

# Sinteza i karakterizacija novih 1,2,3-triazolnih derivata harmina i cimetne kiseline

---

**Martinović, Gea**

**Master's thesis / Diplomski rad**

**2019**

*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:163:986279>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2025-02-19**



*Repository / Repozitorij:*

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



**Gea Martinović**

**Sinteza i karakterizacija novih 1,2,3-triazolnih  
derivata harmina i cimetine kiseline**

**DIPLOMSKI RAD**

Predan Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu

Zagreb, 2019.

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

*Veliko hvala mentorici doc. dr. sc. Ivani Perković na nesebičnoj pomoći, savjetima i ukazanom povjerenju prilikom izrade ovog rada.*

*Zahvaljujem se zaposlenicima Zavoda za farmaceutsku kemiju na ugodnom društvu i pomoći u laboratoriju.*

*Hvala svim prijateljima za puno smijeha i lijepih uspomena koje su nastale tijekom našeg studiranja.*

*Posebno hvala mojoj obitelji na bezuvjetnoj ljubavi, podršci i razumijevanju tijekom cijelog mog života, a posebno tijekom ovih 5 godina.*

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



## KRATICE

A549	humana stanična linija adenokarcinoma alveolarnih bazalnih epitelnih stanica
AchE	acetilkolin esteraza
ADMP	2-azido-1,3-dimetilimidazolin heksafluorofosfat
CAD	derivati cimetine kiseline (eng. <i>cinnamic acid derivatives</i> )
CuAAC	bakar-katalizirajuća azid-alkin cikloadicija
DBU	1,8-diazabiciklo[5.4.0]undeka-7-en
DMF	<i>N,N</i> -dimetilformamid
DMSO	dimetilsulfoksid
DNA	deoksiribonukleinska kiselina
DYRK1A	dvojno specifična tirozin-fosforilacijom regulirana kinaza 1A (eng. <i>dual specificity tyrosine-phosphorylation-regulated kinase 1A</i> )
HBL-100	humana stanična linija karcinoma epitela dojke
HCT-116	humana stanična linija karcinoma debelog crijeva
HeLa	humana stanična linija karcinoma epitela cerviksa
HPLC-MS/MS	tehnika vezanog sustava tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti i tandemске masene spektrometrije
Hsp90	protein toplinskog šoka 90 (eng. <i>heat shock protein 90</i> )
HT – 29	humana stanična linija adenokarcinoma debelog crijeva
IR	infracrveno zračenje
LOX-5	lipooksigenaza
MAO	monoaminooksidaza

MW	mikrovalni reaktor
NMR	nuklearna magnetska rezonancija
PDE-4	fosfodiesteraza 4
PLK	(eng. <i>polo-like-kinase</i> )
s.t.	sobna temperatura
TEA	trietilamin
THF	tetrahidrofuran
TLC	tankoslojna kromatografija
TMS	tetrametilsilan
TPSA	topološka ploština zone polarne površine
$t_t$	temperatura tališta
UV	ultraljubičasto zračenje
WHO	Svjetska zdravstvena organizacija ( <i>World Health Organization</i> )
XOD	ksantin oksidaza

# SADRŽAJ

<b>1. UVOD</b> .....	<b>1</b>
1.1. Harmin kao spoj uzor .....	2
1.1.1. Harmin kao prirodni produkt .....	2
1.1.2. Fizikalno-kemijska svojstva harmina .....	3
1.1.3. Biološko djelovanje harmina .....	4
1.1.4. Derivati harmina i njihovo djelovanje .....	5
2.1. „Click“ kemija .....	11
2.1.1. Huisgenova 1,3-dipolarna cikloadicija katalizirana Cu(I) .....	12
2.1.2. Mehanizam bakrom (I) katalizirane azid-alkin cikloadicije .....	13
2.2.1. 1,2,3-triazoli .....	15
2.2.2. Biološko djelovanje 1,2,3-triazola .....	16
<b>2. OBRAZLOŽENJE TEME</b> .....	<b>20</b>
<b>3. MATERIJALI I METODE</b> .....	<b>23</b>
3.1. Sinteza etilnih estera derivata cimetine kiseline ( <b>1a,b</b> ) .....	25
3.1.1. Sinteza etil (2E)-3-(4-fluorofenil)prop-2-enoata ( <b>1a</b> ) .....	25
3.1.2. Sinteza etil (2E)-3-(3,4-difluorofenil)prop-2-enoata ( <b>1b</b> ) .....	25
3.2. Sinteza alkohola derivata cimetine kiseline ( <b>2a,b</b> ) .....	25
3.2.1. Sinteza (2E)-3-(4-fluorofenil)prop-2-en-1-ola ( <b>2a</b> ) .....	26
3.2.2. Sinteza (2E)-3-(3,4-difluorofenil)prop-2-en-1-ola ( <b>2b</b> ) .....	26
3.3. Sinteza azida derivata cimetine kiseline ( <b>3a,b</b> ) .....	26
3.3.1. Sinteza 1-[(1E)-3-azidoprop-1-en-1-il]-4-fluorobenzena ( <b>3a</b> ) .....	26
3.3.2. Sinteza 4-[(1E)-3-azidoprop-1-en-1-il]-1,2-difluorobenzena ( <b>3b</b> ) .....	27

3.4. Sinteza harmola ( <b>4</b> ) .....	27
3.5. Sinteza 7-metoksi-1-metil-9-(prop-2-in-1-il)-9H-pirido[3,4-b]indola ( <b>5</b> ) .....	28
3.6. Sinteza 1-metil-7-(prop-2-in-1-iloksi)-9H-pirido[3,4-b]indola ( <b>6</b> ) .....	29
3.7. Sinteza N-supstituiranih triazolskih derivata harmina i cimetne kiseline ( <b>7a,b</b> ) .....	29
3.7.1. Sinteza 1-[(2E)-3-(4-fluorofenil)prop-2-en-1-il]-4-({7-metoksi-1-metil-9H-pirido[3,4-b]indol-9-il}metil)-1H-1,2,3-triazola ( <b>7a</b> ) .....	30
3.7.2. Sinteza 1-[(2E)-3-(3,4-difluorofenil)prop-2-en-1-il]-4-({7-metoksi-1-metil-9H-pirido[3,4-b]indol-9-il}metil)-1H-1,2,3-triazola ( <b>7b</b> ) .....	30
3.8. Sinteza O-supstituiranih triazolskih derivata harmola ( <b>8a,b</b> ) .....	31
3.8.1. Sinteza 1-[(2E)-3-(4-fluorofenil)prop-2-en-1-il]-4-[(1-metil-9H-pirido[3,4-b]indol-7-il}oksi)metil]-1H-1,2,3-triazola ( <b>8a</b> ) .....	31
3.8.2. Sinteza 1-[(2E)-3-(3,4-difluorofenil)prop-2-en-1-il]-4-[(1-metil-9H-pirido[3,4-b]indol-7-il}oksi)metil]-1H-1,2,3-triazola ( <b>8b</b> ) .....	32
<b>4. REZULTATI I RASPRAVA .....</b>	<b>33</b>
<b>5. ZAKLJUČCI .....</b>	<b>45</b>
<b>6. LITERATURA .....</b>	<b>47</b>
<b>7. SAŽETAK/SUMMARY .....</b>	<b>52</b>
<b>8. PRILOZI .....</b>	<b>57</b>
<b>9. TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA/BASIC DOCUMENTATION CARD</b>	



## **1. UVOD**

## 1.1. Harmin kao spoj uzor

### 1.1.1. Harmin kao prirodni produkt

Harmin je drugo ime za 7-metoksi-1-metil-9*H*-pirido-[3,4-*b*] indol,  $\beta$ -karbolinski alkaloid prisutan u biljkama, morskim organizmima, te u nekim vrstama životinja. Prvi put je izoliran iz sirijske rutvice (*Peganum harmala*, *Nitrariaceae*, Slika 1), višegodišnje biljke koja raste u Indiji, Kini, Mongoliji i Turskoj. Osim harmina, u biljci su pronađeni i drugi  $\beta$ -karbolinski alkaloidi poput harmalina, harmola i harmolola. Zajedno nose naziv „harmala“ alkaloidi. Oni se mogu pronaći u svim dijelovima biljke, počevši od korijenja do cvijeta i ploda, međutim najveće koncentracije pronađene su u sjemenkama (Slika 2). Sirijska rutvica koristila se u tradicionalnoj medicini kao abortiv, emenagog, diuretik, antipiretik, halucinogen i laktagog, dok se ekstrakt sjemenki u sjevernom dijelu Kine koristio za liječenje malarije i karcinoma probavnog trakta.



**Slika 1.** *Peganum harmala*, L. *Nitrariaceae* (preuzeto s [https://www.123rf.com/stock-photo/peganum\\_harmala.html](https://www.123rf.com/stock-photo/peganum_harmala.html))

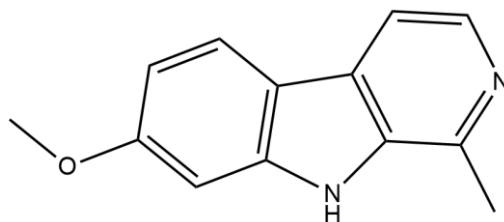


**Slika 2.** Sjemenke vrste *P. harmala* (preuzeto s [https://www.123rf.com/stock-photo/peganum\\_harmala.html](https://www.123rf.com/stock-photo/peganum_harmala.html))

Od ostalih biljnih vrsta bogatih harminom treba spomenuti kineski androfagis (*Andrographis paniculata*, *Acanthaceae*) čiji se listovi i korijen koriste za liječenje dizenterije, dispepsije, malarije i dišnih bolesti te dušnu lozu (*Banisteriopsis caapi*, *Malpighiaceae*) čija se stabljika koristi u pripravcima s neuroprotektivnim učinkom (Javeed i sur., 2018; Onlu i sur., 2018).

### 1.1.2. Fizikalno-kemijska svojstva harmina

Harmin (Slika 3) je po svojoj strukturi triciklički pirido [3,4-b] indol. Bijele je boje, kristaliničnog izgleda te bez mirisa. Izrazito je slabe topljivosti u vodi, dok se u organskim otapalima dobro otapa. Fluorescira pa se može koristiti kao pH indikator, pri pH 7,2 fluorescira plavo dok je pri pH 8,9 boja fluorescencije žuta. Osnovna fizikalno-kemijska svojstva harmina nalaze se u Tablici 1. (<https://en.wikipedia.org/wiki/Harmine>; <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/5280953>; Manske i Holmes, 2014).



**Slika 3.** Struktura harmina

**Tablica 1. Fizikalno-kemijska svojstva harmina**

Molekulska formula	C <sub>13</sub> H <sub>12</sub> N <sub>2</sub> O
Relativna molekulska masa	212,252 g/mol
Gustoća	1.3 g/cm <sup>3</sup>
Talište	264.5 °C
Topljivost u vodi	2,676 mg/L

### 1.1.3. Biološko djelovanje harmina

Harmin pokazuje brojne biološke i farmakološke učinke kao što su: antiproliferativni, antimikrobni, antioksidativni, protuupalni, antidepresivni te neuroprotektivni (Javeed i sur., 2018). Dosad je uspješno dokazana nekolicina mehanizama njegovog djelovanja.

Prvi mehanizam, i za ovaj rad najvažniji, je inhibicija proteina toplinskog šoka 90 (eng. *heat shock protein 90*, Hsp90) kod vrsta roda *Plasmodium*. Proteini toplinskog šoka su vrlo konzervirani molekularni šaperoni (eng. *chaperone*) koji pomažu novosintetiziranim proteinima da poprime terciarnu strukturu koja im osigurava aktivnost. Hsp90 lokaliziran je u citosolu stanice i njegov zadatak je osigurati da tzv. proteini klijenti koji imaju labilnu konformaciju ostanu smotani na pravi način. Kod vrste *P. falciparum*, Hsp90 je jako eksprimiran u eritrocitnoj životnoj fazi te kao takav ima ključnu ulogu u razvoju parazita. Njegovom inhibicijom zaustavlja se razvoj parazita između dvije faze te se tako umanjuje mogućnost za napredak i širenje infekcije. Nadalje, neka istraživanja ukazuju da inhibitori Hsp90 imaju sinergistički učinak s antimalaricima na koje je parazit prethodno razvio rezistenciju. Drugim riječima, inhibitori Hsp90 sprječavaju da se proteini koji su zaduženi za rezistenciju slože na ispravan način i postanu funkcionalni, što omogućuje klasičnim antimalaricima neometano djelovanje. Sekvencioniranjem Hsp90 kod ljudi i vrsta roda *Plasmodium* uočene su razlike koje bi omogućile selektivan učinak na parazita (Murillo-Solano i sur., 2017; Bayih i sur., 2016; Wang i sur., 2016; Biamonte i sur., 2013; Shahinas i sur., 2013; Rodrigues i sur., 2012; <https://www.who.int/>).

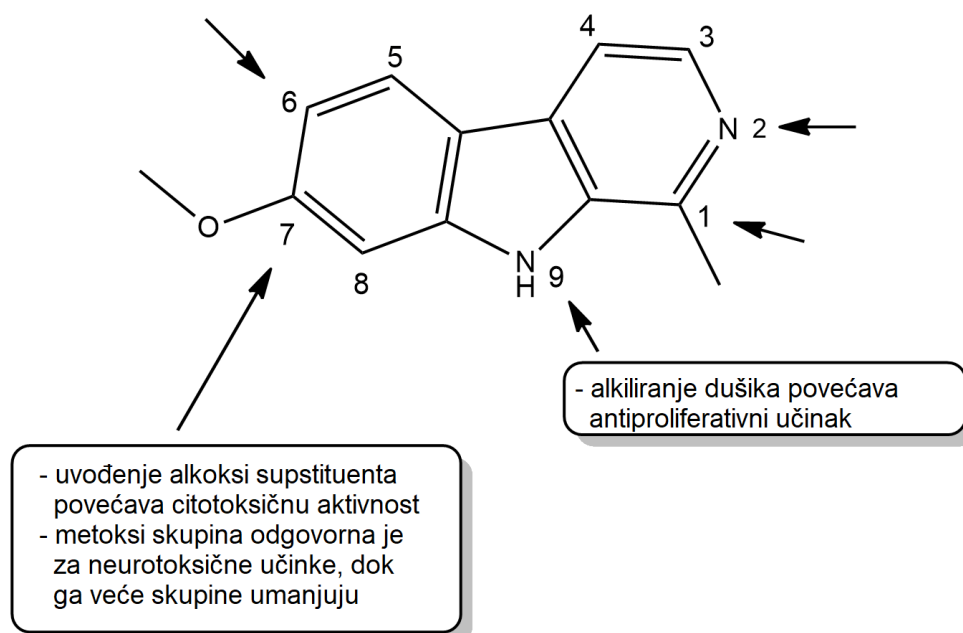
Drugi značajan mehanizam djelovanja harmina je inhibicija monoamino oksidaze A (MAO-A) pa bi harmin mogao biti spoj uzor za nove antidepressive i/ili anksiolitike (Javeed i sur., 2018).

Nadalje, harmin se interkalira u strukturu DNA te inhibira veliki broj različitih enzima, kao što su topoizomeraza I i II, ciklin ovisne kinaze, protein kinaze DYRK1A, PLK1, I $\kappa$ B te tako ostvaruje citotoksičan učinak na stanice različitih tumorskih linija kao što su npr. rak dojke (HBL-100), pluća (A549), kolona (HT-29, HCT-116) i cerviksa (HeLa). Aktivnost protein kinaze DYRK1A je prema novijim istraživanjima ključna za razvitak neurodegenerativnih promjena koje su karakteristične kod Alzheimerove bolesti, pa harmin, zbog svog inhibitornog učinka, može biti spoj uzor u razvoju lijekova koji bi usporili napredovanje te bolesti (Gou i sur., 2018; Pathak i sur., 2018; Ayoob i sur., 2017; Filali i sur., 2016; Frost i sur., 2011).

#### **1.1.4. Derivati harmina i njihovo djelovanje**

Zbog širokog spektra djelovanja, harmin je postao spoj uzor u brojnim istraživanjima, u kojima se modifikacijom njegove strukture žele poboljšati njegova farmakodinamska i farmakokinetička svojstva.

Ishida i suradnici uvodili su različite supstituente na položaje 1, 2, 6, 7 i 9 harmina te ispitivali antiproliferativno djelovanje novih derivata (Slika 4). Uvođenjem alkoksi supstutuenta u položaj 7 povećava se citotoksična aktivnost, a duljina uvedenog alkoksi lanca važna je kako za citotoksičnost tako i za specifičnost djelovanja na određene vrste stanice. Alkiliranje dušika u položaju 9 pojačava antiproliferativno djelovanje *in vivo* i *in vitro*. Naime, prisutnost supsttuenata u položaju 9 olakšava interkalaciju molekule u strukturu DNA, zbog čega se DNA destabilizira te na kraju puca. Metoksi skupina u položaju 7 odgovorna je za neurotoksične učinke, međutim oni značajno slabe ako se metoksi skupina zamijeni većim supstituentima (Ayoob i sur., 2017).



**Slika 4.** Strukturne modifikacije harmina

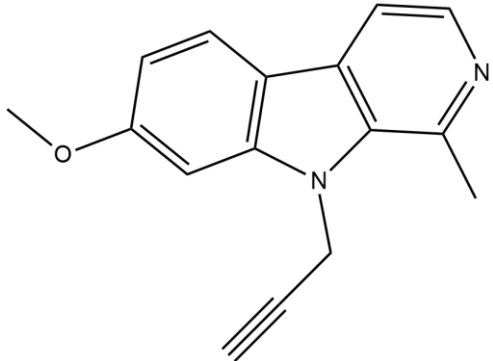
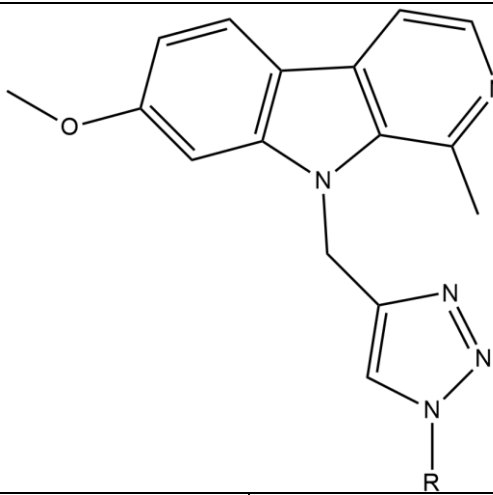
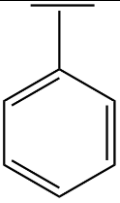
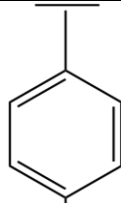
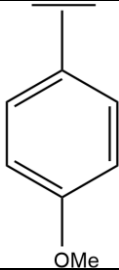
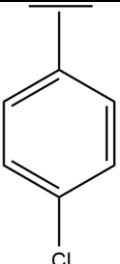
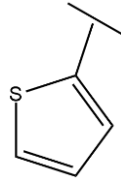
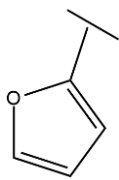
Ayoob i suradnici sintetizirali su triazolne derivate harmina (Tablica 2) čije su citotoksično djelovanje ispitali na nekoliko tumorskih staničnih linija: raku dojke (HBL-100), pluća (A549), kolona (HT-29 i HCT-116) te cerviksa (HeLa). Derivat **A** pokazao je najbolji učinak u svim tumorskim linijama, derivat **B** selektivno je djelovao na stanice raka dojke i pluća, dok je derivat **C** pokazao djelovanje na stanice raka dojke. Derivat **D** je za razliku od derivata **E** pokazao selektivnost prema stanicama raka pluća i kolona. Iz gore navedenih rezultata zaključeno je da uvođenje klora i fluora pojačava antiproliferativni učinak.

**Tablica 2. Triazolni derivati harmina**

OPĆA FORMULA					
	A	B	C	D	E
R					

Filali je sa svojom istraživačkom skupinom sintetizirao različite izoksazolne derivate harmina (Tablica 3) te ispitao njihove antiproliferativne, antikolinergičke te protuupalne učinke. U ispitivanje je bio uključen i alkinski međuprodukt.

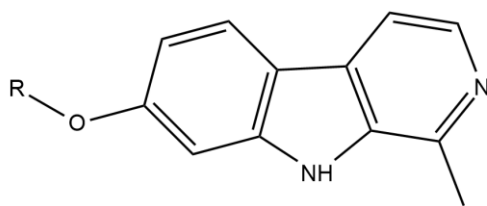
**Tablica 3. Alkinski međuprodukt (1) i izoksazolni derivati (2a-f)**

MEĐUPRODUKT SINTEZE 1			
			
OPĆA FORMULA DERIVATA (2a-f)			
			
	<b>2a</b>	<b>2b</b>	<b>2c</b>
R			
	<b>2d</b>	<b>2e</b>	<b>2f</b>
R			

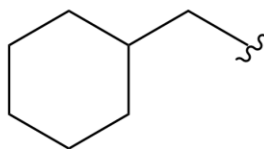
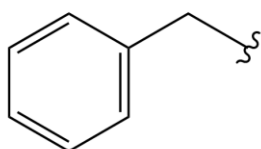
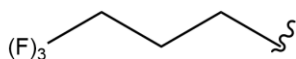
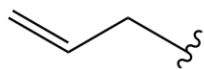


Alkinski međuprodukt **1** pokazao je jako inhibitorno djelovanje za acetilkolin esterazu (AChE), čak 5 puta jače od samog harmina, što nam govori da propargiliranje dušika u položaju 9 harmina značajno povećava inhibitornu aktivnost prema AChE. Derivat **2f** također je pokazao inhibirajući učinak na AChE, međutim nešto slabiji od međuprodukta **1**, dok **2c** i **2d** nisu pokazali nikakav učinak. Nadalje, međuprodukt **1** i derivat **2c** pokazali su pozitivan učinak u ispitivanjima protuupalnog djelovanja, kao inhibitori 5-lipooksigenaze (5-LOX), jednog od ključnih enzima upalnih procesa. Što se tiče inhibiranja ksantin oksidaze (XOD), enzima koji je ključan kod ozljeda krvnih žila i kroničnog zatajenja srca, iako sam harmin pokazuje srednje jako inhibitorno djelovanje, niti jedan od izoksazolnih derivata nije pokazao inhibitorno djelovanje (Filali i sur., 2016).

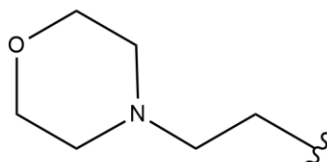
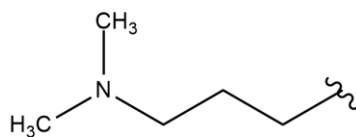
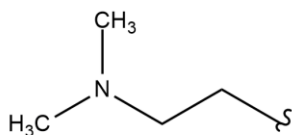
Harmin se pokazao kao vrlo jak i selektivni inhibitor MAO-A izoforme enzima, dok istovremeno gotovo uopće ne djeluje na MAO-B izoformu enzima. Ovo otkriće vrlo je značajno, jer postojeći inhibitori MAO ne djeluju selektivno prema određenoj izoformi, zbog čega se tijekom njihove primjene javljaju nuspojave (ortostatska hipotenzija, nesаница, mučnina, edemi, mialgija, spazam, seksualna disfunkcija) (www.drugs.com; Fiedorowicz i Swartz, 2004). Reniers i suradnici su pokušali sintetizirati derivate harmina koji će također biti selektivni inhibitori MAO-A izoforme enzima. Većina derivata koji su sintetizirani u ovom istraživanju pokazali su da jače inhibiraju MAO-A izoformu. Derivati kojima je *O*-alkilacijom uvedena lipofilna skupina, npr. alifatski lanac, cikloheksilni i benzenski prsten, imaju jači inhibitorni učinak od samog harmina (Slika 5). Najaktivniji od svih je derivat koji sadrži trifluorobutiloksi skupinu ( $K_i = 3,6$  nM). Uvođenjem hidrofilnijih skupina kao što su dimetilaminoetilna, dimetilaminopropilna i etilmorfolinska značajno se smanji inhibitorno djelovanje. Također zamjena metoksi skupine hidroksilnom nije pokazala nikakvu razliku u inhibiciji (Reniers i sur., 2010).



skupine koje povećavaju inhibitorno djelovanje



skupine koje smanjuju inhibitorno djelovanje

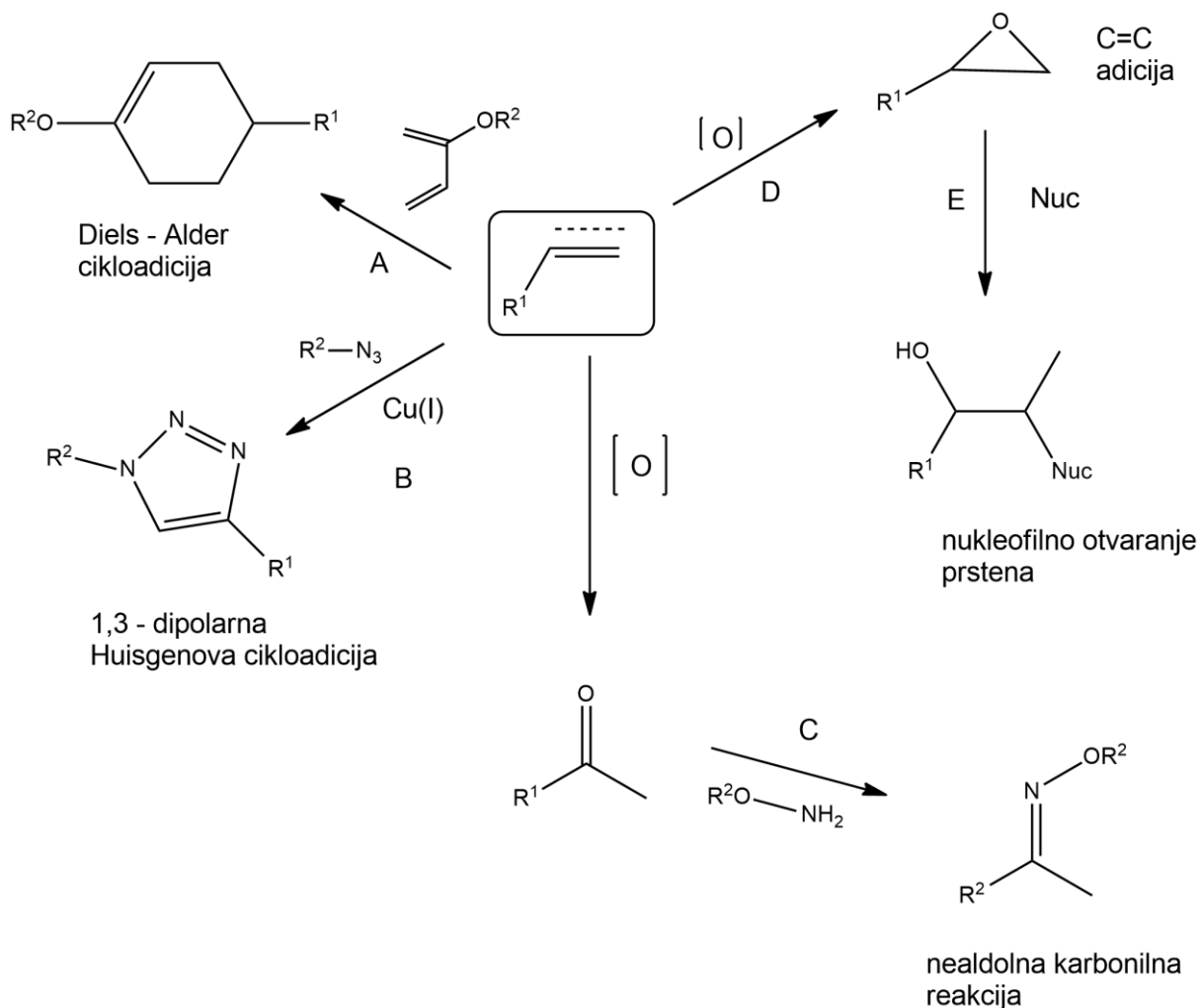


Slika 5. Inhibitori MAO-A izoforme enzima

## 2.1. „Click“ kemija

Dosadašnja nastojanja da se kemijskim reakcijama u kojima nastaju C-C veze stvore lijekovi, koji su svojom strukturom, ali i djelovanjem nalik na spojeve pronađene u prirodi, poput primarnih i sekundarnih metabolita živih organizama, doveli su do izrazito sporog razvoja novih lijekova. Na taj način može nastati otprilike 35 građevnih blokova koji se mogu koristiti za sintezu kompleksnijih spojeva. Te sinteze iznimno su komplicirane, zahtjevaju specifične enzime i uvjete u kojima se provode, a povrh svega zahtijevaju vrijeme kojeg vrlo često nema. Kako bi olakšali i ubrzali razvoj lijekova znanstvenici Kolb, Finn i Sharpless predstavili su „click“ kemiju. „Click“ kemija naziv je novog pristupa kojim se pokušavaju sintetizirati različite supstance spajanjem malih jedinica koristeći heteroatome kao poveznice (C-X-C veze). Cilj je stvoriti što veći broj molekula koje će se moći koristiti kao građevni blokovi u sintezi kako malih tako i velikih i kompleksnih spojeva. Određeni su vrlo strogi kriteriji koje reakcije moraju zadovoljiti kako bi se mogle nazvati „click“ reakcijama. Reakcija mora biti širokog područja primjene, visokog iskorištenja, stereoselektivna te je dopušteno nastajanje isključivo onih nusprodukata koji neće ometati izolaciju glavnog produkta. Uvjeti u kojima se reakcija izvodi moraju biti jednostavni (bilo bi idealno kad bi proces bio neosjetljiv na kisik i vodu), a početni reagensi i materijali lako dostupni. Poželjno je da se reakcija izvodi bez otapala, ali toleriraju se otapala koja su benigna (npr. voda) te otapala koja se mogu lako ukloniti. Važno je da se produkt reakcije može lako izolirati, a u slučaju da ipak postoji potreba za pročišćavanjem, dozvoljeno je koristiti nekromatografske metode, npr kristalizaciju ili destilaciju. Osim toga, produkt mora biti stabilan u fiziološkim uvjetima (Kolb i sur., 2006).

