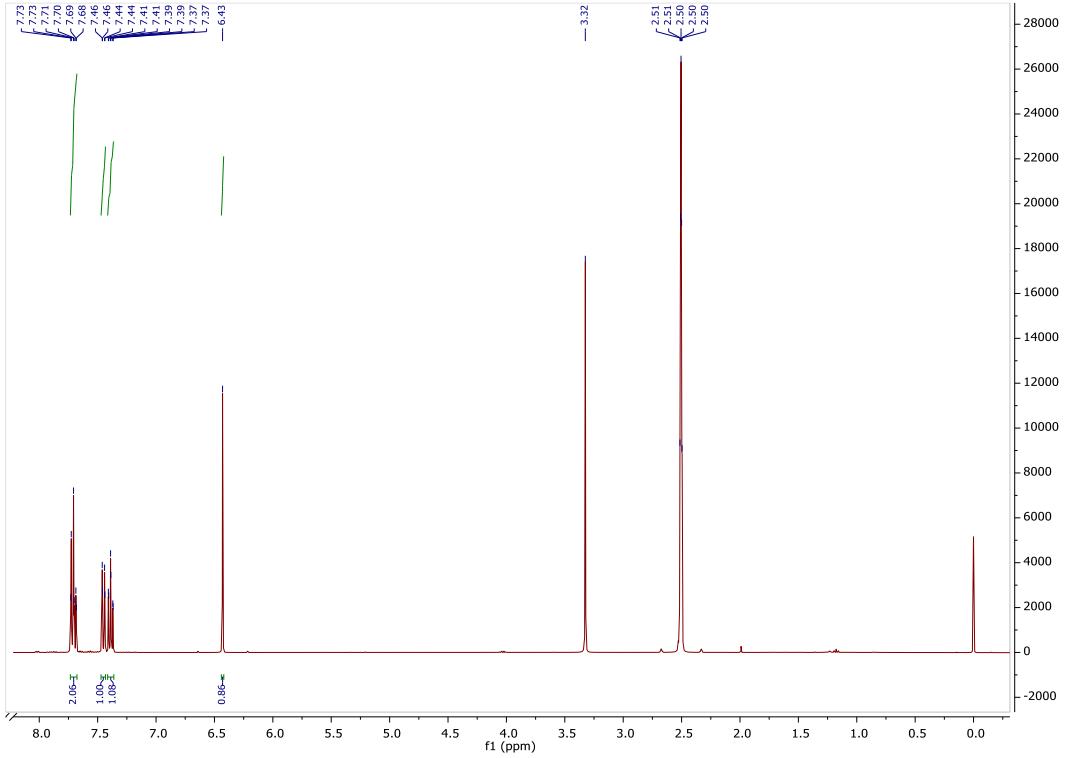
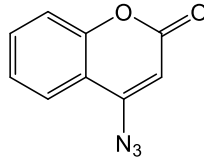




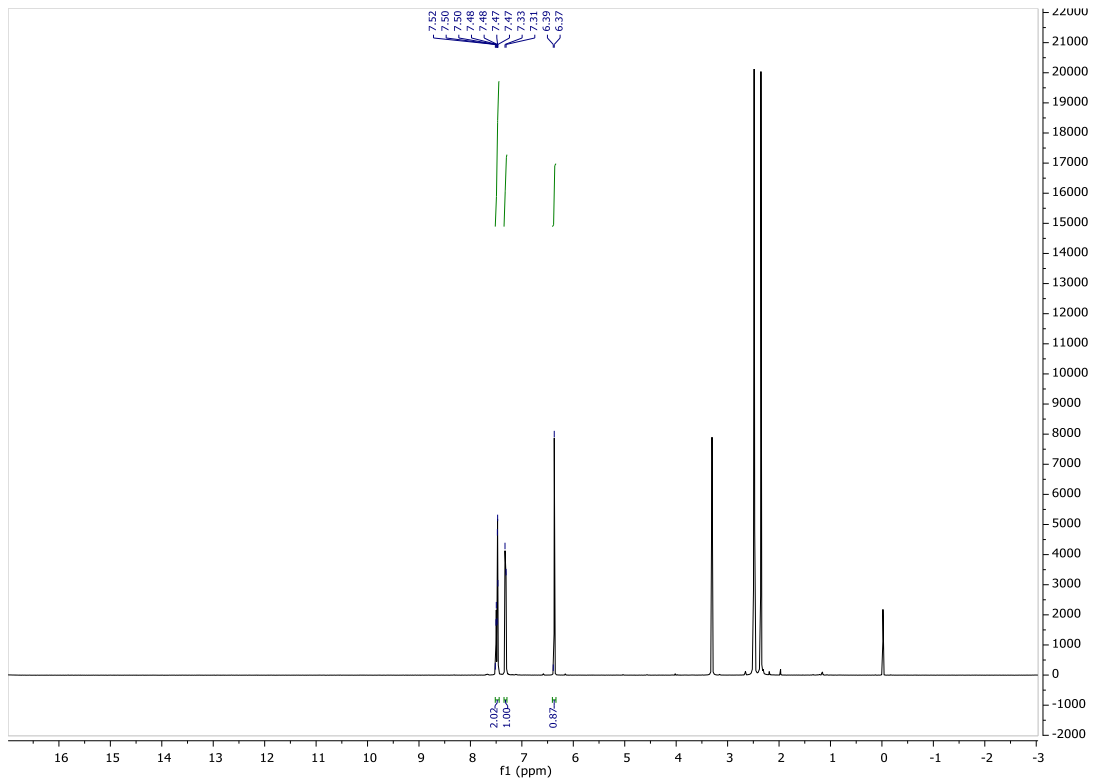
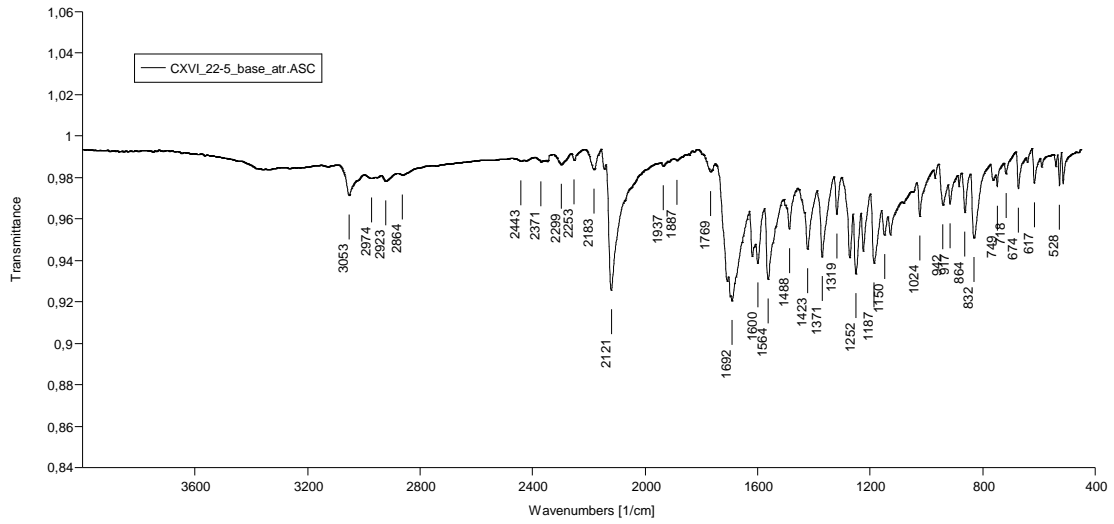
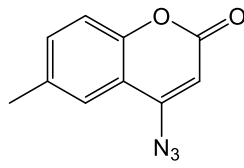
1c

