



UNIVERZITET U NIŠU
PRIRODNO-MATEMATIČKI FAKULTET



Dragan B. Zlatković

**NOVA BIOLOŠKI AKTIVNA SINTETSKA AZA-
HETEROCIKLIČNA JEDINJENJA I NOVI
SEKUNDARNI METABOLITI IZ ODABRANIH
BILJNIH VRSTA: SINTEZA, IZOLOVANJE I
SPEKTRALNA KARAKTERIZACIJA**

DOKTORSKA DISERTACIJA

Niš, 2018.



UNIVERZITET U NIŠU
PRIRODNO-MATEMATIČKI FAKULTET



Dragan B. Zlatković

**NOVA BIOLOŠKI AKTIVNA SINTETSKA AZA-
HETEROCIKLIČNA JEDINJENJA I NOVI
SEKUNDARNI METABOLITI IZ ODABRANIH
BILJNIH VRSTA: SINTEZA, IZOLOVANJE I
SPEKTRALNA KARAKTERIZACIJA**

DOKTORSKA DISERTACIJA

Tekst ove doktorske disertacije stavlja se na uvid javnosti, u skladu sa članom 30., stav 8. Zakona o visokom obrazovanju ("Sl. glasnik RS", br. 76/2005, 100/2007 – autentično tumačenje, 97/2008, 44/2010, 93/2012, 89/2013 i 99/2014)

NAPOMENA O AUTORSKIM PRAVIMA:

Ovaj tekst smatra se rukopisom i samo se saopštava javnosti (član 7. Zakona o autorskim i srodnim pravima, "Sl. glasnik RS", br. 104/2009, 99/2011 i 119/2012).

Nijedan deo ove doktorske disertacije ne sme se koristiti ni u kakve svrhe, osim za upoznavanje sa njenim sadržajem pre odbrane disertacije.

Niš, 2018.



UNIVERSITY OF NIŠ
FACULTY OF SCIENCES AND MATHEMATICS



Dragan B. Zlatković

**NEW BIOLOGICALLY ACTIVE SYNTHETIC AZA-
HETEROCYCLIC COMPOUNDS AND NEW
SECONDARY METABOLITES FROM SELECTED
PLANT SPECIES: SYNTHESIS, ISOLATION AND
SPECTRAL CHARACTERIZATION**

PhD thesis

Niš, 2018.

MENTOR:

Dr Niko Radulović, redovni profesor

Departman za hemiju, Prirodno-matematički fakultet, Univerzitet u Nišu

ČLANOVI KOMISIJE:

Dr Mirjana Popsavin, redovni profesor

Departman za hemiju, biohemiju i zaštitu život sredine, Prirodno-matematički fakultet, Univerzitet u Novom Sadu

Dr Vidoslav Dekić, vanredni profesor

Odsek za hemiju, Prirodno-matematički fakultet, Univerzitet u Prištini sa privremenim sedištem u Kosovskoj Mitrovici

Dr Tatjana Ilić-Tomić, viši naučni saradnik

Institut za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo, Univerzitet u Beogradu

Dr Pavle Ranđelović, docent

Katedra Fiziologija, Medicinski fakultet, Univerzitet u Nišu



**ПРИРОДНО - МАТЕМАТИЧКИ ФАКУЛТЕТ
НИШ**

КЉУЧНА ДОКУМЕНТАЦИЈСКА ИНФОРМАЦИЈА

Редни број, РБР:	
Идентификациони број, ИБР:	
Тип документације, ТД:	монографска
Тип записа, ТЗ:	текстуални / графички
Врста рада, ВР:	докторска дисертација
Аутор, АУ:	Драган Б. Златковић
Ментор, МН:	Нико С. Радуловић
Наслов рада, НР:	Нова биолошки активна синтетска аза-хетероциклична једињења и нови секундарни метаболити из одабраних биљних врста: синтеза, изоловање и спектрална карактеризација
Језик публикације, ЈП:	српски
Језик извода, ЈИ:	енглески
Земља публикавања, ЗП:	Србија
Уже географско подручје, УГП:	Србија
Година, ГО:	2018.
Издавач, ИЗ:	ауторски репринт
Место и адреса, МА:	Ниш, Вишеградска 33.
Физички опис рада, ФО:	10 поглавља, 302 стране, 222 цитата, 15 табела, 15 слика, 64 шема, 119 прилога
Научна област, НО:	хемија
Научна дисциплина, НД:	органска хемија и биохемија
Предметна одредница/Кључне речи, ПО:	Органска синтеза, изоловање природних производа, спектрална карактеризација, фероцени, индоли, Биђинелијева једињења
УДК	54.057 : 547.753 + 547.853.5, 615.322 : 54.061 + 543.429.23
Чува се, ЧУ:	библиотека
Важна напомена, ВН:	Део истраживања на пројекту ев. бр. 172061 надлежног Министарства. Експериментални део је рађен у Лабораторији за органску анализу и синтезу, Департман за хемију, Природно-математички факултет, Универзитет у Нишу
Извод, ИЗ:	Циљ ове докторске дисертације био је откривање нових биолошки активних једињења – кроз изоловање природних производа из одабраних биљних врста или путем органске синтезе. Сва изолована и синтетисана једињења окарактерисана су спектроскопским методама, укључујући једно- и дводимензионалну НМР спектроскопију. Предмет истраживања били су: ароматични естри из врсте <i>Ferula ovina</i> (Apiaceae), октил-естри из врсте <i>Heracleum sphondylium</i> (Apiaceae), диестри оксигенованих гермакранских деривата из врсте <i>Daucus carota</i> (Apiaceae), изотиоцијанати из врсте <i>Reseda lutea</i> (Resedaceae) и епоксиди гермакрона из врсте <i>Geranium macrorrhizum</i> (Geraniaceae). Део ове дисертације била је и синтеза нових хибрида фероцена и индола и испитивање редукције Биђинелијевих једињења литијум-алуминијумхидридом. За изванредан број ових једињења одређивана је биолошка активност (антимикробна, цитотоксична, антиноцицептивна и антиацетилхолинестеразна).
Датум прихватања теме, ДП:	13.07.2016.
Датум одбране, ДО:	
Чланови комисије, КО:	Председник: Члан: Члан: Члан: Члан, ментор:



**ПРИРОДНО - МАТЕМАТИЧКИ ФАКУЛТЕТ
НИШ**

KEY WORDS DOCUMENTATION

Accession number, ANO :	
Identification number, INO :	
Document type, DT :	monograph
Type of record, TR :	textual / graphic
Contents code, CC :	doctoral dissertation
Author, AU :	Dragan B. Zlatković
Mentor, MN :	Niko S. Radulović
Title, TI :	New biologically active synthetic aza-heterocyclic compounds and new secondary metabolites from selected plant species: synthesis, isolation and spectral characterization
Language of text, LT :	Serbian
Language of abstract, LA :	English
Country of publication, CP :	Serbia
Locality of publication, LP :	Serbia
Publication year, PY :	2018
Publisher, PB :	author's reprint
Publication place, PP :	Niš, Višegradska 33.
Physical description, PD :	10 chapters, 302 pages, 222 references, 15 tables, 15 figures, 64 schemes, 119 appendices
Scientific field, SF :	Chemistry
Scientific discipline, SD :	Organic chemistry and biochemistry
Subject/Key words, S/KW :	Organic synthesis, natural product isolation, spectral characterization, ferrocenes, indoles, Biginelli compounds
UC	54.057 : 547.753 + 547.853.5, 615.322 : 54.061 + 543.429.23
Holding data, HD :	library
Note, N :	This work is a part of the research performed within the Project No. 172061. Experimental part of this thesis was done in the Laboratory of organic analysis and synthesis, Department of Chemistry, Faculty of Science and Mathematics, University of Niš.
Abstract, AB :	The aim of this PhD thesis was the discovery of new biologically active compounds either by means of natural product isolation from selected plant taxa or by organic synthesis. All of the either isolated or synthesized compounds were characterized by spectral methods, including one- and two-dimensional NMR experiments. The specific compounds that were the subject of this research were: aromatic esters from <i>Ferula ovina</i> (Apiaceae), octyl esters from <i>Heracleum sphondylium</i> (Apiaceae), diesters of an oxygenated germacranolide from <i>Daucus carota</i> (Apiaceae), isothiocyanates from <i>Reseda lutea</i> (Resedaceae) and germacranolide epoxides from <i>Geranium macrorrhizum</i> (Geraniaceae). Also, as a part of this dissertation, a synthesis of new ferrocene-indole hybrids and the investigation of complex-metal hydride reduction of Biginelli compounds was performed. A number of these compounds were tested for their biological activities (antimicrobial, cytotoxic, antinociceptive and antiacetylcholinesterase activities).
Accepted by the Scientific Board on, ASB :	13.07.2016.
Defended on, DE :	
Defended Board, DB :	President:
	Member:
	Member:
	Member:
	Member, Mentor:

Подаци о докторској дисертацији

Ментор:	др Нико С. Радуловић, редовни професор Природно-математичког факултета, Департман за хемију, Универзитет у Нишу
Наслов:	Нова биолошки активна синтетска аза-хетероциклична једињења и нови секундарни метаболити из одабраних биљних врста: синтеза, изоловање и спектрална карактеризација
Резиме:	Циљ ове докторске дисертације био је откривање нових биолошки активних једињења – кроз изоловање природних производа из одабраних биљних врста или путем органске синтезе. Сва изолована и синтетисана једињења окарактерисана су спектроскопским методама, укључујући једно- и дводимензионалну НМР спектроскопију. Предмет истраживања били су: ароматични естри из врсте <i>Ferula ovina</i> (Apiaceae), октил-естри из врсте <i>Heracleum sphondylium</i> (Apiaceae), диестри оксигенованих гермакранских деривата из врсте <i>Daucus carota</i> (Apiaceae), изотиоцијанати из врсте <i>Reseda lutea</i> (Resedaceae) и епоксиди гермакрона из врсте <i>Geranium macrorrhizum</i> (Geraniaceae). Део ове дисертације била је и синтеза нових хибрида фероцена и индола и испитивање редукције Биђинелијевих једињења литијум-алуминијумхидридом. За изванредан број ових једињења одређивана је биолошка активност (антимикробна, цитотоксична, антиноцицептивна и антиацетилхолинестеразна).
Научна област:	хемија
Научна дисциплина:	органска хемија и биохемија
Кључне речи:	Органска синтеза, изоловање природних производа, спектрална карактеризација, фероцени, индоли, Биђинелијева једињења
УДК:	54.057 : 547.753 + 547.853.5, 615.322 : 54.061 + 543.429.23
CERIF класификација:	P 390, Органска хемија; P 004, Биохемија, метаболизам
Тип лиценце Креативне заједнице:	CC BY-NC-ND

Data on Doctoral Dissertation

Doctoral Supervisor:	Dr Niko Radulović, Full Professor, Department of Chemistry, Faculty of Sciences and Mathematics, University of Niš
Title:	New biologically active synthetic aza-heterocyclic compounds and new secondary metabolites from selected plant species: synthesis, isolation and spectral characterization
Abstract:	The aim of this PhD thesis was the discovery of new biologically active compounds either by means of natural product isolation from selected plant taxa or by organic synthesis. All of the either isolated or synthesized compounds were characterized by spectroscopic methods, including one- and two-dimensional NMR experiments. The specific compounds that were the subject of this research were: aromatic esters from <i>Ferula ovina</i> (Apiaceae), octyl esters from <i>Heracleum sphondylium</i> (Apiaceae), diesters of an oxygenated germacrane derivative from <i>Daucus carota</i> (Apiaceae), isothiocyanates from <i>Reseda lutea</i> (Resedaceae) and germacrone epoxides from <i>Geranium macrorrhizum</i> (Geraniaceae). Also, as a part of this dissertation, a synthesis of new ferrocene-indole hybrids and the investigation of complex metal hydride reduction of Biginelli compounds was performed. A number of these compounds were tested for their biological activities (antimicrobial, cytotoxic, antinociceptive and antiacetylcholinesterase activities).
Scientific Field:	Chemistry
Scientific Discipline:	Organic chemistry and biochemistry
Key Words:	Organic synthesis, natural product isolation, spectral characterization, ferrocenes, indoles, Biginelli compounds
UDC:	54.057 : 547.753 + 547.853.5, 615.322 : 54.061 + 543.429.23
CERIF Classification:	P 390, Organic chemistry; P 004, Biochemistry, metabolism
Creative Commons License Type:	CC BY-NC-ND

Eksperimentalni deo ove disertacije je rađen u Laboratoriji za organsku analizu i sintezu, Prirodno-matematičkog fakulteta, Departmana za hemiju, Univerziteta u Nišu, u okviru istraživačkog projekta ON 172061 „Kombinatorne biblioteke heterogenih katalizatora, prirodnih proizvoda, modifikovanih prirodnih proizvoda i njihovih analoga: put ka novim biološkim agensima” Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije.

Izražavam neizmernu zahvalnost mentoru profesoru dr Niku Raduloviću na stručnim savetima i svesrdnoj pomoći i podršci tokom izrade ove disertacije, ali i celokupnog studiranja.

Zahvaljujem se i članovima komisije, prof. dr Mirjani Popsavin, vanr. prof. dr Vidoslavu Dekiću, dr Tatjani Ilić-Tomić, višem naučnom saradniku, i doc. dr Pavlu Ranđeloviću, na korisnim sugestijama i savetima.

Posebnu zahvalnost dugujem vanr. prof. dr Zorici Stojanović-Radić, dr Pavlu Ranđeloviću, dr Katarini Mitić, dr Tatjani Ilić-Tomić, dr Jasmini Nikodinović-Runić, dr Lidiji Senerović i Nikoli Stojanoviću na pomoći pri ispitivanju farmakoloških i toksikoloških aktivnosti. Zahvaljujem se i kolegama iz laboratorije na predusjetljivosti i razumevanju.

Želim da izrazim i veliku zahvalnost devojci Miljani na podršci, razumevanju i strpljenju za vreme izrade ove disertacije. Naposljetku se zahvaljujem i svojim roditeljima na bezrezevnom razumevanju.

OZNAKE I SKRAĆENICE

Nomenklatura:

Ac – acetil

Ar – aril

Me – metil

Et – etil

Ph – fenil

Bn – benzil

Bz – benzoil

Fc – ferocetil

Glu – glukozil

n – normalni niz

E – *entgegen* (stereodeskriptor)

Z – *zusammen* (stereodeskriptor)

o – *orto*

m – *meta*

p – *para*

R – alkil

Reagensi i rastvarači:

AcOH – sirćetna kiselina

ASA – acetilsalicilna kiselina

CDCl₃ – deuterohloroform

C₆D₆ – deuterobenzen

DCC – *N,N'*-dicikloheksilkarbodiimid

DIAD – diizopropil-azodikarboksilat

DHPM – dihidropirimidinon

DMAP – 4-(dimetilamino)piridin

DMSO – dimetilsulfoksid

Et₂O – dietil-etar

EtOH – etanol

LAH – litijum-aluminijumhidrid

MeOH – metanol

*m*CPBA - *m*-hlorperoksibenzoeva kiselina

PBS – fosfatni pufer sa NaCl

PPE – polifosfatni estar

THF – tetrahidrofuran

Hromatografija i masena spektrometrija

AMDIS - automatizovani sistem za identifikaciju i dekonvoluciju masenih spektara

EI – elektronska jonizacija

FID – plameno-jonizacioni detektor

GC-MS – gasna hromatografija-masena spektrometrija

[M]⁺ – molekulski jon

m/z – odnos mase i naelektrisanja

MPLC – tečna hromatografija pri srednjim pritiscima

NIST – Američki nacionalni institut za standarde i tehnologiju

RI – linearni retencioni indeks

TLC – tankoslojna hromatografija

Nuklearna-magnetna rezonantna spektroskopija. Infracrvena spektroskopija. Ultraljubičasta i vidljiva spektroskopija.

1D – jednodimenzionalna

2D – dvodimenzionalna

¹H NMR – protonska nuklearno-magnetna rezonantna spektroskopija

¹³C NMR - nuklearno-magnetna rezonantna spektroskopija ugljenika-13

ATR – *Attenuated Total Reflectance*

d – dublet

δ – hemijsko pomeranje u NMR spektru

FT – furijeova transformacija

HMBC – *Heteronuclear Multiple Bond Correlation*

HSQC – *Heteronuclear Single Quantum Coherence*

IR – infracrvena spektroskopija

J – konstanta kuplovanja

m – multiplet

NOESY – *Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy*

s – singlet
t – triplet
UV – ultraljubičasta spektroskopija
UV-Vis – ultraljubičasta i vidljiva spektroskopija
q – kvartet

Farmakološka/biološka aktivnost

AChE – acetilholinesteraza
ATP – adenzin-trifosfat
BITC – benzil-izotiocijanat
BMB – bornil-4-metoksibenzoat
BSA – *bovine serum albumin*
DHP – test dinamičke vruće ploče
DNK – deoksiribonukleinska kiselina
LD – smrtonosna doza
IC – koncentracija inhibicije
i.p. - intraperitonealno
MBK - minimalna baktericidna koncentracija
MIK - minimalna inhibitorna koncentracija
MPO – mijeloperoksidaza
MTT - 3-(4,5-dimetiltijazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolijum-bromid
NADPH – nikotinamid-adenin-dinukleotid-fosfat
RNK – ribonukleinska kiselina
SDS – natrijum-dodecil-sulfat
Tris - tris(hidroksimetil)aminometan
TRP - *Transient Receptor Potential channel*
TTC – 2,3,5-trifeniltetrazolijum-hlorid

Ostalo

CPI – *carbon preference index*
et al. – i saradnici

HIV - *human immunodeficiency virus*

rel. int. – relativni intenzitet

S.D. – standardna devijacija

SADRŽAJ

1. UVOD I CILJEVI RADA 10
2. OPŠTI DEO 18
 - 2.1. *Reseda lutea* L. 19
 - 2.1.1. Etnofarmakologija biljne vrste *R. lutea* 19
 - 2.1.2. Glukozinolati 20
 - 2.1.3. Biosinteza glukozinolata 21
 - 2.1.4. Enzimaska hidroliza glukozinolata 23
 - 2.1.5. Glukozinolati iz biljnog roda *Reseda* 24
 - 2.2. *Ferula ovina* (Boiss.) Boiss (Apiaceae) 26
 - 2.2.1. *Ferula ovina* u ishrani 26
 - 2.2.2. Fitohemija roda *Ferula* 26
 - 2.3. *Heracleum sphondylium* L. (Apiaceae) 28
 - 2.3.1. Fitohemija roda *Heracleum* 28
 - 2.4. *Geranium macrorrhizum* L. (Geraniaceae) 29
 - 2.4.1. Fitohemija roda *Geranium* 29
 - 2.5. *Daucus carota* subsp. *carota* (Apiaceae) 30
 - 2.5.1. Fitohemija vrste *D. carota* subsp. *carota* 30
 - 2.6. Šteglihova esterifikacija 31
 - 2.6.1. Mehanizam Šteglihove esterifikacije 31
 - 2.7. Feroceni i njegovi derivati 33
 - 2.7.1. Sinteza monoarilferocena 34
 - 2.7.2. Citotoksičnost ferocenskih derivata 36
 - 2.8. Fišerova sinteza indola 39
 - 2.8.1. Mehanizam Fišerove indolizacije 40
 - 2.8.2. Primeri Fišerove indolizacije 40
 - 2.9. Biđinelijeva reakcija 42
 - 2.9.1. Mehanizam Biđinelijeve reakcije 43
 - 2.9.2. Primeri Biđinelijeve reakcije u sintezi 45
 - 2.9.3. Reakcije dihidropirimidinona 46

- 2.10. Redukcije organskih jedinjenja litijum-aluminijumhidridom 51
 - 2.10.1. Redukcija karbonilnih jedinjenja 51
 - 2.10.2. Primeri redukcije litijum-aluminijumhidridom u organskoj sintezi 52
- 2.11. Modeli za ispitivanje farmakološke/toksikološke aktivnosti 57
 - 2.11.1. Ispitivanje akutne toksičnosti pomoću račića *Artemia salina* 57
 - 2.11.2. Makrofagi i aktivnost mijeloperoksidaze 58
 - 2.11.3. Acetilholinesteraza 58
 - 2.11.4. Nocicepcija i bol 59
 - 2.11.5. Antimikrobna aktivnost sekundarnih metabolita biljaka 60
 - 2.11.6. Citotoksičnost jedinjenja prirodnog porekla 61
- 3. EKSPERIMENTALNI DEO 64
 - 3.1. Hemikalije i rastvarači 65
 - 3.2. Biljni materijal i priprema uzoraka za analizu 65
 - 3.2.1. Biljni material 65
 - 3.2.2. Dobijanje etarskih ulja 65
 - 3.2.3. Autoliza glukozinolata 66
 - 3.2.4. Ekstrakcija voska sa cvetova 66
 - 3.2.5. Ekstrakcija cvetova *D. carrota* dietil-etrom 66
 - 3.3. Metode razdvajanja i analize 67
 - 3.3.1. Gasna hromatografija–masena spektrometrija (GC-MS) i GC-FID 67
 - 3.3.2. Tankoslojna hromatografija (TLC) 68
 - 3.3.3. „Dry-Column Flash“ hromatografija 68
 - 3.3.4. Tečna hromatografija pri srednjim pritiscima (MPLC) 68
 - 3.3.5. Infracrvena spektroskopija (FTIR) 69
 - 3.3.6. Nuklearno-magnetna rezonantna (NMR) spektroskopija 69
 - 3.3.7. Rendgenska strukturna analiza 69
 - 3.3.8. Ultraljubičasta (UV) spektroskopija 70
 - 3.3.9. Elementna mikroanaliza 70
 - 3.3.10. Određivanje konstante kiselosti Bidinelijevog jedinjenja dobijenog iz uree (jedinjenje **6-1**) 70
 - 3.4. Izolovanje i sinteza jedinjenja 71

- 3.4.1. Sinteza biblioteke estara dugolančanih kiselina (opšta procedura) 71
- 3.4.2. Izolovanje i sinteza epoksigermakrona iz vrste *G. macrorrhizum* 79
- 3.4.3. Sinteza semimikrokoličina estara aromatičnih karboksilnih kiselina (opšta procedura) 80
- 3.4.4. Izolovanje 2-(α -L-ramnoziloksi)benzil-izotiocijanata 81
- 3.4.5. Sinteza i spektralna karakterizacija hibridnih jedinjenja ferocena i indola 82
- 3.4.6. Redukcije Biđinelijevih jedinjenja litijum-aluminiumhidridom 83
- 3.5. Testiranje biološke/farmakološke aktivnosti sintetisanih/izolovanih jedinjenja 89
 - 3.5.1. Određivanje *in vitro* aktivnosti 90
 - 3.5.1.1. Ispitivanje antimikrobne aktivnosti mikrodilucionom metodom 90
 - 3.5.1.2. Uticaj na vijabilnost plućnih fibroblasta (MRC5) i ćelija melanoma (A375) 91
 - 3.5.1.3. Određivanje citotoksičnosti na makrofagima pacova i uticaja na mijeloperoksidaznu (MPO) aktivnosti 91
 - 3.5.1.4. Inhibicija acetilholinesteraze (AChE) 93
 - 3.5.2. Određivanje *in vivo* aktivnosti 93
 - 3.5.2.1. Određivanje akutne toksičnosti u modelu račića *Artemia salina* 93
 - 3.5.2.2. Određivanje antinociceptivne aktivnosti 94
- 3.6. Statistička analiza 95
- 4. REZULTATI I DISKUSIJA 96
 - 4.1. Sekundarni metaboliti odabranih biljnih vrsta: sinteza, izolovanje i spektralna karakterizacija 97
 - 4.1.1. Identifikacija i rasprostranjenje *n*-oktil-estara dugolančanih masnih kiselina: da li su ovi estri markeri antropogenog zagađenja? 97
 - 4.1.2. Metaboliti biljne vrste *G. macrorrhizum* i sinteza epoksigermakrona 105

- 4.1.2.1. Izolovanje i određivanje strukture 105
- 4.1.3. Identifikacija estara iz etarskog ulja biljne vrste *Ferula ovina* (Boiss.) Boiss. 111
- 4.1.4. Izolovanje i spektralna karakterizacija 2-(α -L-ramnopiranoziloksi)benzil-izotiocijanata iz *Reseda lutea* L. (Resedaceae) 117
 - 4.1.4.1. Analiza sastava proizvoda autolize glukozinolata iz cveta, ploda i korena biljne vrste *R. lutea* 120
- 4.1.5. Germakranski diestri iz vrste *Daucus carota* L. 124
 - 4.1.5.1. Određivanje strukture jedinjenja **7-1** i **7-2** 124
 - 4.1.5.2. Termalna degradacija jedinjenja **7-1** i **7-2** pri uslovima gasne hromatografije 126
- 4.2. Sekundarni metaboliti odabranih biljnih vrsta: sinteza, izolovanje i spektralna karakterizacija 127
 - 4.2.1. Sinteza i spektralna karakterizacija novih hibrida ferocena i indola 127
 - 4.2.1.1. Spektralna karakterizacija hibrida ferocena i indola 127
 - 4.2.1.2. NMR analiza jedinjenja **5-3a** u DMSO- d_6 127
 - 4.2.1.3. NMR analiza jedinjenja **5-3b** u DMSO- d_6 129
 - 4.2.2. Redukcija Biđinelijevih jedinjenja litijum-aluminijumhidridom 133
 - 4.2.2.1. Sinteza Biđinelijevih jedinjenja [**6-1**]-[**6-19**] 133
 - 4.2.2.2. Redukcija Biđinelijevih jedinjenja [**6-1**]-[**6-11**] pomoću LiAlH₄ 135
 - 4.2.2.3. Određivanje strukture proizvoda redukcije Biđinelijevih jedinjenja pomoću LiAlH₄ 137
 - 4.2.2.4. Kiselost Biđinelijevih jedinjenja (jedinjenje **6-1**) 143
 - 4.2.2.5. Mehanizmi redukcija Biđinelijevih jedinjenja 143
- 4.3. Biološke/farmakološke aktivnosti izolovanih i sintetisanih jedinjenja 148
 - 4.3.1. Antimikrobna aktivnost epoksigermakrona 148
 - 4.3.2. Antinociceptivno dejstvo etarskog ulja *Ferula ovina* (Boiss.) Boiss. i bornil-4-metoksibenzoata 151
 - 4.3.2.1. Model hemijskog bolnog nadražaja 151

4.3.2.2.	Model termalnog bolnog nadražaja	152
4.3.2.3.	Test dinamičke vruće ploče	157
4.3.3.	Antiproliferativna aktivnost autolizata korena, ploda i cveta biljne vrste <i>R. lutea</i>	160
4.3.3.1.	Proapoptotičko dejstvo autolizata korena, cveta i ploda biljne vrste <i>R. lutea</i>	161
4.3.4.	Antimikrobna aktivnost novih oktil-estara iz vrste <i>H.</i> <i>sphondylium</i>	164
4.3.5.	4.3.5. Akutna toksičnost diestara iz vrste <i>D. carota</i> na <i>A. salina</i>	164
4.3.6.	Biološka aktivnost hibrida ferocena i indola	164
4.3.7.	Akutna toksičnost odabranih proizvoda redukcije Biđinelijevih jedinjenja na <i>A. salina</i>	168
5.	IZVOD	169
6.	SUMMARY	174
7.	LITERATURA	179
8.	PRILOZI	190
9.	BIOGRAFIJA I BIBLIOGRAFIJA AUTORA	298
10.	IZJAVE AUTORA	301

1. UVOD I CILJEVI RADA

U današnje vreme, veliki je broj medicinskih i sintetskih hemičara koji ulažu napore da pronađu nova i/ili efikasnija farmakološki aktivna jedinjenja koja bi se jednog dana koristila u borbi protiv ljudskih bolesti modernog doba. Polovina aktivnih sastojaka lekova koji se koriste u lečenju raka je prirodnog porekla ili su izvedeni iz prirodnih proizvoda (McChesney et al., 2007; Radulović et al., 2013a, 2013b). Druge oblasti (razvijanje lekova protiv infektivnih bolesti) još više zavise od prirodnih proizvoda (Newman i Cragg, 2007). Osnovni izvor medikamenta za sedamdeset pet procenata svetske populacije predstavlja oko 250 hiljada vrsta viših biljaka. Prirodni proizvodi su prirodnom selekcijom „evoluirali“ tako da optimalno interaguju sa proteinima i receptorima u biološkim sistemima i zato su često pogodna polazna jedinjenja za otkrivanje novih lekova.

Međutim, klasične metode otkrivanja novih lekova prirodnog porekla, kroz ekstrakciju, fracionisanje, izolovanje, karakterizaciju i farmakološka ispitivanja, postepeno se zamenjuju sintetskim (kombinatornim) pristupom, naročito kada su u pitanju polazna (*lead*) jedinjenja malih molekulskih masa. Ovaj „moderni pristup“ obuhvata sintezu i „skrining“ velikih kombinatornih biblioteka, često uz korišćenje rezultata računarske i strukturne biologije (npr., *in silico docking* analize, Ojima, 2007)

Nije, međutim, dovoljno samo doći do jedinjenja koje poseduje željenu aktivnost – neophodno je dobiti jedinjenje koje pokazuje delotvorno dejstvo, ali koje nije toksično u primenjenoj dozi. Zato je od ogromnog značaja tzv. farmakološki prozor, to jest, opseg doza leka u kome se postiže terapeutsko dejstvo bez neželjenih sporednih ili toksičnih efekata. Od velikog broja bioloških testova moguće je izdvojiti tri koji bi, po našem mišljenju, činili efikasan „skrining“ kojim bi se dobio širok spektar korisnih podataka: test citotoksičnosti na životinjsku vrstu (na primer, na račiće *Artemia salina*) i specijalizovanu ćelijsku kulturu višeg organizma, npr. peritonealni makrofagi pacova, kao i *in vitro* test inhibicije enzima (acetilholinesteraze).

U ovoj disertaciji korišćena su oba pristupa (fitohemijski i sintetski) za dobijanje novih farmakološki aktivnih jedinjenja:

1) *Fitohemijski pristup*. Kao prirodni izvor potencijalno farmakološki aktivnih jedinjenja za ovu disertaciju, odabrane su etnofarmakološki primenjive biljne vrste iz porodica Apiaceae, Geraniaceae i Resedaceae koje su ili fitohemijski malo proučene, ili za koje nije (nedvosmisleno) potvrđeno šta su njihovi aktivni principi. Konkretno, razmatrane su sledeće vrste:

- a) *Geranium macrorrhizum* L. (Geraniaceae), vrsta koja je raširena na Balkanskom poluostrvu i veoma cenjena u etnomedicini balkanskih naroda (Ergene et al., 2006). Prethodna istraživanja (Radulović et al., 2010) pokazala su da etarsko ulje *G. macrorrhizum* poseduje jaku i selektivnu aktivnost na bakteriju *Bacillus subtilis*, ali sastojak odgovoran za ovu aktivnost nije identifikovan. Takođe je utvrđeno i da germakron, glavni sastojak ulja, nije glavni nosilac ove aktivnosti;
- b) *Heracleum sphondylium* L. (Apiaceae), biljna vrsta čija je primena u tradicionalnoj medicini široko rasprostranjena. Uprkos etnofarmakološkoj primeni, ovaj biljni takson je u fitohemijskom smislu donedavno bio malo istražen. Interesantno je da prethodna istraživanja ukazuju da on biosintetiše *n*-oktil-estre, jedinjenja koja su od strane Chaler-a i saradnika (2004) označena kao markeri zagađenja životne sredine ljudskim faktorom. U tom smislu, detaljnom hemijskom analizom, neophodno je potvrditi strukturu pomenutih estara i pružiti dokaze da oni zaista jesu nativni metaboliti vrste *H. sphondylium*;
- c) *Ferula ovina* (Boiss.) Boiss. (Apiaceae) je farmakološki nedovoljno ispitana biljna vrsta. U prethodnim studijama utvrđeno je da vrste iz ovog roda sintetišu estre supstituisanih benzoevih kiselina (vanilinske, *p*-hidroksibenzoeve i *p*-metoksibenzoeve), na primer, ferutinin (ferutinol-*p*-hidroksibenzoat), teferin (ferutinol-vanilat) i ješkeanadiol-*p*-

metoksibenzoat (Popova et al., 2011; Poli et al., 2005). Za ova jedinjenja je od ranije poznato da aktiviraju TRP-jonske kanale (*transient receptor potential channels*) i tako utiču na čulo ukusa (Fujita et al., 2007); takođe, aktivacija ovih receptora povezana je sa osećajem bola (ciljanje TRP-jonskih kanala je deo strategije mnogih istraživačkih timova koji se bave razvijanjem novih analgetika, Patapoutian et al., 2009). Takođe, delovanjem na TRP-kanale (TRPV1, TRPV3, TRPA1, TRPM5 i TRPM8) može da se utiče na čulo ukusa i da se izmene ili aktiviraju signali koji su integrisani sa drugim signalima receptora čula ukusa i mirisa. U tom smislu, detaljna analiza hemijskog sastava etarskog ulja vrste *F. ovina* i testiranje odabranih sastojaka na antinociceptivnu aktivnost mogla bi dovesti do otkrića novih biološki aktivnih jedinjenja (npr. potencijalnih TRP-aktivatora);

- d) *Reseda lutea* L. Pripada porodici Resedaceae koja je deo reda Brassicales (u koji spada i porodica kupusa, Brassicaceae), a za koji je karakteristična biosinteza glukozinolata. Ova jedinjenja imaju zaštitnu ulogu – u slučaju mehaničke povrede ili drugog oštećenja biljnog tkiva, glukozinolati se prevode, usled dejstva enzima mirozinaze, u izotiocijanate, koji su poznati po svojoj antikancerogenoj aktivnosti. Iako se ova biljna vrsta pominje u istorijskim tekstovima (npr. *Historia Naturalis* Plinija Starijeg) zbog svojih lekovitih svojstava, u fitohemijskom smislu joj nije posvećeno mnogo pažnje. Prvi korak pri lociranju farmakološki aktivnih sastojaka ove vrste zahteva najpre detaljnu hemijsku analizu autolizata;
- e) *Daucus carota* L. (Apiaceae) je dobro poznata (šargarepa) široko rasprostranjena dvogodišnja biljka; sekundarni metaboliti populacija iz Srbije su fitohemijski i fitofarmakološki sporadično ispitivani. U ranijim istraživanjima u ekstraktu ove biljne vrste pronađeno je više diestara oksigenovanih germakrskih derivata (Schmiech et al., 2008). Utvrđeno je da gorak ukus ove biljke potiče upravo od ovih jedinjenja, ali drugi

biološki testovi nisu rađeni. Fitohemijska analiza usmerena ka izolovanju minornih sastojaka, u kombinaciji sa odabranim biološkim testovima i razmatranjem potencijalne veze struktura-aktivnost, mogla bi dovesti do otkrića novih farmaceutika;

2) *Sintetski pristup*. Sintetisane su dve serije (a i b) jedinjenja koja bi mogla imati farmakološki značaj. Testiranje biološke aktivnosti biblioteka jedinjenja daje mogućnost daljeg odabira struktura *lead* jedinjenja.

a) Hibridna jedinjenja ferocena i indola. Studija španskih istraživača iz 2011. godine (Quirante et al., 2011) je pokazala da se uvođenjem ferocena u 2-fenilindolski sistem citotoksično dejstvo polaznog jedinjenja povećava 25 puta. Međutim, sintetisana su i testirana samo jedinjenja u kojima su jezgra ferocena i indola povezana preko metilenske grupe. Drugi načini povezivanja ovih osnovnih struktura do sada nisu bili predmet istraživanja ni jedne studije;

b) Proizvodi redukcije dihidropirimidinona. Dihidropirimidinoni (poznati i pod nazivom Biđinelijevi proizvodi) dobijaju su multikomponentnom reakcijom aldehida, 1,3-dikarbonilnog jedinjenja i uree u prisustvu kiselog katalizatora. Dihidropirimidinoni su poznati po svojim farmakološkim osobinama, a zbog svoje jednostavnosti i robusnosti (reakcija dopušta prisustvo velikog broja funkcionalnih grupa), Biđinelijeva reakcija često se primenjuje u kombinatornoj hemiji. Interesantno je, međutim, da i pored velikog broja radova koji se bave dihidropirimidinonima, do sada nije objavljena ni jedna studija koja se bavi redukcijom Biđinelijevih jedinjenja kompleksnim metalnim hidridima, što je bilo vrlo iznenađujuće jer bi se, na primer, kompletnom redukcijom hiralnih Biđinelijevih proizvoda dobili hiralni diamino alkoholi, jedinjenja koja bi potencijalno mogla imati primenu u organskoj katalizi. Ovim pristupom bi se, uz odgovarajuću optimizaciju reakcionih uslova, početna biblioteka Biđinelijevih proizvoda mogla dalje modifikovati, što bi na jednostavan način moglo

dati veliki set novih, potencijalno biološki aktivnih jedinjenja, uz mogućnost finog podešavanja njihove strukture, odnosno aktivnosti.

Imajući u vidu sve navedeno, postavljeni su sledeći ciljevi doktorske disertacije pod nazivom „Nova biološki aktivna sintetska aza-heterociklična jedinjenja i novi sekundarni metaboliti iz odabranih biljnih vrsta: sinteza, izolovanje i spektralna karakterizacija“:

1. Identifikovanje sastojaka etarskog ulja *G. macrorrhizum* koji su odgovorni za prethodno uočenu antimikrobnu aktivnost. To podrazumeva hromatografsko razdvajanje sastojaka ulja na koloni silika-gela, određivanje strukture spektroskopskim metodama i testiranje dejstva izolovanih jedinjenja na odgovarajuće mikroorganizme. Dodatne količine ovih jedinjenja dobile bi se organskom sintezom. Organska sinteza bi time poslužila kao dodatni dokaz strukture jedinjenja;
2. Detaljna analiza etarskog ulja *F. ovina* gasnom hromatografijom sa masenom detekcijom (GC-MS), kao i formiranje sintetske biblioteke aromatičnih estara reakcijom Štegljihove esterifikacije (kao reagensi u reakciji bili bi korišćeni monoterpenski alkoholi koji su identifikovani u ovom ulju). Za estar koji predstavlja novo jedinjenje, kao i za samo ulje, bila bi određena antinociceptivna aktivnost;
3. Detaljna analiza ispirka cvetova *H. sphondylium* GC-MS-om, potvrda strukture prisutnih jedinjenja hemijskom sintezom, ali i provera tvrdnje koja je izneta u radu *Chaler*-a i sar. (2004) – da li su oktil estri viših masnih kiselina zaista markeri zagađenja životne sredine? Takođe, bila bi određivana i antimikrobna aktivnost novih identifikovanih estara;
4. Izolovanje i određivanje strukture germakranskih diestara iz *D. carota*. Za izolovana jedinjenja određena bi bila akutna toksičnost na račiće *Artemia salina*;

5. Izolovanje i spektralna karakterizacija izotiocijanata iz autolizata biljne vrste *R. lutea*; određivanje citotoksične aktivnosti izolovanih izotiocijanata na ćelije melanoma i normalnih fibroblasta;
6. Sinteza i spektralna karakterizacija izomernih 2-(ferocenilfenil)-1*H*-indola, to jest hibridnih jedinjenja ferocena i indola, povezanih preko jezgra benzena. Ključni korak sinteze bila bi Fišerova indolizacija. Biološka aktivnost sintetisanih jedinjenja bila bi ispitivana pomoću tri testa, na tri različita nivoa: molekularnom (antiacetil-holinesterazna aktivnost), mikroskopskom (citotoksično dejstvo na makrofagima pacova) i makroskopskom (akutna toksičnost na račiće *A. salina*);
7. Proučavanje reakcije redukcije Biđinelijevih jedinjenja korišćenjem litijum-aluminijumhidrida. Variranjem svakog od tri strukturalna bloka – aldehida, uree i dikarbonilnog jedinjenja bio bi sintetisan veći broj ovih jedinjenja, a zatim i ispitivan uticaj različitih faktora na proizvod redukcije. Za odabrana sintetisana jedinjenja bila bi određena akutna toksičnost na *A. salina*.

Predviđena ispitivanja ostvarena su pomoću sledećih metoda:

1. Dobijanje etarskih ulja (hidrodestilacijom po *Clevenger*-u), kao i ekstrakcija biljnog materijala organskim rastvaračima;
2. Analiza etarskih ulja i praćenje toka reakcija gasnom hromatografijom (GC), gasnom hromatografijom sa masenom detekcijom (GC-MS) i tankoslojnom hromatografijom (TLC);
3. Razdvajanje sastojaka ulja/ekstrakata i izolovanje reakcionih proizvoda (kolonska hromatografija, *dry flash* hromatografija i tečna hromatografija pod srednjim pritiscima, MPLC);
4. Spektroskopska i strukturalna karakterizacija – nuklearna magnetna spektroskopija ugljenika ^{13}C i vodonika ^1H (jedno- i dvodimenzionalna ^1H i ^{13}C NMR), infracrvena spektroskopija (IR), ultraljubičasta-vidljiva spektroskopija (UV-VIS), masena spektrometrija (MS) i rendgenska strukturalna analiza;
5. Određivanje antimikrobne aktivnosti mikrodilucionom metodom;

6. Određivanje citotoksičnosti (MTT testom) na makrofagima pacova i uticaja na mijeloperoksidaznu (MPO) aktivnost pomoću spektrofotometrijske metode;
7. Određivanje uticaja na vijabilnost plućnih fibroblasta (MRC5) i ćelija melanoma (pomoću MTT testa vijabilnosti, analize ćelijskog ciklusa i metodom Aneksin V-FITC/PI obojenja);
8. Određivanje akutne toksičnosti u modelu slanovodnih račića *Artemia salina*;
9. Određivanje antinociceptivne aktivnosti (test abdominalnog grčenja, metoda vruće ploče, test uranjanja repa i test dinamičke vruće ploče);
10. Određivanje antiacetilholinesterazne aktivnosti Elmanovom metodom.

2. OPŠTI DEO

2.1. *Reseda lutea* L.

2.1.1. Etnofarmakologija biljne vrste *R. lutea*

Najveći deo našeg znanja o medicinskim biljkama potiče iz drevnih tekstova. U svetom pismu, na primer, pominje se 150 medicinskih biljaka (Duke, 2007). Opus Galena, Hipokrata i Dioskorida predstavlja osnovu srednjevekovnih arapskih i latinskih farmakopeja (Paavilainen, 2009)¹. Jedna od najznačajnijih figura rimske farmakopeje je bio Plinije Stariji (*Gaius Plinius Secundus Maior*, 23–79. n.e.), vojni oficir i prirodnjak. Njegov *magnum opus* Istorija prirode (*Historia naturalis*) smatra se prvom enciklopedijom zapadne civilizacije. Njegovi traktati o lečenju medicinskim biljkama imali su veliki uticaj na razvoj modernih farmakopeja.

Reseda lutea L. (Resedaceae), poznata i kao *Reseda vulgaris* (ovo ime je često korišćeno u tekstovima koji su nastali pre 20. veka), a u srpskom jeziku kao žuta rezeda ili žuti katanac, trajna je zeljasta biljka rasprostranjena u delovima Evrope, zapadne Azije i severne Afrike. U Australiji se smatra invazivnom vrstom i upornim korovom. Raste na umereno vlažnim staništima. Cvetovi rezede su sitni i neugledni (oko 5-6 mm u prečniku), ali veoma mirisni, tako da se u faraonskom Egiptu ova biljna vrsta koristila u ceremonijama sahrana. Prvi zapis o lekovitim svojstvima ovog taksona potiče iz 27. knjige Istorije prirode (Pliny, 1956). Žuta rezeda je korišćena za lečenje tumora, a sastavni deo procedure bilo je i izgovaranje vradžbine². Prva reč magičnih stihova (*Reseda*) predstavlja imperativ latinskog glagola *resedare* (lečiti, vidati), i na taj način je vrsta dobila ime.

O upotrebi ove biljne vrste u lečenju tumora pisali su i francuski erudita Etjen Fransoa Žofrua (Geoffroy, 1756) i čuveni engleski botaničar Semjuel Frederik Grej (Gray, 1824). Vredi istaći da je francuski autor bio vrlo konkretan kada je govorio o taksonu (nedvosmisleno se govori o biljnoj

¹ Za iscrpan pregled najznačajnijih autora i radova grčko-rimske antike, pogledati knjige Hollanda (1996) i Paavilainena (2009).

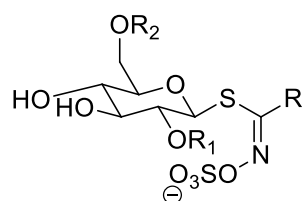
² “Reseda, morbis reseda, Scisne, scisne quis hic pullus egerit radices? Nec caput nec pedes habeat.”

vrsti *R. lutea*, a ne nekoj srodnoj vrsti poput *R. luteola*). Žofrua ne navodi koji delovi biljke treba da se koriste, ali preporučuje spoljašnju upotrebu u slučajevima “inflamatornih tumora”.

Međutim, upotreba ove biljne vrste vremenom je prestala i danas je *R. lutea* potpuno odsutna iz modernih farmakopeja, a u naučnoj literaturi ima vrlo malo podataka o farmakološkim aktivnostima žute rezede. Objavljeni su podaci o antibakterijskoj (Kumarasamy et al., 2002), anti-inflamatornoj (Bremner et al., 2009) i anti-HIV (Bedoya et al., 2001) aktivnosti ekstrakta biljne vrste *R. lutea*, ali ovi rezultati su bili samo delovi studija koje su obuhvatale veliki broj različitih biljnih vrsta. Takođe u ovim publikacijama nije bilo reči o sastavu ekstrakata. U nedavno objavljenim etnofarmakološkim istraživanjima medicinskih biljaka Turske (Cakilcioglu et al., 2011) i Bosne (Šarić-Kundalić et al., 2011) ne spominje se antitumorska aktivnost ove biljne vrste.

2.1.2. Glukozinolati

Glukozinolati su prirodni proizvodi karakteristični za pripadnike reda Brassicales (drugi naziv Capparales; deo ovog reda je i familija Resedaceae). Struktura glukozinolata sastoji se iz β -D-glukopiranozne jedinice koja je preko atoma sumpora povezana sa *N*-hidroksiiminosulfatnim estrom i bočnim ostatkom R (šema 1). Prvu (pogrešnu) strukturu glukozinolata predložio je *Gadamer* (1897); do ispravne strukture glukozinolata prvi su došli *Ettlinger* i *Lundeen* (1956). Struktura glukozinolata potvrđena je hemijskom sintezom (Ettlinger i Lundeen, 1957) i rentgenskom analizom (Marsh i Waser, 1970).



Šema 1. Opšta formula glukozinolata (R – lanac ili grupa poreklom iz amino kiselina; R₁ i R₂ – najčešće derivatizovani položaji glukoze)

Glukozinolati se klasifikuju prema aminokiselinskom prekursoru i prema strukturnoj sličnosti. Bočni lanac R najčešće nastaje od jedne od osam aminokiselina. Glukozinolati mogu da se podele u tri grupe: alifatični (izvedeni iz Ala, Leu, Ile, Met i Val), aromatični (izvedeni iz Phe i Tyr) i indolski (izvedeni iz Trp).

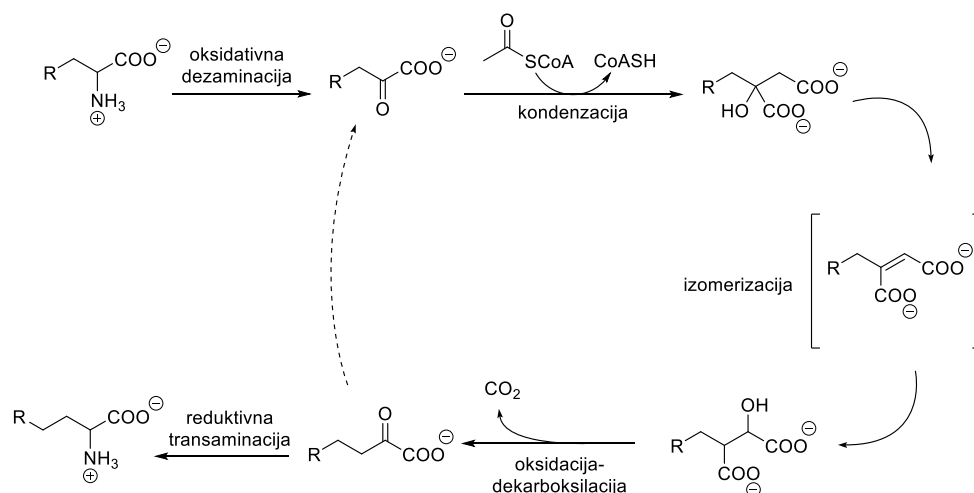
Po strukturnoj sličnosti glukozinolati se dele na (Fahey et al., 2001):

- A) Glukozinolate sa sumporom u bočnom lancu
- B) Alifatične glukozinolate nerazgranatog i razgranatog niza
- C) Olefinske glukozinolate (koji se dele u grupe razgranatih i nerazgranatih bočnih lanaca, odnosno alkohola)
- D) Zasićene alkohole (razgranatog i nerazgranatog bočnog niza)
- E) Alifatične ketone i estre
- F) Aromatične glukozinolate
- G) Benzoate
- H) Indolske glukozinolate
- I) Glikozilovane glukozinolate
- J) Cimetne glukozinolate i
- K) Seleno-glukozinolate

2.1.3. Biosinteza glukozinolata

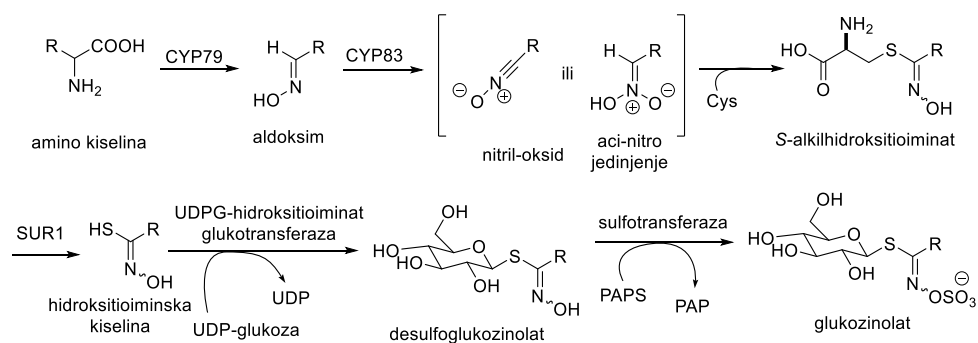
Biosinteza glukozinolata se sastoji od tri koraka (Fahey et al., 2001; Halkier i Gershenzon, 2006):

- 1) Elongacije (produžavanje bočnog lanca (šema 2);
- 2) Vezivanja glukozidnog ostatka (šema 3);
- 3) Sekundarne modifikacije bočnog lanca.



Šema 2. Ciklus elongacije bočnog lanca aminokiselina u biosintezi glukozinolata (Halkier i Gershenzon, 2006).

Ciklus elongacije sastoji se od tri koraka 1) kondenzacije α -keto kiseline i acetil-SCoA, 2) izomerizacije, i 3) oksidacije i dekarboksilacije.



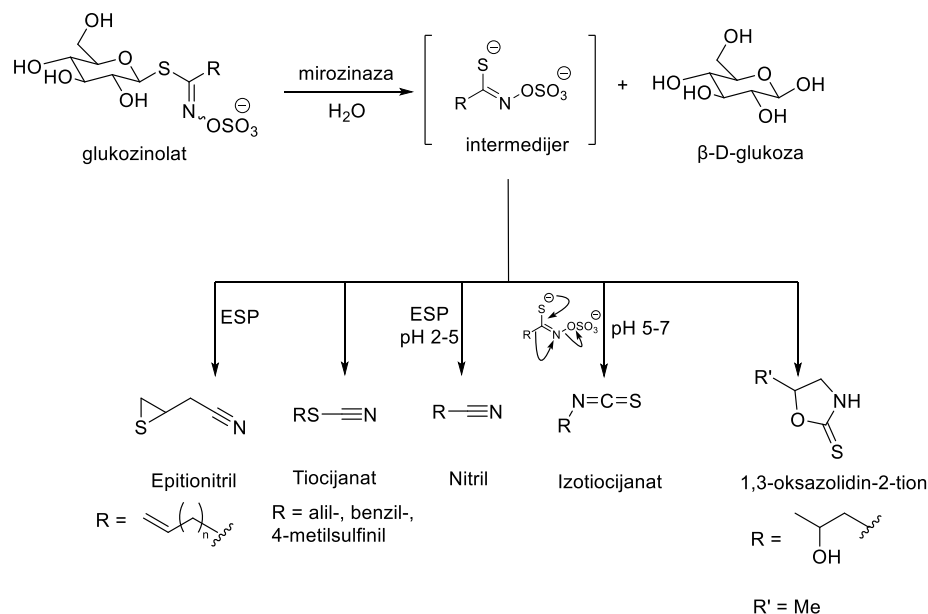
Šema 3. Biosinteza glukozinolata (Lin et al., 2013).

Vezivanje glukozidnog ostatka započinje konverzijom proteinske aminokiseline (ili aminokiseline produženog lanca) do aldoksima (ovaj korak katalizuje citohrom P450 iz familije CYP79). Drugi korak, konverziju oksima do aci-nitro jedinjenja ili nitril-oksida katalizuje P450 iz familije CYP83 (Wittstock i Halkier, 2002). Treći korak je (najverovatnije) neenzimska reakcija sa cisteinom. Zatim slede prevođenje S-alkilhidroksitioiminata u hidroksitioiminsku kiselinu, S-glukozilacija glukotransferazom i sulfonovanje desulfoglukozinolata 3'-fosfoadenozin-5'-fosfosulfatom (PAPS) katalizovan sulfotransferazom (Halkier i Du, 1997; Lin et al., 2013).

Završna faza biosinteze glukozinolata je modifikacija bočnog lanca. Neke od reakcija modifikacije su: stereospecifična hidroksilacija, uvođenje nezasićenja (eliminacijom metilsulfanil- ili metilsulfinil-grupe), acilovanje tioglukopiranozne grupe, itd. (Bellostas et al., 2007).

2.1.4. Enzimska hidroliza glukozinolata

Mehaničkim povređivanjem biljke koja sadrži glukozinolate (na primer, žvakanjem povrća, napadom insekata, oštećenjem tkiva prilikom zamrzavanja i sl.) dolazi do hidrolitičke razgradnje glukozinolata koja je katalizovana enzimom mirozinazom (ovaj enzim koegzistira sa glukozinolatima, ova barijera se uklanja mehaničkim oštećenjem biljnog tkiva, Fahey et al., 2001). Dejstvom mirozinaze dolazi do hidrolize i gubitka β -glukozidne jedinice i formiranja nestabilnog intermedijera koji se spontano premešta u niz proizvoda (Rosa et al., 1997, Šema 4). Sastav autolizata glukozinolata zavisi od uslova reakcije (pH sredine i prisustva/odsustva epitiospecifičnog proteina, ESP). Izotiocijanati nastaju Losenovim premeštanjem pri neutralnim uslovima (Halkier i Gerschenzon, 2006).



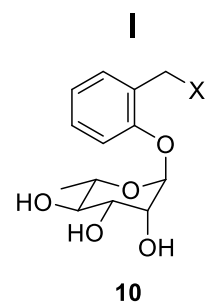
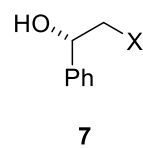
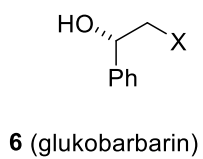
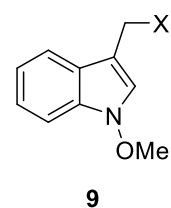
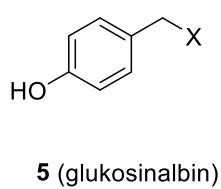
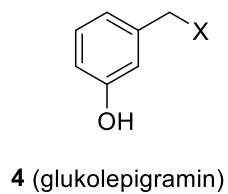
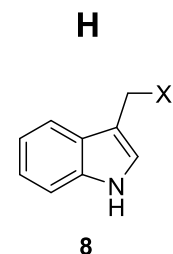
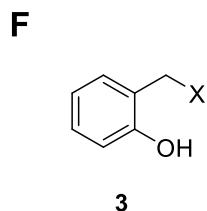
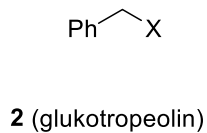
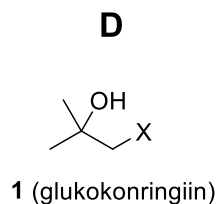
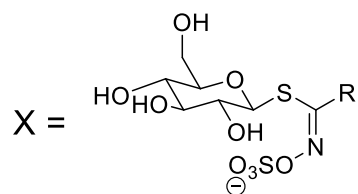
Šema 4. Mogući proizvodi enzimske hidrolize glukozinolata.