Neki od primjera „click“ reakcija prikazanih na Shemi 1 su cikloadicijske reakcije (Diels-Alderove te 1,3 dipolarne cikloadicije; reakcije A i B), nealdolni tipovi karbonilnih reakcija (nastajanje uree, oksima itd; reakcija C), adicije na nezasićene C=C veze (najznačajnije su oksidativne adicije; reakcija D) te reakcije otvaranja prstena (epoksidi, aziridini, itd; reakcija E) (Moses i Moorhouse, 2007).

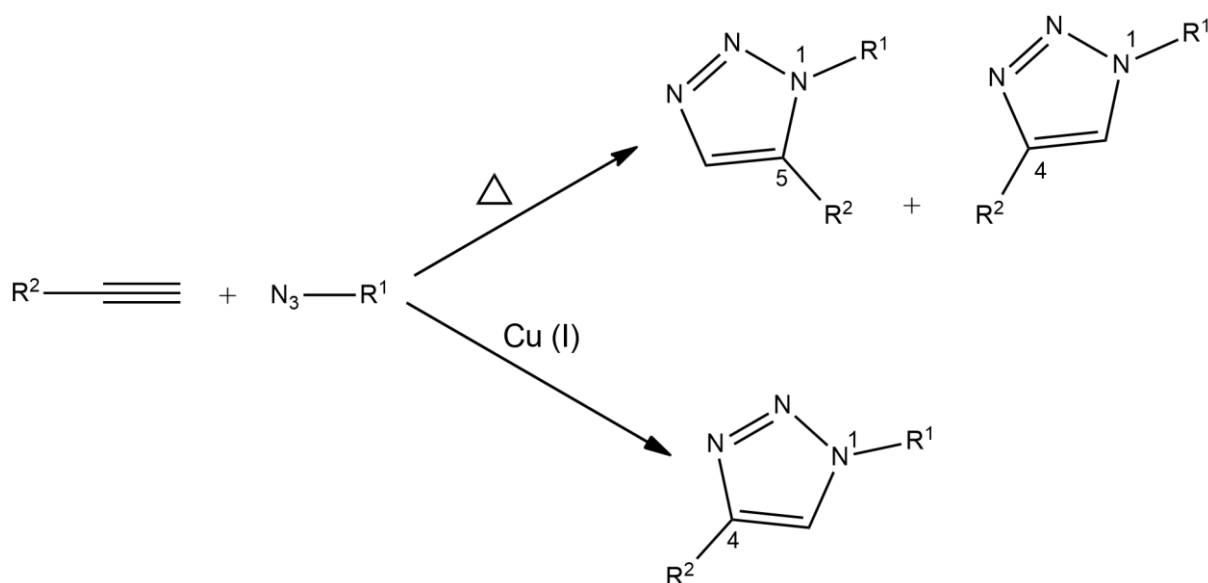


Shema 1. Primjeri „click“ reakcija

### 2.1.1. Huisgenova 1,3-dipolarna cikloadicija katalizirana Cu(I)

Huisgen je bio prvi koji je predstavio 1,3-dipolarnu cikloadicijsku reakciju između alkina i azida kojom nastaju 1,2,3-triazoli. Alkini i azidi spojevi su visoke kinetičke stabilnosti, inertni u većini bioloških i organskih uvjeta, tako da bi se reakcija među njima odvijala izrazito sporo, te bi se morala izvoditi pri vrlo povišenim temperaturama. Također, kao produkt reakcije nastajala bi smjesa 1,4- i 1,5-regioizomera. Znanstvenici Meldal i Sharpless su, svaki sa svojom grupom znanstvenika, neovisno otkrili kako se dodatkom bakrovih (I) soli značajno povisuje regioselektivnost Huisgenove reakcije što rezultira nastajanjem isključivo 1,4-regioizomernog produkta (Shema 2). Također, reakcija se ubrzava čak do  $10^7$  puta, čime je omogućeno izvođenje reakcije na sobnoj temperaturi. Ova reakcija visokog postotka iskorištenja

primjenjiva je za raznolike početne reaktante sa funkcionalnim skupinama koje nije potrebno prethodno zaštititi te osigurava produkt kojem je potrebno minimalno pročišćavanje. Posljednja istraživanja ukazuju da se dodatkom heterocikličkih liganada, poput tri-(1,2,3-triazol) amina koji stabilizira bakar, poboljšava njegova katalitička aktivnost, a samim time se poboljšava iskoristivost te skraćuje trajanje reakcije. Bakrom (I) katalizirana azid-alkin cikloadicija, zbog gore navedenih razloga, danas je primjer idealne „click“ reakcije (Bock i sur., 2006; Lee i sur., 2006; Himo i sur., 2005; Kolb i sur., 2001).

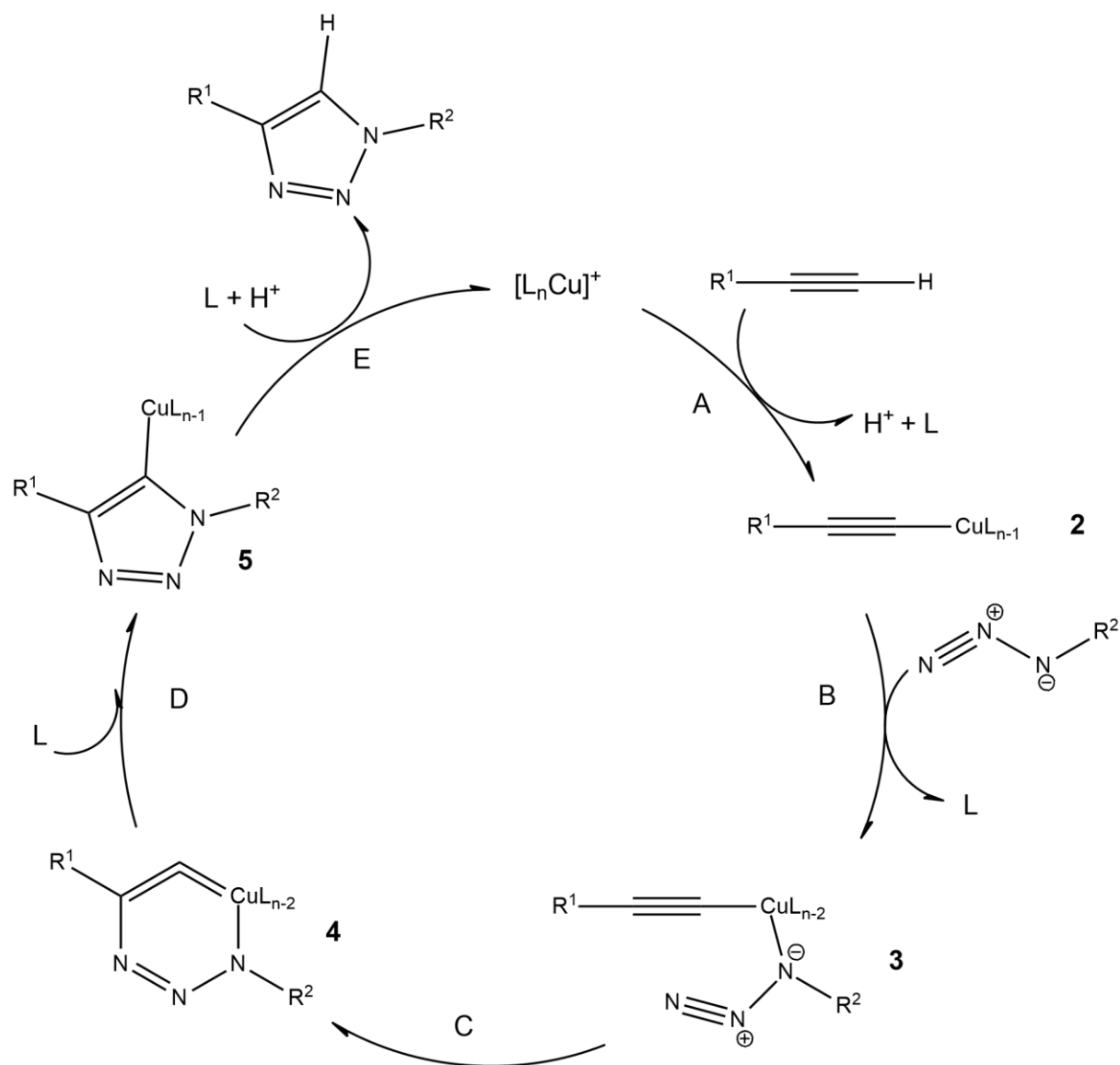


**Shema 2.** Shema Huisgenovih cikloadicija

### 2.1.2. Mehanizam bakrom (I) katalizirane azid-alkin cikloadicije

Bakrom (I) katalizirana azid-alkin cikloadicija može se izvoditi u različitim otapalima, u širokom području pH (4-12) te pri različitim temperaturama (0-160 °C). Reaktanti mogu biti veliki broj različitih supstrata, a područje primjene je vrlo široko (Bock i sur., 2006). Fokin, Sharpless i suradnici dali su incijalno objašnjenje mehanizma (Shema 3). Reakcija započinje koordinacijom alkina na bakar (I) pri čemu nastaje bakrov (I) acetilid **2**. U sljedećem koraku, azid preko dušika na kojem je vezan supstituent R stupa u interakciju s bakrom pri čemu nastaje intermedijer **3**. Intermedijer **3** se nakon nastajanja prve C-N veze transformira u šesteročlani prsten **4**. U tom koraku dolazi do oksidacije bakra iz oksidacijskog stanja +1 u +3. Potom

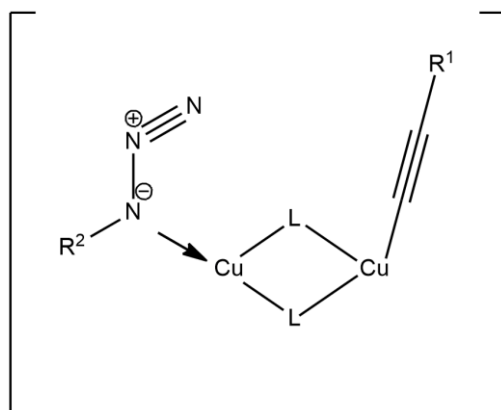
slijedi kontrakcija prstena uz redukciju bakra ponovno do oksidacijskog stanja +1 kako bi nastao bakrov (I) triazolid **5**. U zadnjem koraku dolazi do protoniranja triazolida i formira se 1,2,3-triazol (Zhu i sur., 2016).



**Shema 3.** Inicijalni mehanizam bakrom (I) katalizirane azid-alkin cikloadicije

Daljnijm proučavanjem mehanizma, ustanovljeno je da korak **C** u kojem se formira šesteročlani prsten zahtjeva visoku aktivacijsku energiju. Kinetička istraživanja i računalna modeliranja koja su provedena kako bi bolje razjasnila taj korak, pokazala su da uvođenje dodatnog iona bakra značajno snižava aktivacijsku barijeru reakcije. U tom slučaju, dva iona bakra povezana

su vezujućim ligandom, jedan bakrov ion tvori acetilid, dok drugi kompleksira azid i aktivira ga, te istovremeno uzrokuje preraspodjelu elektronske gustoće oko alkinskog dijela molekule i povećava reaktivnost cijelog acetilida (Slika 6) (Ben El Ayouchia i sur., 2018; Zhu i sur., 2016; Worrell i sur., 2013; Bock i sur., 2006). Također, prisutnost dva bakrena iona značajno olakšava pravilno orijentiranje supstrata za cikloadiciju.

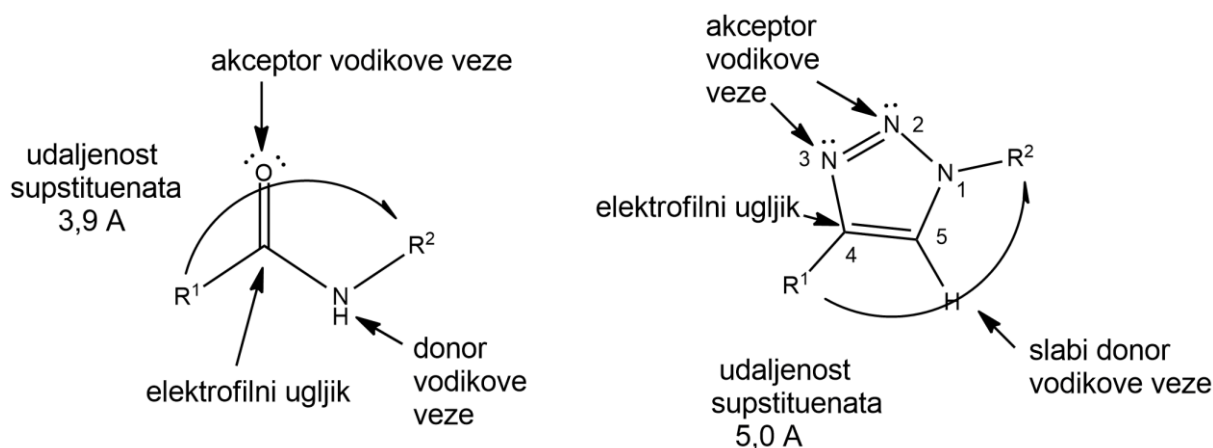


**Slika 6.** Novopretpostavljeni izgled intermedijera **3**

### 2.2.1. 1,2,3-Triazoli

1,2,3-Triazoli su peteročlani heterocikli koji nastaju kao produkti bakar-katalizirajuće azid-alkin ciklizacije (eng. *copper-catalyzed azide-alkyne cyclization*, CuAAC). Posjeduju i bazična i kisela svojstva te nisu protonirani pri fiziološkom pH. Imaju jaki dipolni moment (5,2-5,6 Debye), pokazuju visoku aromatsku stabilnost te su dobri akceptori vodikovih veza. Vrlo su otporni na metaboličke i kemijske razgradnje, te su inertni u hidrolitičkim, oksidacijskim i redukcijским uvjetima, čak i pri vrlo visokim temperaturama. Vodikove veze i dipolne interakcije koje mogu formirati, omogućuju vezanje na brojne biomolekularne mete. Bioizosteri su amidne veze, međutim ipak postoje neke strukturne razlike između triazolnog prstena i amidne veze, kao npr. jedan dodatni atom u triazolnoj osnovici zbog čega se udaljenost između supstituenata na triazolnom prstenu povećava za 1,1 Å (5,0 Å) u odnosu na udaljenost supstituenata amidne veze (3,9 Å) (Slika 7). Triazolni prsten je akceptor vodikovih veza, upravo zbog svojih  $sp^2$  hibridiziranih dušikovih atoma N2 i N3 te slobodnog elektronskog para, a jaki dipolni moment triazola polarizira proton C5 atoma koji se onda ponaša kao slabi donor

vodikovih veza, slično kao NH u amidnoj vezi. C4 atom triazolnog prstena sličan je karbonilnom ugljiku amidne veze jer su oba elektrofilni (Raić-Malić i Meščić, 2015; Lauria i sur., 2014 ; Hou i sur., 2012; Bock i sur., 2006).



**Slika 7.** Usporedba amidne veze i 1,2,3-triazola

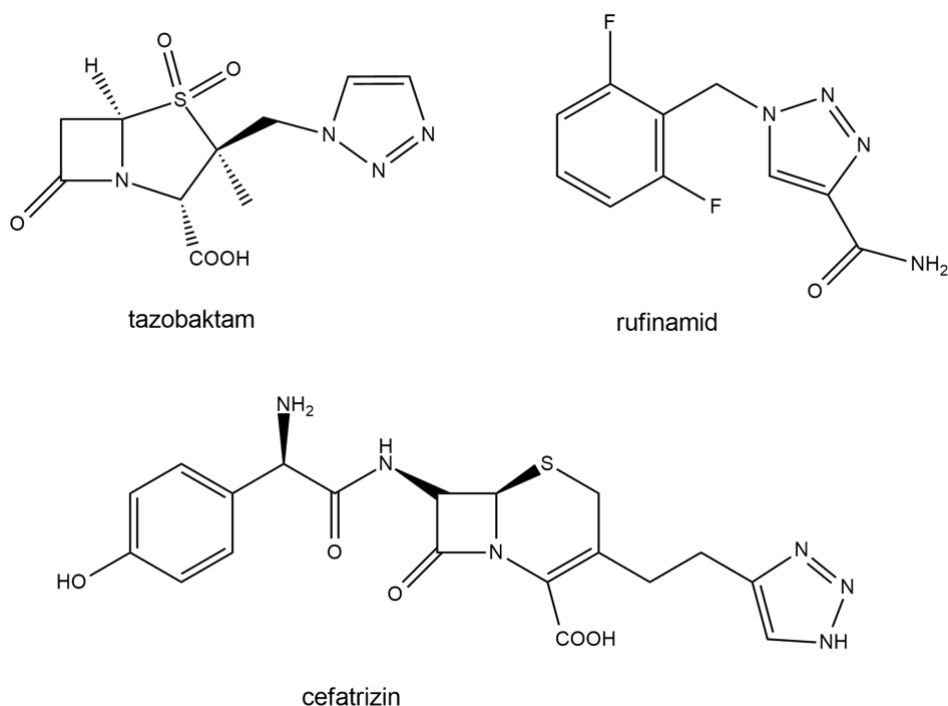
Triazoli su i bioizosteri aromatskih prstenova te dvostruke veze. Uvelike su korisni i kao krute poveznice među atomima, primjerice kod povezivanja farmakofora u homodimerne ili heterodimerne lijekove ili pak stvaranja bidentatnih lijekova, kod kojih se spajaju molekule koje se vežu na dva različita vezna mjesta na istoj meti, sve sa svrhom povećavanja aktivnosti lijeka (Raić-Malić i Meščić, 2015; Hou i sur., 2012).

### 2.2.2. Biološko djelovanje 1,2,3-triazola

Neki derivati 1,2,3-triazola već se koriste kao lijekovi za liječenje različitih bolesti, kao na primjer tazobaktam, cefatrizin i rufinamid. Tazobaktam je inhibitor  $\beta$ -laktamaze koji se najčešće kombinira s piperacilinom, penicilinom širokog spektra djelovanja, kako bi mu pojačao učinak. Osim toga, pokazuje jači učinak od klavulanske kiseline i sulbaktama, također inhibitora  $\beta$ -laktamaze. Cefatrizin je polusintetski cefalosporinski antibiotik koji izvrsno djeluje na Gram pozitivne bakterije te vrste *E. coli*, i *Salmonella* sp., a rufinamid je antikonvulziv koji



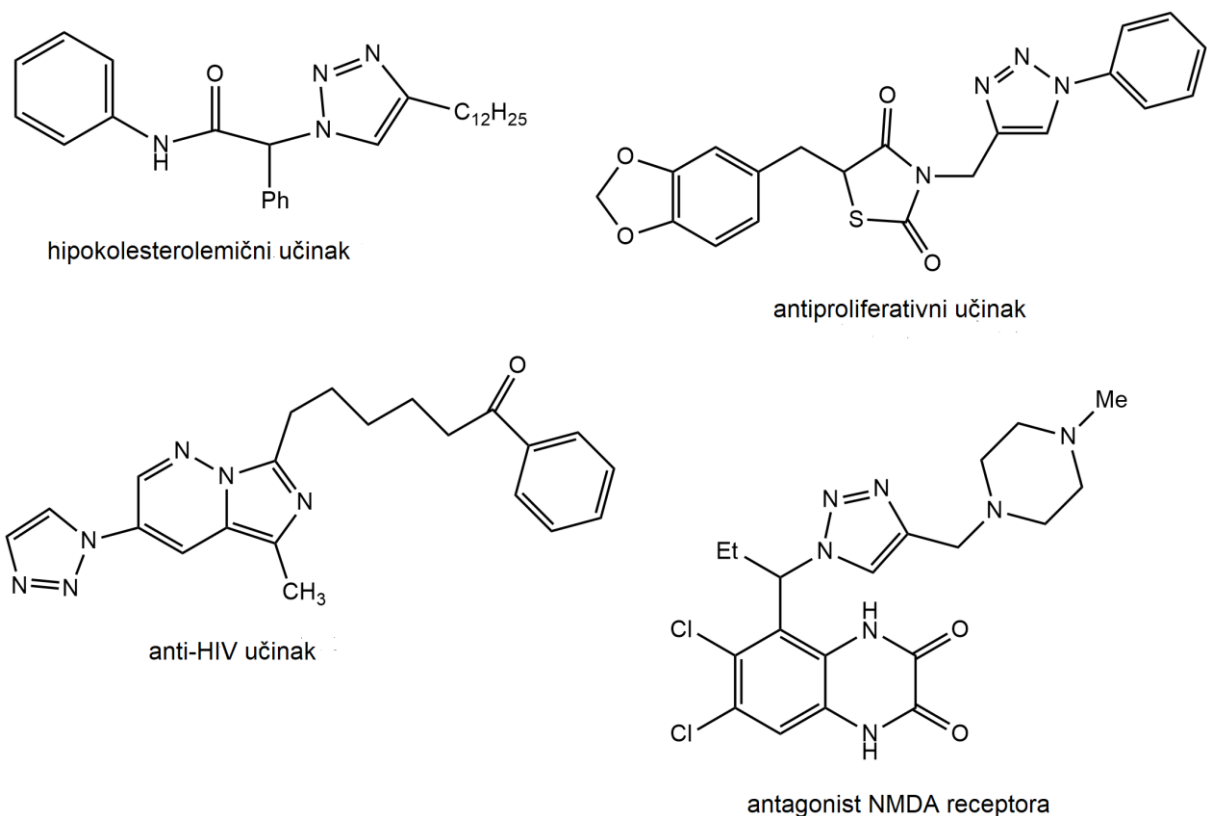
se koristi za terapijsko liječenje Lennox-Gastautov-a sindroma te nekih oblika epileptičnih napada (Slika 8).



**Slika 8.** Lijekovi; derivati 1,2,3-triazola

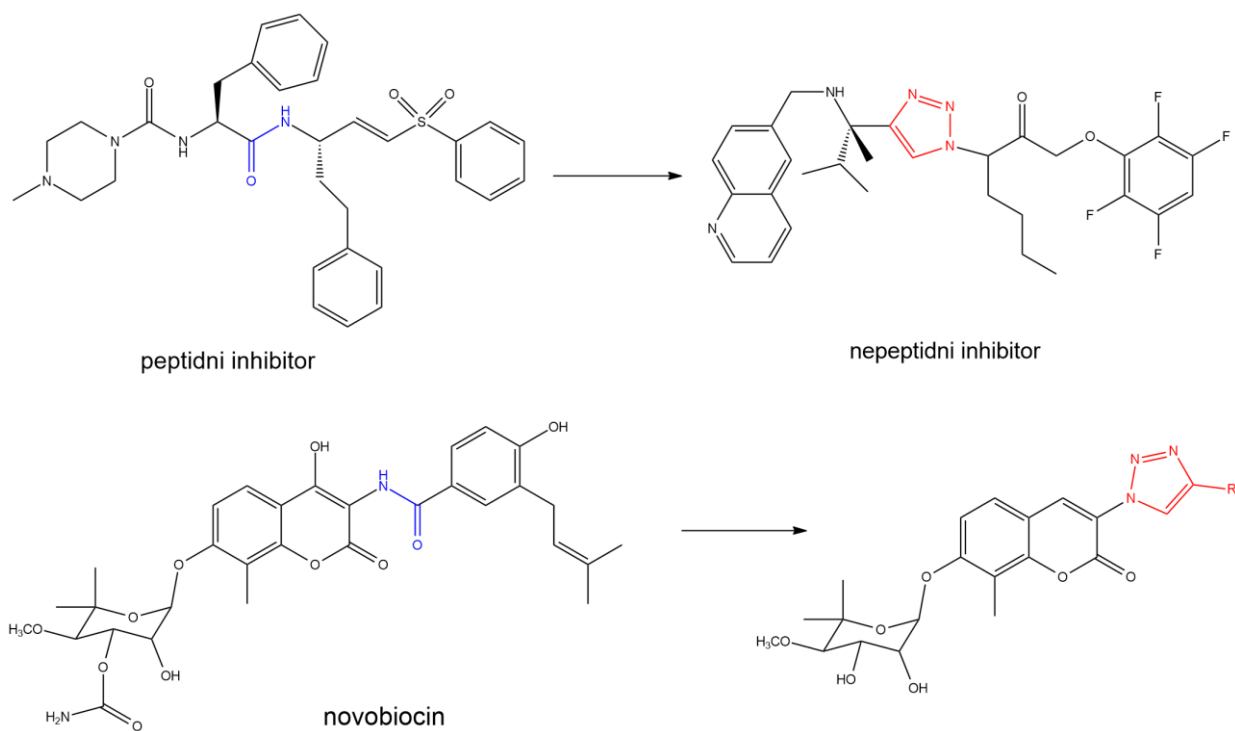
Također, postoji i nekolicina triazolskih derivata koji se kao potencijalni lijekovi nalaze u različitim fazama kliničkih ispitivanja (Faraz i sur., 2017; Agalave i sur., 2011; Kharb i sur., 2010; [www.drugs.com](http://www.drugs.com)).

Derivati 1,2,3-triazola dosad su pokazali veliki terapijski potencijal u različitim poljima; pokazuju antiproliferativno, protuupalno, analgetsko, anti-HIV, antimikrobno, antikonvulzivno, antituberkulozno, antiparazitsko, antitrombotsko, antidepresivno te antivirusno djelovanje (Slika 9). Inhibiraju enzime kao što su histonska deacetilaza, fosfodiesteraza-4 (PDE-4), alkalne fosfataze, cistein proteaza i acetilkolinesteraza. Također se primjenjuju i u pripravi glikokonjugata te u modifikacijama proteina i DNA (Dheer i sur., 2017).



**Slika 9.** Derivati 1,2,3-triazola koji pokazuju različita farmakološka djelovanja

S obzirom da su 1,2,3-triazoli bioizosteri amidne veze, znanstvenici su iskoristili tu činjenicu u svrhu pretvaranja peptidnih molekula u peptidomimetike krute strukture koji su otporni na djelovanje proteaza, čime bi se povećala stabilnost i vrijeme poluraspada molekule u fiziološkim uvjetima organizma, što je vrlo važno u razvoju lijekova (Shankaraiah i sur., 2015). Ellman i suradnici su sintetizirali nepeptidne inhibitore „Cruzain“ proteina kao potencijalne lijekove za Chagasovu bolest, upravo zamjenom amidne veze triazolnim prstenom. Druge istraživačke skupine modificirale su molekule ceramida, novobiocina te neke cikličke peptide uvođenjem triazolnog prstena umjesto amidne veze, čime su poboljšale učinak i stabilnost spojeva (Slika 10) (Hou i sur., 2012).