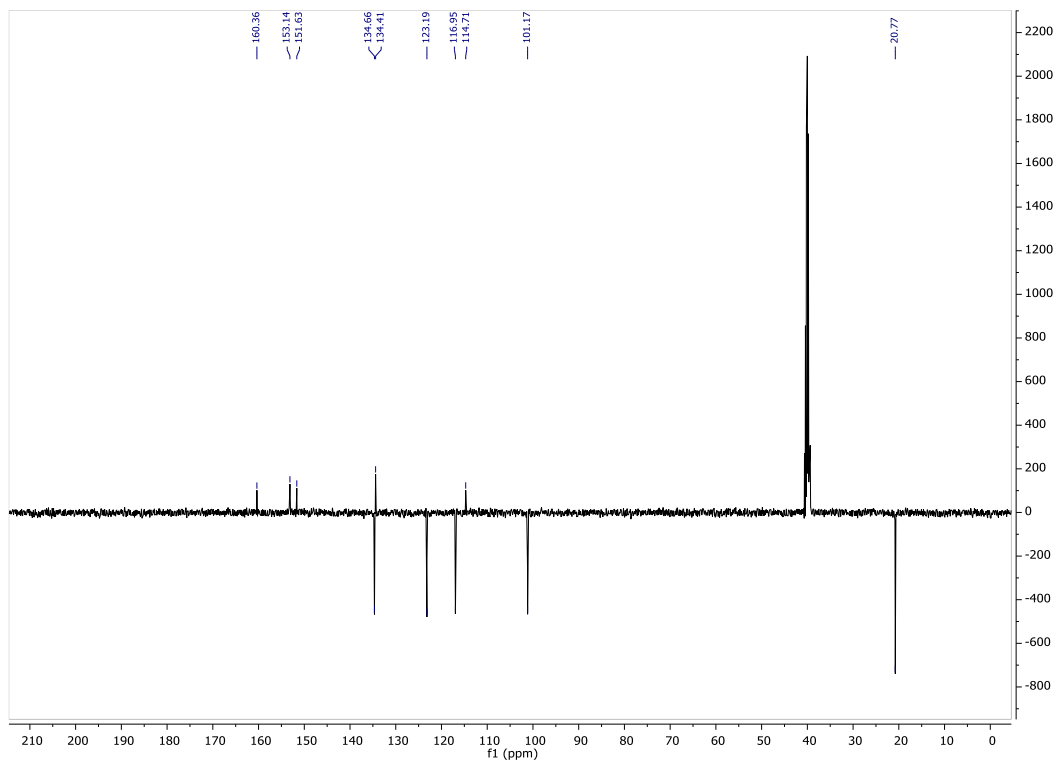


2a

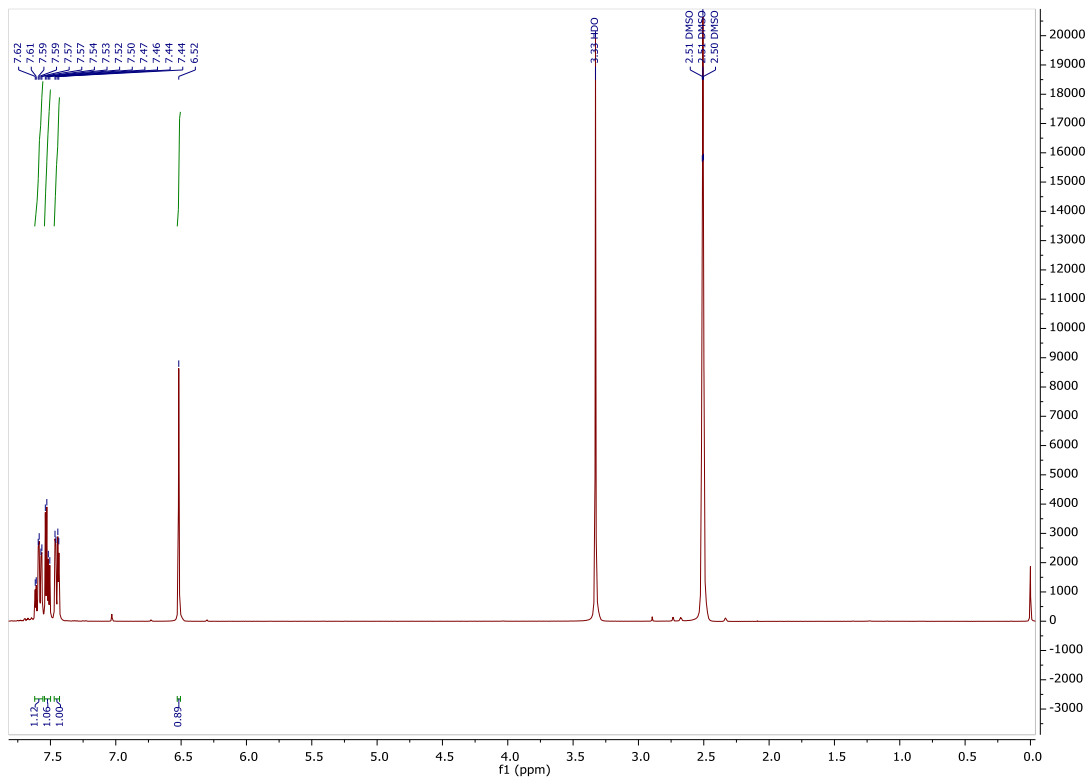
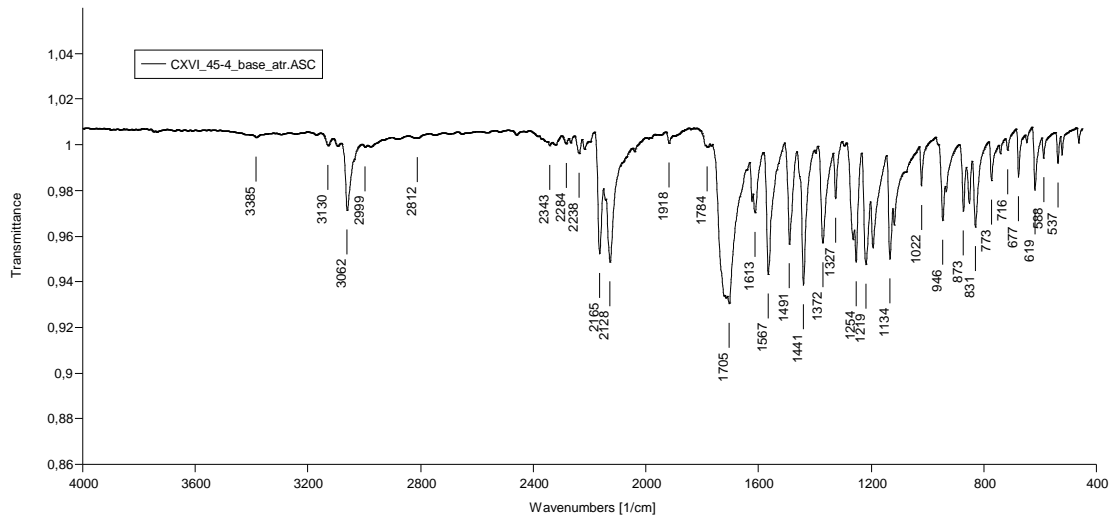
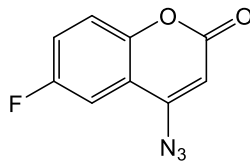