2.1.5. Glukozinolati iz biljnog roda *Reseda*

Za 9 taksona roda *Reseda* do danas je poznato deset glukozinolata (tabela 1). Strukture ovih jedinjenja predstavljene su na šemi 5.

Tabela 1. Rasprostranjenost glukozinolata u rodu *Reseda* L. (Fahey et al., 2001)

Vrsta	Identifikovani glukozinolati	Referenca
<i>Reseda alba</i>	1, 5, 7, 8	Boufford et al., 1989 Daxenbichler et al., 1991 Olsen i Sorensen, 1979
<i>R. complicata</i>	8, 9	Schraudolf, 1965
<i>R. crystallina</i>	8	Schraudolf, 1965
<i>R. lutea</i>	2, 5, 8	Cole, 1976 Daxenbichler et al., 1991 Schraudolf, 1965
<i>R. luteola</i>	5, 6, 7, 8	Bjorkqvist i Hase, 1988 Cole, 1976 Daxenbichler et al., 1991 Ettlinger i Kjaer, 1968 Kirkland et al., 1971 Kjaer i Gmelin, 1958
<i>R. media</i>	2, 4, 7, 8	Olsen i Sorensen, 1979
<i>R. odorata</i>	3, 8, 10	Ahmed et al., 1972 Olsen i Sorensen, 1980
<i>R. phyteuma</i>	5, 8	Daxenbichler et al., 1991 Schraudolf, 1965
<i>R. stricta</i>	5,7	Daxenbichler et al., 1991



Šema 5. Glukozinolati identifikovani u biljnim vrstama roda *Reseda*. Velikim slovima je označen tip glukozinolata (videti sekciju 2.1.2, Fahey et al., 2001).

2.2. *Ferula ovina* (Boiss.) Boiss (Apiaceae)

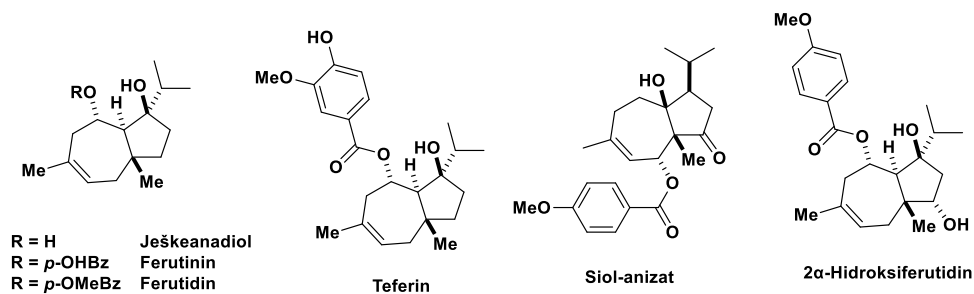
2.2.1. *Ferula ovina* u ishrani

Rod *Ferula* L. se sastoji od oko 150 biljnih vrsta koje nastanjuju region Mediterana i istočne i centralne Azije. Mnoge vrste ovog roda istorijski su poznate po svojoj upotrebi u ishrani i medicinskim osobinama. Asafetida, smola koja se dobija iz rizoma nekoliko biljnih vrsta roda *Ferula* (jedna od njih je *F. asa-foetida*) u Nepal u se koristi kao sastojak karija (Eigner i Scholz, 1999). Galbanum, eksudat vrsta *F. galbaniflua* i *F. rubricaulis*, dodaje se u slatkiše (Evans, 1999), a upotrebljava se i za lečenje stomaćnih tegoba (Sadraei et al., 2001). *Ferula orientalis* se u Turskoj koristi kao začin (Kartal et al., 2007). Prirodni preparati na bazi *F. hermonis* se prodaju kao afrodizijaci (Hadidi et al., 2003).

U iranskoj flori je prisutno oko 30 taksona ovog roda, jedan od njih je *Ferula ovina* (Boiss.) Boiss. Smola koje se dobija zasecanjem stabljike ove biljke se koristi kao tradicionalni začin (Rana, 2003). Ova biljna vrsta je takođe veoma poznata i po svojoj medicinskoj upotrebi: vodeni ekstrakt ove biljne vrste ima antispazmodičnu, antiholinergičnu i relaksatorsku aktivnost (Al-Khalil et al., 1990). Iako je sastav etarskog ulja *F. ovina* već publikovan (Ghannadi et al., 2002; Rahmani et al., 2008), farmakološka aktivnost ovog ulja do danas nije ispitivana.

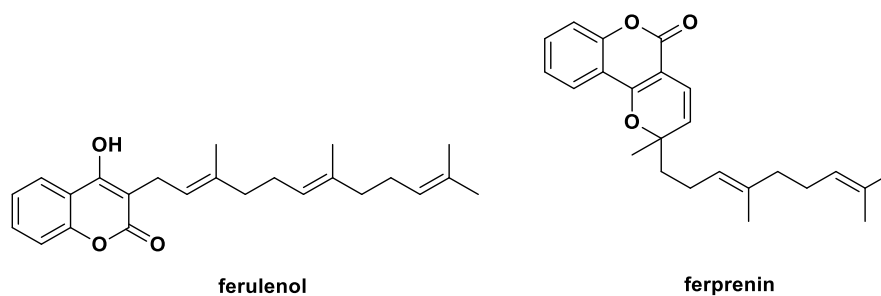
2.2.2. Fitohemija roda *Ferula*

U dosadašnjim istraživanjima iz roda *Ferula* je izolovan veliki broj seskviterpenskih estara (daukanskog tipa) aromatičnih kiselina (Lamnaouer et al., 1989). Na šemi 6 prikazani su daukanski estri identifikovani u vrstama *F. communis* i *F. arrigonii* sa Sardinije (Poli et al., 2005). Prikazani hidroksi- i metoksibenzoat alkohola ješkeanadiola pokazali su antiproliferativno dejstvo na ćelije kancera debelog creva čoveka.



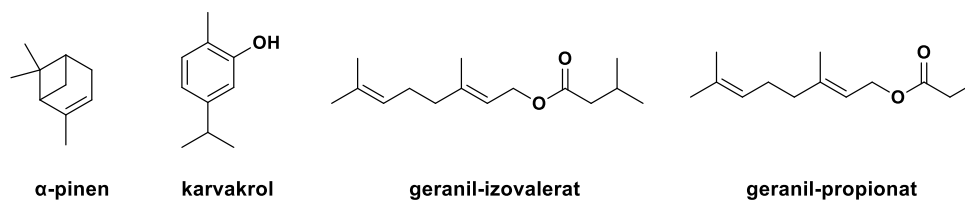
Šema 6

U rodu *Ferula* takođe su veoma zastupljeni i seskviterpenski kumarini (šema 7). Prvi izolovani (ujedno i najzastupljeniji) kumarin iz ovog roda bio je farnezilovani derivat 4-hidroksikumarina, ferulenol. Utvrđeno je da je ovo jedinjenje (zajedno sa još jednim prenilovanim kumarinom, ferpreninom), odgovorno za sindrom feruloze – hemoragični sindrom koji se javlja kod sisara i koji je izazvan konzumiranjem vrste *F. communis*. Utvrđeno je da ferulenol inhibira regeneraciju vitamina K iz vitamin K 2,3-epoksida i da je afinitet ovog jedinjenja ka vitamin K-epoksid reduktazi 20 puta jači od varfarina (Gebauer, 2007).



Šema 7

U dve objavljene studije u kojima je analiziran sastav etarskog ulja *F. ovina* (Ghannadi et al., 2002; Rahmani et al., 2008) identifikovan je relativno mali broj sastojaka (manje od 50), a glavni sastojci bili su α-pinen, karvakrol, geranil-izovalerat i geranil-propionat (šema 8).



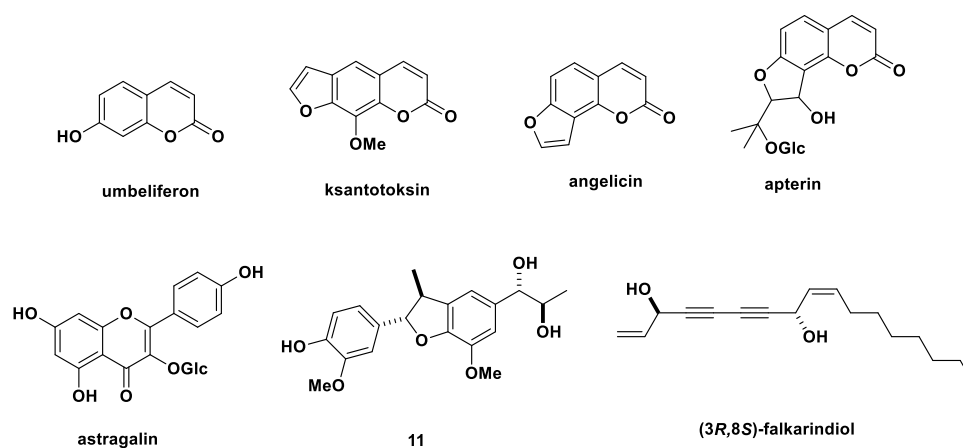
Šema 8

2.3. *Heracleum sphondylium* L. (Apiaceae)

Heracleum L. je rod porodice štitnjača od oko 70 rasprostranjenih biljnih vrsta (Evans, 1996). *Heracleum sphondylium* L., u narodu poznat kao „mečja šapa“, raste širom Evrope i severne Afrike i tradicionalno se koristi protiv dijareje i dizenterije (Evans, 1996).

2.3.1. Fitohemija roda *Heracleum*

Od oko 120 vrsta roda *Heracleum*, do sada je fitohemijski ispitano tek 21 (Bahadori et al., 2016); rod je veoma bogat različitim tipovima kumarinskih derivata. Do sada su identifikovana jednostavna kumarinska jedinjenja (poput umbeliferona iz plodova *H. leskowiei*), linearni (npr., ksantotoksin) i angularni (angelicin) furokumarini iz plodova *H. mantegazzianum*, kondenzovana kumarinska jedinjenja, glikozilovani kumarini (apterin), flavonoidi (astragalin), iridoidi, lignani (npr. jedinjenje **11** iz korena *H. dissectum*), fenilpropanoidi, poliacetileni (falkarindiol iz *H. maximum*), lipidi (u semenu *H. lehmannianum*) itd. (šema 9., Bahadori et al., 2016).



Šema 9

Glavni sastojci etarskog ulja *H. crenatifolium*, *H. platytaenium* i *H. sphondylium* subsp. *ternatum* bili su 1-oktanol i estri 1-oktanola (acetat, butanoat, izovalerat i heksanoat) (Ozek et al., 2002; 2005).

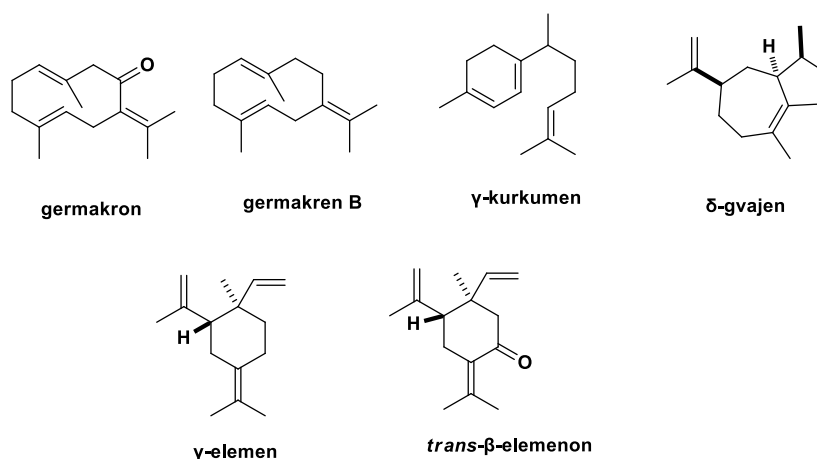
2.4. *Geranium macrorrhizum* L. (Geraniaceae)

Rod *Geranium* sastoji se od oko 300 vrsta, od toga je najmanje 55 fitohemijski ispitano (Lis-Balchin, 2002). Najdetaljnije su ispitane vrste *G. macrorrhizum*, *G. robertianum* i *G. thunbergii*. *G. macrorrhizum* (zdravac) poseduje širok spektar bioloških aktivnosti (na primer, antimikrobno, antioksidativno i sedativno dejstvo, Radulović et al., 2011), te je stoga veoma cenjen u etnofarmakologiji balkanskih naroda.

2.4.1. Fitohemija roda *Geranium*

Dva jedinjenja koja su karakteristična za ovaj rod (po kom su dobila imena) su geraniin (elagitanin izolovani iz *G. thunbergii*) i germakron (seskviterpen koji je izolovan iz zdravca, *G. macrorrhizum*). Poznato je da vrste ovog roda sadrže veliki broj flavonoida (kvercetin, kempferol, miricetin), tanina (elagična i galna kiselina), kondenzovanih tanina itd. (Lis-Balchin, 2002).

Etarsko ulje vrste *G. macrorrhizum* se najvećim delom (>80%) sastoji od seskviterpena. Rezultati svih dosadašnjih studija bili su prilično konzistentni po pitanju sadržaja glavnog sastojka germakrona (50-55%; Lis-Balchin, 2002 i reference navedene u ovoj monografiji; Radulović et al., 2010). U ulju nadzemnog dela biljke prisutne su i znatne količine germakrena B, γ -kurkumena, *trans*- β -elemenona i γ -elemena (šema 10). Etarsko ulje rizoma sastoji se pretežno od seskviterpenoida gvajanskog skeleta (glavni sastojak, oko 50% ulja je δ -gvajen, Radulović et al., 2010).



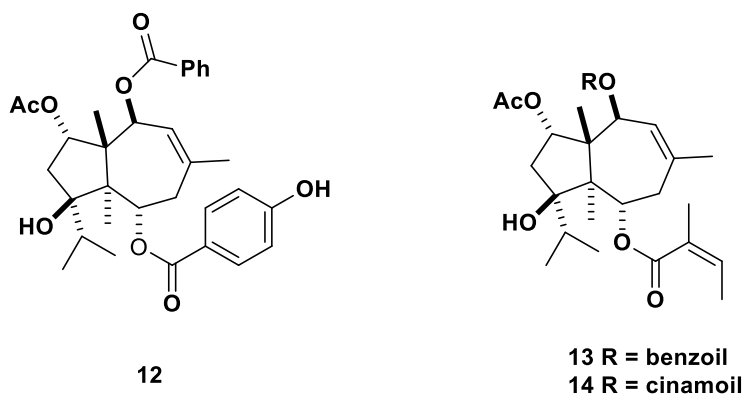
Šema 10

2.5. *Daucus carota* subsp. *carota* (Apiaceae)

Divlja šargarepa (*Daucus carota* subsp. *carota*) je dvogodišnja zeljasta biljka iz porodice štitašica. Zbog svog terapijskog dejstva (pre svega antibakterijskog i antifungalnog), veoma je cenjena u tradicionalnoj medicini (Tavares et al., 2008).

2.5.1. Fitohemija vrste *D. carota* subsp. *carota*

U različitim delovima divlje šargarepe (*D. carota* subsp. *carota*) identifikovani su seskviterpeni daukanskog tipa (*trans*-dauka-8-en-4-ol, *trans*-dauka-8,11-dien, dauka-5,8-dien, akora-4,9-dien, akora-4,10-dien, karotol i daukol), furokumarini (8-metoksipsoralen i 5-metoksipsoralen), flavonoli (kvercetin i kempferol), flavoni (apigenin i luteolin), poliacetileni, masne kiseline i β -karoten (Al-Snafi, 2017; Ahmed et al., 2005 i reference navedene u ovim publikacijama). U korenu divlje šargarepe identifikovani su daukanski triestri **12-14** (Ahmed et al., 2005).



Šema 11

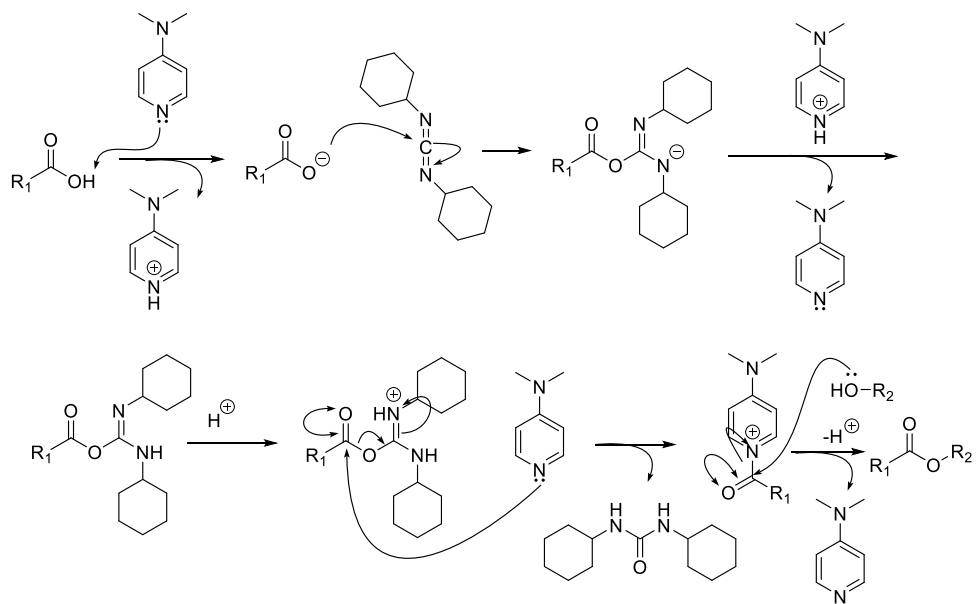
Etarsko ulje plodova *D. carota* sastavljeno je pretežno od oksigenovanih monoterpena i oksigenovanih seskviterpena; glavni sastojci su geranil-acetat i β -azaron. Etarsko ulje lišća sastoji se uglavnom od ugljovodonika, α -pinena (27%), sabinena (25%) i germakren D (16%) (Ksouri et al., 2015).

2.6. Štegljehova esterifikacija

Štegljehova esterifikacija predstavlja reakciju esterifikacije koje se odvija pri blagim uslovima (obično na sobnoj temperaturi). Ova reakcija je jedna od najboljih metoda za dobijanje *tert*-butil estara (pri uslovima Fišerove esterifikacije *t*-BuOH formira karbokation, a nakon eliminacije protona izobuten). Reakciju je prvi opisao Wolfgang Štegljeh (Neises i Steglich, 1978). Neke od karakteristika Štegljehove reakcije su: 1) reakcija se vrši uz prisustvo DMAP-a (građenje aktivnog acil-intermedijera i sprečava formiranje neželjenog proizvoda *N*-acil uree); 2) reakcija toleriše prisustvo velikog broja funkcionalnih grupa, na primer, diazo grupe; 3) voda koja nastaje u reakciji reaguje sa DCC-om (*N,N'*-dicikloheksilkarbodiimidom) čime se dobija *N,N'*-dicikloheksilurea (DCU); 4) najčešće korišćeni rastvarači su dihlormetan i hloroform; ugljen tetrahlorid i acetonitril su odlične alternative zbog slabe rastvorljivosti DCU u ovim rastvaračima; 5) najveći deo nastale uree je moguće odvojiti ceđenjem, ali tragovi obično ostaju u reakcionoj smeši i ponekad ih je teško ukloniti. Zato se danas umesto DCC-a često koristi vodorastvorni 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)karbodiimid ili DCC vezan za polimer; 6) uslovi Štegljehove esterifikacije mogu da se koriste za formiranje makrolaktona (tzv. Kekova makrolaktonizacija). Ova procedura zahteva veliko razblaženje (< 0,03 M). Supstrat se u tom slučaju rastvara u aprotičnom rastvaraču i dodaje postepeno (tokom nekoliko sati) u refluktujući rastvor koji sadrži reagens (Kurti i Czako, 2005).

2.6.1. Mehanizam Štegljehove esterifikacije

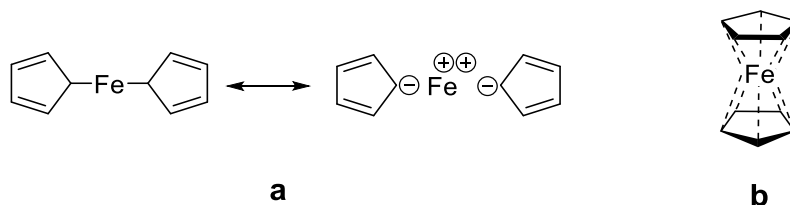
Mehanizam se sastoji iz dva koraka (šema 12): u prvom koraku se formira elektrofilni intermedijer, a u drugom koraku se formira estar (i *N,N'*-dialkilurea kao nusproizvod).



Šema 12. Mehanizam Štegljohve esterifikacije

2.7. Feroceni i njegovi derivati

Moderna era organometalne hemije započinje sintezom ferocena 1951. godine. Dva istraživačka tima su, sasvim nezavisno jedan od drugog, dobila stabilno jedinjenje molekulske formule $\text{FeC}_{10}\text{H}_{10}$ reakcijom gvožđe(III)-hlorida sa ciklopentadienilmagnezijum-bromidom (Kealy i Paulson, 1951) i reakcijom gvožđa sa ciklopentadienom na $300\text{ }^\circ\text{C}$ (Miller et al., 1952). Interesantno je da su oba tima predložila takvu strukturu ferocena gde su dva prstena povezana za atom gvožđa sigma vezom. Do ispravne strukture ferocena su, takođe gotovo istovremeno, došli Vudvard i Wilkinson sa Harvarda (Wilkinson et al., 1952) i Fišer sa Tehničkog univerziteta u Minhenu (Fischer i Pfab, 1952, šema 13). Vudvard i Wilkinson su prvi predložili „sendvič“ strukturu, gde je atom gvožđa smešten između dva prstena. Naime, podaci dobijeni IR spektroskopijom ukazivali su da su sve C-H veze u molekulu ekvivalentne, što ne bi bio slučaj u prvo predloženoj strukturi ferocena. Ernst Fišer i Wolfgang Pfab su prvi dali direktan dokaz za sendvič strukturu korišćenjem podataka dobijenih rentgenskom kristalografijom (Cantrill, 2014).

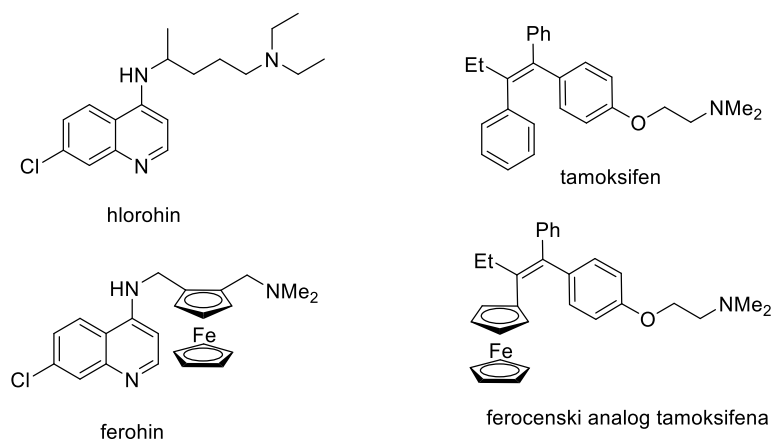


Šema 13. Strukture ferocena koje su predložili a) Miller et al. (1952);
b) Wilkinson et al. (1952)

Derivati ferocena danas privlače veliku pažnju medicinskih hemičara, koji ga često uvode u strukturu kao zamenu za fenil ili alkil grupu (Gielen i Tiekink, 2005). Nekoliko osobina čine da ferocenil (Fc) grupa bude poželjni strukturni fragment: lipofilnost (ferocenski derivati su lipofilniji od odgovarajućih fenil, tako da ferocenil jedinjenja mogu biti biodostupnija od fenil analoga), stabilnost (18 elektronska konfiguracija $\text{Fe}(\eta^5\text{-C}_5\text{H}_5)_2$) i netoksičnost (ferocen ima reputaciju „bezbednog“ metallocena). Toksičnost samog ferocena je testirana na psima u visokim dozama tokom tri meseca i

nije zapažena akutna toksičnost, čak ni pri dozi od 1 g/kg telesne mase (Yeary, 1969).

Nije moguće predvideti ishod uvođenja ferocenske grupe u molekul na njegovu biološku aktivnost. Na primer, Loev i Flores (1961) su prvi istraživači koji su inkorporirali ferocensko jezgro u farmakološki aktivna jedinjenja (amfetamin i fenitoin), međutim, dobijeni analozi nisu bili aktivni. Postoji veliki broj studija gde je uvođenje ferocena pojačalo aktivnost polaznog jedinjenja, ili izmenilo njegov profil aktivnosti (Gielen i Tiekink, 2005). Na primer, ferohin (Šema 14) je 35 puta aktivniji na otporne sojeve *Plasmodium falciparium* (jedog od parazita koji izaziva malariju kod ljudi) od klinički primenjivanog hlorohina. Istraživanja su pokazala da se dejstvo osim očekivanim mehanizmom (koji se vezuje za prisustvo hinolinskog jezgra) ostvaruje i proizvodnjom HO· (za ovo je zaslužan metalocen) (Dubar et al., 2013; Fouda et al., 2007). Ferocenski analog tamoksifena (modulator estrogenskih receptora; anti-tumorni agens) ima manje nedostataka nego originalni molekul. Za dodatne primere videti pregledni članak Fouda et al. (2007).



Šema 14

2.7.1. Sinteza monoarilferocena

Iako je dobijanje derivata ferocena reakcijama elektrofilne aromatične supstitucije često i lako, formiranje veze Fc-Ar ne predstavlja nimalo jednostavan zadatak. Ovde su navedene neke od metoda koje se najčešće koriste za dobijanje monoarilferocena (videti šemu 15):

(1) Najstariji postupak, koji se ujedno u najčešće koristi je reakcija ferocena i arildiazonijum soli (Rosenblum et al., 1962). Prinosi koji se ostvaruju u ovim reakcijama retko su iznad 40%. Kao sporedni proizvodi često se dobijaju i 1,1'-, 1,2- i 1,3-diarilferoceni koji se teško razdvajaju od monoarilferocena. Prinos može neznatno da se poveća ako se kao rastvarač umesto glacijalne sirćetne kiseline ili acetona koristi dietil-etar. Reakcija najverovatnije teče u dva koraka: u prvom koraku ferocen predaje elektron diazonijum jonu čime se dobija ferocenijum jon i aril-diazonijum radikal koji gubitkom azota prelazi u aril radikal. Proizvod nastaje reakcijom aril radikala i ferocenijum jona.

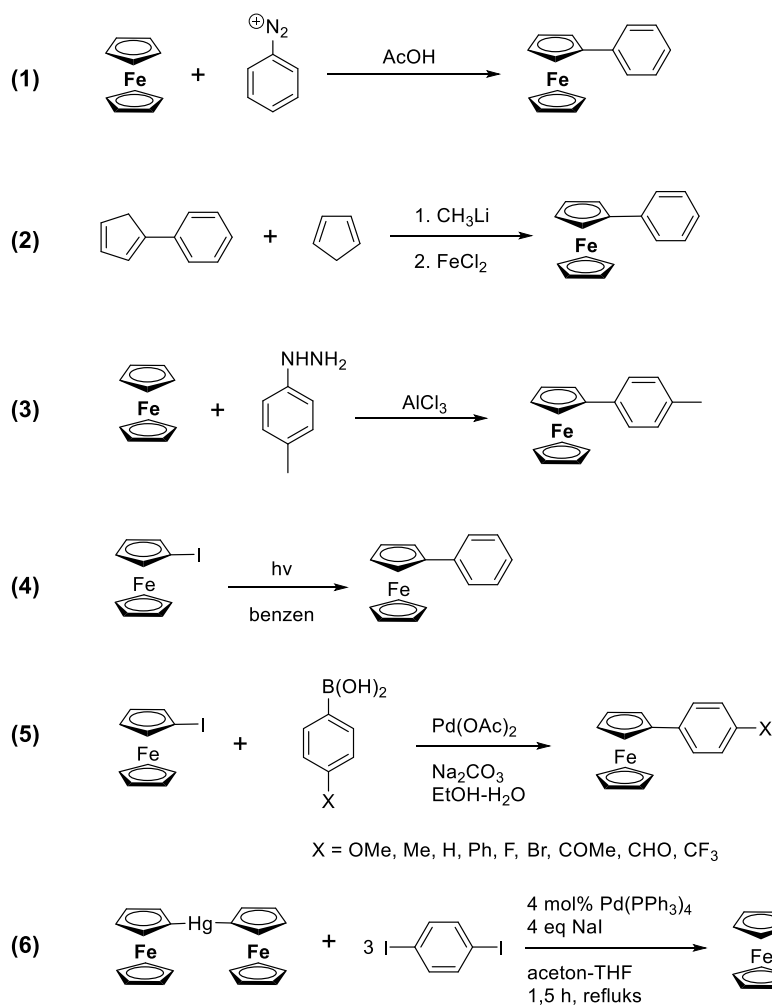
(2) Reakcija aril ciklopentadiena sa gvožđe(II)-hloridom i ciklopentadienom u prisustvu jake baze (Pauson, 1954).

(3) Reakcija aril hidrazina sa ferocenom u prisustvu aluminijum-hlorida kao katalizatora (Sollott i Peterson, 1968). Na ovaj način sintetisan je veliki broj aril-ferocena (*o*-tolil-, *p*-tolil-, 4-bromofenil-, itd.) i ovim postupkom se dobijaju samo monoarilferoceni, ali su prinosi uglavnom niski.

(4) Slobodno-radikalska reakcija jodferocena i benzena. Problem je vrlo slaba regioselektivnost reakcije; kada se koriste monosupstituisani benzeni dobijaju se sva tri regioizomera. Reakcija se najverovatnije vrši preko napada intermedijernog ferocenil radikala nastalog ozračivanjem na derivate benzena; regioselektivnost je slična kao u reakciji istog derivata benzena i fenil radikala (Imrie et al., 1993).

(5) Najbolji prinosi dobijaju se reakcijom ferocena sa arilbornim kiselinama u prisustvu natrijum-karbonata i paladijum(II)-acetata u smeši vode i etanola na sobnoj temperaturi (Imrie et al., 1999).

(6) Dobri prinosi dobijaju se reakcijom bis(ferocenil)žive i jodarena u prisustvu kompleksa paladijuma(0) kao katalizatora (Beletskaya et al., 2001).



Šema 15

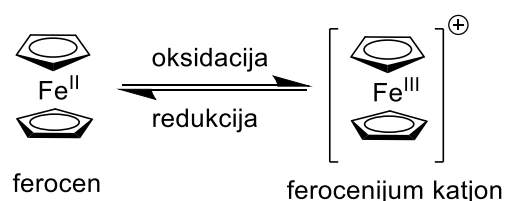
2.7.2. Citotoksičnost ferocenskih derivata

Antitumorska aktivnost leka cisplatine (koristi se u oko 50% slučajeva lečenja različitih kancera) podstakla je veliko interesovanje za novim neorganskim citostaticima (Gielen i Tiekink, 2005)³. Citotoksična aktivnost ferocenskih jedinjenja prvi put je zapažena krajem 70-ih kada su Brynes i sar. (Fiorina et al., 1978) pokazali da ferocenski analozi koji sadrže amino- ili amidnu funkcionalnu grupu imaju citotoksično dejstvo na limfocite leukemije (Ornelas, 2011).

³ Cisplatina, međutim, poseduje dva velika nedostatka: nedelotvornost na mnoge tumore i nefrotoksičnost (Gasser et al., 2011)

Kopf-Maier i sar. su 1984. pokazali da ferocenijum soli (na primer, pikrat i trihloracetat) poseduju antitumorsku aktivnost. Autori studije su testirali dejstvo ferocena i ferocenijum soli na Erlihove ćelije (tumorske ćelije) kod miševa. Zapaženo je da ferocen, koji je nerastvoran u vodi, nema aktivnost na ćelije tumora. Ferocenijum soli (rastvorne u vodi) pokazale su odličnu citotoksičnu aktivnost – na primer, ferocenijum-tetrahlridoferat(III) ($[\text{Cp}_2\text{Fe}]^+[\text{FeCl}_4]^-$) u optimalnoj dozi produžava životni vek miševa za 380% (u odnosu na kontrolnu grupu miševa sa Erlihovim ćelijama). Zaključak autora je bio da rastvorljivost derivata ima presudnu ulogu u anti-tumornoj aktivnosti. Dokaz za ovu tvrdnju bilo je i odsustvo aktivnosti slabo rastvornog ferocenijum-heptamolibdata (*Kopf-Maier et al.*, 1984).

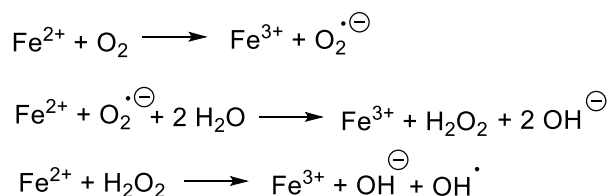
Mehanizam citotoksičnog dejstva ferocenskih jedinjenja još uvek nije potpuno rasvetljen; za sada još nije sasvim jasno koje oksidaciono stanje gvožđa u derivatima ferocena (Fe(II) ili Fe(III)) je odgovorno za aktivnost. Jedno mišljenje je da redoks stanje gvožđa nije od velike važnosti za aktivnost – kada dospe u ćeliju, Fe^{2+} gubi elektron i uspostavlja se ravnoteža sa Fe^{3+} (*Swarts et al.*, 2001, Šema 16). Elektrodni potencijal za ovaj proces je sličan sa drugim biološkim redoks reakcijama (*Connely i Geiger*, 1996). Aktivnost ferocenskih derivata u ovom slučaju zavisila bi od biodostupnosti agensa i lakoće oksidacije Fe^{2+} u Fe^{3+} (što zavisi od elektrodnog potencijala redoks para ferocen/ferocenijum jon, to jest od supstituenata na ferocenu). Na primer, antiproliferativna aktivnost poliaspartamidnih ferocenskih konjugata (koji sadrže 4-ferocenilbutansku kiselinu) se dovodi u vezu sa niskim elektrodnim potencijalom



Šema 16

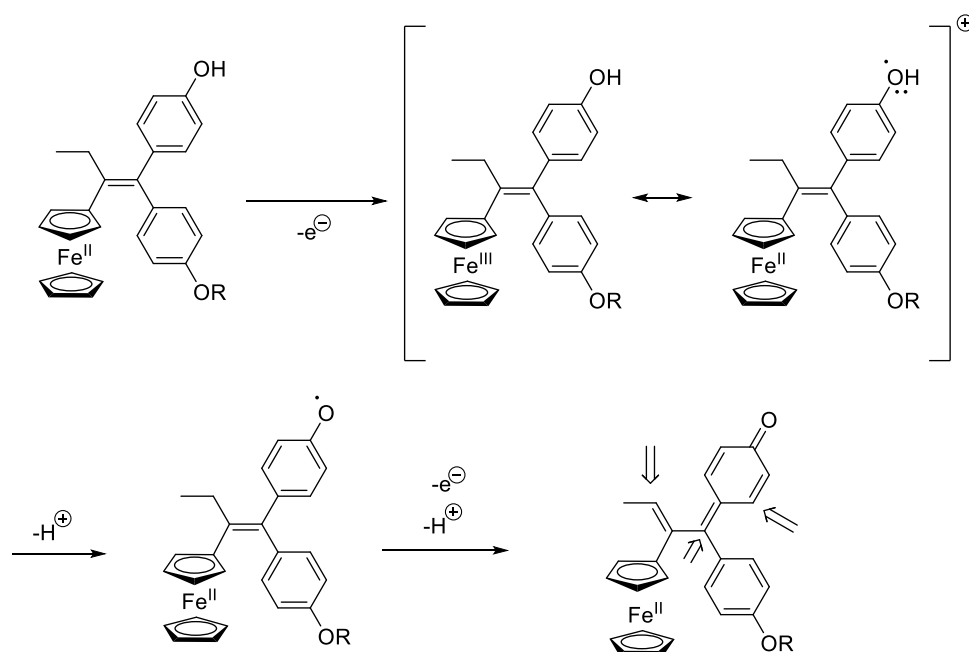
Dosadašnje studije (*Houlton et al.*, 1991, *Tamura i Miwa*, 1997; *Osella et al.*, 2000; *Neuse*, 2005) pokazale su da mehanizam citotoksičnog dejstva ferocenskih jedinjenja najverovatnije uključuje i korak generisanja radikala

(Fentonovom reakcijom) koji oštećuju DNK i uvode ćeliju u apoptozu (Šema 17).



Šema 17

Objavljen je veliki broj studija koje se bave sintezom potencijalnih antikancer ferocenskih derivata (videti pregledni članak *Ornelas* (2011)). Najveću pažnju privukli su već pomenuti ferocenski derivati tamoksifena (ferocifeni). Tamoksifen (nesteroidni selektivni estrogenski receptor, SERM) koristi se u lečenju ER+ raka dojke (Jordan, 1992). Ferocifene su prvi sintetisali 1996. *Jaouen* i sar. zamenom fenil grupe iz 4-hidroksitamoksifena ferocenil grupom (Top et al., 1996). Aktivni metabolit, hidroksiferocifen, lako se oksiduje do hinonskog intermedijera i smatra se da je formiranje adukata ove vrste i nukleoiniskih baza odgovorno za toksičnost ferocifena (Šema 18).



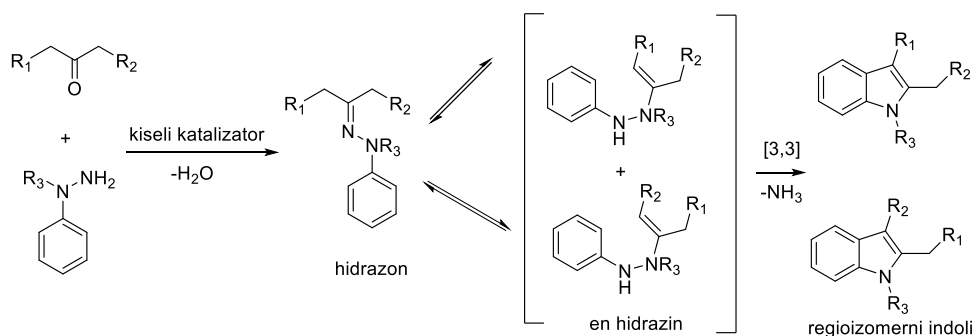
Šema 18. Redoks aktivacija ferocifena koju su predložili *Jaouen* i sar. Strelice označavaju elektrofilna mesta.

2.8. Fišerova sinteza indola

Fišerova indolizacija je reakcija dobijanja indolovog jezgra ciklizacijom arilhidrazona aldehida ili ketona uz zagrevanje ili pod uticajem kiselog katalizatora. Prvu indolizaciju aril hidrazona su izveli *Fischer* i *Jourdan* (1883) – tretiranjem pirogroždane kiseline i *N*-metil-*N*-fenilhidrazona alkoholnim rastvorom hlorovodonika dobili su 1-metilindol-2-karboksilnu kiselinu. Fišerova indolizacija je najvažnija metoda za dobijanje supstituisanih indola. Sinteza indola se često vrši tako što se ekvimolarna smeša arilhidrazina i karbonilnog jedinjenja podvrgne uslovima indolizacije, bez prethodnog izolovanja hidrazona (Li, 2005). Ovakva procedura vrlo je korisna kada je intermedijerni hidrazon nestabilan.

U Fišerovoj sintezi indola može da se koristi veliki broj Bronštedovih i Luisovih kiselina: 1) mineralne kiseline (HCl, H₂SO₄, polifosforna kiselina, metansulfonska kiselina, itd.), 2) slabe kiseline (AcOH), 3) kisele gline (montmorilonit, Mordenit) i 4) Luisove kiseline (AlCl₃, ZnCl₂, BF₃) (Kurti i Czako, 2005). Za reakcije katalizovane Luisovim kiselinama obično su dovoljni blagi uslovi (sobna temperatura).

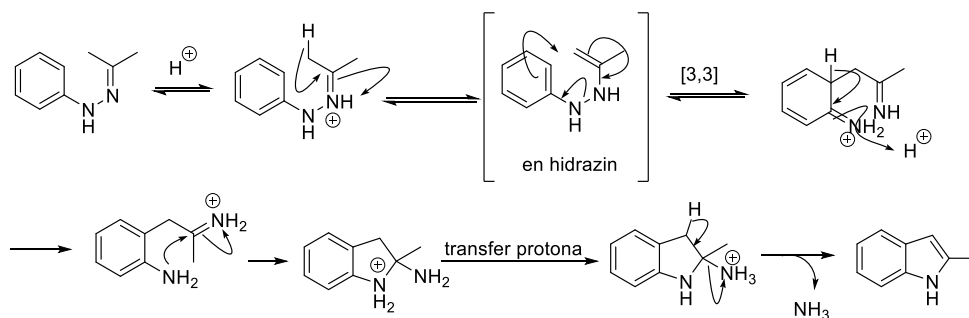
Nesimetrični ketoni daju dva regioizomerna 2,3-disupstituisana indola, a regioselektivnost zavisi od uslova reakcije (prirode reaktanata i sternih efekata u ketonu i en hidrazinu, šema 19). Jake kiseline favorizuju stvaranje manje supstituisanog en hidrazina, dok je reakcija katalizovana slabim kiselinama obrnute selektivnosti (Li, 2005). 1,3-Dikarbonila jedinjenja i α,β -nezasićeni ketoni su loši supstrati za Fišerovu indolizaciju (arilhidrazoni β -ketoestara ciklizacijom daju pirazol-3-one; α,β -nezasićeni ketoni daju pirazoline, Kurti i Czako, 2005). Prisustvo *orto* supstituenata, kao i prisustvo elektron-akceptorskih grupa na aromatičnom prstenu hidrazina smanjuje prinos i brzinu reakcije.



Šema 19

2.8.1. Mehanizam Fišerove indolizacije

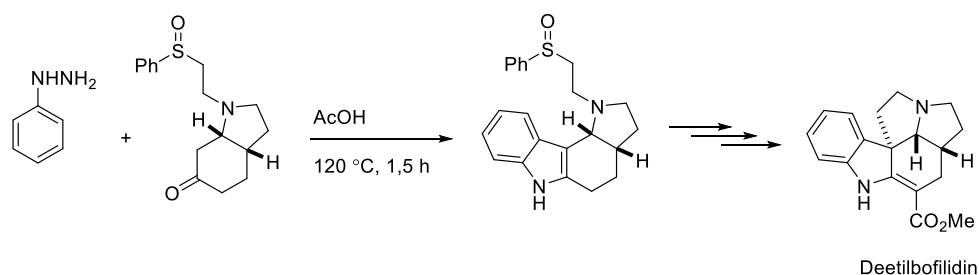
Mehanizam koji je danas prihvaćen je predložio R. Robinson (1924) i sastoji se iz četiri koraka (šema 20): 1) kiselo katalizovana tautomerija hidrazona i en hidrazina; 2) [3,3]-sigmatropno premeštanje kojim se formira nova C-C veza, ali i narušava aromatičnosti prstena (najverovatnije iz mono- ili diprotonovane vrste); 3) aromatizacija transferom protona i formiranje petočlanog prstena 5-egzo-trig ciklizacijom i 4) gubitak molekula amonijaka čime nastaje indol (Kurti i Czako, 2005). Položaj ravnoteže između hidrazona i njegovog tautomera en hidrazina neprestano se pomera u desno zbog ireverzibilnog procesa rearomatizacije u koraku 3).



Šema 20

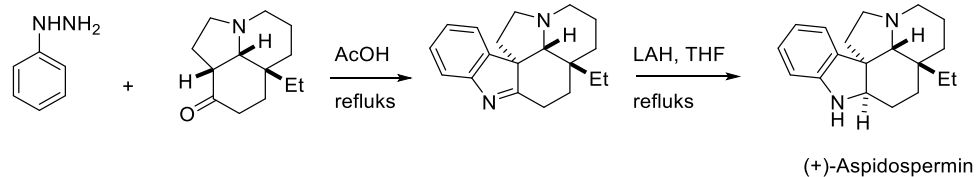
2.8.2. Primeri Fišerove indolizacije

Jedan od koraka totalne sinteze deetilbofilidina (Bonjoch et al., 1996) bila je regioselektivna Fišerova indolizacija kojom je dobijen dole prikazani oktahidropirololo[3,2-*c*]karbazol u prinosu od 60% (šema 21).



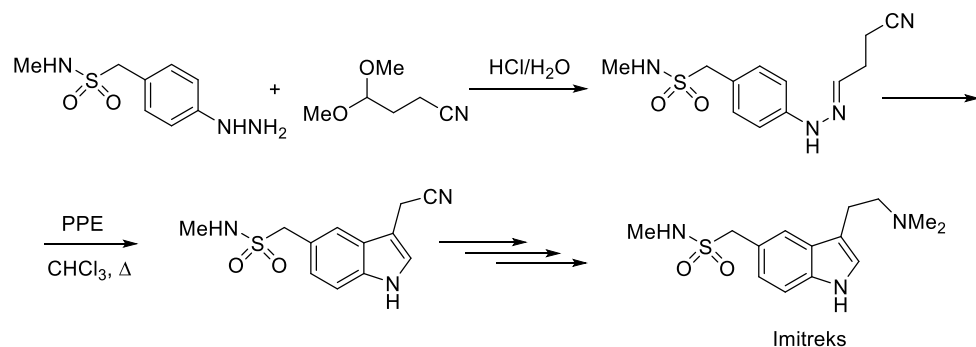
Šema 21

Jedan od završnih koraka sinteze (+)-aspidospermidina (Iyengar et al., 2000) bila je Fišerova indolizacija tricikličnog ketona. U glacialnoj AcOH reakcija je išla mehanizmom formiranja supstituisanijeg intermedijernog en hidrazina (šema 22).



Šema 22

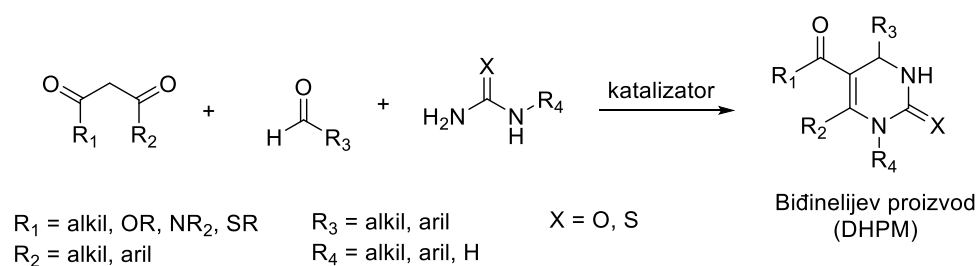
Sumatriptan (Imitreks, komercijalni lek koji se koristi za lečenje migrena i klasternih glavobolja) takođe se sintetiše Fišerovom indolizacijom. Zbog velike osetljivosti aldehida, u reakciji je korišćen dimetilacetal 3-cijanopropanala (šema 23).



Šema 23

2.9. Biđinelijeva reakcija

Biđinelijeva reakcija je višekomponentna reakcija kojom se dobijaju funkcionalizovani 3,4-dihidropirimidin-2(1*H*)-oni (skraćeno: DHPM). Reakcija nosi ime po Pjetru Biđineliju koji je prvi 1893. sintetisao derivate DHPM reakcijom aromatičnog aldehida, uree i etil-acetoacetata u etanolu, u prisustvu katalitičke količine HCl (proizvodi ove reakcije često se nazivaju Biđinelijevi proizvodi, šema 24). Interesantno je da je do 70-tih godina 20. veka objavljeno svega nekoliko publikacija u kojima je korišćena Biđinelijeva reakcija; interesovanje se, međutim, naglo rasplamsalo 90-tih godina. Danas se Biđinelijeva reakcija često koristi za dobijanje novih biološki aktivnih jedinjenja, a Biđinelijevi proizvodi su u fokusu pažnje kako akademskih krugova, tako i farmaceutske industrije.



Šema 24

Postoji više razloga zašto je to tako: 1) DHPM iskazuju širok spektar terapijskih i farmakoloških osobina (na primer, antivirusnu, antibakterijsku, antitumornu, itd; za detaljan pregled bioloških aktivnosti Biđinelijevih proizvoda videti rad Kappe, 2000a), 2) DHPM fragment je identifikovan kao deo strukture nekoliko (biološki aktivnih) prirodnih proizvoda i Biđinelijeva kondenzacija je iskorišćena kao ključni korak u totalnim sintezama nekoliko prirodnih proizvoda (Li, 2005), 3) jednostavnost *one-pot* reakcije, obrade, prečišćavanja proizvoda, kao i dostupnost startnih reagenasa (Kappe, 2000b). Biđinelijeva reakcija je toleriše prisustvo velikog broja funkcionalnih grupa (Kurti i Czako, 2005), 4) raznovrsnost početnih supstrata – struktura svake od tri komponente reakcije može da se varira, čime se dobija visok stepen diverziteta koji je naročito koristan, na primer u kombinatornoj hemiji. Po SciFinder[®]-u, do

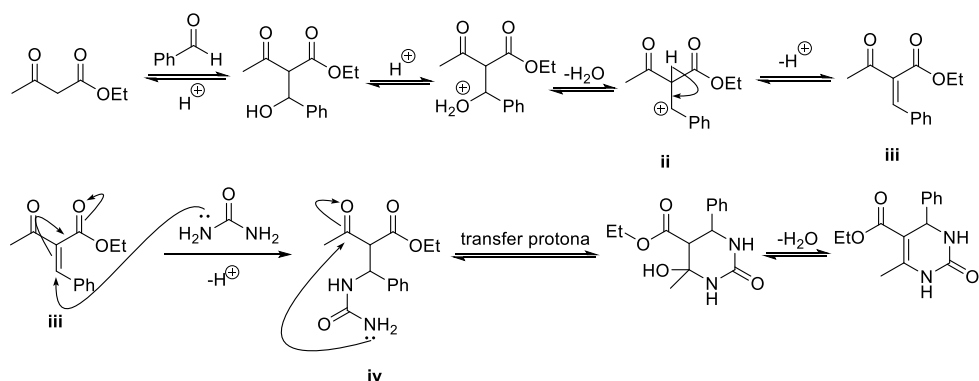
septembra 2017. godine sintetisano je preko 70.000 različitih Biđinelijevih proizvoda.

Većina radova koja je publikovana nakon određivanja mehanizma reakcije (Kappe, 1997) bavi se unapređenjem sintetske metodologije (Li, 2005). Veliki broj DHPM za koje postoje podaci u literaturi sintetisani su direktno Biđinelijevom reakcijom; međutim, moguće je do DHPM analoga doći i sintetskom funkcionalizacijom dihidropirimidinonskog jezgra. Svaki od šest centara u heterocikličnom prstenu može da se modifikuje (Singh i Singh, 2012). Neke od ovih reakcija su: manipulacija C-6 metil grupe (na primer, halogenovanje), alkilovanje/acilovanje na heteroatomima ili modifikacija estarske grupe vezane za C-5 (pogledati primere u sekciji 2.3.3).

Do danas je u literaturi zabeleženo nekoliko pokušaja redukcije Biđinelijevih proizvoda i svi su uključivali proces desulfurizacije; na primer, DHPM dobijeni iz tiouree i njihovi S-metilovani derivati redukovani su Raney[®]-niklom do C-2 nesupstituisanih 1,4-dihidropirimidina (Khanina et al., 1986). Isti proizvodi dobijeni su reduktivnom detionacijom 3,4-dihidropirimidin-2-tiona pri *flow* uslovima (Raney[®]-Ni, H₂ na 1-2 bara u acetonitrilu, Desai i Kappe, 2005).

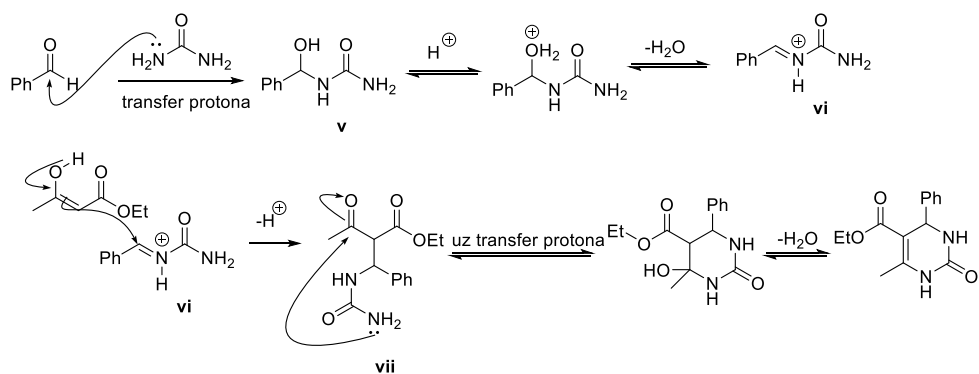
2.9.1. Mehanizam Biđinelijeve reakcije

Prvi detaljan mehanizam Biđinelijeve reakcije predložili su *Sweet* i *Fissekis* (1973, Šema 25). Predložili su mehanizam koji se sastojao iz 4 koraka: 1) aldolne adicije etil-acetoacetata i benzaldehida; 2) protonovanjem i gubitkom vode iz intermedijera **i** nastaje karbokatjon **ii** koji je u ravnoteži sa enonom **iii**; 3) ključni napad uree na **iii** daje ureid **iv**; 4) ciklizacijom intermedijera **iv** nastaje hemiaminal koji podleže dehidraciji i na taj način se formira DHPM. Autori studije su pokazali da prethodno sintetisani enon **iii** u reakciji sa *N*-metil ureom zaista daje *N*-metilovani Biđinelijev proizvod (1-Me-DHPM).



Šema 25. Mehanizam Biđinelijeve reakcije koji su predložili *Sweet* i *Fissekis* (1973)

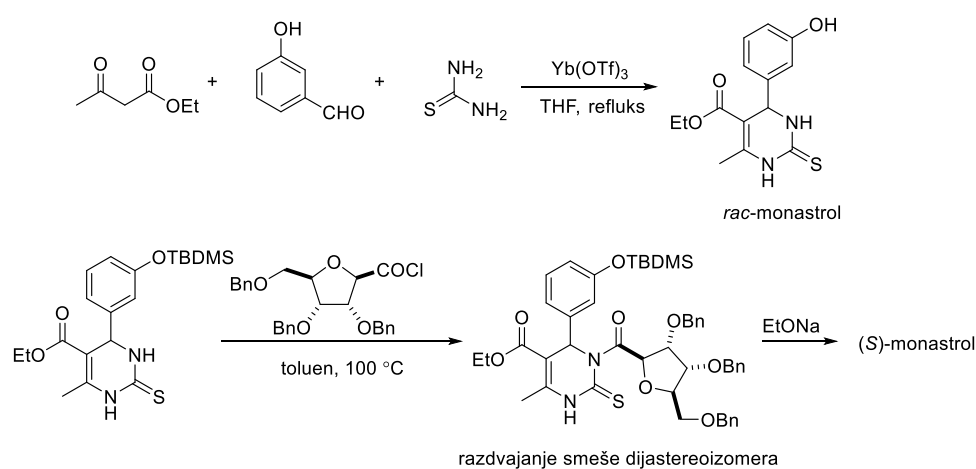
Ovaj mehanizam, 25 godina kasnije, odbacio je *Kappe* (1997) kao neosnovan. Naime, podaci koje je on dobio ^1H i ^{13}C NMR eksperimentima nisu dali dokaz o postojanju karbokatjona. Takođe je utvrdio da aldol (**i** u Šemi 26) koji je neophodan za nastajanje karbokatjona **ii** ne nastaje kada se benzaldehid i etil-acetatoacetat pomešaju pri uslovima Biđinelijeve reakcije. Mehanizam koji je on predložio (koji je i danas prihvaćen, Šema 4) sastoji se iz sledećih koraka: 1) nukleofilnim napadom uree na aldehid nastaje hemiaminal **v**; 2) iz njega nastaje iminijum katjon **vi**; 3) **vi** reaguje sa dikarbonilnim jedinjenjem čime se dobija intermedijer **vii**; 4) ciklizacijom i dehidratacijom **vii** nastaje Biđinelijev proizvod.