**Slika 10.** Modifikacije peptidnog inhibitora „Cruzain“ proteina kao potencijalnog lijeka za Chagasovu bolest i novobiocina

Zbog širokog raspona njihovog terapijskog potencijala, jednostavne sinteze te vrlo zahvalnih fizikalno-kemijskih svojstava 1,2,3-triazola, možemo očekivati i porast broja triazolnih derivata koji će se naći u terapiji kao novi ljekoviti oblici.

## **2. OBRAZLOŽENJE TEME**

Malarija je jedna od najopasnijih bolesti tropskih i subtropskih područja koju uzrokuju paraziti roda *Plasmodium*. Za čovjeka su opasne četiri vrste: *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. ovale* i *P. malariae*. Prijenosnici bolesti su komarci roda *Anopheles*. Simptomi bolesti javljaju se 10 do 15 dana nakon ugriza komarca, a uključuju porast tjelesne temperature (čak i do 41,5 °C), groznicu, glavobolje i povraćanje. Ukoliko se ne započne s terapijom na vrijeme, može doći do pogoršanja stanja, pojave anemije, akutnog respiratornog zatajenja, hipoglikemije, zatajenja bubrega, plućnog edema i napadaja koji mogu rezultirati komom.

Prema procjenama Svjetske zdravstvene organizacije (WHO), 2017. godine broj oboljelih od malarije iznosio je 219 milijuna ljudi, dok je broj smrtnih slučajeva uzrokovan malarijom iste godine iznosio preko 435 000. 80 % oboljelih nalazi se u Subsaharskoj Africi, a 60% umrlih čine djeca mlađa od 5 godina.

Veliki problem predstavlja rezistencija koju su paraziti razvili na dosad korištene antimalarike, posebice na klorokin koji se koristio kao prva linija liječenja, a u porastu je i broj slučajeva sa rezistencijom na liječenje koje uključuje istovremeno korištenje nekoliko antimalarika različitog mehanizma djelovanja, kao na primjer kombinacije s artemisinom. Zbog svega navedenog, potraga za novim antimalaricima koji će djelovati na rezistentne sojeve i neće uzrokovati ozbiljne nuspojave, u fokusu je istraživanja mnogih istraživačkih skupina u svijetu, pa tako i na Zavodu za farmaceutsku kemiju, Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta u Zagrebu.

Harmin je  $\beta$ -karbolinski alkaloid koji pokazuje širok spektar djelovanja, između ostalog i antimalarijski učinak za koji se pretpostavlja da je posljedica inhibicije proteina toplinskog šoka kod vrsta roda *Plasmodium*.

Cimetna kiselina, odnosno 3-fenilprop-2-enska kiselina, i njezini derivati, prirodni su spojevi koji su najzastupljeniji u vrstama roda *Cinnamomum* iz porodice *Lauraceae*. Pokazuju raznolika biološka djelovanja, te je u literaturi opisano njihovo antimalarijsko, antimikrobno, antioksidativno, antidijabetičko, hepatoprotektivno, antidepresivno, protuupalno i citostatko djelovanje.

Cilj ovog rada je sinteza i karakterizacija novih 1,2,3-triazolnih derivata harmina koji u svojoj strukturi sadrže derivate cimetne kiseline, kao potencijalnih antimalarika.

Novosintetizirani derivati produkti su Huisgenove 1,3-dipolarne cikloadicije katalizirane Cu(I) pa u svojoj strukturi sadrže 1,2,3-triazolni prsten kao poveznicu između  $\beta$ -karbolinskog i

cimetnog dijela molekule. Visoka stabilnost te dobra fizikalno-kemijska svojstva triazolnih prstenova dodatno poboljšavaju farmakodinamička i farmakokinetička svojstva novih derivata.

U daljnim istraživanjima koja prelaze okvire ovog rada, ovim spojevima bit će ispitano antimalarijsko i citotoksično 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 Paragon FT-IR spektrometru (Perkin Elmer, UK).  $^1\text{H}$  i  $^{13}\text{C}$  NMR spektri snimljeni su na Bruker AV-400 (Bruker, SAD) kod 400 MHz za  $^1\text{H}$  i kod 101 MHz za  $^{13}\text{C}$ . Uzorci su mjereni u DMSO- $d_6$  otopinama na 20 °C u NMR cjevčicama od 5 mm. Kemijski pomaci dani su u ppm u odnosu na tetrametilsilan (TMS) kao unutarnji standard. Spektri masa snimljeni su na HPLC-MS/MS (Agilent Technologies Triple Quadripole 6420).

Tijek reakcija i čistoća produkata praćeni su tankoslojnom kromatografijom (TLC). Za TLC su upotrijebljene silikagel ploče 60 F 254 (Merck, Njemačka), te petroleter/etilacetat (2:1), cikloheksan/etilacetat/metanol (3:1:0,5 i 1:1:0,5), cikloheksan/etilacetat (9:1 i 2:1) i diklormetan/metanol (9,7:0,3 i 9,5:0,5) kao pokretne faze. Za kromatografiju na koloni kao nepokretna faza korišten je silikagel veličine čestica 0,063–0,200 mm (Kemika, Hrvatska) uz iste pokretne faze kao i u tankoslojnoj kromatografiji. Analizirani spojevi detektirani su UV zračenjem ( $\lambda = 254 \text{ nm}$ ) i parama joda.

Harmin, 4-fluorocimetna kiselina, tionil klorid, litij aluminij hidrid, 2-azido-1,3-dimetilimidazolinheksafluorofosfat (ADMP), 1,8-diazabicyklo[5.4.0]undeka-7-en (DBU), bromovodična kiselina, natrijev hidrid, propargil bromid, bezvodni eter, cezijev karbonat i nabavljeni su od tvrtke Sigma-Aldrich (SAD), trietilamin (TEA) i bakrov (II) acetat nabavljeni su od tvrtke Alfa-Aesar (SAD), a 3,4-difluorocimetna kiselina od tvrtke TCI Chemicals (Japan).

Bezvodna otapala dobivena su sljedećim postupcima. Bezvodni toluen: toluen je ekstrahiran vodom, zatim je osušen nad bezvodnim kalcijevim kloridom, destilirana i čuvan nad natrijem. Bezvodni dimetilformamid (DMF): smjesa 1L DMF-a i 100 mL bezvodnog toluena destilirana je, pri čemu prvo destilira azeotropna smjesa toluena i vode, a zatim čisti DMF. Čuvan je nad aktiviranim molekulskim sitima. Bezvodni diklormetan: diklormetan je ekstrahiran vodom, sušen iznad kalcijeva klorida i predestilirana. Sve ostale kemikalije bile su *p. a.* čistoće.



### 3.1. Sinteza etilnih estera derivata cimetine kiseline (1a,b)

Otopini 0,3 mmola odgovarajućeg derivata cimetine kiseline (CAD, *cinnamic acid derivatives*) u 10 mL suhog toluena dodano je 3 kapi suhog DMF-a i 1,1 mL (1,78 g, 0,015 mol) tionil klorida na s.t. Nakon 1h tionil klorid je uparen pod sniženim tlakom te je reakcijska smjesa naparena dva puta suhim toluenom koji je zatim uparen do suha pod sniženim tlakom. Dobiveni klorid odgovarajuće cimetine kiseline korišten je u slijedećem reakcijskom koraku bez pročišćavanja.

Otopina klorida odgovarajuće cimetine kiseline u suhom diklormetanu dokapana je otopini 0,419 mL TEA (0,304 g, 0,3 mmol) u 5 mL apsolutnog etanola na s.t. Nakon 1 h reakcijska smjesa je uparena do suha pod sniženim tlakom te je ekstrahirana vodom ( $2 \times 20$  mL) iz etilacetata (20 mL). Organski sloj je osušen nad bezvodnim Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, filtriran i uparen pod sniženim tlakom.

#### 3.1.1. Sinteza etil (2E)-3-(4-fluorofenil)prop-2-enoata (1a)

Nakon pročišćavanja kromatografijom na koloni uz pokretnu fazu diklormetan/metanol (9,5:0,5), dobiven je spoj **1a** koji je upotrebljen u daljnim reakcijama.

#### 3.1.2. Sinteza etil (2E)-3-(3,4-difluorofenil)prop-2-enoata (1b)

Nakon pročišćavanja kromatografijom na koloni uz pokretnu fazu diklormetan/metanol (9,5:0,5), dobiven je spoj **1b** koji je upotrebljen u daljnim reakcijama.

### 3.2. Sinteza alkohola derivata cimetine kiseline (2a,b)

Otopina 2,5 mmol odgovarajućeg CAD estera (**1a,b**) u suhom THF-u je ohlađena na -5 °C i propuhana argonom. Otopini je na -5 °C dodano 0,111 g (2,5 mmol) LiAlH<sub>4</sub>. Nakon 1 h na -5 °C reakcija je prekinuta dodatkom vode (20 mL) te je zakiseljena s nekoliko kapi 20% klorovodične kiseline do prestanka pjenjenja. Smjesa je ekstrahirana eterom ( $2 \times 20$  mL). Organski slojevi su sakupljeni i ekstrahirani vodom ( $2 \times 20$  mL), osušeni nad bezvodnim Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, filtrirani i upareni pod sniženim tlakom.

### 3.2.1. Sinteza (2E)-3-(4-fluorofenil)prop-2-en-1-ola (2a)

Količina estera **1a** : 0,511 g.

Nakon pročišćavanja kromatografijom na koloni uz pokretnu fazu cikloheksan/etilacetat (2:1), dobiveno je 0,209 g spoja **2a**.

Iskorištenje: 0,209 g (48 %).

### 3.2.2. Sinteza (2E)-3-(3,4-difluorofenil)prop-2-en-1-ola (2b)

Količina estera **1b** : 0,536 g.

Nakon pročišćavanja kromatografijom na koloni uz pokretnu fazu cikloheksan/etilacetat (2:1), dobiveno je 0,182 g spoja **2b**.

Iskorištenje: 0,182 g (43%).

## 3.3. Sinteza azida derivata cimetine kiseline (3a,b)

Otopina 1,07 mmola odgovarajućeg alkohola (**2a,b**) u 4 mL suhog THF-a je ohlađena na 0 °C. Otopini je na 0 °C dodano 0,365 g (1,28 mmol) ADMP-a i 0,171 mL (0,174 g, 1,39 mmol) DBU. Reakcijska smjesa miješana je 10 minuta na 0 °C. Reakcijskoj smjesi dodana je zasićena otopina NH<sub>4</sub>Cl (20 mL) te je ekstrahirana diklormetanom (2 × 20 mL). Organski slojevi su sakupljeni i ekstrahirani zasićenom otopinom NaCl (2 × 20 mL), osušeni nad bezvodnim Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, filtrirani i upareni pod sniženim tlakom.

### 3.3.1. Sinteza 1-[(1E)-3-azidoprop-1-en-1-il]-4-fluorobenzena (3a)

Količina alkohola **2a**: 0,209 g.

Nakon pročišćavanja kromatografijom na koloni uz pokretnu fazu cikloheksan/etilacetat (9:1), dobiven je spoj **3a** kao uljasti produkt.

Iskorištenje: 0,097 g (51 %).

IR (KBr)  $\nu_{\max}$  3041, 2926, 2869, 2101, 1602, 1506, 1350, 1230, 968, 845, 804, 771 cm<sup>-1</sup>.

$^1\text{H}$  NMR (400 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  7.63–7.48 (m, 2H, 5, 9), 7.24–7.13 (m, 2H, 6, 8), 6.71 (d, 1H, 3,  $J = 15.9$  Hz), 6.35 (dt, 1H, 2,  $J = 15.8, 6.6$  Hz), 4.03 (dd, 2H, 1,  $J = 6.5, 0.9$  Hz).

$^{13}\text{C}$  NMR (101 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  161.87 (d, 7,  $J = 245.0$  Hz), 132.55 (3), 132.45 (4), 128.52 (d, 5, 9,  $J = 8.3$  Hz), 123.05 (2), 115.55 (d, 6, 8,  $J = 21.5$  Hz), 52.09 (1).

### 3.3.2. Sinteza 4-[(1*E*)-3-azidoprop-1-en-1-il]-1,2-difluorobenzena (**3b**)

Količina alkohola **2b**: 0,182 g.

Nakon pročišćavanja kromatografijom na koloni uz pokretnu fazu cikloheksan/etilacetat (9:1), dobiven je spoj **3b** kao uljasti produkt.

Iskorištenje: 0,124 g (59 %).

IR (KBr)  $\nu_{\text{max}}$  3038, 2928, 2070, 2102, 1604, 1516, 1434, 1294, 1275, 1212, 1147, 1115, 966, 872, 773  $\text{cm}^{-1}$ .

$^1\text{H}$  NMR (400 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  7.68–7.62 (m, 1H, 9), 7.45–7.31 (m, 2H, 5, 6), 6.68 (d, 1H, 3,  $J = 15.8$  Hz), 6.44 (dt, 1H, 2,  $J = 15.8, 6.4$  Hz), 4.05 (d, 2H, 1,  $J = 6.4$  Hz).

$^{13}\text{C}$  NMR (101 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  150.95–147.49 (6, 7), 133.85 (4), 131.36 (3), 124.87 (9), 123.74 (2), 117.67 (d, 8,  $J = 17.2$  Hz), 114.98 (d, 5, 17.5 Hz), 51.90 (1).

### 3.4. Sinteza harmola (**4**)

Otopina 0,250 g harmina (1,178 mmol) u 3 mL octene kiseline i 1,5 mL 47% HBr miješani su u mikrovalnom reaktoru (MW) 20 minuta (130 °C, 150W). Reakcijska smjesa je zatim dodana u 100 mL destilirane vode te je dokapavanjem 5% NaOH zalužena do pH oko 9. Smjesa je ekstrahirana s etil-acetatom (3 × 30 mL). Organski slojevi su sakupljeni, osušeni nad bezvodnim natrijevim sulfatom, filtrirani te upareni pod sniženim tlakom. Sirovi produkt pročišćen je rastrljavanjem u smjesi etera i diklormetana (3:1) te je potom odsisan. Nakon rastrljavanja eterom, odsisan je svijetlo-žuti talog **4**.

Iskorištenje: 0,185 g (79%).

$t_{\text{f}}$  304–307 °C.

MS ( $m/z$ ) 199.0 (M+1).

IR (KBr)  $\nu_{\max}$  3282, 2480, 1636, 1574, 1454, 1366, 1298, 1234, 1174, 1110, 990, 896, 838, 800  $\text{cm}^{-1}$ .

$^1\text{H}$  NMR (400 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  11.22 (s, 1H, 10), 9.73 (s, 1H, 14), 8.12 (d, 1H, 7,  $J = 5.3$  Hz), 7.94 (d, 1H, 3,  $J = 8.5$  Hz), 7.74 (d, 1H, 6,  $J = 5.3$  Hz), 6.91 (d, 1H, 12,  $J = 2.0$  Hz), 6.71 (dd, 1H, 2,  $J = 8.5, 2.1$  Hz), 2.70 (s, 3H, 13).

$^{13}\text{C}$  NMR (101 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  158.24 (1), 142.27 (8), 140.89 (11), 137.59 (7), 134.41 (9), 127.51 (4), 122.52 (3), 113.87 (5), 111.64 (6), 109.65 (2), 96.60 (12), 20.24 (13).

### 3.5. Sinteza 7-metoksi-1-metil-9-(prop-2-in-1-il)-9H-pirido[3,4-b]indola (5)

Otopini 0,2 g (0,94 mmol) harmina u 5 mL bezvodnog DMF-a dodano je 0,06 g (2,5 mmol, 60% disp. u mineralnom ulju) NaH te je miješano 15 min pod atmosferom argona. Zatim je suspenziji dodano 0,3 mL (2,82 mmol) 80% otopine propargil-bromida u toluenu pod atmosferom argona. Reakcija je miješana 2 h na s.t. Reakcijska smjesa dodana je u 50 mL vode. Smjesa je ekstrahirana diklormetanom (4  $\times$  30 mL), a potom su organski spojevi sakupljeni, isprani vodom, osušeni nad bezvodnim natrijevim sulfatom te upareni pod sniženim tlakom. Nakon pročišćavanja kromatografijom na koloni uz pokretnu fazu diklormetan/metanol (9,5:0,5) te rastrljavanja u eteru dobive je sivo-zeleni talog **5**.

Iskorištenje: 0,129 g (55%)

$t_f$  147–148 °C.

MS ( $m/z$ ) 251.2 (M+1).

IR (KBr)  $\nu_{\max}$  3270, 3064, 2118, 1616, 1568, 1494, 1450, 1402, 1340, 1294, 1254, 1226, 1192, 1170, 1138, 1042, 976, 922, 830, 806, 722, 690, 648  $\text{cm}^{-1}$ .

$^1\text{H}$  NMR (400 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  8.20 (d, 1H, 7,  $J = 5.2$  Hz), 8.10 (d, 1H, 3,  $J = 8.6$  Hz), 7.88 (d, 1H, 6,  $J = 5.2$  Hz), 7.33 (d, 1H, 8,  $J = 2.1$  Hz), 6.90 (dd, 1H, 2,  $J = 8.6$  Hz, 2.1 Hz), 5.45 (d, 2H, 1',  $J = 2.3$  Hz), 3.91 (s, 3H, 14), 3.37 (t, 1H, 3',  $J = 2.3$  Hz), 3.05 (s, 3H, 13).

$^{13}\text{C}$  NMR (101 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  160.72 (1), 142.60 (8), 141.09 (11), 138.53 (7), 134.40 (9), 128.92 (4), 122.50 (3), 114.42 (5), 112.29 (6), 109.70 (2), 93.83 (12), 80.25, 75.59 (2'), 55.68 (14), 34.22 (1'), 22.49 (13).

### 3.6. Sinteza 1-metil-7-(prop-2-in-1-iloksi)-9H-pirido[3,4-b]indola (6)

Otopini 0,180 g (0,91 mmol) harmola **5** u 4 mL suhog DMF-a je dodano 0,414 g (1,27 mmol) cezijeovog karbonata. Smjesa je propuhana argonom. Nakon 15 minuta dokapana je 0,11 mL (0,99 mmol) 80% otopina propargil-bromida u toluenu pod atmosferom argona. Reakcija je miješana 2 h na s.t. Nakon 2 h smjesa je dodana u 50 mL destilirane vode te ekstrahirana diklormetanom (4 × 30 mL). Organski slojevi su sakupljeni te isprani vodom, osušeni iznad bezvodnog natrijevog sulfata te upareni pod sniženim tlakom. Nakon pročišćavanja kromatografijom na koloni uz pokretnu fazu diklormetan/metanol (9,7:0,3 i 9,5:0,5) te rastrljavanja u smjesi etera i diklormetana (5:1) dobiven je prljavo bijeli talog **6**.

Iskorištenje : 0,120 g (56%).

$t_f$  159–161 °C.

MS ( $m/z$ ) 237.2 (M+1).

IR (KBr)  $\nu_{\max}$  3272, 3068, 2960, 2868, 2774, 2118, 1632, 1566, 1484, 1454, 1328, 1276, 1166, 1136, 1108, 1070, 1024, 948, 816, 704, 684  $\text{cm}^{-1}$ .

$^1\text{H}$  NMR (400 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  11.55 (s, 1H, 10), 8.17 (d, 1H, 7,  $J = 5.3$  Hz), 8.10 (d, 1H, 3,  $J = 8.7$  Hz), 7.85 (d, 1H, 6,  $J = 5.3$  Hz), 7.13 (d, 1H, 12,  $J = 2.1$  Hz), 6.89 (dd, 1H, 2,  $J = 8.7$  Hz, 2.3 Hz), 4.93 (d, 2H, 1',  $J = 2.3$  Hz), 3.64 (t, 1H, 3',  $J = 2.3$  Hz), 2.74 (s, 3H, 13).

$^{13}\text{C}$  NMR (101 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  157.94 (1), 141.67 (8), 141.33 (11), 137.59 (7), 134.60 (9), 127.17 (4), 122.68 (3), 115.35 (5), 112.06 (6), 109.55 (2), 96.00 (12), 78.44 (2'), 55.75 (1'), 20.22 (13).

### 3.7. Sinteza N-supstituiranih triazolskih derivata harmina i cimetine kiseline (7a,b)

0,05 g (0,2 mmol) spoja **5** otopljeno je u 5 mL metanola. Otopini je dodano 0,0018 g (0,01 mmol) bakrovog (II) acetata i otopina 0,2 mmola odgovarajućeg azida (**3a** ili **3b**) u metanolu. Reakcijska smjesa je miješana preko noći na s.t. nakon čega je uparena do suha. Nakon pročišćavanja kromatografijom na koloni uz dodatak  $\text{Al}_2\text{O}_3$  i pokretnu fazu cikloheksan/etilacetat/metanol (3:1:0,5) te rastrljavanja u eteru, odsisan je bijeli talog.

### 3.7.1. Sinteza 1-[(2E)-3-(4-fluorofenil)prop-2-en-1-il]-4-({7-metoksi-1-metil-9H-pirido[3,4-b]indol-9-il}metil)-1-1,2,3-triazola (7a)

Količina spoja **3a**: 0,038 g.

Iskorištenje : 0,04 g (56%).

$t_t$  188–190 °C.

MS ( $m/z$ ) 428.2 (M+1).

IR (KBr)  $\nu_{\max}$  3126, 3048, 3000, 2930, 2836, 1626, 1562, 1510, 1450, 1408, 1324, 1252, 1224, 1168, 1136, 1044, 970, 924, 846, 816, 738  $\text{cm}^{-1}$ .

$^1\text{H}$  NMR (400 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  8.18 (d, 1H, 7,  $J = 5.2$  Hz), 8.09 (d, 1H, 3,  $J = 8.6$  Hz), 8.00 (s, 1H, 3'), 7.88 (d, 1H, 6,  $J = 5.2$  Hz), 7.49 – 7.40 (m, 2H, 8', 12'), 7.34 (d, 1H, 8,  $J = 2.1$  Hz), 7.20 – 7.10 (m, 2H, 9', 11'), 6.88 (dd, 1H, 2,  $J = 8.6, 2.2$  Hz), 6.51 (d, 1H, 6',  $J = 15.9$  Hz), 6.39 (dt, 1H, 5',  $J = 15.9, 6.3$  Hz), 5.89 (s, 2H, 1'), 5.08 (d, 2H, 4',  $J = 6.0$  Hz), 3.88 (s, 3H, 14), 3.05 (s, 3H, 13).

$^{13}\text{C}$  NMR (101 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  161.86 (d,  $J = 245.3$  Hz), 160.55 (1), 144.11 (2'), 142.67 (8), 141.12 (11), 138.06 (3), 134.65 (9), 132.26 (7'), 132.20 (5'), 128.52 (4), 128.48 (d, 8', 12',  $J = 8.0$  Hz), 123.65 (3'), 122.85 (6'), 122.38 (3), 115.52 (d, 9', 11',  $J = 21.5$  Hz), 114.48 (5), 112.25 (6), 109.32 (2), 94.13 (12), 55.61 (14), 51.20 (4'), 39.73 (1'), 23.22 (13).

### 3.7.2. Sinteza 1-[(2E)-3-(3,4-difluorofenil)prop-2-en-1-il]-4-({7-metoksi-1-metil-9H-pirido[3,4-b]indol-9-il}metil)-1H-1,2,3-triazola (7b)

Količina spoja **3b**: 0,045 g.

Iskorištenje: 0,049 g (55%).

$t_t$  167 °C.

MS ( $m/z$ ) 446.2 (M+1).

IR (KBr)  $\nu_{\max}$  3120, 3068, 3006, 2964, 2840, 1626, 1568, 1518, 1452, 1410, 1348, 1296, 1252, 1228, 1168, 1138, 1116, 1048, 1026, 974, 926, 888, 818, 738  $\text{cm}^{-1}$ .

$^1\text{H}$  NMR (400 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  8.18 (d, 1H, 7,  $J = 5.2$  Hz), 8.09 (d, 1H, 3,  $J = 8.6$  Hz), 8.00 (s, 1H, 3'), 7.88 (d, 1H, 6,  $J = 5.2$  Hz), 7.57-7.52 (m, 1H, 8'), 7.41-7.33 (m, 1H, 11'), 7.34 (d,

<sup>1</sup>H, 8,  $J = 2.1$  Hz), 7.24-7.20 (m, 1H, 12'), 6.89 (dd, 1H, 2,  $J = 8.6, 2.1$  Hz), 6.49-6.48 (m, 2H, 5',6'), 5.89 (s, 2H, 1'), 5.09 (d, 2H, 4',  $J = 2.3$  Hz), 3.88 (s, 3H, 14), 3.05 (s, 3H, 13).

<sup>13</sup>C NMR (101 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$  160.55 (1), 150.57 (dd, 9',  $J = 53.1, 12.2$  Hz), 148.13 (dd, 10',  $J = 55.1, 12.3$  Hz), 144.12 (2'), 142.66 (8), 141.13 (11), 138.08 (7), 134.65 (9), 133.62 (7'), 131.23 (5'), 128.53 (4), 125.37 (3'), 123.75 (d, 12',  $J = 17.2$  Hz), 122.91 (6'), 122.39 (3), 117.64 (d, 11',  $J = 17.2$  Hz), 114.94 (d, 8',  $J = 17.2$  Hz), 114.48 (5), 112.26 (6), 109.31 (2), 94.14 (12), 55.60 (14), 51.04 (4'), 39.93 (1'), 23.23 (13).

### 3.8. Sinteza *O*-supstituiranih triazolskih derivata harmola (8a,b)

0,05 g (0,2 mmol) spoja **6** otopljeno je u 5 mL metanola. Otopini je dodano 0,0018 g (0,01 mmol) bakrovog (II) acetata i otopina 0,2 mmola odgovarajućeg azida (**3a** ili **3b**) u metanolu. Reakcijska smjesa je miješana preko noći na s.t. nakon čega je uparena do suha. Nakon pročišćavanja kromatografijom na koloni uz dodatak Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> i pokretnu fazu cikloheksan/etilacetat/metanol (1:1:0,5 za **8a** te 3:1:0,5 za **8b**) te rastrljavanja u eteru, odsisan je bijeli talog.

#### 3.8.1. Sinteza 1-[(2*E*)-3-(4-fluorofenil)prop-2-en-1-il]-4-[(1-metil-9*H*-pirido[3,4-*b*]indol-7-il)oksi]metil]-1*H*-1,2,3-triazola (8a)

Količina spoja **3a**: 0,037 g.

Iskorištenje: 0,05 g (60%).

$t_t$  196–198 °C.

MS ( $m/z$ ) 414.2 (M+1).

IR (KBr)  $\nu_{\max}$  3370, 3147, 3094, 2947, 2900, 2870, 1632, 1602, 1569, 1511, 1482, 1450, 1419, 1367, 1322, 1276, 1235, 1179, 1135, 1107, 1072, 1048, 1028, 1013, 975, 943, 827, 801, 772, 739 cm<sup>-1</sup>.

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$  11.47 (s, 1H, 10), 8.29 (s, 1H, 3'), 8.16 (d, 1H, 7,  $J = 5.3$  Hz), 8.06 (d, 1H, 3,  $J = 8.7$  Hz), 7.81 (d, 1H, 6,  $J = 5.3$  Hz), 7.50-7.46 (m, 2H, 8', 12'), 7.19 (d, 1H, 12,  $J = 2.2$  Hz), 7.17-7.10 (m, 2H, 9',11'), 6.91 (dd, 1H, 2,  $J = 8.7, 2.2$  Hz), 6.62 (d, 1H, 6',  $J =$

15.9 Hz), 6.49 (dt, 1H, 5',  $J = 15.9, 6.3$  Hz), 5.30 (s, 2H, 1'), 5.20 (d, 2H, 4',  $J = 6.1$  Hz), 2.72 (s, 3H, 13).

$^{13}\text{C}$  NMR (101 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  161.90 (d, 10',  $J = 245.2$  Hz), 158.75 (1), 143.02 (2'), 141.78 (8), 141.36 (11), 137.76 (7), 134.60 (9), 132.47 (5'), 132.29 (7'), 128.57 (d, 8', 12',  $J = 8.2$  Hz), 127.15 (4), 124.53 (3'), 123.59 (6'), 122.66 (3), 115.53 (d, 9', 11',  $J = 21.5$  Hz), 115.13 (5), 111.98 (6), 109.51 (2), 95.86 (12), 61.47 (1'), 51.33 (4'), 20.32 (13).

### 3.8.2. Sinteza 1-[(2E)-3-(3,4-difluorofenil)prop-2-en-1-il]-4-[(1-metil-9H-pirido[3,4-b]indol-7-il)oksi)metil]-1H-1,2,3-triazola (8b)

Količina spoja **3b**: 0,035 g.

Iskorištenje: 0,047 g (68%).