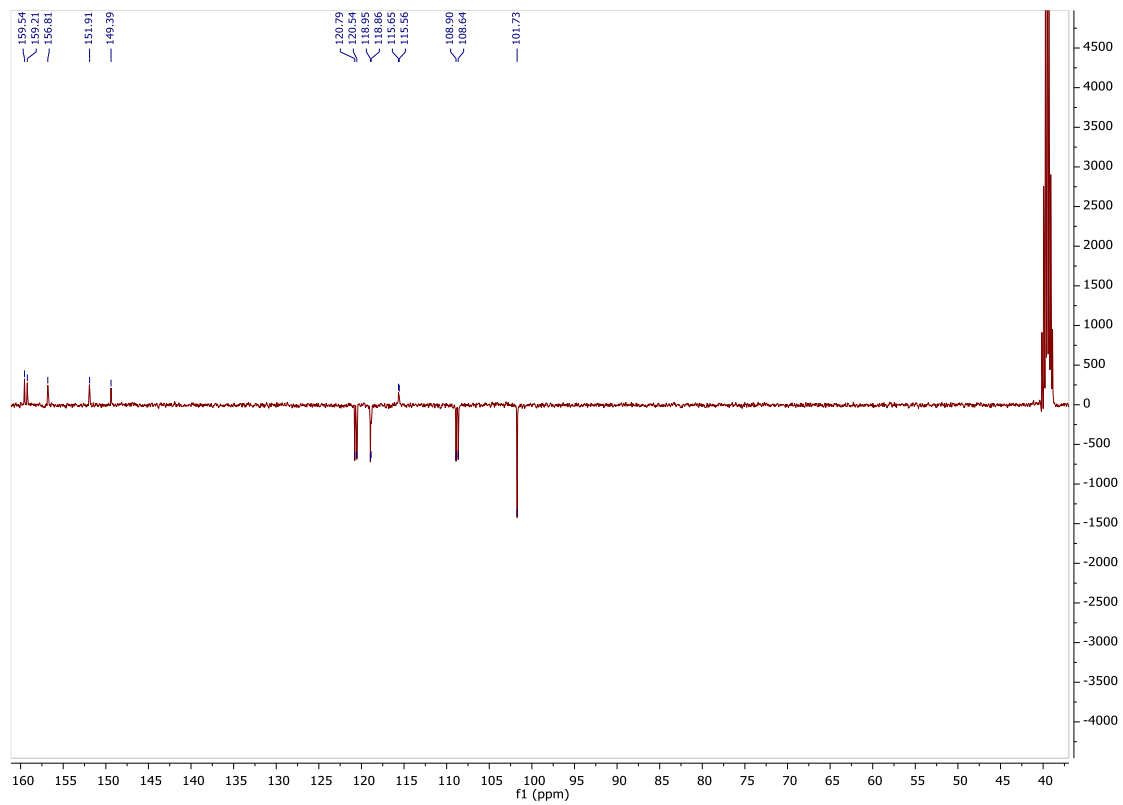
2b



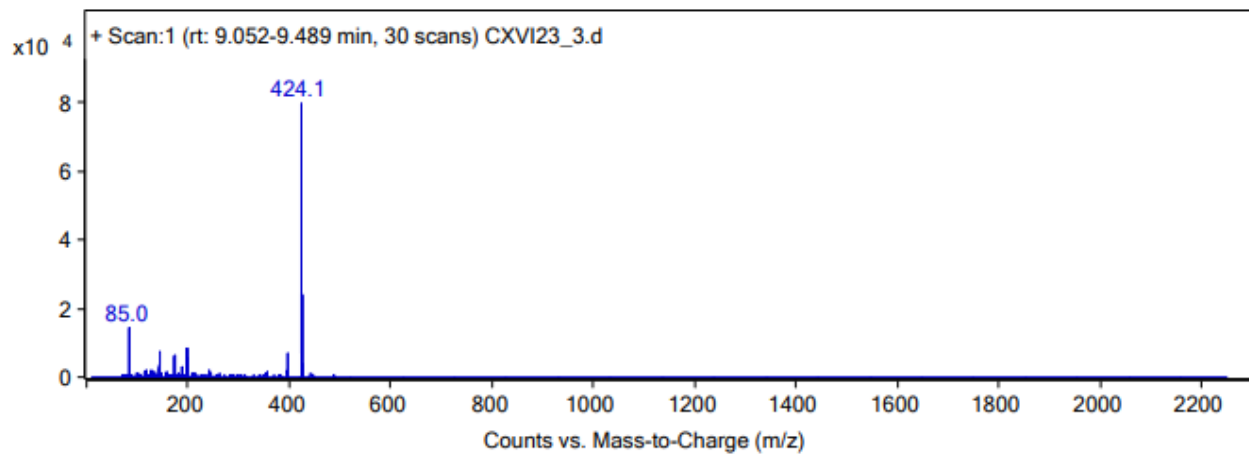
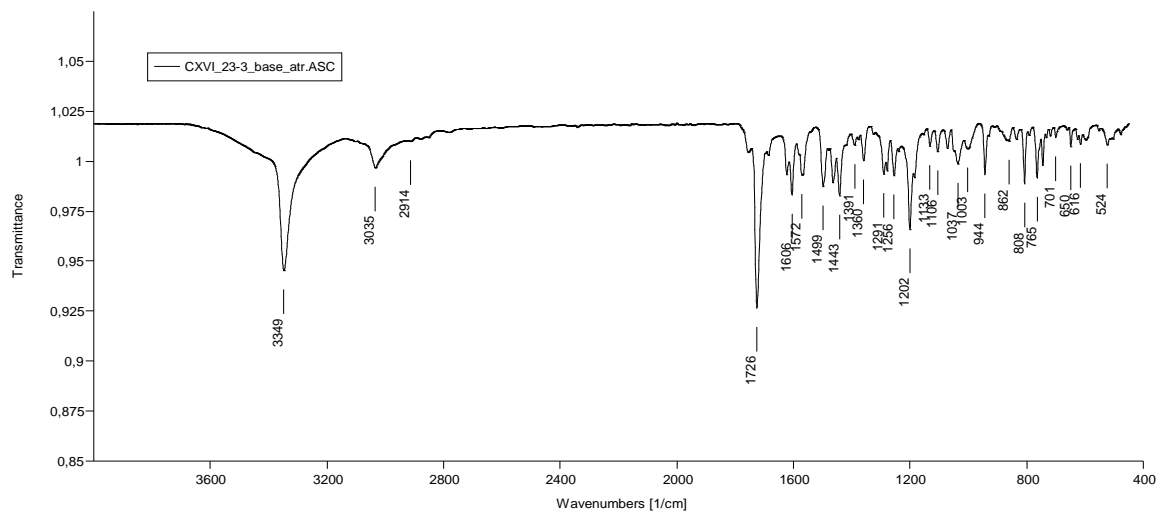
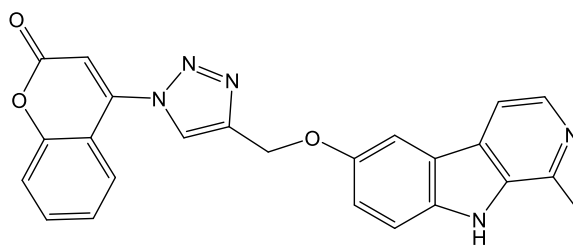


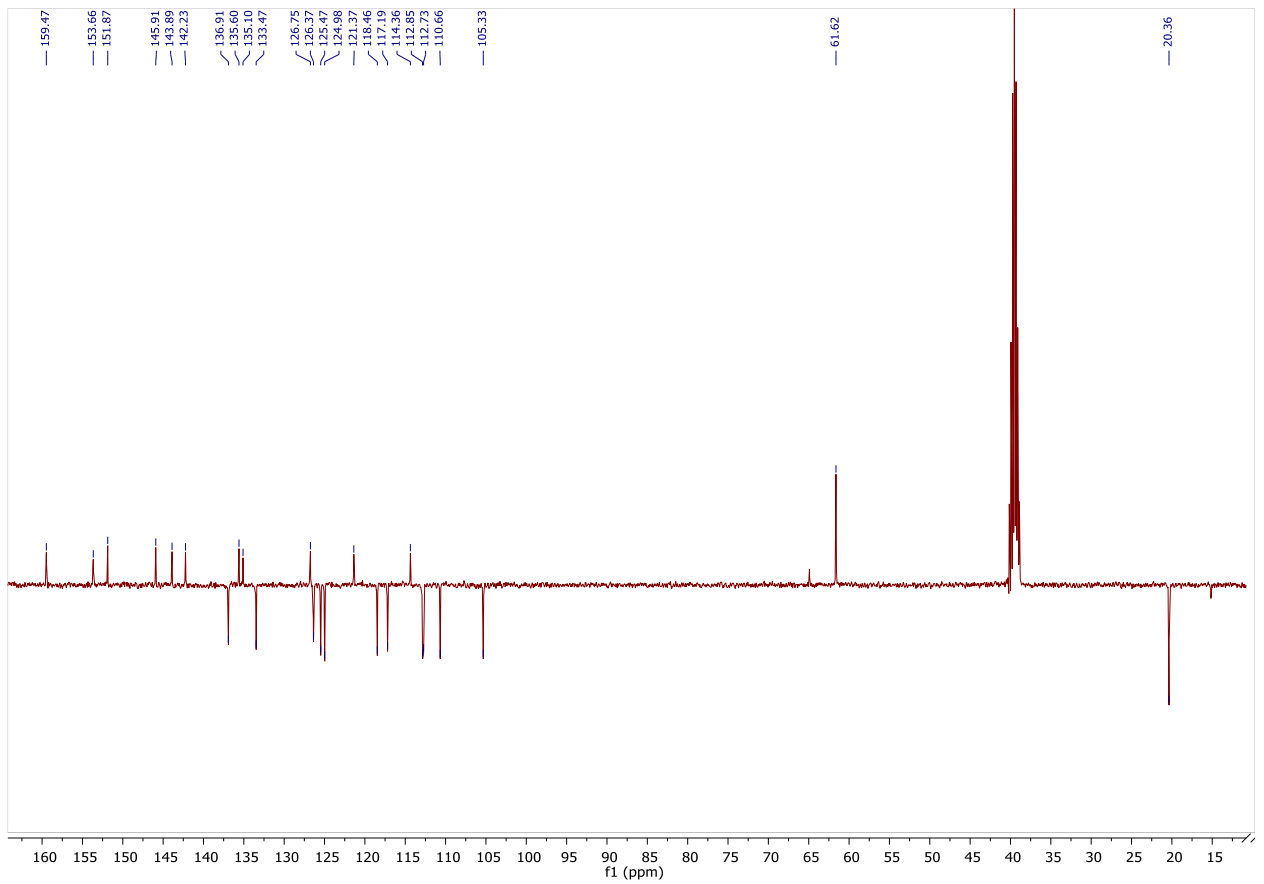
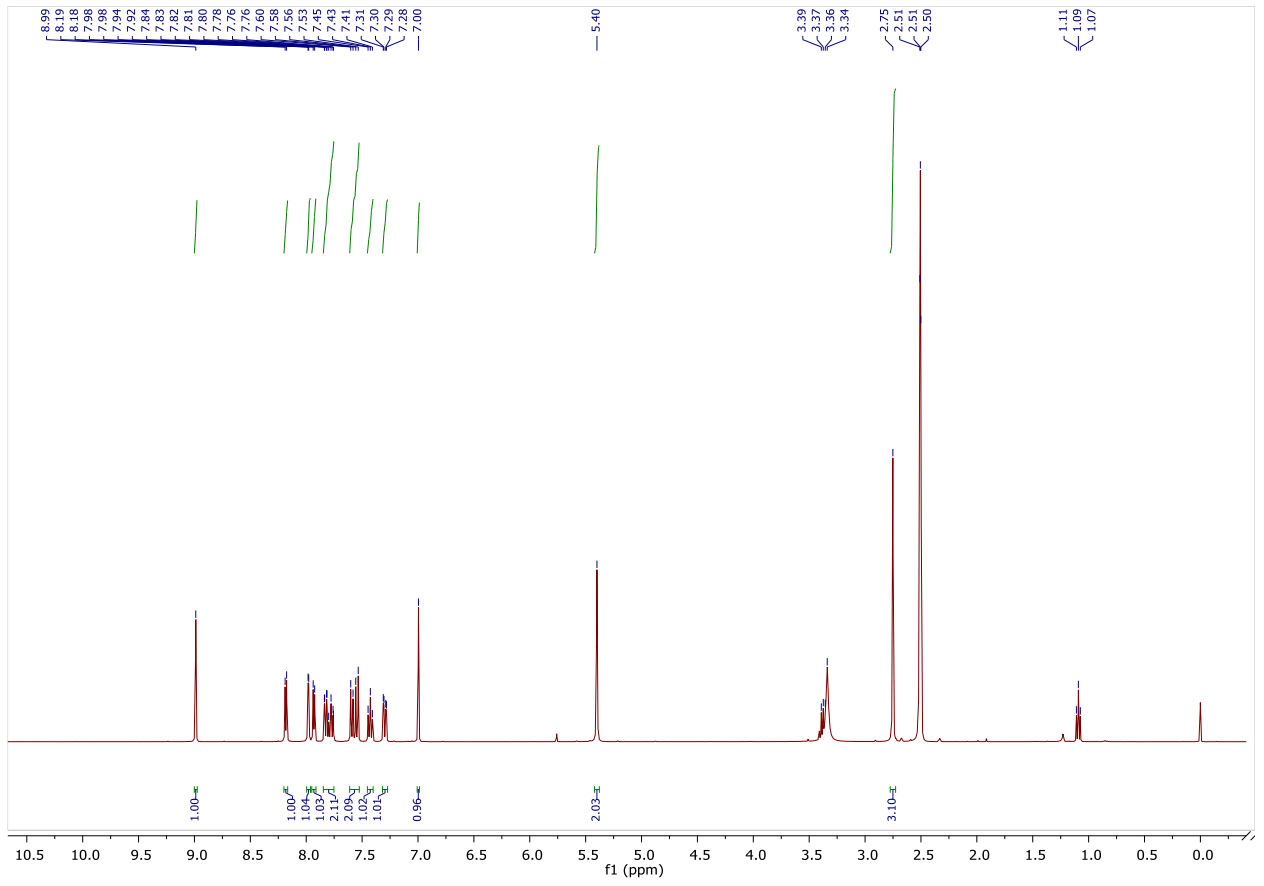
2c