Šema 26. Mehanizam Biđinelijeve reakcije koji je predložio *Kappe* (1997)

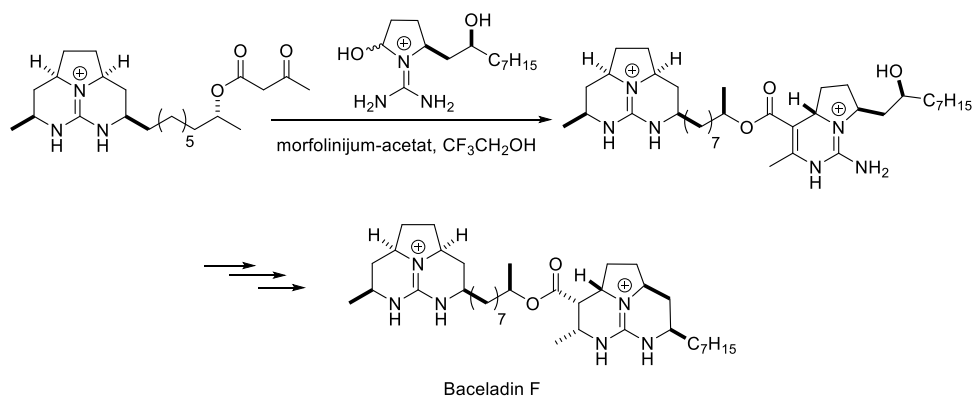
2.9.2. Primeri Biđinelijeve reakcije u sintezi

Najpoznatiji Biđinelijev proizvod svakako je monastrol, hemoterapeutsko jedinjenje koje selektivno inhibira mitotički kinezin Eg5 (Li, 2005). Racemski monastrol se dobija u visokom prinosu (95%) *one-pot* reakcijom 3-hidroksibenzaldehida, tiouree i etil-acetoacetata uz prisustvo katalitičke količine $\text{Yb}(\text{OTf})_3$ (Dondoni et al., 2002, šema 27). Rezolucija monastrola vrši se formiranjem i razdvajanjem diastereoizomernih N^3 -ribofuranozil amida (Dondoni et al., 2002).



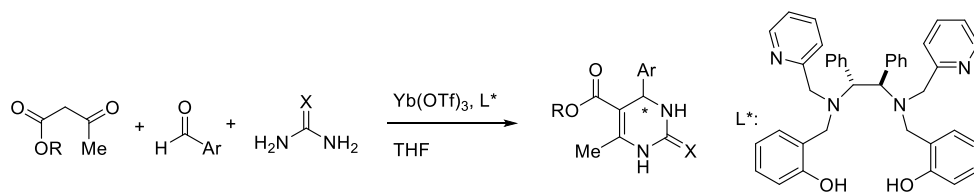
Šema 27

Biđinelijeva reakcija se ne primenjuje često u totalnoj sintezi kompleksnih prirodnih proizvoda; najpoznatiji primer je prva totalna sinteza bacheladina F (Cohen i Overman, 2001; šema 28). Intermedijerni bisgvanidin dobijen je Biđinelijevom reakcijom enantiomerno čistog β -keto estra sa derivatom gvanidina u prisustvu morfolinijum-acetata. Preostali koraci sinteze bili su mezilovanje alkoholne funkcionalne grupe, intramolekulska $\text{S}_{\text{N}}2$ reakcija i katalitička hidrogenizacija (Kurti i Czako, 2005).



Šema 28

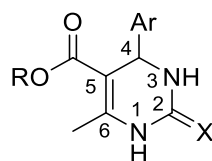
Važan događaj za hemiju dihidropirimidinona bilo je otkriće prve asimetrične Bidinelijske reakcije 2005. godine (Huang et al., 2005; šema 29). Korišćenjem hiralnog iterbijumovog katalizatora dobijeni su Bidinelijski proizvodi u odličnim prinosima i sa odličnom enantioselektivnošću.



Šema 29

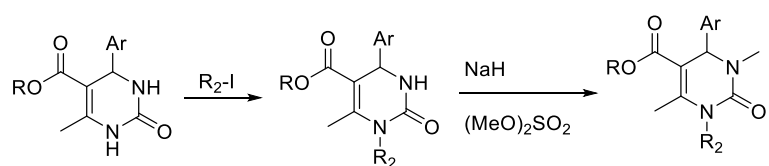
2.9.3. Reakcije dihidropirimidinona

Svaki od šest atoma DHPM prstena (šema 30) moguće je funkcionalizovati što značajno doprinosi diverzifikaciji dihidropirimidinona. Ovde ćemo navesti neke od reakcija koje se koriste za modifikaciju DHPM jezgra.



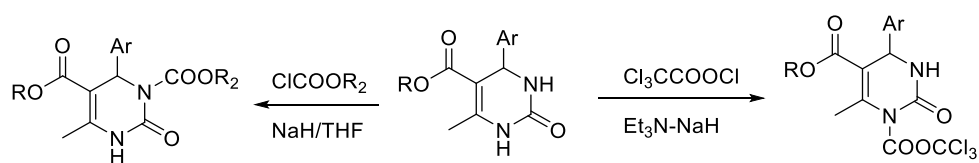
Šema 30

Reakcije na N-1. Poznato je da se vodonik vezan za N-1 azot, usled prisustva konjugovanog enamino estarskog fragmenta, može lako deprotonovati. Halogen na metil grupi vezanoj za C-6 dodatno povećava kiselost ovog protona, tako da se C-6 brommetil i C-6 dibrommetil derivati mogu metilovati dejstvom dimetil-sulfata (uz NaOH) već na sobnoj temperaturi (Zigeuner et al., 1966). Upotrebom jače baze (dimetil sulfat/NaH), moguće je alkilovati i N-3 položaj (Kappe et al., 1992).



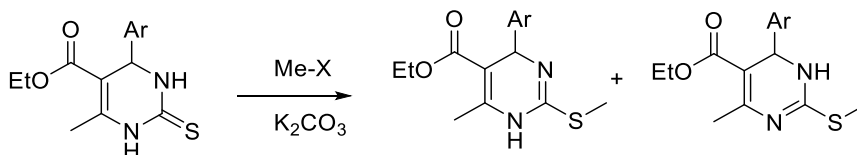
Šema 31

Interesantna je regioselektivnost alkoksikarbonilacije DHPM-a. Dejstvom poluestra fozgena u prisustvu NaH supstitucija se vrši isključivo na N-3 atomu, dok se u reakciji sa trihlormetil analogom dobija N-1 supstituisani derivat (Cho et al., 1988, šema 32). Supstitucija aromatičnog jezgra vezanog za C-4 takođe ima uticaja na regioselektivnost – *ortho*-supstitucija favorizuje formiranje N-1 supstituisanog DHPM-a (Cho et al., 1988).



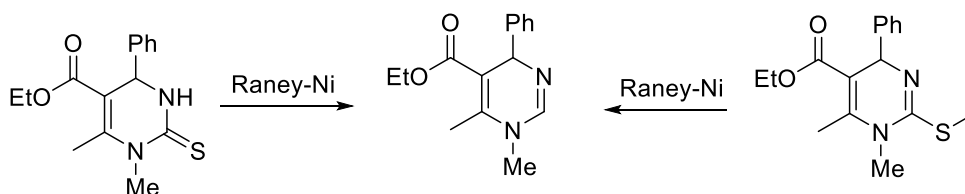
Šema 32

Reakcije na C-2. Atom sumpora (kod jedinjenje dobijenih iz tiouree) se lako alkiluje alkil-halogenidima u prisustvu slabe baze (Nishimura et al., 2011) pri čemu se dobija smeša estara 1,4- i 1,6-dihidropirimidinon-5-karboksilne kiseline (šema 33).



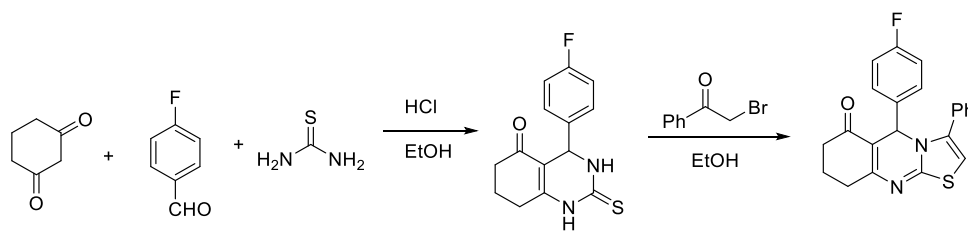
Šema 33

C-2 nesupstituisani 1,4-dihidropirimidini se mogu dobiti reduktivnom desulfurizacijom Bidinelijevog proizvoda ili njegovog S-metilovanog derivata (Khanina et al., 1986, šema 34):



Šema 34

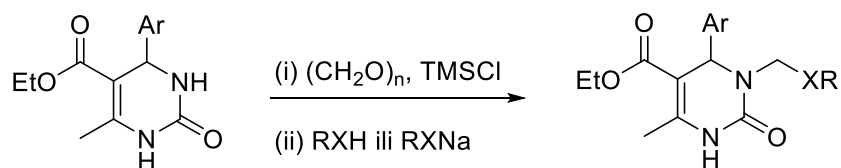
DHPM jezgro može da se transformiše u tiazolo[3,2-*a*]pirimidine pomoću α -halogen derivata. Na primer, *Ghorab* (2000) je sa svojim saradnicima iskoristio ovu reakciju za sintezu serije potencijalnih antifungalnih agenasa (šema 35):



Šema 35

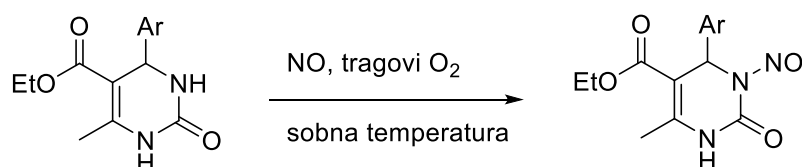
Reakcije na N-3. N-3 supstituisani alkoksimetil, aminometil, arilsulfonilmetil i azidometil derivati mogu se regioselektivno dobiti *one-pot* reakcijom dihidropirimidona sa paraformaldehydom,

hlortrimetilsilanom i odgovarajućim nukleofilom (alkoholom, aminom, natrijum-benzensulfinitom ili natrijum-azidom, Zhang, 2010):



Šema 36

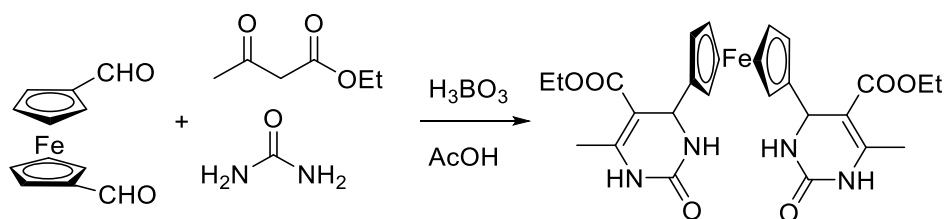
N-3 nitrozovanje Biđinelijevih jedinjenja azot(II)-oksidom daje nitrozamide nukleofilnim napadom N-3 atoma na *in situ* formirani N_2O_3 u prisustvu aprotičnih polarnih rastvarača:



Šema 37

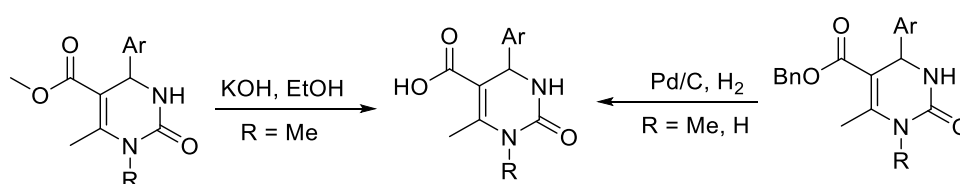
Reakcije na C-4. Od tri komponente koje učestvuju i Biđinelijevoj reakciji u literaturi je najviše variran identitet upotrebljenog aldehida. Veći prinosi dobijaju se sa aromatičnim aldehydima koji u položajima 3- i 4- imaju elektron-akceptorske grupe. Kondenzacija alifatičnih aldehida retko se koristi jer obično daje niske prinose i veliki broj sporednih proizvoda (Singh i Singh, 2012).

Serijski ferocenskih dihidropirimidinona sintetisana je Biđinelijevom reakcijom formil- ili 1,1'-diformilferocena, etil-acetoacetata i uree uz katalizu bornom kiselinom (Csampai et al., 2009):



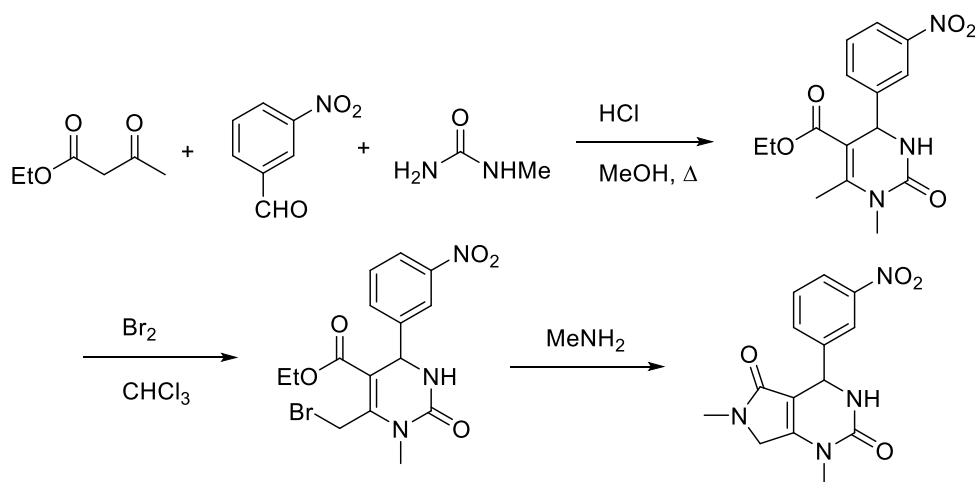
Šema 38

Reakcije na C-5. Estarska grupa vezana za C-5 ugljenik je vrlo otporna na hidrolizu ili napad nukleofila kod N-1 nesupstituisanih jedinjenja, dok se N-1 metil derivati lako hidrolizuju 5%-im rastvorom KOH (Singh i Singh, 2012). Nereaktivnost estra objašnjava se delokalizacijom elektronskog para sa N-1 azota (što potvrđuje i činjenica da se estri heksahidropirimidin karboksilnih kiselina lako saponifikuju, Folkers i Johnson, 1993). Kiseliniski derivat dihidropirimidinona može se dobiti i hidrogenolizom odgovarajućeg benzil estra:



Šema 39

Reakcije na C-6. Namazi i saradnici (2001) su iskoristili DHPM jezgro za sintezu pirolo[3,4-*d*]pirimidina (Li, 2005). Najpre je Biđinelijev proizvod (sintetisan u prinosu od 60%) bromovan (sa visokim prinosom), a zatim je supstitucijom broma i ciklizacijom intermedijernog amino estra dobijen odgovarajući pirolo[3,4-*d*]pirimidin u prinosu od 53%.



Šema 40

2.10. Redukcije organskih jedinjenja litijum-aluminijumhidridom

Litijum-aluminijumhidrid (LiAlH_4 , LAH) je jedan od dva najčešće korišćena hidridna redukciona sredstva u organskoj hemiji (natrijum-borhidrid je drugi). LiAlH_4 su prvi sintetisali *Finholt, Bond i Schlesinger* (1947). Preparativno se dobija reakcijom litijum-hidrida i aluminijum-hlorida. Korišćenjem viška aluminijum-hlorida dobija se alan (aluminijum-hidrid, Hudlicky, 1984). Zamenom vodonika iz LAH alkil ili alkoksi grupom dobijaju se novi redukcionni agensi sa izmenjenom redukcionom sposobnošću i hemoselektivnošću (na primer, litijum-trimetoksi- i trietoksihidrid; litijum-tri-*t*-butoksihidrid, itd.). Litijum-aluminijumhidrid je jedno od najjačih redukcionih sredstava za supstrate sa polarizabilnim funkcionalnim grupama (Smith, 2011).

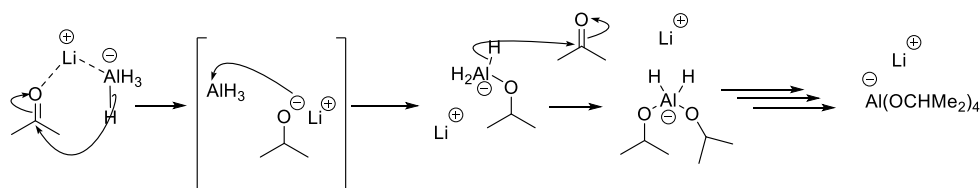
LAH je stabilan na sobnoj temperaturi; međutim, reakcija litijum-aluminijumhidrida i vode je izuzetno egzotermna i rukovanje ovim reagensom zahteva posebnu pažnju. Reakcije sa LAH se izvode pod anhidrovanim uslovima u rastvaračima koji ne sadrže kisele protone. Kontakt LiAlH_4 i malih količina vode ili vlage (na primer, iz nedovoljno osušenog laboratorijskog posuđa) može dovesti do eksplozije (Hudlicky, 1984).

Reakcije sa LiAlH_4 obično se izvode mešanjem dietil-etarskih rastvora/suspenzija. Rastvorljivost LAH u Et_2O je 35-40 g na 100 g etra. THF (rastvorljivost: 13 g/100 g) i dioksan (0,1 g/100 g) se takođe često koriste. Reagens se obično predstavlja kao $\text{Li}^+[\text{AlH}_4^-]$ i smatra se da u etru egzistira u vidu agregata solvatisanih litijumovih jona i tetrahidroaluminatnih jona (Smith, 2011).

2.10.1. Redukcija karbonilnih jedinjenja

Litijum-aluminijumhidrid vrlo lako i brzo redukuje većinu karbonilnih jedinjenja: aldehide i ketone, estre, laktone, amide, laktame, anhidride kiseline i karboksilne kiseline (Hudlicky, 1984). Većina redukcija karbonilnih jedinjenja pomoću LiAlH_4 se sastoji iz sledećih koraka (Šema 10): 1) koordinacije Li^+ za karbonilni kiseonik, 2) transfera nukleofilnog hidrida na elektrofilnu $\text{C}=\text{O}$ grupu, 3) formiranja alkoksialuminatnog

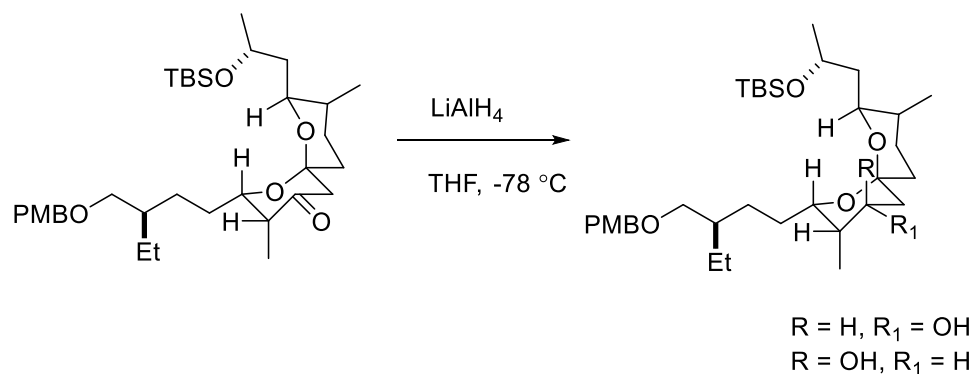
intermedijera koji sadrži još tri aktivna hidrida i može (formalno) da reaguje sa još tri ekvivalenta karbonilnih jedinjenja.



Međutim, svaki naredni korak redukcije odvija se sporije od prethodnog; ovo se može iskoristiti za dobijanje modifikovanih reageasa koji su manje reaktivni, ali i selektivniji u odnosu na litijum-aluminijumhidrid (Carruthers i Coldham, 2004). Tačan stehiometrijski odnos u kom reaguju LAH i karbonilno jedinjenje zavisi od strukture supstrata i teško ga je predvideti (na primer, 1 mol acetona reaguje sa 0,25 mol LAH, sterno zaštićeniji diizopropil-ke-ton i LAH reaguju u približnom odnosu 1 : 0,5, Smith (2011)). Generalno, da bi bili sigurni da je dodato dovoljno redukcionog sredstva, koristi se najmanje jedan ekvivalent LAH (to jest, četiri ekvivalenta hidrida) za svaki stepen redukcije funkcionalne grupe.

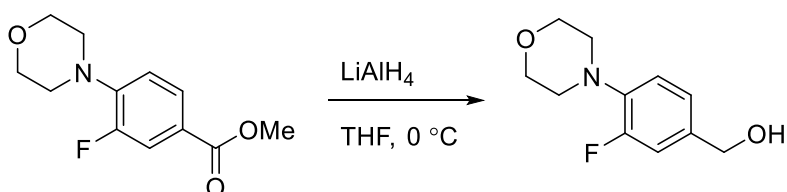
2.10.2. Primeri redukcije litijum-aluminijumhidridom u organskoj sintezi

Redukcija ketona. Evans i saradnici (1990) su iskoristili redukciju litijum-aluminijumhidridom za sintezu poznatog degradacionog proizvoda rutamicina. Dobijeno je 55% ekvatorijalnog i 45% aksijalnog alkohola (ukupan prinos redukcije: 90%, šema 41). Reakciona smeša obrađena je zasićenim rastvorom natrijum-kalijum-tartarata (Rošelova so).



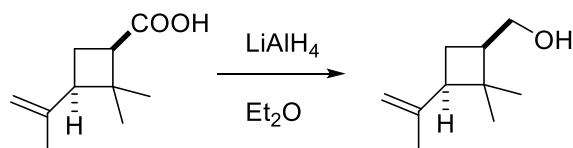
Šema 41

Redukcija estara. Redukcijom estara (RCOOR_1) dobijaju se, dva alkohola, R_1OH i RCH_2OH . Redukcijom pomoću LiAlH_4 ne gubi se stereochemija α -ugljenika (Smith, 2011) Jedan od koraka sinteze novih antibakterijskih fenilizoksazolina (Barbachyn et al., 2003; šema 42) bila je kvantitativna redukcija dole prikazanog estra do odgovarajućeg benzil-alkohola. Višak LiAlH_4 je uništen tzv. Fajzerovom metodom: za x grama LiAlH_4 koji se doda u reakcionu smešu, prilikom obrade (pažljivo, na $0\text{ }^\circ\text{C}$) dodaje se x ml vode, zatim x ml 15%-og rastvora NaOH i još x ml vode. Dobijeni talog aluminijumovih soli se lako uklanja ceđenjem (Li et al., 2007).



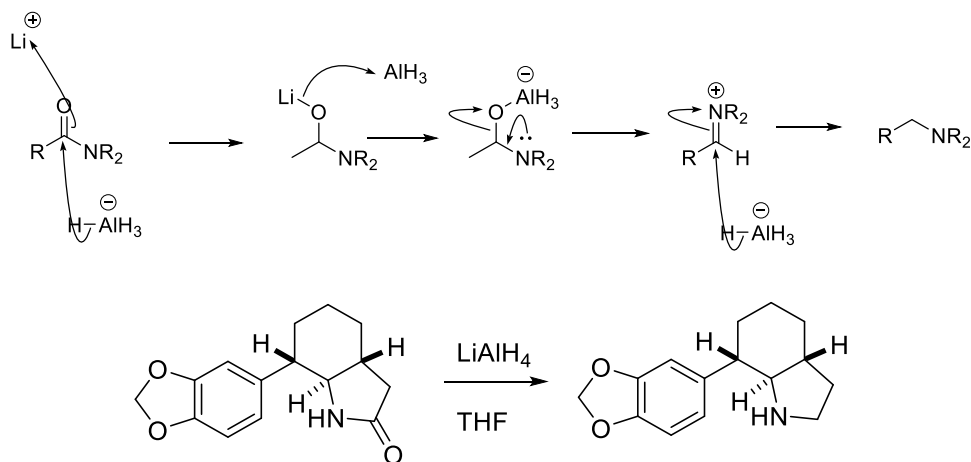
Šema 42

Redukcija karboksilnih kiselina. Redukcija karboksilne kiseline zahteva prisustvo najmanje tri hidridna ekvivalenta (prvi ekvivalent deprotonuje kiselinu, zatim se dva ekvivalenta troše za redukciju karboksilata do alkoksialuminata koji hidrolizom daje alkohol). Prilikom sinteze seksualnog feromona štitaste vaši *Planococcus citri*, prikazana kiselina je redukovana do odgovarajućeg alkohola pomoću LiAlH_4 (Passaro i Webster, 2004; Smith, 2011; šema 43):



Šema 43

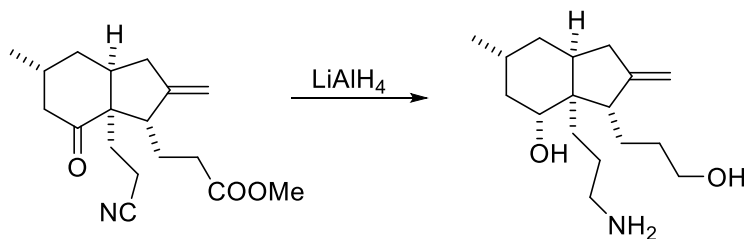
Redukcija amida. Redukcijom amida najpre se dobija α -aminoalkohol; eliminacijom alkoksialuminata dobija se intermedijerni iminijum jon (šema 44) koji se dalje redukuje do amina.



Šema 44

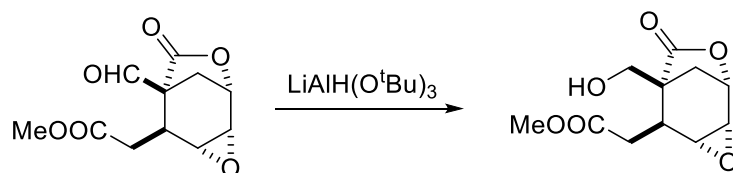
Laktami se redukuju do cikličnih amina. Prilikom totalne sinteze α - i β -likorana (Yasuhara et al., 2003), prikazani oktahidroindolon je redukovan do oktahidroindola u visokom prinosu (98%, šema 44).

LiAlH_4 je jak redukциони agens koji redukuje veliki broj karbonilnih i nekarbonilnih heterofunkcionalnih grupa (epokside, ozonide, nitrile, azide, alkil-halogenide, itd; videti knjige *Hudlicky* (1984) i *Smith* (2011)). Selektivna redukcija jedne funkcionalne grupe u prisustvu druge najčešće nije moguća litijum-aluminijumhidridom; na primer redukcijom LiAlH_4 prikazanog višefunkcionalnog jedinjenja na $-78\text{ }^\circ\text{C}$ (supstrat sadrži keton, cijano- i estarsku grupu, Heatcock et al., 1989; šema 45) redukuju se sve tri funkcionalne grupe (Smith, 2011).



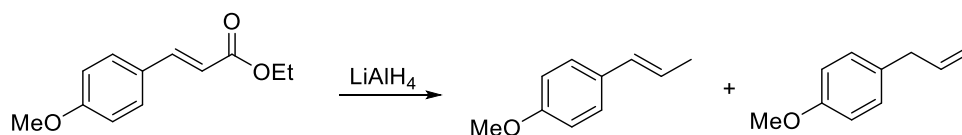
Šema 45

LiAlH₄ može da se iskoristi za dobijanje selektivnijih redukcionih sredstvava (tretiranjem alkoholima ili aluminijum-hloridom, Carruthers i Coldham, 2004). Na primer, litijum-tri-*t*-butoksialuminijumhidrid redukuje selektivno aldehide i ketone u prisustvu epoksida i estarske funkcionalne grupe (Carruthers i Coldham, 2004; šema 47).



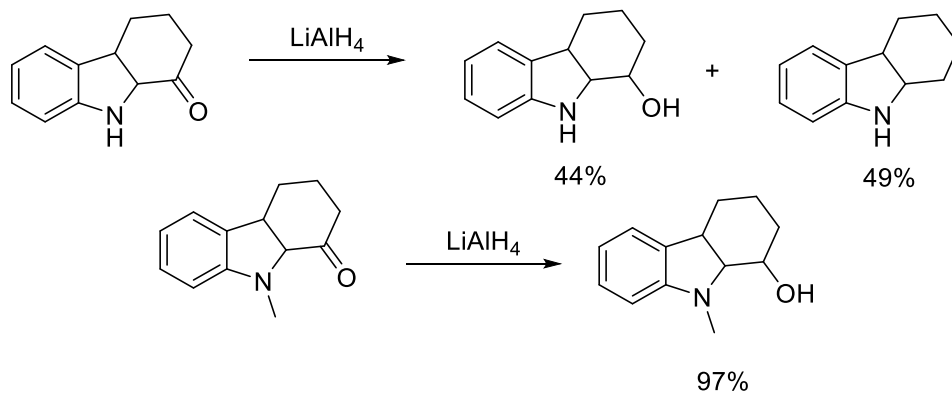
Šema 46

Reakcije hidrogenolize. Redukcija aromatičnih ketona do ugljovodonika može da se vrši hidridnim transferom kada je karbonilna grupa vezana direktno za aromatično jezgro (Hudlicky, 1984). Interesantan je i primer redukcije etil-4-metoksicinamata do alkena (šema 47) dejstvom LiAlH₄/AlCl₃. Stabilizacija intermedijernog karbokacijona je od presudne važnosti za ishod reakcije jer nije moguće hidrogenolizovati etil-cinamat pri istim uslovima (Butler i Perkins, 1974).



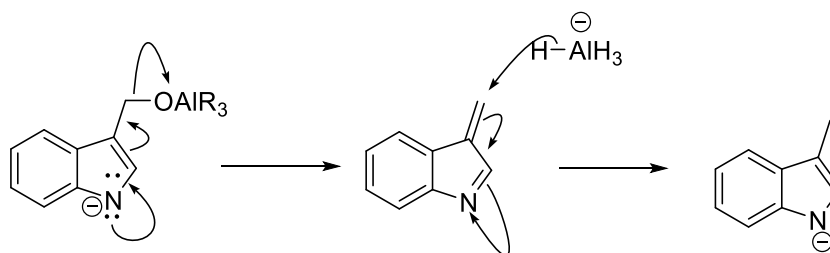
Šema 47

Kiseonične funkcionalne grupe vezane za C-2 atom indolovog prstena su naročito osetljive na hidrogenolizu – značajan deo proizvoda redukcije (49%) prikazanog heksahidrokarbazolona proizvod je hidrogenolize. *N*-metilovani derivat ovog jedinjenja je, međutim, otporan na hidrogenolizu (Sundberg, 1970; šema 48).



Šema 48

Leete i Marion (1953) su pokazali da se 3-hidroksimetilindol (očekivani proizvod redukcije 3-formilindola) redukuje dejstvom LiAlH_4 do 3-metilindola. Pretpostavlja se da se ova redukcija sastoji iz koraka eliminacije aluminata (podstaknute slobodnim elektronskim parom sa deprotonovanog azota) i konjugovane adicije hidrida na nastali intermedijer (šema 49).



Šema 49

2.11. Modeli za ispitivanje farmakološke/toksikološke aktivnosti

2.11.1. Ispitivanje akutne toksičnosti pomoću račića *Artemia salina*

Artemia salina (Artemiidae) je vrsta račića koja naseljava slana jezera. Ova vrsta može da toleriše izuzetno visok nivo saliniteta – preko 300 promila (300 g/L), što predstavlja uslove u kojima većina drugih životinjskih vrsta ne može da preživi. Usled odsustva predatora *Artemia* gradi guste populacije.

Test toksičnosti za račiće *A. salina*, prvi je razvio *Michael* sa saradnicima (1956), a standardizovan je 1981. (Vanhaecke et al.). *Artemia salina* se zadnjih 30 godina često koristi kao modelni organizam u toksikološkim studijama, iako se ova vrsta, usled svoje otpornosti, ne smatra bioindikatorom (Dokey i Tonkins, 2009). Ovaj test je do sada, korišćen za određivanje toksičnosti, između ostalog, biljnih ekstrakata (Meyer et al., 1982; Moshi et al., 2010; Sharma et al., 2013; da Costa et al., 2010; Parra et al., 2010), teških metala (Martinez et al., 1999), morskih prirodnih proizvoda (Carballo et al., 2002) i nanočestica (Ates et al., 2013). *Parra* i saradnici (2001) su pokazali (u testovima ispitivanja toksičnosti dvadeset biljnih ekstrakata) da postoji visok stepen korelacije LD₅₀ vrednosti za *A. salina* i LD₅₀ vrednosti za akutnu oralnu toksičnost kod miševa.

S obzirom da je farmakologija „toksikologija pri nižim dozama“, to jest, da toksične supstance pri nižim, netoksičnim dozama, često imaju zanimljiva farmakološka dejstva, test toksičnosti na *A. salina* se koristi i kao preliminarni skrining prilikom razvijanja novih farmakološki aktivnih jedinjenja (Bohlin i Bruhn, 1999). Osim činjenice da je korišćenje *A. salina* prihvatljiva alternativa korišćenju sisara u toksikološkim ispitivanjima, postoje i druge prednosti ovog testa (Hamidi et al., 2014): 1) brzina (LD₅₀ vrednosti se dobijaju već nakon 24 h), 2) jednostavnost (nije potrebna posebna prethodna obuka eksperimentatora), 3) visok stepen repetabilnosti (Vanhaecke et al., 1981) i 4) mala količina jedinjenja/ekstrakta potrebna za testiranje.

2.11.2. Makrofagi i aktivnost mijeloperoksidaze

Makrofagi predstavljaju heterogenu populaciju mononuklearnih fagocita prisutnih u većini tkiva organizma. Oni imaju ključnu ulogu u regulaciji i izvršavanju mnogih homeostatskih, imunoloških i inflamatornih procesa (Mosser, 2003; Stout i Suttles, 2004; Kim et al., 2012). Makrofagi tkiva su prva linija odbrane od patogenih mikroorganizama (pre migracije polimorfonuklearnih neutrofila i monocita). Glavne funkcije makrofaga su fagocitoza i razgradnja stranog materijala i regulacija proizvodnje inflamatornih medijatora, kao što su pro-inflamatorni citokini, prostaglandini i reaktivne kiseonične i azotne vrste. Ključni enzimi u proizvodnji kiseoničnih vrsta (kroz tzv. respiratornu ili oksidativnu eksploziju) su NADPH-oksidaza i mijeloperoksidaza (MPO). Prethodna istraživanja su pokazala da MPO ima antimikrobni i citotoksični efekat (Klebanoff, 1968; Edelson i Cohn, 1973). MPO reaguje sa vodonik-peroksidom (H_2O_2), nastalim u respiratornoj eksploziji, čime se formira kompleks koji može da oksiduje veliki broj supstanci. Jedna od njih je i hloridni jon koji se oksiduje do hipohlorita, od koga dalje nastaju hlor i hloramini. Ovi proizvodi (koji predstavljaju jaka oksidaciona sredstva) imaju važnu ulogu u odbrani domaćina od bakterija, virusa i gljivica. Međutim, oksidacione osobine MPO možda doprinose inicijaciji tumora s obzirom da je poznato da aktivnost MPO može da izazove oštećenje DNK (Van Rensburg et al., 1992). Naime, neutrofil i makrofagi, koji proizvode MPO, infiltriraju tumore, tako da je ovaj enzim koristan marker infiltracije fagocita kod premalignih i neoplastičnih lezija. Makrofage su i profesionalne antigen-predstavjuće ćelije i imaju važnu ulogu u aktivaciji T limfocita i regulaciji imunskog odgovora (Pozzi et al., 2005).

2.11.3. Acetilholinesteraza

Acetilholinesteraza (AChE) je enzim koji hidrolizuje acetilholin u neuromuskulatornim sinapsama, kao i holinergičnim sinapsama u mozgu (Lionetto et al., 2013). Aktivnost AChE kontroliše prenos nervnih impulsa i sprečava konstantnu aktivaciju postsinaptičkih holinergičnih receptora. Ovaj enzim ima ogroman značaj u održavanju normalne funkcije

celokupnog nervnog sistema (Taylor i Radić, 1994). Inhibitori AChE inhibiraju hidrolizu acetilholina i time dovode do povećanja nivoa i trajanja dejstva neurotransmitera. Inhibitori AChE mogu da se podele u dve grupe: reverzibilni (kompetitivni i nekompetitivni), koji imaju terapeutsku primenu, i ireverzibilni, kojima se pripisuju toksični efekti (Čolović et al., 2013).

Deficit centralne holinergetične funkcije je važan činilac nastanka kognitivne disfunkcije prilikom starenja, ali i kod Alchajmerove bolesti. Alchajmerovu bolest karakteriše gubitak memorije i drugih intelektualnih sposobnosti koje dovode do značajnog smanjenja kvaliteta života. Aktivnost holin-acetiltransferaze je značajno smanjena kod pacijenata obolelih od Alchajmerove bolesti. Lek za Alchajmerovu bolest ne postoji, ali terapija reverzibilnim inhibitorima AChE dovodi do ublažavanja simptoma (poboljšanje memorije, razmišljanja, govornih sposobnosti i drugih misaonih procesa). Korišćenjem inhibitora acetilholinesteraze, poput fizostigmina, održava se nivo ACh (kroz smanjenje brzine njegove hidrolize), time se podstiče neurotransmisija u regionu prednjeg mozga i kompenzuje gubitak funkcije moždanih ćelija (Čolović et al., 2013).

2.11.4. Nocicepcija i bol

Pojmovi nocicepcija i bol su blisko povezani, ali ne i ekvivalentni. Međunarodno udruženje za proučavanje bola (*International Association for the Study of Pain*, IASP) definiše bol kao: „neprijatno emocionalno i osećajno iskustvo povezano sa pravom ili potencijalnom povredom tkiva, ili uzrokovano tim oštećenjem ili povredom“. Nocicepcija se definiše kao prenos i procesuiranje bolnih stimulusa u nervnom sistemu. Bolni stimulus (mehanički, termalni ili hemijski) aktivira nociceptore prisutne u perifernim strukturama, informacija se prenosi do dorzalnog roga kičmene moždine, a odatle ide do cerebralnog korteksa gde se stvara osećaj bola.

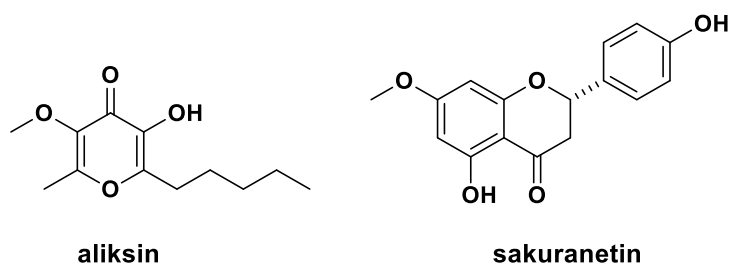
Bol je, dakle, uslovljen funkcijom viših moždanih centara, dok nocicepcija može da se javi i u odsustvu bola. Na primer, kičmena moždina osoba koje su pretrpele kompletno oštećenje (to jest transekciju) kičmene moždine i dalje može da procesuirati informacije koje dobija od nociceptora, ali bol

izostaje jer ova informacija ne može da se prenese dalje (Radulović et al., 2013a).

2.11.5. Antimikrobna aktivnost sekundarnih metabolita biljaka

Sekundarni metaboliti predstavljaju grupu jedinjenja koja ne učestvuje direktno u rastu i razvoju biljke, ali ima važnu ulogu u mehanizmima adaptacije i preživljavanja. Dugo je bilo ustaljeno mišljenje da su ova jedinjenja beznačajni „otpadni proizvodi“, ali je njihova višestruka funkcija (na primer, u privlačenju insekata koji obavljaju polinaciju; u zaštiti od biljojeda i mikroba i sl.) dokaz da njihova biosinteza nije aberacija već da je genetski kontrolisani mehanizam (Daniel, 2005). Svaka biljna vrsta je specijalizovana za proizvodnju jedne ili više grupa jedinjenja koja im pomažu u preživljavanju. Tri glavne klase sekundarnih metabolita su terpenoidi, alkaloidi i fenilpropanoidi i srodna fenolna jedinjenja (Radulović et al., 2013b). Svaka od ovih klasa može dalje da se podeli u potklase, na primer, terpenoidi se dele (na mono-, seskvi-, diterpene itd.) na osnovu broja molekula izopentenil-difosfata koji učestvuju u biosintezi. Dalja podela se vrši po tipu ugljeničnog skeleta (do sada, npr., postoji 147 seskviterpenskih i 118 diterpenskih skeletnih tipova). Prisustvo ili odsustvo specifičnih funkcionalnih grupa dalje doprinose diverzitetu jedinjenja iz svake od ovih potklasa.

Antimikrobna jedinjenja iz biljaka mogu da se podele u dve kategorije: fitoanticipini, jedinjenja koja su prisutna u biljci pre napada mikroorganizama, ili koja se proizvode iz već prisutnih prekursora, i fitoaleksini koji se sintetišu i akumuliraju u biljci nakon izlaganja mikroorganizmima (Slusarenko et al., 1985). U grupu fitoanticipina spadaju i glukozinolati, o kojima je već bilo govora u ovoj disertaciji. U fitoaleksine spadaju aliksin, izolovan iz belog luka (*Allium sativum*) i flavonoid sakuranetin (Kodama, 1992), šema 50.



Šema 50

Sekundarni metaboliti mogu da deluju na ćeliju mikroorganizma na nekoliko različitih načina: preko narušavanja strukture i funkcije membrane, prekida sinteze DNK i RNK, ometanja metabolizma intermedijera, izazivanja koagulacije sastojaka citoplazme i prekida normalne ćelijske komunikacije (Radulović et al., 2013b). Antimikrobna aktivnost većine prirodnih proizvoda ispoljava se kroz delovanje na citoplazmatsku membranu. Sekundarni metaboliti mogu da utiču na permeabilnost i funkciju membrane na više načina. Na primer, neki antifungalni agensi (saponini) deluju na metabolizam ergosterola koji učestvuje u održavanju integriteta i fluidnosti membrane i regulaciju enzima koji su neophodni za rast i deobu ćelija (Radulović et al., 2013b). Karvakrol, sa druge strane, interaguje sa citoplazmatskom membranom tako što se smešta između acilnih lanaca fosfolipida, i na taj način dovodi do povećanja permeabilnosti i narušavanja potencijala membrane i gradijenta pH. Pokazano je da antimikrobno dejstvo sekundarnih metabolita generalno raste sa njihovom lipofilnošću, što je direktno povezano sa sposobnošću ovih molekula da interaguju sa membranom.

2.11.6. Citotoksičnost jedinjenja prirodnog porekla

Po podacima Svetske zdravstvene organizacije kancer je vodeći uzročnik smrti u svetu. U 2012. godini je zabeleženo 14,1 milion novih slučajeva kancera sa 8,2 miliona smrtnih slučajeva (14,6% od ukupnog broja obolelih) (WHO, 2014). Najčešći tipovi kancera kod muškaraca su rak pluća, prostate i želuca, dok se kod žena najčešće javljaju rak dojke, rak pluća i rak grlića materice (WHO, 2014).

Kancer se sastoji od grupe ćelija koje su izgubile sposobnost da regulišu rast ili ćelijsku smrt. Sve tumorske ćelije pokazuju šest karakterističnih znakova (Hanahan i Weinberg, 2000).

- 1) Rast i deoba ćelija čak i u odsustvu stimulacije od strane spoljnih signala;
- 2) Kontinuirani rast i deoba i po dobijanju signala za prestanak rasta;
- 3) Izbegavanje programirane ćelijske smrti⁴;
- 4) Neograničeni potencijal za deobu (zdrave ćelije umiru nakon određenog broja podela, ćelije raka su, u tom smislu, besmrtno);
- 5) Izražena angiogeneza (proces formiranja novih krvnih sudova koji snabdevaju ćelije raka kiseonikom i nutrijentima);
- 6) Širenje na okolna tkiva i metastaziranje.

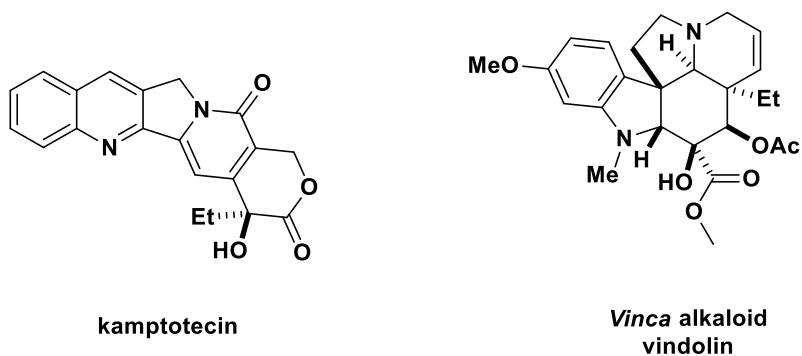
Uobičajeno je da se za lečenje kancera koristi više terapija (kombinacija hemoterapije, hiruškog zahvata i/ili radioterapije). Hemoterapija podrazumeva korišćenje jednog ili više antikancer agenasa. Prvi hemoterapeutici otkriveni su 40-ih godina prošlog veka kada je primećeno da bojni otrov iperit suzbija hematopoezu (proizvodnju krvi). Decembra 1942. nekoliko pacijenata sa uznapredovalim limfomom je intravenski tretirano azotnim iperitom i tom prilikom je uočeno drastično (ali samo privremeno) poboljšanje njihovog stanja (Fenn i Udelsman, 2011).

Danas se koristi veliki broj hemoterapeutika, međutim, najveći broj ovih jedinjenja nije dovoljno specifičan prema ćelijama tumora i dovodi do oštećenja normalnog tkiva i sporednih efekata. Da bi se postigli najbolji rezultati obično se koristi kombinacija hemoterapeutika različitog mehanizma dejstva (Chabner i Roberts, 2005).

Veliki broj citotoksičnih agenasa koji se danas klinički koriste su prirodnog porekla ili su izvedeni iz prirodnih proizvoda. Na primer, irinotekan (koji se prodaje pod zaštićenim imenom *Camptosar*; koristi se u lečenju

⁴ Za razliku od nekroze, koja predstavlja traumatsku smrt ćelije koja nastaje kao rezultat akutne povrede ćelije, apoptoza (ili programirana ćelijska smrt) je regulisan i kontrolisan proces. Za razliku od nekroze, ćelijski fragmenti koji nastaju prilikom apoptoze se uklanjaju (gutanjem od strane fagocita ćelija) pre nego što dospeju do susednih ćelija i izazovu njihovo oštećenje.

kolonorektalnog kancera), derivat je prirodnog proizvoda kamptotecina (šema 51), izolovanog iz kore drveta *Camptotheca acuminata* (Schwarz et al., 2007). Taksani (na primer, kabazitaksel, koji se u kombinaciji sa prednizonom koristi za lečenje kancera prostate) izolovani su iz kalifornijske tise, (*Taxus brevifolia*). *Vinca* alkaloidi (šema 51) su antimitotički i antimikrotubularni agensi izolovani iz vrste *Catharanthus roseus*.



Šema 51

3. EKSPERIMENTALNI DEO

3.1. Hemikalije i rastvarači

Neposredno pre korišćenja, svi rastvarači (dietil-etar, dihlormetan, heksan, aceton, etil-acetat) su destilovani, dok su ostale hemikalije korišćene bez prethodnog prečišćavanja. Korišćene su komercijalne supstance sledećih proizvođača: Alfa Aesar (Vord Hil, Masačusec, SAD), Sigma-Aldrich (Sent Luis, Mizuri, SAD), Carl Roth (Karlsruhe, Nemačka), Fluka (Noj-Ulm, Nemačka), Galenika (Beograd, Srbija), Hoffmann La Roche (Bazel, Švajcarska) i Zdravlje (Leskovac, Srbija).

3.2. Biljni materijal i priprema uzoraka za analizu

3.2.1. Biljni materijal

Biljni materijal je sakupljen na teritoriji nekoliko zemalja (Srbija, Iran, Nemačka, Portugalija, Španija i Grčka). Nadzemni deo biljne vrste *Ferula ovina* (Boiss.) Boiss. (Apiaceae) je sakupljen sa prirodnog staništa na nadmorskoj visini od 1650 m, 12. juna 2011. u regiji Sabzevar, na severoistoku Irana. Materijal vrste *Reseda lutea* L. (Resedaceae) sakupljen je na teritoriji opštine Niš, 12. juna 2013. Cvetovi vrste *Heracleum sphondylium* L. (Apiaceae) su sakupljeni tokom avgusta 2011. godine sa ukupno 14 lokacija: korišćen je *H. sphondylium* sa teritorije opštine Niš (sa prirodnih staništa nezagađene oblasti Suve planine, kao i zagađenih urbanih delova Niša), Barselone (Španija), Lisabona (Portugal), Soluna (Grčka) i Drezdena (Nemačka). Cvetovi biljne vrste *Daucus carota* L. (Apiaceae) sakupljeni su na više lokacija na teritoriji opštine Niš tokom jula 2015. godine. Biljni materijal *Geranium macrorrhizum* L. (Geraniaceae) je sakupljen u septembru 2011. na severnim padinama Vlasinske visoravni. Herbarski primerici deponovani su u herbarijumu Prirodno-matematičkog fakulteta u Nišu, Laboratorija za organsku analizu i sintezu (NR0072011–NR0202011; DZ0052013).

3.2.2. Dobijanje etarskih ulja

Biljni materijal (nadzemni delovi biljnih vrsta *F. ovina* i *G. macrorrhizum*) je osušen na vazduhu do konstantne mase i hidrodestilovan sa oko 3 L vode, oko 2,5 sata, korišćenjem aparature po Klevendžeru (Radulović et al., 2009). Dobijena ulja su razdvojena od vode ekstrakcijom pomoću dietil-

etra, a zatim osušena magnezijum-sulfatom i odmah analizirana. Prinosi dobijenih ulja (w/w): 0,18% (*G. macrorrhizum*) i 1,5% (*F. ovina*).

3.2.3. Autoliza glukozinolata

Eksperimenti autolize su izvedeni kao što je opisano u radu Radulović i saradnika (2011). Sveži delovi biljne vrste *R. lutea* (cvetovi, koren i plodovi; po 25 g; svaki eksperiment je ponovljen tri puta) homogenizovani su sa dovoljnom količinom destilovane vode da se dobije polutečna konzistencija smeše. Svakom uzorku je dodat dietil-etar (100 ml) i dvofazni sistem je, nakon zatvaranja staklenih posuda, mešan na 20 obrtaja u minutu tokom 8 h. Nakon završene hidrolize dodat je NaCl, a organski sloj je zatim odvojen od izoljenog vodenog sloja ceđenjem kroz Whatman No. 1 filter papir. Ostatak biljne mase ekstrahovan je još dva puta sa po 50 ml dietil-etra. Spojeni organski slojevi su osušeni anhidrovanim magnezijum-sulfatom. Nakon odvajanja sredstva za sušenje, rastvarač je uklonjen destilacijom na sobnoj temperaturi pomoću rotacionog vakuum uparivača. Prinosi su bili sledeći: koren – 0,29%, cvet – 2,43%, plod – 0,044% (w/w).

3.2.4. Ekstrakcija voska sa cvetova

Vosak sa cvetova biljne vrste *H. sphondylium* ispran je uranjanjem svežih cvetova u dihlormetan i istovremenim izlaganjem ultrazvuku tokom deset sekundi (izbegavan je svaki suvišan kontakt sa cvetovima). Ispirak (dobijen od 20 štitova cvetova ispranih u 200 ml dihlormetana, ukupno 10 serija) je filtriran kroz 0,2 µm Whatman Puradisc filter (Whatman, Maidstone, Kent, UK) kako bi se otklonio nerastvorni materijal, zatim je osušen anhidrovanim magnezijum-sulfatom i ukoncentrovan na vakuum-uparivaču. Pomoću GC-MS-a analiziran je i rastvarač (ukoncentrovani dihlormetan) koji je prošao kroz sve korake analize (osim kontakta sa biljnim materijalom), kako bi se uverili da nije bilo kontaminacije.

3.2.5. Ekstrakcija cvetova *D. carota* dietil-etrom

Osušen biljni materijal (500 g cvetova) ekstrahovan je dietil-etrom tokom 7 dana. Nakon odvajanja biljnog materijala ceđenjem, ekstrakt je osušen anhidrovanim magnezijum-sulfatom, a zatim je rastvarač uklonjen

destilacijom na rotacionom uparivaču na sobnoj temperaturi. Prinos: 1,6% (w/w). Jedinjenja 7-1 i 7-2 (po 15 mg) izolovana su iz uzorka mase 2,0 g MPLC-om (silika gel, etil-acetat/heksan 1:6 [v/v]). Spektralni podaci dva jedinjenja su se slagala sa publikovanim podacima (Schmiech et al., 2008).

3.3. Metode razdvajanja i analize

3.3.1. Gasna hromatografija – masena spektrometrija (GC-MS) i gasna hromatografija sa plameno-jonizacionom detekcijom (GC-FID)

Za analizu etarskih ulja, kao i reakcionih smeša, korišćen je GC-MS. Analize su izvedene korišćenjem Hewlett-Packard 6890N gasnog hromatografa koji je opremljen kapilarnom kolonom DB-5MS (5% fenilmetilsiloksana, 30 m x 0,25 mm, debljina filma 0,25 µm, Agilent Technologies, SAD), koji je bio direktno kuplovan sa 597B masenim detektorom iste kompanije. Jonizacija je vršena elektronima energije 70 eV. Pun sken masenog detektora beležen je u intervalu m/z 35-750 (brzina skeniranja – 5 skenova u sekundi), a vreme skeniranja je bilo 0,32 sekunde. Režim rada GC-MS-a bio je: temperature injektora i detektora su održavane na 250 i 320 °C; temperatura peći je programirana linearno od 70 do 315 °C (osim u slučaju derivata ferocena kada je opseg bio 150 – 315 °C) brzinom od 5 °C/min nakon čega je temperatura održavana na 315 °C tokom 10 min. Kao noseći gas korišćen je helijum, pri konstantnom protoku od 1,0 ml/min. Pulsno je injektirana zapremina od 1 µl ispitivanog uzorka (protok je bio 1,5 ml/min u prvih 30 sekundi, a zatim je podešen na 1 ml/min), razblažena 1/100 (w/v), splitovana u odnosu 40/1. Procentualni sastav pojedinih sastojaka je određen/procenjen samo na osnovu površine pikova, bez korišćenja korekcionih faktora.

Obrada rezultata vršena je pomoću MSD ChemStation softvera (ver. D.03.00.611, Agilent Technologies, SAD) u kombinaciji sa AMDIS (ver. 2.68) i NIST MS Search programskim paketima (ver. 2.0d, Nacionalni institut za standarde i tehnologiju, SAD). AMDIS je korišćen za dekonvoluciju (ekstrakciju masenih spektara iz skenova preklapljenih pikova), dok je NIST MS Search obezbedio algoritam za pretragu biblioteka masenih spektara. Korišćene su sledeće biblioteke: *Wiley*

Registry of Mass Spectral Data 11th Edition, *NIST/EPA/NIH Mass Spectral Library* 07, *MassFinder* 2.3, *Adams* (Adams, 2007) i biblioteke masenih spektara laboratorije za organsku analizu i sintezu, PMF-a u Nišu. Linearni retencioni indeksi svih sastojaka analiziranih uzoraka su određeni koinjekcijom uzorka sa homologom serijom *n*-alkana od C₇-C₃₇. Hemijski sastav uzoraka etarskih ulja je određen upoređivanjem linearnih retencionih indeksa sastojaka sa literaturnim vrednostima, kao i na osnovu poređenja masenih skenova jedinjenja sa spektrima jedinjenja iz biblioteka.

Gasna hromatografija sa plameno-jonizacionom detekcijom (GC-FID) je izvedena korišćenjem uređaja Agilent 7890A koji je bio opremljen plameno-jonizujućim detektorom i HP-5MS kolonom. Parametri FID detektora bili su: temperatura grejača 300 °C, protok vodonika 30 ml/min, protok vazduha 400 ml/min, protok azota (*make up gas*) 23,5 ml/min, frekvencija beleženja signala 20 Hz.