$t_r$  172–173 °C.

MS ( $m/z$ ) 432.2 (M+1).

IR (KBr)  $\nu_{\text{max}}$  3400, 3274, 3052, 3014, 2934, 2876, 1630, 1568, 1514, 1432, 1272, 1238, 1172, 1110, 1056, 1010, 962, 868, 816, 634  $\text{cm}^{-1}$ .

$^1\text{H}$  NMR (400 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  11.47 (s, 1H, 10), 8.30 (s, 1H, 3'), 8.15 (d, 1H, 7,  $J = 5.3$  Hz), 8.06 (d, 1H, 3,  $J = 8.6$  Hz), 7.81 (d, 1H, 6,  $J = 5.3$  Hz), 7.64-7.61 (m, arom., 1H, 8'), 7.38-7.33 (m, arom., 1H, 11'), 7.28-7.25 (m, arom., 1H, 12'), 7.19 (d, 1H, 12,  $J = 2.2$  Hz), 6.91 (dd, 1H, 2,  $J = 8.7, 2.2$  Hz), 6.63-6.57 (m, 2H, 5', 6'), 5.30 (s, 2H, 1'), 5.21 (d, 2H, 4',  $J = 4.7$  Hz), 2.72 (s, 3H, 13).

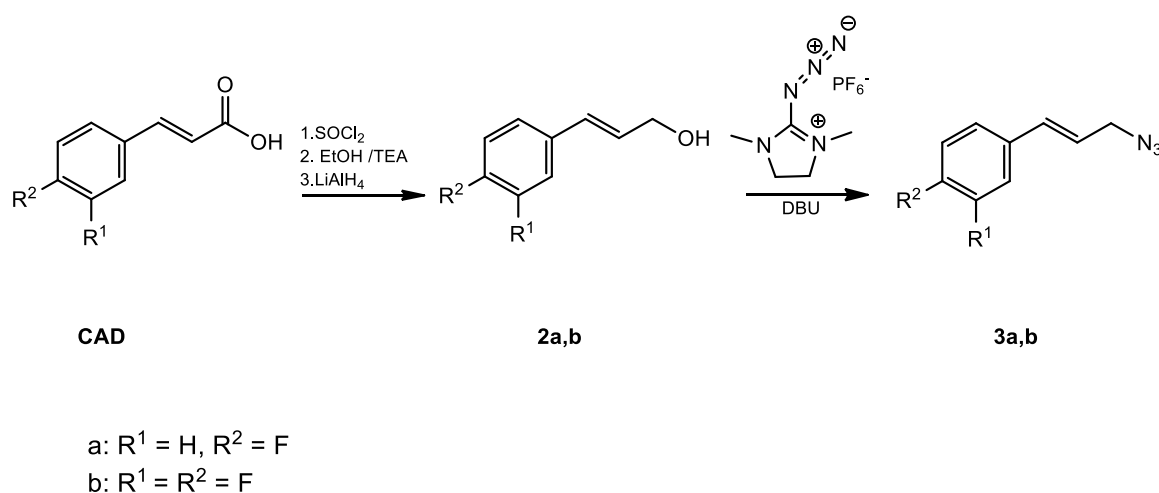
$^{13}\text{C}$  NMR (101 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  158.73 (1), 150.59 (dd, 9',  $J = 52.7, 12.4$  Hz), 148.16 (dd, 10',  $J = 54.5, 12.4$  Hz), 143.01 (2'), 141.76 (8), 141.34 (11), 137.74 (7), 134.58 (9), 133.67 (7'), 131.50 (5'), 125.28 (4), 124.55 (3'), 123.84 (6'), 123.83 (d, 12',  $J = 3.1$  Hz), 122.63 (3), 117.63 (d, 11',  $J = 17.2$  Hz), 115.12 (5), 115.00 (d, 8',  $J = 17.4$  Hz), 127.23 (12), 111.94 (6), 109.46 (2), 95.82 (12), 61.45 (1'), 51.14 (4'), 20.31 (13).



## **4. REZULTATI I RASPRAVA**

Ciljni spojevi koji su opisani u ovom radu su 1,2,3-triazolni derivati harmina koji u svojoj strukturi sadrže derivate cimetine kiseline. Harmin je spoj koji pokazuje širok spektar djelovanja, između ostalog i antimalarijsko, koje je posljedica inhibicije Hsp90 kod vrsta roda *Plasmodium*. Takvim djelovanjem sprječava se razvoj parazita te daljnje širenje infekcije. Neka istraživanja pokazuju da zbog ovakvog mehanizma djelovanja, harmin djeluje sinergistički s drugim antimalaricima na koje je parazit razvio rezistenciju, što čini harmin još značajnijom komponentom u razvoju antimalarijskih lijekova. Cimetna kiselina i njezini derivati također pokazuju širok spektar djelovanja, uključujući antimalarijsko djelovanje. 1,2,3-triazolni prsten iskorišten je kao poveznica između dvaju farmakofora zbog jednostavne sinteze, dobrih fizikalno-kemijskih svojstava i visoke stabilnosti.

Sintetski proces započinje prevođenjem derivata cimetine kiseline u azide cimetine kiseline. (Shema 4). U prvom koraku reakcije CAD su dodatkom tionil-klorida i suhog DMF prevedeni u kiselinske kloride CAD. Otopini kiselinskog klorida dodani su etanol i TEA, koji u reakciji esterifikacije služe kao akceptori oslobođenog klorovodika, čime je omogućeno nastajanje estera CAD. LiAlH<sub>4</sub> upotrebljen je za provođenje redukcija estera, i to u atmosferi argona kako bi se spriječili oksidacijski procesi pod utjecajem kisika iz zraka. Nakon pročišćavanja, dobiveni su alkoholi CAD (**2a,b**). U posljednjem koraku u sintezi azida, korišten je reagens ADMP kao donor azidne skupine, a reakcije su izvođene pri temperaturi od 0°C. Reakciji pogoduju bazični uvjeti, zbog čega je reakcijskoj smjesi dodana baza DBU. Sintetski postupak preuzet je iz rada Kitamura i sur., 2012. i pokazao se vrlo uspješan. Konačni produkti, azidi derivata cimetine kiseline (**3a,b**) upotrebljeni su kao građevni elementi u reakciji Huisgenove cikloadicije.

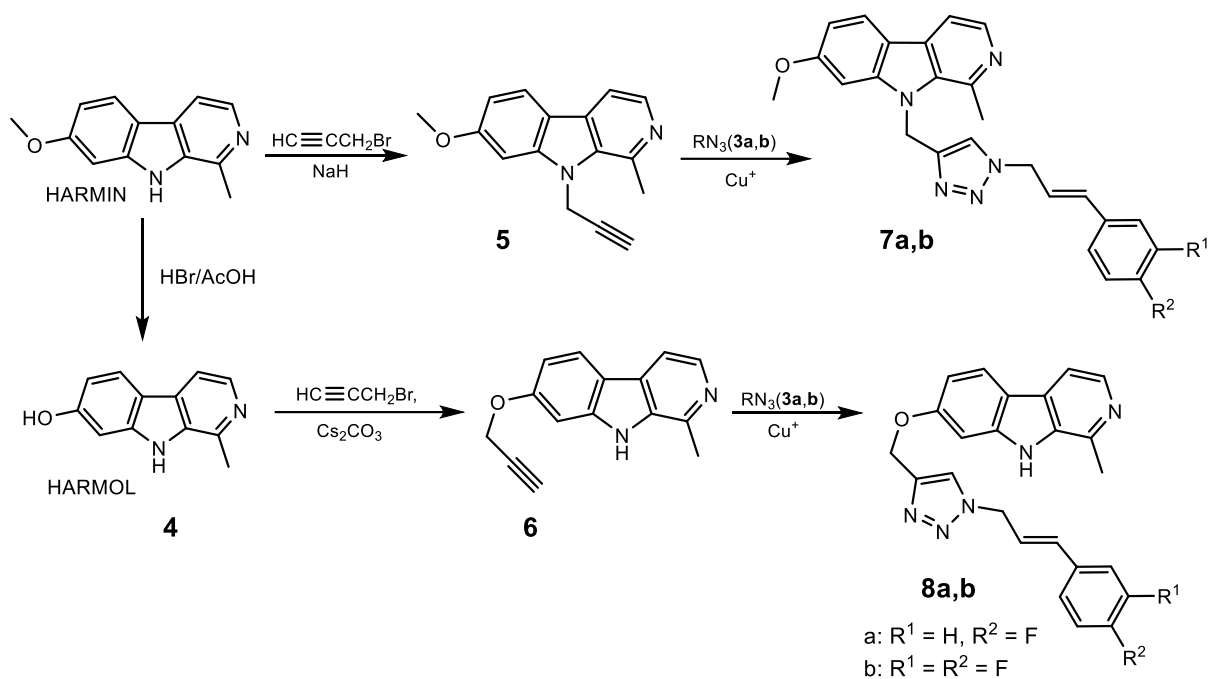


**Shema 4.** Sinteza azida

Sljedeći korak je uvođenje alkina u molekule harmina i harmola. Produkti ovih reakcija predstavljaju drugu vrstu građevnih elemenata u reakciji Huisgenove cikloadicije. Za sintezu *O*-derivata potrebno je provesti *O*-demetilaciju harmina kako bi nastao harmol (**4**). Reakcija se provodi u 47 % HBr uz dodatak ledene octene kiseline. Sintetski postupak i reagensi preuzeti su iz rada Friedrich i sur., 2012., uz modifikaciju uvjeta reakcije; reakcija provedena u mikrovalnom reaktoru (MW) na 130 °C za razliku od temperature od 140 °C koja je navedena u radu, čime je značajno skraćeno trajanje reakcije, s 48 sati na 20 minuta u MW. Radi se o reakciji nukleofilne supstitucije gdje u prvom koraku dolazi do protonacije kisikovog atoma pri čemu nastaju povoljni uvjeti koji omogućavaju cijepanje eterne veze i vezanje metilne izlazne skupine na halogenid. U kiselim uvjetima, harmol se nalazi u obliku soli pa zaluživanjem do pH 9 dodavanjem 5 % NaOH on prelazi u oblik baze, čime postaje topljiv u organskom otapalu. Istovremeno nastaju soli octene i bromovodične kiseline koje su topljive u vodi pa u ekstrakciji etil-acetatom zaostaju u vodenom sloju dok produkt prelazi u organski sloj čime ga uspješno izoliramo.

Williamsonovom sintezom etera preveli smo harmin i harmol u propargilirane produkte. Dodatkom baze u reakcijsku smjesu dolazi do deprotoniranja alkohola čime nastaje alkoksidni intermedijer koji je bolji nukleofil od samog alkohola te se reakcija odvija brže. Alkoksidni intermedijer napada alkilirajući reagens, u ovom slučaju propargil bromid, u reakciji nukleofilne supstitucije pri čemu kao produkt reakcije nastaje eter (Williamson, 1852). U reakciji s harminom kao baza je korišten NaH te se alkilacija odvija na atomu dušika, s obzirom da je dušik nukleofilniji od kisika zbog manje elektonegativnosti. U reakciji s harmolom, korišten je cezijev karbonat kako bi se alkilacija odvila na atomu kisika, a ne na atomu dušika. Reakcijska je smjesa propuhana argonom kako bi je zaštitili od oksidativnog učinka kisika iz zraka. Sirovi produkti **5** i **6** pročišćeni su kromatografijom na koloni i rastrljani eteru. Navedeni spojevi predstavljaju alkinske građevne elemente u konačnom reakcijskom koraku.

Konačna reakcija kojom su nastali ciljani spojevi naziva se Huisgenova 1,3-dipolarna cikloadicija katalizirana Cu(I) u kojoj su početni reaktanti spojevi u obliku azida (**3a,b**) i alkina (**5,6**). Reakcije su izvedene u blagim uvjetima, bez korištenja suhih otapala i pri sobnoj temperaturi. Trajanje reakcija iznosilo je od 18 do 24 sata, a iskorištenja od 55 do 68%. Sirovi produkti pročišćeni su kromatografijom na koloni gdje se osim silikagela nalazio i aluminijev oksid koji je zadržao ostatke bakrovog (II) acetata. Shema 5 prikazuje nastanak alkina **5** i **6** te konačnu reakciju kojom su dobiveni ciljani produkti.

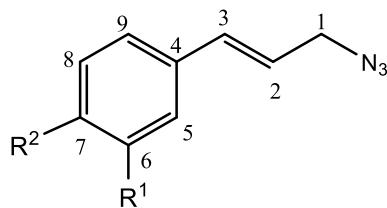


**Shema 5.** Sinteza novih derivata harmina

Tijek svih reakcija i čistoća produkata praćeni su tankoslojnom kromatografijom. Novi spojevi karakterizirani su uobičajenim analitičkim i spektroskopskim metodama (talište, IR, <sup>1</sup>H i <sup>13</sup>C NMR, MS). Prisutnost triazolnog prstena u konačnim produktima (**7a,b** i **8a,b**) potvrđena je pojavom novog pika u <sup>1</sup>H NMR spektru na 8.0-8.3 ppm koji potiče od jedinog prisutnog vodika u prstenu.

Analitički i spektroskopski podaci spojeva koji su sintetizirani u okviru ovog rada prikazani su u tablicama 4-8, a spektri svih spojeva u poglavlju Prilozi.

**Tablica 4. Analitički i spektroskopski podaci i kemijski pomaci u  $^1\text{H}$  i  $^{13}\text{C}$  NMR spektrima azida derivata cimetine kiseline **3a** i **3b****



Spoj	<b>3a</b>	<b>3b</b>
$\text{R}^1$	H	F
$\text{R}^2$	F	F
$t_f$ ( $^{\circ}\text{C}$ )	ulje	ulje
Molekulska formula	$\text{C}_9\text{H}_8\text{FN}_3$	$\text{C}_9\text{H}_7\text{F}_2\text{N}_3$
$M_r$	177.18	195.17
IR(KBr) $\nu_{\text{max}}$ ( $\text{cm}^{-1}$ )	3041, 2926, 2869, 2101, 1602, 1506, 1350, 1230, 968, 845, 804, 771	3038, 2928, 2070, 2102, 1604, 1516, 1434, 1294, 1275, 1212, 1147, 1115, 966, 872, 773
$^1\text{H}$ NMR (400 MHz, DMSO- $d_6$ )	7.63–7.48 (m, 2H, 5, 9), 7.24– 7.13 (m, 2H, 6, 8), 6.71 (d, 1H, 3, $J = 15.9$ Hz), 6.35 (dt, 1H, 2, $J = 15.8, 6.6$ Hz), 4.03 (d, 2H, 1, $J = 6.5$ Hz)	7.68–7.62 (m, 1H, 9), 7.45–7.31 (m, 2H, 5, 6), 6.68 (d, 1H, 3, $J =$ 15.8 Hz), 6.44 (dt, 1H, 2, $J = 15.8,$ 6.4 Hz), 4.05 (d, 2H, 1, $J = 6.4$ Hz)
$^{13}\text{C}$ NMR (101 MHz, DMSO- $d_6$ )	161.87 (d, 7, $J = 245.0$ Hz), 132.55 (3), 132.45 (4), 128.52 (d, 5, 9, $J = 8.3$ Hz), 123.05 (2), 115.55 (d, 6, 8, $J = 21.5$ Hz), 52.09 (1)	150.95-147.49 (m, 6, 7), 133.85 (4), 131.36 (3), 124.87 (9), 123.74 (2), 117.67 (d, 8, $J = 17.2$ Hz), 114.98 (d, 5, 17.5 Hz), 51.90 (1)

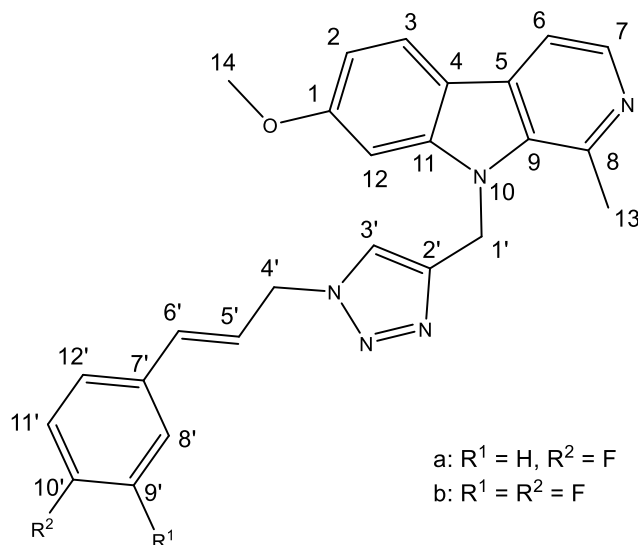
**Tablica 5. Analitički i spektroskopski podaci *N*-supstituiranih triazolskih derivata harmina (7a i 7b)**

Spoj	<b>7a</b>	<b>7b</b>
R <sup>1</sup>	H	F
R <sup>2</sup>	F	F
<i>t</i> <sub>t</sub> (°C)	188 – 190	167
Molekulska formula	C <sub>25</sub> H <sub>22</sub> FN <sub>5</sub> O	C <sub>25</sub> H <sub>21</sub> F <sub>2</sub> N <sub>5</sub> O
<i>M</i> <sub>r</sub>	427.47	445.46
MS ( <i>m/z</i> )	428,2 (M+1)	446,2 (M+1)
IR(KBr) <i>v</i> <sub>max</sub> (cm <sup>-1</sup> )	3126, 3048, 3000, 2930, 2836, 1626, 1562, 1510, 1450, 1408, 1324, 1252, 1224, 1168, 1136, 1044, 970, 924, 846, 816, 738	3120, 3068, 3006, 2964, 2840, 1626, 1568, 1518, 1452, 1410, 1348, 1296, 1252, 1228, 1168, 1138, 1116, 1048, 1026, 974, 926, 888, 818, 738

**Tablica 6. Analitički i spektroskopski podaci *O*-supstituiranih triazolskih derivata harmina (8a i 8b)**

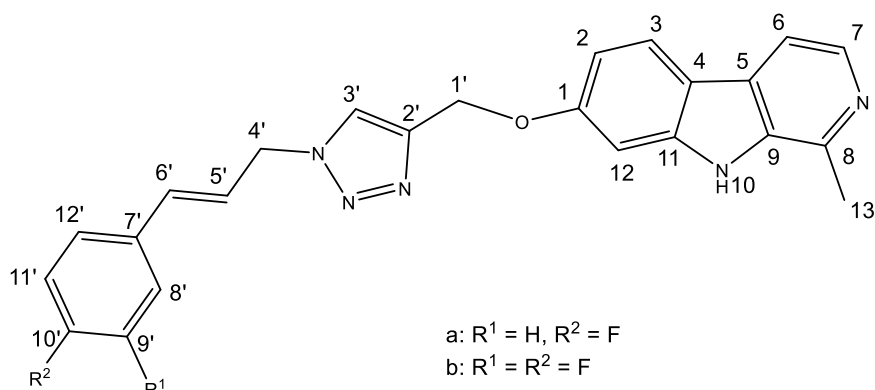
Spoj	<b>8a</b>	<b>8b</b>
R <sup>1</sup>	H	F
R <sup>2</sup>	F	F
<i>t</i> <sub>t</sub>	188 – 190	167
Molekulska formula	C <sub>25</sub> H <sub>22</sub> FN <sub>5</sub> O	C <sub>25</sub> H <sub>21</sub> F <sub>2</sub> N <sub>5</sub> O
<i>M</i> <sub>r</sub>	427.47	445.46
MS ( <i>m/z</i> )	414,2 (M+1)	432,2 (M+1)
IR (KBr) <i>v</i> <sub>max</sub> (cm <sup>-1</sup> )	3370, 3147, 3094, 2947, 2900, 2870, 1632, 1602, 1569, 1511, 1482, 1450, 1419, 1367, 1322, 1276, 1235, 1179, 1135, 1107, 1072, 1048, 1028, 1013, 975, 943, 827, 801, 772, 739 cm <sup>-1</sup>	3400, 3274, 3052, 3014, 2934, 2876, 1630, 1568, 1514, 1432, 1272, 1238, 1172, 1110, 1056, 1010, 962, 868, 816, 634

**Tablica 7. Kemijski pomaci u  $^1\text{H}$  i  $^{13}\text{C}$  NMR spektrima *N*-supstituiranih triazolskih derivata harmina (7a i 7b)**



Spoj	7a	7b
$^1\text{H}$ NMR (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$ )	$\delta$ 8.18 (d, 1H, 7, $J = 5.2$ Hz), 8.09 (d, 1H, 3, $J = 8.6$ Hz), 8.00 (s, 1H, 3'), 7.88 (d, 1H, 6, $J = 5.2$ Hz), 7.49 – 7.40 (m, 2H, 8', 12'), 7.34 (d, 1H, 8, $J = 2.1$ Hz), 7.20 – 7.10 (m, 2H, 9', 11'), 6.88 (dd, 1H, 2, $J = 8.6, 2.2$ Hz), 6.51 (d, 1H, 6', $J = 15.9$ Hz), 6.39 (dt, 1H, 5', $J = 15.9, 6.3$ Hz), 5.89 (s, 2H, 1'), 5.08 (d, 2H, 4', $J = 6.0$ Hz), 3.88 (s, 3H, 14), 3.05 (s, 3H, 13).	$\delta$ 8.18 (d, 1H, 7, $J = 5.2$ Hz), 8.09 (d, 1H, 3, $J = 8.6$ Hz), 8.00 (s, 1H, 3'), 7.88 (d, 1H, 6, $J = 5.2$ Hz), 7.57-7.52 (m, 1H, 8'), 7.41-7.33 (m, 1H, 11'), 7.34 (d, 1H, 8, $J = 2.1$ Hz), 7.24-7.20 (m, 1H, 12'), 6.89 (dd, 1H, 2, $J = 8.6, 2.1$ Hz), 6.49-6.48 (m, 2H, 5', 6'), 5.89 (s, 2H, 1'), 5.09 (d, 2H, 4', $J = 2.3$ Hz), 3.88 (s, 3H, 14), 3.05 (s, 3H, 13).
$^{13}\text{C}$ NMR (101 MHz, $\text{DMSO-}d_6$ )	$\delta$ 161.86 (d, $J = 245.3$ Hz), 160.55 (1), 144.11 (2'), 142.67 (8), 141.12 (11), 138.06 (3), 134.65 (9), 132.26 (7'), 132.20 (5'), 128.52 (4), 128.48 (d, 8', 12', $J = 8.0$ Hz), 123.65 (3'), 122.85 (6'), 122.38 (3), 115.52 (d, 9', 11', $J = 21.5$ Hz), 114.48 (5), 112.25 (6), 109.32 (2), 94.13 (12), 55.61 (14), 51.20 (4'), 39.73 (1'), 23.22 (13).	$\delta$ 160.55 (1), 150.57 (dd, 9', $J = 53.1, 12.2$ Hz), 148.13 (dd, 10', $J = 55.1, 12.3$ Hz), 144.12 (2'), 142.66 (8), 141.13 (11), 138.08 (7), 134.65 (9), 133.62 (7'), 131.23 (5'), 128.53 (4), 125.37 (3'), 123.75 (d, 12', $J = 17.2$ Hz), 122.91 (6'), 122.39 (3), 117.64 (d, 11', $J = 17.2$ Hz), 114.94 (d, 8', $J = 17.2$ Hz), 114.48 (5), 112.26 (6), 109.31 (2), 94.14 (12), 55.60 (14), 51.04 (4'), 39.93 (1'), 23.23 (13).

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



Spoj	8a	8b
$^1\text{H}$ NMR (400 MHz, DMSO- $d_6$ )	$\delta$ 11.47 (s, 1H, 10), 8.29 (s, 1H, 3'), 8.16 (d, 1H, 7, $J = 5.3$ Hz), 8.06 (d, 1H, 3, $J = 8.7$ Hz), 7.81 (d, 1H, 6, $J = 5.3$ Hz), 7.50-7.46 (m, 2H, 8', 12'), 7.19 (d, 1H, 12, $J = 2.2$ Hz), 7.17-7.10 (m, 2H, 9', 11'), 6.91 (dd, 1H, 2, $J = 8.7, 2.2$ Hz), 6.62 (d, 1H, 6', $J = 15.9$ Hz), 6.49 (dt, 1H, 5', $J = 15.9, 6.3$ Hz), 5.30 (s, 2H, 1'), 5.20 (d, 2H, 4', $J = 6.1$ Hz), 2.72 (s, 3H, 13).	$\delta$ 11.47 (s, 1H, 10), 8.30 (s, 1H, 3'), 8.15 (d, 1H, 7, $J = 5.3$ Hz), 8.06 (d, 1H, 3, $J = 8.6$ Hz), 7.81 (d, 1H, 6, $J = 5.3$ Hz), 7.64-7.61 (m, arom., 1H, 8'), 7.38-7.33 (m, arom., 1H, 11'), 7.28-7.25 (m, arom., 1H, 12'), 7.19 (d, 1H, 12, $J = 2.2$ Hz), 6.91 (dd, 1H, 2, $J = 8.7, 2.2$ Hz), 6.63-6.57 (m, 2H, 5', 6'), 5.30 (s, 2H, 1'), 5.21 (d, 2H, 4', $J = 4.7$ Hz), 2.72 (s, 3H, 13).
$^{13}\text{C}$ NMR (101 MHz, DMSO- $d_6$ )	$\delta$ 161.90 (d, 10', $J = 245.2$ Hz), 158.75 (1), 143.02 (2'), 141.78 (8), 141.36 (11), 137.76 (7), 134.60 (9), 132.47 (5'), 132.29 (7'), 128.57 (d, 8', 12', $J = 8.2$ Hz), 127.15 (4), 124.53 (3'), 123.59 (6'), 122.66 (3), 115.53 (d, 9', 11', $J = 21.5$ Hz), 115.13 (5), 111.98 (6), 109.51 (2), 95.86 (12), 61.47 (1'), 51.33 (4'), 20.32 (13).	$\delta$ 158.73 (1), 150.59 (dd, 9', $J = 52.7, 12.4$ Hz), 148.16 (dd, 10', $J = 54.5, 12.4$ Hz), 143.01 (2'), 141.76 (8), 141.34 (11), 137.74 (7), 134.58 (9), 133.67 (7'), 131.50 (5'), 125.28 (4), 124.55 (3'), 123.84 (6'), 123.83 (d, 12', $J = 3.1$ Hz), 122.63 (3), 117.63 (d, 11', $J = 17.2$ Hz), 115.12 (5), 115.00 (d, 8', $J = 17.4$ Hz), 127.23 (12), 111.94 (6), 109.46 (2), 95.82 (12), 61.45 (1'), 51.14 (4'), 20.31 (13).