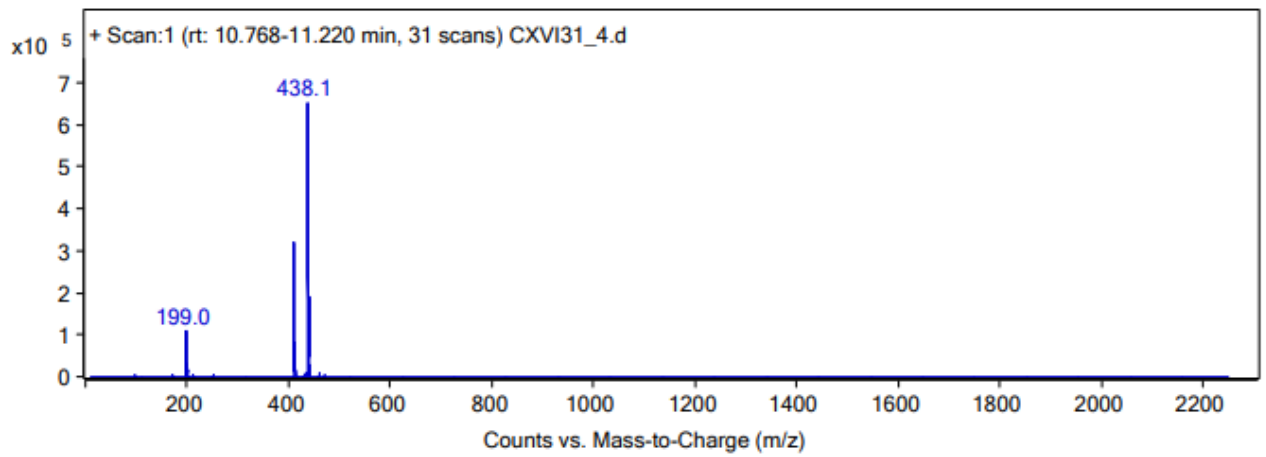
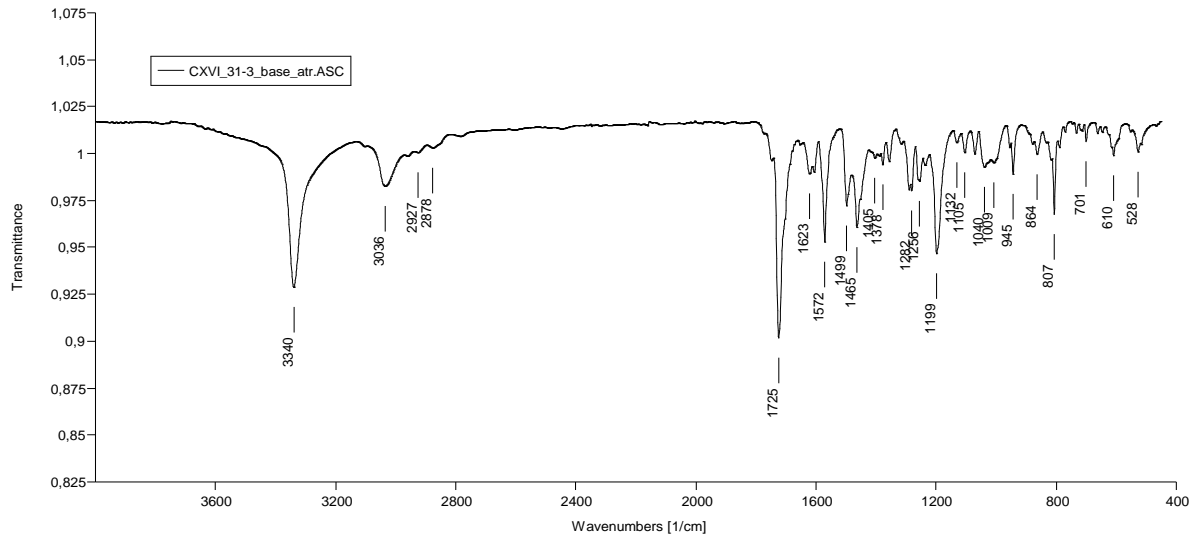
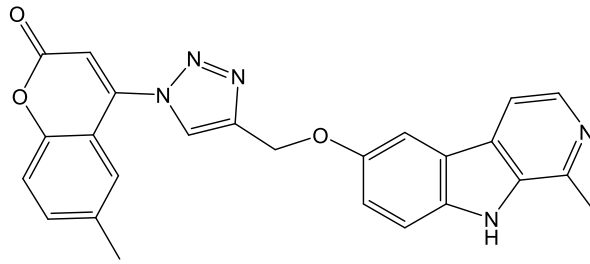