3.3.2. Tankoslojna hromatografija (TLC)

Analitička TLC je vršena na aluminijumskim pločama sa nanešenim slojem silika-gela 60 (Merck, Nemačka). Kao eluent korišćene su različite smeše heksana i dietil-etra, kao i heksana i etil-acetata. Mrlje na TLC-u su vizualizovane pomoću UV lampe (254 i 356 nm) i izazivane 30% H₂SO₄ (v/v) ili reagensom koji sadrži vanilin i sumpornu kiselinu (6% vanilina [w/v] i 1% H₂SO₄ [v/v] u etanolu), nakon čega su pločice zagrevane do pojave mrlja.

3.3.3. „Dry-column flash“ hromatografija

Za preparativno razdvajanje pomoću „dry-column flash“ hromatografije korišćena je jednostavna aparatura koja se sastojala od kolone silika-gela 60 (>230 mesh-a, Merck, Darmštad, Nemačka), napakovane na sinterovom staklenom levku srednje poroznosti i veličine, i standardne boce za vakuum filtraciju.

3.3.4. Tečna hromatografija pri srednjim pritiscima (MPLC)

Preparativno razdvajanje pomoću MPLC-a ostvareno je na Büchi instrumentu (Büchi, Labortechnik, Švajcarska), na napakovanoj koloni silika-gela 60, sa radnom pumpom istog proizvođača (Module C-601, pump controller C-610) pri protoku od 2,5 ml/min. Kao eluent korišćene su smeše heksan-dietil-etra ili heksan-etil-acetata.

3.3.5. Infracrvena spektroskopija (FTIR)

FT-ATR infracrveni spektri (FT = *Fourier*-ova transformacija, ATR = *attenuated total reflectance*) čistih supstanci snimani su na spektrofotometrima Thermo Nicolet, model 6700 (Waltham, SAD) i Perkin-Elmer FTIR 31725-X.

3.3.6. Nuklearno-magnetna rezonantna (NMR) spektroskopija

NMR spektri su snimani na tri instrumenta: Bruker Avance III 400 MHz (^1H na 400 MHz, ^{13}C na 100.6 MHz), Varian Unity 200 NMR (^1H na 200 MHz, ^{13}C na 50 MHz) i Bruker DMX 500 (500,26 MHz za ^1H , a 125,8 MHz za ^{13}C) na 25 °C u CDCl_3 , CD_3SOCD_3 , CD_3OD i CD_3CN koristeći tetrametilsilan (TMS) kao unutrašnji standard. Vrednosti hemijskih pomeranja za ^1H NMR spektre su date u δ (ppm) jedinicama u odnosu na TMS (δ 0,00), a za heteronuklearne 2D spektre u odnosu na signale rastvarača (rezidualni CHCl_3 : δ_{H} 7,26 i $^{13}\text{CDCl}_3$: δ_{C} 77,16 ; $\text{CHD}_2\text{SOCD}_3$: δ_{H} 2,50 i $^{13}\text{CD}_3\text{SOCD}_3$: δ_{C} 39,52; CHD_2OD : δ_{H} 4,87 i $^{13}\text{CD}_3\text{OD}$: δ_{C} 49,00; CHD_2CN : δ_{H} 1,94 i $\text{CD}_3^{13}\text{CN}$: δ_{C} 118,26). Skalarna kuplovanja (J) data su u Hz. 2D NMR spektri (^1H - ^1H COSY, NOESY, HSQC i HMBC) i višepulsni spektri (DEPT90 i DEPT135) su snimani uz primenu uobičajenih pulsnih sekvenci dostupnih u softveru instrumenta. Spektri su obrađivani MestreNova softverom (11.0.0.3, Mestrelab Research, A Coruña, Španija).

3.3.7. Rendgenska strukturalna analiza

Rendgenska strukturalna analiza je izvedena na Oxford Diffraction Xcalibur Sapphire3 Gemini difraktometru koristeći Cu $K\alpha$ zračenje ($\lambda = 1,5418 \text{ \AA}$) na sobnoj temperaturi. Podaci su obrađivani u CrysAlis softveru korišćenjem SCALE3 ABSPACK (Oxford Diffraction, 2008). Analiza

kristalne strukture je izvršena korišćenjem programa SHELXS i SHELXL. Svi H atomi su postavljeni na izračunate geometrijski definisane položaje sa konstantnim C-H rastojanjima od 0,93 Å kada je H-atom vezan za sp^2 -hibridizovan ugljenik, 0,96 Å kada je vezan za sp^3 hibridizovan ugljenik i 0,97 Å kada je H-atom vezan za sp^3 -hibridizovan ugljenik koji je vezan za sp^2 -hibridizovan ugljenik.

3.3.8. Ultraljubičasta (UV) spektroskopija

Ultraljubičasti spektri su snimani na aparatu UV-1800 Shimadzu koristeći acetonitril ili dimetil-sulfoksid kao rastvarač.

3.3.9. Elementna mikroanaliza

Elementna mikroanaliza ugljenika, vodonika i azota čistih jedinjenja je izvršena na Carlo Erba 1106 mikroanalizatoru i dobiveni rezultati su se dobro slagali sa predviđenim vrednostima.

3.3.10. Određivanje konstante kiselosti Biđinelijeovog jedinjenja dobijenog iz uree (jedinjenje **6-1**)

Konstanta kiselosti i izosbestička tačka jedinjenja **6-1** određene su pomoću UV spektrofotometrije na sobnoj temperaturi. Početni rastvor jedinjenja **6-1** pripremljen je rastvaranjem 10,0 mg jedinjenja **6-1** u 10 ml CH_3SOCH_3 , a zatim su pripremljena tri rastvora iste koncentracije jedinjenja **6-1** ($c = 1,63 \times 10^{-4}$ M) i to: Rastvor 1: 2,0 ml početnog rastvora razblaženo je do 50 ml rastvorom fosfatnog pufera (10 mM, pH 1,80, 0,1 M NaCl). Rastvor 2: 2,0 ml početnog rastvora razblaženo je do 50 ml rastvorom NaOH koncentracije 0,3 M; Rastvor 3: 2,0 ml početnog rastvora razblaženo je do 50 ml rastvorom NaOH koncentracije 5 M. Rastvori 1 i 3 iskorišćeni su za snimanje UV spektra rastvora u kom je prisutno samo jedinjenje **6-1** (rastvor 1) ili njegova konjugovana baza (rastvor 3). Rastvor 2 je titrovan rastvorom NaOH koncentracije 10 M, pH rastvora je konstantno meren tokom titracije, a UV spektri rastvora su snimani po uspostavljanju ravnoteže. pK_a vrednost je određena na osnovu jednačine: $pK_a = pH_i - \log[(A_{HA} - A_i)/(A_i - A_{A-})]$, gde je A_{HA} apsorbanca rastvora 1, A_{A-} apsorbanca rastvora 3, a A_i predstavlja apsorbance zabeležene tokom titracije. Sve

apsorbance su merene na talasnoj dužini 331,5 nm (talasna dužina na kojoj je razlika apsorbanci rastvora 1 i 3 najveća).

3.4. Izolovanje i sinteza jedinjenja

3.4.1. Sintaza biblioteke estara dugolančanih kiselina (opšta procedura)

Rastvori odgovarajućih karboksilnih kiselina (eikozanska, heneikozanska, dokozanska, trikozanska, tetrakozanska, pentakozanska ili heksakozanska kiselina, 1 mmol), alkohola (1-heksanol, 1-oktanol ili 2-etil-1-heksanol, 1 mmol), 4-(dimetilamino)piridina (DMAP, katalitička količina, 5 mg), i *N,N'*-dicikloheksilkarbodiimida (DCC, 1,1 mmol) u 10 ml suvog CH₂Cl₂ su mešani preko noći na sobnoj temperaturi, zaštićeni od vlage iz atmosfere kalcijum-hloridnom cevčicom. Talog (*N,N'*-dicikloheksilurea) je odstranjen filtracijom, nakon toga filtrat je ukoncentrovan pri sniženom pritisku i sobnoj temperaturi. Sirovi proizvod je prečišćen MPLC hromatografijom, korišćenjem silika-gela i eluenta kome je postepeno povećavana polarnost (estri su eluirani sa kolone 3% (v/v) rastvorom dietil-etra u heksanu). Čistoća jedinjenja je proveravana pomoću TLC-a i GC-MS analizom.

Spektralni podaci sintetisanih jedinjenja

Heksil-eikozanoat (1-1)

¹H NMR (CDCl₃, 200 MHz): δ 0,90 – 0,94 (m, 6H), 1,20 – 1,55 (m, 42H), 2,23 (t, 2H, *J* = 7,2 Hz), 4,02 (t, 2H, *J* = 6,1 Hz).

¹³C NMR (CDCl₃, 50,3 MHz): δ 174,0, 64,4, 34,4, 31,8, 31,5, 29,7, 29,4 (11 C), 29,1, 28,8, 28,6, 25,5, 25,1, 22,4, 22,2, 14,2, 14,0.

EI-MS *m/z* (relativna jačina, %): 396,5 (3,1) [M]⁺, 313,4 (17,4), 84,1 (76,6), 69,1 (32,2), 61,1 (49,5), 57,1 (51,4), 56,1 (41,7), 55,1 (41,5), 43,0 (100), 41,0 (33,0).

Elementna analiza: izračunato za C₂₆H₅₂O₂: C, 78,72; H, 13,21. Nađeno: 78,76; H, 13,17.

Retencioni indeks (DB5-MS): 2780

Heksil-heneikozanoat (1-2)

¹H NMR (CDCl₃, 200 MHz): δ 0,89 – 0,95 (m, 6H), 1,18 – 1,55 (m, 44H), 2,23 (t, 2H, *J* = 7,0 Hz), 4,01 (t, 2H, *J* = 6,0 Hz).

^{13}C NMR (CDCl_3 , 50,3 MHz): δ 174,0, 64,4, 34,4, 31,8, 31,5, 29,7, 29,4 (12 C), 29,1, 28,8, 28,6, 25,5, 25,1, 22,4, 22,2, 14,2, 14,0.

EI-MS m/z (relativna jačina, %): 410,5 (3,4) $[\text{M}]^+$, 327,4 (18,4), 84,1 (75,0), 69,1 (32,1), 61,1 (48,7), 57,1 (52,5), 56,1 (39,9), 55,1 (42,5), 43,0 (100), 41 (31,0).

Elementna analiza: izračunato za $\text{C}_{27}\text{H}_{54}\text{O}_2$: C, 78,96; H, 13,25. Nađeno: 78,90; H, 13,31.

Retencioni indeks (DB5-MS): 2882

Heksil-dokozanoat (1-3)

^1H NMR (CDCl_3 , 200 MHz): δ 0,91 – 0,95 (m, 6H), 1,18 – 1,54 (m, 46), 2,22 (t, 2H, $J = 7,1$ Hz), 4,01 (t, 2H, $J = 6,0$ Hz).

^{13}C NMR (CDCl_3 , 50,3 MHz): δ 174,0, 64,4, 34,4, 31,8, 31,5, 29,7, 29,4 (13 C), 29,2, 28,8, 28,6, 25,5, 25,1, 22,4, 22,2, 14,2, 14,0.

EI-MS m/z (relativna jačina, %): 424,5 (4,1) $[\text{M}]^+$, 341,4 (19,7), 84,1 (74,6), 69,1 (31,4), 61,1 (49,5), 57,1 (54,9), 56,1 (39,6), 55,1 (41,5), 43,0 (100), 41 (29,7).

Elementna analiza: izračunato za $\text{C}_{28}\text{H}_{56}\text{O}_2$: C, 79,18; H, 13,29. Nađeno: 79,06; H, 13,33.

Retencioni indeks (DB5-MS): 2982

Heksil-trikozanoat (1-4)

^1H NMR (CDCl_3 , 200 MHz): δ 0,89 – 0,95 (m, 6H), 1,18 – 1,55 (m, 48H), 2,23 (t, 2H, $J = 7,0$ Hz), 4,02 (t, 2H, $J = 6,0$ Hz).

^{13}C NMR (CDCl_3 , 50,3 MHz): δ 174,0, 64,4, 34,4, 31,8, 31,5, 29,7, 29,4 (14 C), 29,1, 28,8, 28,6, 25,5, 25,1, 22,4, 22,2, 14,2, 14,0.

EI-MS m/z (relativna jačina, %): 438,4 (3,1) $[\text{M}]^+$, 355,4 (15,0), 84,1 (72,0), 69,1 (29,6), 61,1 (46,8), 57,1 (53,5), 56,1 (39,4), 55,1 (39,8), 43,0 (100), 41 (28,3).

Elementna analiza: izračunato za $\text{C}_{29}\text{H}_{58}\text{O}_2$: C, 79,38; H, 13,32. Nađeno: 79,49; H, 13,25.

Retencioni indeks (DB5-MS): 3083

Heksil-tetrakozanoat (1-5)

^1H NMR (CDCl_3 , 200 MHz): δ 0,90 – 0,94 (m, 6H), 1,20 – 1,54 (m, 50H), 2,25 (t, 2H, $J = 7,1$ Hz), 4,01 (t, 2H, $J = 6,1$ Hz).

^{13}C NMR (CDCl_3 , 50,3 MHz): δ 174,0, 64,4, 34,4, 31,8, 31,5, 29,7, 29,4 (15 C), 29,1, 28,8, 28,6, 25,5, 25,1, 22,4, 22,2, 14,2, 14,0.

EI-MS m/z (relativna jačina, %): 452,5 (6,3) $[\text{M}]^+$, 369,4 (21,8), 84,1 (77,4), 69,1 (33,8), 61,1 (51,6), 57,1 (61,7), 56,1 (39,4), 55,1 (41,3), 43,0 (100), 41 (27,7).

Elementna analiza: izračunato za $\text{C}_{30}\text{H}_{60}\text{O}_2$: C, 79,58; H, 13,36. Nađeno: 79,49; H, 13,33.

Retencioni indeks (DB5-MS): 3182

Heksil-pentakozanoat (1-6)

^1H NMR (CDCl_3 , 200 MHz): δ 0,92 – 0,96 (m, 6H), 1,20 – 1,55 (m, 52H), 2,23 (t, 2H, $J = 7,0$ Hz), 4,02 (t, 2H, $J = 6,1$ Hz).

^{13}C NMR (CDCl_3 , 50,3 MHz): δ 174,0, 64,4, 34,4, 31,8, 31,5, 29,7, 29,4 (16 C), 29,1, 28,8, 28,6, 25,5, 25,1, 22,4, 22,2, 14,2, 14,0.

EI-MS m/z (relativna jačina, %): 466,5 (4,4) $[\text{M}]^+$, 383,4 (14,9), 84,1 (72,9), 69,1 (31,8), 61,1 (49,6), 57,1 (63,9), 56,1 (38,2), 55,1 (37,9), 43,0 (100), 41 (27,7).

Elementna analiza: izračunato za $\text{C}_{31}\text{H}_{62}\text{O}_2$: C, 79,76; H, 13,39. Nađeno: 78,70; H, 13,44.

Retencioni indeks (DB5-MS): 3282

Heksil-heksakozanoat (1-7)

^1H NMR (CDCl_3 , 200 MHz): δ 0,90 – 0,95 (m, 6H), 1,18 – 1,54 (m, 54H), 2,22 (t, 2H, $J = 7,1$ Hz), 4,02 (t, 2H, $J = 6,0$ Hz).

^{13}C NMR (CDCl_3 , 50,3 MHz): δ 174,0, 64,4, 34,4, 31,8, 31,5, 29,7, 29,4 (17 C), 29,1, 28,8, 28,6, 25,5, 25,1, 22,4, 22,2, 14,2, 14,0.

EI-MS m/z (relativna jačina, %): 480,6 (5,5) $[\text{M}]^+$, 397,5 (14,8), 84,1 (71,5), 69,1 (29,7), 61,1 (46,9), 57,1 (60,5), 56,1 (37,0), 55,1 (35,6), 43,0 (100), 41 (19,5).

Elementna analiza: izračunato za $\text{C}_{32}\text{H}_{64}\text{O}_2$: C, 79,93; H, 13,42. Nađeno: 78,89 H, 13,47.

Retencioni indeks (DB5-MS): 3382

Heksil-oktakozanoat (1-8)

¹H NMR (CDCl₃, 200 MHz): δ 0,89 – 0,95 (m, 6H), 1,18 – 1,55 (m, 58H), 2,23 (t, 2H, *J* = 7,0 Hz), 4,02 (t, 2H, *J* = 6,0 Hz).

¹³C NMR (CDCl₃, 50,3 MHz): δ 174,0, 64,4, 34,4, 31,8, 31,5, 29,7, 29,4 (19 C), 29,1, 28,8, 28,6, 25,5, 25,1, 22,4, 22,2, 14,2, 14,0.

EI-MS *m/z* (relativna jačina, %): 494,6 (4,2) [M]⁺, 411,5 (14,1), 84,1 (70,2), 69,1 (28,4), 61,1 (44,5), 57,1 (58,9), 56,1 (34,8), 55,1 (35,0), 43,0 (100), 41 (17,7).

Elementna analiza: izračunato za C₃₄H₆₈O₂: C, 80,24; H, 13,47. Nađeno: 80,14; H, 13,52.

Retencioni indeks (DB5-MS): 3582

Heksil-trikontanoat (1-9)

¹H NMR (CDCl₃, 200 MHz): δ 0,89 – 0,95 (m, 6H), 1,18 – 1,55 (m, 62H), 2,23 (t, 2H, *J* = 7,0 Hz), 4,02 (t, 2H, *J* = 6,0 Hz).

¹³C NMR (CDCl₃, 50,3 MHz): δ 174,0, 64,4, 34,4, 31,8, 31,5, 29,7, 29,4 (21 C), 29,1, 28,8, 28,6, 25,5, 25,1, 22,4, 22,2, 14,2, 14,0.

EI-MS *m/z* (relativna jačina, %): 508,6 (5,3) [M]⁺, 425,5 (13,9), 84,1 (69,2), 69,1 (28,0), 61,1 (44,4), 57,1 (58,5), 56,1 (34,6), 55,1 (37,0), 43,0 (100), 41 (17,3).

Elementna analiza: izračunato za C₃₆H₇₂O₂: C, 80,53; H, 13,52. Nađeno: 80,58; H, 13,46.

Retencioni indeks (DB5-MS): 3782

n-Oktil-heksadekanoat (1-10)

¹H NMR (CDCl₃, 200 MHz): δ 0,90 – 0,95 (m, 6H), 1,22 – 1,55 (m, 38H), 2,20 (t, 2H, *J* = 7,0 Hz), 4,02 (t, 2H, *J* = 6,0 Hz).

¹³C NMR (CDCl₃, 50,3 MHz): δ 174,0, 64,4, 34,4, 31,8, 31,5, 29,7, 29,4 (9 C), 29,1, 28,8, 28,6, 25,5, 25,1, 22,4, 22,2, 14,2, 14,0.

EI-MS m/z (relativna jačina, %): 368,4 (3,1) $[M]^+$, 257,3 (100), 239,3 (21,1), 129,1 (15,2), 112,2 (77,7), 97,1 (17,6), 83,1 (47,9), 57,1 (65,5), 56,1 (25,8), 43,0 (50,1).

Elementna analiza: izračunato za $C_{24}H_{48}O_2$: C, 78,20; H, 13,12. Nađeno: 78,23; H, 13,10.

Retencioni indeks (DB5-MS): 2575

n-Oktil-eikozanoat (**1-11**)

1H NMR ($CDCl_3$, 200 MHz): δ 0,90 – 0,95 (m, 6H), 1,18 – 1,52 (m, 46H), 2,22 (t, 2H, $J = 7,0$ Hz), 4,01 (t, 2H, $J = 6,0$ Hz).

^{13}C NMR ($CDCl_3$, 50,3 MHz): δ 174,0, 64,4, 34,4, 31,8, 31,5, 29,7, 29,4 (13 C), 29,1, 28,8, 28,6, 25,5, 25,1, 22,4, 22,2, 14,2, 14,0.

EI-MS m/z (relativna jačina, %): 424,5 (3,4) $[M]^+$, 313,4 (22,7), 112,2 (65,2), 83,1 (56,0), 71,1 (71,1), 70,1 (44,2), 69,1 (43,9), 57,1 (100), 55,1 (47,9), 43,0 (75,7).

Elementna analiza: izračunato za $C_{28}H_{56}O_2$: C, 79,18; H, 13,29. Nađeno: 79,11; H, 13,31.

Retencioni indeks (DB5-MS): 2975

n-Oktil-heneikozanoat (**1-12**)

1H NMR ($CDCl_3$, 200 MHz): δ 0,89 – 0,95 (m, 6H), 1,18 – 1,60 (m, 48H), 2,20 (t, 2H, $J = 7,1$ Hz), 4,05 (t, 2H, $J = 6,3$ Hz).

^{13}C NMR ($CDCl_3$, 50,3 MHz): δ 174,0, 64,4, 34,4, 31,8, 31,5, 29,7, 29,4 (14 C), 29,1, 28,8, 28,6, 25,5, 25,1, 22,4, 22,2, 14,2, 14,0.

EI-MS m/z (relativna jačina, %): 438,5 (3,4) $[M]^+$, 327,4 (22,7), 112,2 (54,1), 83,1 (44,6), 71,1 (72,1), 70,1 (40,4), 69,1 (43,3), 57,1 (100), 55,1 (48,2), 43,0 (72,8).

Elementna analiza: izračunato za $C_{29}H_{58}O_2$: C, 79,38; H, 13,32. Nađeno: 79,40; H, 13,22.

Retencioni indeks (DB5-MS): 3075

n-Oktil-dokozanoat (**1-13**)

1H NMR ($CDCl_3$, 200 MHz): δ 0,88 – 0,94 (m, 6H), 1,20 – 1,55 (m, 50H), 2,20 (t, 2H, $J = 7,0$ Hz), 4,06 (t, 2H, $J = 6,1$ Hz).

^{13}C NMR (CDCl_3 , 50,3 MHz): δ 174,0, 64,4, 34,4, 31,8, 31,5, 29,7, 29,4 (15 C), 29,1, 28,8, 28,6, 25,5, 25,1, 22,4, 22,2, 14,2, 14,0.

EI-MS m/z (relativna jačina, %): 452,5 (3,4) $[\text{M}]^+$, 341,4 (22,7), 112,2 (52,3), 83,1 (41,3), 71,1 (69,7), 70,1 (37,7), 69,1 (43,7), 57,1 (100), 55,1 (44,6), 43,0 (86,1).

Elementna analiza: izračunato za $\text{C}_{30}\text{H}_{60}\text{O}_2$: C, 79,58; H, 13,36. Nađeno: 79, 52; H, 13,33.

Retencioni indeks (DB5-MS): 3175

n-Oktil-trikozanoat (1-14)

^1H NMR (CDCl_3 , 200 MHz): δ 0,89 – 0,94 (m, 6H), 1,18 – 1,55 (m, 52H), 2,22 (t, 2H, $J = 7,3$ Hz), 4,06 (t, 2H, $J = 5,9$ Hz).

^{13}C NMR (CDCl_3 , 50,3 MHz): δ 174,0, 64,4, 34,4, 31,8, 31,5, 29,7, 29,4 (16 C), 29,1, 28,8, 28,6, 25,5, 25,1, 22,4, 22,2, 14,2, 14,0.

EI-MS m/z (relativna jačina, %): 466,5 (3,2) $[\text{M}]^+$, 355,4 (23,7), 112,2 (50,7), 83,1 (40,2), 71,1 (67,3), 70,1 (34,7), 69,1 (41,1), 57,1 (100), 55,1 (40,6), 43,0 (72,2).

Elementna analiza obračunata za $\text{C}_{31}\text{H}_{62}\text{O}_2$: C, 79,76; H, 13,39. Nađeno: 79,70; H, 13,46.

Retencioni indeks (DB5-MS): 3275

n-Oktil-tetrakozanoat (1-15)

^1H NMR (CDCl_3 , 200 MHz): δ 0,89 – 0,95 (m, 6H), 1,16 – 1,50 (m, 54H), 2,23 (t, 2H, $J = 7,0$ Hz), 4,01 (t, 2H, $J = 6,0$ Hz).

^{13}C NMR (CDCl_3 , 50,3 MHz): δ 174,0, 64,4, 34,4, 31,8, 31,5, 29,7, 29,4 (17 C), 29,1, 28,8, 28,6, 25,5, 25,1, 22,4, 22,2, 14,2, 14,0.

EI-MS m/z (relativna jačina, %): 480,6 (5,1) $[\text{M}]^+$, 369,4 (24,2), 112,2 (51,3), 97,1 (17,6), 83,1 (47,9), 70,1 (30,9), 69,1 (37,0), 57,1 (100), 55,1 (42,9), 43,0 (50,1).

Elementna analiza: izračunato za $\text{C}_{32}\text{H}_{64}\text{O}_2$: C, 79,93; H, 13,42. Nađeno: 80,00 H, 13,40.

Retencioni indeks (DB5-MS): 3375

n-Oktil-pentakozanoat (1-16)

^1H NMR (CDCl_3 , 200 MHz): δ 0,90 – 0,97 (m, 6H), 1,19 – 1,55 (m, 56H), 2,25 (t, 2H, $J = 7,1$ Hz), 4,04 (t, 2H, $J = 6,0$ Hz).

^{13}C NMR (CDCl_3 , 50,3 MHz): δ 174,0, 64,4, 34,4, 31,8, 31,5, 29,7, 29,4 (18 C), 29,1, 28,8, 28,6, 25,5, 25,1, 22,4, 22,2, 14,2, 14,0.

EI-MS m/z (relativna jačina, %): 494,6 (4,7) $[\text{M}]^+$, 383,4 (25,1), 112,2 (50,5), 97,1 (18,2), 83,1 (45,6), 70,1 (29,3), 69,1 (35,4), 57,1 (100), 55,1 (42,6), 43,0 (52,8).

Elementna analiza: izračunato za $\text{C}_{33}\text{H}_{66}\text{O}_2$: C, 80,09; H, 13,44. Nađeno: 80,12; H, 13,46.

Retencioni indeks (DB5-MS): 3475

n-Oktil-heksakozanoat (1-17)

^1H NMR (CDCl_3 , 200 MHz): δ 0,89 – 0,96 (m, 6H), 1,20 – 1,56 (m, 58H), 2,23 (t, 2H, $J = 7,2$ Hz), 4,04 (t, 2H, $J = 6,1$ Hz).

^{13}C NMR (CDCl_3 , 50,3 MHz): δ 174,0, 64,4, 34,4, 31,8, 31,5, 29,7, 29,4 (19 C), 29,1, 28,8, 28,6, 25,5, 25,1, 22,4, 22,2, 14,2, 14,0.

EI-MS m/z (relativna jačina, %): 508,6 (4,6) $[\text{M}]^+$, 397,4 (26,2), 112,2 (47,0), 97,1 (17,5), 83,1 (44,3), 70,1 (29,0), 69,1 (34,8), 57,1 (100), 55,1 (40,4), 43,0 (52,6).

Elementna analiza: izračunato za $\text{C}_{34}\text{H}_{68}\text{O}_2$: C, 80,24; H, 13,47. Nađeno: 80,31; H, 13,44.

Retencioni indeks (DB5-MS): 3575

2-Etilheksil-heksadekanoat (1-18)

^1H NMR (CDCl_3 , 200 MHz): δ 0,90 – 0,96 (m, 9H), 1,23 – 1,66 (m, 35H), 2,26 (t, 2H, $J = 7,0$ Hz), 4,00 (m, 2H).

^{13}C NMR (CDCl_3 , 50,3 MHz): δ 174,0, 66,7, 38,9, 34,4, 32,0, 30,5, 29,4 (9 C), 29,1 (2 C), 25,1, 23,9, 23,1, 22,5, 14,0 (2 C), 11,0.

EI-MS m/z (relativna jačina, %): 368,4 (0,1) $[\text{M}]^+$, 257,3 (28,7), 256,3 (30,0), 239,1 (19,1), 113,2 (25,9), 112,1 (89,9), 83,1 (37,6), 71,1 (64,5), 70,1 (100), 57,1 (100), 43 (58,5).

Elementna analiza: izračunato za $\text{C}_{24}\text{H}_{48}\text{O}_2$: C, 78,20; H, 13,12. Nađeno: 78,16; H, 13,15.

Retencioni indeks (DB5-MS): 2505

2-Etilheksil-eikozanoat (1-19)

¹H NMR (CDCl₃, 200 MHz): δ 0,90 – 0,95 (m, 9H), 1,22 – 1,68 (m, 43H), 2,24 (t, 2H, *J* = 7,0 Hz), 4,02 (m, 2H).

¹³C NMR (CDCl₃, 50,3 MHz): δ 174,0, 66,7, 38,9, 34,4, 32,0, 30,5, 29,4 (13 C), 29,1 (2 C), 25,1, 23,9, 23,1, 22,5, 14,0 (2 C), 11,0.

EI-MS *m/z* (relativna jačina, %): 424,5 (0,1) [M]⁺, 313,4 (20,2), 312,4 (28,3), 113,2 (33,3), 112,3 (100), 83,1 (35,2), 71,1 (77,5), 70,1 (62,4), 57,1 (92,0), 43,1 (44,2).

Elementna analiza: izračunato za C₂₈H₅₆O₂: C, 79,18; H, 13,29. Nađeno: 79,21; H, 13,32.

Retencioni indeks (DB5-MS): 2905

2-Etilheksil-dokozanoat (1-20)

¹H NMR (CDCl₃, 200 MHz): δ 0,90 – 0,95 (m, 9H), 1,23 – 1,66 (m, 47H), 2,25 (t, 2H, *J* = 7,2 Hz), 4,02 (m, 2H).

¹³C NMR (CDCl₃, 50,3 MHz): δ 174,0, 66,7, 38,9, 34,4, 32,0, 30,5, 29,4 (15 C), 29,1 (2 C), 25,1, 23,9, 23,1, 22,5, 14,0 (2 C), 11,0.

EI-MS *m/z* (relativna jačina, %): 452,5 (0,1) [M]⁺, 341,4 (15,0), 340,4 (26,5), 113,2 (31,7), 112,3 (100), 83,1 (33,0), 71,1 (72,4), 70,1 (57,4), 57,1 (88,0), 43,1 (47,6).

Elementna analiza: izračunato za C₃₀H₆₀O₂: C, 79,58; H, 13,36. Nađeno: 79,54; H, 13,27.

Retencioni indeks (DB5-MS): 3105

2-Etilheksil-tetrakozanoat (1-21)

¹H NMR (CDCl₃, 200 MHz): δ 0,90 – 0,95 (m, 9H), 1,22 – 1,66 (m, 51H), 2,24 (t, 2H, *J* = 7,0 Hz), 4,02 (m, 2H).

¹³C NMR (CDCl₃, 50,3 MHz): δ 174,0, 66,7, 38,9, 34,4, 32,0, 30,5, 29,4 (17 C), 29,1 (2 C), 25,1, 23,9, 23,1, 22,5, 14,0 (2 C), 11,0.

EI-MS *m/z* (relativna jačina, %): 480,6 (0,1) [M]⁺, 369,4 (16,2), 368,4 (22,5), 113,2 (28,7), 112,3 (100), 83,1 (32,5), 71,1 (70,3), 70,1 (55,4), 57,1 (86,8), 43,1 (44,6).

Elementna analiza: izračunato za C₃₂H₆₄O₂: C, 79,93; H, 13,42. Nađeno: 79,90 H, 13,41.

Retencioni indeks (DB5-MS): 3305

2-Etilheksil-heksakozanoat (1-22)

¹H NMR (CDCl₃, 200 MHz): δ 0,90 – 0,95 (m, 9H), 1,20 – 1,66 (m, 55H), 2,25 (t, 2H, *J* = 7,0 Hz), 4,02 (m, 2H).

¹³C NMR (CDCl₃, 50,3 MHz): δ 174,0, 66,7, 38,9, 34,4, 32,0, 30,5, 29,4 (19 C), 29,1 (2 C), 25,1, 23,9, 23,1, 22,5, 14,0 (2 C), 11,0.

EI-MS *m/z* (relativna jačina, %): 508,6 (0,3) [M]⁺, 397,4 (12,3), 396,4 (20,4), 113,2 (26,7), 112,3 (100), 83,1 (33,2), 71,1 (76,3), 70,1 (52,1), 57,1 (96,8), 43,1 (40,3).

Elementna analiza: izračunato za C₃₄H₆₈O₂: C, 80,24; H, 13,47. Nađeno: 80,22; H, 13,51.

2-Feniletil-pentakozanoat (1-23)

¹H NMR (CDCl₃, 200 MHz): δ 0,90 (t, 3H, *J* = 7,5 Hz), 1,20 – 1,66 (m, 54H), 2,28 (t, 2H, *J* = 7,2 Hz), 2,94 (t, 2H, *J* = 7,2 Hz), 4,22 (t, 2H, *J* = 7,2 Hz), 7,22 – 7,33 (m, 5H).

¹³C NMR (CDCl₃, 50,3 MHz): δ 174,0, 138,0, 128,9 (2 C), 128,5 (2 C), 126,5, 64,5, 35,2, 34,4, 29,4 (19 C), 25,0, 22,6, 22,5, 13,0.

EI-MS *m/z* (relativna jačina, %): 106,1 (2,0), 105,1 (36,4), 104,1 (100), 103,1 (1,7), 91 (2,2), 73 (2,8), 71 (3,1), 57 (3,8), 43 (2,2), 41 (2,4).

Elementna analiza: izračunato za C₃₃H₅₈O₂: C, 81,42; H, 12,01. Nađeno: 81,38; H, 12,06.

Retencioni indeks (DB5-MS): 3606

3.4.2. Izolovanje i sinteza epoksigermakrona iz *G. macrorrhizum*

Hromatografsko razdvajanje sastojaka etarskog ulja G. macrorrhizum. Sastojci etarskog ulja (korišćen je uzorak mase 2,0 g) su najpre razdvajani MPLC-om (gradijentni uslovi, od 1% Et₂O u heksanu (*v/v*) do čistog etra). Frakcije su pulovane (na osnovu TLC-a) pri čemu je dobijeno 10 različitih frakcija. Sve ove frakcije su ponovo hromatografisane, ovog puta pri

izokratskim uslovima. Sistem rastvarača (heksan/Et₂O) je određen tako da R_f vrednost većine detektovanih jedinjenja bude u opsegu 0,15 – 0,30. Jedinjenja 4,5- i 1,10-epoksigermakroni (po 15 mg od svakog) su izolovana iz treće frakcije eluiranjem 10%-im rastvorom Et₂O u heksanu (v/v).

rel-(1R,6E,10R)-1,7-dimetil-4-(1-metiletiliden)-11-oksabicyklo[8.1.0]undec-6-en-3-on (= 1,10-epoksigermakron; **2-1**). RI 1831. EI-MS: 107 (100), 149 (93,5), 67 (69,1), 121 (66,5), 135 (62,0), 91 (57,3), 79 (40,6), 93 (39,5), 234 (37,4, M⁺), 235 (6,2, [M+1]⁺).

rel-(1R,6E,10R)-6,10-dimetil-3-(1-metiletiliden)-11-oksabicyklo[8.1.0]undec-6-en-4-on (= 4,5- epoksigermakron; **2-2**). RI 1851. EI-MS: 68 (100), 67 (72,9), 167 (54,3), 121 (42,9), 107 (37,1), 79 (27,1), 91 (27,1), 234 (7,1, M⁺).

Hemijska pomeranja protona ¹H i ugljenika ¹³C prikazana su u poglavlju Rezultati i diskusija.

Sinteza epoksigermakrona. U rastvor 0,40 g (1,83 mmol) germakrona u 40 ml CH₂Cl₂ pri 0 °C dodato je 0,40 g (2,31 mmol) mCPBA. Nakon 30 minuta mešanja reakciona smeša je isprana sa 2 × 50 ml zasićenog rastvora NaHCO₃, a posle spajanja vodena faza je ekstrahovana sa 25 ml CH₂Cl₂. Spojeni organski slojevi su sušeni iznad anhidrovanog MgSO₄, i nakon uklanjanja rastvarača, dobijeno je 0,38 g sirovog proizvoda. Epoksi jedinjenja **2-1** i **2-2** su razdvojena MPLC-om (izokratski uslovi, heksan/Et₂O 9:1, v/v) i izolovano je 264 mg (61,7%) 4,5- i 75 mg (17,5%) 1,10-epoksi izomera. Spektralni podaci izolovanih jedinjenja su se slagali sa podacima dobijenim za izolovana jedinjenja.

3.4.3. Sinteza semimikrokoličina estara aromatičnih karboksilnih kiselina (opšta procedura)

Rastvori odgovarajućih karboksilnih kiselina (benzoeva, 4-hidroksibenzoeva, 4-metoksibenzoeva ili vanilinska kiselina, 0,1 mmol), alkohola (borneol, izoborneol, geraniol, mentol, nerol ili *endo*-fenhol), 4-(dimetilamino)piridina (0,5 mg) i DCC-a (1,1 mmol) u 1,0 ml suvog

CH₂Cl₂ su, nakon stajanja preko noći (u GC vijali) analizirani direktno GC-MS-om bez obrade.

Sinteza bornil-4-metoksibenzoata (BMB). Dihlormetanski rastvor borneola (154 mg, 1 mmol), 4-metoksibenzoeve kiseline (152 mg, 1 mmol), DMAP-a (5 mg) i DCC-a (226 mg, 1,1 mmol) je mešan preko noći na sobnoj temperaturi (rastvor je od vlage zaštićen CaCl₂-cevičicom). Istaložena urea je uklonjena filtracijom, a dobijeni filtrat je zatim ukoncentrovan *in vacuo*. Estar je prečišćen MPLC-om (silika-gel, heksan/CH₂Cl₂ 1 : 1 [v/v]). Čistoća estarske frakcije je potvrđena TLC-om i GC-MS-om.

¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz) δ: 0,91 (s, 3H), 0,92 (s, 3H), 0,97 (s, 3H), 1,11 (dd, *J* = 3,4 and 13,8 Hz), 1,20–1,48 (m, 2H), 1,60–1,90 (m, 2H), 2,00–2,25 (m, 1H), 2,46 (dddd, *J* = 13,8, 9,9, 4,6, 3,4 Hz, 1H), 3,86 (s, 3H), 5,09 (ddd, *J* = 9,9, 3,4, 2,0 Hz, 1H), 6,94 (dd, 8,9, 2,3 Hz, 2H), 8,20 (dd, 8,9, 2,3 Hz, 2H).

¹³C NMR (CDCl₃, 100 MHz) δ: 13,6, 18,9, 19,7, 27,4, 28,1, 36,9, 45,0, 47,8, 49,1, 55,4, 80,1, 113,6, 123,0, 131,5, 163,0, 166,7.

EI-MS *m/z* (rel. intenzitet, %): 135 (100,0), 136 (14,4), 77 (7,7), 92 (6,0), 288 (4,6, M⁺), 41 (4,1), 93 (3,8).

3.4.4. Izolovanje 2-(α-L-ramnoziloksi)benzil-izotiocijanata (**4-1**)

Proizvodi hidrolize dobiveni iz cvetova biljne vrste *R. lutea* su razdvojeni pomoću MPLC-a. Najpre su *n*-alkani isprani sa kolone čistim heksanom, a zatim je kao mobilna faza korišćen čist etil-acetat. Jedinjenje **4-1** (70 mg, dobijeno iz 100 mg lizata) je izolovano u čistom stanju (što je potvrđeno TLC-om, GC-MS-om, NMR-om i elementnom analizom).

RI(DB-5MS) = 2569, EI-MS *m/z* (rel. intenzitet, %): 311 (4,58, [M]⁺), 312 (0,79, [M+1]⁺), 313 ([0,30, M+2]⁺), 166 (26,5), 165 (21,6), 147 (3,1), 129 (26,0), 107 (100), 85 (58,7), 78 (27,3), 77 (28,4), 72 (5,1), 71 (46,5).

IR (cm⁻¹): 3361 (O-H), 2916, 2848 (C-H), 2080 (-N=C=S), 1491, 1455, 1238, 1131, 1060, 1011, 979, 752, 666.

^1H i ^{13}C hemijska pomjeranja su prikazana u poglavlju Rezultati i diskusija.

3.4.5. Sinteza i spektralna karakterizacija hibridnih jedinjenja ferocena i indola

Sinteze 3- i 4-ferocenilacetofenona (5-2a i 5-2b). Diazonijum soli 3- i 4-aminoacetofenona su pripremljene postepenim dodavanjem hladnog rastvora NaNO_2 (1,30 g, 18,8 mmol u 10 ml vode) rastvoru odgovarajućeg amina (2,0 g, 14,8 mmol) u vodenom rastvoru H_2SO_4 (1 M, 37,5 ml) na 0 °C. Dobijeni rastvor se dodaje u ohlađenu suspenziju ferocena (3,50 g, 18,8 mmol) u glacijalnoj sirćetnoj kiselini (200 ml) pod inertnom atmosferom azota. Rastvor se meša na sobnoj temperaturi 24 h, a zatim izlije u 400 ml vode. Smeša se ekstrahuje sa 3×50 ml dihlormetana, a zatim se spojeni organski slojevi neutrališu zasićenim rastvorom Na_2CO_3 . Nakon odvajanja CH_2Cl_2 faza se suši anhidrovanim MgSO_4 i koncentruje *in vacuo*. Proizvodi (**5-2a** i **5-2b**) se prečišćavaju MPLC-om uz dihlormetan kao eluent. Prinosi: **5-2a**: 1,51 (33,4%) i **5-2b**: 1,31 (26,8%). NMR spektri dobijenih čistih jedinjenja slagali su se sa literaturnim podacima (Traylor i Ware, 1967).

EI-MS m/z (rel. intenzitet, %) **5-2a**: 304 (100, M^+), 305 (22,3, $[\text{M} + 1]^+$), 139 (9,2), 261 (7,8, $\text{M} - \text{Ac}$), 302 (7,5, $[\text{M} - 2]^+$), 121 (7,1), 144 (6,7), 260 (6,0), 56 (4,9, Fe^+), 203 (4,3).

EI-MS m/z (rel. intenzitet, %) **5-2b**: 304 (100, M^+), 261 (22,1, $\text{M} - \text{Ac}$), 305 (16,4, $[\text{M} + 1]^+$), 144 (8,9), 139 (6,9), 302 (6,5, $[\text{M} - 2]^+$), 260 (5,9), 121 (5,2), 262 (4,4), 56 (4,1, Fe^+).

Indolizacije 5-2a i 5-2b. Smeša dve kapi glacijalne sirćetne kiseline, 0,72 g (6,66 mmol) fenilhidrazina i 1,00 g jedinjenja **5-2a** ili **5-2b** u 10 ml etanola refluktuje se tokom 2 h, a dobijena smeša se zatim upari do suva. Sirovi hidrazonski intermedijeri se suše na visokom vakuumu 30 min, a zatim se dodaje 10 ml polifosforne kiseline. Smeša se greje na 100 °C jedan sat, hladi do sobne temperature i obrađuje pažljivim dodavanjem 50 ml ledene vode. Nakon ekstrakcije dihlormetanom spojene organske faze se ispiraju vodom, suše anhidrovanim MgSO_4 , a zatim se rastvarač ukloni (vakuum uparivač).

Proizvodi (**5-3a** i **5-3b**) se prečišćavaju hromatografijom (MPLC, heksan/CH₂Cl₂ 3:1, [v/v]). Prinosi: **5-3a**: 270 mg (21,8%) i **5-3b**: 188 mg (15,2 %).

EI-MS *m/z* (rel. intenzitet, %) **5-3a**: 377 (100, M⁺), 378 (28,6, [M + 1]⁺), 188 (11,9), 254 (10,1), 375 (8,7, [M – 2]⁺), 121 (5,6), 376 (4,3, [M – 1]⁺), 379 (4,2, [M + 2]⁺).

EI-MS *m/z* (rel. intenzitet, %) **5-3b**: 377 (100, M⁺), 378 (29,5, [M + 1]⁺), 256 (10,0), 121 (8,5), 375 (8,3, [M – 2]⁺), 254 (7,1), 379 (6,2, [M + 2]⁺), 376 (4,1, [M – 1]⁺).

¹H i ¹³C NMR hemijska pomeranja prikazana su u poglavlju Rezultati i diskusija.

3.4.6. Redukcije Biđinelijevih jedinjenja litijum-aluminiumhidridom

Sinteze dihidropirimidinona (Biđinelijeva jedinjenja [6-1]-[6-19]). Početni dihidropirimidinoni su sintetisani po proceduri iz rada Jin i sar. (2002) uz korišćenje *p*-toluensulfonske kiseline kao katalizatora. Smeša koja se sastoji 2 mmol aromatičnog aldehida, 2 mmol β-dikarbonilnog jedinjenja (metil-acetoacetata ili acetilacetona), 3 mmol uree (uree, metiluree ili tiouree) i 50 mg *p*-toluensulfonske kiseline u 20 ml etanola (95%, [v/v]) refluktuje se tokom 2 do 4 h. Tok reakcije prati se TLC-om, a nakon završetka reakcije smeša se ohladi ledenim kupatilom do 0 °C. U najvećem broju slučajeva talog Biđinelijevog jedinjenja se odmah formira – u suprotnom se nukleacija podstiče grebanjem unutrašnje površine balona metalnom spatulom. Talog se odvaja filtracijom, ispira vodom i hladnim etanolom, pa rekristališe iz vrelog etanola (95%, [v/v]). Čistoća dobijenih proizvoda je potvrđena TLC, GC-MS i NMR analizama. Kompletni protonski i ¹³C NMR spektri za jedinjenja [6-1]-[6-19] (uključujući i asignaciju signala), dati su u Prilogu. Spektralni podaci dobijenih jedinjenja su se dobro slagali sa literaturnim podacima (Jin et al., 2002).

Metilovanje 3,4-dihidropirimidin-2-(1H)-tiona (6-16). Metilovanje 3,4-dihidropirimidin-2-(1H)-tiona (**6-16**) rađeno je po proceduri iz rada Wang-a i sar. (2014). Smeša jedinjenja **6-16** (1 mmol), metil-jodida (1,1 mmol) i

K₂CO₃ (2 mmol) u acetonu (10 ml) meša se preko noći na sobnoj temperaturi. Smeša se zatim izlije u 50 ml vode, a dobijeni talog procedi. Nakon sušenja se dobija smeša (**6-17**) metil-4-fenil-6-metil-2-(metiltio)-1,4-dihidropirimidin-5-karboksilata i njegovog regio-izomera metil-6-fenil-4-metil-2-(metiltio)-1,6-dihidropirimidin-5-karboksilata u odnosu 2,2 : 1. Spektralni podaci su se slagali sa publikovanim spektrima (Wang et al., 2014).

Redukcije jedinjenja [6-1]-[6-19] litijum-aluminijumhidridom. U etarsku suspenziju jedinjenja [6-1]-[6-19] (1 mmol supstance u 10 ml Et₂O) polako se doda (tokom 5 minuta) 190 mg (5 mmol) litijum-aluminijumhidrida na 0 °C. Smeša se refluktuje 3 h, ohladi do 0 °C i obrađuje sukcesivnim dodatkom vode (1 ml), 15%-og (w/v) rastvora natrijum-hidroksida (1 ml), pa opet vode (1 ml). Smeša se ekstrahuje dihlormetanom, suši iznad anhidrovanog MgSO₄, a zatim se rastvarač uklanja *in vacuo*. Proizvodi se prečišćavaju hromatografijom na SiO₂ (MPLC, etil-acetat/heksan 1:1, [v/v]). ¹H i ¹³C NMR pomeranja jedinjenja [6-1a]-[6-11a] prikazana su u poglavlju Rezultati i diskusija. Potpuna asignacija hemijskih pomeranja je izvršena analizom 1D- i 2D-spektara.

Redukcije jedinjenja **6-1** i **6-12** litijum-aluminijumdeuteridom su izvršene na analogan način. Takođe je izvršeno još nekoliko reakcija redukcije jedinjenja **6-12**:

(1) vreme reakcije je varirano između 30 i 90 min; (2) ispitivan je i efekat promene redosleda dodavanja reagenasa – suspenzija jedinjenja **6-12** je postepeno dodavana u suspenziju LiAlH₄. Ostali uslovi reakcije su bili isti kao u opštoj proceduri redukcije.

6-1a: prinos-90%, IR, cm⁻¹: 3210, 3100, 1650, EI-MS (*m/z*, rel. intenzitet): 202 (19, M⁺), 187 (77), 125 (100);

6-2a: prinos-92%, IR, cm⁻¹: 3250, 3100, 1655, EI-MS (*m/z*, rel. intenzitet): 216 (15, M⁺), 201 (66), 125 (100);

6-3a: prinos-88%, IR, cm⁻¹: 3225, 3100, 1695, 1655, EI-MS (*m/z*, rel. intenzitet): 216 (13, M⁺), 201 (55), 125 (100);

6-4a: prinos-81%, IR, cm^{-1} : 3225, 3100, 1655, EI-MS (m/z , rel. intenzitet): 216 (9, M^+), 201 (65), 125 (100);

6-5a: prinos-92%, IR, cm^{-1} : 3235, 3100, 1670, EI-MS (m/z , rel. intenzitet): 232 (17, M^+), 217 (61), 125 (100);

6-6a: prinos-87%, IR, cm^{-1} : 3225, 3100, 1660, EI-MS (m/z , rel. intenzitet): 232 (10, M^+), 217 (52), 125 (100);

6-7a: prinos-82%, IR, cm^{-1} : 3230, 3100, 1650, EI-MS (m/z , rel. intenzitet): 232 (17, M^+), 217 (61), 125 (100);

6-8a: prinos-90%, IR, cm^{-1} : 3230, 3100, 1670, EI-MS (m/z , rel. intenzitet): 220 (24, M^+), 205 (60), 125 (100);

6-9a: prinos-85%, IR, cm^{-1} : 3240, 3100, 1655, EI-MS (m/z , rel. intenzitet): 220 (21, M^+), 205 (57), 125 (100);

6-10a: prinos-82%, IR, cm^{-1} : 3230, 3100, 1680, EI-MS (m/z , rel. intenzitet): 220 (21, M^+), 205 (95), 125 (100);

6-11a: prinos-95%, IR, cm^{-1} : 3210, 3100, 1650, EI-MS (m/z , rel. intenzitet): 192 (39, M^+), 177 (100), 125 (22);

6-12a: prinos-14%, IR, cm^{-1} : 3240, 3100, 1665, EI-MS (m/z , rel. intenzitet): 216 (16, M^+), 201 (48), 139 (100); ^{13}C -NMR (100,6 MHz, CDCl_3): δ 14,8 (C-8), 16,1 (C-7), 29,9 (NMe), 60,4 (C-4), 105,7 (C-5), 126,9 (C-2'), 128,0 (C-4'), 128,8 (C-3'), 128,8 (C-6), 143,2 (C-1'), 154,3 (C-2); ^1H -NMR (400 MHz, CDCl_3): δ 1,53 (H-7), 1,94 (H-8), 3,18 (NMe), 4,68 (H-4), 5,01 (NH-3), 7,27-7,39 (5H, ArH).

6-12b: prinos-74%, IR, cm^{-1} : 3400-3200, 1670; ^{13}C -NMR (100,6 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): δ 14,0 (C-7), 29,2 (NMe), 54,6 (C-8), 57,8 (C-4), 110,6 (C-5), 126,6 (C-2'), 127,3 (C-4'), 128,5 (C-3'), 132,3 (C-6), 144,2 (C-1'), 154,0 (C-2); ^1H -NMR (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): δ 1,95 (3H, H-7), 3,02 (3H, NMe), 3,51 (1H, dd, $J = 12,5, 6,4$ Hz, H-8), 4,05 (1H, dd, $J = 12,5, 4,5$ Hz, H-8), 4,65 (1H, OH, dd, $J = 6,4, 4,5$ Hz), 4,82 (1H, H-4), 7,20-7,40 (5H).

6-13b: prinos-75%, IR, cm^{-1} : 3400-3200, 1660; ^{13}C -NMR (100,6 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): δ 16,6 (C-7), 31,8 (NMe), 56,5 (C-8), 60,5 (C-4), 113,1 (C-5),

117,8 (d, $J = 21,2$ Hz, C-3'), 131,2 (d, $J = 8,2$ Hz, C-2'), 135,0 (C-6), 143,1 (C-1'), 156,0 (C-2) 164,0 (d, $J = 242,7$ Hz, C-4'); $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, DMSO- d_6): δ 1,95 (3H, H-7), 3,01 (3H, NMe), 3,51 (1H, dd, $J = 12,5, 6,4$ Hz, H-8), 4,04 (1H, dd, $J = 12,5, 4,5$ Hz, H-8), 4,66 (1H, OH, dd, $J = 6,4, 4,5$ Hz), 4,83 (1H, H-4), 7,08-7,24 (5H, ArH).

6-15b: prinos-80%, IR, cm^{-1} : 3400-3200, 1650; $^{13}\text{C-NMR}$ (100,6 MHz, DMSO- d_6): δ 14,0 (C-7), 20,7 (C-1''), 29,2 (NMe), 54,3 (C-8), 57,9 (C-4), 110,8 (C-5), 126,6 (C-2'), 129,0 (C-3'), 132,1 (C-6), 136,4 (C-4'), 141,3 (C-1'), 154,0 (C-2); $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, DMSO- d_6): δ 1,94 (3H, H-7), 2,26 (3H, H-1'') 3,01 (3H, NMe), 3,50 (1H, dd, $J = 12,5, 6,4$ Hz, H-8), 4,04 (1H, dd, $J = 12,5, 4,5$ Hz, H-8), 4,64 (1H, OH, dd, $J = 6,4, 4,5$ Hz), 4,76 (1H, H-4), 7,08-7,13 (4H).

6-16a: prinos-22%, IR, cm^{-1} : 3250, 3100, 1670, EI-MS (m/z , rel. intenzitet): 218 (M^+ , 63), 203 (38), 141 (100), 158 (16); $^{13}\text{C-NMR}$ (100,6 MHz, DMSO- d_6): δ 14,2 (C-7), 14,2 (C-7), 59,3 (C-4), 104,2 (C-5), 125,3 (C-6), 126,8 (C-2'), 127,5 (C-4'), 128,4 (C-3'), 143,2 (C-1'), 172,6 (C-2); $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, DMSO- d_6): δ 1,43 (3H, H-8), 1,75 (3H, H-7), 4,64 (1H, H-4), 7,20-7,40 (5H, ArH), 8,74 (1H, NH-3), 9,41 (1H, NH-1).

6-16b: prinos-57%, IR, cm^{-1} : 3200, 3100, 1660, EI-MS (m/z , rel. intenzitet): 218 (M^+ , 44), 203 (45), 141 (100); $^{13}\text{C-NMR}$ (100,6 MHz, DMSO- d_6): δ 19,6 (C-7), 51,4 (C-6), 60,9 (C-4), 113,2 (C-8), 127,6 (C-2'), 128,6 (C-4'), 128,9 (C-3'), 138,4 (C-1'), 141,4 (C-5), 177,3 (C-2); $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, DMSO- d_6): δ 1,29 (d, $J = 6,6$ Hz, H-7), 4,21 (qddd, $J = 6,6, 1,5, 1,5, 1,5$ Hz), 4,68 (dd, $J = 1,5, 1,5$ Hz, H-8), 5,07 (H-4), 5,15 (dd, $J = 1,5, 1,5$ Hz, H-8).

6-18b: prinos-66%, IR, cm^{-1} : 3400-3200, 1650; $^{13}\text{C-NMR}$ (100,6 MHz, CDCl_3): δ 14,2 (C-7), 22,2 (C-9), 29,8 (NMe), 54,2 (C-4), 67,0 (C-8), 114,4 (C-5), 126,7 (C-2'), 128,1 (C-4'), 129,2 (C-3'), 132,1 (C-6), 144,5 (C-1'), 155,0 (C-2); $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): δ 1,30 (3H, d, $J = 6,5$ Hz), 2,05 (3H, H-7), 3,16 (3H, NMe), 4,73 (1H, qd, $J = 6,5, 2,6$ Hz), 4,87 (1H, H-4), 5,40 (1H, OH), 7,26-7,30 (5H, ArCH);

6-19a: prinos-87%, IR, cm^{-1} : 3250, 3100, 1660, EI-MS (m/z , rel. intenzitet): 216 (M^+ , 13), 187 (29), 139 (100); ^{13}C -NMR (100,6 MHz, CDCl_3): δ 12,9 (C-9), 15,2 (C-7), 21,3 (C-8), 59,4 (C-4), 108,9 (C-5), 125,8 (C-6), 127,2 (C-2'), 128,0 (C-4'), 128,7 (C-3'), 143,7 (C-1'), 154,1 (C-2); ^1H -NMR (400 MHz, CDCl_3): δ 0,84 (3H, t, $J = 7,5$ Hz), 1,69 (1H, dq, $J = 15,0, 7,5$ Hz, H-8), 1,80 (3H, H-7), 1,98 (1H, dq, $J = 15,0, 7,5$ Hz, H-8), 4,86 (H-4), 5,45 (1H, NH-3), 7,28-7,34 (5H, ArH).