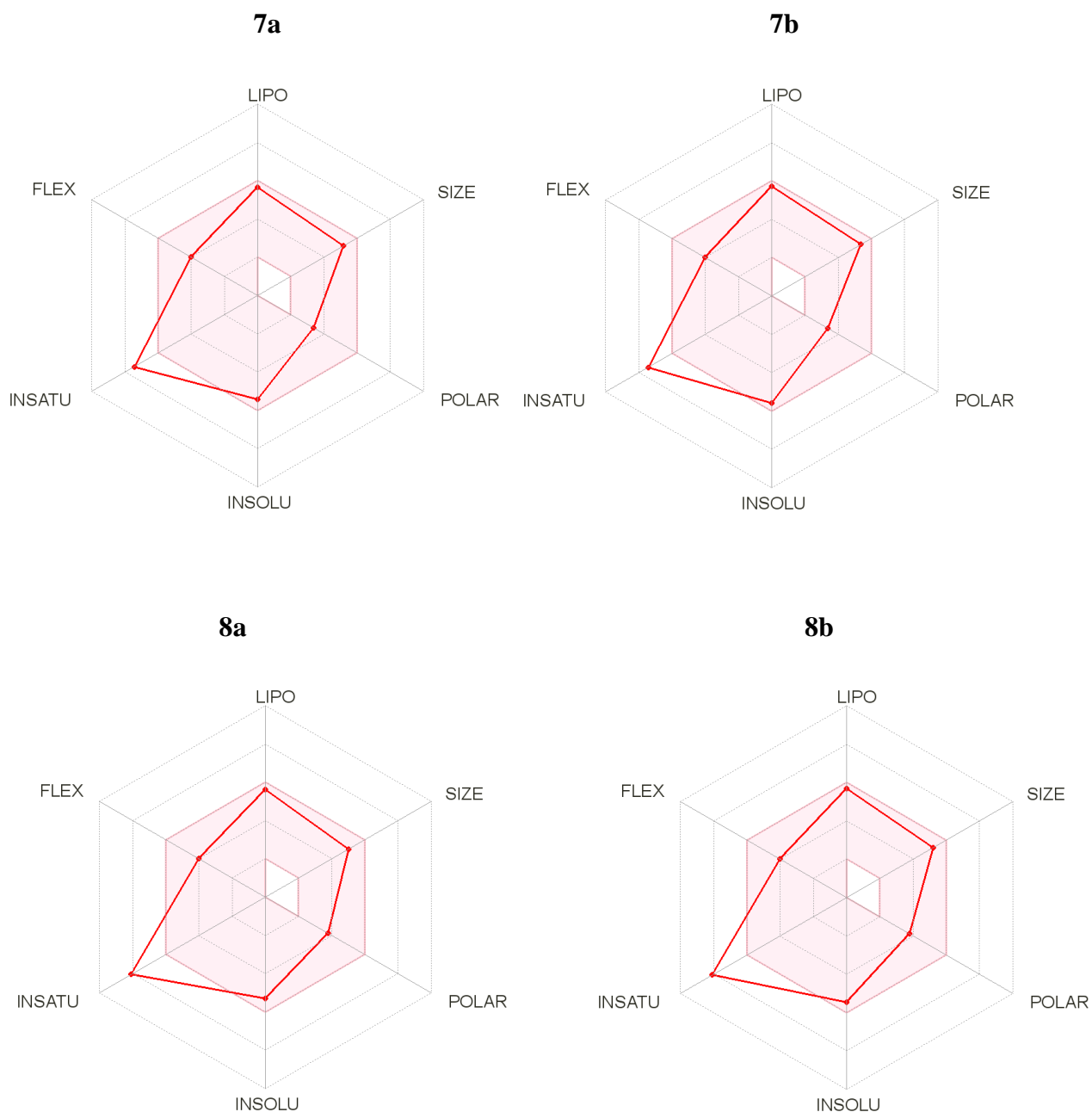
Za izračunavanje fizičko-kemijskih deskriptore molekula i predviđanje farmakokinetičkih karakteristika molekula upotrebljene su besplatne *web aplikacije* Chemicalize (<https://chemicalize.com/>) i SwissADME (<http://www.swissadme.ch/>). Jedno od najvažnijih farmakokinetičkih svojstava koje novosintetizirana molekula lijeka mora zadovoljiti jest dobra oralna bioraspoloživost, koja je direktna posljedica apsorpcije molekule iz gastrointestinalnog trakta. Postoji nekoliko algoritama koji na temelju fizičko-kemijskih parametara predviđaju oralnu bioraspoloživost molekule, a najpoznatija su Lipinskijeva pravila te Veberova pravila. Prema Lipinskiju, da bi molekula imala dobru oralnu bioraspoloživost mora imati relativnu molekulsku masu manju od 500, logaritam partijskog koeficijenta (log P) manji od 5, broj donora vodikovih veza manji od 6 te maksimalno 10 akceptora vodikovih veza (Lipinski i sur., 1997). Veberova pravila nastala su kao svojevrsna kritika Lipinskijevih pravila te nalažu sljedeće: broj rotirajućih veza ne smije biti veći od 10, polarnost površine određena je zbrojem donora i akceptora vodikovih veza te ne smije biti veća od 12, a topološka ploština zone polarne površine (TPSA) mora biti manja od 140 Å<sup>2</sup> (Veber i sur., 2002). U Tablici 8. navedeni su izračunati parametri za derivate **7a,b** i **8a,b**.

**Tablica 9. Pregled parametara izračunatih putem *web aplikacije* Chemicalize**

Spoj	<b>7a</b>	<b>7b</b>	<b>8a</b>	<b>8b</b>
Molekulska formula	C <sub>25</sub> H <sub>22</sub> FN <sub>5</sub> O	C <sub>25</sub> H <sub>21</sub> F <sub>2</sub> N <sub>5</sub> O	C <sub>24</sub> H <sub>20</sub> FN <sub>5</sub> O	C <sub>24</sub> H <sub>19</sub> F <sub>2</sub> N <sub>5</sub> O
Mr	427.47	445.46	413.45	431.44
log P	4,40	4,45	4,18	4,18
Broj donora vodikove veze	0	0	1	1
Broj akceptora vodikove veze	4	4	5	5
Zbroj donora i akceptora vodikove veze	4	4	6	6
Broj rotirajućih veza	6	6	6	6
TPSA <sup>a</sup> (Å <sup>2</sup> )	57,76	57,76	68,62	68,62
Lipinskijeva pravila	4/4	4/4	4/4	4/4
Veberova pravila	3/3	3/3	3/3	3/3

Prema podacima koji se nalaze u Tablici 8, svi derivati zadovoljavaju i Lipinskijeva i Veberova pravila, te bi se prema tome mogla očekivati dobra oralna bioraspoloživost istih.

SwissADME na temelju izračunatih parametara stvara jedinstveni grafički prikaz izračunatih parametara koji utječu na oralnu bioraspodjivu u obliku šesterokuta (Daina i sur., 2017). Grafički prikaz naziva se *Bioavailability radar* (Slika 11).

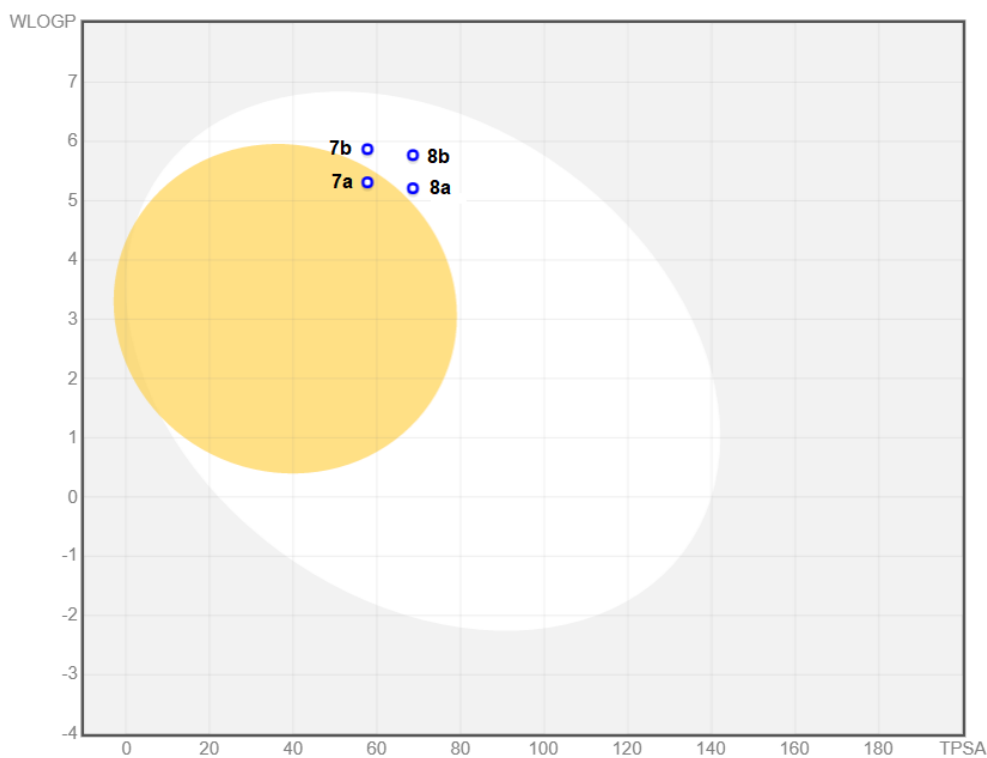


**Slika 11.** *Bioavailability radar* novosintetiziranih derivata harmina **7a,b** i **8a,b** (preuzeto s <http://www.swissadme.ch>)

Svaki kut šesterokuta na Slici 11 predstavlja jedan parametar, dok ružičasto polje predstavlja optimalni raspon vrijednosti za svaki parametar koje pozitivno korelira s oralnom bioraspoloživošću. Lipofilnost (LIPO) je kvantificirana vrijednošću logaritma partijskog koeficijenta izračunatog korištenjem programa XLOGP 3.2.2 te mora zadovoljiti vrijednosti između -0,7 i +5,0. Veličina molekule (SIZE) kvantificirana je molekulskom masom (vrijednosti između 150 i 500 g mol<sup>-1</sup>). Polarnost molekule (POLAR) kvantificirana je vrijednošću TPSA koja se mora nalaziti između 20 i 130 Å<sup>2</sup>, dok je netopljivost molekule (INSOLU) kvantificirana negativnom vrijednošću logaritma molarne topljivosti izračunate topološkom metode Delaneyja (log S) te ne smije biti veća od 6. Nezasićenost molekule (INSATU) kvantificirana je udjelom sp<sup>3</sup> hibridiziranih ugljikovih atoma u ukupnom broju atoma ugljika te vrijednost ne smije biti niža od 0,25. Fleksibilnost molekule kvantificirana je brojem rotirajućih veza kojih ne smije biti više od 9 (Daina i sur., 2017).

Kao što je vidljivo na Slici 11, sva četiri novosintetizirana derivata nalaze se u optimalnom području za 5 od 6 navedenih parametara. Nezasićenost molekule, koju derivati **7a,b** i **8a,b**, ne zadovoljavaju, iznosi 0,16 za spojeve **7a,b** i 0,12 za spojeve **8a,b**.

*Boiled EGG* model (Slika 12) je grafički prikaz generiran na web stranici SwissADME koji na temelju strukture molekula predviđa njihove farmakokinetičke parametre. Molekule su označene plavim ili crvenim točkama. Za molekule označene plavim točkama program predviđa da jesu supstrati P-glikoproteina, dok za one označene crvenim da nisu. Podatak o tome je li molekula supstrat P-glikoproteina bitan je za procjenu efluksa te molekule kroz biološke membrane npr. hoće li molekula biti izbačena kroz gastrointestinalnu stijenku natrag u lumen ili pak izbačena iz mozga. Za molekule koje se na grafičkom prikazu nalaze unutar bijelo obojenog područja predviđena je pasivna apsorpcija u gastrointestinalnom traktu, a za one koje se nalaze unutar žuto obojenog područja predviđeno je da bi mogli prelaziti kroz krvno moždanu barijeru (Daiana i sur., 2017).



**Slika 12.** *Boiled EGG* model novosintetiziranih derivata harmina **7a,b** i **8a,b** (preuzeto s <http://www.swissadme.ch>)

Prema podacima iz *Boiled EGG* modela na Slici 12 predviđeno je da su sve molekule supstrati P-glikoproteina. Spojevi **7b** te **8a** i **8b** će se prema predviđanjima pasivno apsorbirati iz gastrointestinalnog trakta, dok će samo spoj **7a** prolaziti krvno moždanu barijeru.

## **5. ZAKLJUČAK**

U ovom radu opisana je sinteza novih 1,2,3-triazolnih derivata harmina koji u svojoj strukturi sadrže derivate cimetine kiseline. Sinteza i karakterizacija provedena je u okviru 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 opisani u literaturi:

- 1-[(2*E*)-3-(4-fluorofenil)prop-2-en-1-il]-4-({7-metoksi-1-metil-9*H*-pirido[3,4-*b*]indol-9-il}metil)-1*H*-1,2,3-triazol (**7a**)
- 1-[(2*E*)-3-(3,4-difluorofenil)prop-2-en-1-il]-4-({7-metoksi-1-metil-9*H*-pirido[3,4-*b*]indol-9-il}metil)-1*H*-1,2,3-triazol (**7b**)
- 1-[(2*E*)-3-(4-fluorofenil)prop-2-en-1-il]-4-[(1-metil-9*H*-pirido[3,4-*b*]indol-7-il}oksi)metil]-1*H*-1,2,3-triazol (**8a**)
- 1-[(2*E*)-3-(3,4-difluorofenil)prop-2-en-1-il]-4-[(1-metil-9*H*-pirido[3,4-*b*]indol-7-il}oksi)metil]-1*H*-1,2,3-triazol (**8b**)

Sintetizirani su i spojevi koji su se koristili u sintezi derivata **7a,b** i **8a,b** kao građevni elementi, a to su azidi **3a,b** i *N*- i *O*- supstituirani propargilni derivati harmina (**5** i **6**). Harmol (**4**) sintetiziran je iz harmina.

Svim novosintetiziranim spojevima struktura je potvrđena uobičajenim analitičkim i spektroskopskim metodama (IR, <sup>1</sup>H i <sup>13</sup>C NMR, MS) te im je određena temperatura tališta.

Triazolskim derivatima **7a,b** i **8a,b** računski je opisana mogućnost oralne bioraspoloživost pomoću brojnih strukturnih parametara koji opisuju fizičko-kemijska svojstva istih.

U daljnim ispitivanjima, koji prelaze okvir ovog rada, novosintetiziranim derivatima bit će ispitano biološko djelovanje.

## **6. LITERATURA**

- Agalave SG, Maujan SR, Pore VS. Click chemistry: 1,2,3-triazoles as pharmacophores. *Chem Asian J*, 2011, 6, 2696–2718.
- Ayoob I, Hazari YM, Lone SH, Shakeel-u-Rehman Khuroo MA, Fazili KM, Bhat KA. Phytochemical and Cytotoxic Evaluation of Peganum Harmala: Structure Activity Relationship Studies of Harmine. *ChemistrySelect*, 2017, 2, 2965–2968.
- Bayih AG, Folefoc A, Mohon AN, Eagon S, Anderson M, Pillai DR. In vitro and in vivo anti-malarial activity of novel harmine-analog heat shock protein 90 inhibitors: A possible partner for artemisinin. *Malar J*, 2016, 15, 1–11.
- Ben El Ayouchia H, Bahsis L, Anane H, Domingo LR, Stiriba SE. Understanding the mechanism and regioselectivity of the copper(i) catalyzed [3 + 2] cycloaddition reaction between azide and alkyne: A systematic DFT study. *RSC Adv*, 2018, 8, 7670–7678.
- Biamonte MA, Wanner J, Le Roch KG. Recent advances in malaria drug discovery. *Bioorg Med Chem Lett*, 2013, 23, 2829–2843.
- Bock VD, Hiemstra H, Van Maarseveen JH. Cu I-catalyzed alkyne-azide “click” cycloadditions from a mechanistic and synthetic perspective. *Eur J Org Chem*, 2006, 51–68.
- Chemicalize, <https://chemicalize.com/#/calculation>, pristupljeno 02.06.2019.
- 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 – UK*, 2017, 7, 42717.
- Dheer D, Singh V, Shankar R. Medicinal attributes of 1,2,3-triazoles: Current developments. *Bioorg Chem*, 2017, 71, 30–54.
- Drugs, [www.drugs.com](http://www.drugs.com), pristupljeno 15.5.2019.
- Faraz KM, Garima V, Wasim A, Akranth M, Mumtaz AM. Synthetic Trends Followed for the Development of 1,2,3-Triazole Derivatives. *Int J Drug Dev*, 2017, 9, 22–25.



- Fiedorowicz JG, Swartz KL. The role of monoamine oxidase inhibitors in current psychiatric practice. *J Psychiatr Pract*, 2004, 10, 239–248.
- Filali I, Romdhane A, Znati M, B. Jannet H, Bouajila J. Synthesis of New Harmine Isoxazoles and Evaluation of their Potential Anti-Alzheimer, Anti-inflammatory, and Anticancer Activities. *Med Chem*, 2016, 12, 184–190.
- Frédéric R, Bruyère C, Vancraeynest C, Reniers J, Meinguet C, Pochet L, Backlund A, Masereel B, Kiss R, Wouters J. Novel trisubstituted harmine derivatives with original in vitro anticancer activity. *J Med Chem*, 2012, 55, 6489–6501.
- Frost D, Meechoovet B, Wang T, Gately S, Giorgetti M, Shcherbakova I, Dunckley T.  $\beta$ -carboline compounds, including Harmine, inhibit DYRK1A and Tau phosphorylation at multiple Alzheimer's disease-related sites. *PLoS ONE*, 2011, 6(5).
- Guo L, Chen W, Cao R, Fan W, Ma Q, Zhang J, Dai, B. Synthesis and structure-activity relationships of asymmetric dimeric  $\beta$ -carboline derivatives as potential antitumor agents. *Eur J Med Chem*, 2018, 147, 253–265.
- Harmine, <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/5280953>, pristupljeno 24.04.2019.
- Harmine, <https://en.wikipedia.org/wiki/Harmine>, pristupljeno 24.04.2019.
- Himo F, Lovell T, Hilgraf R, Rostovtsev VV, Noodleman L, Sharpless KB, Fokin VV(). Copper(I)-catalyzed synthesis of azoles. DFT study predicts unprecedented reactivity and intermediates. *J Am Chem Soc*, 2005, 127, 210–216.
- Hou J, Liu X, Shen J, Zhao G, Wang PG. The impact of click chemistry in medicinal chemistry. *Expert Opin Drug Discov*, 2012, 7, 489–501.
- Javeed M, Rasul A, Hussain G, Jabeen F, Rasool B, Shafiq N, Ali M. Harmine and its derivatives: Biological activities and therapeutic potential in human diseases. *Bangladesh J of Pharmacol*, 2018, 13, 203–213.
- Kharb R, Sharma PC, Yar MS. Pharmacological significance of triazole scaffold. *J Enzyme Inhib Med Chem*, 2011, 26, 1–21.

- Kitamura M, Koga T, Yano M, Okauchi T. Direct Synthesis of Organic Azides from Alcohols Using 2-Azido-1,3-dimethylimidazolium Hexafluorophosphate. *Synlett*, 2012, 23, 1335–1338.
- Kolb HC, Finn MG, Sharpless KB. Click Chemistry: Diverse Chemical Function from a Few Good Reactions. *Angew. Chem - Int Ed*, 2001, 40, 2004–2021.
- Lauria A, Delisi R, Mingoia F, Terenzi A, Martorana A, Barone G, Almerico AM. (1,2,3-Triazole in Heterocyclic Compounds, Endowed With Biological Activity, Through 1,3-Dipolar Cycloadditions. *Eur J Org Chem*, 2014, 2014, 3289–3306.
- Lee BY, Park SR, Jeon HB, Kim KS. A new solvent system for efficient synthesis of 1,2,3-triazoles. *Tetrahedron Lett*, 2006, 47, 5105–5109.
- 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 Deliver Rev*, 1997, 23, 3–25.
- Manske RHF, Holmes HL. *The Alkaloids: Chemistry and Physiology*. SAD, Elsevier, 2014, str. 596.
- Moses JE, Moorhouse AD. The growing applications of click chemistry. *Chem Soc Rev*, 2007, 36, 1249–1262.
- Murillo-Solano C, Dong C, Sanchez CG, Pizarro JC. Identification and characterization of the antiplasmodial activity of Hsp90 inhibitors. *Malar J*, 2017, 16, 1–14.
- Onlu S, Bingol O, Turker M, Ozdemir FA.  $\beta$ -carboline production from in vitro regenerated peganum  $\beta$ -carboline production from in vitro regenerated peganum harmala l . plant, *Fresen Environ Bull*, 2018, 27, 8447–8451.
- Pathak, A., Rohilla, A., Gupta, T., Akhtar, M. J., Haider, M. R., Sharma, K., Yar, M. S. DYRK1A kinase inhibition with emphasis on neurodegeneration: A comprehensive evolution story-cum-perspective. *Eur J Med Chem*, 2018, 158, 559–592.
- Raic-Malic S, Mescic A. Recent Trends in 1,2,3-Triazolo-Nucleosides as Promising Anti-Infective and Anticancer Agents. *Curr Med Chem*, 2015, 22, 1462–1499.

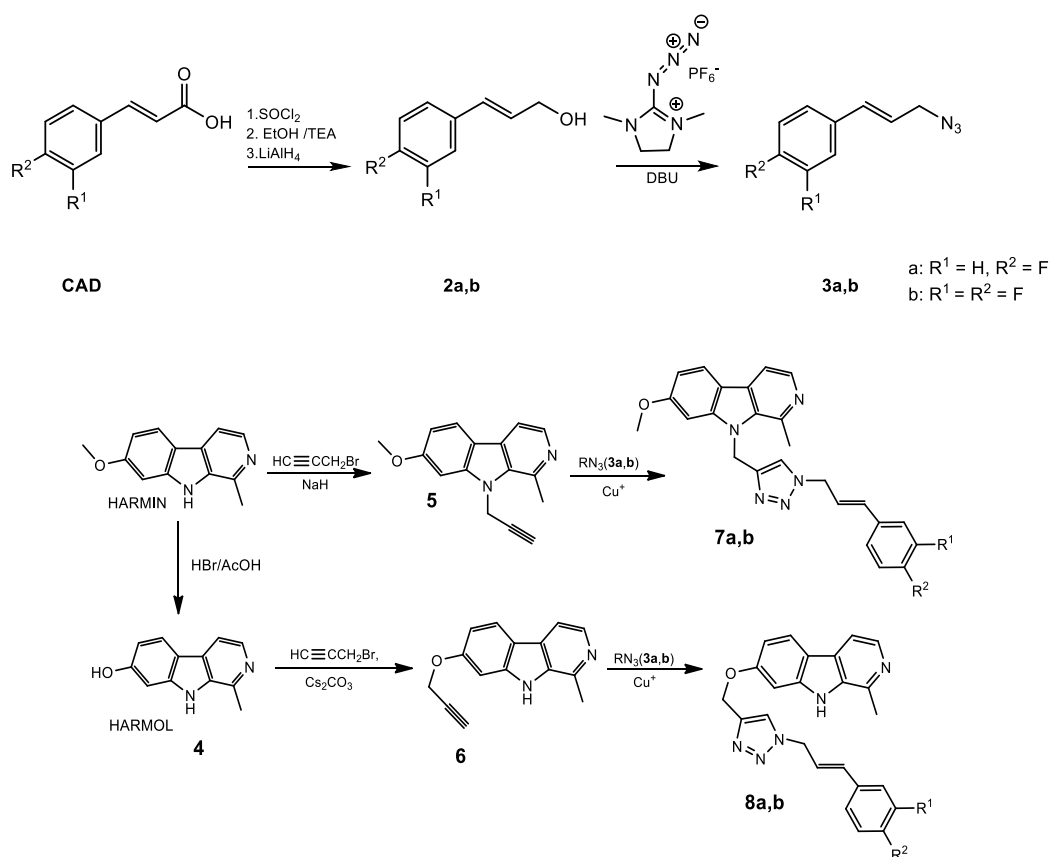
- Reniers J, Robert S, Frederick R, Masereel B, Vincent S, Wouters J. Synthesis and evaluation of  $\beta$ -carboline derivatives as potential monoamine oxidase inhibitors. *Bioorg Med Chem*, 2011, 19, 134–144.
- Rodrigues T, Prudêncio M, Moreira R, Mota MM, Lopes, F. Targeting the liver stage of malaria parasites: A yet unmet goal. *J Med Chem*, 2012, 55, 995–1012.
- Shahinas D, Folefoc A, Pillai D. Targeting Plasmodium falciparum Hsp90: Towards Reversing Antimalarial Resistance. *Pathogens*, 2013, 2, 33–54.
- Shankaraiah N, Jadala C, Nekkanti S, Senwar KR, Nagesh N, Shrivastava S, Kamal A. Design and synthesis of C3-tethered 1,2,3-triazolo- $\beta$ -carboline derivatives: Anticancer activity, DNA-binding ability, viscosity and molecular modeling studies. *Bioorg Chem*, 2016, 64, 42–50.
- SwissADME, <http://www.swissadme.ch/>, pristupljeno 02.06.2019.
- 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.
- Wang T, Mäser, P, Picard D. Inhibition of Plasmodium falciparum Hsp90 Contributes to the Antimalarial Activities of Aminoalcohol-carbazoles. *J Med Chem*, 2016, 59, 6344–6352.
- Williamson, AW. On etherification. *Q. J Chem Soc*, 1852, 4, 229.
- World health organization, <https://www.who.int/malaria/media/world-malaria-report-2018/en/>, pristupljeno 20.03.2019.
- Worrell BT, Malik JA, Fokin VV. Direct evidence of a dinuclear copper intermediate in Cu(I)-catalyzed azide-alkyne cycloadditions. *Science*, 2013, 340, 457–460.
- Zhu L, Brassard CJ, Zhang X, Guha PM, Clark RJ. On the Mechanism of Copper(I)-Catalyzed Azide–Alkyne Cycloaddition. *Chem Rec*, 2016, 16, 1501–1517.
- 123RF, [https://www.123rf.com/stock-photo/peganum\\_harmala.html](https://www.123rf.com/stock-photo/peganum_harmala.html), pristupljeno 20.03.2019.

## **7. SAŽETAK / SUMMARY**

## Sinteza i karakterizacija novih 1,2,3-triazolnih derivata harmina i cimetne kiseline

Ovaj rad dio je istraživanja provedenog na Zavodu za farmaceutsku kemiju Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu koji obuhvaća dizajniranje, sintetiziranje i biološku evaluaciju derivata harmina s antimalarijskim djelovanjem. Cilj ovog rada bila je sinteza i karakterizacija dosad neopisana četiri 1,2,3-triazolna derivata harmina koji u svojoj strukturi sadrže derivate cimetne kiseline.

Sinteza je započeta prevođenjem derivata cimetne kiseline do odgovarajućih azida (**3a,b**) prema dolje navedenoj shemi, a harmin i harmol, alkohol nastao demetiliranjem harmina, prevedeni su u odgovarajuće alkinne (**5 i 6**) u reakciji s propargil bromidom. Bakar (I)-katalizirajućom azid-alkin ciklizacijom u kojoj su početni reaktanti bili azidi derivata cimetne kiseline (**3a,b**) i alkinni (**5 i 6**) dobiveni su konačni produkti **7a,b** i **8a,b**.



Strukture svih sintetiziranih spojeva potvrđene su uobičajenim spektroskopskim metodama (IR, <sup>1</sup>H i <sup>13</sup>C NMR, MS). Čvrstim produktima određeno je talište. Sva četiri spoja zadovoljavaju Lipinskijeva i Veberova pravila, a dobru oralnu bioraspodjeljivost predviđa im i alat SwissADME.

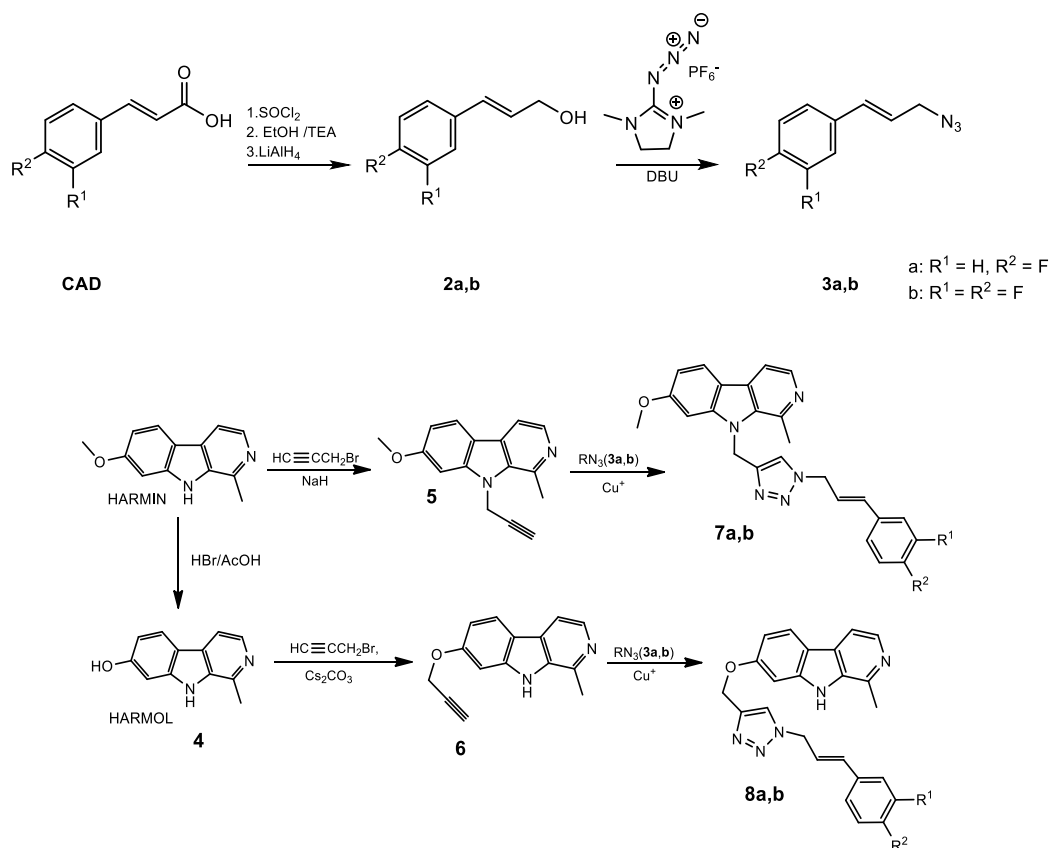
Sintetiziranim derivatima će u daljnjim istraživanjima biti ispitano biološko djelovanje.