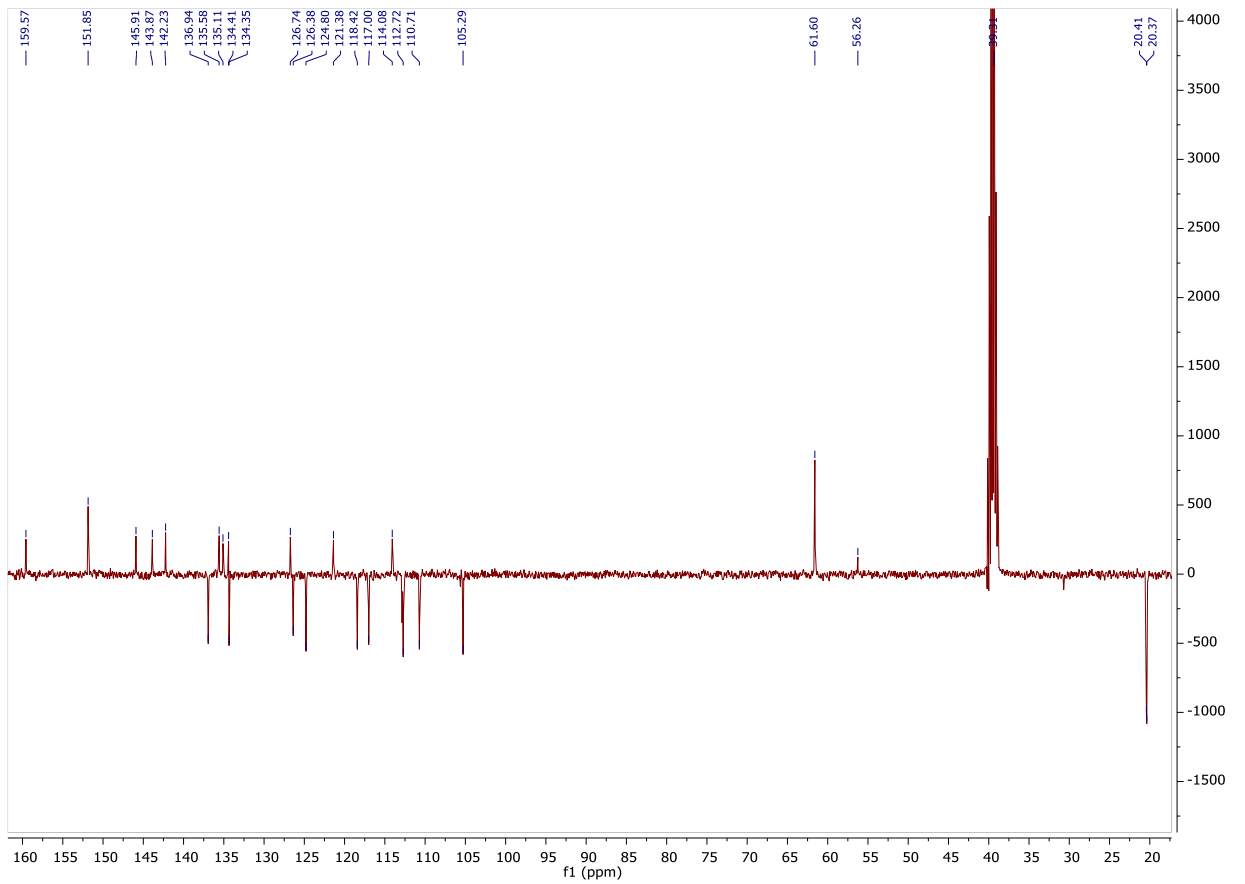
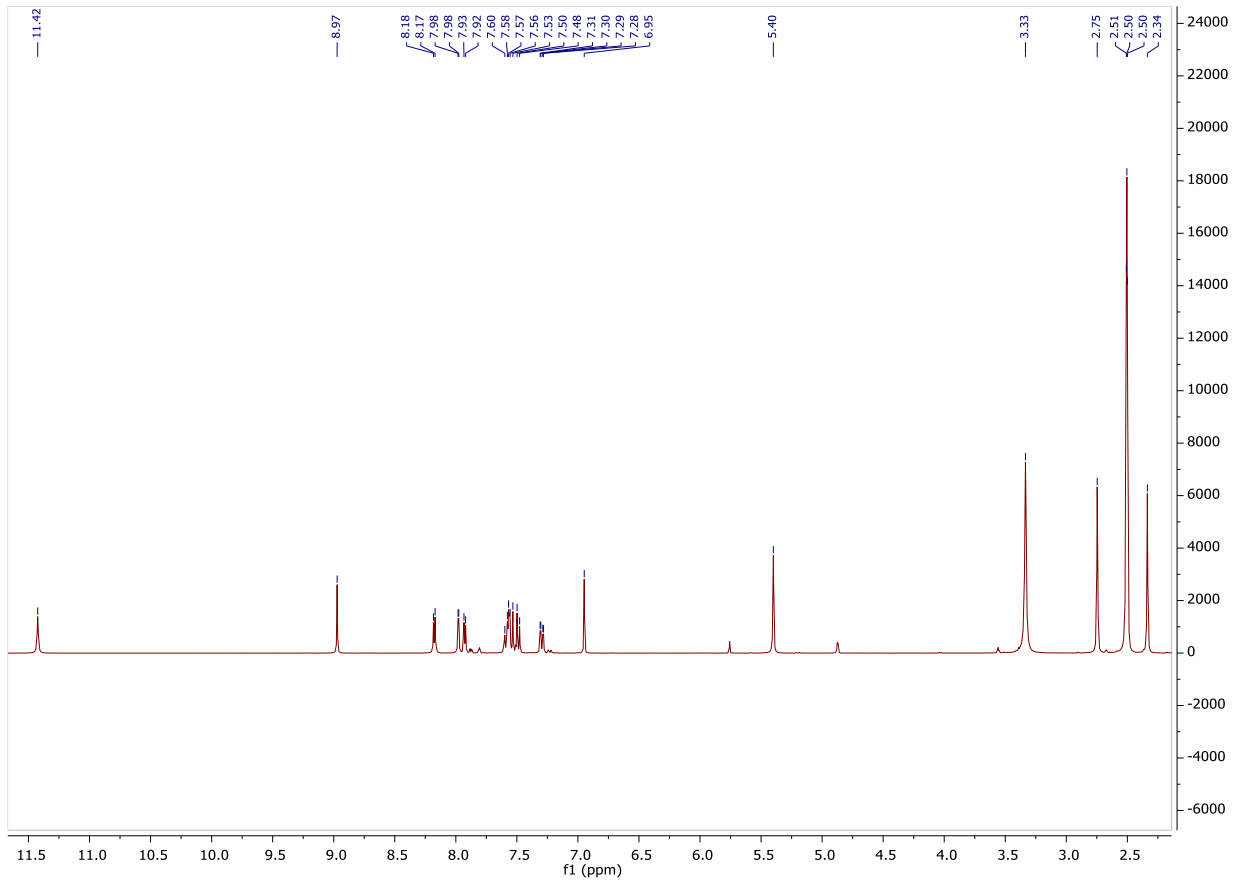
8a

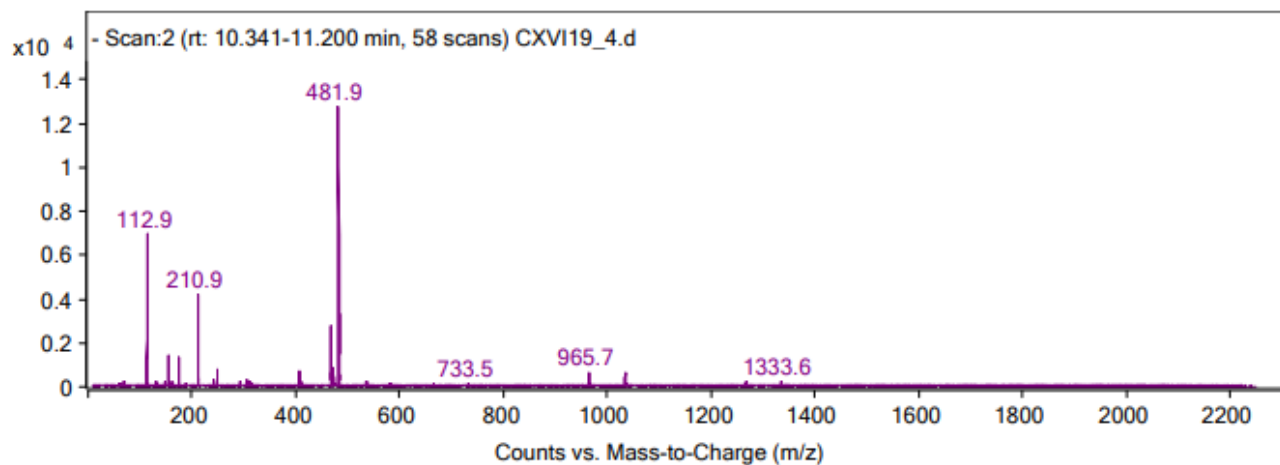
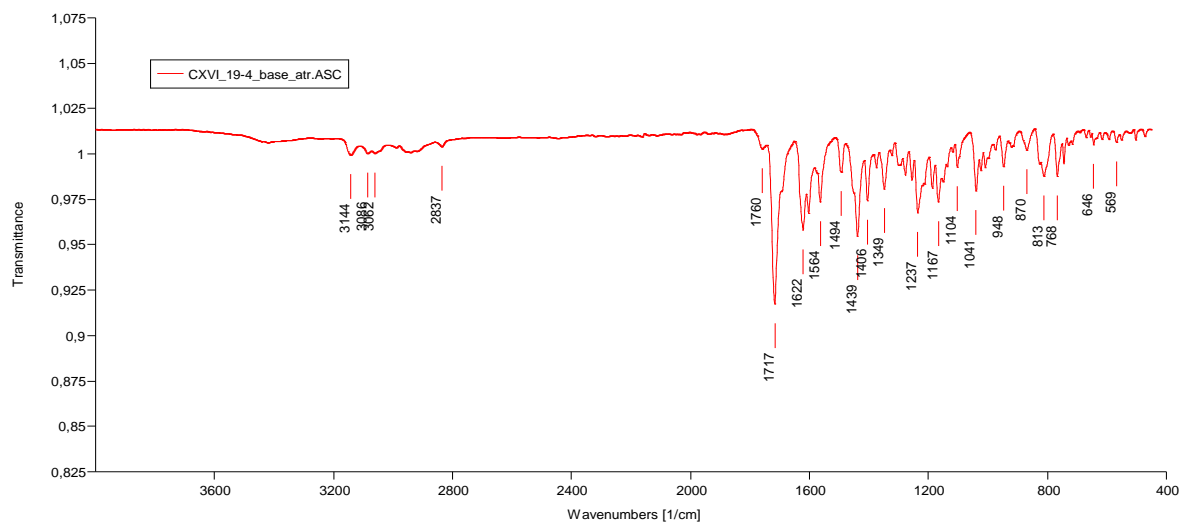
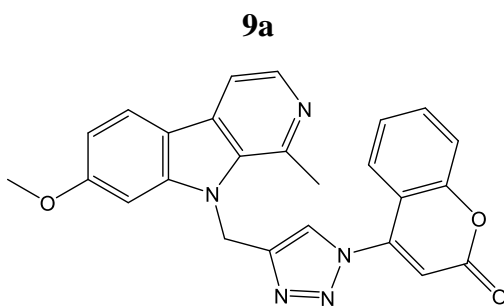