6-20: prinos-10%, IR, cm^{-1} : 3100, 1400, 1250, EI-MS (m/z , rel. intenzitet): 230 (100, M^+), 183 (43), 115 (27); ^{13}C -NMR (100,6 MHz, CDCl_3): δ 14,1 (SMe), 15,1 (C-8), 22,9 (C-7), 121,2 (C-5), 128,2 (C-2'), 129,0 (C-4'), 129,1 (C-3'), 138,5 (C-1'), 164,9 (C-4), 167,2 (C-6), 168,1 (C-2); ^1H -NMR (400 MHz, CDCl_3): δ 2,22 (3H, H-8), 2,50 (3H, H-7), 2,57 (3H, SMe), 7,40-7,60 (5H, ArH).

Dehidratacija alkohola [6-12b]-[6-15b]. Jedinjenja [6-12b]-[6-15b] (0,05 mmol) se rastvore u 5 ml etil-acetata, doda se 2,5 g silika-gela, a dobijena suspenzija se refluktuje 15 min. Zatim se doda 5 ml metanola, silika-gel se odvoji ceđenjem i ispere sa 10 ml smeše MeOH- CH_2Cl_2 (1:1, [v/v]). Rastvarači se uklone (vakuum uparivač), pa ostatak podvrgne hromatografiji (MPLC). Kao jedini proizvodi dobijaju se dieni [6-12c]-[6-15c] u prinosu 50-60%. ^1H i ^{13}C NMR pomeranja prikazana su u poglavlju Rezultati i diskusija.

6-12c: prinos-55%, IR, cm^{-1} : 3240, 3100, 1700, EI-MS (m/z , rel. intenzitet): 214 (100, M^+), 170 (57), 156 (24), 115 (33);

6-13c: prinos-52%, IR, cm^{-1} : 3230, 3100, 1680, EI-MS (m/z , rel. intenzitet): 232 (100, M^+), 188 (63), 174 (26), 133 (33);

6-14c: prinos-52%, IR, cm^{-1} : 3230, 3100, 1670, EI-MS (m/z , rel. intenzitet): 244 (100, M^+), 229 (18), 200 (17), 186 (18), 121 (26);

6-15c: prinos-60%, IR, cm^{-1} : 3220, 3100, 1660, EI-MS (m/z , rel. intenzitet): 228 (100, M^+), 213 (30), 184 (48), 170 (44), 129 (29).

Izomerizacija alkohola 6-12b i 6-14b. Smeša alkohola (6-12b ili 6-14b, 0,05 mmol), silika-gela (2,5 g) i CH_2Cl_2 (5 ml) se meša 48 h na sobnoj

temperaturi. Smeša se razblaži sa 5 ml MeOH i procedi, a zatim se rastvarač ukloni *in vacuo*. Sirovi proizvod se prečisti hromatografijom (MPLC) sa čistim EtOAc kao eluentom. Aciklični proizvodi **6-12d** i **6-14d** se dobijaju u prinosu od 60%.

6-12d: $^{13}\text{C-NMR}$: (100,6 MHz, CDCl_3): δ 26,7 (C-7), 27,3 (NMe), 56,1 (C-4), 126,3 (C-2'), 127,3 (C-4'), 127,8 (C-8), 128,5 (C-3'), 140,6 (C-4'), 147,9 (C-5), 157,8 (C-2), 199,8 (C-6); $^1\text{H-NMR}$: (400 MHz, CDCl_3): δ 2,37 (3H, H-7), 2,79 (3H, NMe), 4,37 (1H, NH-1), 5,47 (1H, d, $J=8,5$ Hz, NH-3), 5,79 (1H, d, $J=8,5$ Hz, H-4), 6,17 (1H, H-8), 6,24 (1H, H-8), 7,25-7,29 (5H, ArH). IR, cm^{-1} : 3240, 3100, 1720, 1650.

6-14d: $^{13}\text{C-NMR}$: (100,6 MHz, CDCl_3): δ 26,7 (C-7), 27,3 (NMe), 55,2 (C-1''), 55,9 (C-4), 56,1 (C-4), 112,4 (C-4'), 113,1 (C-2'), 118,7 (C-6'), 127,8 (C-8), 129,6 (C-5'), 142,3 (C-1'), 147,8 (C-5), 157,9 (C-2), 159,8 (C-3'), 199,8 (C-6); $^1\text{H-NMR}$: (400 MHz, CDCl_3): δ 2,32 (3H, H-7), 2,79 (3H, NMe), 3,78 (3H, H-1''), 5,49 (1H, d, $J=8,5$ Hz, NH-3), 5,76 (1H, d, $J=8,5$ Hz, H-4), 6,15 (1H, H-8), 6,23 (1H, H-8), 6,80-6,95 (4H, ArH). IR, cm^{-1} : 3220, 3100, 1730, 1650.

Dils-Alderova reakcija diena 6-12c sa diizopropil-azodikarboksilatom (DIAD). Smeša diena **6-12c** (0,1 mmol, 21,4 mg) i diizopropil-azodikarboksilata (0,3 mmol, 60,7 mg) se meša u $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{Et}_2\text{O}$ (1:3, v/v, 2 ml) sve dok TLC-om nije potvrđena potpuna konverzija startnog diena u reakcionoj smeši (1 h). Reakcija je takođe praćena NMR-om, a prinos reakcije (97%) je izračunat qNMR analizom uz interni standard. U $^1\text{H-NMR}$ spektru sirovog proizvoda primećeno je prisustvo nekoliko diastereotopnih adukata **6-12e**, a jedan od njih je uspešno izolovan MPLC-om na SiO_2 u čistom stanju (kao eluent korišćen je EtOAc).

$^{13}\text{C-NMR}$ (100,6 MHz, CDCl_3): δ 21,9 (Me); 22,0 (Me), 32,7 (NMe), 42,4 (CH_2), 44,1 (CH_2), 71,0 (CHMe_2), 71,8 (CHMe_2), 72,3 (C4), 108,0, 128,1 (ArCH), 128,6 (ArCH), 130,6 (ArCH), 136,3 (C-1'), 149,6, 153,4 (karbonil iz estarske grupe), 154,5 (karbonil iz druge estarske grupe), 156,2 (C-2); $^1\text{H-NMR}$: (400 MHz, CDCl_3): δ = 1,25 (Me, 6H), 1,31 (Me, 6H), 3,70 (NMe), 3,75 (NH), 4,19 i 4,93 (dijastereotopni protoni vezani za ugljenik na δ 42,4), 4,30 i 4,70 (dijastereotopni protoni vezani za ugljenik na δ 44,0), 4,95 (CHMe_2), 5,05 (CHMe_2), 6,51 (H-4), 7,40-7,60 (5H, ArH).

3.5. Testiranje biološke/farmakološke aktivnosti sintetisanih/ izolovanih jedinjenja

Mikroorganizmi. Ispitivanje antimikrobne aktivnosti odabranih jedinjenja (1-10, 1-11, 1-12, [1-14]-[1-17], 2-1 i 2-2) je vršeno na Gram-pozitivnim sojevima bakterija (*Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Listeria monocytogenes* ATCC 19115 i *Staphylococcus aureus* ATCC 25923) i Gram-negativnim sojevima bakterija (*Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 19582 i *Salmonella enteritidis* ATCC 13076), kao i na jedan soj gljivice (*Candida albicans* ATCC 10231).

Ćelijske kulture. Ljudske ćelijske melanoma (A375) i fibroblasta pluća (MRC5) potiču iz američke kolekcije kultura sojeva (ATCC, *American Type Culture Collection*). Ćelije su kultivisane u medijumu RPMI-1640 koji je sadržavao 100 µg/ml streptomicina, 100 U/ml penicilina i 10% (v/v) seruma fetusa govečeta (FBS). Pri određivanju citotoksičnog efekta korišćene su monoslojne ćelijske kulture u medijumu RPMI-1640. Ćelije su uzgajane u atmosferi 95% vazduha i 5% CO₂ (v/v) zasićenog vlagom na 37 °C.

Izolovanje ćelija iz peritonealnog eksudata. Pacovima je intraperitonealno injektiran tioglikoladni medijum kako bi se podstakla migracija cirkulatornih monocita u peritoneum, kao i proliferacija rezidentnih peritonealnih makrofaga (Eichner i Smeaton, 1983; Melnicoff et al., 1989). Ispiranje peritoneuma PBS-om izvršeno je 7 dana nakon *i.p.* injektiranja, kada većina ćelija u peritonealnom eksudatu predstavljaju makrofagi (Oghiso et al., 1992). Peritonealni ispirci se centrifugiraju (1200 obrtaja u minuti, 10 minuta na 4 °C), a zatim se dobijen ćelijski talog ispira PBS-om. Utvrđeno je (*Trypan blue* metodom) da je nakon ove procedure vijabilnost ćelija (koncentracija je podešena na $2,5 \times 10^6$ ćelija/ml) bila > 95%.

Slanovodni račići *Artemia salina*. Liofilizirane ciste (2 g) slanovodnih račića (*A. salina*) dodaju se u 1 L veštačke morske vode. Suspenzija se termostatira na 26 °C, uz aeraciju i konstantnu osvetljenost sijalicom od 60 W. Većina cisti se transformišu u roku od 48 sati.

Miševi. Miševi muškog pola soja BALB/c (20 ± 5 g), starosti 5 nedelja, dobijeni su iz Vivarijuma Instituta za biomedicinska istraživanja, Medicinski fakultet, Univerzitet u Nišu. Životinje su čuvane u grupama od po šest miševa pod standardnim laboratorijskim uslovima: dvanaestočasovni ciklusi svetla i mraka na 22 ± 2 °C sa stalno dostupnom hranom i vodom. Životinje su aklimatizovane na laboratorijske uslove najmanje 12 h pre testiranja (bez hrane, ali sa dostupnom vodom). Svi eksperimenti su sprovedeni u skladu sa principima zaštite i korišćenja laboratorijskih životinja u naučnim istraživanjima i odobreni su od strane lokalnog etičkog odbora (01-10204-05).

Pacovi. Pacovi muškog pola soja *Wistar*, starosti 3 meseca su uzgajani u Vivarijumu Instituta za biomedicinska istraživanja Medicinskog fakulteta u Nišu. Svi eksperimenti su sprovedeni u skladu sa principima zaštite i korišćenja laboratorijskih životinja u naučnim istraživanjima (Direktiva EU iz 2010; 2010/63/EU) i odobreni su od strane lokalnog etičkog odbora.

3.5.1. Određivanje *in vitro* aktivnosti

3.5.1.1. Ispitivanje antimikrobne aktivnosti mikrodilucionom metodom

Antimikrobna aktivnost je ispitivana bujon dilucionom metodom (Radulović et al., 2010). Određivanje minimalne inhibitorne koncentracije (MIK) je vršeno metodom serijskog razblaženja u bunarićima (96) mikrotitarskih ploča. Bakterije su uzgajane na *Mueller-Hinton* agaru na 37 °C, a gljivica na *Sabouraud* dekstroznom agaru na 30 °C. Nakon 18 sati kultivacije, pripremljene su suspenzije bakterija u *Mueller-Hinton* bujonu, a zatim je njihov turbiditet podešen na 0,5 jedinica *McFarland*-ove skale. Gustina kolonija ovako dobijenih inokuluma bakterija iznosila je 5×10^5 . Suspenzije gljivica su pripremljene u *Sabouraud* dekstroznom bujonu, a gustina (5×10^5) je podešena brojanjem ćelija u Tomaovoj komori. Rastvori jedinjenja su pripremljeni u 10%-om (v/v) vodenom rastvoru DMSO-a, a zatim su serijskim razblaženjem dobijeni rastvori u opsegu koncentracija 10 – 0,019 mg/ml (u slučaju *B. subtilis* pripremljeno je dodatnih 10 razblaženja). Bunarić ploče je inokuliran, a zatim je ploča

inkubirana na 37 °C tokom 24 h u slučaju bakterija ili 30 °C tokom 48 sati u slučaju *C. albicans*. Bakterijski rast je vizualizovan dodavanjem 20 µl 0,5%-og (w/v) vodenog rastvora 2,3,5-trifeniltetrazolijum-hlorida (TTC). Za MIK je uzimana najniža koncentracija jedinjenja koja je inhibirala rast mikroorganizama (crveno obojenje na dnu bunarića po dodavanju TTC-a), dok je minimalna baktericidna/fungicidna koncentracija (MBK/MFK) bila najniža koncentracija supstance koja ubija 99,99% mikroorganizama. MBK i MFK su određivane tako što je bujon iz svih bunarića u kojima nije došlo do rasta zasejan na *Mueller-Hinton* agaru i inkubiran tokom 24 h na 37 °C za bakterije, ili na *Sabouraud* dekstroznom agaru tokom 48 h na 30 °C za gljivicu. Svi eksperimenti su rađeni u triplikatu i ponovljeni 4 puta.

3.5.1.2. Uticaj na vijabilnost plućnih fibroblasta (MRC5) i ćelija melanoma (A375)

Određivanje vijabilnosti MTT testom. Vijabilnost ćelija je određena *in vitro* redukcijom 3-(4,5-dimetiltijazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolijum-bromida (MTT). Test je izveden 24 h nakon inkubiranja ćelija u medijumu koji sadrži jedinjenja u različitim koncentracijama, a na način kako je opisao Mihajlović sa saradnicima (2012). Komercijalni citostatik cisplatina (*cis*-diamminplatina(II)-dihlorid) je korišćen kao pozitivna kontrola. Rezultati su predstavljeni kao procenat u odnosu na vrednost kontrole (netretirane ćelije; izražena kao 100%), a IC₅₀ vrednosti su izračunate kao koncentracije pri kojima je zabeležena inhibicija rasta od 50%.

Analiza ćelijskog ciklusa. Ćelije ($2,5 \times 10^5$ po bunariću) su tretirane testiranim jedinjenjima (pri IC₅₀) tokom 24 h, zatim su odvojene od podloge digestijom sa tripsinom, pa fiksirane 70%-im (v/v) etanolom na 4 °C (30 min). Nakon ispiranja PBS-om, ćelije su inkubirane 30 min u mraku sa propidijum-jodidom (PI, Molecular Probes, Invitrogen, Karlsbad, Kalifornija) (20 mg/ml) i RNK-azom (0,1 mg/ml) na 37 °C. Crvena fluorescencija je određivana protočnom citometrijom (CyFlow Space Partec, Partec GmbH, Munster, Nemačka). Raspodela ćelija po različitim

fazama ćelijskog ciklusa analizirana je softverom Partec FloMax (Partec GmbH, Munster, Nemačka). Svi eksperimenti su ponovljeni tri puta.

Aneksin V-FITC/P. Ćelije ($2,5 \times 10^5$ po bunariću) tretirane gore navedenim jedinjenjima (pri IC_{50}) tokom 24 h, odvojene su od podloge tripsinskom digestijom i obojene sa AnnV-FITC/PI (Molecular Probes, Invitrogen, Karlsbad, Kalifornija). Obojene ćelije su prebrojane protočnom citometrijom (CyFlow Space Partec) i analizirane korišćenjem softvera Partec FloMax. Svi eksperimenti su ponovljeni tri puta.

3.5.1.3. Određivanje citotoksičnosti na makrofagima pacova i uticaja na mijeloperoksidaznu (MPO) aktivnost

Test kristal-violet (Crystal violet assay). Da bi se odredila vijabilnost adheriranih ćelija upotrebljeno je bojenje kristal-violetom (Flick i Glifford, 1984). Nakon 60 min inkubiranja ćelija sa jedinjenjima **5-3a** i **5-3b** (koncentracije 0,5, 1, 5, 10 i 50 μ M), ćelije su isprane PBS-om, a zatim su adherirane ćelije obojene 1%-im (*w/v*) rastvorom kristal-violeta na sobnoj temperaturi. Ploče su zatim isprane PBS-om, a preostali kristal-violet, koji se nalazi u ćelijama, ekstrahovan je etanolom. Apsorbanca rastvorene boje (proporcionalna broju adheriranih ćelija) određena je spektrofotometrijski (Multiscan Ascent, Labsystems, Finska) na 595 nm. Rezultati su prikazani kao procenat vijabilnosti u odnosu na kontrolne uzorke i kao OD (optička gustina), apsorbanca na 595 nm \times 1000. Svi eksperimenti su ponovljeni tri puta.

Određivanje MPO aktivnosti. Za određivanje MPO aktivnosti makrofaga korišćena je modifikovana metoda iz studije Mitić et al. (2011). Ukratko, suspenzije ćelija peritonealnih makrofaga su dodate u ploču sa 96 bunarića. Ploče su inkubirane 60 min na 37 °C u atmosferi 95% vazduh i 5% CO₂. Ne-adherirane ćelije su uklanjone ispiranjem ploča PBS-om (temperature 37 °C), čime je dobijen ujednačeni monosloj makrofaga na dnu bunarića. Adheriranim ćelijama su dodati rastvori supstanci **5-3a** i **5-3b** različitih koncentracija. MPO aktivnost određuje se pomoću 1,2-diaminobenzena u citratnom puferu koji je tretiran vodonik-peroksidom i tritonom X-100. Reakcija se zaustavlja 1 M rastvorom sumporne kiseline. Apsorbance su

izmerene spektrofotometrijski (Multiscan Ascent, Labsystems, Finska) na 540 nm. Rezultati se izražavaju kao OD, (apsorbanca na 540 nm) \times 1000. Svi eksperimenti su ponovljeni tri puta.

3.5.1.4. Inhibicija acetilholinesteraze (AChE)

Inhibicija AChE od strane jedinjenja **5-3a** i **5-3b** merena je kolorimetrijskom metodom koja se zasniva na Elmanovoj metodi (Radulović et al., 2013c). U svaki od 96 bunarića mikrotitarske ploče doda se po 25 μ l rastvora acetiltioholin-jodida (15 mM), 125 μ l 5,5-ditiobis(2-nitrobenzoewe kiseline) (3 mM) u puferu A (50 mM Tris-HCl, pH 7,9 koji sadrži 0,1 M NaCl i 0,02 M MgCl₂), 50 μ l pufera B (50 mM Tris-HCl, pH 7,9 koji sadrži 0,1% BSA) i 25 μ l rastvora supstance (0,156 – 40 μ g supstance u 1 ml 10% DMSO [v/v], geometrijska progresija koncentracija); apsorbanca se čita svakih 15 s tokom jednog minuta (5 merenja) na talasnoj dužini od 405 nm. Zatim se u svaki bunarić doda 25 μ l rastvora AChE (0,22 U/ml u puferu B), pa se ploča se inkubira na 25 °C tokom 10 min. Ponovo se mere apsorbanca (8 puta u intervalu od 15 sekundi). Vodeni rastvor DMSO-a (10%, [v/v]) se koristi kao negativna kontrola. Apsorbanca koja se javlja usled spontane hidrolize supstrata (merena pre dodavanja enzima, slepa proba) oduzima se od vrednosti apsorbanca nakon dodavanja AChE. Fizostigmin (0,12 – 15 μ mol/ml) je korišćen kao pozitivna kontrola. Svi eksperimenti su izvedeni u triplikatu i ponovljeni su tri puta.

3.5.2. Određivanje *in vivo* aktivnosti

3.5.2.1. Određivanje akutne toksičnosti u modelu račića *Artemia salina*

U Petrijeve šolje, koje sadrže jedinjenja **5-3a**, **5-3b**, **[6-1a]**-**[6-11a]** (u koncentracijama 10⁻⁶, 10⁻⁵, 10⁻⁴ M) rastvorena u veštačkoj morskoj vodi doda se po 20 nauplija (konačna koncentracija DMSO-a bila je manja od 1% [v/v]). Uzorci nisu aerisani, ali su Petrijeve šolje bile konstantno osvetljene. Nakon 24 i 48 h, prebrojavani su mrtvi račići, a LD₅₀ vrednost (koncentracija smrtonosna za 50% populacije nauplija) je određena

statističkom analizom. Kao pozitivna kontrola korišćeni su rastvori različitih koncentracija natrijum-dodecilsulfata (SDS).

3.5.2.2. Određivanje antinociceptivne aktivnosti

Tretman oglednih životinja. Etarsko ulje biljne vrste *F. ovina* (FO), bornil-4-metoksibenzoat, morfin i kapsaicin su rastvoreni u zapremini od 0,3 ml maslinovog ulja po životinji pred sam test. Šest eksperimentalnih i dve kontrolne grupe, sa šest životinja po grupi, korišćene su u testovima abdominalnog grčenja izazvanih sirćetnom kiselinom i testovima osetljivosti na termalni nadražaj. Za test dinamičke vruće ploče (*dynamic hot plate*, DHP) korišćene su još tri grupe životinja i supstance su nanošene na zadnje šape životinja. Za ostale testove, FO i bornil-4-metoksibenzoat su životinjama davani intraperitonealno (*i.p.*) u dozama od 50, 100 i 200 mg/kg. Kontrolne grupe su primile morfin (u dozi 5 mg/kg), acetilsalicilnu kiselinu (ASA; pozitivna kontrola za test abdominalnog grčenja) i maslinovo ulje (negativna kontrola).

Test abdominalnog grčenja (abdominal writhing test). Metoda je opisana u Radulović et al. (2012). Nakon davanja sirćetne kiseline (1%, *v/v, i.p.*) meri se broj abdominalnih grčeva tokom 20 min. Grčenje se definiše kao kontrakcija abdominalnih mišića praćena ekstenzijom prednjih i zadnjih udova i izduženjem tela. Procenat inhibicije grčenja računa se po formuli: Procenat inhibicije = $100 \times [\text{broj grčeva (kontrola)} - \text{broj grčeva (test)}] / \text{broj grčeva (kontrola)}$.

Metoda vruće ploče (Hot plate test). Životinje su stavljene na vruću ploču temperature 55 ± 1 °C, a kao reakcija na bolni (termalni) nadražaj smatra se lizanje prednjih i zadnjih šapa ili poskakivanje. Da bi se izbeglo oštećenje kože, trajanje testa je ograničeno na 20 sekundi. Bazna reakcija na bol je definisana kao vreme potrebno da životinja reaguje 60 i 30 minuta pre injektiranja jedinjenja ili kontrole i predstavlja normalnu reakciju životinje na povišenu temperaturu. Vreme reakcije je mereno 15, 30, 45, 60, 90 i 120 min nakon tretmana. Povećanje bazne linije se računa po formuli $IB^5 = ((\text{vreme reakcije} \times 100) / \text{BL}) - 100$, gde je BL vrednost bazne linije.

⁵ Increase in Baseline

Antinociceptivnost je kvantifikovana kao površina ispod grafika zavisnosti (AUC^6) i računa se kao zbir AUC_1 ($AUC_1 = 15 \times [IB(\min15)/2 + IB(\min30) + IB(\min45) + IB(\min60)/2]$) i AUC_2 ($AUC_2 = 30 \times [IB(\min60)/2 + IB(\min90) + IB(\min120)/2]$). Procenat produženja vremena reakcije životinje pod dejstvom morfina, odnosno svake koncentracije FO i BMB se računa po formuli: $\% = AUC/\max$; gde je $\max = [(20 \times 100)/BL - 100] \times 105$.

Test uranjanja repa. Deo repa dužine 5 cm se uranja u sud sa vodom koja je održavana na temperaturi $50 \pm 0,5$ °C. U testu se meri vreme (15, 30, 45, 60, 90 i 120 minuta posle davanja FO, bornil-4-metoksibenzoata i kontrola) potrebno da životinja izvuče rep iz vode. Procenat inhibicije se računa po formuli kao u metodi vruće ploče.

Test dinamičke vruće ploče (Dynamic hot plate test). Test je izveden po metodi iz rada Yalcin-a i saradnika (2009). DMSO (negativna kontrola), kapsaicin (pozitivna kontrola, 10 mM u DMSO-u) ili bornil-4-metoksibenzoat (10 mM u DMSO-u) su nanošeni na šape životinja 15 minuta pre nego što se postave na zagrejanu ploču. Inicijalna temperatura ploče je $30 \pm 0,1$ °C (kada se životinja stavi na nju), a zatim se povećava do 43 °C brzinom od 1 °C/min. Za svaki interval od 1 min beleži se koliko puta životinja liže šape, koliko je puta poskočila ili koliko se puta uspravila na zadnje noge.

3.6. Statistička analiza

Rezultati su izraženi kao srednja vrednost \pm standardna devijacija. Statistička značajnost razlika između grupa je utvrđivana jednofaktorskom analizom varijanse (ANOVA⁷) i Tjukijevim *post-hoc* testom za višestruka poređenja (softver Graphpad Prism verzija 5.03, San Dijego, Kalifornija). Vrednosti verovatnoće (p) manje od 0,05 smatrane su statistički značajnim.

⁶ *Area Under the Curve*

⁷ *Analysis of Variance*

4. REZULTATI I DISKUSIJA

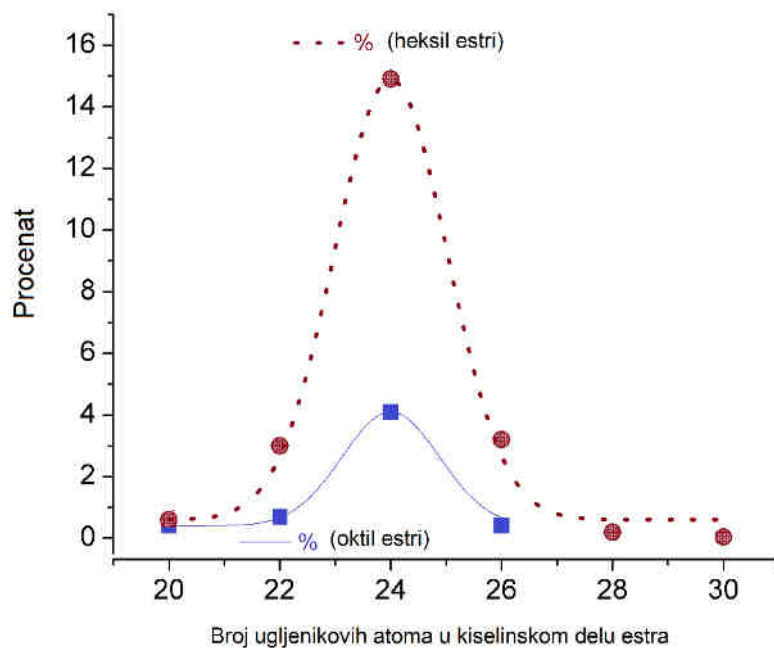
4.1. Sekundarni metaboliti odabranih biljnih vrsta: sinteza, izolovanje i spektralna karakterizacija

4.1.1. Identifikacija i rasprostranjenje *n*-oktil-estara dugolančanih masnih kiselina: da li su ovi estri markeri antropogenog zagađenja?

Identifikovani sastojci voska vrste *H. sphondylium*, njihov procentni sastav, odnosno sadržaj u biljnom materijalu (u μg po g svežih cvetova), RI vrednosti i metode identifikacije predstavljeni su u tabeli 2. Identifikovana jedinjenja čine oko 95% ukupne površine ispod detektovanih pikova, a više od 50% čine *n*-alkani. Raspodela relativnih sadržaja *n*-alkana ima očekivani oblik Gausove krive, sa visokom CPI vrednošću (CPI, skraćeno od *carbon preference index* predstavlja odnos zastupljenosti alkana sa neparnim i alkana sa parnim brojem atoma ugljenika) – 5,0, i sa maksimumom na C₂₉ (za više detalja o gausovskoj raspodeli alkana u biljkama, videti Radulović et al. 2012b). Nonakozan je prethodno, takođe, identifikovan kao najzastupljeniji alkan u vosku listova *H. sphondylium* (Maffei, 1996), ali sa nešto nižom vrednošću CPI – 2,2. Pored alkana u vosku su bili prisutni i *n*-heksil (25%) i *n*-oktil (5%) alkanoati. Identitet ovih estara potvrđen je njihovom sintezom iz odgovarajućih karboksilnih kiselina i 1-heksanola ili 1-oktanola i naknadnim GC ko-injektiranjem čistih jedinjenja sa ispirom.

Prisustvo *n*-oktil-estara u vosku nije neočekivano jer je prethodnim istraživanjima (Iskan et al., 2003, 2004; Ozek et al., 2002, 2005) već pokazano da ova biljna vrsta biosintetiše značajne količine 1-oktanola – ovaj alkohol i njegovi acetati i/ili butirati su identifikovani kao glavni sastojci etarskih ulja plodova biljne vrste *H. sphondylium*, a koja su izolovana hidrodestilacijom iz biljnog materijala u značajnom prinosu (3,7%, v/w). Veća zastupljenost estara čiji kiselinski deo sadrži paran broj ugljenika, što je vidljivo iz visokih CPI vrednosti (8,8 za heksil i 9,3 za oktil estre), ukazuje na njihovo biogeno poreklo. Relativna zastupljenost heksil i oktil estara ima gausovsku raspodelu (slika 1) oko tetrakozanoata – slično kao i kod *n*-alkana, što se slaže sa biosintetskim putevima ovih jedinjenja (Radulović et al., 2012b). Prirodno poreklo ovih heksil- i oktil-estara je vidljivo iz gotovo beznačajne razlike u kvalitativnom i

kvantitativnom sastavu voska koji je izolovan iz uzoraka sa različitih lokacija (ukupno 14, među njima su bile lokacije sa različitim stepenom zagađenja).



Slika 1. Gausovska raspodela sadržaja heksil- i oktil-estara nađenih u vosku biljne vrste *H. sphondylium*

Tabela 2. Hemijski sastav voska cvetova vrste *H. sphondylium*

RI ^{a)}	Jedinjenje	Količina [%] ^{b)}	Količina [$\mu\text{g/g w/w}$] ^{c)}	ID ^{d)}
1963	Heksadekanska kiselina	$2,0 \pm 0,1$	$9,8 \pm 0,2$	MS, RI, GC
2000	Eikozan	t	$0,3 \pm 0,1$	MS, RI, GC
2100	Heneikozan	$1,0 \pm 0,1$	$5,1 \pm 0,2$	MS, RI, GC
2172	Oktadekanska kiselina	t	$0,4 \pm 0,1$	MS, RI, GC
2200	Dokozan	$0,3 \pm 0,1$	$1,3 \pm 0,2$	MS, RI, GC
2229	Eikozanal	t	/	MS, RI
2280	1-Eikozanol	$0,2 \pm 0,1$	$1,6 \pm 0,2$	MS, RI, GC
2300	Trikozan	$3,7 \pm 0,1$	$17,2 \pm 0,7$	MS, RI, GC
2400	Tetrakozan	$0,9 \pm 0,1$	$4,4 \pm 0,3$	MS, RI, GC
2463	2-Metiltetrakozan	t	/	MS, RI
2482	1-Dokozanol	$0,2 \pm 0,1$	$0,7 \pm 0,1$	MS, RI, GC
2500	Pentakozan	$7,7 \pm 0,2$	$37,9 \pm 2,5$	MS, RI, GC
2563	2-Metilpentakozan	t	/	MS, RI
2572	3-Metilpentakozan	t	/	MS, RI
2600	Heksakozan	$3,3 \pm 0,2$	$15,2 \pm 1,4$	MS, RI, GC
2611	Dokozil-acetat	$0,4 \pm 0,1$	$2,3 \pm 0,2$	MS, RI, GC
2663	2-Metilheksakozan	t	/	MS, RI
2700	Heptakozan	$10,0 \pm 0,3$	$48,2 \pm 4,4$	MS, RI, GC
2710	Trikozil-acetat	$0,2 \pm 0,1$	/	MS, RI

2761	2-Metilheptakozan	0,2 ± 0,1	/	MS, RI
2780	Heksil-eikozanoat	0,6 ± 0,1	2,9 ± 0,7	MS, RI, GC
2800	Oktakozan	3,0 ± 0,2	14,7 ± 1,3	MS, RI, GC
2810	(E,E,E,E)-skvalen	6,2 ± 0,1	/	MS, RI
2810	Tetrakozil-acetat	t	0,3 ± 0,1	MS, RI, GC
2882	Heksil-heneikozanoat	t	0,8 ± 0,3	MS, RI, GC
2900	Nonakozan	17,0 ± 0,3	85,5 ± 7,1	MS, RI, GC
2975	Oktil-eikozanoat	0,4 ± 0,1	2,1 ± 0,3	MS, RI, GC
2982	Heksil-dokozanoat	3,0 ± 0,1	15,5 ± 2,4	MS, RI, GC
3000	Trikontan	0,9 ± 0,1	4,1 ± 0,7	MS, RI, GC
3075	Oktil-heneikozanoat	t	0,5 ± 0,1	MS, RI, GC
3076	γ-Tokoferol	1,0 ± 0,1	4,7 ± 0,2	MS, RI, GC
3083	Heksil-trikozanoat	1,3 ± 0,1	5,9 ± 0,6	MS, RI, GC
3100	Hentriakontan	5,0 ± 0,1	23,1 ± 1,7	MS, RI, GC
3121	2-Nonakozanon	t	/	MS, RI
3175	Oktil-dokozanoat	0,7 ± 0,1	3,2 ± 0,3	MS, RI, GC
3182	Heksil-tetrakozanoat	14,9 ± 0,3	70,0 ± 7,4	MS, RI, GC
3200	Dotriakontan	0,4 ± 0,1	2,1 ± 0,3	MS, RI, GC
3209	Oktakozil-acetat	t	/	MS, RI
3275	Oktil-trikozanoat	0,2 ± 0,1	1,1 ± 0,2	MS, RI, GC
3282	Heksil-pentakozanoat	1,2 ± 0,1	0,4 ± 0,1	MS, RI, GC

3300	Tritriakontan	t	0,3 ± 0,1	MS, RI, GC
3306	2-Feniletil-dokozanoat	t	0,4 ± 0,1	MS, RI, GC
3350	2-Hentriakontanon	0,2 ± 0,1	/	MS, RI
3375	Oktil-tetrakozanoat	4,1 ± 0,1	20,0 ± 3,5	MS, RI, GC
3382	Heksil-heksakozanoat	3,2 ± 0,1	14,1 ± 2,2	MS, RI, GC
3400	Tetratriakontan	t	0,4 ± 0,1	MS, RI, GC
3406	Benzil-tetrakozanoat	t	/	MS, RI
3475	Oktil-pentakozanoat	0,4 ± 0,1	2,0 ± 0,2	MS, RI, GC
3506	2-Feniletil-tetrakozanoat	0,4 ± 0,1	2,0 ± 0,1	MS, RI, GC
3575	Oktil-heksakozanoat	0,4 ± 0,1	2,1 ± 0,5	MS, RI, GC
3582	Heksil-oktakozanoat	0,2 ± 0,1	1,1 ± 0,2	MS, RI, GC
3606	2-Feniletil-pentakozanoat	t	0,5 ± 0,1	MS, RI, GC
3706	2-Feniletil-heksakozanoat	t	0,7 ± 0,1	MS, RI, GC
3782	Heksil-trikontanoat	t	0,3 ± 0,1	MS, RI, GC

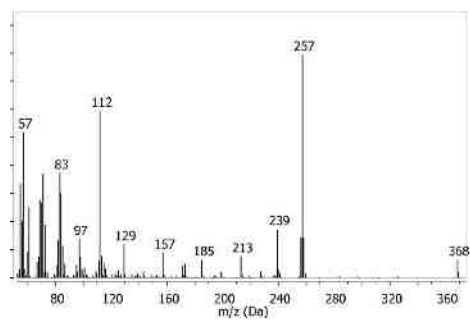
^{a)} RI: Retencioni indeks (izračunat u odnosu na C₁₉-C₃₈ *n*-alkane na DB-5MS koloni); ^{b)} Procentni sastav izračunat iz površine pikova FID hromatograma bez upotrebe korekcionih faktora, t označava sastojke prisutne u tragovima (<0,1%); ^{c)} procentni sastav dobijen kvantifikacijom pomoću kalibracione krive; ^{d)} ID: metoda identifikacije, MS: sastojak identifikovan poređenjem masenih spektara, RI: sastojak identifikovan pomoću poređenja vrednosti RI; GC: identifikacija potvrđena pomoću GC ko-injektiranja sa standardom; /: sastojak nije kvantifikovan pomoću GC-kalibracione krive.

Svi identifikovani oktil-estri predstavljaju nove prirodne sastojke, osim oktil-dokozanoata koji je prethodno pronađen u žbunu *Melastoma melabathricum*, Melastomataceae (Dinda i Saha, 1986) i u vrstama drveća *Dichrostachys cinerea*, Fabaceae (Jain i Saxena, 2003) i *Ailanthus excelsa*, Simaroubaceae (Sharma et al., 2008). Heksil-estri heneikozanske i trikozanske kiseline takođe predstavljaju nova prirodna jedinjenja. Ostali heksil-alkanoati koje smo identifikovali su već poznata jedinjenja, pronađena u ekstraktu cvetova biljnih vrsta *Lonicera fragrantissima*, Caprifoliaceae (Radulović et al., 2009) i *Ilex aquifolium*, Aquifoliaceae (Van Genderen et al., 1988). Novo prirodno jedinjenje je i 2-feniletil-pentakozanoat, a njegov identitet je potvrđen sintezom.

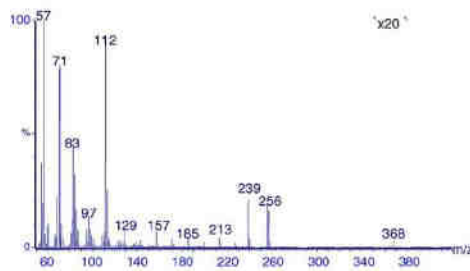
Neki od oktil-estara koje smo identifikovali predloženi su za markere zagađenja gradskim otpadnim vodama u živom svetu (Chaler et al., 2004). S obzirom da smo mi utvrdili da su ovi estri prirodnog porekla, kao sastojci voska *H. sphondylium*, oni ne mogu da se smatraju markerima zagađenja jer se prirodno mogu naći u uzorcima. Da bi proverili rezultate Chaler-a i saradnika, uporedili smo spektralne podatke za oktil-estre iz studije ovih španskih istraživača sa podacima dobijenim za naša sintetisana jedinjenja. Jedini potpun maseni spektar u publikaciji Chaler-a i saradnika bio je spektar oktil-heksadekanoata, pa smo sintetisali ovo jedinjenje i snimili njegov spektar (slika 2). Maseni spektri oktil-estara iz rada Chaler-a i saradnika (2004) sadrže intenzivni jon na m/z 112 (najverovatnije nastao Meklafertijevim premeštanjem, a u slučaju n -oktil-heksakozanoata on je bio drugi po intenzitetu (odmah nakon jona na m/z 57). Intenzitet jona m/z 112 u spektru istog jedinjenja koje smo mi sintetisali bio je 78% od osnovnog jona (m/z 57) koji se u ovom slučaju nalazio na m/z 257. Ova i još neke izražene razlike (obratiti pažnju na različite intenzitete fragmentnih jona na m/z 256, koji potiče od $[RCOOH]^+$, i m/z 257 $[RCOOH_2]^+$) jasno su vidljive sa slike 2 gde su navedeni maseni spektri oktil-heksadekanoata (b) iz rada španskih istraživača i spektar našeg standarda (a) (koji nije nađen u vosku biljne vrste *H. sphondylium*, ali je sintetisan radi poređenja).

Takve razlike se obično javljaju kod izomernih jedinjenja koja se razlikuju u razgranatosti (na mestu grananja se formira stabilniji katjon) (McLafferty i Turecek, 1993). Ovo, kao i činjenica da su *Chaler* i saradnici uz ovaj oktil-estar identifikovali i brojne 2-etilheksil estre (ftalate i heksandioate) nas je navelo na pretpostavku da su estri 2-etil-1-heksanola (poznati prekursor u dobijanju plastifikatora, Radulović i Blagojević, 2012) pogrešno identifikovani kao *n*-oktil-estri. Da bismo potvrdili ovu hipotezu, sintetisali smo odgovarajuće estre 2-etil-1-heksanola i utvrdili da se maseni spektri ovih estara skoro idealno poklapaju sa masenim spektrima koje su objavili *Chaler* i saradnici (2004), videti sliku 2c.

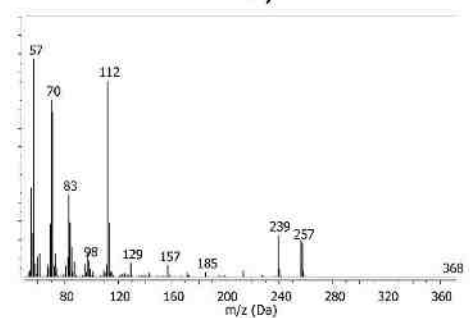
Prema svemu gore navedenom, verujemo da je potrebno izvršiti ispravku u identifikaciji, te da su jedinjenja (navodno oktil-estri) koje su *Chaler* i saradnici (2004) identifikovali kao markere otpadnih voda u živom svetu u stvari 2-etil-1-heksil-estri viših masnih kiselina, to jest da oktil-estri ne predstavljaju markere zagađenja.



a)



b)



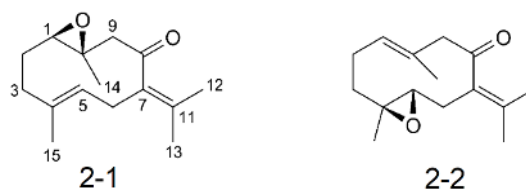
c)

Slika 2. Maseni spektri: a) *n*-oktil-heksadekanoata; b) *n*-oktil-heksadekanoata (preuzet iz Chaler et al., 2004); c) 2-etilheksil-heksadekanoata.

4.1.2. Metaboliti biljne vrste *G. macrorrhizum* i sinteza epoksigermakrona

4.1.2.1. Izolovanje i određivanje strukture

Jedinjenja **2-1** i **2-2** (šema 52) izolovana su iz etarskog ulja nadzemnog dela *G. macrorrhizum* nakon dve uzastopne hromatografije na koloni silikagela. Molekulske formule ova dva jedinjenja određene su na osnovu analize njihovih EI masenih spektara. U oba slučaja se molekulski jon nalazio na m/z 234,2, a intenzitet $[M+1]^+$ jona bio je 16,5% od intenziteta M^+ jona, što je ukazivalo da jedinjenja **2-1** i **2-2** sadrže po 15 C-atoma. ^{13}C NMR spektri oba jedinjenja su takođe sadržala 15 neekvivalentnih signala koji potiču od jednog C=O ugljenika, 4 sp^2 ugljenika (dve C=C veze) i 10 alifatičnih C-atoma ($\delta < 100$ ppm). Jedina logična molekulska formula monoizotopske mase 234,2, sa 15 C-atoma i najmanje jednim O-atomom je $\text{C}_{15}\text{H}_{22}\text{O}_2$. Tri nezasićenja potiču od dve C=C veze i jedne C=O grupe, a preostala dva nezasićenja predstavljaju dva prstena. IR spektri jedinjenja **2-1** i **2-2** ukazuju na prisustvo α,β -nezasićene karbonilne grupe (1672 cm^{-1} kod **2-1**) i epoksi (840 cm^{-1} kod **2-1**) grupe.

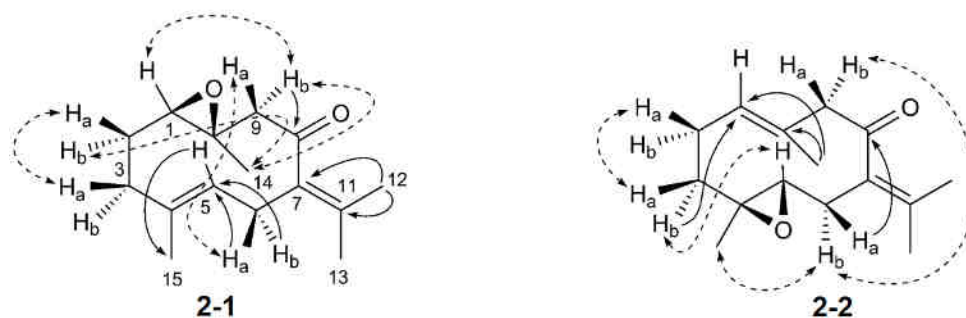


Šema 52

NMR karakterizacija 1,10-epoksigermakrona (2-1) u CDCl_3 . Konektivnost je određena analizom 2D-NMR spektara, pre svega ^1H - ^1H -COSY, HSQC i HMBC (slika 3; prikazana je i numeracija C-atoma). Signal karbonilne grupe, C-8, pokazuje HMBC interakcije sa signalima vodonika na δ 2,48 i 2,97 (oba vodonika vezana su za isti ugljenik čiji je signal na δ 55,2). Ovakve vrednosti hemijskih pomeranja mogu se očekivati za CH_2 protone pored C(8)=O grupe. Ovaj ugljenik (C-9) koreliše sa vodoncima metil grupe (δ_{H} 1,27; δ_{C} 17,4), koji dodatno korelišu sa dva oksigenovana ugljenika, neprotonovanim ugljenikom na δ 57,7 i CH-ugljenikom na δ 64,5. Očigledno je da su ovi ugljenici deo epoksidnog prstena (δ 57,7 [C-

10], 64,5 [C-1]), a HMBC korelacija signala δ_H 2,48 i δ_C 57,7 dodatno potvrđuje ovu konektivnost.

Signali vodonika metil grupe na δ_H 1,77 (δ_C 19,9) korelišu sa ugljenikom na δ 22,2 (radi se o ugljeniku metil grupe za koji su vezani protoni na δ 1,67) i obrnuto, postoji korelacija signala na δ_H 1,67 sa signalom na δ_C 19,9. Ovo je moguće samo ako su ove metil grupe geminalne i vezane za isti C-atom dvogube veze (δ_C 138,0). Ovaj ugljenik i ugljenik na δ 130,1 čine izopropilidensku grupu u molekulu.

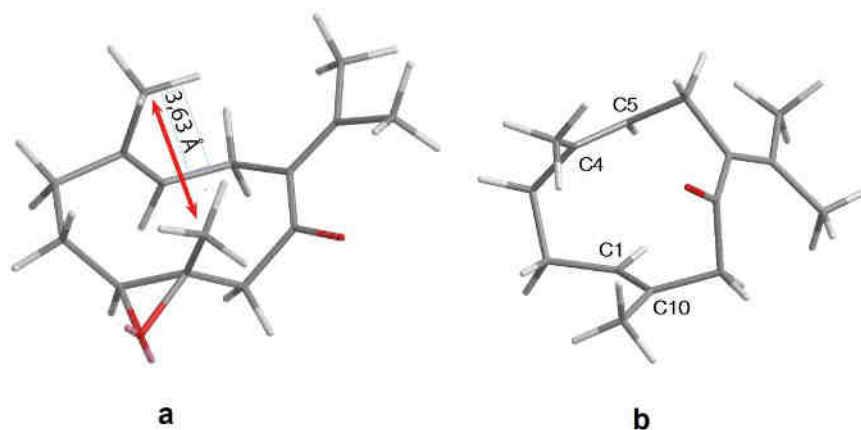


Slika 3. HMBC (H → C) i NOESY (H ↔ H) interakcije jedinjenja 2-1 i 2-2

Jedini H-atom C=C veze (δ 5,02, vezan za ugljenik čiji se signal nalazi na δ 123,7 [C-5]) kuplovan je sa dva dijastereotopna H-atoma čije su rezonance na δ 2,86 i 3,07 (vodonici su vezani za C-atom na δ 29,9, C-6). Vrednost hemijskog pomeranja vodonika ukazivala je na CH₂ grupu vezanu za dva *sp*² C-atoma (C-5 i C-7). Uočena je i HMBC interakcija između C-5 i Me grupe (δ_C 15,5; δ_H 1,54) što je moguće samo ako je Me grupa vezana za drugi kraj C=C veze (δ 134,0, C-4). Ovi metil protoni korelišu sa CH₂ ugljenikom (δ 36,5, C-3); C-3 koreliše sa H-atomima preostale metilenske grupe (δ_C 23,3; δ_H 2,00 i 1,43, C-2). S obzirom da su na ovaj način svi signali C-atoma u molekulu asignirani, zaključujemo da je molekul jedan od stereoizomera 1,10-epoksigermakrona.

Kompletna NMR asignacija (uključujući asignaciju signala dijastereotopnih H-atoma) i određivanje relativne stereochemije izvršeno je analizom NOESY spektra. NOESY interakcija H-atoma hemijskih pomeranja δ 1,27

i 1,57 (slika 3) bila je presudna za razlikovanje mogućih stereoizomera. Konformeri najnižih energija (1*S**,10*S**)- i (1*S**,10*R**)-dijastereoizomernih epoksida modelovani su i optimizovani programom HyperChem v. 7.0 (Gejnsvil, Florida, SAD), uz korišćenje metode AM2. Na slici 4a, na modelu (1*S**,10*S**)-stereoizomera naznačena je i pomenuta NOESY interakcija. Kod drugog dijastereoizomera ne postoje uslovi (prostorna blizina) za pojavu ove dipolarne interakcije. Kompletna asignacija hemijskih pomeranja prikazana je u tabeli 3. Ovaj epoksid je prethodno izolovan samo dva puta (Bohlmann i Zdero, 1973; Ulubelen et al., 1986) iz biljnog roda *Smyrniium*. U ovoj tezi po prvi put je izvršena potpuna asignacija svih rezonanci C- i H-atoma (do sada su se u literaturi mogli naći samo nepotpuni spektralni podaci, Hikino et al., 1977).



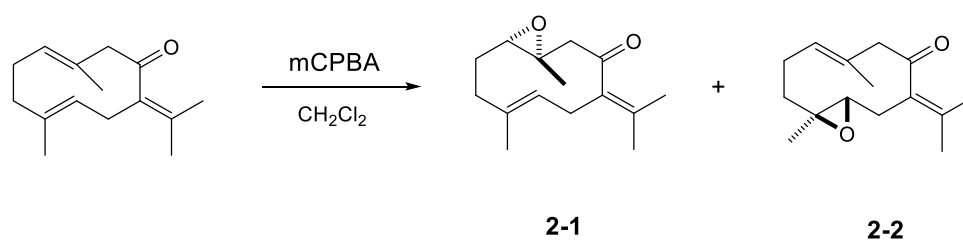
Slika 4. Molekulski modeli a) jedinjenja 2-1 i b) germakrona, dobijeni AM2 minimizacijom energije (uz korišćenje HyperChem softvera)

Tabela 3. ¹H (500 MHz) i ¹³C NMR (125 MHz) pomeranja jedinjenja **2-1** i **2-2** u CDCl₃.

Pozicija	Germakron-1,10-epoksid (2-1)		Germakron-4,5-epoksid (2-2)	
	δ _C (ppm)	δ _H (ppm)	δ _C (ppm)	δ _H (ppm)
C(1)	64,5	2,72, <i>d</i> , <i>J</i> = 10,8 Hz	129,7	5,20, <i>d</i> , <i>J</i> = 5,0 Hz
C(2)	23,3	a: 2,00, <i>m</i> , <i>J</i> = 10,4 Hz b: 1,43, <i>m</i>	24,6	a: 2,22, široki signal b: 2,32, široki signal
C(3)	36,5	a,b: 2,2, <i>m</i>	37,6	a: 1,15, <i>ddd</i> , <i>J</i> = 6,5, 12,5, 12,5 Hz b: 2,15, <i>dd</i> , <i>J</i> = 12,5, 6,5 Hz
C(4)	134,0		60,8	
C(5)	123,7	5,02, <i>d</i> , <i>J</i> = 9,8 Hz	64,6	2,43, <i>dd</i> , <i>J</i> = 2,0, 10,5 Hz
C(6)	29,9	a: 3,07, <i>dd</i> , <i>J</i> = 11,3 Hz b: 2,86, <i>d</i> , <i>J</i> = 11,3 Hz	29,5	a: 2,88, <i>d</i> , <i>J</i> = 14,0 Hz b: 2,05, <i>d</i> , <i>J</i> = 10,5, 14,0 Hz
C(7)	130,1		134,6	
C(8)	209,9		204,7	
C(9)	55,2	a: 2,97, <i>d</i> , <i>J</i> = 10,9 Hz b: 2,48, <i>dd</i> , <i>J</i> = 10,9, 0,5 Hz	55,5	a: 3,45, široki signal b: 3,01, široki signal
C(10)	57,7		126,6	
C(11)	138,0		133,7	
C(12)	22,2	1,67, <i>s</i>	20,4	1,83, <i>s</i>
C(13)	19,9	1,77, <i>s</i>	22,8	1,82, <i>s</i>
C(14)	17,4	1,27, <i>s</i>	17,0	1,72, <i>s</i>
C(15)	15,5	1,54, <i>s</i>	15,9	1,02, <i>s</i>

NMR karakterizacija 4,5-epoksigermakrona (**2-2**) u $CDCl_3$. Struktura jedinjenja **2-2** određena je na sličan način kao i struktura jedinjenja **2-1**. NOESY spektar je opet bio od presudne važnosti za utvrđivanje (4*S**,5*S**)-konfiguracije molekula i za razlikovanje dijastereotopnih H-atoma. Neke od HMBC i NOESY interakcija prikazane su na slici 3. Apsolutne konfiguracije hiralnih centara u jedinjenjima **2-1** i **2-2** nisu određivane.

Sinteza. Strukture jedinjenja **2-1** i **2-2** dodatno su potvrđene sintezom. Epoksidacija germakrona (izolovanog iz etarskog ulja *G. macrorrhizum*) *m*-hlorperbenzoevom kiselinom (*m*CPBA) daje dva regioizomerna epoksida **2-1** i **2-2**. Uočena je ista regioselektivnost reakcije kao u studijama Piet-a i saradnika (1995) i *Kuroyanagi*-ja i saradnika (1990) – 4,5-epoksid (**2-2**) se gradi u višku. Sporedni proizvod (1,10-epoksigermakron, **2-1**) izolovan je u količini koja je bila dovoljna za snimanje NMR spektara. Spektralni podaci sintetisanih jedinjenja bili su identični sa onima izolovanih epoksida. Potvrda identiteta izvršena je GC ko-injektiranjem etarskog ulja sa sintetisanim jedinjenjima.



Šema 53

Biosinteza. U dostupnoj literaturi, dva epoksi derivata germakrona se navode kao metaboliti germakrona nastali biotransformacijom od strane mikroorganizama (Hikino et al., 1977). Molekulsko modelovanje konformacija germakrona omogućilo nam je da ispitamo da li dva epoksida mogu da nastanu neenzimskom oksidacijom germakrona, najzastupljenijeg seskviterpenskog ketona u ulju *G. macrorrhizum* (u gore navedenoj reakciji ulogu oksidansa ima *m*CPBA; u biološkim sistemima bi to mogao da bude atmosferski O_2). Naša namera je bila da utvrdimo da li je jedna od dve C=C veze sterno zaštićenija – napad O_2 vrste na ovu dvogubu vezu dao bi manju

količinu odgovarajućeg epoksida. U etarskom ulju detektovane su približno iste količine oba epoksida, dok se sintetska smeša nakon epoksidacije sastojala uglavnom od 4,5-epoksida **2-2**. Naša računanja za gasnu fazu (HyperChem, AM2 model, slika 2-2b) pokazala su sličnu izloženost obe dvogube veze [C(4)=C(5) i C(1)=C(10)], što ukazuje da je selektivnost reakcije epoksidacije sa *m*CPBA posledica sternih karakteristika oksidansa ili uticaja rastvarača. Međutim, ne treba očekivati da mali oksidans (kao na primer O₂) može da razlikuje dve olefinske grupe na način na koji bi to mogao biomolekul. Stoga je naša pretpostavka da su dva epoksida nastala u neenzimskoj reakciji koja se odvijala u živoj biljci, tokom skladištenja biljnog materijala ili tokom hidrodestilacije (ulje je podvrgnuto GC-MS analizama odmah nakon izolovanja). U ranijim studijama su već zabeleženi slučajevi formiranja epoksida auto-oksidacijom terpena (Blagojević et al., 2006). Međutim, čini se da je u drugim biljnim vrstama 4,5-epoksi jedinjenje biogenetskog porekla (Shiobara et al., 1985), što potvrđuju relativno velike detektovane količine ovog jedinjenja (i veća učestalost pojave među sekundarnim metabolitima biljnih vrsta) u poređenju sa 1,10-epoksidom.