Ključne riječi: harmin, cimetna kiselina, 1,2,3-triazol, sinteza

## Synthesis and characterization of novel harmine and cinnamic acid 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. Main focus of the research is 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 four novel harmine 1,2,3-triazole derivatives containing cinnamic acid derivatives in their structure.

Synthesis began with transformation of cinnamic acid derivatives to azides (**3a,b**) in a four step procedure. On the other hand, harmine and harmole (**4**), an alcohol generated by demethylation of harmine, were transformed in alkynes **5** and **6**, in the reaction of alkylation using propargyl bromide. The copper(I)-catalyzed azide-alkyne cycloaddition, in which cinnamic acid derivatives azides (**3a,b**) and alkynes (**5** and **6**) were used, resulted in the formation of final compounds **7a,b** (*N*-derivatives) and **8a,b** (*O*-derivatives).



Structures of the newly prepared compounds were confirmed using conventional analytical and spectroscopic methods (IR, <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C NMR, MS). Melting points of the solid compounds were also determined.

All four novel derivatives meet all of the Lipinski and Veber criteria for good oral bioavailability of potential drugs. SwissADME web tool predicts good oral bioavailability of all four derivatives.

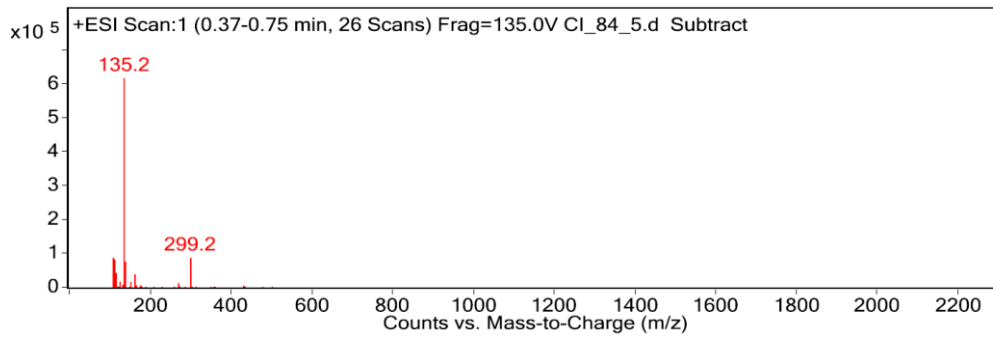
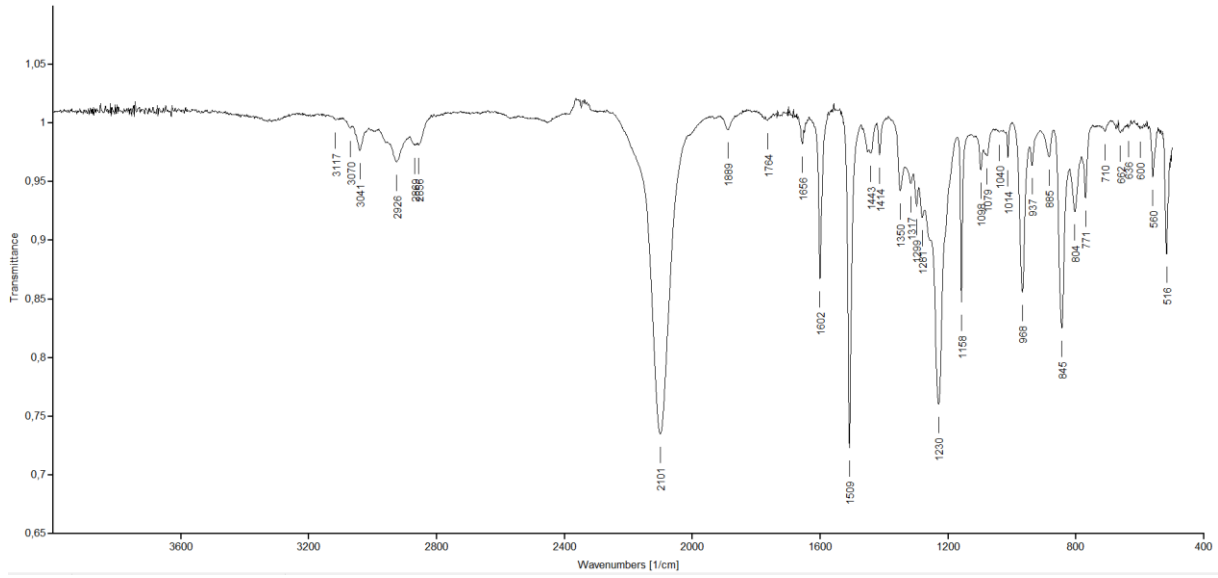
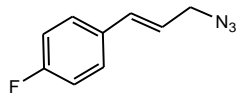
Further studies will investigate antimalarial activity of the new harmine derivatives.

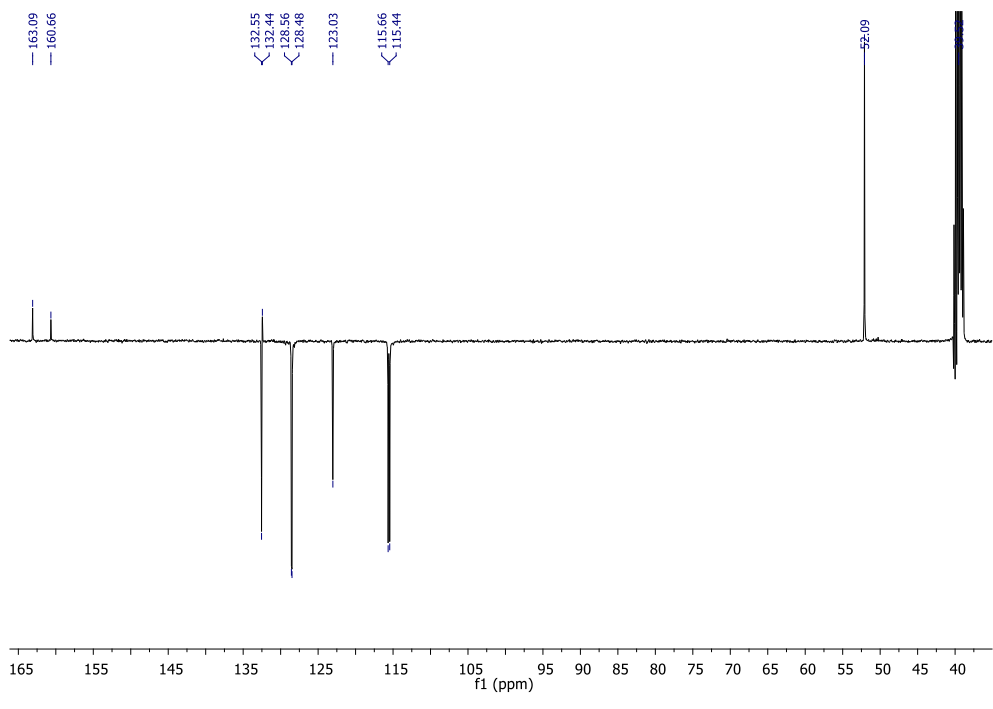
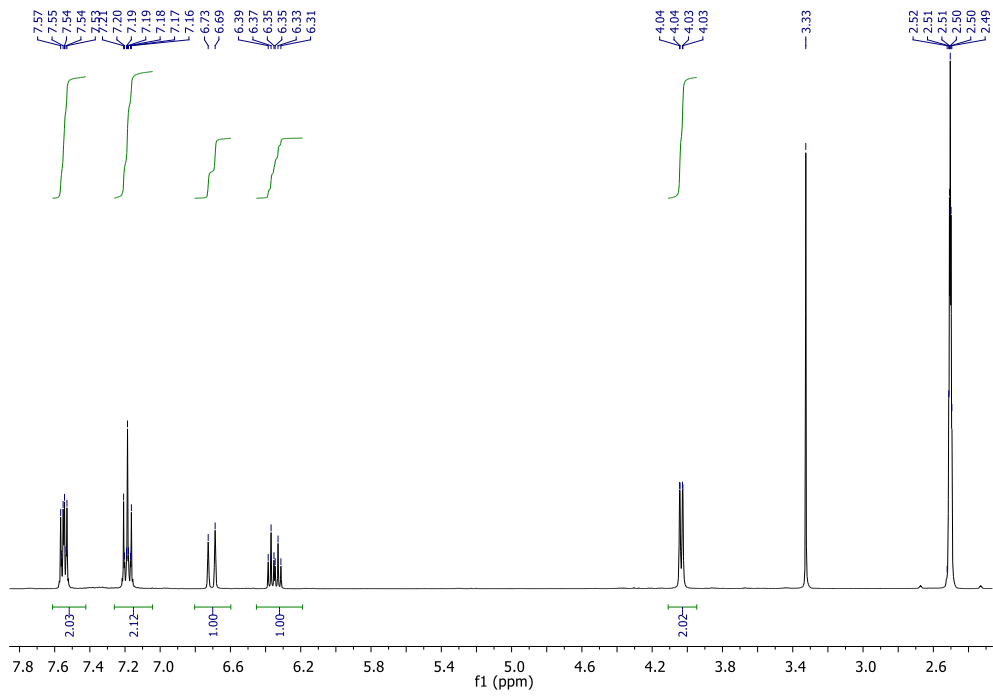
Keywords: harmine, cinnamic acid, 1,2,3-triazoles, synthesis



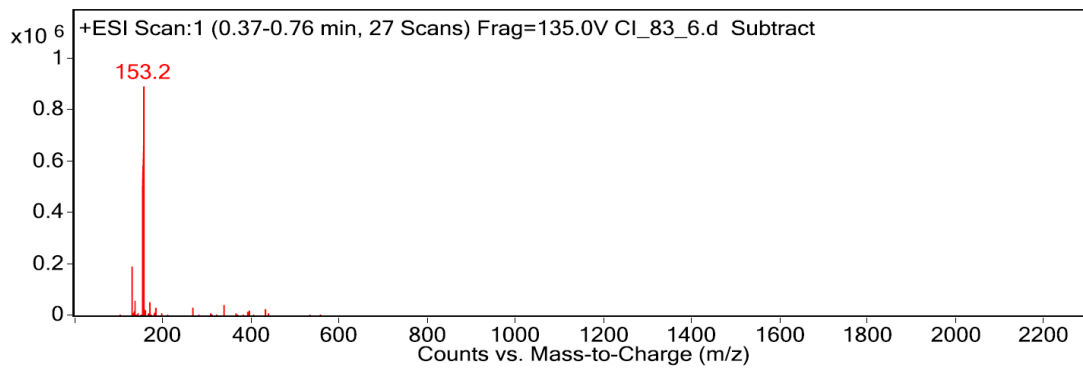
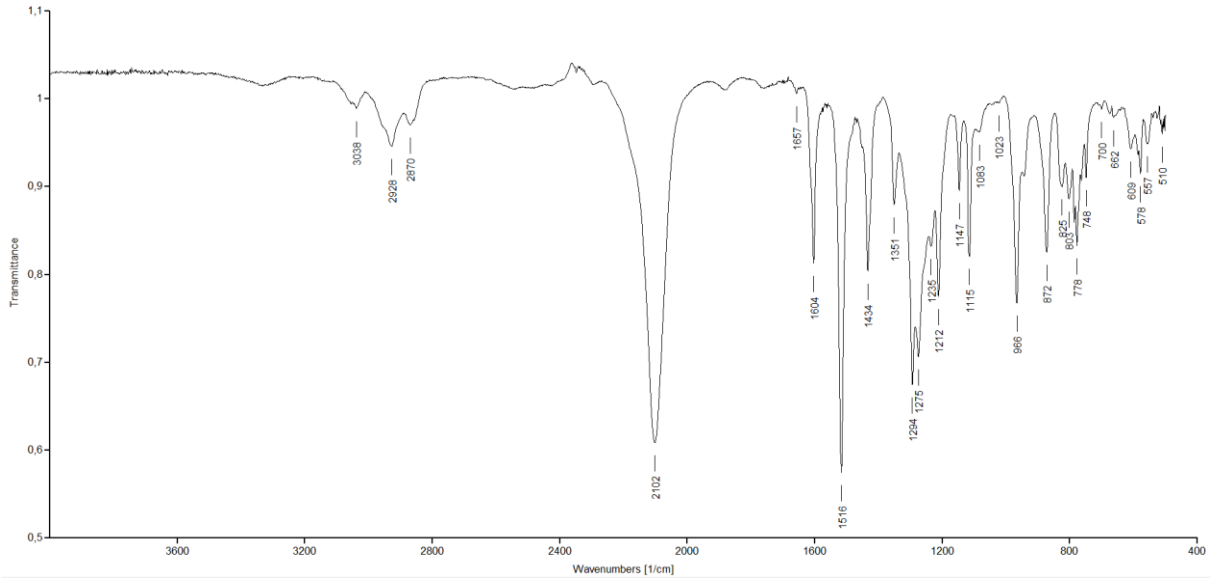
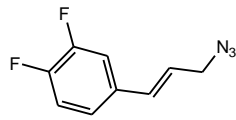
## **8. PRILOZI**

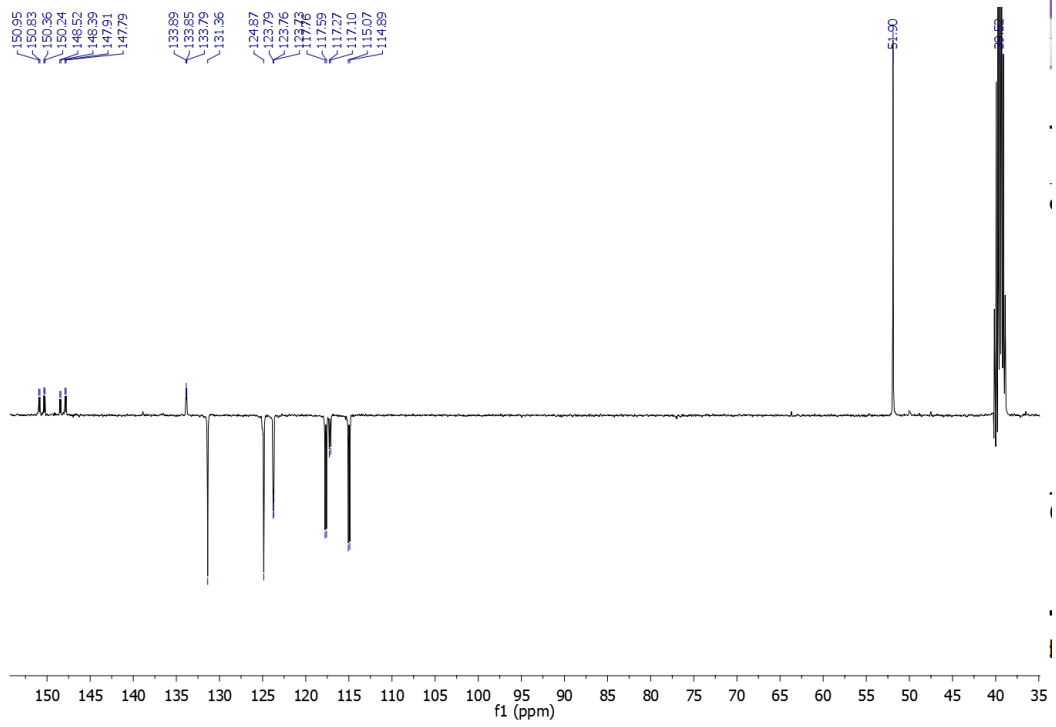
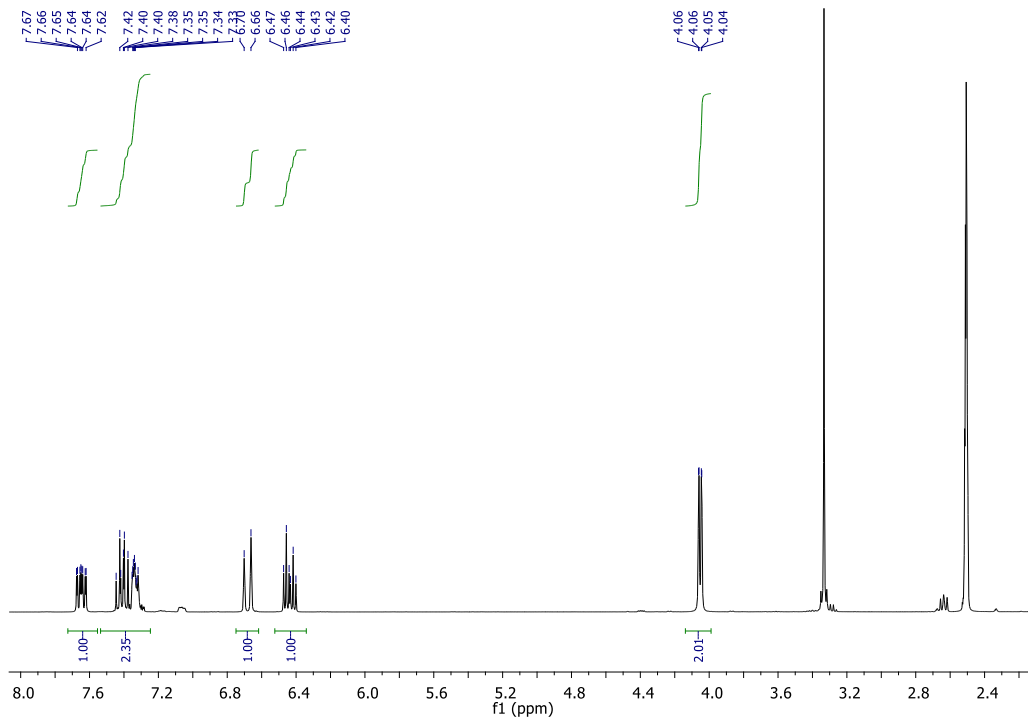
**3a**



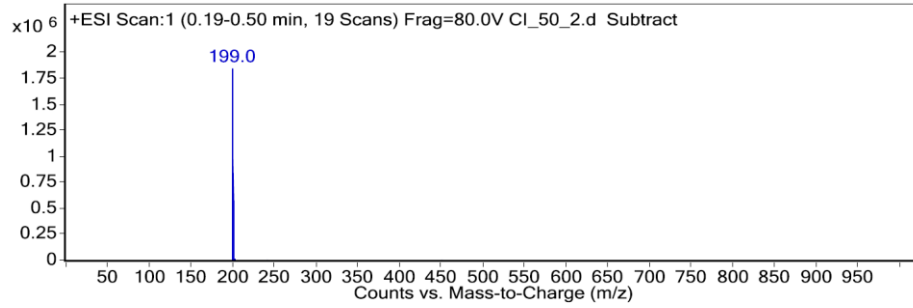
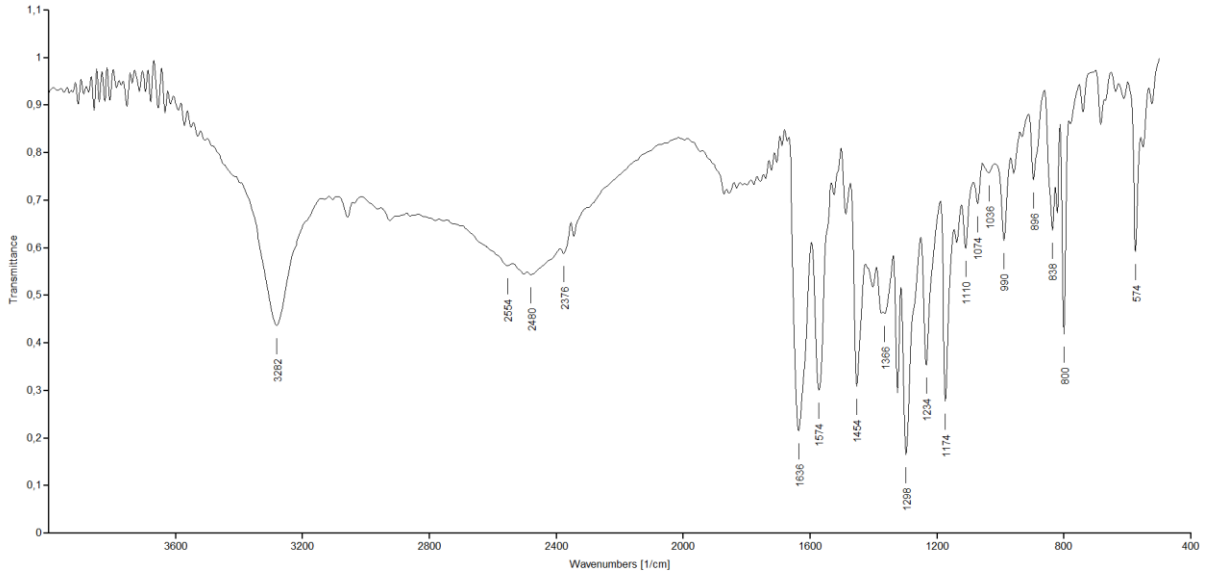
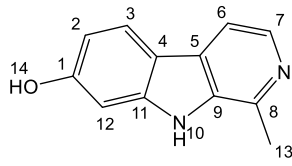


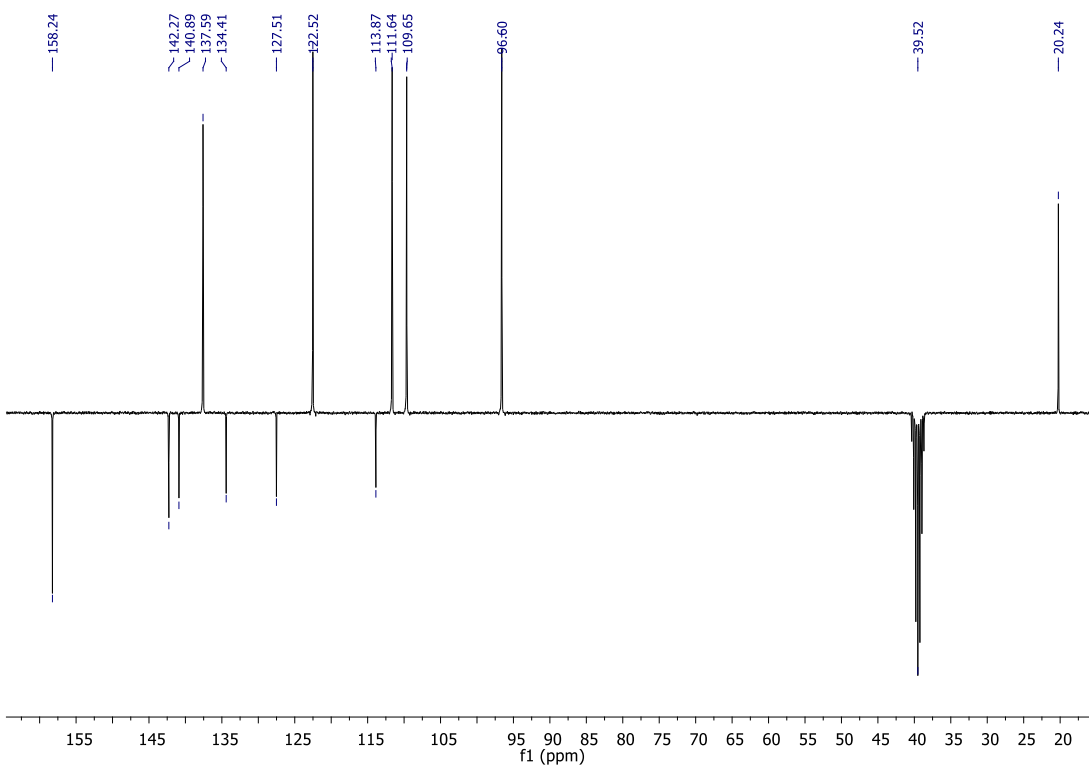
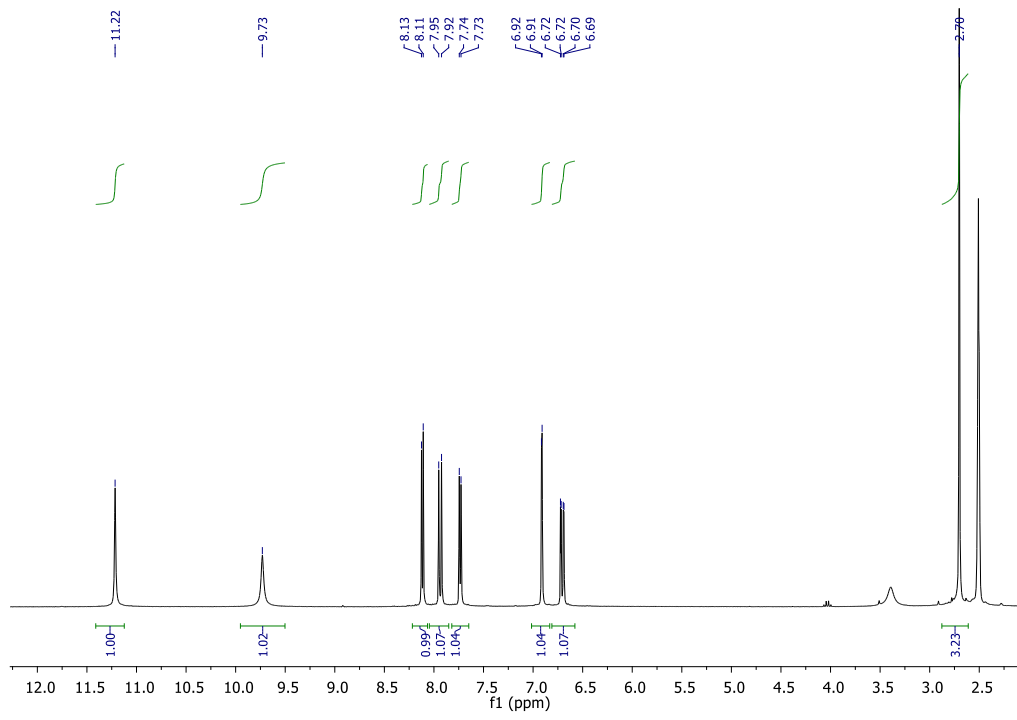
### 3b



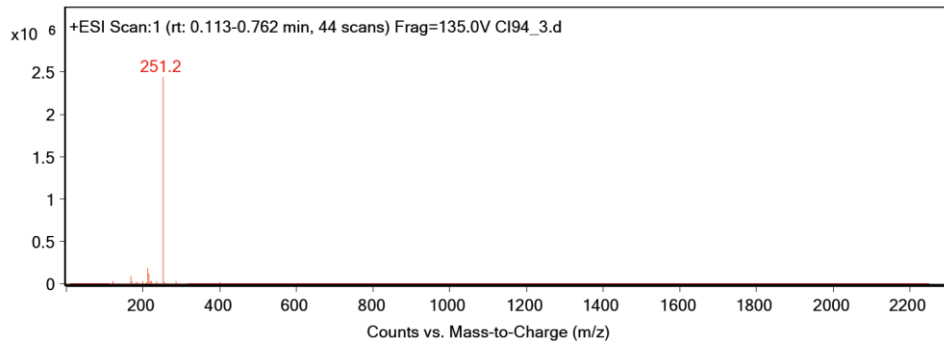
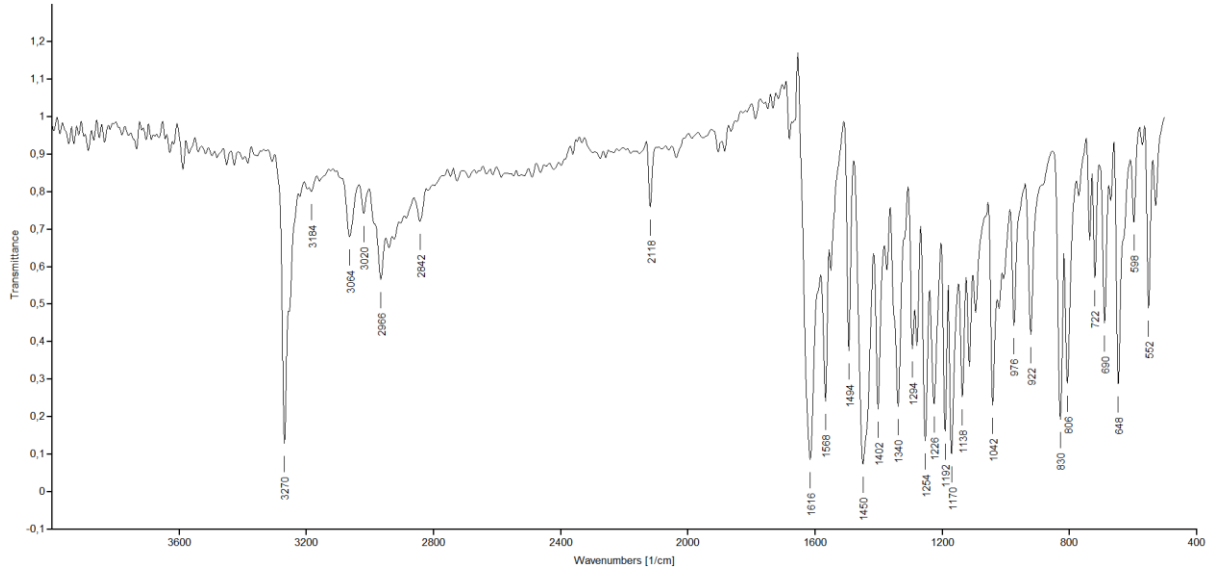
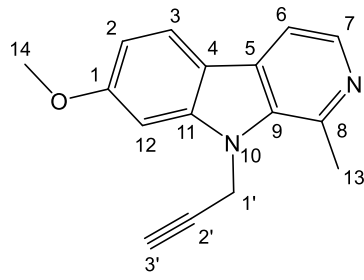