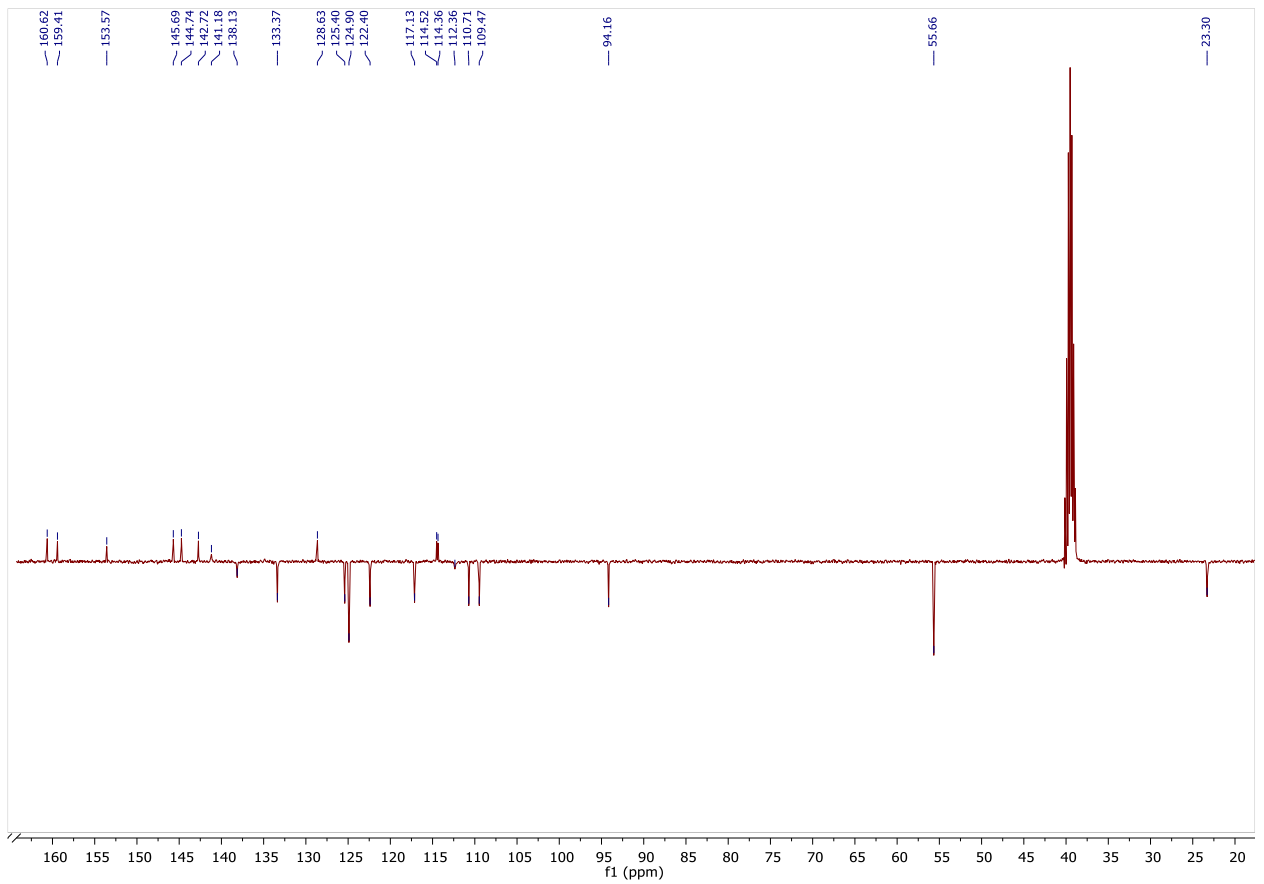
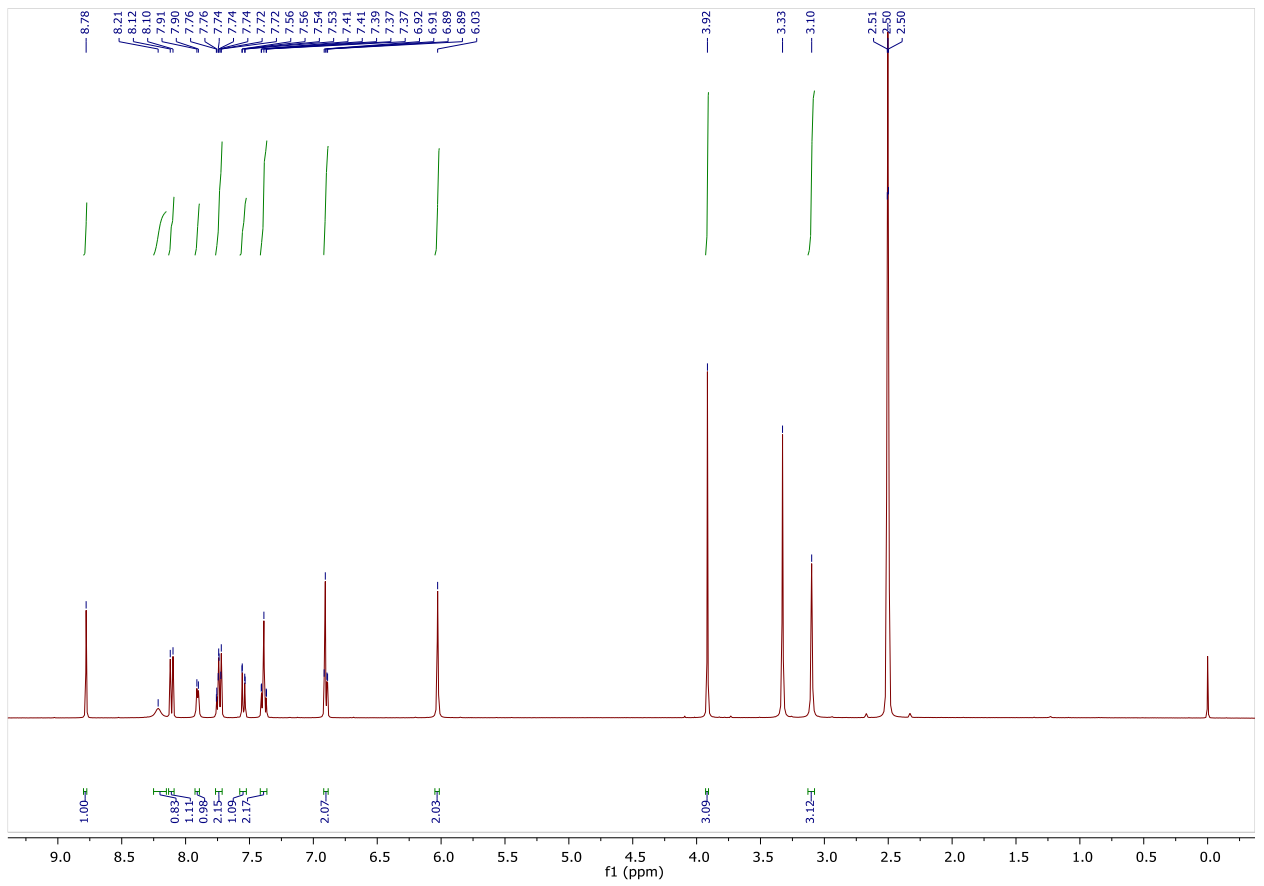