4.1.3. Identifikacija estara iz etarskog ulja biljne vrste *Ferula ovina* (Boiss.) Boiss.

Sastav etarskog ulja. GC-MS analize su pokazale da se etarsko ulje biljne vrste *F. ovina* (Apiaceae) sastoji najvećim delom od monoterpenskih ugljovodonika (α -pinen [17,8%], limonen [14,3%] i mircen [13,0%], videti tabelu 4). Ovakav sastav je u skladu sa prethodno objavljenim podacima za ovu biljnu vrstu (Ghannadi et al., 2002; Rahmani et al., 2008). Analize su takođe pokazale prisustvo velikog broja aromatičnih estara čije su RI vrednosti bile veće od 1700. Mogući identitet kiselinskog dela estara je mogao da bude pretpostavljen na osnovu masenih spektara estara, na primer, fragmentni jon karakterističan za sve benzoate javljao se na m/z 105 ($C_6H_5CO^+$); takođe metoksibenzoati (m/z 135), hidroksibenzoati (m/z 121) i hidroksimetoksibenzoati (m/z 151) su prepoznati na osnovu karakteristične fragmentacije. Kod svih uočenih estara razlika u masama molekulskih i osnovnih jona ($ArCO^+$) iznosila je 153 amu, što ukazuje da su alkoholni deo estara činili monoterpenoli molekulske formule $C_{10}H_{18}O$ ($M_r = 154$). Međutim, maseni spektri estara nisu bili dovoljno informativni da se pomoću njih razlikuju estri različitih izomera monoterpenskih alkohola. Njihov identitet je utvrđen sintezom tih estara i GC ko-injektiranjem sintetskih uzoraka sa etarskim uljem. Pošli smo od pretpostavke da monoterpenki alkoholi (borneol, *endo*-fenhol, geraniol i nerol, videti tabelu 5), koji su detektovani u ulju, ulaze u sastav estara pomenutih aromatičnih kiselina. Iako na osnovu masenih spektara nije bilo moguće odrediti koji regioizomeri metoksibenzoeve i hidroksibenzoeve kiseline ulaze u sastav estara, odlučili smo da za sintezu koristimo *para*-izomere jer su *p*-hidroksi- i *p*-metoksibenzoati već identifikovani kao sekundarni metaboliti taksona roda *Ferula*. Sve moguće kombinacije estara pripremljene su Štegljivim kuplovanjem, a zatim su koinjektirani sa uzorkom ulja (tabela 5). Sintetisani su i izobornil- i mentil-estri pomenutih kiselina da bi ispitali da li je moguće utvrditi alkoholni deo aromatičnog estra samo na osnovu prisustva ili odsustva molekuskog jona (bez obzira na broj nezasićenja alifatičnog monoterpenola).

Od 24 sintetisana jedinjenja, GC ko-injekcijom je utvrđeno prisustvo 6 estara u ulju (bornil-estri sve četiri kiseline, kao i vanilati i benzoati *endo-fenhola*). Pretragom literature je utvrđeno da je bornil-4-metoksibenzoat novi prirodni proizvod. Dodatne količine ovog estra su sintetisane za farmakološke testove i potpunu strukturnu karakterizaciju. Struktura je potvrđena na osnovu 1D- i 2D-NMR spektara i rendgenskom strukturnom analizom kristala ovog estra.

Tabela 4. Procentni sastav etarskog ulja biljne vrste *Ferula ovina*

RI ^{a)}	Jedinjenje	% ^{b)}	ID ^{c)}	Klasa ^{d)}
846	(2 <i>E</i>)-heksenal	t	RI, MS, Co-GC	FAD
921	triciklen	0,7	RI, MS	M
932	α -pinen	17,8	RI, MS, Co-GC	M
946	kamfen	6,3	RI, MS, Co-GC	M
969	sabinen	0,4	RI, MS, Co-GC	M
974	β -pinen	1,9	RI, MS, Co-GC	M
988	mircen	13,0	RI, MS, Co-GC	M
988	dehidro-1,8-sineol	0,1	RI, MS	MO
1002	α -felandren	0,1	RI, MS, Co-GC	M
1008	δ -3-karen	0,5	RI, MS	M
1014	α -terpinen	0,1	RI, MS, Co-GC	M
1022	<i>p</i> -cimen	0,4	RI, MS, Co-GC	M
1025	limonen	14,3	RI, MS, Co-GC	M
1025	β -felandren	2,1	RI, MS	M
1026	1,8-sineol	0,0	RI, MS, Co-GC	MO
1032	<i>trans</i> - β -ocimen	0,1	RI, MS	M
1054	γ -terpinen	0,1	RI, MS, Co-GC	M
1065	<i>cis</i> -sabinen-hidrat	0,0	RI, MS	MO
1083	fenhon	0,5	RI, MS	MO
1086	terpinolen	0,4	RI, MS, Co-MS	M
1088	metil-benzoat	0,0	RI, MS, Co-GC	FAD
1090	6,7-epoksimircen	0,0	RI, MS	MO
1095	linalool	1,1	RI, MS, Co-GC	MO
1098	<i>trans</i> -sabinen-hidrat	0,0	RI, MS	MO
1111	<i>cis</i> -ruža oksid	0,0	RI, MS	MO
1118	<i>cis-p</i> -menta-2-en-1-ol	t	RI, MS	MO
1123	<i>endo</i> -fenhol	0,2	RI, MS, Co-GC	MO
1129	α -kamfolenal	0,1	RI, MS	MO
1132	<i>cis</i> -limonen-oksidi	t	RI, MS, Co-GC	MO
1137	(<i>E</i>)-epoksiocimen	t	RI, MS	MO
1137	<i>trans</i> -limonen-oksidi	t	RI, MS, Co-GC	MO
1141	veratrol	t	RI, MS, Co-GC	FAD
1144	<i>cis</i> -verbenol	0,2	RI, MS, Co-GC	MO
1145	izopulegol	t	RI, MS	MO
1148	<i>trans</i> -verbenol	0,7	RI, MS, Co-GC	MO
1151	citronelal	0,6	RI, MS, Co-GC	MO
1158	<i>trans</i> -pinokamfon	t	RI, MS, Co-GC	MO
1160	pinokarvon	t	RI, MS	MO
1172	<i>p</i> -menta-1,5-dien-8-ol	0,2	RI, MS	MO

1172	<i>cis</i> -pinokamfon	t	RI, MS, Co-GC	MO
1175	borneol	0,2	RI, MS, Co-GC	MO
1179	<i>p</i> -cimen-8-ol	t	RI, MS	MO
1183	terpinen-4-ol	0,2	RI, MS, Co-GC	MO
1183	kripton	t	RI, MS, Co-GC	MO
1196	α -terpineol	0,9	RI, MS, Co-GC	MO
1204	verbenon	t	RI, MS, Co-GC	MO
1207	<i>trans</i> -piperitol	t	RI, MS	MO
1215	<i>trans</i> -karveol	t	RI, MS	MO
1219	<i>endo</i> -fenhil-asetat	4,1	RI, MS, Co-GC	MO
1225	citronelol	0,8	RI, MS, Co-GC	MO
1226	<i>cis</i> -karveol	t	RI, MS	MO
1229	<i>egzo</i> -fenhil-asetat	t	RI, MS	MO
1249	geraniol	0,3	RI, MS, Co-GC	MO
1257	metil-citronelat	0,2	RI, MS	MO
1283	<i>cis</i> -verbenil-asetat	0,1	RI, MS	MO
1288	bornil-asetat	4,6	RI, MS, Co-GC	MO
1324	mirtenil-asetat	t	RI, MS, Co-GC	MO
1334	<i>trans</i> -karvil-asetat	0,1	RI, MS	MO
1348	α -terpinil-asetat	3,0	RI, MS	MO
1350	citronelil-asetat	t	RI, MS	MO
1357	neril-asetat	0,1	RI, MS, Co-GC	MO
1371	metil-4-metoksibenzoat	t	RI, MS, Co-GC	FAD
1374	daucen	0,1	RI, MS	S
1377	geranil-asetat	0,7	RI, MS, Co-GC	MO
1389	β -elemen	t	RI, MS, Co-GC	S
1393	<i>cis</i> -jasmon	0,3	RI, MS	O
1398	metileugenol	0,5	RI, MS, Co-GC	PP
1424	<i>trans</i> -kariofilen	0,5	RI, MS, Co-GC	S
1424	2,5-dimetoksi- <i>p</i> -cimen	t	RI, MS	O
1434	nerilaceton	t	RI, MS	O
1452	α -humulen	t	RI, MS	S
1453	(<i>E</i>)- β -farnezen	0,1	RI, MS	S
1490	(<i>E,E</i>)- α -farnezen	0,1	RI, MS	S
1493	β -selinen	0,1	RI, MS	S
1500	α -selinen	0,2	RI, MS	S
1510	β -bisabolen	0,1	RI, MS	S
1522	δ -kadinen	t	RI, MS	S
1522	miristicin	9,4	RI, MS, Co-GC	PP
1546	elemicin	4,7	RI, MS, Co-GC	PP
1564	β -kalakoren	t	RI, MS	S
1587	kariofilen-oksida	0,1	RI, MS	SO

1596	neril-izovalerat	0,1	RI, MS, Co-GC	MO
1600	heksadekan	t	RI, MS, Co-GC	FAD
1603	geranil-izovalerat	0,1	RI, MS, Co-GC	M
1606	karotol	0,2	RI, MS	SO
1629	1- <i>epi</i> -kubenol	0,1	RI, MS	SO
1645	kubenol	t	RI, MS	SO
1652	α -kadinol	t	RI, MS	SO
1699	β -sinensal	t	RI, MS	SO
1722	(<i>E,E</i>)-farnesol	t	RI, MS	SO
1759	benzil-benzoat	t	RI, MS, Co-GC	FAD
1773	<i>endo</i> -fenhil-benzoat	t	RI, MS, Co-GC	MO
1884	bornil-benzoat	t	RI, MS, Co-GC	MO
1959	palmitinska kiselina	t	RI, MS, Co-GC	FAD
1980	kamforen	t	RI, MS	D
2185	bornil-4-metoksibenzoat	0,3	RI, MS, Co-GC	MO
2202	<i>endo</i> -fenhil-vanilat	1,1	RI, MS, Co-GC	MO
2251	bornil-4-hidroksibenzoat	0,2	RI, MS, Co-GC	MO
2311	bornil-vanilat	0,8	RI, MS, Co-GC	MO
Ukupno		96,2		
Monoterpenoidi				
Ugljovodonici		58,2		
Oksigenovani		21,5		
Seskviterpenoidi				
Ugljovodonici		1,2		
Oksigenovani		0,4		
Diterpeni		t		
Masne kiseline i srodna jedinjenja		t		
Fenilpropanoidi		14,6		
Ostalo		0,3		

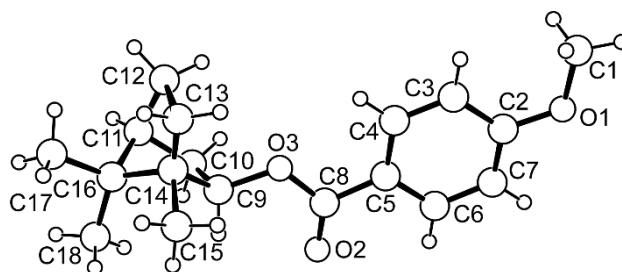
^{a)} RI: Retencioni indeks (izračunat u odnosu na C₈-C₂₄ *n*-alkane na DB-5MS koloni; ^{b)} Procentni sastav izračunat iz površina pikova FID hromatograma bez upotrebe korekcionih faktora, "t" označava sastojke prisutne u tragovima (< 0,1%); ^{c)} ID: metoda identifikacije, MS: sastojak identifikovan poređenjem masenih spektara, RI: sastojak identifikovan poređenjem vrednosti RI, co-GC: sastojak identifikovan i/ili potvrđen GC ko-injektiranjem sa standardom; ^{d)} O, ostalo; FAD, masne kiseline i srodna jedinjenja; M, monoterpeni; MO, oksigenovani monoterpeni; S, seskviterpeni; SO, oksigenovani seskviterpeni; D, diterpenoidi; PP, fenilpropanoidi.

Tabela 5. Retencioni indeksi sintetisanih aromatičnih estara na DB-5MS kapilarnoj koloni

	benzoat	4-metoksibenzoat	4-hidroksibenzoat	vanilat
bornil	1884	2185	2251	2311
izobornil	1893	2194	2260	2323
geranil	1957	2245	2308	2372
mentil	1870	2150	2238	2297
neril	1934	2220	2284	2346
endo-fenhil	1773	2086	2149	2202

Rendgenska strukturna analiza bornil-4-metoksibenzoata. Rendgenskom analizom monokristala bornil-4-metoksibenzoata potvrđena je očekivana struktura ovog aromatičnog estara (slika 5). Zbog visokog stepena neuređenja bornil-grupe, nije bilo moguće detaljno opisati dužine veza i uglove tog dela molekula. Geometrija metoksibenzoatne grupe je u granicama očekivanih vrednosti. Estarska grupa C8/O2/O3 [C8–O2 = 1,210(6), C8–O3 = 1,315(6) Å] gradi diedarski ugao od 4,0(8)° u odnosu na ravan fenil-grupe. Torzioni ugao O2-C8-O3-C9 koji iznosi 2,2(10)° ukazuje na *sin* poziciju bornil-grupe u odnosu na estarski O2. Metoksi-grupa samo blago odstupa od ravni fenil prstena (torzioni ugao C1-O1-C2-C3 iznosi -2,0(9)°).

I pored prisustva tri kiseonika i više donorskih C-H grupa, kristalna struktura ne sadrži značajne C-H...O interakcije. Najbliži kontakt kiseoničnog akceptora estarske grupe bio je C1–H1c...O2ⁱ (H...O = 2,68 Å i C–H...O = 130°; $i = x - 1/2, y - 1/2, z$). Orijehtacija C-H fragmenata ka fenil grupi sugeriše da C-H... π imaju važnu ulogu u stabilizaciji strukture.



Slika 5. ORTEP prikaz bornil-4-metoksibenzoata sa šemom numeracije. Neke od dužina veza (Å): O1–C2 1,352(7), C5–C8 1,488(7), C8–O2 1,210(6), C8–O3 1,315(6), C9–O3 1,449(7); neki od uglova veza (°): O2–C8–O3 123,9(5), C2–O1–C1 118,5(5).

4.1.4. Izolovanje i spektralna karakterizacija 2-(α -L-ramnopiranoziloksi)-benzil-izotiocijanata iz *Reseda lutea* L. (Resedaceae)

Inicijalne analize autolizata cveta, ploda i korena biljne vrste *R. lutea* (Resedaceae) otkrile su prisustvo sastojka (jedinjenje **4-1**) molekulske mase 311 amu u autolizatima dobijenim iz nadzemnih delova biljke. Pošto nije bilo moguće identifikovati ovaj sastojak poređenjem sa masenim spektrima iz dostupnih baza, jedinjenje je izolovano hromatografijom autolizata cveta na koloni silika-gela. Čist uzorak jedinjenja **4-1** je zatim okarakterisan serijom 1D i 2D NMR eksperimenata (HSQC, HMBC, ^1H - ^1H COSY i NOESY).

Molekulska formula jedinjenja je **4-1** određena na osnovu vrednosti m/z molekuskog jona. Relativno veliki intenzitet $[\text{M}+2]^+$ jona (6,6% u odnosu na intenzitet molekuskog jona) karakteristika je jedinjenja koja sadrže sumpor. Atomi ugljenika, sumpora i kiseonika doprinose relativnom intenzitetu $[\text{M}+2]^+$ (%) jona po sledećoj jednačini: $rel.int[\text{M}+2]/rel.int[\text{M}] = (\text{br. C} \times 1,1)^2/200 + (\text{br. O} \times 0,2) + (\text{br. S} \times 4,4)$ (McLafferty i Tureček, 1993). Broj atoma sumpora je očigledno 1, a broj C i O atoma može da se proceni na osnovu date jednačine. Najbolje slaganje dobija se kada je broj ugljenika 14, a broj O-atoma 5. Logična molekulska formula monoizotopske mase 311,1, sa 14 C-atoma, 5 O-atoma i jednim atomom sumpora je $\text{C}_{14}\text{H}_{17}\text{NO}_5\text{S}$. Relativni intenzitet $[\text{M}+1]^+$ jona ($[\text{M}+1]/[\text{M}] = 17,2\%$) slaže se sa teorijski predviđenom vrednošću od 17,03%.

U ^{13}C NMR spektru je uočeno prisustvo 14 signala neekvivalentnih ugljenikovih atoma – 7 sp^2 , jedan dvostruko oksigenovani (δ 97,7) i 4 monoooksigenovana sp^3 C-atoma, jedna metilenska i jedna metil-grupa. Na osnovu protonskog spektra je zaključeno prisustvo disupstituisanog benzenovog jezgra, ali usled preklapanja signala vodonika na aromatičnom jezgru nije bilo moguće odmah odrediti tip supstitucije. Usled odsustva simetrije signala eliminisana je mogućnost 1,4-disupstitucije. Bilo je moguće prepoznati dva pseudotripleta sa *orto*-vrednostima konstanti kuplovanja (δ 7,36, H-6 i δ 7,04, H-7, pseudotripleti, $^3J \approx 7,5$ Hz), što je

ukazivalo na nesimetrično 1,2-disupstituisano benzenovo jezgro (kod 1,3-disupstituisanog jezgra javio bi se samo jedan takav signal). U HMBC spektru (šema 54) nađena je dodatna potvrda za ovo: neprotonovani ugljenici aromatičnog jezgra na 153,7 (C-4) i 122,9 (C-3) ppm korelišu (kroz tri veze) sa različitim protonima (C-4 sa 7,31 (H-6) i 7,28 (H-8); δ 122,9 sa 7,04 (H-5) i 7,24 (H-7)). Da su supstituenti *meta*, pomenuti ugljenici bi korelirali sa istim protonom. Neprotonovani ugljenik na δ 131,2 očigledno nije deo aromatičnog sistema jer ne koreliše ni sa jednim od aromatičnih protona. To je, uz prisustvo karakterističnog jona na m/z 72 (CH_2NCS^+) bila prva indikacija prisustva izotiocijanatne grupe u molekulu.

Na osnovu visokog stepena oksigenacije i odgovarajućih ^1H i ^{13}C NMR pomeranja prepostavili smo da je ostatak strukture šećerne prirode. Oksigenovani ugljenik (δ 153,7) aromatičnog jezgra koreliše preko tri veze sa protonom na δ 5,59, koji je vezan za dvostruko oksigenovani, anomerni ugljenik na 97,8 ppm (C-1') (šema 4-1). Ostatak strukture šećera određen je na osnovu analize ^1H - ^1H COSY i HMBC spektara: H-1' kupluje se sa H-2' (4,32 ppm), koji se takođe kupluje i sa H-3' (4,12 ppm). H-3' kupluje se sa H-4' (3,71 ppm), a H-4' sa H-5' (3,76 ppm). Ovaj proton se dalje kupluje sa metil grupom (1,30 ppm, *d*, $J = 6,2$ Hz), ali i koreliše sa C-1' signalom u HMBC spektru. Time je ustanovljena struktura ciklične 6-deoksipiranoheksodne jedinice. Relativna stereochemija je ustanovljena pomoću vrednosti vicinalnih konstanti kuplovanja. H-4' i H-5' se sprežu konstantom $J = 9,3$ Hz (karakteristično za diaksijalni odnos). Male J -vrednosti kuplovanja protona H-1' i H-2' (1,5 Hz) pokazuju da su oba protona u ekvatorijalnim položajima. Ovo potvrđuje i vrednost $J_{2,3'} = 3,3$ Hz (karakteristična za aksijalno-ekvatorijalna kuplovanja). NOESY spektar je potvrdio rezultate dobijene na osnovu vrednosti konstanti kuplovanja – korelacije H-6'/H-4' i H-5'/H-3' moguće su samo ako su ovi atomi/grupe sa iste strane prstena. Određena stereochemija odgovara strukturi ((2*R**,3*R**,4*R**,5*R**,6*S**)-3,4,5-trihidroksi-6-metiltetrahidro-2*H*-piran-2-il)oksi- grupe, to jest, jednom od dva enantiomerna monosaharidna ostatka α -L-ramnospiranozil- ili α -D-ramnospiranozil- (6-deoksi- α -D-manospiranozil).

Jedina metilenska grupa u molekulu vezana je za ugljenik u aromatičnom prstenu čije je hemijsko pomeranje 122,9 ppm. Ovo se jasno vidi iz HMBC spektra – metilenski protoni korelišu sa aromatičnim ugljenicima na δ 153,7, 122,9 i 129,2. Takođe i metilenski C-atom koreliše sa jednim protonom, na δ 7,28. Time su asignirani svi signali atoma u molekulu osim jednog atoma ugljenika. Hemijsko pomeranje preostalog ugljenika odgovara rezonanci izotiocijanatne grupe (δ 131,2). HMBC korelacija C-1 i H-2 potvrđuje da je -NCS grupa vezana za metilensku grupu.

Sve do sada navedeno ukazuje da struktura jedinjenja **4-1** odgovara nekom od dva enantiomera: 2-(α -L-ramnopiranoziloksi)benzil-izotiocijanatu ili 2-(6-deoksi- α -D-manopiranoziloksi)benzil-izotiocijanatu. Nijedan od ova dva enantiomera nije ranije zabeležen u literaturi. Međutim, glukozinolat iz koga nastaje 2-(α -L-ramnopiranoziloksi)benzil-izotiocijanat, 2-(α -L-ramnopiranoziloksi)benzil-glukozinolat, izolovan je iz cveta druge vrste roda *Reseda* (*R. odorata*, Olsen i Sorensen, 1979). Logično je pretpostaviti da je jedinjenje **4-1** proizvod hidrolize upravo ovog glukozinolata. Zato verujemo da jedinjenje **4-1** predstavlja 2-(α -L-ramnopiranoziloksi)benzil-izotiocijanat.

U cilju kvantifikacije izolovanog jedinjenja u uzorku autolizata (rastvorenog u CD_3SOCD_3), snimljeni su i NMR spektri jedinjenja **4-1** u deuterisanom dimetil-sulfoksidu (asignirane vrednosti hemijskih pomeranja date su u tabeli 6). Treba spomenuti dve bitne razlike protonskih spektara jedinjenja **4-1** u CD_3SOCD_3 i CDCl_3 . 1) ^1H NMR spektar snimljen u CD_3SOCD_3 sadrži dva dubleta konstante kuplovanja 16,0 Hz (na 4,78 i 4,87 ppm) kojih nema u protonskom spektru snimljenom u CDCl_3 . Ovi signali odgovaraju geminalnim protonima vezanim za C-2 ugljenik (što potvrđuje i HSQC spektar). Sa druge strane, ova dva protona su izohrona u spektrima snimanim u CDCl_3 . 2) Svi OH signali su dobro razdvojeni (i moguće ih je lako asignirati analizom ^1H - ^1H COSY spektra) u $\text{DMSO-}d_6$, dok u CDCl_3 ovi protoni formiraju širok pik u oblasti 4,5-4,8 ppm koji nestaje po dodatku nekoliko kapi D_2O .

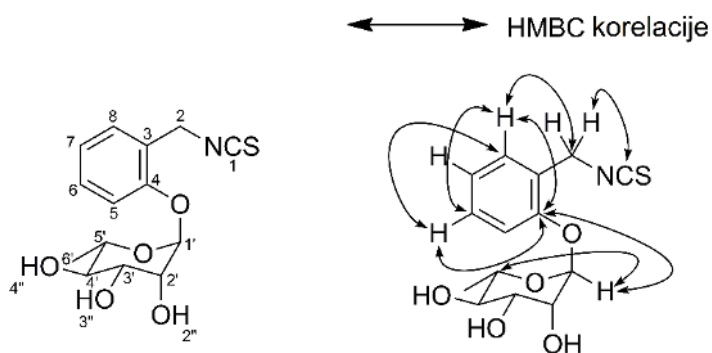
4.1.4.1. Analiza sastava proizvoda autolize glukozinolata iz cveta, ploda i korena biljne vrste *R. lutea*

Rezultati GC- i GC-MS analiza autolizata cveta, plodova i korena biljne vrste *R. lutea* predstavljeni su u tabeli 7 (GC-MS i NMR profili autolizata dati su u prilogu). U hromatogramima sva tri autolizata bilo je moguće uočiti mali broj komponenti. Benzil-izotiocijanat (59,9%) i 2-(α -L-ramnopiranoziloksi)benzil-izotiocijanat [**4-1**] (74,7%) su identifikovani kao glavni sastojci autolizata korena i cveta. Ostala detektovana isparljiva jedinjenja (pod uslovima GC analize) su uglavnom predstavljali sastojke voskova, koji se često susreću u prirodi.

Benzil-izotiocijanat i odgovarajući glukozinolat (glukotropeolin) prethodno su izolovani iz biljne vrste *R. lutea* (Cole, 1976). Višestruko glikolizovani glukozinolati, međutim, nisu česti (2-(α -L-ramnopiranoziloksi)benzil-glukozinolat je samo jedan od četiri prirodna glukozinolata koji sadrže više od jedne saharidne jedinice, Fahey et al., 2001). Kao što je već naglašeno, glukozinolat iz ove klase je već pronađen u rodu *Reseda* (Olsen i Sorensen, 1979).

Količina dva detektovana izotiocijanata je određena pomoću kvantitativne ^1H NMR spektroskopije (qNMR) korišćenjem 1,4-benzohinona kao internog standarda. Kako autolizat nije bio potpuno rastvoran u CDCl_3 , kao rastvarač korišćen je $\text{DMSO}-d_6$. Za kvantifikaciju ovih jedinjenja korišćene su vrednosti integrala metilenskih protona (za benzil-izotiocijanat) i anomernog protona (za jedinjenje **4-1**). Na osnovu qNMR-a je utvrđeno da koren autolizata sadrži od 65,0% (w/w) benzil-izotiocijanata, dok je sadržaj jedinjenja **4-1** u autolizatu cveta bio 86,3% (w/w). Autolizat ploda je predstavljao uglavnom smešu n -alkana, ali je detektovana i izvesna količina jedinjenja **4-1** (4,3%, w/w). Ovi procenti dobro korelišu sa vrednostima dobijenim GC-FID analizom, ali merenje površina pikova u GC-hromatogramima potcenjuje relativnu zastupljenost izotiocijanata za oko 10%.

Rezultati qNMR analize omogućili su nam i da procenimo količinu glukozinolata u netaknutom biljnom tkivu. Uz pretpostavku da se reakcija autolize odvijala kvantitativno, minimalni sadržaji glukotropeolina i 2-(α -L-ramnopiranoziloksi)benzil-glukozinolata u korenu, cvetu i plodu iznosili su, redom: 0,57/-, -/4,1, i $-/3,7 \times 10^{-3}\%$ (w/w). Ovi procenti ukazuju na relativno visok sadržaj glukozinolata, u poređenju sa drugim taksonima iz reda Brassicales (Rosa i Rodrigues, 2001).



Šema 54

Tabela 6. ^1H i ^{13}C NMR hemijska pomeranja (ppm) 2-(α -L-ramnopiranoziloksi)benzil-izotiocijanata u CDCl_3 i CD_3SOCD_3 (na 400, odnosno 100,6 MHz)

Asignacija	Tip ugljenika/vodonika	Hloroform- <i>d</i>		DMSO- <i>d</i> ₆	
		^{13}C	^1H	^{13}C	^1H
C-1	C _q	131,2		130,1	
C-2	CH ₂	44,9	4,66 (<i>s</i>)	44,6	a: 4,87 b: 4,78 (<i>d</i>) $J_{2a,2b} = 16,0$ Hz
C-3	C _q	122,9		123,7	
C-4	C _q	153,7		154,1	
C-5	CH	114,2	7,24 (<i>dd</i>) $J_{5,6} = 7,5$ Hz $J_{5,7} = 0,9$ Hz	114,7	7,21 (<i>br d</i>) $J_{5,6} = 8,0$ Hz
C-6	CH	130,3	7,31 (<i>ddd</i>) $J_{6,5} = 7,5$ Hz $J_{6,7} = 7,5$ Hz $J_{6,8} = 1,6$ Hz	130,4	7,34 (<i>br dd</i>) $J_{6,7} = 7,4$ Hz $J_{5,6} = 8,0$ Hz
C-7	CH	122,4	7,04 (<i>ddd</i>) $J_{7,6} = 7,5$ Hz $J_{7,8} = 7,5$ Hz $J_{7,5} = 0,9$ Hz	122,0	7,05 (<i>br dd</i>) $J_{7,6} = 7,4$ Hz $J_{7,8} = 7,7$ Hz
C-8	CH	129,2	7,28 (<i>dd</i>) $J_{8,7} = 7,5$ Hz $J_{8,6} = 1,6$ Hz	129,6	7,38 (<i>br d</i>) $J_{8,7} = 7,7$ Hz
C-1'	CH	97,8	5,59 (<i>d</i>) $J_{1',2'} = 1,4$ Hz	98,9	5,46 (<i>d</i>) $J_{1',2'} = 1,4$ Hz
C-2'	CH	70,9	4,32 (<i>dd</i>) $J_{2',1'} = 1,4$ Hz $J_{2',3'} = 3,3$ Hz	70,6	3,93 (<i>br d</i>) $J_{2',1'} = 1,4$ Hz $J_{2',2'\text{OH}} = 6,1$ Hz
C-3'	CH	71,8	4,12 (<i>dd</i>) $J_{3',4'} = 9,3$ Hz $J_{3',2'} = 3,3$ Hz	70,2	3,47 (<i>br d</i>) $J_{3',3'\text{OH}} = 6,1$ Hz
C-4'	CH	73,1	3,71 (<i>dd</i>) $J_{4',3'} = 9,3$ Hz $J_{4',5'} = 11,9$ Hz	72,8	3,30 (<i>br dd</i>) $J_{4',5'} = 9,3$ Hz $J_{4',4'\text{OH}} = 6,4$ Hz
C-5'	CH	69,4	3,76 (<i>dd</i>) $J_{5',6'} = 6,0$ Hz $J_{5',4'} = 11,9$ Hz	70,9	3,71 (<i>dd</i>) $J_{5',6'} = 6,4$ Hz $J_{5',4'} = 9,3$ Hz
C-6'	CH ₃	17,7	1,30 (<i>d</i>) $J_{6',5'} = 6,0$ Hz	18,4	1,12 (<i>d</i>) $J_{6',5'} = 6,4$ Hz
	OH-2'				5,10 (<i>d</i>) $J_{2',2'\text{OH}} = 6,1$ Hz
	OH-3'				4,74 (<i>d</i>) $J_{3',3'\text{OH}} = 6,1$ Hz
	OH-4'				4,83 (<i>d</i>) $J_{3',3'\text{OH}} = 6,1$ Hz

Tabela 7. Procentni sastav (GC-FID) etarskog ekstrakta autolizovanog biljnog materijala vrste *R. lutea*

RI izračunato ^a	Sastojak ^b	Procenat ^c		
		koren	cvet	plod
952	benzaldehyd	1,5	-	-
1026	benzil-alkohol	0,7	-	-
1039	salicil-aldehyd	1,2	-	-
1100	undekan	0,9	-	-
1160	benzoeva kiselina	7,3	-	-
1320	benzil-izotiocijanat (BITC)	59,9	-	-
2300	trikoza	-	-	17,5
2500	pentakoza	-	3,6	22,2
2569	2-(α -L-ramnospiranoziloksi)benzil-izotiocijanat (4-1)	-	74,7	5,2
2700	heptakoza	15,5	10,6	30,1
2900	nonakoza	9,2	5,2	19,6
Ukupno		96,2	94,0	94,6

^aEksperimentalno određeni linearni retencioni indeksi na DB-5 koloni;

^bSastojci su identifikovani pomoću GC, GC-MS i koinjekcije sa standardom i/ili NMR analizom;

^cProcentni sastav izračunat iz površine pikova FID hromatograma bez upotrebe korekcionih faktora.

4.1.5. Germakranski diestri iz vrste *Daucus carota* L.

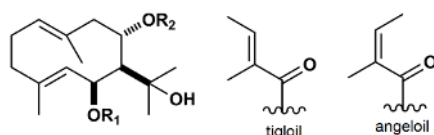
4.1.5.1. Određivanje strukture jedinjenja 7-1 i 7-2

Jedinjenja 7-1 i 7-2 su izolovana iz etarskog ekstrakta cvetova *D. carota*. Konektivnost u jedinjenju 7-1 (šema 55) je određena analizom HSQC i HMBC spektara (numeracija ugljenika prikazana je na šemi 56). Protonski i ^{13}C signali koji pripadaju atomima dve tiglatne grupe su asignirani pomoću HMBC korelacija protona vezanih za konjugovanu dvogubu vezu (H-3' i H-3''). H-3' (δ 6,67) koreliše, preko tri veze, sa karbonilnim ugljenikom C-1' (δ 167,2) koji se kupluje sa protonima metil grupe H-5' (δ 1,72). H-3' koreliše i sa C-5' (δ 11,8), kao i sa C-4' (δ 14,2), za koji su vezani protoni H-4' na hemijskom pomeranju 1,70 ppm. Na sličan način su asignirana pomeranja atoma drugog tigлата. *E*-stereochemija dvogubih veza C(2')=C(3') i C(2'')=C(3'') je zaključena na osnovu NOESY spektra – H-3' i H-3'' korelišu samo sa signalima H-4', odnosno H-4''. Odsustvo NOESY korelacija H-3' \leftrightarrow H-5' i H-3'' \leftrightarrow H-5'' moguće je samo kod ditigloil-diestra.

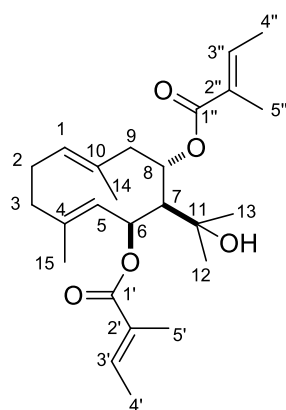
Položaji dva oksigenovana ugljenika (C-6 i C-8) na germakranskom prstenu određeni su pomoću HMBC korelacija sa dve *endo* dvostruke veze – H-6 (δ 5,79) koreliše sa tri *sp*²-hibridizovana ugljenika (C-1', C-5 i C-15), dok H-8 (5,67) koreliše sa samo dva *sp*²-hibridizovana ugljenika - C-1'' i C-10 (δ 129,0). H-8 je dublet dubleta i kupluje se sa dva dijastereotopna CH₂ protona vezana za C-9 (δ 2,79 i 1,99). Treći oksigenovani ugljenik (C-11) nije deo prstena i vezan je za C-7 (δ 52,9) koji koreliše sa protonima dve metil grupe, C-12 i C-13 (δ 1,39 i 1,43). Protoni H-2 i H-3 takođe su asignirani pomoću HMBC korelacija sa dve dvogube veze. Signali protona vezanih za C-2 (δ 2,42 i 2,14) korelišu sa C-1, C-10 i C-4; s druge strane H-3 protoni (δ 2,17) kupluju se sa C-1, C-4 i C-5. Stereochemija dve dvogube veze, kao i relativna stereochemija tri hiralna centra (C-6, C-7 i C-8) određena je analizom NOESY korelacija – na primer NOESY korelacija signala na 5,79 (H-6) i 1,90 (H-7) moguća je samo ako su sa iste strane prstena.

Struktura i relativna stereochemija jedinjenja **7-2** određena je na analogan način. *Z*-konfiguracija dvogube veze C(2')=C(3') utvrđena je na osnovu prisustva kros-pika H-3' ↔ H-5' u NOESY spektru.

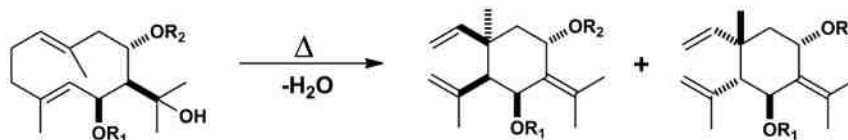
Na osnovu svega navedenog verujemo da jedinjenje **7-1** predstavlja 6,8-*O*-ditigloil-(1(10*E*),4*E*)-germakradien-6β,8α,11-triol, a da je jedinjenje **7-2** 6-*O*-angeloil-8-*O*-tigloil-(1(10*E*),4*E*)-germakradien-6β,8α,11-triol. Oba jedinjenja već su izolovana iz vrste *D. carota* (Schmiech et al., 2008), a spektralni podaci za oba jedinjenja odlično se slažu sa podacima koji su dobijeni u našim eksperimentima.



Šema 55. Germakranski diestri izolovani iz *D. carota* (jedinjenje **7-1**: R₁ = R₂ = tigloil; jedinjenje **7-2**: R₁ = angeloil, R₂ = tigloil)



Šema 56. Šema numeracije ugljenikovih atoma jedinjenja **7-1** preuzeta je iz studije Schmiech i saradnika (2008).



Šema 57

4.1.5.2. Termalna degradacija jedinjenja 7-1 i 7-2 pri uslovima gasne hromatografije

Jedinjenja 7-1 i 7-2 podvrgnuta su gasnoj hromatografiji sa masenom detekcijom da bi snimili njihove EI masene spektre. Međutim, u dobijenim hromatogramima nije bilo moguće detektovati pikove jedinjenja molekulske mase 418 amu (koliko iznosi molekulska masa dva izolovana jedinjenja), već jedinjenja mase 400 amu; po našem mišljenju, prilikom gasne hromatografije dolazi do dehidratacije i [3,3]-sigmatropnog premeštanja⁸ jedinjenja 7-1 i 7-2 u odgovarajuće elemanske derivate (shema 57), što se može zaključiti na osnovu oblika hromatografskih pikova.

⁸ Poznato je da pod sličnim uslovima germakranski derivati sa 4,5 i 1,10 dvostrukim vezama podležu ovom premeštanju (Radulović et al., 2010).

4.2. Sinteza i spektralna karakterizacija novih azaheterocikličnih jedinjenja

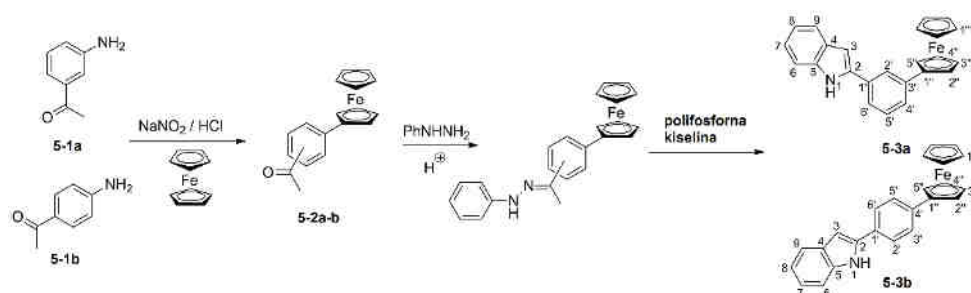
4.2.1. Sinteza i spektralna karakterizacija novih hibrida ferocena i indola

Ferocetilacetofenoni **5-2a** i **5-2b** su sintetisani kuplovanjem ferocena sa odgovarajućim diazonijum solima (šema 58). Reakcijom ovih ketona sa fenilhidrazinom dobijaju se hidrazoni, iz kojih se Fišerovom indolizacijom dobijaju jedinjenja **5-3a** i **5-3b**. Do sada Fišerova indolizacija nije pokušana na supstratima koji sadrže ferocenovno jezgro. Dakle, u ovoj disertaciji je predstavljena prva *de novo* sinteza indola u prisustvu ferocenske grupe. Iako se za Fišerovu indolizaciju može koristiti veliki broj kiselina (Li, 2004), u našem slučaju je samo upotrebom polifosforne kiseline dobijen prihvatljiv prinos reakcije. Korišćenje H₂SO₄, *p*-toluensulfonske kiseline, glacijalne sirćetne kiseline i BF₃·Et₂O nije dovelo do formiranja željenih proizvoda. Takođe, kada smo pokušali da sintetišemo i treći regioizomer [2-(2-ferocetilfenil)-1*H*-indol], u reakcionoj smeši su detektovani samo tragovi proizvoda. I pored činjenice da je ferocenska grupa generalno stabilna u kiselim uslovima (mnogi derivati ferocena dobijaju se reakcijama u kiseloj sredini), verujemo da kombinacija visoke temperature i koncentrovane kiseline koja je neophodna u Fišerovoj sintezi indola deluje pogubno za ovaj metalocen (uočili smo da tokom reakcije dolazi do velikog stepena razgradnje do neorganskih jedinjenja). Iako su prinosi reakcija bili relativno mali (oko 20%), ovom metodologijom smo došli do novih struktura hibrida ferocena i indola, kod kojih su ferocen i indolovo jezgro povezani preko aromatičnog prstena (do sada su bili sintetisani samo 3-ferocetil supstituisani indoli, Lo et al., 2006; Quirante et al., 2011).

4.2.1.1. Spektralna karakterizacija hibrida ferocena i indola

Molekulska formula (C₂₄H₁₉FeN) dva sintetisana jedinjenja je potvrđena na osnovu vrednosti M⁺ u masenom spektru. U ovim spektrima su bili dominantni molekularni jon i njegovi izotopski joni (očekivano za jedinjenje sa tako visokim stepenom nezasićenja). Monoizotopske mase molekularnih jona odgovaraju jonima koji sadrže samo najzastupljenije izotope (¹²C, ¹H, ⁵⁶Fe i ¹⁴N). Karakteristika spektara je bio i veliki intenzitet [M-2] jona, rezultat prisustva ⁵⁴Fe izotopa. Vrednosti intenziteta jona (od

[M-2] do [M+2]) dobro su se slagale sa teorijski predviđenim vrednostima. Fragmentni joni su bili niskog intenziteta, ali se u oba spektra mogao uočiti jon na m/e 56 (Fe^+) karakterističan za jedinjenje koja sadrže ferocen. Indoli **5-3a** i **5-3b** su potpuno okarakterisani 1D- i 2D-NMR analizama. NMR spektri su snimljeni u različitim rastvaračima (šema numeracije je prikazana u šemi 58) i hemijska pomeranja data su u tabeli 8.



Šema 58

4.2.1.2. NMR analiza jedinjenja **5-3a** u $\text{DMSO-}d_6$

Protonski spektri oba jedinjenja su pokazivali uobičajene odlike monosupstituisanih ferocenskih (Fc) sistema – dva magnetno neekvivalentna „*orto*“ ($\text{H-2}''$ i $\text{H-5}''$) protona na δ 4,91. Na nešto nižem pomeranju (δ 4,40) su signali dva „*meta*“ protona ($\text{H-3}''$ i $\text{H-4}''$) i intenzivni signal na δ 4,07 koji potiče od pet ekvivalentnih vodonika sa nesupstituisanog ciklopentadienilnog (Cp) prstena. Nijedan od Fc protona nije pokazivao HMBC interakcije sa ugljenicima iz ostatka molekula, ali je u NOESY spektru opažena korelacija između signala na δ 4,91 ($\text{H-2}''$) i signala protona sa aromatičnog jezgra na δ 7,50 i 8,02. Takvih korelacija nije bilo za proton na δ 4,40 ($\text{H-3}''$), što zaista pokazuje da su „*orto*“ protoni na većim vrednostima hemijskih pomeranja.

Prisustvo 1,3-disupstituisanog benzenovog jezgra je bilo očigledno iz protonskog spektra. $\text{H-2}'$ signal se javlja kao pseudotriplet, kuplovan sa $\text{H-4}'$ i $\text{H-6}'$ malih i gotovo jednakih vrednosti konstanti kuplovanja (1,6 Hz), što implicira da su *orto* položaji u odnosu na ovaj proton supstituisani. Pseudotriplet na δ 7,39 ($\text{H-5}'$) je spregnut većim J -vrednostima (7,6 i 7,8 Hz), što ukazuje na prisustvo dva susedna *orto* protona, dok signali na δ 7,50 ($\text{H-4}'$) i 7,70 ($\text{H-6}'$) imaju oblik dubleta dubleta dubleta (jedna veća i

dve manje konstante kuplovanja). Ovi protoni mogu se razlikovati pomoću NOESY spektra – H-4' koreliše sa protonima Fc grupe, dok H-6' koreliše sa signalima iz indolovog jezgra (slika 6).

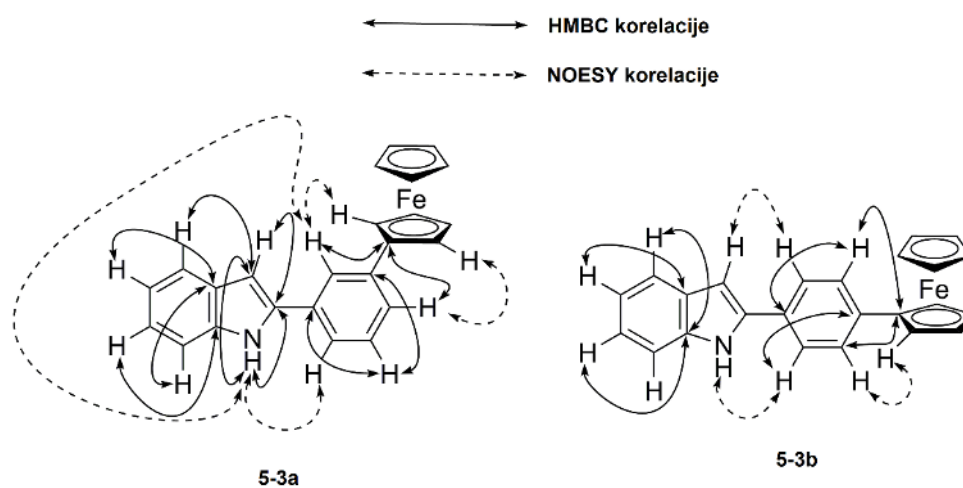
Određivanje hemijskih pomeranja protona indolovog sistema je takođe bilo jednostavno. H-3 proton zaštićen je delokalizacijom elektronskog para sa azota, što se slaže sa niskom δ_C vrednošću (99,3 ppm) ugljenika za koji je vezan. C-3 ugljenik koreliše u HMBC spektru sa signalom na δ 7,57 koji potiče od protona H-9. Ostali CH protoni su udaljeni više od tri veze od C-3. H-9 proton kupluje se sa H-8 (*ddd*). Ostali protoni su bili na δ 7,45 (H-6, *dd*, koreliše sa NH protonom u NOESY spektru, slika 5-1) i 7,13 (H-7, *ddd*).

Signali protonovanih ugljenika su lako asignirani pomoću HSQC spektra. U slučaju neprotonovanih ugljenika je neophodno bilo korišćenje HMBC korelacija (slika 6). Ugljenik na 129,2 ppm (C-4) koreliše sa vodonikom H-8, dok ugljenik na 137,6 ppm (C-5) koreliše sa H-7 signalom. Od preostala tri neassignirana signala ugljenika, samo signal na δ 138,2 ne koreliše sa H-5', što znači da je ovaj ugljenik u sastavu indolovog prstena (C-2). Preostala dva ugljenika je bilo nemoguće razlikovati jer pokazuju samo jednu jaku interakciju u HMBC spektru (sa H-5' preko tri veze). Iz ovog razloga smo se odlučili da snimimo NMR spektre ovog jedinjenja i u drugim rastvaračima. U spektrima snimljenim u CDCl₃, CD₃CN i CD₃OD lako se uočavaju slabija kuplovanja preko dve veze (C-1' sa H-6' i C-3' sa H-4'). Na taj način su asignirani svi signali ugljenika i hemijska pomeranja su data u tabeli 8.

4.2.1.3. NMR analiza jedinjenja **5-3b** u DMSO-*d*₆

Usled simetrije AA'BB' spinskog sistema centralnog benzenovog jezgra, protonski spektar *para* izomera je bio jednostavniji. Protoni H-2' i H-3' se mogu razlikovati pomoću NOESY (H-3' koeliše sa Fc protonima) ili HMBC (H-3' koreliše sa jedinim neprotonovanim Fc ugljenikom) interakcija (slika 6). Većina rezonanci ugljenika (i svih protona) određena je iz uočenih interakcija u 2D spektrima, kao i u slučaju jedinjenja **5-3a**. Assignacija tri ugljenika na pomeranjima δ 130,1 138,3 i 138,7 nije bila tako

jednostavna zbog malog broja HMBC interakcija ovih signala. Iz interakcija 130,1/7,60 ppm i 138,7/7,77 ppm (koje predstavljaju kuplovanja ugljenika i protona preko tri veze) pomeranje od 130,1 ppm pripisali smo ugljeniku C-1', a 138,7 ppm ugljeniku C-4'. To znači da jedini preostali signal ugljenika (138,3 ppm) pripada ugljeniku C-2 unutar indolovog jezgra. Vrednost ovog hemijskog pomeranja je u skladu sa pomeranjem odgovarajućeg ugljenika *meta* izomera. Iako je naša namera bila da snimimo NMR spektre jedinjenja **5-3b** i u drugim rastvaračima, to nismo uspeli zbog jako slabe rastvorljivosti.