4

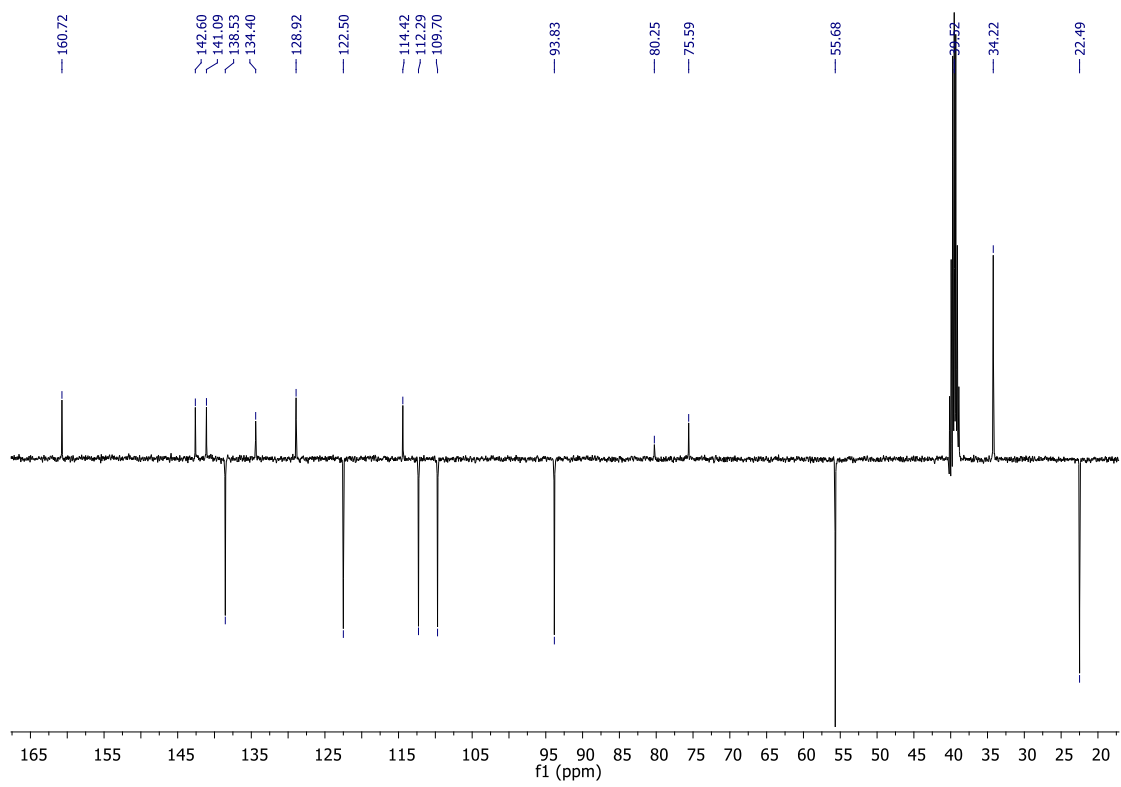
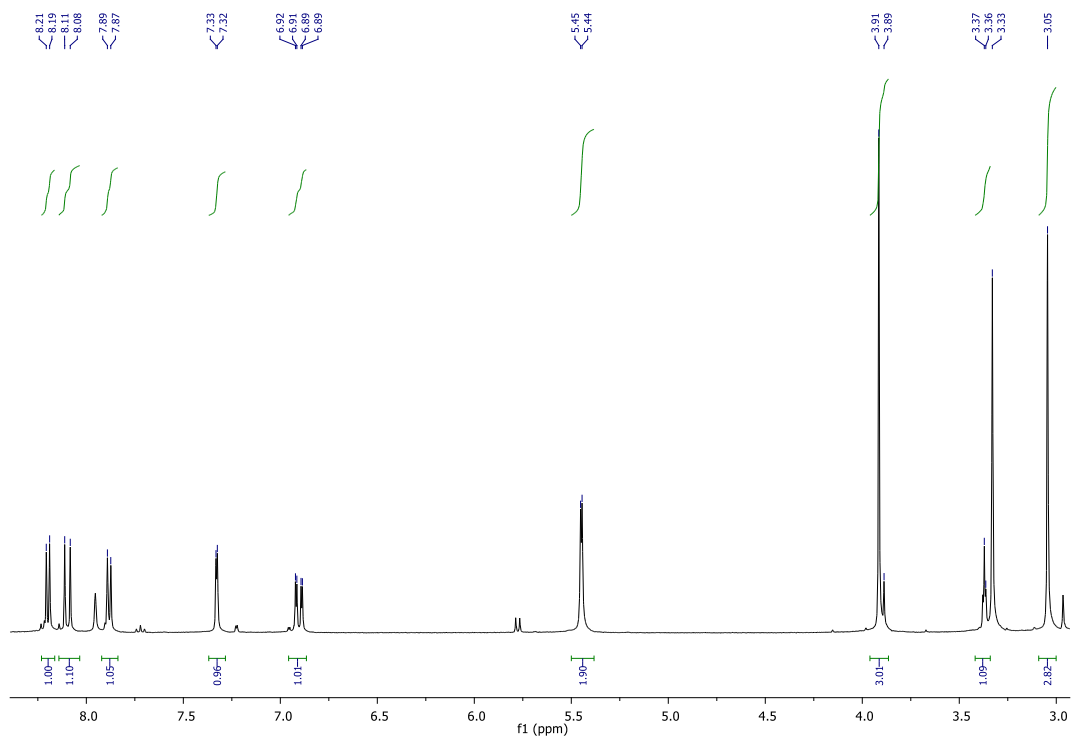




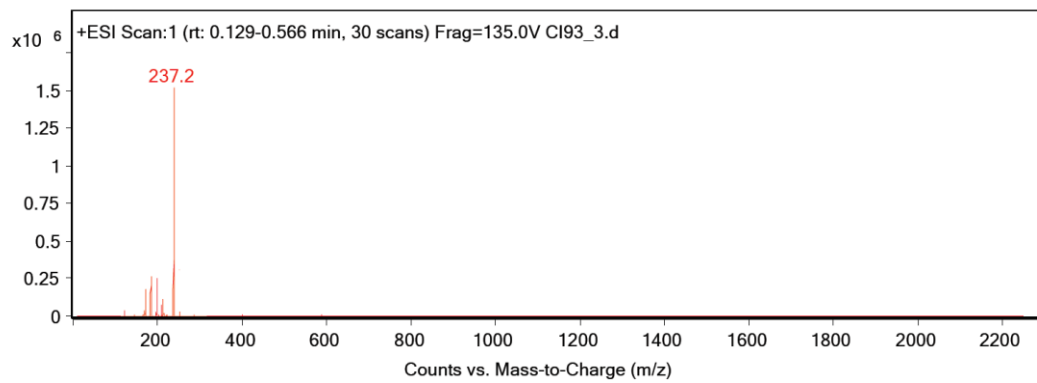
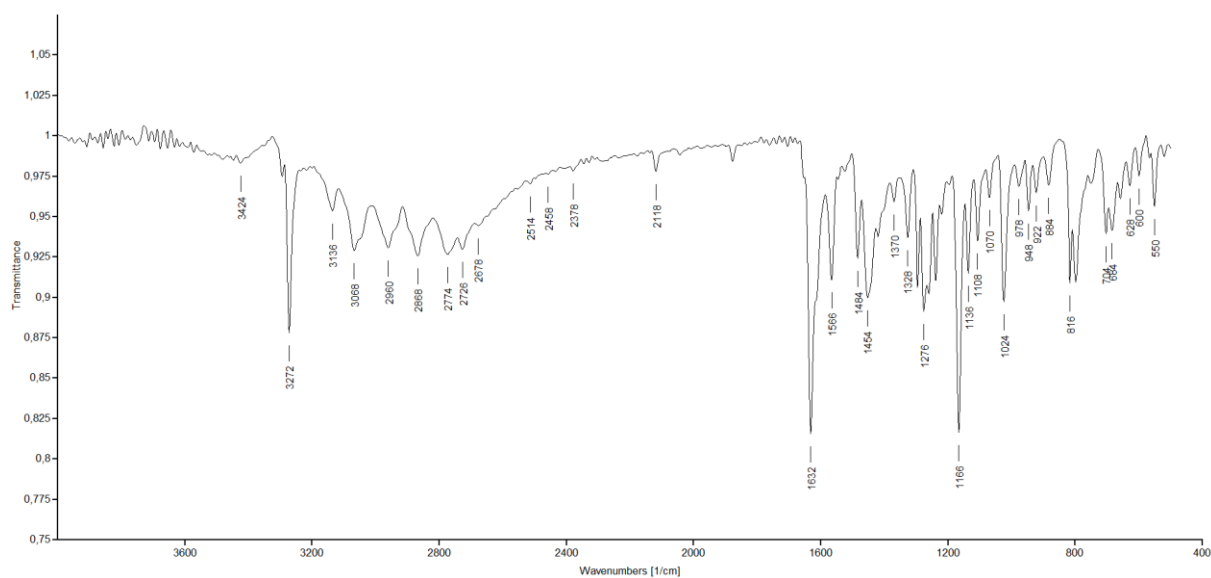
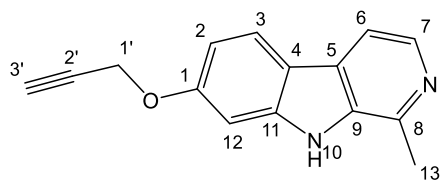
5

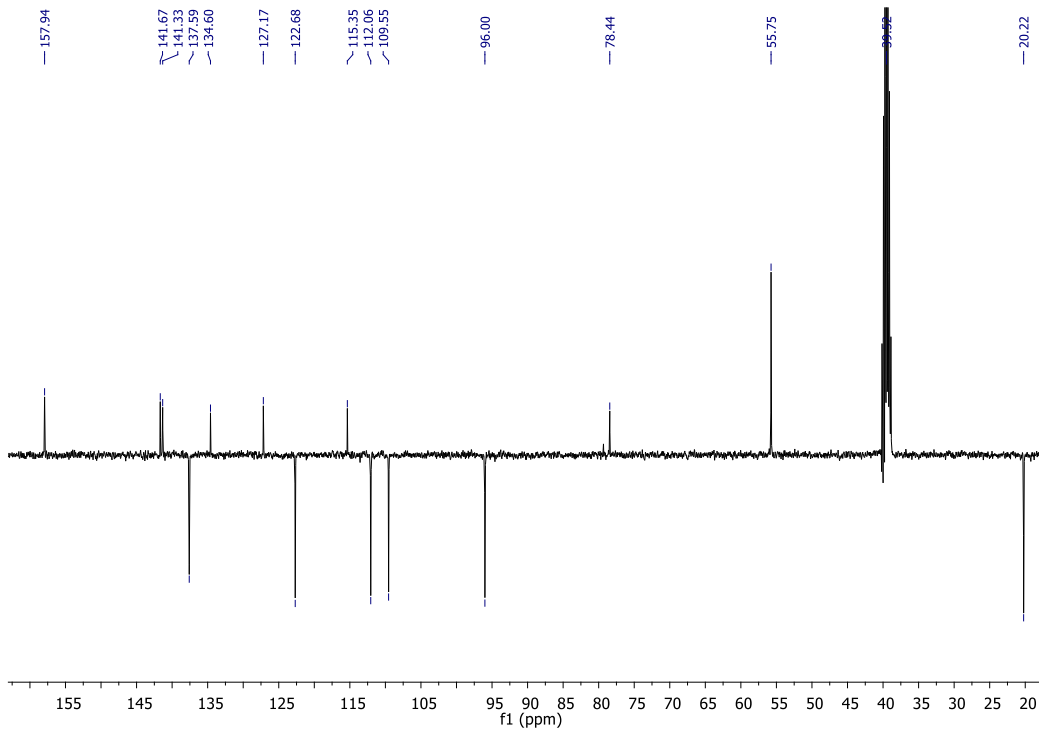
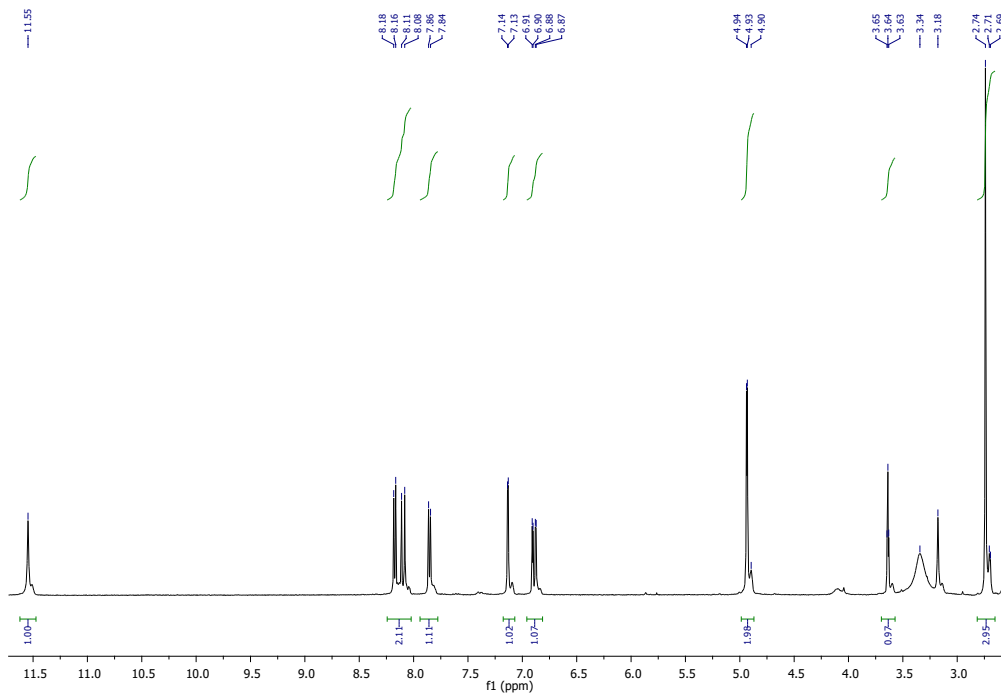




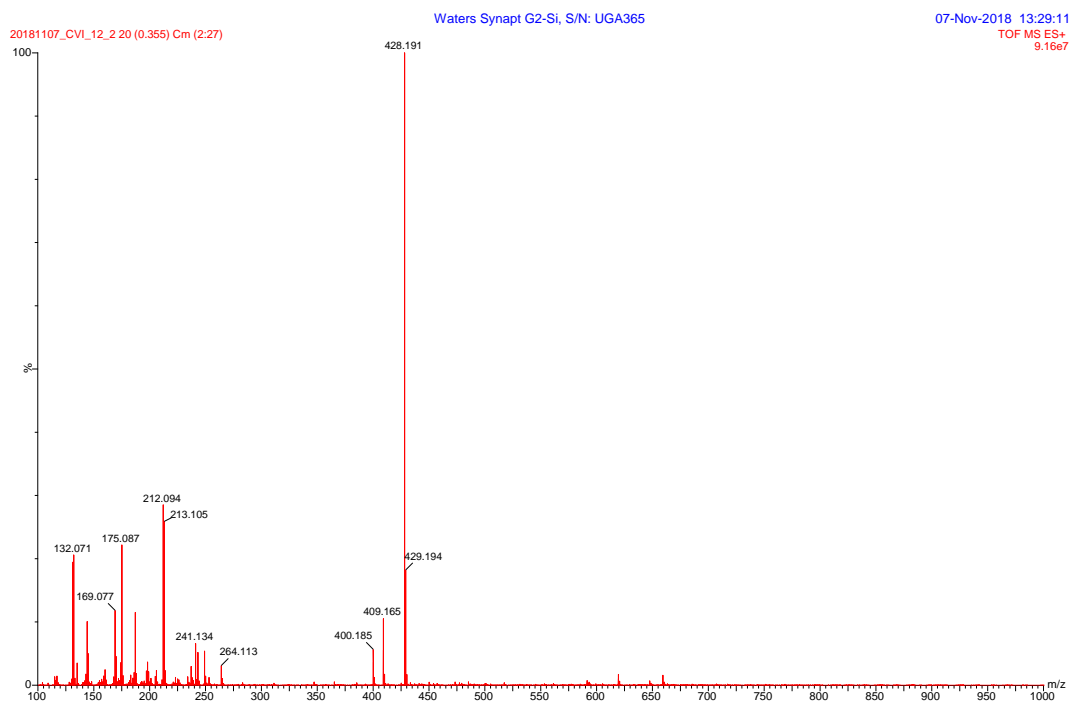
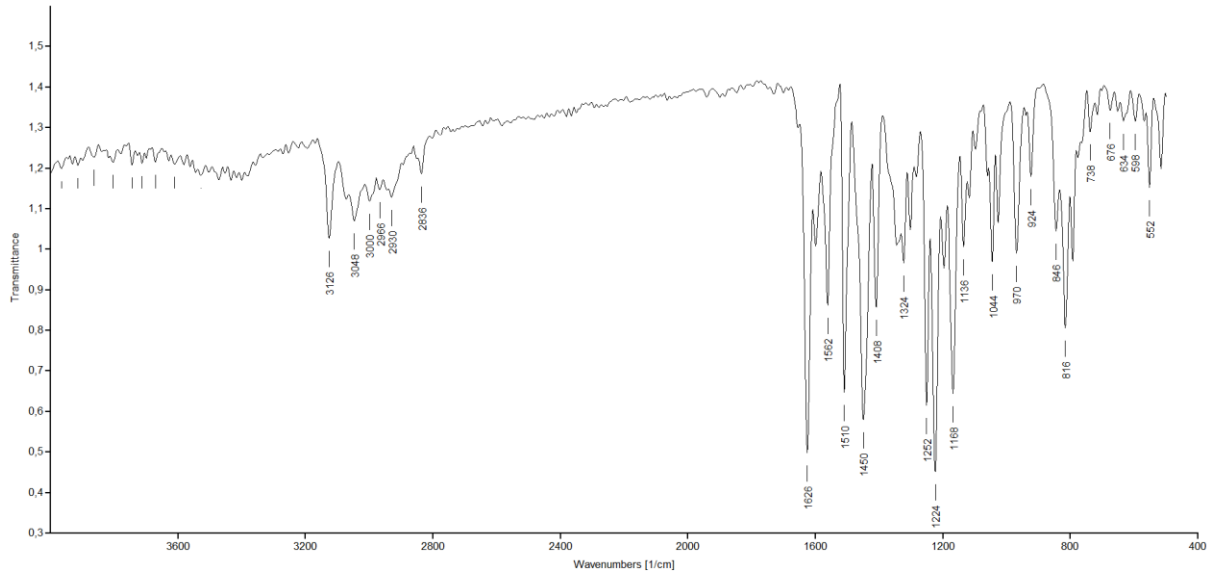
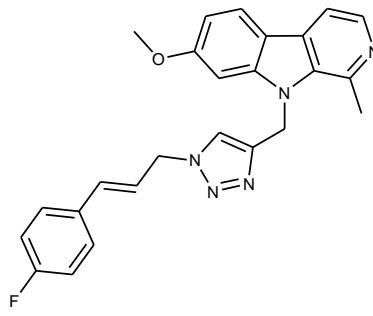


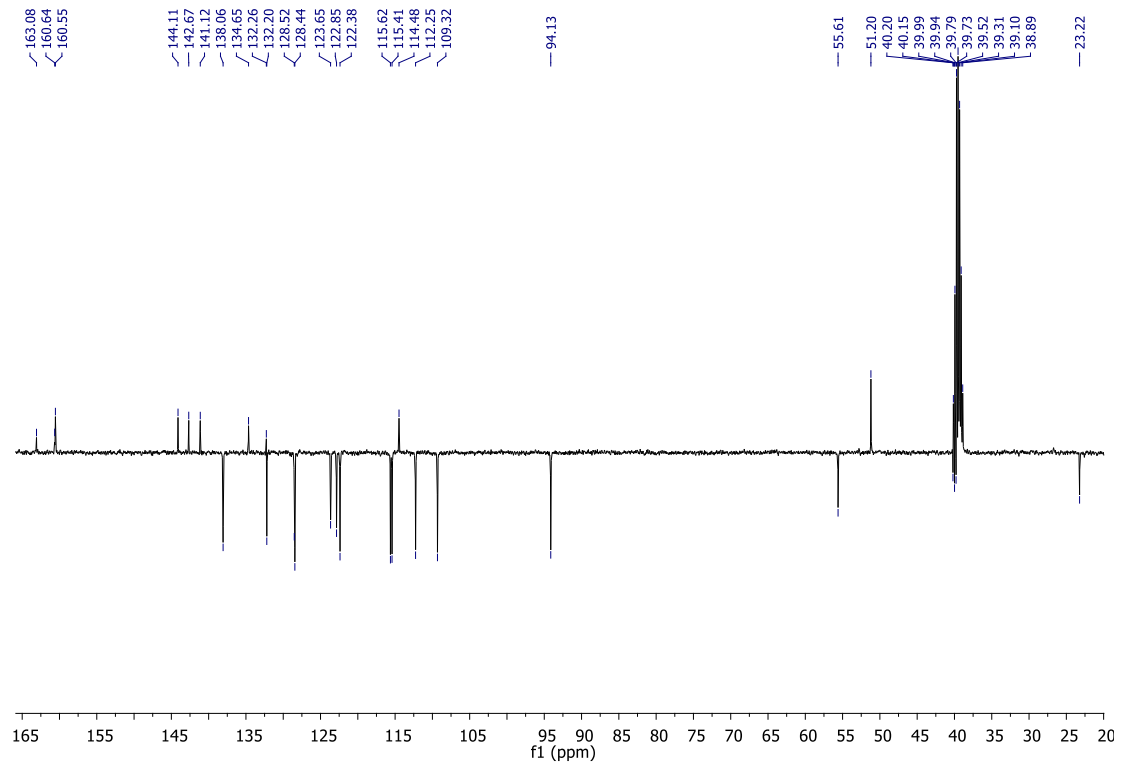
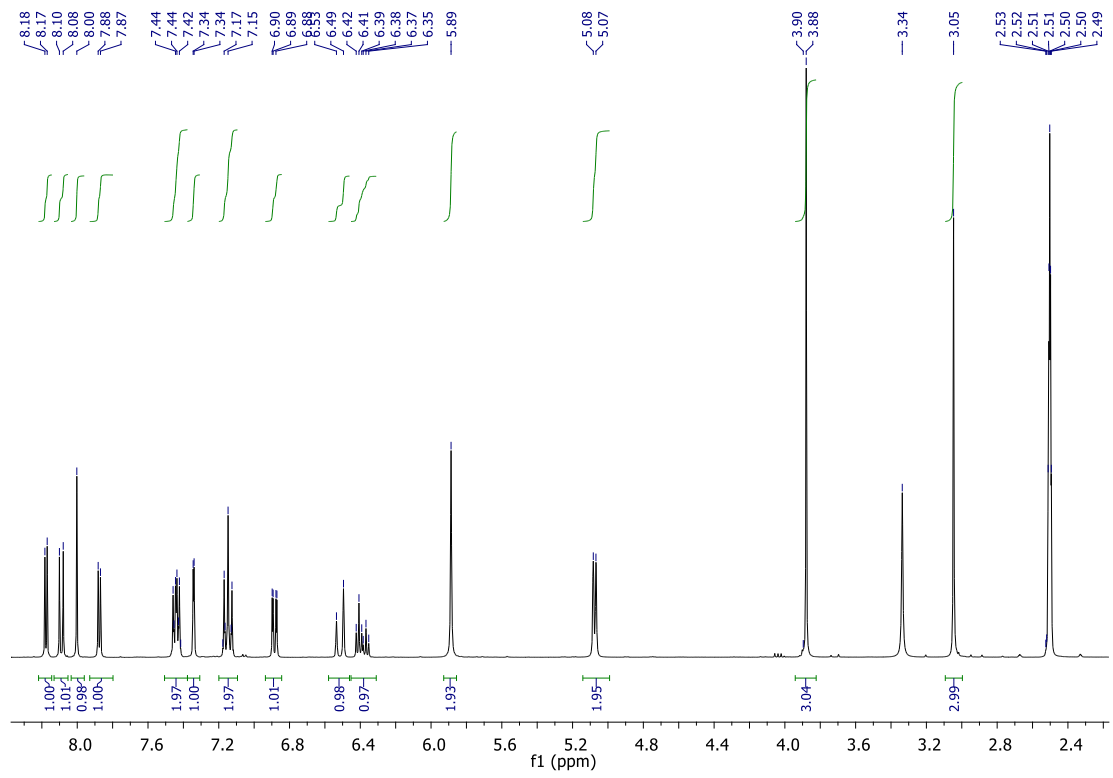
# 6



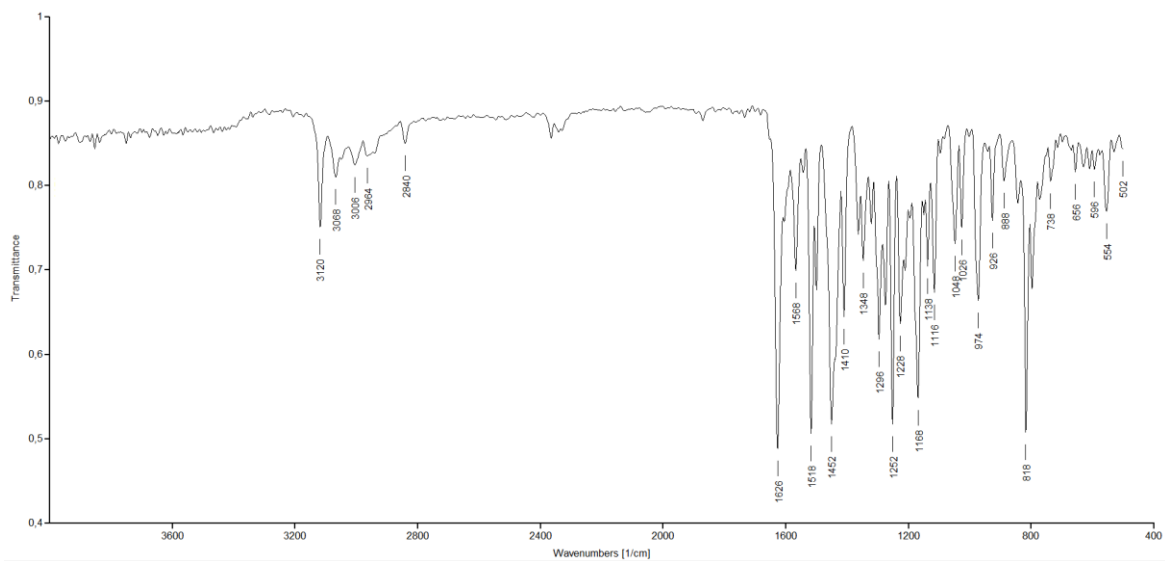
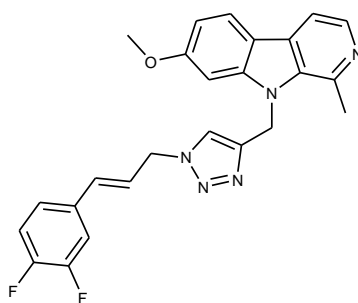