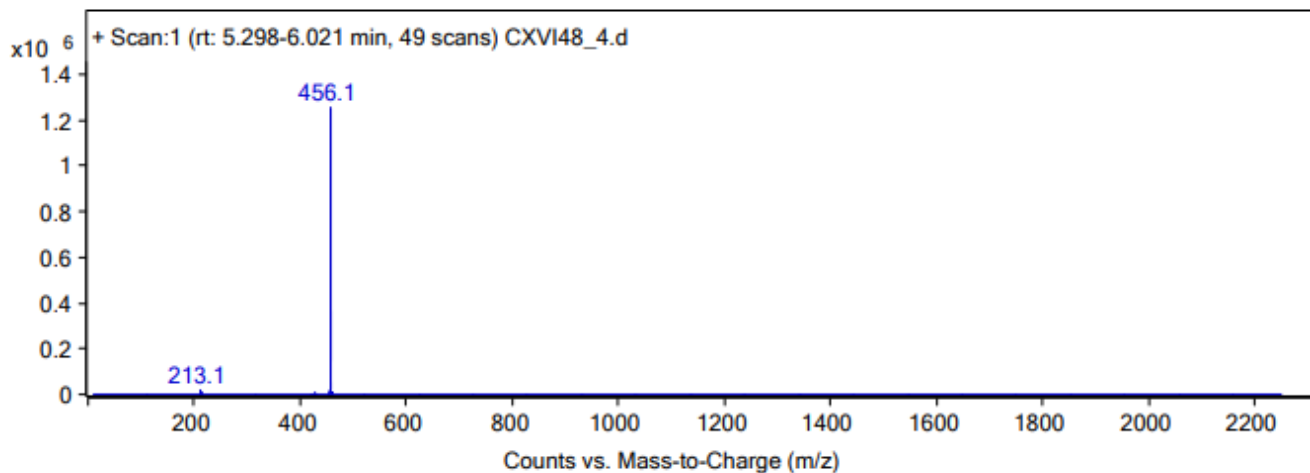
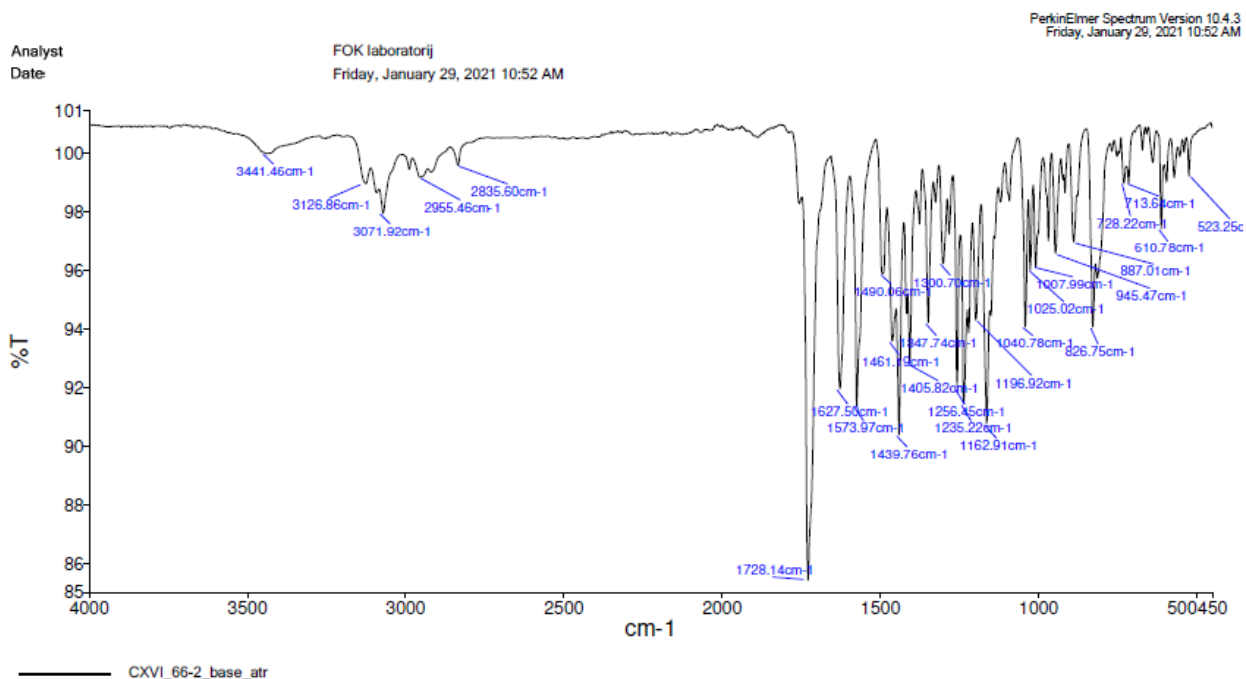
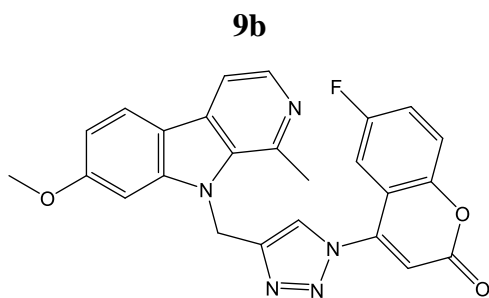
8b