Slika 6. Važne uočene HMBC i NOESY korelacije jedinjenja **5-3a** i **5-3b**

Tabela 8. ¹H (400 MHz) i ¹³C (100 MHz) NMR hemijska pomerenja 2-(3-ferocenilfenil)-1*H*-indola (**5-3a**) i 2-(4-ferocenilfenil)-1*H*-indola (**5-3b**)

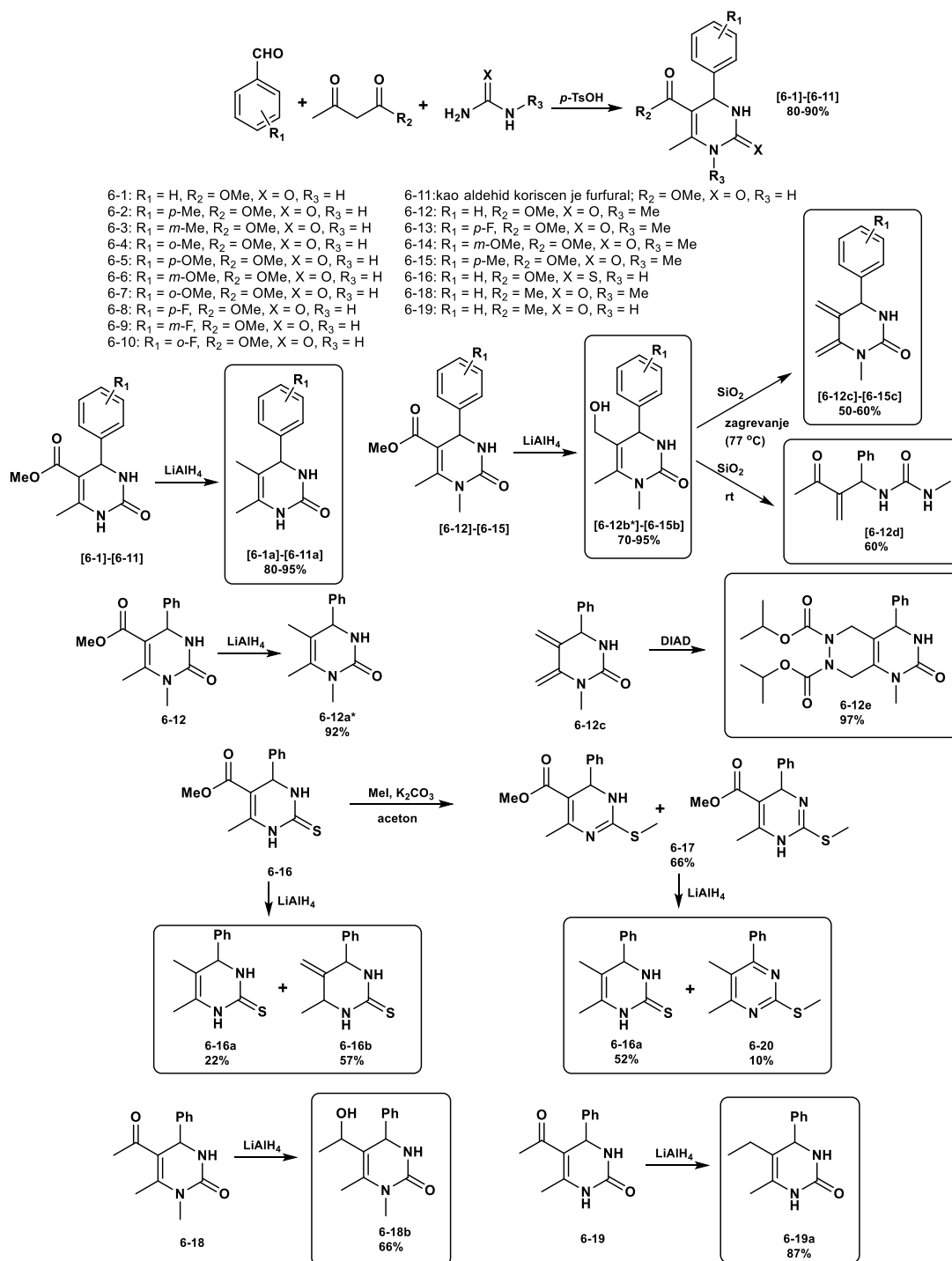
C	2-(3-ferocenilfenil)-1 <i>H</i> -indol									2-(4-ferocenilfenil)-1 <i>H</i> -indol		
	Tip ugljenika	DMSO- <i>d</i> ₆			Hloroform- <i>d</i>		Acetonitril- <i>d</i> ₃		Metanol- <i>d</i> ₄		C	¹³ C
		¹³ C	¹ H	¹³ C	¹ H	¹³ C	¹ H	¹³ C	¹ H			
C-2	C _q	138,2		138,1		140,3		138		C _q	138,3	
C-3	CH	99,3	6,98 <i>J</i> _{3,6} = 0,7 Hz <i>J</i> _{3,1} = 2,1 Hz	100,0	6,91 <i>J</i> _{3,6} = 0,9 Hz <i>J</i> _{3,1} = 2,1 Hz	99,1	6,92 <i>J</i> _{3,6} = 0,8 Hz <i>J</i> _{3,1} = 2,2 Hz	98,3	6,86 <i>J</i> _{3,6} = 0,7 Hz	CH	98,6	6,86 <i>J</i> _{3,6} = 0,7 Hz <i>J</i> _{3,1} = 2,1 Hz
C-4	C _q	129,2		129,4		129,1		129,2		C _q	129,3	
C-5	C _q	137,6		136,9		137,2		137,5		C _q	137,6	
C-6	CH	111,7	7,45 <i>J</i> _{6,7} = 8,1 Hz <i>J</i> _{6,3} = 0,7 Hz <i>J</i> _{6,8} = 1,9 Hz	110,9	7,46 <i>J</i> _{6,7} = 7,9 Hz <i>J</i> _{6,3} = 0,9 Hz <i>J</i> _{6,8} = 1,9 Hz	111,1	7,50 <i>J</i> _{6,7} = 8,1 Hz <i>J</i> _{6,3} = 0,9 Hz <i>J</i> _{6,8} = 1,9 Hz	110,7	7,44 <i>J</i> _{6,7} = 8,1 Hz <i>J</i> _{6,3} = 0,7 Hz <i>J</i> _{6,8} = 1,7 Hz	CH	111,6	7,41 <i>J</i> _{6,7} = 8,0 Hz <i>J</i> _{6,3} = 0,7 Hz <i>J</i> _{6,8} = 1,7 Hz
C-7	CH	122,0	7,13 <i>J</i> _{7,9} = 1,2 Hz <i>J</i> _{7,8} = 7,1 Hz <i>J</i> _{7,6} = 8,1 Hz	122,4	7,25 <i>J</i> _{7,9} = 1,2 Hz <i>J</i> _{7,8} = 7,2 Hz <i>J</i> _{7,6} = 7,9 Hz	122,2	7,20 <i>J</i> _{7,9} = 1,2 Hz <i>J</i> _{7,8} = 7,1 Hz <i>J</i> _{7,6} = 8,1 Hz	121,3	7,12 <i>J</i> _{7,9} = 1,2 Hz <i>J</i> _{7,8} = 7,1 Hz <i>J</i> _{7,6} = 8,1 Hz	CH	121,8	7,09 <i>J</i> _{7,8} = 7,1 Hz <i>J</i> _{7,6} = 8,0 Hz <i>J</i> _{7,9} = 1,2 Hz
C-8	CH	119,8	7,03 <i>J</i> _{8,6} = 1,0 Hz <i>J</i> _{8,7} = 7,1 Hz <i>J</i> _{8,9} = 7,9 Hz	120,3	7,20 <i>J</i> _{8,6} = 1,9 Hz <i>J</i> _{8,7} = 7,2 Hz <i>J</i> _{8,9} = 7,9 Hz	119,8	7,09 <i>J</i> _{8,6} = 1,9 Hz <i>J</i> _{8,7} = 7,1 Hz <i>J</i> _{8,9} = 8,0 Hz	119,1	7,02 <i>J</i> _{8,6} = 1,7 Hz <i>J</i> _{8,7} = 7,1 Hz <i>J</i> _{8,9} = 7,9 Hz	CH	119,7	7,00 <i>J</i> _{8,7} = 7,1 Hz <i>J</i> _{8,9} = 7,9 Hz <i>J</i> _{8,6} = 1,7 Hz
C-9	CH	120,5	7,57 <i>J</i> _{9,8} = 7,9 Hz <i>J</i> _{9,7} = 1,2 Hz	120,7	7,71 <i>J</i> _{9,8} = 7,9 Hz <i>J</i> _{9,7} = 1,2 Hz	120,2	7,62 <i>J</i> _{9,8} = 8,0 Hz <i>J</i> _{9,7} = 1,2 Hz	119,8	7,57 <i>J</i> _{9,8} = 7,9 Hz <i>J</i> _{9,7} = 1,2 Hz	CH	120,3	7,53 <i>J</i> _{9,8} = 7,9 Hz <i>J</i> _{9,7} = 1,2 Hz
C-1'	C _q	132,7 ili 140,2		132,5		132,4		132,8		C _q	130,1	
C-2'	CH	122,6	8,02 <i>J</i> _{2',4'} = 1,6 Hz <i>J</i> _{2',6'} = 1,6 Hz	122,9	7,79 <i>J</i> _{2',4'} = 1,6 Hz <i>J</i> _{2',6'} = 1,6 Hz	122,4	7,93 <i>J</i> _{2',4'} = 1,7 Hz <i>J</i> _{2',6'} = 1,7 Hz	122,0	7,96 <i>J</i> _{2',4'} = 1,6 Hz <i>J</i> _{2',6'} = 1,6 Hz	CH	125,5	7,78 <i>J</i> _{2',3'} = 8,3 Hz
C-3'	C _q	132,7 ili 140,2		140,4		140,3		140,1		CH	126,6	7,60 <i>J</i> _{3',2'} = 8,3 Hz
C-4'	CH	125,4	7,50 <i>J</i> _{4',5'} = 7,8 Hz <i>J</i> _{4',6'} = 1,2 Hz	125,7	7,50 <i>J</i> _{4',5'} = 7,9 Hz <i>J</i> _{4',6'} = 1,2 Hz	125,3	7,54 <i>J</i> _{4',5'} = 7,8 Hz <i>J</i> _{4',6'} = 1,2 Hz	124,7	7,48 <i>J</i> _{4',5'} = 7,7 Hz <i>J</i> _{4',6'} = 1,1 Hz	C _q	138,7	

			$J_{4,2} = 1,6 \text{ Hz}$		$J_{4,2} = 1,6 \text{ Hz}$		$J_{4,2} = 1,7 \text{ Hz}$		$J_{4,2} = 1,6 \text{ Hz}$	
			7,39		7,40		7,42		7,37	
C-5'	CH	129,4	$J_{5,4} = 7,8 \text{ Hz}$	129,0	$J_{5,4} = 7,9 \text{ Hz}$	129,0	$J_{5,4} = 7,8 \text{ Hz}$	128,5	$J_{5,4} = 7,7 \text{ Hz}$	
			$J_{5,6} = 7,6 \text{ Hz}$		$J_{5,6} = 7,4 \text{ Hz}$		$J_{5,6} = 7,4 \text{ Hz}$		$J_{5,6} = 7,7 \text{ Hz}$	
			7,70		7,51		7,64		7,63	
C-6'	CH	123,1	$J_{6,5} = 7,6 \text{ Hz}$	122,8	$J_{6,5} = 7,4 \text{ Hz}$	122,8	$J_{6,5} = 7,4 \text{ Hz}$	122,4	$J_{6,5} = 7,7 \text{ Hz}$	
			$J_{6,4} = 1,2 \text{ Hz}$		$J_{6,4} = 1,2 \text{ Hz}$		$J_{6,4} = 1,2 \text{ Hz}$		$J_{6,4} = 1,1 \text{ Hz}$	
			$J_{6,2} = 1,6 \text{ Hz}$		$J_{6,2} = 1,6 \text{ Hz}$		$J_{6,2} = 1,7 \text{ Hz}$		$J_{6,2} = 1,6 \text{ Hz}$	
C-1"	C _q	85,0		85,0		84,8		84,9		C _q 84,7
C-2"	CH	66,9	4,91	66,7	4,76	66,5	4,83	66,3	4,81	CH 66,6 4,82
C-3"	CH	69,4	4,40	69,1	4,41	69,1	4,39	68,7	4,38	CH 69,5 4,37
C-1"	CH	69,9	4,07	69,8	4,13	69,6	4,07	69,2	4,07	CH 69,8 4,04
NH	Het-H		11,50 (široki s)		8,35 (široki s)		9,85 (široki s)		/	Het-H 11,42

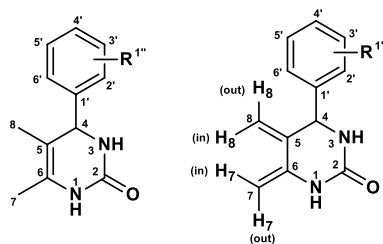
4.2.2. Redukcija Biđinelijevih jedinjenja litijum-aluminijumhidridom

4.2.2.1. Sinteza Biđinelijevih jedinjenja [6-1]-[6-19]

Sinteza Biđinelijevih jedinjenja [6-1]-[6-19] (šema 59) vršena je po proceduri koju su razvili *Jin* i saradnici (2002). Kao kiseli katalizator je korišćena *p*-toluensulfonska kiselina – očekivani proizvodi su dobijeni u odličnim prinosima uz kratka reakciona vremena. Sirovi proizvodi lako kristališu iz reakcionih smeša i jednostavno se prečišćavaju rekristalizacijom (hromatografska razdvajanja nisu bila neophodna). Identitet jedinjenja je potvrđen GC-MS, IR, UV, i 1D- i 2D-NMR analizama. Dobijeni eksperimentalni podaci su se slagali sa publikovanim spektralnim podacima. S obzirom da su ova jedinjenja prethodno detaljno okarakterisana, ovde ćemo navesti samo neke odlike NMR spektara pripremljenih Biđinelijevih jedinjenja: 1) protoni H-7 metil-grupe se homoalilno sprežu sa H-4 protonom homoalilnom konstantom kuplovanja ($^5J = 0,6$ Hz, što potvrđuje i interakcija ovih signala u ^1H - ^1H COSY spektru), 2) H-4 se kupluje sa NH-3 signalom ($^3J = 3,4$ Hz), a javlja se u spektru u vidu dubleta kvarteta (linije kvarteta su, u najvećem broju slučajeva, loše razdvojene, ali su jasno definisane nakon ozračivanja NH-3 signala u eksperimentu selektivnog homodekuplovanja), 3) NH-1 i NH-3 se kupluju („W“ kuplovanjem) konstantom $^4J = 2,1$ Hz, 4) C-2 signal (C=O uree) koreliše u HMBC spektru sa H-4 (preko tri veze), ali ne koreliše ni sa jednim od NH protona, 5) NH-1 se kupluje sa C-5 ugljenikom iz dvogube veze, ali ne i sa C-6 signalom. Biđinelijevi proizvodi su bili slabo rastvorni u deuterisanom hloroformu, tako da su njihovi spektri uglavnom snimani u CD_3SOCD_3 ; u spektru jedinjenja **6-5** (snimljenom u deuterohloroformu) uočeno je širenje i pomeranje ka nižoj δ vrednosti oba NH signala. Neke od ovih karakteristika se pojavljuju i u redukcionim proizvodima ovih jedinjenja.



Šema 59. Strukturni diverzitet proizvoda (uokvirena jedinjenja) postiže se redukcijom Biđinelijevih jedinjenja pomoću LiAlH₄. (*Redukcijom jedinjenja **6-12** dobija se ili **6-12a** ili **6-12b**, u zavisnosti od redosleda dodavanja reagenasa).
DIAD = diizopropil-azodikarboksilat



Šema 60. Numeracija korišćena pri asignaciji NMR signala

4.2.2.2. Redukcija Biđinelijevih jedinjenja [6-1]-[6-11] pomoću LiAlH₄

Redukcijom jedinjenja [6-1]-[6-11] (Biđinelijevih proizvoda dobijenih iz uree i metil-acetoacetata), viškom LiAlH₄ u suvom etru, dobijaju se, u gotovo kvantitativnom prinosu, jedinjenja [6-1a]-[6-11a] (šema 59). Detaljan opis interpretacije spektara kojom smo došli do struktura proizvoda redukcije dat je u sledećem odeljku. Ovakvo ponašanje podseća na ishode redukcija indol-3-il- i pirol-3-il karbonilnih derivata pomoću LiAlH₄. Na primer, 3-formil-1*H*-indol se redukuje do 3-metil-1*H*-indola, a 3-acetil-1*H*-indol do 3-etil-1*H*-indola (Sundberg, 1970).

Ishod redukcije N-1 (azot u poziciji 1) metilovanog Biđinelijevog jedinjenja **6-12** je zavisio od redosleda dodavanja reaktanata. Dodavanjem Et₂O-suspenzije jedinjenja **6-12** u suspenziju LiAlH₄ formira se isključivo jedinjenje **6-12a** u skoro kvantitativnom prinosu. Međutim, postepenim dodavanjem redukcionog reagensa u etarsku suspenziju jedinjenja **6-12** kao glavni proizvod (prinos: 74%) dobija se alkohol **6-12b**. Ovakvo ponašanje N-1 metilovanih Biđinelijevih proizvoda bi se moglo očekivati s obzirom da je poznato da deprotonovanje kiselog NH protona prilikom redukcije 1*H*-indol-3-karbaldehida utiče na ishod hidrogenolize – kada je pokušana redukcija metilovanog derivata (1-metil-1*H*-indol-3-karbaldehid) dobijen je samo 3-hidroksimetil-1-metil-1*H*-indol (Sundberg, 1970). U našem slučaju su detektovani samo tragovi proizvoda hidrogenolize (manje od 1%). Kada je isti redosled dodavanja reagenasa primenjen u slučaju redukcije jedinjenja [6-13]-[6-15] pomoću LiAlH₄ dobijeni su alkoholi [6-13b]-[6-15b]. Sav startni materijal izreaguje nakon 30 minuta refluksa, a duže trajanje reakcije nema efekta na sastav i prinos proizvoda. Reakcije se

odvijaju i na sobnoj temperaturi, ali su znatno duže (oko 5 sati na osnovu TLC-a).

Redukcija jedinjenja **6-18** i **6-19** (Bidinelijski proizvodi dobijeni iz acetilacetona) analogna je redukciji [**6-1**]-[**6-15**]. N-Me derivat **6-18** redukcijom daje samo jedan diastereoizomerni alkohol **6-18b**. Iako relativna stereochemija nije mogla nedvosmisleno da se odredi na osnovu spektralnih podataka, *in silico* modelovanje omogućilo nam je da predložimo najverovatniju stereochemiju – *S*,R**. Jedinjenje **6-19** daje proizvod hidrogenolize **6-19a**.

Dien **6-12c** prvobitno je izolovan hromatografskim razdvajanjem sirovog proizvoda dobijenog redukcijom jedinjenja **6-12**. Nastajanje diena **6-12c** nije bilo jednostavno objasniti – mogućnost da se dien formira prilikom redukcije ili alkalne obrade reakcione smeše je odmah odbačena jer u protonskom spektru sirovog nehromatografisanog proizvoda nije bilo signala terminalnih =CH₂ atoma. Ispostavilo se da se dien **6-12c** formira prilikom suvog nanošenja uzorka na silika gel – suspenzija SiO₂ i sirovog proizvoda je grejana na 77 °C kako bi se uklonio rastvarač (etil-acetat). Međutim, kada je proizvod na kolonu nanešen u vidu CH₂Cl₂ rastvora izolovan je samo alkohol **6-12b**. Nastajanje diena na ovaj način je potvrđeno kada su refluktovanjem alkohola [**6-12b**]-[**6-15b**] u etil-acetatu u prisustvu silika gela dobijeni dieni [**6-12c**]-[**6-15c**] u prinosima između 50 i 60%. Ispostavilo se da je ovakav način dehidratacije vrlo pogodna metoda za dobijanje diena [**6-12c**]-[**6-15c**] jer korišćenjem katalitičkih količina jakih kiselina (*p*-TsOH, BF₃, HCl) nisu dobijeni željeni dienski proizvodi. Treba još napomenuti da je alkohol **6-15b** (sa MeO- grupom na aromatičnom prstenu u položaju 4) bio mnogo manje stabilan od alkohola **6-13b** i **6-14b** – za ova dva jedinjenja je uočena neznatna degradacija nakon nekoliko dana čuvanja na sobnoj temperaturi, dok su na temperaturi -20 °C bila potpuno stabilna. Sa druge strane, znaci degradacije jedinjenja **6-15b** bili su vidljivi u NMR spektrima nakon samo nekoliko sati snimanja u CDCl₃ (čak i kada su iz rastvarača prethodno uklonjeni tragovi kiseline).

Kada je dehidracija alkohola **6-12b** i **6-15b** pokušana na sobnoj temperaturi, ishod reakcije je bio potpuno drugačiji – došlo je do izomerizacije i otvaranja dihidropirimidinonskog prstena i formiranja acikličnih konjugovanih ketona **6-12d** i **6-15d**. Ova jedinjenja su izolovana nakon hromatografije na koloni silika gela u prinosu od oko 60%, ali su njihovi rastvori u CDCl_3 bili stabilni svega 24 h.

Sirovi proizvod redukcije jedinjenja **6-18** je, bez prethodnog prečišćavanja, podvrgnut dehidracionim uslovima (refluks u etil-acetatu u prisustvu silika-gela), a zatim je dobijena smeša hromatografisana na stubu silika-gela. Na taj način izolovana su jedinjenja **6-18a-d** (šema 64) u čistom stanju. Prinos alkohola **6-18a** je bio manji od 5%, a najveći deo proizvoda (preko 60%) činili su proizvodi dehidracije **6-18b-d**.

Redukcijom Biđinelijevog proizvoda **6-16**, koji je sintetisan iz tiouree, dobijaju se dva izomerna proizvoda (**6-16a** i **6-16b**) koji se razlikuju samo u položaju dvogube veze. Međutim, prinos očekivanog endo alkena (**6-16a**) bio je upola manji od prinosa egzo alkena **6-16b** (ukupan prinos oba alkena bio je oko 80%). Ovi rezultati pokazali su da je identitet $\text{C}=\text{X}$ grupe presudan za ishod redukcije litijum-aluminijumhidridom. Glavni proizvod redukcije *S*-metilovanog derivata **6-17** (smeše dva jedinjenja koja su u tautomernoj ravnoteži) je jedinjenje **6-16a**, koje se formira demetilovanjem, redukcijom estarske grupe i hidrogenolizom. Identifikovali smo i sporedni proizvod, pirimidinski derivat **6-20** [6-fenil-4,5-dimetil-2-(metiltio)pirimidin].

Dien **6-12b** reaguje brzo na sobnoj temperaturi sa diizopropilazodikarboksilatim i daje odgovarajući Dils-Alderov adukt **6-12e** u skoro kvantitativnom prinosu (97%). Ova reakcija ilustruje reaktivnost i moguću primenu dobijenih diena za proširenje hemijskog diverziteta jedinjenja koja su dostupna iz Biđinelijevih proizvoda.

4.2.2.3. Određivanje strukture proizvoda redukcije Biđinelijevih jedinjenja pomoću LiAlH_4

Jedinjenja [6-1a]-[6-11a]. Na osnovu molekulskih jona utvrđeno je da je molekulska masa ovih jedinjenja za 44 amu manja od startnih

dihidropirimidinona. Protonski spektri proizvoda su bili slični sa $^1\text{H-NMR}$ spektrima početnih Biđinelijevih jedinjenja – jedina izrazita promena u izgledu spektara bio je gubitak estarske MeO grupe (H-9 na oko 3,50 ppm za Biđinelijeva jedinjenja, šema 60) i pojavljivanje signala nove metil grupe na oko 1,50 ppm. Hemijska pomeranja ostalih protona su bila tek neznatno promenjena (tabele 9 i 10). U $^{13}\text{C NMR}$ i IR spektrima nije bilo odgovarajućih signala estarske karbonilne grupe. Deo molekula koji potiče od uree je bio potpuno otporan na dejstvo LiAlH_4 , s obzirom da su rezonance C-2 signala bile prisutne u $^{13}\text{C NMR}$ spektrima i nakon redukcije. Hemijska pomeranja novonastale metil grupe (H-8) ukazivala su da je ona na dvostrukoj vezi (to je potvrđeno i iz HMBC spektara). Signal H-8 korelisao je ne samo sa ugljenicima dvogube veze (C-5 i C-6) već i sa C-4, što ukazuje da je redukcija dovela do deoksigenacije estarske grupe i formiranja proizvoda [6-1a]-[6-11a]. Na osnovu iznetog zaključili smo da se redukcijom Biđinelijevih jedinjenja sintetisanih ih uree i acetoacetata dobijaju 4-aril-5,6-dimetil-3,4-dihidropirimidin-2-(1H)-oni.

Jedinjenja 6-12a-d. Redukcijom *N*-metildihidropirimidinona **6-12** dobijena su dva proizvoda. Identitet sporednog proizvoda (**6-12a**) je lako utvrđen s obzirom da je struktura ovog jedinjenja analogna strukturama [6-1a]-[6-11a]. Dodatni signal MeN-grupe na 3,18 ppm je zamenio signal protona vezanog za N-1, koji se u jedinjenjima [6-1a]-[6-11a] obično nalazio na oko 6,10 ppm. Glavni proizvod reakcije (prinos 74%) bio je alkohol **6-12b**. Dva diastereotopna protona na 4,22 i 3,52 ppm kupluju se sa protonom OH-grupe (4,65 ppm, dd, $J = 6,3, 4,5$ Hz, CD_3SOCD_3). Dehidratacijom alkohola **6-12b** dobijen je dien **6-12c** sa dve egzo dvostruke veze. Asignacija hemijskih pomeranja za četiri $=\text{CH}_2$ protona izvršena je analizom NOESY spektara (tabela 11). Prisustvo nOe korelacije između NMe protona (na 3,16 ppm) i dubleta ($J_{\text{gem}} = 1,5$ Hz) na 4,22 ppm omogućilo je da pripišemo ovaj signal protonu H-7_{out}. Ovaj signal se kupluje sa signalom H-7_{in} koji koreliše u NOESY spektru sa signalom H-8_{in}. H-8_{in} se geminalno kupluje sa H-8_{out}, a oba protona dodatno se kupluju, preko četiri veze, sa H-4. Pozicije dvostrukih veza mogu da se odrede i iz HMBC spektara: protoni vezani za C-8 korelišu sa ugljenikom C-6 dok

protoni vezani za C-7 korelišu sa C-5. Usled delokalizacije slobodnog elektronskog para azota, hemijsko pomeranja signala C-7 se značajno razlikuje (za skoro 25 ppm) od pomeranja C-8. Izomerizacijom **6-12b** se dobija aciklično jedinjenje **6-12d**. Ugljenik karbonilne grupe (199,7 ppm) korelišu u HMBC spektru sa metil protonima C-7 i sa dva protona na sp^2 hibridizovanom ugljeniku C-8. H-8 protoni se kupluju sa C-4, H-4 se kupluje sa NH-3 ($J = 8,4$ Hz), ugljenik uree C-2 kupluje se sa H-1 protonima, dok NH-1 i NH-3 protoni korelišu (hemijska izmena) u NOESY spektru. Na osnovu ovih korelacija zaključili smo da je struktura jedinjenja **6-12d**: 3-(1-fenil-2-metilen-3-oksobutil)-1-metilurea.

Jedinjenja 6-16a-b. Nakon redukcije dihidropirimidintiona **6-16** izolovana su dva proizvoda. Proizvod **6-16a** (dobijen u prinosu od 22%) je lako identifikovan jer su njegovi NMR spektri posedovali iste karakteristike kao i jedinjenja [**6-1a**]-[**6-11a**]. Glavni proizvod redukcije **6-16b** (prinos 57%), izomer jedinjenja **6-16a**, posedovao je jednu egzo metilensku grupu (dva protona na dvostrukoj vezi, hemijskih pomeranja 5,15 i 4,68 ppm, vezana su za isti ugljenik, δ_c 113,2). Tačno mesto dvostruke veze u molekulu određeno je analizom HMBC spektra – protoni vezani za dvostruku vezu korelišu, preko tri veze, sa CH ugljenicima na 61,0 ppm (C-4) i 51,5 ppm (C-6), što je moguće samo ako dvostruka veza povezuje C-5 i C-8. Interesantno je da su sve konstante kuplovanja protona u spektru (izuzev kuplovanja unutar fenil grupe i kuplovanja protona H-7 i H-6, $J = 6,6$ Hz) bile iste vrednosti ($J = 1,5$ Hz) – geminalno kuplovanje H-8 protona (pro-*E* i pro-*Z*), alilna kuplovanja između H-6 i H-8, kao i između H-4 i H-8, i „W“ kuplovanje H-4 i H-6. Pomenuto „W“ kuplovanje postoji samo ako je relativna stereochemija formiranog 6-fenil-4-metil-5-metilentetrahidropirimidin-2(1*H*)-tiona bila 4*S**, 6*R**, to jest ako se metil- i fenil- grupe nalaze sa iste strane ravni heterocikličnog prstena.

Metilovanjem jedinjenja **6-16** dobija se ravnotežna smeša *S*-metilovanih tautomera **6-17** (metil-4-fenil-6-metil-2-(metiltio)-1,4-dihidropirimidin-5-karboksilat i metil-6-fenil-4-metil-2-(metiltio)-1,6-dihidropirimidin-5-karboksilat). Redukcijom smeše tautomera pomoću $LiAlH_4$ dobijaju se dva jedinjenja **6-16a** i **6-20**; hemijska pomeranja ugljenika C-2, C-4, C-5 i C-6

karakteristična su za pirimidinske derivate, a konektivnost je potvrđena uočenim HMBC i NOESY korelacijama tri prisutne metil grupe. Metil-grupa vezana za sumpor pokazuje samo jedno daljinsko CH kuplovanje (sa C-2), H-7 se kupluje sa C-5 (kroz dve) i C-6 (kroz tri veze), dok H-8 koreliše sa C-4 i C-6 (kroz tri veze) i sa C-5 (kroz dve veze). Dobijeni spektralni podaci su ukazivali da je struktura jedinjenja **6-20** 6-fenil-4,5-dimetil-2-(metiltio)pirimidin.

Tabela 9. ¹³C NMR hemijska pomeranja (ppm) jedinjenja [6-1a]-[6-11a] u CDCl₃ ili CD₃SOCD₃ na 100,6 MHz

Signal	6-1a (CDCl ₃)	6-2a (CDCl ₃)	6-3a (CDCl ₃)	6-4a (CDCl ₃)	6-5a (CDCl ₃)	6-6a (CDCl ₃)	6-7a (CDCl ₃)	6-8a (CDCl ₃)	6-9a (CDCl ₃)	6-10a (CDCl ₃)	6-11a (CD ₃ SOCD ₃)
C-2	153,6	153,7	154,2	153,8	154,0	153,4	154,4	154,1	153,8	154,3	153
C-4	61,8	61,4	61,6	58,4	61,0	61,7	54,1	60,8	61,1	53,8	53,1
C-5	102,8	102,8	102,5	101,9	102,8	102,6	101,1	102,4	102,1	101,1	98,6
C-6	125,2	125,2	125,5	126,3	125,3	125,4	127,5	125,8	126,0	126,9	127,3
C-7	15,7	15,6	15,5	15,5	15,5	15,7	15,6	15,5	15,6	15,5	14,8
C-8	14,3	14,3	14,3	14,1	14,3	14,3	14,8	14,3	14,3	14,2	14,0
C-1'	143,2	140,4	143,4	140,1	135,6	144,8	129,3	139,2	145,9	129,7	155,7
C-2'	127,0	127,0	127,7	135,6	128,2	113,2	157,1	128,7	114,0	160,2	105,7
C-3'	128,8	129,4	138,4	130,6	114,0	160,0	110,4	115,6	163,1	115,5	110,1
C-4'	128,1	137,7	128,5	128,3	159,0	112,8	120,8	162,4	115,0	129,5	142,1
C-5'			128,7	126,7		129,8	127,5		130,3	124,7	
C-6'			124,2	127,8		119,4	129,0		122,7	128,8	
C-1''		21,1	21,4	19,0	55,3	55,3	55,3				

Tabela 10. ¹H NMR hemijska pomeranja (ppm) jedinjenja [6-1a]-[6-11a] u CDCl₃ ili CD₃SOCD₃ na 400 MHz

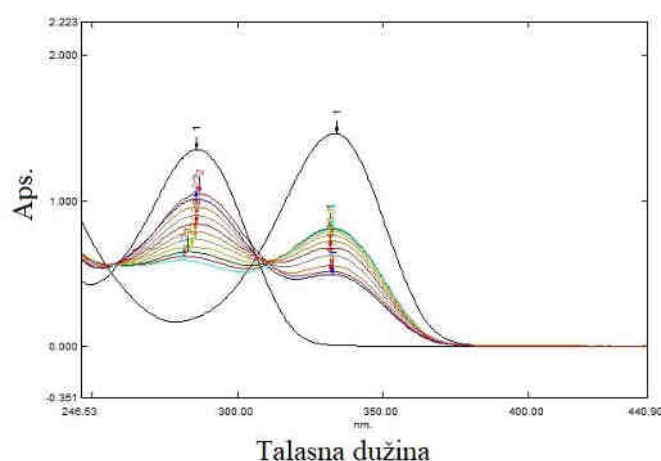
Signal	6-1a (CDCl ₃)	6-2a (CDCl ₃)	6-3a (CDCl ₃)	6-4a (CDCl ₃)	6-5a (CDCl ₃)	6-6a (CDCl ₃)	6-7a (CDCl ₃)	6-8a (CDCl ₃)	6-9a (CDCl ₃)	6-10a (CDCl ₃)	6-11a (CD ₃ SOCD ₃)
H-2	¹³ C										
H-4	4,77	4,78	4,74	5,12	4,74	4,75	5,16	4,74	4,76	5,19	4,69
H-5											
H-6											
H-7	1,80	1,79	1,81	1,81	1,81	1,80	1,87	1,78	1,80	1,83	1,67
H-8	1,44	1,43	1,45	1,39	1,44	1,44	1,56	1,41	1,44	1,51	1,47
H-1'											
H-2'		7,20			7,23			7,25			6,18
H-3'	7,27-7,39	7,17	7,03-7,14	7,11-7,20	6,88	6,80-6,95	6,88	7,00	6,90-7,10	7,05	6,37
H-4'	(5H)		(4H)	(4H)		(4H)	7,14		(4H)	7,35	7,57
H-5'							6,92			7,16	
H-6'							7,25			7,27	
H-1''		2,34	2,36	2,38	3,82	3,80					
NH-1	6,10	6,78	7,51	/	7,18	6,43	6,59	7,47	7,20	7,27	8,02
NH-3	4,99	5,17	5,49	5,60	5,36	5,09	5,28	/	5,53	5,34	7,01

Tabela 11. ^1H i ^{13}C NMR hemijska pomeranja (ppm) jedinjenja **6-12c-15c** u CDCl_3 na 400, odnosno 100,6 MHz

Signal	6-12c (CDCl_3)		6-13c (CDCl_3)		6-14c (CDCl_3)		6-15c (CDCl_3)	
	^{13}C	^1H	^{13}C	^1H	^{13}C	^1H	^{13}C	^1H
C-2	153,9		153,7		153,8		153,9	
C-4	58,2	5,00	57,5	5,01	58,1	4,98	57,9	4,98
C-5	139,4		139,3		139,3		138,0	
C-6	142,9		142,7		142,9		140,3	
C-7	89,2	4,20 (H-7 _{OUT} , <i>d</i> , <i>J</i> =1,5 Hz) 4,57 (H-7 _{IN} , <i>d</i> , <i>J</i> =1,5 Hz)	89,4	4,24 (H-7 _{OUT} , <i>d</i> , <i>J</i> =1,5 Hz) 4,59 (H-7 _{IN} , <i>d</i> , <i>J</i> =1,5 Hz)	89,2	4,21 (H-7 _{OUT} , <i>d</i> , <i>J</i> =1,5 Hz) 4,58 (H-7 _{IN} , <i>d</i> , <i>J</i> =1,5 Hz)	89,1	4,20 (H-7 _{OUT} , <i>d</i> , <i>J</i> =1,5 Hz) 4,55 (H-7 _{IN} , <i>d</i> , <i>J</i> =1,5 Hz)
C-8	113,3	4,84 (H-8 _{OUT} , <i>d</i> , <i>J</i> =0,7 Hz) 5,57 (H-8 _{IN} , <i>d</i> , <i>J</i> =0,7 Hz)	113,4	4,84 (H-8 _{OUT} , <i>d</i> , <i>J</i> =0,6 Hz) 5,59 (H-8 _{IN} , <i>d</i> , <i>J</i> =0,6 Hz)	113,4	4,80 (H-8 _{OUT} , <i>d</i> , <i>J</i> =0,7 Hz) 5,57 (H-8 _{IN} , <i>d</i> , <i>J</i> =0,7 Hz)	113,2	4,81 (H-8 _{OUT} , <i>d</i> , <i>J</i> =0,7 Hz) 5,55 (H-8 _{IN} , <i>d</i> , <i>J</i> =0,7 Hz)
C-1'	139,9		135,6 (<i>d</i> , <i>J</i> =3,0 Hz)		141,5		139,6	
C-2'	126,6		128,3 (<i>d</i> , <i>J</i> =8,1 Hz)	7,28 (2H)	113,5		126,5	
C-3'	128,8	7,27-7,40 (5H)	115,8 (<i>d</i> , <i>J</i> =21,9 Hz)	7,08 (2H)	160,0		129,5	7,17 (4H)
C-4'	128,1		162,5 (<i>d</i> , <i>J</i> =247,0 Hz)		112,3	6,80-6,95 (4H)	136,8	
C-5'					129,9			
C-6'					118,9			
C-1''					55,3	3,80	21,1	2,34
N-Me	30,4	3,16	30,4	3,18	30,4	3,17	30,4	3,17
NH-3		/		5,38		5,30		5,24

4.2.2.4. Kiselost Biđinelijevih jedinjenja (jedinjenje **6-1**)

Drastična razlika u ishodu redukcija N-1 metilovanih i nemetilovanih Biđinelijevih jedinjenja ukazuje na ulogu H-1 protona vezanog za N-1 u reakciji. Kiselost Biđinelijevih jedinjenja (**6-1**) je po prvi put određena u ovoj disertaciji. UV spektri jedinjenja **6-1** u oblasti pH 13,20-13,59 prikazani su na slici 7. Jasno uočljiva izobestička tačka ukazuje da je interkonverzija jedinjenja **6-1** i njegove konjugovane baze jedini proces koji se odigravao u rastvoru, što potvrđuje validnost spektrofotometrijske metode za određivanje pK_a . Konstanta kiselosti je izračunata transformacijom izraza klasične spektrofotometrijske jednačine (za više detalja pogledati eksperimentalni deo). Određena vrednost ($pK_a = 13,52$) ukazuje na dramatičan uticaj dodatne konjugacije (u 3-aminoakrilatnom fragmentu) na kiselost NH-1 protona; kada se uporedi sa nesupstituisanom ureom ($pK_a = 27$), kiselost NH protona je povećana za faktor 10^{13} .



Slika 7. UV spektri jedinjenja **6-1** snimljenih u oblasti pH 13,20 – 13,59

4.2.2.5. Mehanizmi redukcija Biđinelijevih jedinjenja

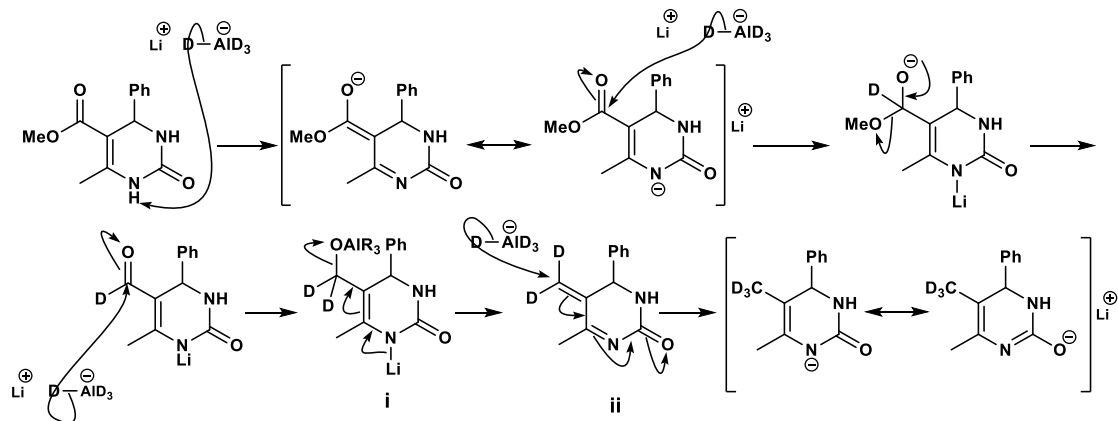
Mehanizmi su ispitani eksperimentima sa deuterisanim redukcionim agensom. Redukcije jedinjenja **6-1** i **6-12** izvedene su pomoću litijum-aluminijumdeuterida. Metil grupa C-8 u jedinjenju **6-1** je potpuno deuterisana, što se može zaključiti iz pojave hepteta na 13,5 ppm u ^{13}C NMR spektru, gubitka H-8 signala i pojednostavljenja multipleta H-4 i H-7. Broj inkorporiranih deuterijuma i njihov položaj potvrđen je pomoću m/z vrednosti molekulskog jona i pojave $[\text{M} - \text{CD}_3]^+$ fragmentnog jona u

masenom spektru. Prisustvo kvinteta na 58,6 ppm ukazuje na vezivanje dva deuterijuma za C-8 prilikom redukcije kompleksnim deuteridom. Na osnovu ovih eksperimenata zaključili smo da se redukcije Biđinelijevih jedinjenja pomoću LiAlH_4 (date u shemama 61 do 63) sastoje od sledećih koraka:

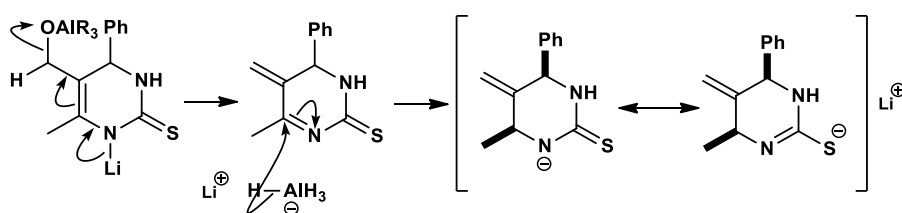
- (1) U prvom koraku, LiAlH_4 napada estarsku ili ketonsku karbonilnu grupu Biđinelijevog jedinjenja. Ovom koraku prethodi deprotonovanje relativno kiselog NH-1 azota, ukoliko je u sintezi Biđinelijevog jedinjenja korišćena urea. Deprotonovanje smanjuje elektrofilnost estera/ketona što se vidi i iz neuspešnih pokušaja da se jedinjenje **6-1** hidrolizuje bazom (suprotno tome, N-metilovani analog lako podleže hidrolizi, Singh i Singh, 2012).
- (2) Generisani tetraedarski intermedijer se raspada na aldehid koji podleže napadu drugog ekvivalenta hidridnog reagensa, čime se dobija alkoksidna (preciznije, aluminatna) vrsta **i**. Kod jedinjenja **6-18** i **6-19**, ovaj intermedijer se formira u prvom koraku. Kod N-1 metilovanih Biđinelijevih jedinjenja reakcija se ovde zaustavlja i nakon bazne obrade dobijaju se alkoholi **6-12b** i **6-15b**.
- (3) Kod Biđinelijevih jedinjenja sintetisanih iz uree, slobodni elektronski par sa negativno naelektrisanog azotovog atoma izbacuje, preko C-5-C-6 dvostruke veze, odlazeću grupu (najverovatnije aluminat) iz molekula, čime se dobija intermedijer **ii**. Intermedijer **ii** (konjugovani imin) je elektrofilan (u položajima C-6 i C-8) zbog konjugacije sa C-2 karbonilnom grupom.
- (4) Proizvodi **[6-1a]**-**[6-11a]** se formiraju Majklovom adicijom trećeg hidridnog ekvivalenta na konjugovani imin **ii** i protonovanjem prilikom obrade reakcije. Moguć je i drugačiji mehanizam: napad hidrida na C-6 atom intermedijera **ii** dovodi do formiranja egzo dvostruke veze, a dobijeni proizvod prilikom obrade tautomerizuje u stabilniji proizvod (**6-1a**). Ovaj mehanizam je, međutim, odbačen – redukcija jedinjenja **6-1** litijum-aluminijumdeuteridom daje isključivo proizvod u kojem je C-8 potpuno deuterisan. Ako bi se paralelno odvijala oba mehanizma, procenat deuterisanja C-8 bio bi

manji od 100% (s obzirom da bi došlo do vezivanja protona iz H₂O prilikom obrade).

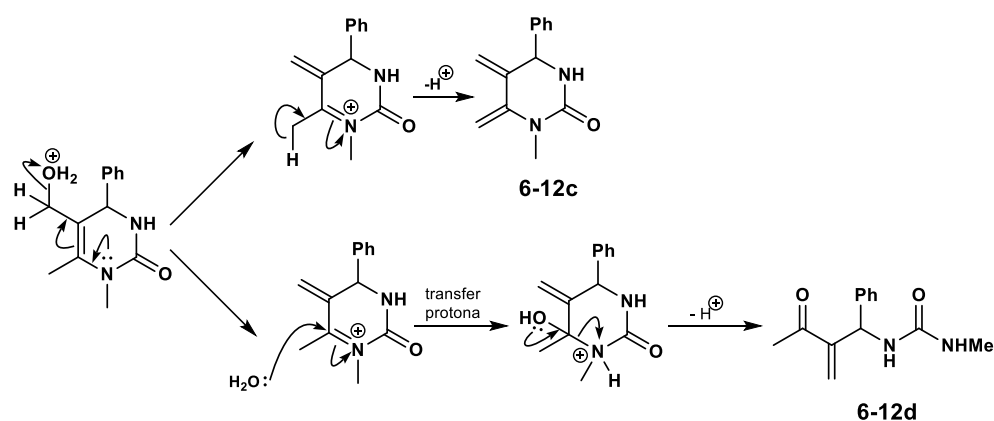
- (5) Mehanizam nastanka **6-16b** sastoji se od direktnog nukleofilnog napada hidrida na iminski ugljenik, C-6, u intermedijeru **ii** (šema 62). Uočena stereoselektivnost (kompleksni hidrid napada pretežno sa manje sterno zaštićene strane heterocikličnog prstena, nasuprot fenil grupe) potvrđuje da se jedinjenje **6-14b** formira direktnim nukleofilnim napadom na C=N. Razlika u regiohemiji hidridnog napada najverovatnije potiče od odsustva produžene delokalizacije kod Biđinelijevih jedinjenja sintetisanih iz tiouree.
- (6) Zagrevanje alkohola **6-12b** u prisustvu silika-gela dovodi do dehidratacije; međutim, na sobnoj temperaturi dolazi do izomerizacije i otvaranja prstena. Formiranje jedinjenja **6-12c** i **6-12d** najverovatnije se odvija preko istog intermedijera – konjugovanog iminijum jona (šema 63). Na višim temperaturama dobija se dien **6-12c** koji je favorizovan entropijom, dok se na sobnoj temperaturi dobija termodinamički stabilniji konjugovani keton **6-12d**.
- (7) Mehanizam koji bi objasnio nastajanje jedinjenja **6-18b-d** dat je na šemi 64. Sve reakcije se odvijaju kroz zajednički intermedijer, konjugovani iminijum katjon **i**. Majklovom adicijom hidrida na C-8 intermedijera **i** dobija se jedinjenje **6-18b**. Kiselo katalizovana dehidratacija alkohola **6-18a** daje dien **6-18d** (najverovatnije gubitkom protona intermedijera **i**). Za formiranje jedinjenja **6-18c** moguće je predložiti dva mehanizma – ovo jedinjenje može da nastane iz diena **6-18d** [1,5]-sigmatrofnim premeštanjem vodonika ili tautomerizacijom intermedijera **i**. Vrlo je verovatno da barem male količine jedinjenja **6-18c** nastaju iz **i** – uočili smo da ovaj proizvod nastaje redukcijom Biđinelijevog jedinjenja **6-18** pomoću NaBH₄ kao jedini dehidracioni proizvod (prinos 5%) kada se reakciona smeša obradi bazom. Time se jedinjenje **6-18d** eliminiše kao prekursor **6-18c** jer su neophodni kiseli uslovi za nastajanje diena.



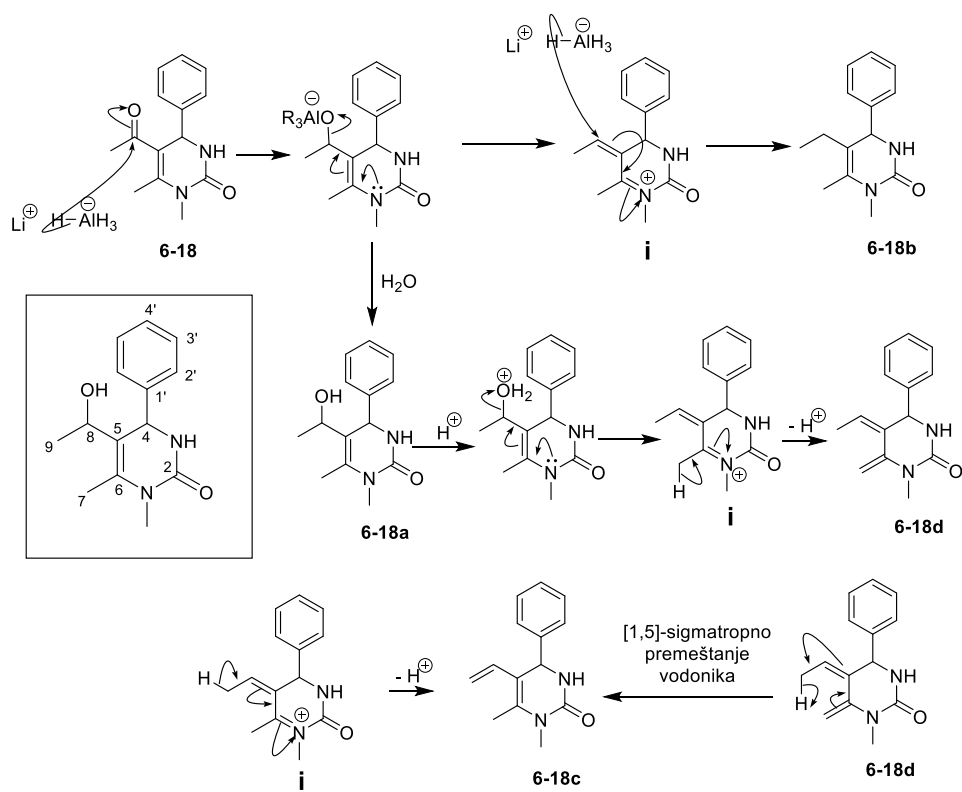
Šema 61. Predloženi mehanizam redukcije jedinjenja **6-1** (i drugih Biđinelijevih jedinjenja bez N-1-Me grupe) pomoću LiAlD_4 , kojom se dobijaju deoksigenovani proizvodi [**6-1a**]-[**6-11a**]



Šema 62. Predloženi mehanizam redukcije jedinjenja **6-16** litijum-aluminijumhidridom, kojom se dobija jedinjenje **6-16b**



Šema 63. Predloženi mehanizmi dehidratacije (gore) i izomerizacije (dole) jedinjenja **6-12** (i drugih alkohola koji se dobijaju redukcijom *N*-metilovanih Biđinelijevih jedinjenja)



Šema 64. Predloženi mehanizam formiranja proizvoda **6-18b-d**.

4.3. Biološke/farmakološke aktivnosti izolovanih i sintetisanih jedinjenja

4.3.1. Antimikrobna aktivnost epoksigermakrona

Epoksidacija germakrona omogućila nam je da dobijemo dovoljno materijala za testiranje antimikrobne aktivnosti. Vrednosti MIK su određene mikrodilucionom metodom za 6 bakterijskih i 1 soj gljivice. Dobijene vrednosti date su u tabeli 12.

Vrednosti MIK za 4,5-epoksigermakron na bakterije bile su u oblasti od 10 µg/ml, (43 nmol/ml), za *Bacillus subtilis*, do 3,34 mg/ml (14,3 µmol/ml), za soj *Escherichia coli*. 1,10-Epoksigermakron je bio 10 puta aktivniji na *B. subtilis* dok su ostale vrednosti MIK i MBK bile približno iste kao vrednosti za 4,5-epoksid. Oba jedinjenja su pokazala slabu antifungalnu aktivnost na gljivicu *Candida albicans*.

Iako je većina vrednosti MIK bila značajno viša od onih za testirane kontrole, najveća uočena aktivnost (u slučaju *B. subtilis*) bila je samo 10 puta manja od aktivnosti tetraciklina. Ovaj rezultat je veoma impresivan ako se ima u vidu da etarska ulja i njihovi sastojci nisu efikasni antimikrobni agensi (Radulović et al., 2013). Jedinjenja koja su najčešći sastojci etarskih ulja imaju vrednosti MIK koje su reda veličine mg/ml (uz retke izuzetke kao što su etarsko ulje *G. macrorrhizum*, Radulović et al., 2010).

Oba jedinjenja su pokazala mnogo veće antibakterijske aktivnosti od germakrona na *B. subtilis* (Radulović et al., 2010). 1,10-Epoksigermakron je 1250 puta aktivniji prema *B. subtilis* od germakrona. Međutim, iako se ove aktivnosti mogu smatrati izuzetno jakim, doprinos ovih jedinjenja aktivnosti celog ulja (vrednosti MIK prema *B. subtilis* bile su 0,4 µg/ml za ulje rizoma i 1,0 µg/ml za ulje nadzemnog dela) zanemarljiv je usled male zastupljenosti dva epoksida u ulju (< 1,0%). Međutim, 4,5-epoksigermakron je glavni sastojak etarskog ulja nekoliko biljnih vrsta roda *Curcuma* (Shiobara et al., 1985; Kojima et al., 1998; Matsuda et al., 1998) i vrste iz ovog roda se tradicionalno koriste za lečenje bakterijskih infekcija. To znači da bi ovo jedinjenje moglo da bude jedan od glavnih aktivnih principa taksona koji pripadaju ovom etnofarmakološki važnom rodu.

Poboljšanje antimikrobne aktivnosti koje se javlja inkorporiranjem O-atoma u germakron može da se smatra posledicom uvođenjem dodatne farmakofore. Epoksigermakroni sadrže ne samo α,β -nezasićenu karbonilnu grupu već i vrlo reaktivni oksaciklopropanski prsten koji može da se otvori i intra- (Hikino et al., 1977; Piet et al., 1995; Kuroyanagi et al., 1990) i intermolekulski. Ovim procesima dolazi ili do direktne kovalentne modifikacije biološkog (bakterijskog) nukleofila (i gubitka njegove funkcije) ili stvaranja niza reaktivnih elektrofilnih vrsta (Perez Morales et al., 2013) koji mogu da reaguju sa pomenutim nukleofilima. Intramolekulski put je vrlo povoljan, što se može i zaključiti po nestabilnosti epoksida u kiseljoj sredini.

Važan faktor koji može doprineti široj upotrebi ovih jedinjenja je i jednostavnost kojim se mogu dobiti, to jest, germakron se može u velikim količinama izolovati iz etarskog ulja *G. macrorrhizum*, biljne vrste koja se industrijski uzgaja. Takođe, moguće je izbeći upotrebu toksičnog reagensa *mCPBA* s obzirom da postoji veliki broj „zelenih“ procedura za epoksidaciju olefina (van Vliet et al., 2001).

Tabela 12. Minimalne inhibitorne koncentracije (MIK [$\mu\text{mol/ml}$]), minimalne baktericidne koncentracije (MBK [$\mu\text{mol/ml}$]) i minimalne fungicidne koncentracije (MFK) germakron-1,10-epoksida (**2-1**) i germakron-4,5-epoksida (**2-2**)

Sojevi	2-1		2-2		Kontrola [nmol/ml] MIK/MBK (tetraciklin)
	MIK	MBK	MIK	MBK	
Bakterijski sojevi					
<i>Gram-negativni</i>					
<i>Escherichia coli</i>	7,14	14,3	14,3	14,3	3,51/3,21
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	0,043	0,214	0,855	2,14	7,02/7,02
<i>Salmonella enteritidis</i>	7,14	7,14	7,14	14,3	7,02/7,03
<i>Gram-pozitivni</i>					
<i>Bacillus subtilis</i>	0,0043	0,0086	0,043	0,086	0,195/0,195
<i>Listeria monocytogenes</i>	7,14	14,3	7,14	14,3	36,0/36,0
<i>Staphylococcus aureus</i>	7,14	7,14	7,14	14,3	0,202/0,202
	MIK	MFK	MIK	MFK	MIK/MFK (nistatin)
Soj gljivice					
<i>Candida albicans</i>	21,4	>42,8	10,7	>42,8	0,09/0,09

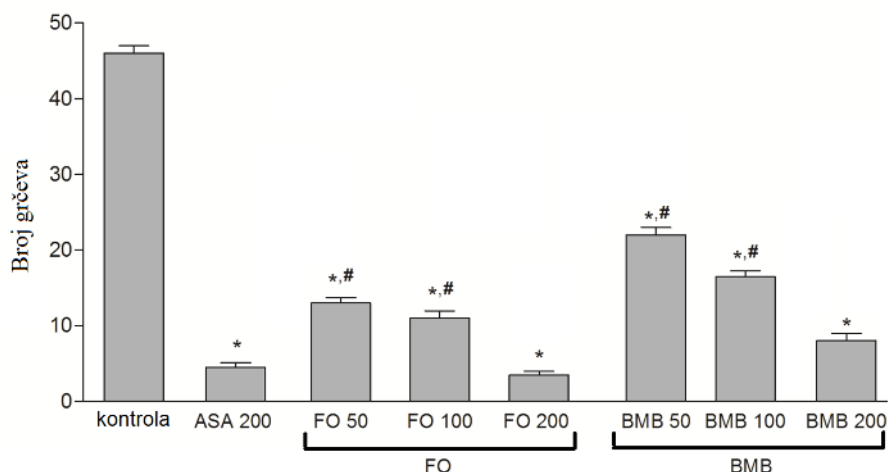
4.3.2. Antinociceptivno dejstvo etarskog ulja *Ferula ovina* (Boiss.) Boiss. i bornil-4-metoksibenzoata

Antinociceptivne aktivnosti etarskog ulja *F. ovina* i bornil-4-metoksibenzoata su određivane u tri modela nocicepcije u kojima se ispituju dva različita tipa bolnog nadražaja (termalni i hemijski bolni nadražaj).

4.3.2.1. Model hemijskog bolnog nadražaja

U ovom modelu, po ubrizgavanju sirćetne kiseline dolazi do sinteze i otpuštanja prostaglandina i medijatora simpatičkog nervnog sistema, aktivacije i senzitivacije perifernih hemosenzitivnih nociceptivnih receptora i aktivacije upalnog procesa, što rezultuje abdominalnim grčenjem (Haider et al., 2011). Etarsko ulje (FO) je pokazivalo jako antinociceptivno dejstvo, što se najjasnije videlo po inhibiciji abdominalnog grčenja izazvanog sirćetnom kiselinom (slika 8). Za životinje tretirane etarskim uljem vrste *F. ovina*, u dozi od 200 mg kg⁻¹ telesne mase, zabeleženo je smanjenje broja grčeva (92%) što je bilo približno efektu acetilsalicilne kiseline u istoj dozi (200 mg kg⁻¹, 90%, tabela 13). Od ranije je poznato da neki od glavnih sastojaka etarskog ulja vrste *F. ovina* (tabela 4) poseduju analgetsko dejstvo (de Sousa, 2011), pa prisustvo monoterpena mircena, α - i β -pinena, limonena i sl. može barem delom da objasni uočenu aktivnost ulja.

Uporedo sa uljem je testiran i novi prirodni proizvod, bornil-4-metoksibenzoat (BMB). Ovo jedinjenje je pokazalo gotovo identičan efekat (~83%, 200 mg kg⁻¹) kao etarsko ulje (slika 8). Uočeno je statistički značajno dejstvo (smanjenje broja grčeva) za FO i BMB u svim testiranim dozama, uz doznu zavisnost. Rezultati dobijeni pri testiranju FO i BMB i dozi od 200 mg kg⁻¹ nisu se statistički razlikovali od dejstva aspirina u istoj dozi. Lažno pozitivni rezultati u ovom testu su mogući, pri čemu mišićni relaksanti, adrenergični blokatori, antihistaminici i neuroleptici ispoljavaju lažno pozitivno dejstvo (Le Bars et al., 2011). Kako je borneol nekompetitivni inhibitor nikotinskih receptora koji su uključeni u regulaciju kontrakcije skeletnih mišića (Park et al., 2003), može se spekulirati da bornil-4-metoksibenzoat poseduje miorelaksantnu aktivnost.



Slika 8. Efekat akutnog tretmana etarskog ulja vrste *F. ovina* (FO, u dozama 50, 100 i 200 mg kg⁻¹), bornil-4-metoksibenzoata (BMB) i acetilsalicilne kiseline, ASA (200 mg kg⁻¹), na broj grčeva kod miševa tretiranih sirćetnom kiselinom. Kontrola je primila maslinovo ulje. Vrednosti su date kao srednja vrednost ± SD, $n = 6$. Iz ANOVA i Tjukijeveg testa, * $p < 0,001$ u odnosu na kontrolu; # $p < 0,001$ u odnosu na ASA.

4.3.2.2. Model termalnog bolnog nadražaja

Analgetsko dejstvo etarskog ulja *F. ovina* je određivano pomoću metode vruće ploče i testa uranjanja repa kojima se ispituje dejstvo supstanci na percepciju bola u centralnom nervnom sistemu. Važno je napomenuti da u testu abdominalnog grčenja i centralni i periferalni analgetici daju pozitivne rezultate. Centralna kontrola bola je pod uticajem modulacije bolnog nadražaja od strane moždanih ćelijskih grupa (jedra) poput *locus coeruleus/subcoeruleus* i *raphe* kompleksa. Smatra se da je metoda vruće ploče selektivni test za supstance koje utiču na supraspinalni odgovor (Le Bars et al., 2011), to jest, na strukture mozga koje percipiraju bol i nalaze se iznad kičmene moždine. Testirano etarsko ulje je izazivalo povećanje vremena reakcije pri temperaturi od 55 ± 1 °C. Izračunati procenat inhibicije reakcije, u dozama od 50, 100 i 200 mg kg⁻¹, i morfina (u dozi 5 mg kg⁻¹) iznosio je: 13,2, 21,1, 28,4 i 72,7% (tabela 13). Statistički značajan efekat najveće doze od 200 mg kg⁻¹ ulja zabeležen je nakon 30 minuta od tretiranja (slika 9). Najjači efekat ulja na percepciju termalnog

nadražaja (maksimalno povećanje vremena reakcije) uočeno je 90 min nakon tretiranja (za sve doze), i ostao je na približno istom nivou do kraja eksperimenta (slika 9), dok se efekat morfina (5 mg kg^{-1}) javio znatno brže (svega 15 min nakon aplikacije, slika 9).

Tabela 13. Antinociceptivno dejstvo (procenat inhibicije) *i.p.* injektiranja etarskog ulja *F. ovina* (FO), bornil-4-metoksibenzoata (BMB) i pozitivnih kontrola (acetilsalicilna kiselina, ASA* u testu abdominalniog grčenja i morfin** u testovima vruće ploče i uranjanja repa).