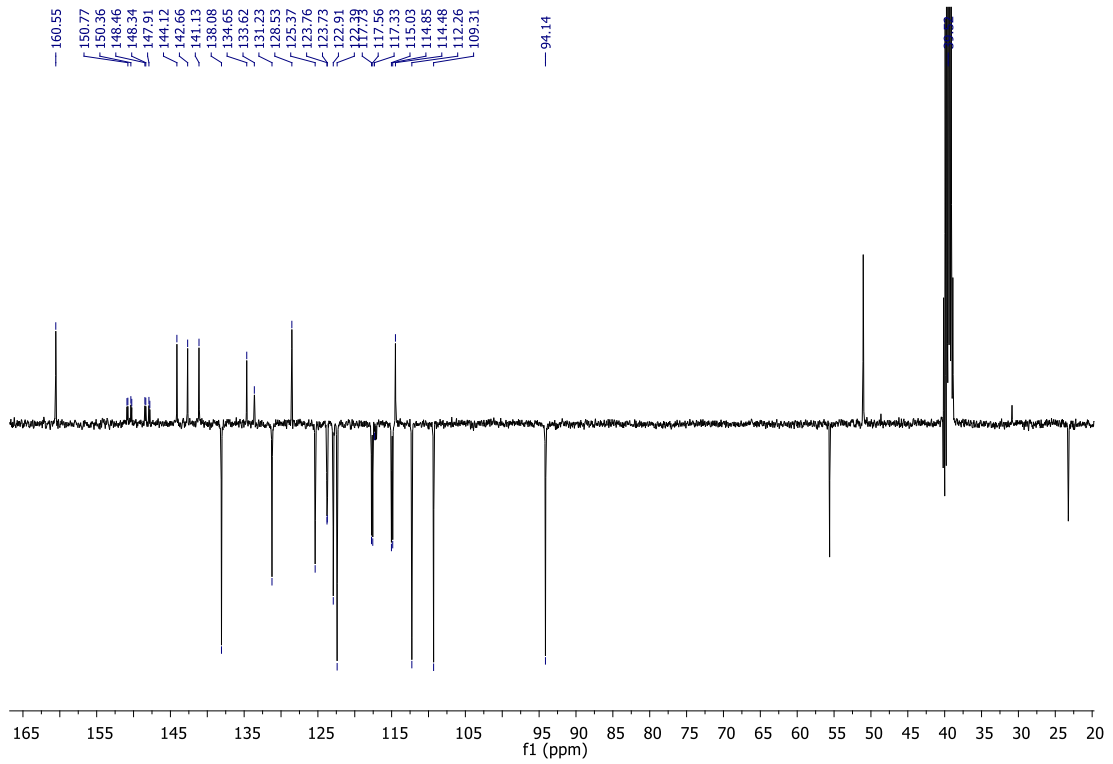
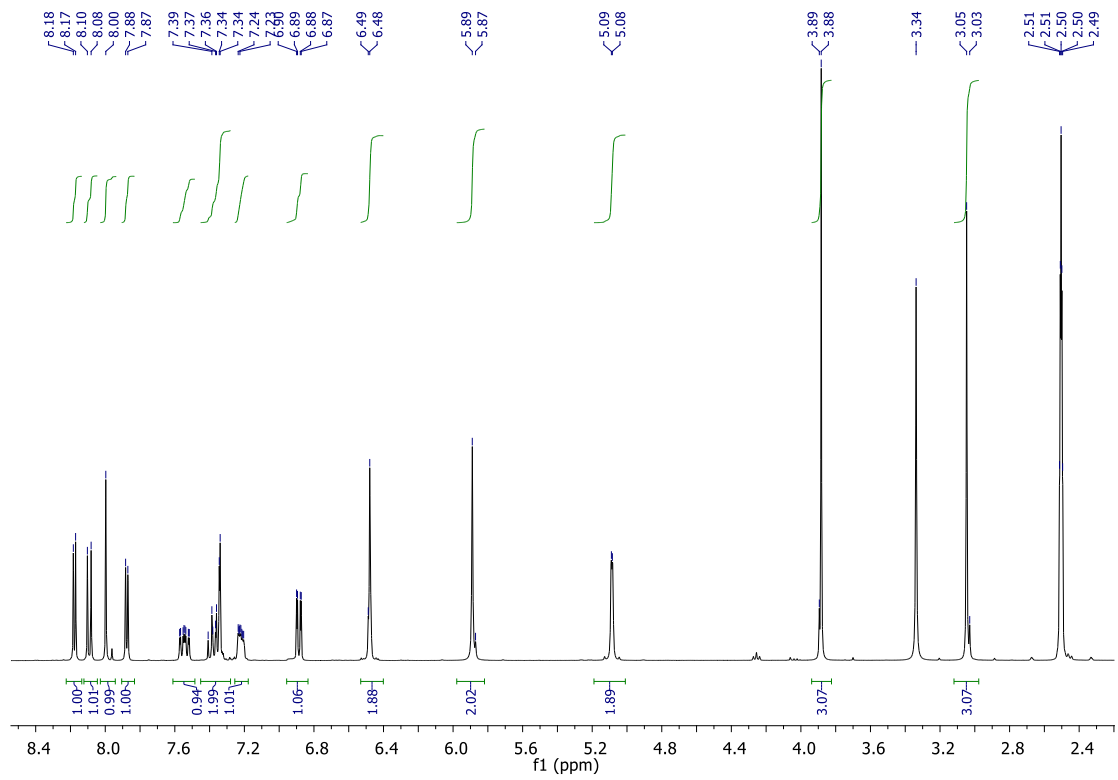
7a



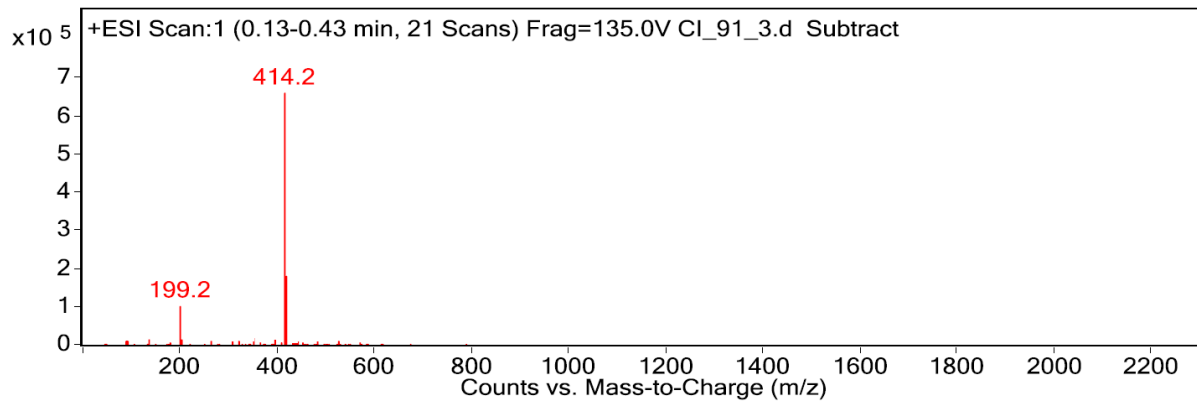
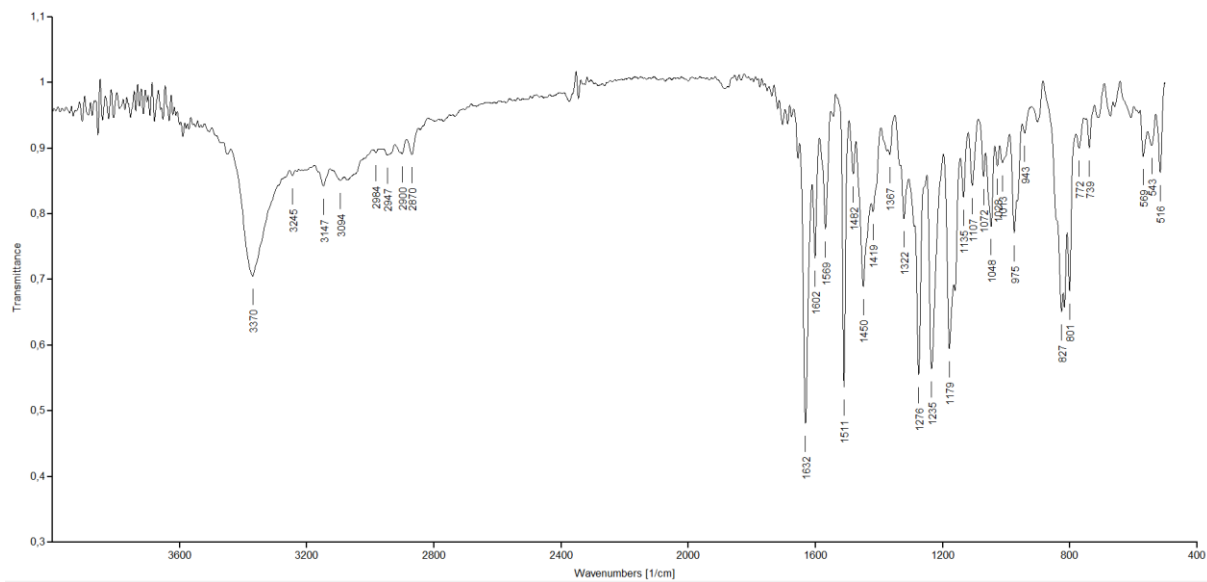
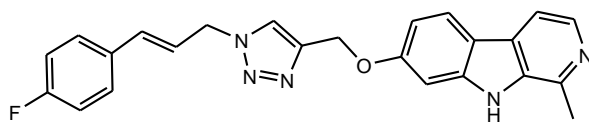


7b

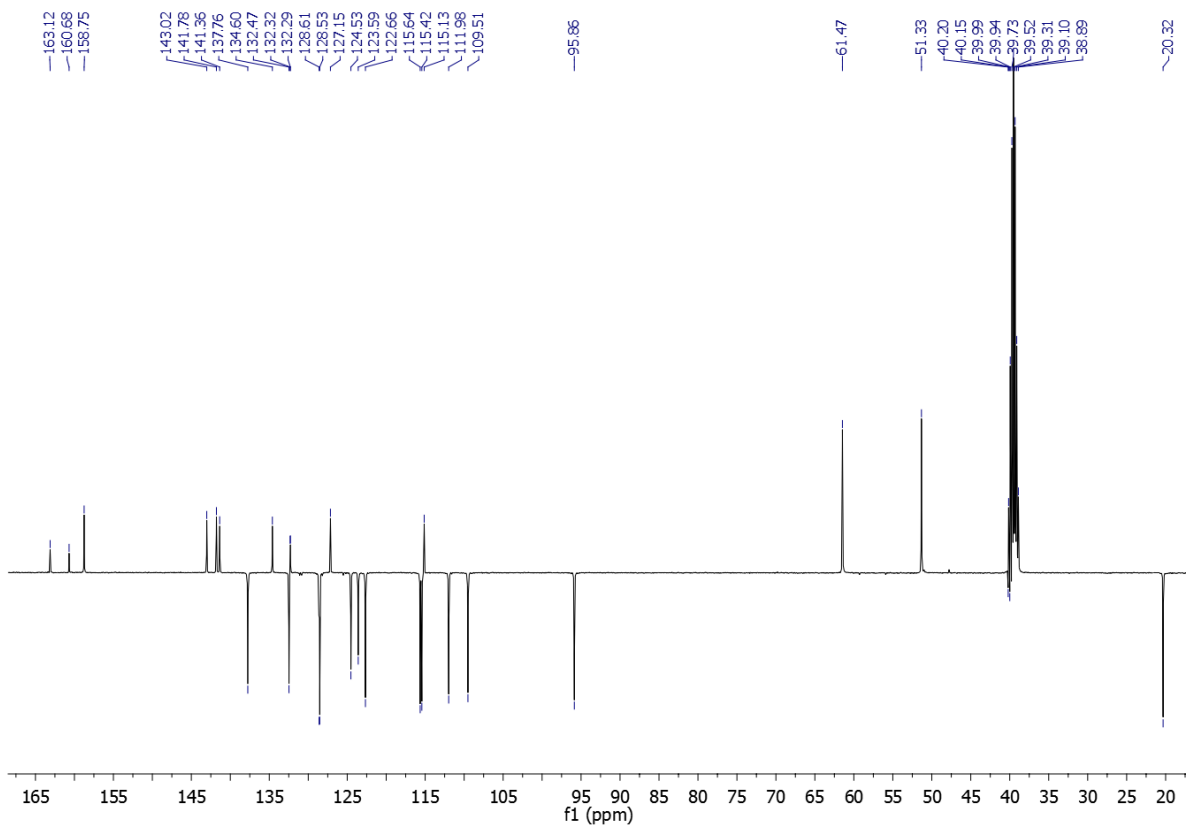
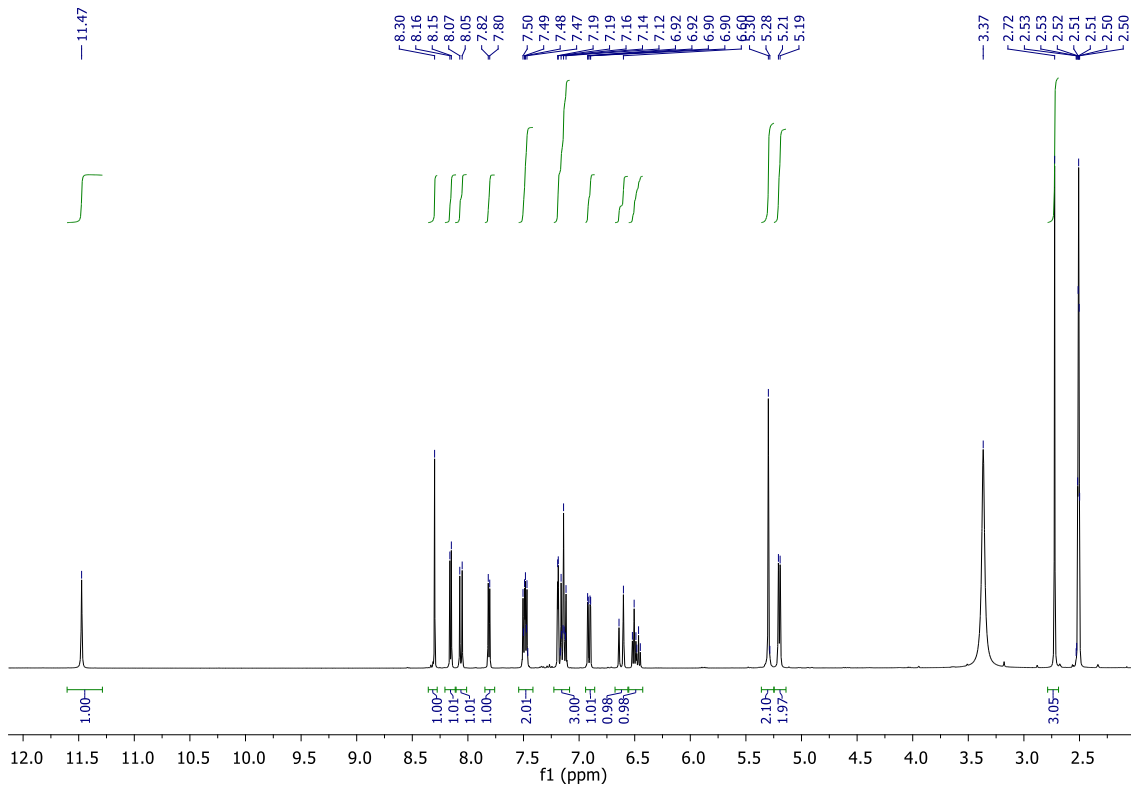




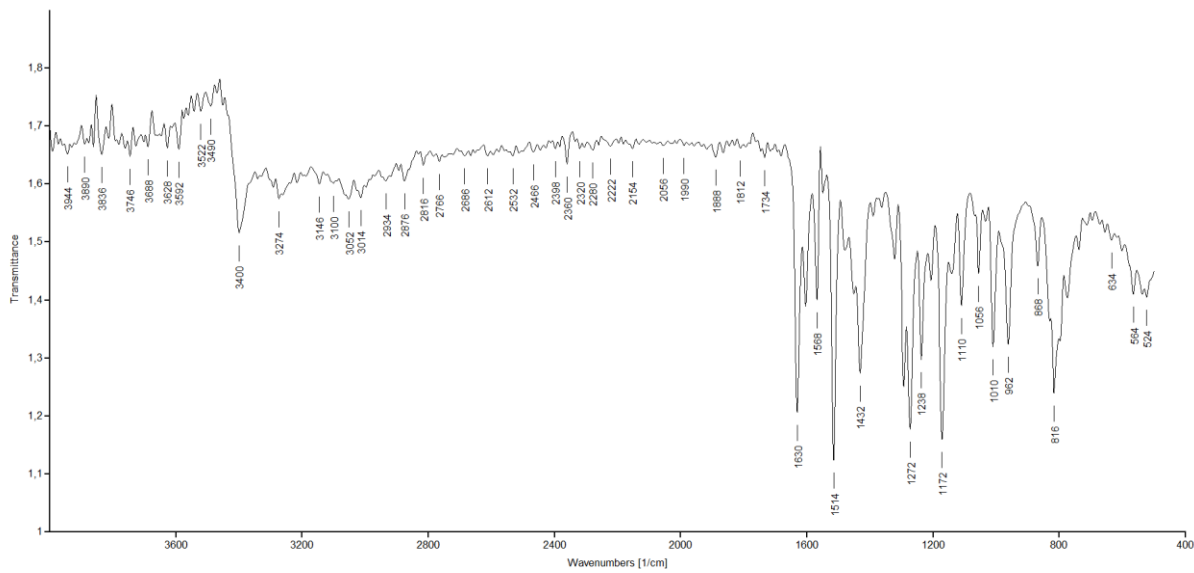
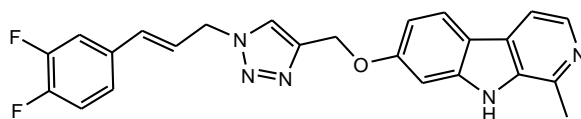
**8a**







# 8b

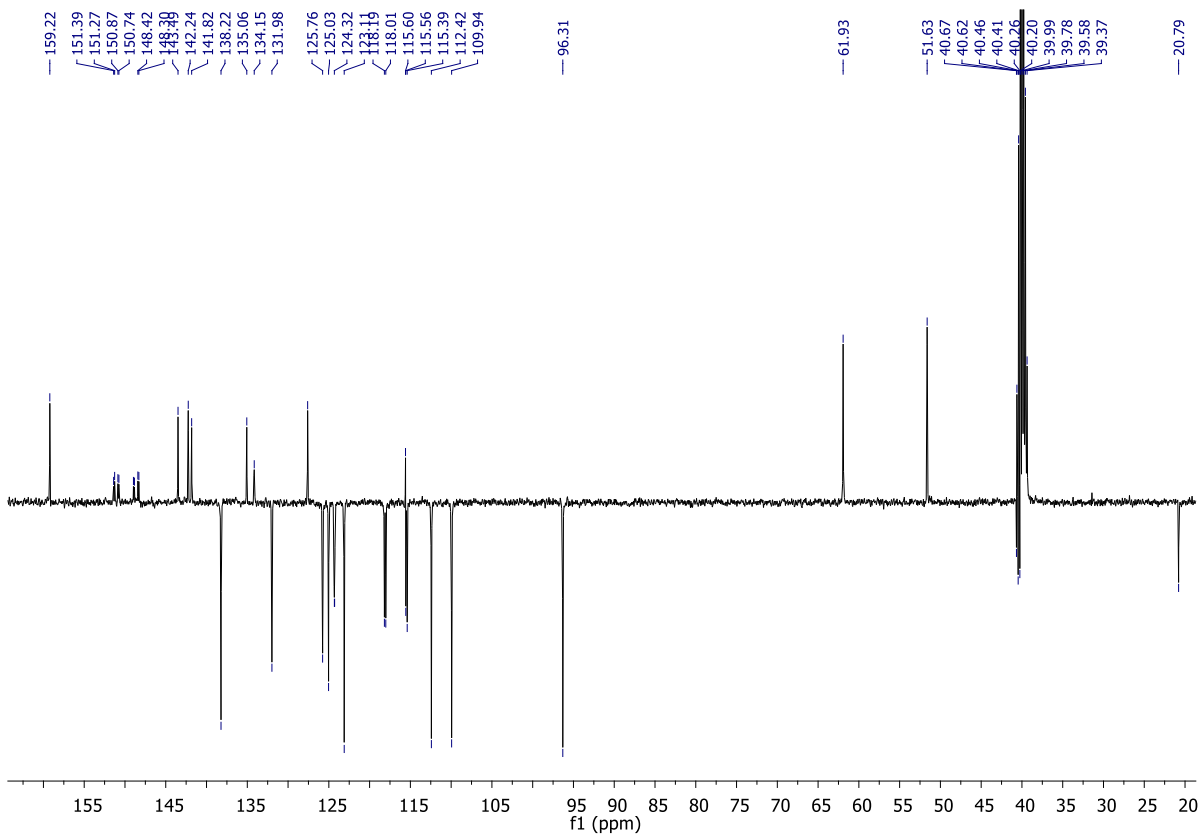
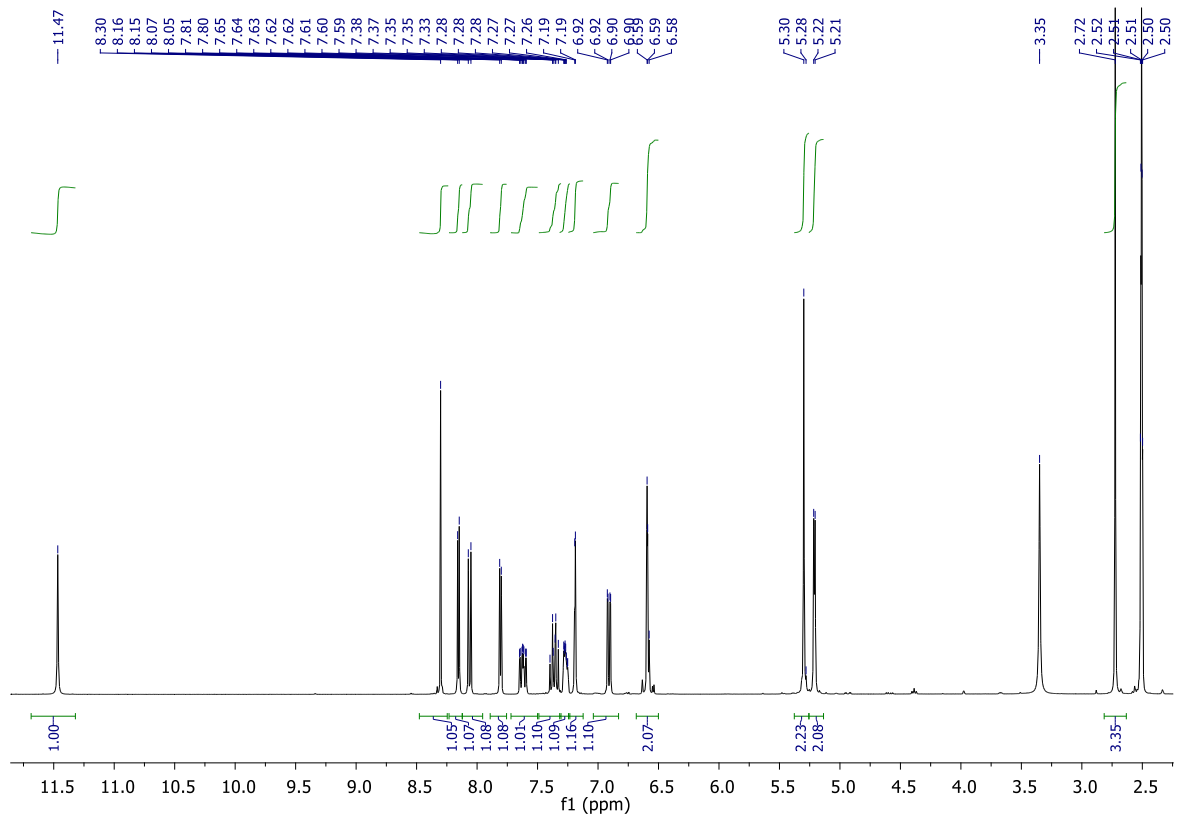


20181029\_CV111\_2 18 (0.321) Cm (1:58)

Waters Synapt G2-Si, S/N: UGA365

29-Oct-2018 15:26:25  
TOF MS ES+  
3.48e8





**9. TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA/  
BASIC DOCUMENTATION CARD**

## 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-triazolnih derivata harmina i cimetine kiseline

Gea Martinović

#### SAŽETAK

Ovaj rad dio je istraživanja provedenog na Zavodu za farmaceutsku kemiju Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu koji obuhvaća dizajniranje, sintetiziranje i biološku evaluaciju derivata harmina s antimalarijskim djelovanjem. Cilj ovog rada bila je sinteza i karakterizacija dosad neopisana četiri 1,2,3-triazolna derivata harmina koji u svojoj strukturi sadrže derivate cimetine kiseline.

Sinteza je započeta prevođenjem derivata cimetine kiseline do odgovarajućih azida (**3a,b**) prema dolje navedenoj shemi, a harmin i harmol, alkohol nastao demetiliranjem harmina, prevedeni su u odgovarajuće alchine (**5** i **6**) u reakciji s propargil bromidom. Bakar (I)-katalizirajućom azid-alkin ciklizacijom u kojoj su početni reaktanti bili azidi derivata cimetine kiseline (**3a,b**) i alchini (**5** i **6**) dobiveni su konačni produkti **7a,b** i **8a,b**.

Strukture svih sintetiziranih spojeva potvrđene su uobičajenim spektroskopskim metodama (IR, <sup>1</sup>H i <sup>13</sup>C NMR, MS). Čvrstim produktima određeno je talište. Sva četiri spoja zadovoljavaju Lipinskijeva i Veberova pravila, a dobru oralnu bioraspoloživost predviđa im i alat SwissADME.

Sintetiziranim derivatima će u daljnjim istraživanjima biti ispitano biološko djelovanje.

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

Rad sadrži: 75 stranica, 17 grafičkih prikaza, 9 tablica i 45 literaturnih navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: harmin, cimetna kiselina, 1,2,3- triazol, sinteza

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

Ocjenjivači: **Dr. sc. Ivana Perković**, *docentica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*

**Dr. sc. Zrinka Rajić**, *izvanredna profesorica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*

**Dr. sc. Ana Mornar Turk**, *redovita profesorica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*

Rad prihvaćen: kolovoz, 2019.

## 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 cinnamic acid 1,2,3-triazole derivatives

Gea Martinović

#### SUMMARY

This paper is a part of ongoing research at the Department of Medicinal Chemistry, Faculty of Pharmacy and Biochemistry, University of Zagreb. Main focus of the research is 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 four novel harmine 1,2,3-triazole derivatives containing cinnamic acid derivatives in their structure.

Synthesis began with transformation of cinnamic acid derivatives to azides (**3a,b**) in a four step procedure. On the other hand, harmine and harmole (**4**), an alcohol generated by demethylation of harmine, were transformed in alkynes **5** and **6**, in the reaction of alkylation using propargyl bromide. The copper(I)-catalyzed azide-alkyne cycloaddition, in which cinnamic acid derivatives azides (**3a,b**) and alkynes (**5** and **6**) were used, resulted in the formation of final compounds **7a,b** (*N*-derivatives) and **8a,b** (*O*-derivatives).

Structures of the newly prepared compounds were confirmed using conventional analytical and spectroscopic methods (IR, <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C NMR, MS). Melting points of the solid compounds were also determined.

All four novel derivatives meet all of the Lipinski and Veber criteria for good oral bioavailability of potential drugs. SwissADME web tool predicts good oral bioavailability of all four derivatives.

Further studies will investigate antimalarial activity of the new harmine derivatives.

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

Thesis includes: 75 pages, 17 figures, 9 tables and 45 references. Original is in Croatian language.

Keywords: harmine, cinnamic acid, 1,2,3-triazoles, synthesis

Mentor: **Ivana Perković, Ph.D.** Assistant Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

Reviewers: **Ivana Perković, Ph.D.** Assistant Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry  
**Zrinka Rajić, Ph.D.** Associate Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry  
**Ana Mornar Turk, Ph.D.** Full Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

The thesis was accepted: August 2019