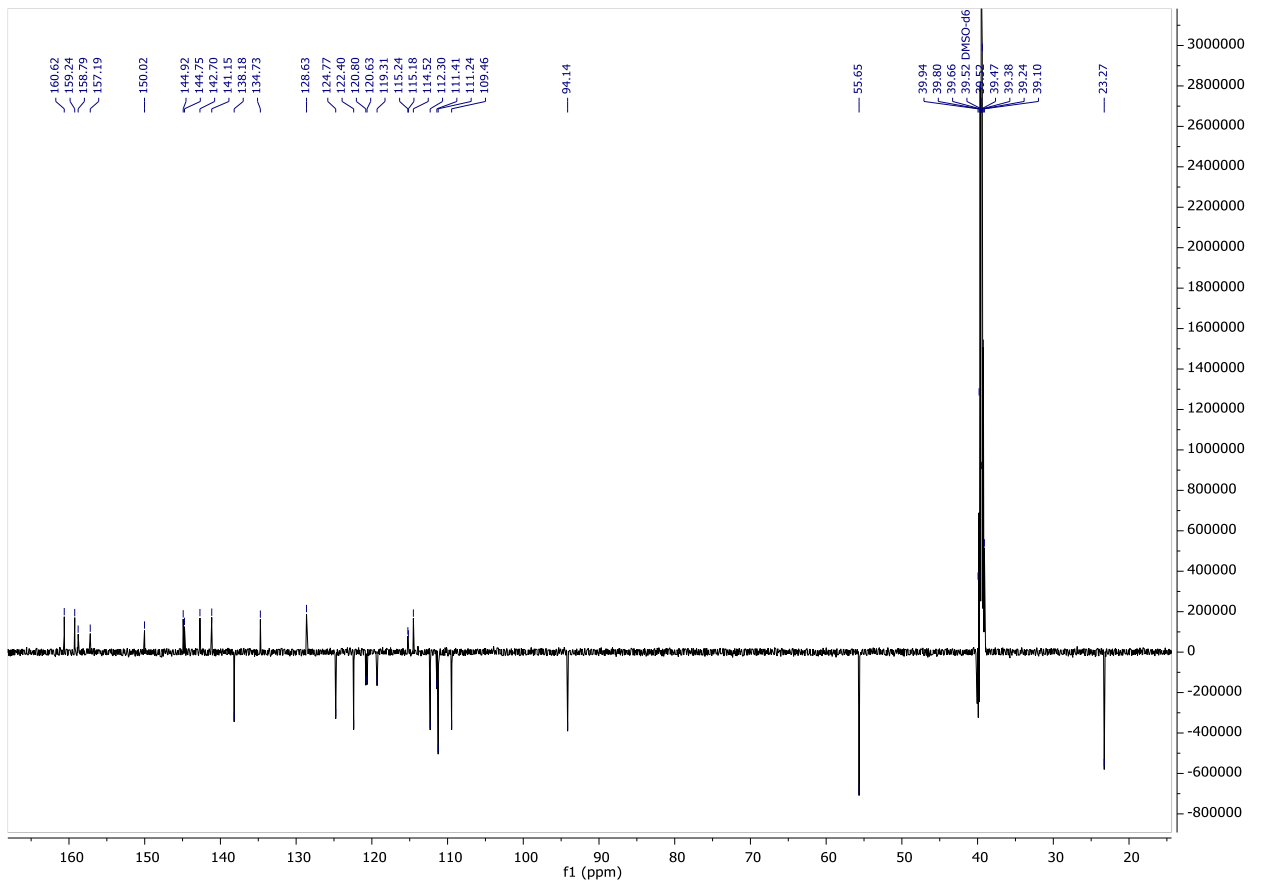
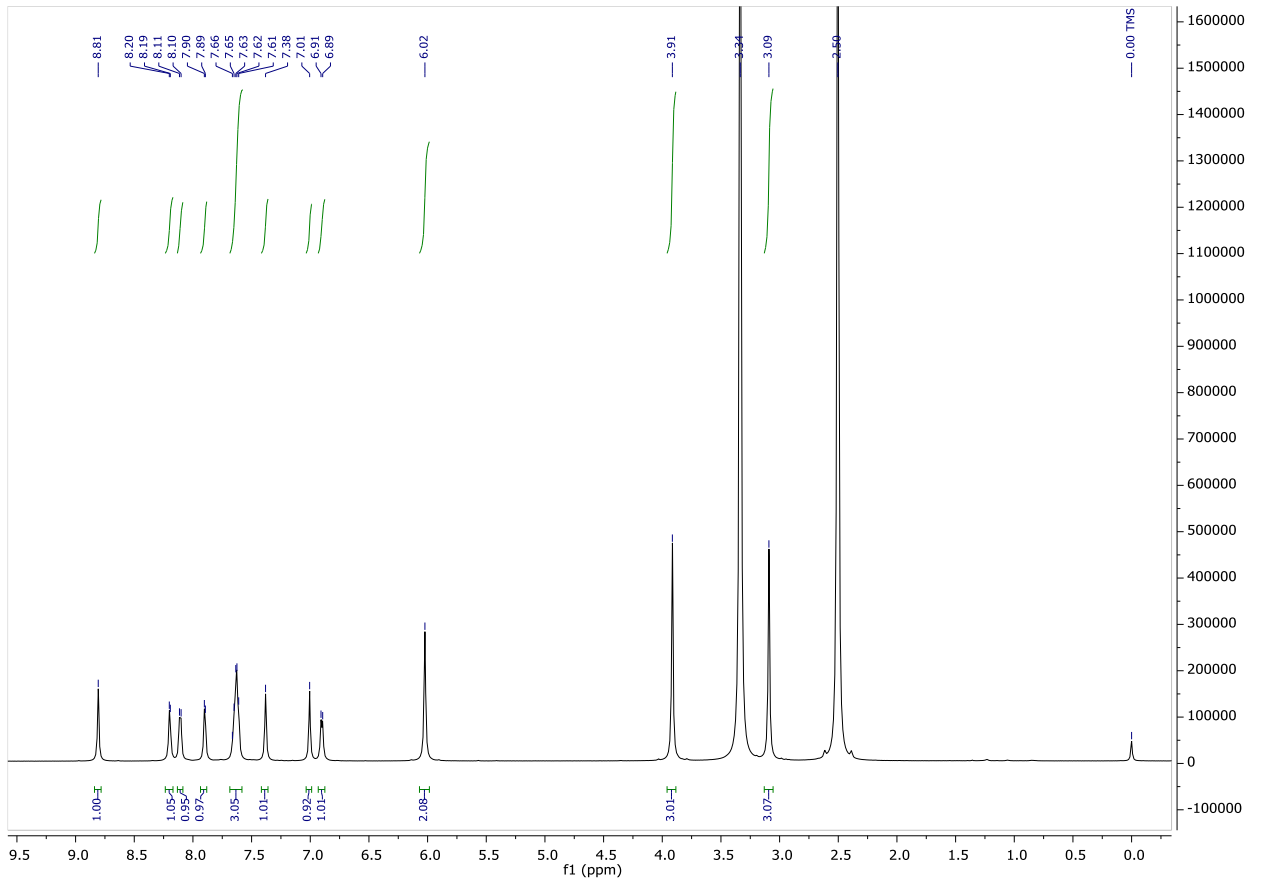












9. TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Temeljna dokumentacijska kartica

Sveučilište u Zagrebu
Farmaceutsko-biokemijski fakultet
Studij: Farmacija
Zavod za farmaceutsku kemiju
A. Kovačića 1, 10000 Zagreb, Hrvatska

Diplomski rad

Sinteza i karakterizacija novih 1,2,3-triazolskih derivata harmina i kumarina

Maja Toth

SAŽETAK

Ovaj rad dio je istraživanja provedenog na Zavodu za farmaceutsku kemiju Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu koji obuhvaća dizajn, sintezu te biološku evaluaciju derivata harmina s potencijalnim antimalarijskim djelovanjem. Cilj ovog rada bila je sinteza i karakterizacija novih 1,2,3-triazolskih hibrida harmina i kumarina. Sinteza je započeta prevođenjem derivata kumarina do odgovarajućih azida **2a-c** prema dolje navedenoj shemi. Harmin i fenol **5** dobiven iz 5-metoksitriptamina zatim su prevedeni u odgovarajuće alkine **6** i **7** u reakciji s propargil-bromidom. Bakar(I)-kataliziranom reakcijom alkin-azid cikloadicije u kojoj su početni reaktanti bili alkin **6** i **7** te azidi **2a-c** dobiveni su konačni produkti **8a-b** i **9a-b**. Strukture svih novosintetiziranih spojeva potvrđene su spektroskopskim metodama (IR, ^1H i ^{13}C NMR, MS) te im je određena temperatura tališta. Sva četiri konačna produkta zadovoljavaju Lipinskijeva i Veberova pravila, a web alat SwissADME im predviđa dobru oralnu bioraspoloživost. Biološko djelovanje novosintetiziranih derivata bit će ispitano u daljnjim istraživanjima.

Rad je pohranjen u Središnjoj knjižnici Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Rad sadrži: 69 stranica, 12 grafičkih prikaza, 7 tablica i 38 literaturnih navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: harmin, kumarin, 1,2,3-triazol, sinteza, *click* kemija

Mentor: **Dr. sc. Kristina Pavić**, *poslijedoktorand Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*

Ocjenjivači : **Dr. sc. Kristina Pavić**, *poslijedoktorand Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*

Dr. sc. Ivana Perković, *docent Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*

Dr. sc. Lidija Bach-Rojecky, *izvanredni profesor/ redoviti profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*

Rad prihvaćen: srpanj 2021.

Basic documentation card

University of Zagreb
Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Study: Pharmacy
Department of Medicinal Chemistry
A. Kovačića 1, 10000 Zagreb, Croatia

Diploma thesis

Synthesis and characterization of novel harmine and coumarin 1,2,3-triazole derivatives

Maja Toth

SUMMARY

This paper is a part of ongoing research at the Department of Medicinal Chemistry, Faculty of Pharmacy and Biochemistry, University of Zagreb, which includes design, synthesis, and biological evaluation of novel harmine derivatives as potential antimalarial drugs. The aim of this diploma thesis was the synthesis and characterization of novel harmine 1,2,3-triazole derivatives comprising coumarin in their structure. Synthesis began with transformation of coumarin derivatives to azides **2a-c** shown in set out below scheme. Both harmine and phenol **5**, which was generated from 5-methoxytryptamine, were transformed into alkynes **6** and **7** in the reaction of alkylation using propargyl bromide. The copper(I)-catalyzed alkyne-azide cycloaddition, in which alkynes **6** and **7**, and coumarin derivatives **2a-c** were used, resulted in the formation of the final compounds **8a-b** (*O*-derivatives) and **9a-b** (*N*-derivatives). Structures of the newly synthesized compounds were confirmed using spectroscopic methods (IR, ¹H and ¹³C NMR, MS), while melting points were determined for solid compounds. All four novel derivatives fulfill all the Lipinski's and Veber's criteria for good oral bioavailability of potential drugs. SwissADME web tool predicts good oral bioavailability as well. Biological activity of the newly synthesized compounds will be examined in further studies.

The thesis is deposited in the Central Library of the University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry.

Thesis includes: 69 pages, 12 figures, 7 tables and 38 references. Original is in Croatian language.

Keywords: harmine, coumarin, 1,2,3-triazole, synthesis, click chemistry

Mentor: **Kristina Pavić, Ph.D.** *Postdoctoral Associate*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

Reviewers: **Kristina Pavić, Ph.D.** *Postdoctoral Associate*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Ivana Perković, Ph.D. *Assistant Professor* University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Lidija Bach-Rojecky, Ph.D. *Associate Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

The thesis was accepted: July 2021.