Grupa	Doza (mg/kg)	% inhibicije		
		Test abdominalnog grčenja*	Test vruće ploče**	Test uranjanja repa**
FO	50	71,7	13,2	38,5
	100	77,1	21,1	42,8
	200	92,4	28,4	55,8
BMB	50	52,2	-7,1 [#]	32,6
	100	64,1	-7,4 [#]	42,8
	200	82,6	-1,7 [#]	49,9
Pozitivna kontrola	200*/5**	90,2	72,7	80,6

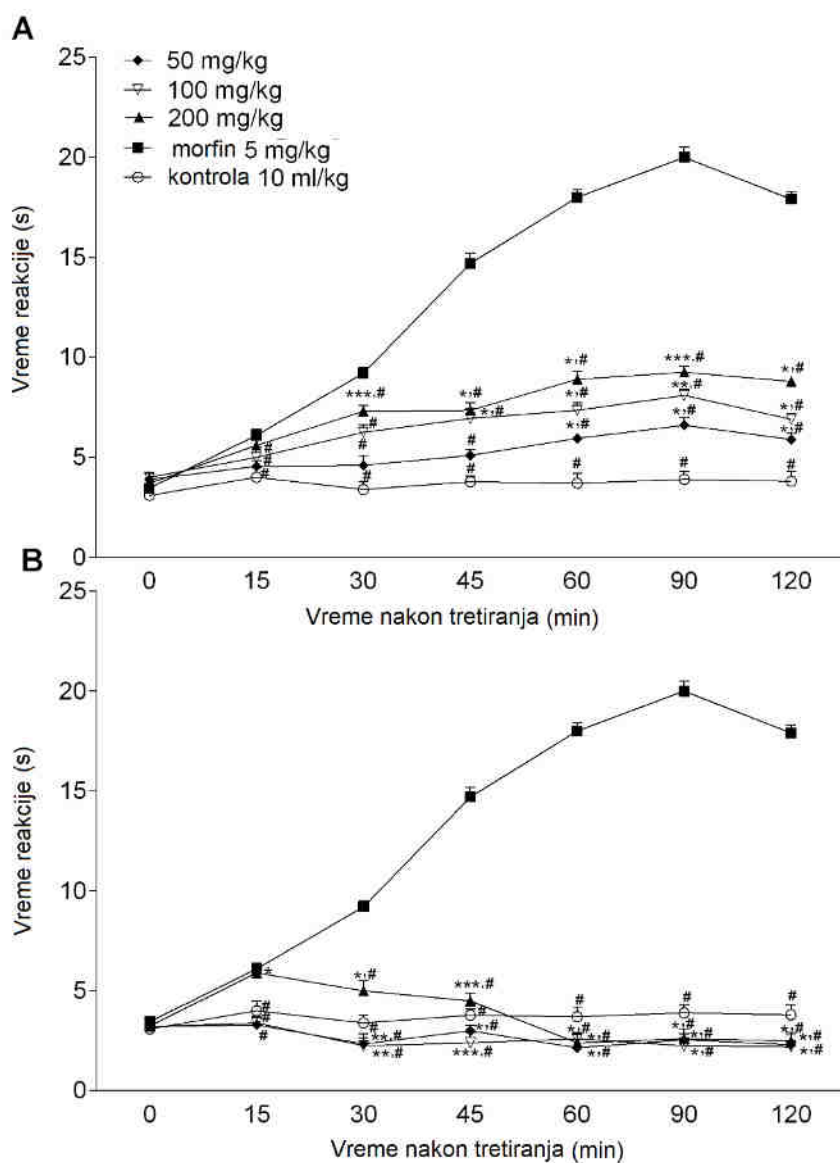
- reakcija miševa je bila brža od reakcije kod miševa korišćenih za određivanje bazne reakcije.

Kod životinja tretiranih bornil-4-metoksibenzoatom uočeno je drugačije ponašanje u ovom testu. Životinje koje su tretirane bornil-4-metoksibenzoatom su značajno brže reagovala na termalni stimulus od kontrolnih, a ovo ponašanje se može opisati kao hiperalgezija ili kao alodinija (slika 9). Hiperalgezija predstavlja povećanje osetljivosti na bol kroz smanjenje praga bola⁹ i/ili pojačanje odgovora na bol koji prelazi prag, a alodinija je postojanje osećaja bola kao odgovor na nenociceptivni nadražaj (Sandkuhler, 2009)¹⁰.

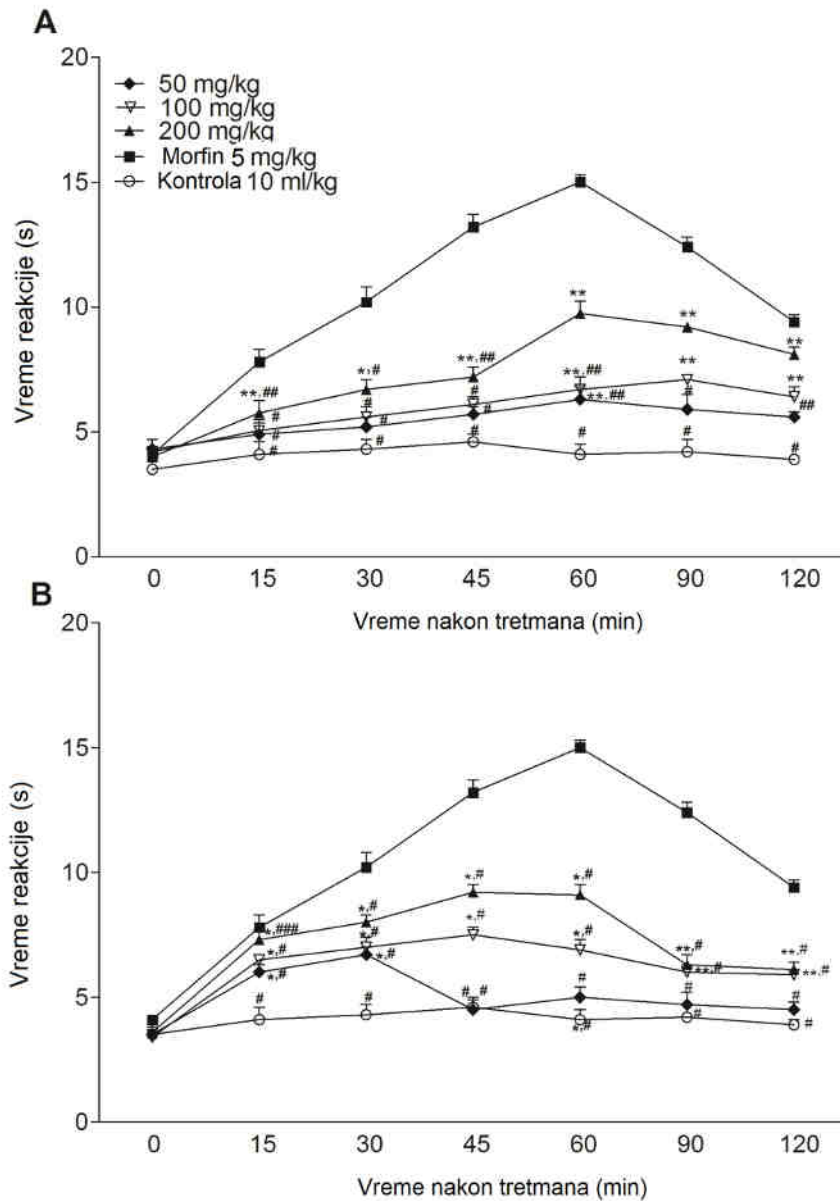
⁹ Skraćeno vreme reakcije na isti termalni nadražaj (npr., ista temperatura vruće ploče)

¹⁰ Reakcija životinje na nižu temperaturu

Na slici 9 se može uočiti kako se smanjuje vreme reakcije miševa na termalni nadražaj u svim testiranim dozama bornil-4-metoksibenzoata. Samo je najveća doza dovela do kratkotrajne analgezije (od 15 do 45 min) nakon čega je kod životinja ponovo nastupila hiperalgezija/alodinija.



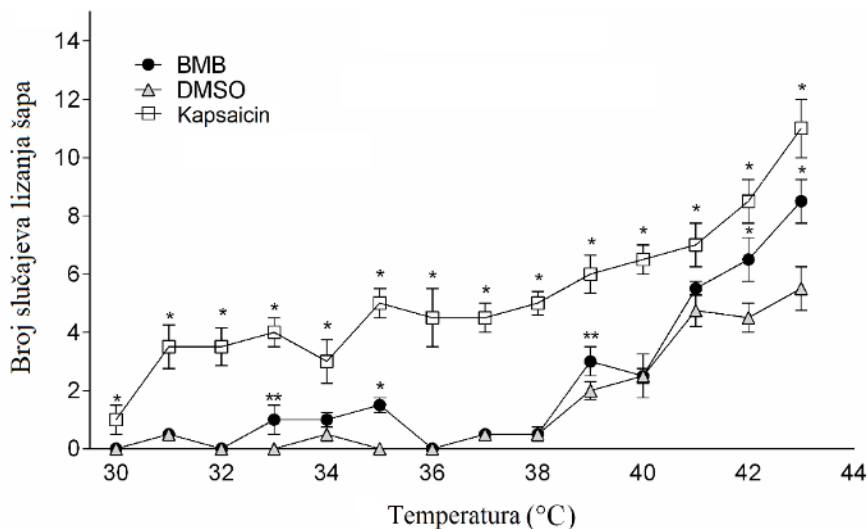
Slika 9. Efekat etarskog ulja vrste *F. ovina* (u dozama od 50, 100 i 200 mg kg⁻¹) na nociceptivni odgovor u testu vruće ploče (A) i efekat bornil-4-metoksibenzoata (50, 100 i 200 mg kg⁻¹) u istom testu (B), u poređenju sa aktivnošću morfina (5 mg kg⁻¹) i kontrolom (maslinovo ulje, 10 mL kg⁻¹). Rezultati su izraženi kao srednja vrednost ± SD, $n = 6$. Iz ANOVA i Tjukijevog testa, $*p < 0,001$, $**p < 0,01$, $***p < 0,05$ u odnosu na kontrolu; $\#p < 0,001$ u odnosu na morfin.



Slika 10. Efekat etarskog ulja vrste *F. ovina* (u dozama od 50, 100 i 200 mg kg⁻¹) na nociceptivni odgovor u testu uranjanja repa (A) i efekat bornil-4-metoksibenzoata (50, 100 i 200 mg kg⁻¹) u istom testu (B), u poređenju sa aktivnošću morfina (5 mg kg⁻¹) i kontrolom (maslinovo ulje, 10 mL kg⁻¹). Rezultati su izraženi kao srednja vrednost ± SD, $n = 6$. Iz ANOVA i Tjukijevog testa, $*p < 0,001$, $**p < 0,01$ u odnosu na kontrolu; $\#p < 0,001$, $\#\#p < 0,01$, $\#\#\#p < 0,05$ u odnosu na morfin.

Limonen, jedan od glavnih sastojaka testiranog ulja, nema dejstvo na supraspinalnu nocicepciju (do Amaral et al., 2007) za razliku od ulja koje smo testirali. Međutim, utvrđeno je da mircen, koji čini oko 13% ulja, stimuliše otpuštanje endogenih opioda kroz medijaciju $\alpha 2$ -adrenoreceptora (Rao et al., 1990). Može se pretpostaviti da mircen doprinosi uočenoj analgetskoj aktivnosti ulja, ali moguće je da i drugi sastojci prisutni u malim količinama takođe imaju uticaja.

Test uranjanja repa se pre svega zasniva na spinalnom refleksu koji može da uključuje više strukture nervnog sistema i predstavlja selektivni test kojim se ispituje centralna analgetska aktivnost (Le Bars et al., 2001). Ulje je u ovom testu pokazalo slabu aktivnost u poređenju sa kontrolom (slika 10). Tek je pri najvećoj dozi došlo do povećanja vremena reakcije (slika 10) od samog početka testa (15 min nakon tretiranja životinja). Za dozu od 200 mg kg^{-1} , najznačajniji odgovor (najduže vreme potrebno za reakciju) je zabeležen nakon 60 min, a efekat počinje da slabi 120 minuta nakon tretmana. U ovom vremenskom periodu (kod životinja koje su dobile najveću dozu etarskog ulja), kao i u periodu od 90 do 120 min za grupu tretiranu uljem u dozi od 100 mg kg^{-1} , nije bilo statistički značajnih razlika između pomenutih vremena reakcije (posle 60, 90 i 120 min) i vremena reakcija grupe tretirane morfinom (slika 10). Procenti inhibicije rasli su sa dozom i iznosili su redom: 38,5, 42,8 i 55,8%, dok je za morfin on iznosio 80,6% (tabela 13). U ovom testu nije zapaženo povećanje osetljivosti na bolni nadražaj kada su životinje tretirane bornil-4-metoksibenzoatom (slika 10), tj. aktivnost estra je bila analgetska. Estar je pokazivao blagu antinociceptivnu aktivnost, sa maksimumom u dozama od 100 i 200 mg kg^{-1} (tabela 13) 45 min nakon tretmana. Najmanja doza estra (50 mg kg^{-1}) nakon 45 min od tretmana nije imala značajan antinociceptivni efekat.



Slika 11. Efekat DMSO-a, kapsaicina i bornil-4-metoksibenzoata (BMB) na miševe u testu dinamičke vruće ploče (broj slučajeva lizanja šapa po grupi životinja). Rezultati su izraženi kao srednja vrednost \pm SD, $n = 6$. Iz ANOVA i Tjukijevog testa, * $p < 0,001$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,05$ u odnosu na DMSO.

Rezultati koji su dobijeni testiranjem bornil-4-metoksibenzoata dobijeni u dva različita testa sugerisali su suprotne efekte ove supstance. Međutim, iako se u oba testa procenjuje centralna kontrola bola i termalne nocicepcije, ovi rezultati su samo na prvi pogled nelogični. Objašnjenje se može naći u činjenici da su za refleks izvlačenja repa iz vrele vode zaslužni centri u kičmenoj moždini, dok su za reakciju u testu vruće ploče odgovorne supraspinalne strukture (Wong et al., 1994). S obzirom da je bornil-4-metoksibenzoat pokazao aktivnost samo u testu uranjanja repa, može se zaključiti da se njegov antinociceptivni efekat javlja na spinalnom nivou. Razlog različite aktivnosti ovog estera u dva testa možda leži u različitoj zastupljenosti opioidnih receptora na supraspinalnom (μ_1 , κ_3 , δ_1 , σ_2) i spinalnom (μ_2 , κ_1 , δ_2) nivou (Hosseinzadeh et al., 2000).

4.3.2.3. Test dinamičke vruće ploče

Da bi smo objasnili rezultate dobijene za bornil-4-metoksibenzoat u testu vruće ploče miševi tretirani ovim estrom podvrgnuti su još jednom,

specifičnom testu (test dinamičke vruće ploče, DHP¹¹) na osnovu koga je moguće napraviti razliku između alodinije i hiperalgezije (Yalcin et al., 2009). Najčešća reakcija miševa (soja C57Bl/6J) u studiji Yalcin-a i saradnika na nociceptivni nadražaj bila je pokušaj bega – to jest, skakanje sa vruće ploče u pokušaju bega. U našoj studiji ovakva reakcija nije zabeležena (muških BALB/c miševa), čak ni kod životinja koje su tretirane kapsaicinom. Jedini povišeni parametri zabeleženi u našim eksperimentima bili su lizanje šapa i uspravljanje na zadnje noge (slika 11). Međutim, uspravljanje na zadnje noge može da se posmatra kao nespecifično s obzirom da je i za životinje iz negativne kontrolne grupe (DMSO) zabeleženo blago povećanje ovog parametra. Uspravljanje na zadnje noge (na sredini ili uz zidove aparata) može da se posmatra kao istraživačko ponašanje, slično kao u testu otvorenog polja (*open field test*), a ne reakcija na termalni stimulus. Zato je odlučeno da se za reakciju BALB/c miševa u DHP testu uzima samo lizanje šapa. Statistički značajno povećanje ovog parametra je uočeno čim su životinje tretirane kapsaicinom postavljene na ploču temperature 30 °C (slika 11). Sa druge strane, životinje iz negativne kontrolne grupe (DMSO) ili životinje tretirane bornil-4-metoksibenzoatom lizale su šape mnogo ređe od senzitiviranih životinja (slika 11). Na osnovu rezultata prethodnih testova, kao i DHP testa, možemo da zaključimo da bornil-4-metoksibenzoat izaziva hiperalgeziju, a ne alodiniju.

Aktivnost bornil-4-metoksibenzoata bi mogla da bude povezana sa gustatornim osobinama ovog jedinjenja, pa onda i same biljne vrste. Prethodne studije su pokazale da monoterpeni rasprostranjeni u hrani (na primer, borneol, kamfor, karvakrol, eugenol i timol) utiču na TRPV kanale (Xu et al., 2006). Aktivacija TRPV kanala depolariše ćelije i skraćuje vreme trajanja akcionog potencijala. Pomenuti monoterpeni aktiviraju TRPV3 receptore, dovodeći do povećanja nivoa Ca²⁺ ili aktivacije G-protein-spregnutih receptora kojih ima najviše u koži (keratinociti), nosnoj i usnoj duplji. Prisustvo ovih receptora u usnoj duplji ukazuje na to da oni možda predstavljaju potencijalno mesto na koje deluju jedinjenja prisutna u začinskim biljkama (na primer karvakrol iz origana) (Joshi et al., 2010).

¹¹ *Dynamic Hot Plate test*

TRPV3 receptori se aktiviraju na temperaturama od 22 do 40 °C, što znači da su aktivirani tokom DHP testa. Povišene temperature ili ulazak lipofilnih jedinjenja (na primer, monoterpena) u keratinizovane slojeve i aktivacija TRPV3 u keratinocitima dovodi do otpuštanja ATP-a sa krajeva signalnih neurona, čime se stvara osećaj toplote (Lee i Caterina, 2005). Predloženi mehanizam dejstva kamfora (čija je struktura bliska bornil-grupi iz novog estra) uključuje i aktivaciju TRPV3 kanala. Kamfor takođe deluje na TRPV1 receptore (kroz desenzitizaciju) i TRPA1 receptore (kroz inhibiciju) (Xu et al., 2005).

4.3.3. Antiproliferativna aktivnost autolizata korena, ploda i cveta biljne vrste *R. lutea*

Tretiranje ljudskih ćelija melanoma (A375) i fibroblasta (MRC5) različitim koncentracijama autolizata korena, cveta i ploda biljne vrste *R. lutea* tokom 24 h, kao i čistih jedinjenja (2-(α -L-ramnopiranoziloksi)benzil-izotiocijanat i benzil-izotiocijanat), značajno smanjuje preživljavanje ćelija obe linije, pri čemu su IC₅₀ vrednosti u opsegu između 1,7 i 50 μ g/ml (tabela 14). Dobijeni rezultati pružaju prve dokaze *in vitro* citotoksičnosti sastojaka ove biljne vrste na ljudskim ćelijskim linijama. Takođe, IC₅₀ vrednosti svih testiranih supstanci (izuzev autolizata ploda) bile su reda veličine vrednosti dobijenih za cisplatinu (tabela 14). Autolizat korena i benzil-izotiocijanat su pokazali različit efekat na ove dve ćelijske linije. Ćelije melanoma su bile osetljivije od ćelija fibroblasta na tretman autolizatom korena, dok su ćelije fibroblasta bile dva puta osetljivije na benzil-izotiocijanat. Sa druge strane, za 2-(α -L-ramnopiranoziloksi)benzil-izotiocijanat (**4-1**) je uočena manja toksičnost na ćelije fibroblasta i nešto niže IC₅₀ vrednosti na ćelije melanoma (približne vrednostima zabeleženim za cisplatinu). Određena IC₅₀ vrednost (24 h tretman za benzil-izotiocijanat na A375 ćelije (22 μ M)) slaže se sa publikovanim rezultatima *Huang*-a i saradnika (2012), koji su ispitivali aktivnost benzil-izotiocijanata na ćelijsku liniju melanoma čoveka A375.S2. Međutim, autori ove studije nisu ispitivali toksičnost benzil-izotiocijanata na netumorske HaCaT ćelije, dok smo mi utvrdili da su ćelije fibroblasta (netumorske) dva puta osetljivije na benzil-izotiocijanat od ćelija melanoma (tabela 14).

Najjače *in vitro* antiproliferativno dejstvo na ćelijsku liniju A375 uočeno je prilikom tretiranja autolizatom korena – dejstvo je bilo 20 puta jače nego u slučaju autolizata ploda. S obzirom da se približno 65% (*w/w*) ovog hidrolizata sastoji od benzil-izotiocijanata (što odgovara koncentraciji od 1,62 μ g/ml na 2,50 μ g/ml autolizata korena) može se zaključiti da su neki od drugih sastojaka autolizata ili vrlo aktivna antiproliferativna jedinjenja ili jedinjenja koja pojačavaju dejstvo benzil-izotiocijanata. Na primer, nedavno je utvrđeno da benzil-izotiocijanat pojačava citotoksičnost cisplatine na ćelije HL-60 (Lee et al., 2012).

Autolizati cveta i ploda vrste *R. lutea* bili su manje aktivni na ćelije A375 u poređenju sa autolizatom korena, a njihove antiproliferativne aktivnosti su odlično korelirale sa prisutnom količinom 2-(α -L-ramnopiranoziloksi)benzil-izotiocijanata (**4-1**) u ova dva lizata. Utvrđeno je da 86% (w/w, ekvivalentno sadržaju od 4,3 μ g/ml) autolizata cveta i 4% (w/w, ekvivalentno 2,15 μ g/ml) autolizata plodova čini jedinjenje **4-1**¹², što odgovara približnoj vrednosti IC₅₀ za ovo jedinjenje (tabela 14). Ovi rezultati ukazuju na potencijalni sinergički efekat novog prirodnog proizvoda **4-1** sa drugim citotoksičnim molekulima (hemoterapeuticima).

Iako u literaturi ima jako malo podataka o toksičnosti benzil-izotiocijanata na nekancerogene ćelijske linije (Huang et al., 2012; Kim et al., 2013; Lamy et al., 2013), u našim eksperimentima uočen je izražen antiproliferativan efekat benzil-izotiocijanata, kao i jedinjenja **4-1** na netransformisane fibroblaste (MRC5), pri čemu su IC₅₀ vrednosti bile 1,6 (za benzil-izotiocijanat) i 2,2 (u slučaju jedinjenja **4-1**) puta niže nego prema ćelijama melanoma (tabela 14). Ispitivani autolizati su takođe imali značajan antiproliferativan efekat na MRC5 ćelije – vrednosti IC₅₀ bili su iste kao i odgovarajuće koncentracije dobijene za ćelije A375 sa izuzetkom autolizata korena. Naime, iako je benzil-izotiocijanat imao jači efekat na ovu ćelijsku liniju, autolizat korena bio je manje toksičan što pokazuje da druga jedinjenja prisutna u autolizatu menjaju efekat benzil-izotiocijanata.

4.3.3.1. Proapoptičko dejstvo autolizata korena, cveta i ploda biljne vrste *R. lutea*

Kako bi odredili mehanizam citotoksičnog dejstva dobijenih autolizata, benzil-izotiocijanata i 2-(α -L-ramnopiranoziloksi)benzil-izotiocijanata na ćelije melanoma, ispitivali smo efekat ovih suspstanci na ćelijski ciklus A375 ćelija melanoma. Analiza ćelijskog ciklusa je pokazala da tretiranje navedenim supstancama (u koncentraciji koja je bila jednaka IC₅₀) dovodi do akumulacije ćelija melanoma u SubG fazi (11-22%, za netretiranu kontrolu 4,6%) što ukazuje na ćelijsku smrt apoptozom. Tretiranje

¹²Važno je istaći da su ispitivani autolizati bili stabilni i da u MTT testovima vijabilnosti nije primećeno smanjenje citotoksične aktivnosti prilikom višemesečnog skladištenja na 4 °C.

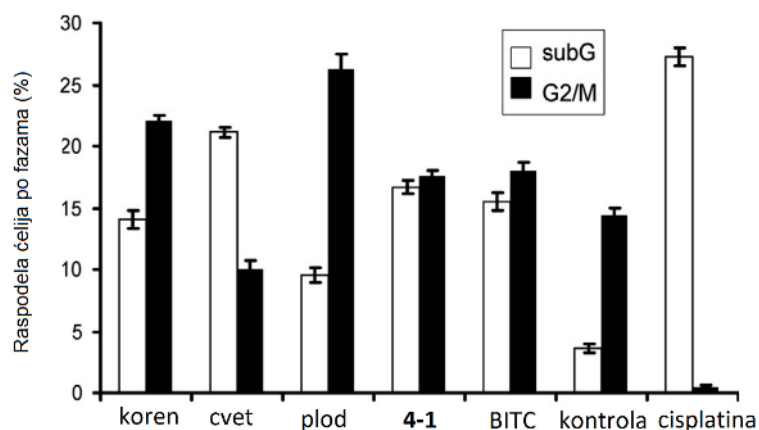
cisplatinom, često upotrebljavanim antikancerskim terapeutikom, izazvalo je izraženije zaustavljanje ćelijskog ciklusa u SubG fazi (27%) i smanjilo je broj ćelija u G2/M fazi. Za ćelije tretirane autolizatom cveta uočen je sličan trend kao i za ćelije tretirane cisplatinom, dok su ostale testirane supstance dovele do povećanja broja ćelija u G2/M fazi u poređenju sa kontrolom (slika 12). Tretman benzil-izotiocijanatom je imao sličan efekat na ćelije melanoma A375.2, kao što je pokazano u studiji *Huang-a i sar.* (2012).

Analiza aneksin V/PI dvostrukog bojenja protočnom citometrijom pokazala je da sve testirane supstance izazivaju apoptozu, dok nekroza nije opažena (slika 13). Nakon 24 h tretiranja ćelija benzil-izotiocijanatom (u koncentraciji koja je bila jednaka IC_{50}) uočili smo 8% apoptotičkih ćelija melanoma (uključujući ranu i kasnu apoptozu), što se slaže sa publikovanim podacima koji pokazuju da benzil-izotiocijanat izaziva apoptozu kod sličnih ćelija melanoma (Huang et al., 2012).

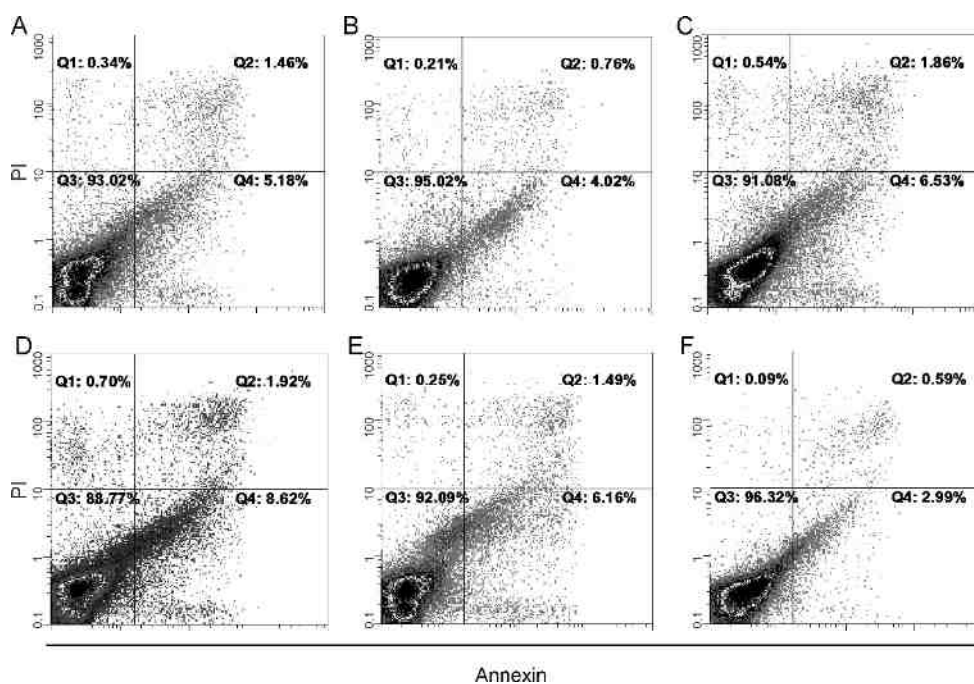
Tabela 14. *In vitro* antiproliferativna aktivnost autolizata vrste *R. lutea* i čistih izotiocijanata na ćelijske linije A375 (melanoma) i MRC5 (fibroblasta)

Testirana supstanca	IC_{50} ($\mu\text{g/ml}$) ^a	
	A375	MRC5
Autolizat korena	2,5 ± 0,1	5,0 ± 0,3
Autolizat cveta	5,0 ± 0,2	5,0 ± 0,1
Autolizat ploda	50 ± 4	50 ± 3
2-(α -L-Ramnopiranoziloksi)benzil-izotiocijanat	3,4 ± 0,1 (10,9 ± 0,3 μM)	2,1 ± 0,1 (6,8 ± 0,3 μM)
Benzil-izotiocijanat (BITC)	3,7 ± 0,2 (24,9 ± 1,3 μM)	1,7 ± 0,1 (11,4 ± 0,7 μM)
Cisplatina	1,8 ± 0,1 (6,3 ± 0,1 μM)	2,9 ± 0,3 (9,5 ± 0,2 μM)

^a IC_{50} vrednosti (koncentracije kod kojih dolazi do inhibicije rasta ćelija od 50%) su izračunate na osnovu tri nezavisna eksperimenta i predstavljene kao srednja vrednost ± SD.



Slika 12. Raspodela ćelija A375 po fazama prilikom tretiranja odgovarajućim supstancama (autolizat korena, cveta i ploda vrste *R. lutea*; 2-(α -L-ramnopiranoziloksi)benzil-izotiocijanat i benzil-izotiocijanat (BITC), u koncentraciji koja je jednaka IC_{50}). Kao kontrola korišćene su netretirane ćelije i cisplatina.



Slika 13. Profili aneksin V/PI bojenja iz tri nezavisna eksperimenta. Nakon tretiranja odgovarajućom supstancom (autolizat korena, A; cveta, B; ploda, C; 2-(α -L-ramnopiranoziloksi)benzil-izotiocijanat, D; benzil-izotiocijanat, E) u koncentraciji koja je jednaka IC_{50} u periodu od 24 h. Ćelije su obojene aneksin V/PI. Kontrolu (F) predstavljaju ćelije koje nisu tretirane.

4.3.4. Antimikrobna aktivnost novih oktil-estara iz vrste *H. sphondylium*

Za nove oktil-estre viših masnih kiselina koji su identifikovani u vosku vrste *H. sphondylium* (jedinjenja **1-10**, **1-11**, **1-12**, [**1-14**]-[**1-17**]) pokušali smo, mikrodilucionom metodom, da odredimo MIK vrednosti za 6 bakterijskih i jedan soj gljivice. Međutim, ni jedan od estara nije pokazivao statistički značajno antimikrobno dejstvo u najvećoj testiranoj koncentraciji od 2,5 μM (opseg koncentracija rastvora bio je uslovljen jako slabom rastvorljivošću jedinjenja u vodi).

4.3.5. Akutna toksičnost diestara iz vrste *D. carota* na *A. salina*

Za jedinjenja **7-1** i **7-2** određivana je akutna toksičnost prema račićima *Artemia salina*. Jedinjenja su testirana u koncentracijama od 1 do 100 μM i tom prilikom su pokazala jak toksičan efekat. Veća toksičnost je zabeležena za jedinjenje **7-1** ($\text{LD}_{50} = 60 \mu\text{M}$ nakon 24 h i 45 μM nakon 48 h) u odnosu na **7-2** ($\text{LD}_{50} = 90 \mu\text{M}$ nakon 24 h i 60 μM nakon 48 h). Interesantno je da je za estre tiglinske kiseline (eugenil-tiglat, Radulović et al., 2013c) već određivana akutna toksičnost na *A. salina*, ali da LD_{50} vrednost nije mogla da bude utvrđena zbog slabe rastvorljivosti jedinjenja u veštačkoj morskoj vodi (u najvišoj koncentraciji 0,05 mg/ml estar nije pokazivao nikakvu aktivnost).

4.3.6 Biološka aktivnost hibrida ferocena i indola

Akutna toksičnost na A. salina. Jedinjenja **5-3a** i **5-3b** su pokazala izrazitu akutnu toksičnost na *A. salina*. Niže LD_{50} vrednosti su dobijene za *meta* izomer **5-3a** (20,7 μM posle 24 h i <13,3 μM posle 48 h) nego za *para* izomer **5-3b** (24 h: $\text{LD}_{50} = 120,4 \mu\text{M}$; 48 h: $\text{LD}_{50} = 66,5 \mu\text{M}$). Neka ferocenska jedinjenja su već poznata po toksičnosti na *A. salina* (Chohan i Naseer, 2007; Chohan, 2009) i uočene aktivnosti mogu da se objasne prisustvom dve farmakofore (2-fenilindola i ferocena). Aktivnost ferocenskih jedinjenja najčešće je uzrokovana formiranjem ferocenijum-jona koji su poznati izvor slobodnih radikala, a za koje je karakteristična

veća rastvorljivost u vodi, a usled prisustva dva ciklopentadienilna prstena, i bolja penetracija membrana (Kopf-Maier et al., 1984). Antitumorski efekat 2-fenilindolske strukture je više puta potvrđen (za više informacija pogledati studiju *Quirante*-a i sar., 2011 i reference koje su citirane u tom radu). Moguće je i da prisustvo obe grupe (Fc i indolovog jezgra) kao rezultat ima sinergističku (cito)toksičnu interakciju. Opažanje koje je izneo *Neuse* (2001), da rastvorljivost u vodi treba da bude jedan od glavnih kriterijuma pri razvijanju novih ferocenskih antikancer agenasa, u skladu je sa ovim sinergizmom – polarno indolovo jezgro kompenzuje manju hidrofilitnost Fc grupe.

Antiacetilholinesterazna (anti-AChE) aktivnost. Inhibicija AChE dovodi do akumulacije neurotransmitera acetilholina (ACh) u holinergičnim sinapsama i neuromuskularnim spojevima, što dovodi do preterane stimulacije holinergičnih receptora i holinergične toksičnosti (Lotti, 2000). Neki od toksičnih efekata su pojačano znojenje i salivacija, dijareja, pojačani bronhijalni sekret, mioza, grčevi mišića i drugi efekti centralnog nervnog sistema (Costa, 2006).

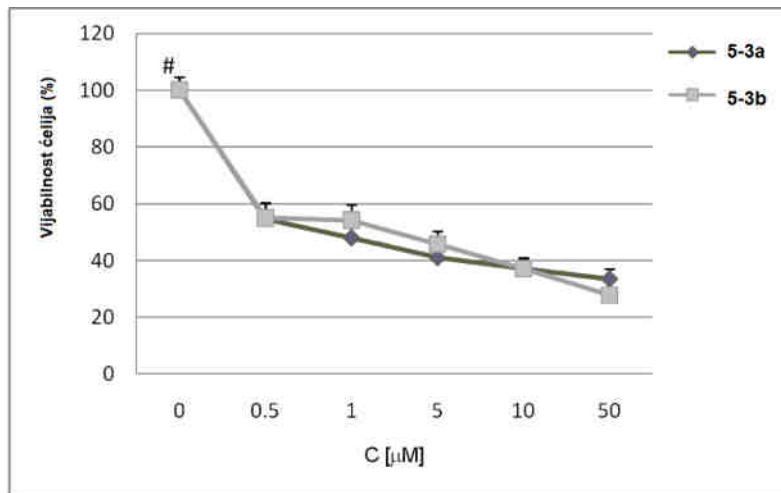
Jedinjenje **5-3a** pokazuje značajno slabiju anti-AChE aktivnost ($IC_{50} = 255 \mu M$) u odnosu na fizostigmin ($0,30 \mu M$). Usled slabe rastvorljivosti, najveća koncentracija u kojoj je jedinjenje **5-3b** testirano bila je $100 \mu g/ml$, a u ovoj koncentraciji testirana supstanca nije imala nikakav efekat na aktivnost AChE, tako da IC_{50} vrednost za *para* izomer nije određena. Rezultati pokazuju da testirane supstance nemaju potencijalnu anti-AChE aktivnost koja bi dovela do neželjenih efekata.

Interesantno je da fizostigmin, pozitivna kontrola korišćena u našim testovima, takođe pripada klasi indola i da ima 1000 puta veću anti-AChE aktivnost od jedinjenja **5-3a**. Šta više, indolski alkaloidi su dobro poznati po svojoj inhibicionoj aktivnosti holinesteraze (Konrath, 2013). Moguće objašnjenje za nedostatak aktivnosti je da uvođenje voluminozne ferocenske grupe u molekul sprečava formiranje jakih privlačnih interakcija između enzima i supstrata u aktivnom centru.

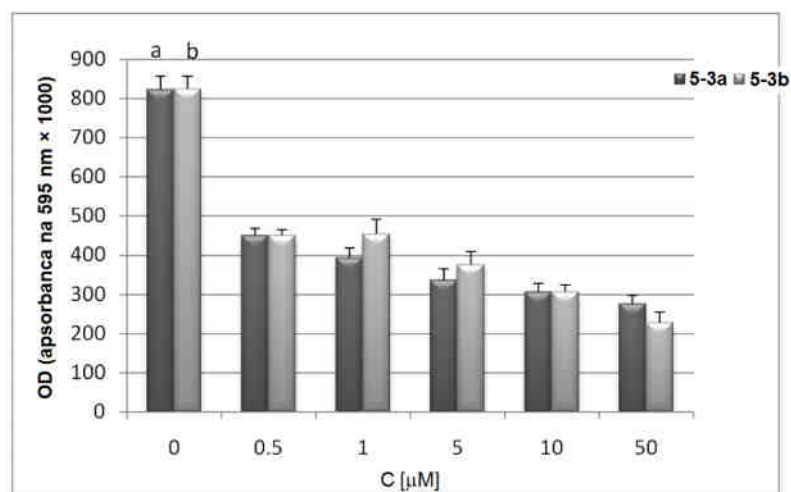
Određivanje citotoksičnosti jedinjenja 5-3a i 5-3b na makrofagima i određivanje MPO aktivnosti makrofaga. In vitro citotoksično dejstvo dva hibrida ferocena i indola testirano je inkubacijom peritonealnih makrofaga sa ovim jedinjenjima tokom 1 h, nakon čega je određivana vijabilnost ćelija testom kristal-violet. I tako kratak period inkubacije bio je dovoljan da jedinjenja **5-3a** i **5-3b** pokažu značajno citotoksično dejstvo. Naime, vijabilnost makrofaga smanjena je za više od 50% u prisustvu najmanje koncentracije ovih jedinjenja (IC₅₀ vrednosti su bile u opsegu 0,5 – 1,0 μM, slike 14 i 15). Citotoksični efekat je zavisio od koncentracije – veće koncentracije jedinjenja **5-3a** i **5-3b** značajno su smanjivale vijabilnost peritonealnih makrofaga u poređenju sa netretiranim ćelijama.

Oba jedinjenja dovode do statistički značajnog smanjenja MPO aktivnosti (jedinjenje **5-3a** pri koncentraciji 5 μM; **5-3b** u koncentraciji od 1 μM). Inhibiciona aktivnost na MPO jedinjenja indola je dobro poznata (Sliskovic et al., 2009; Malle et al., 2007) i smatra se da indoli imaju ulogu jednoelektronskog supstrata za reaktivne intermedijerne MPO-Fe(IV) vrste. Međutim, ne treba zanemariti i mogući doprinos Fc grupe – ferocen se lako oksiduje do ferocenijum (Fe³⁺) stanja, u kome može da reaguje sa MPO-Fe(IV) i spreči formiranje HOCl. Ovo je za sada samo spekulacija jer ne postoje studije koje se bave ispitivanjem dejstva ferocena na MPO.

U našim testovima, peritonealni makrofagi su korišćeni kao model za ispitivanje efekata hibrida indola i ferocena na vijabilnost i aktivnost inflamatornih ćelija. Fiziološki značaj modulacije makrofaga koji indukuju ova dva jedinjenja može biti povezan sa inflamatornom reakcijom. Naša studija je pokazala da **5-3a** i **5-3b** smanjuju i vijabilnost makrofaga i njihovu MPO aktivnost. Ako razmatramo korelaciju sa *in vivo* uslovima, ova jedinjenja bi mogla da izazovu ćelijsku smrt makrofaga, značajno smanjenje broja zrelih imunskih ćelija i doprinesu smanjenom inflamatornom odgovoru. Sa druge strane, oslabljena MPO aktivnost smanjuje mogućnost uspešne imunske reakcije na mikrobne infekcije i eliminaciju patogena. Naši rezultati ukazuju da jedinjenja **5-3a** i **5-3b** mogu da moduliraju aktivnosti makrofaga, to jest, imaju potencijalno imunosupresivne osobine.

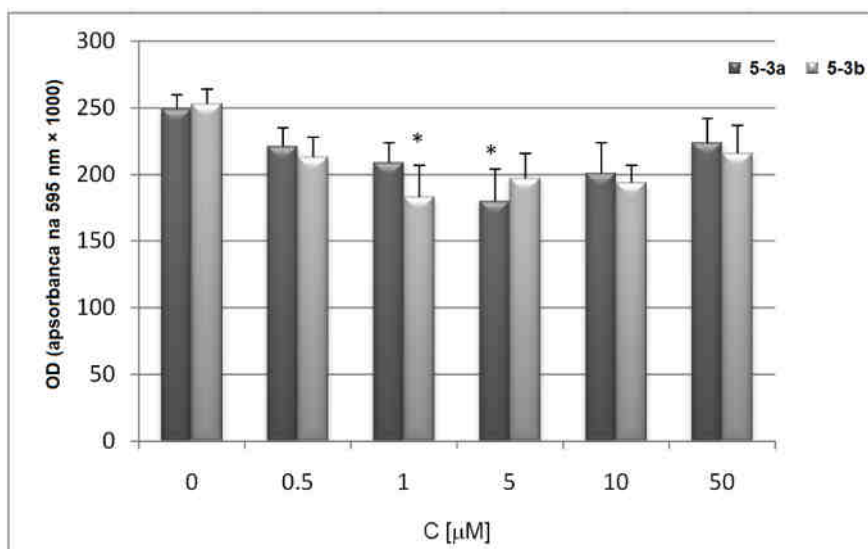


a #, $p < 0.0001$, 0 (PBS) i koncentracije 5-3a ili 5-3b



b a, $p < 0.0001$ a, 0 (PBS) i koncentracije 5-3a
b, $p < 0.0001$ b, 0 (PBS) i koncentracije 5-3b

Slika 14. Uticaj različitih koncentracija jedinjenja **5-3a** i **5-3b** na vijabilnost makrofaga, izražen kao % vijabilnosti ćelija (a) i optička gustina (OD, apsorbanca na 595 nm × 1000) (b). Broj uzoraka ćelija bio je 8. Statistički značajne razlike (*t*-test): # $p < 0,0001$, 0 (fosfatni pufer) i koncentracije **5-3a** ili **5-3b**; a ($p < 0,0001$, 0 (PBS) i koncentracije **5-3a**; b ($p < 0,0001$, 0 (fosfatni pufer) i koncentracije **5-3b**.



Slika 15. *In vitro* efekat jedinjenja **5-3a** i **5-3b** na MPO aktivnost peritonealnih makrofaga. Broj uzoraka ćelija bio je 8 puta. Statistički značajne razlike (*t*-test): **p* < 0,05 i 0 (PBS).

4.3.7. Akutna toksičnost odabranih proizvoda redukcije Biđinelijevih jedinjenja na *A. salina*

Za jedinjenja [**6-1a**]-[**6-11a**] je određivana toksičnost u modelu račića *A. salina*. Jedinjenja [**6-5a**]-[**6-7a**], **6-9a** i **6-11a** nisu pokazala aktivnost u maksimalnoj testiranoj koncentraciji od 200 µM. Za preostala jedinjenja su testirana u koncentracijama 1-500 µM, usled nešto bolje rastvorljivosti. Tom prilikom su pokazala umereno jaku toksičnost (vrednosti LD₅₀ su date u tabeli 15).

Tabela 15. Akutna toksičnost proizvoda hidrogenolize Biđinelijevih jedinjenja na *A. salina*

	6-1a	6-2a	6-3a	6-4a	6-8a	6-10a
LD ₅₀ (µM, 24 h)	330	400	310	180	420	200
LD ₅₀ (µM, 48 h)	250	125	220	100	250	145

5. IZVOD

Cilj ove doktorske disertacije (pod nazivom „Nova biološki aktivna sintetska azaheterociklična jedinjenja i novi sekundarni metaboliti iz odabranih biljnih vrsta: sinteza, izolovanje i spektralna karakterizacija“) bio je otkrivanje novih biološki aktivnih jedinjenja – kroz izolovanje prirodnih proizvoda iz odabranih biljnih vrsta ili putem organske sinteze. Sva izolovana i sintetisana jedinjenja okarakterisana su spektroskopskim metodama, uključujući jedno- i dvodimenzionalnu NMR spektroskopiju. Predmet istraživanja bili su: aromatični estri iz vrste *Ferula ovina* (Apiaceae), oktil-estri iz vrste *Heracleum sphondylium* (Apiaceae), diestri oksigenovanih germakranskih derivata iz vrste *Daucus carota* (Apiaceae), izotiocijanati iz vrste *Reseda lutea* (Resedaceae) i epoksidi germakrona iz vrste *Geranium macrorrhizum* (Geraniaceae). Deo ove disertacije bila je i sinteza novih hibrida ferocena i indola i ispitivanje redukcije Biđinelijevih jedinjenja litijum-aluminijumhidridom. Za izvestan broj ovih jedinjenja određivana je biološka aktivnost (antimikrobna, citotoksična, antinociceptivna i antiacetilholinesterazna). Dobijeni su sledeći rezultati:

Iz etarskog ulja nadzemnog dela vrste *G. macrorrhizum* izolovani su 4,5- i 1,10-epoksigermakroni. Strukture ovih epoksi-derivata određene su analizom 1D i 2D NMR spektara i molekulskim modelovanjem, a potvrđene sintezom iz germakrona. Za ova jedinjenja određena je antimikrobna aktivnost mikrodilucionom metodom – oba jedinjenja pokazala su jaku aktivnost prema *Bacillus subtilis* (minimalne inhibitorne koncentracije bile su 4,3 nmol/ml za 1,10- i 43 nmol/ml za 4,5-epoksigermakron) i *Pseudomonas aeruginosa* (0,043 μmol/ml za 1,10- i 0,855 μmol/ml za 4,5-epoksigermakron). Mikrobiološka aktivnost ovih epoksida barem delom opravdava etnomedicinsku upotrebu ove biljne vrste.

Fitohemijским ispitivanjem biljne vrste *H. sphondylium* pronađeno je sedam *n*-oktil-estara nerazgranatih viših masnih kiselina (C-20 do C-26). Struktura ovih biljnih metabolita nedvosmisleno je utvrđena GC ko-injektiranjem sintetisanih estara sa ispirkom cvetova. Izuzev oktil-dokozanoata, svi identifikovani oktil-estri predstavljaju nove prirodne proizvode. Upoređivanjem spektara ovih jedinjenja koji su dali *Chaler* i

sar. (J. Chromatogr. A 1046 (2004) 203) sa našim spektralnim podacima utvrđeno je da postoji značajno neslaganje. Verujemo da su jedinjenja koja su identifikovali *Chaler* i sar. u stvari 2-etilheksil-estri i da su pogrešno identifikovani kao *n*-oktil-estri. Pokušaj da se za šest novih estara odredi antimikrobna aktivnost bio je neuspešan zbog izuzetno slabe rastvorljivosti ovih jedinjenja u vodi.

GC-MS analizama etarskog ulja nadzemnog dela vrste *F. ovina* utvrđeno je prisustvo više retkih aromatičnih estara monoterpenskih alkohola. Strukture ovih estara potvrđene su sintezom i ispostavilo se da je jedan od njih, bornil-4-metoksibenzoat, novi prirodni proizvod. Antinociceptivne aktivnosti ulja i novog estra su određivane pomoću nekoliko laboratorijski modela. Ulje je pokazalo jaku perifernu i umerenu centralnu analgetsku aktivnost. Međutim, miševi tretirani bornil-4-metoksibenzoatom bili su osetljiviji na bolni stimulus u odnosu na kontrolnu grupu. Pomoću testa dinamičke vruće ploče utvrđeno je da bornil-4-metoksibenzoat izaziva hiperalgeziju, a ne alodiniju. Rezultati ukazuju na to da sastojci ovog etarskog ulja potencijalno doprinose antinociceptivnim i hiperalgezijskim osobinama ove začinske biljne vrste.

Autolizati dobijeni iz različitih organa (korena, cvetova i plodova) biljne vrste *R. lutea* analizirani su pomoću GC i GC-MS, kao i IR, 1D- i 2D-NMR spektroskopija. Glavni sastojak autolizata korena bio je benzil-izotiocijanat, dok je u autolizatu cveta najzastupljeniji bio 2-(α -L-ramnopiranoziloksi)benzil-izotiocijanat (koji predstavlja novi prirodni proizvod). Autolizati i njihovi glavni sastojci podvrgnuti su MTT testu na dve ćelijske linije čoveka: A375 (melanom) i MRC5 (fibroblast). Mehanizam citotoksičnog dejstva proučavan je pomoću analize ćelijskog ciklusa i Aneksin V testa. Izotiocijanati su pokazali značajnu antiproliferativnu aktivnost u slučaju obe ćelijske linije, što objašnjava uočenu citotoksičnost testiranih autolizata. Analizom ćelijskog ciklusa utvrđeno je da je najverovatniji mehanizam ćelijske smrti apoptoza. Dobijeni rezultati idu u prilog antitumorskoj aktivnosti koja je u istorijskim tekstovima pripisivana ovoj biljnoj vrsti. Iako je razlika u efektu biljnih metabolita na transformisane i netransformisane ćelije bila mala, može se

tvrditi da citotoksično dejstvo uočeno u našim testovima barem delimično objašnjava (davno zaboravljenu) etnofarmakološku upotrebu ove biljne vrste.

Etarski ekstrakt cvetova vrste *D. carota* podvrgnut je seriji hromatografija na silika-gelu i tom prilikom su izolovana dva seskviterpenska estra: 6,8-*O*-ditigloil-(1(10*E*),4*E*)-germakradien-6 β ,8 α ,11-triol i 6-*O*-angeloil-8-*O*-tigloil-(1(10*E*),4*E*)-germakradien-6 β ,8 α ,11-triol. Strukture ovih jedinjenja određene su analizom jedno- i dvodimenzionalnih NMR spektara (uključujući NOESY, HSQC, HMBC i ¹H-¹H COSY). Za oba estra je uočena tendencija da pri uslovima gasne hromatografije podležu [3,3]-sigmatropnom premeštanju u odgovarajuće elemanske derivate. Oba diestra pokazala su značajnu toksičnost prema račićima *A. salina*.

U potrazi za novim citotoksičnim agensima sintetisali smo dva nova hibridna jedinjenja ferocena i indola, 2-(3-ferocenilfenil)-1*H*-indol i 2-(4-ferocenilfenil)-1*H*-indol, koristeći Fišerovu sintezu indola kao ključni korak sinteze. Strukture jedinjenja potvrđene su detaljnim spektralnim analizama (uključujući i 1D- i 2D-NMR u različitim rastvaračima). Oba jedinjenja pokazala su slabu antiacetilholinesteraznu aktivnost, ali i jaku citotoksičnu aktivnost na makrofagima peritoneuma pacova i toksičnost na slanovodne račiće *A. salina*. Takođe, oba jedinjenja su u značajnoj meri inhibirala mijeloperoksidaznu aktivnost što sugerise njihovu potencijalnu primenu za lečenje upalnih procesa. Dobijeni rezultati bioloških testova vrlo su ohrabrujući i ukazuju na moguću citotoksičnu aktivnost ovih jedinjenja i u slučaju ćelija raka.

Redukcija Biđinelijevih jedinjenja litijum-aluminijumhidridom po prvi put je ispitivana u ovoj disertaciji. Redukcijom dihidropirimidinona dobijenih iz uree dobijaju se (u prinosu 80 – 95%) proizvodi hidrogenolize (4-aril-5-(*m*)etil-6-metil-3,4-dihidropirimidin-2(1*H*)-oni; 11 primera), dok se redukcijom N-1 metilovanih Biđinelijevih jedinjenja dobijaju odgovarajući alkoholi (4-aril-5-((1-)-hidroksi(*m*)etil)-6-metil-3,4-dihidropirimidin-2(1*H*)-oni; 4 primera) u prinosu od 70 – 80%. Dobijeni alkoholi mogu lako da se dehidratišu do vicinalnih bis(egzo-metilenskih) derivata (4-aril-1-metil-5-

(m)etilen-6-metilentetrahidropirimidin-2(1*H*)-oni; 4 primera) ili izomerizuju do acikličnih jedinjenja (3-(1-aril-2-metilen-3-oksobutil)-1-metiluree; 2 primera) pri blago kiselim uslovima. Ishod redukcije takođe zavisi od strukturnih karakteristika reaktanata i reakcionih uslova kao što su: urea/tiourea, tip 1,3-dikarbonilnog jedinjenja, redosled dodavanja reagenasa itd. Redukcija Biđinelijevih jedinjenja litijum-aluminijumhidridom predstavlja efikasan pristup za dobijanje biblioteka raznovrsnih jedinjenja koja bi mogla imati sintetski i farmakološki značaj. Mehanizam reakcija je proučavan kroz eksperimente sa litijum-aluminijumdeuteridom i pomoću određivanja pKa vrednosti za Biđinelijeva jedinjenja. Za neke od proizvoda redukcije Biđinelijevih jedinjenja određena je akutna toksičnost za račiće *A. salina*.

6. SUMMARY

The aim of this PhD thesis (entitled: „New biologically active synthetic aza-heterocyclic compounds and new secondary metabolites from selected plant species: synthesis, isolation and spectral characterization“) was the discovery of new biologically active compounds either by means of natural product isolation from selected plant taxa or by organic synthesis. All of the either isolated or synthesized compounds were characterized by spectroscopic methods, including one- and two-dimensional NMR experiments. The specific compounds that were the subject of this research were: aromatic esters from *Ferula ovina* (Apiaceae), octyl esters from *Heracleum sphondylium* (Apiaceae), diesters of an oxygenated germacrane derivative from *Daucus carota* (Apiaceae), isothiocyanates from *Reseda lutea* (Resedaceae) and germacrane epoxides from *Geranium macrorrhizum* (Geraniaceae). Also, as a part of this dissertation, a synthesis of new ferrocene-indole hybrids and the investigation of complex metal hydride reduction of Biginelli compounds was performed. A number of these compounds were tested for their biological activities (antimicrobial, cytotoxic, antinociceptive and antiacetylcholinesterase activities). The following results were obtained:

4,5- and 1,10-Epoxygermacrones were isolated from the essential oil of the aerial parts of *G. macrorrhizum* L. The structures of the epoxy derivatives were deduced from their 1D and 2D-NMR spectra, molecular modeling, and confirmed by synthesis starting from germacrane. The epoxy compounds were screened for their antimicrobial activities by a microdilution assay, which revealed high activities of both compounds against *Bacillus subtilis* (minimum inhibitory concentrations (MICs) determined were 4.3 and 43 nmol/ml for 1,10- and 4,5-epoxygermacrones, resp.) and *Pseudomonas aeruginosa* (0.043 and 0.855 μ mol/ml for 1,10- and 4,5-epoxygermacrones, resp.). The discovery and observed activity of the two epoxides fills the gap in our knowledge of the active principles in this highly renowned ethnomedicinal plant species.

Seven *n*-octyl straight-chain alkananoates, from C-20 to C-26, were found in the wild-growing plant *H. sphondylium* from 14 locations. Those plant

metabolites were unambiguously identified by gas chromatographic co-injection of the synthesized esters with the inflorescence washings. All identified octyl esters represent new natural compounds, except for octyl docosanoate. Since we have demonstrated that *n*-octyl esters occur naturally, and in abundance, they cannot be any longer recognized as wastewater markers. Additionally, here we provide evidences that the compounds identified by Chaler et al. (J. Chromatogr. A 1046:203–210, 2004) are in fact 2-ethylhexyl esters, mistakenly identified as *n*-octyl esters. Newly identified esters available through synthesis were tested for their antimicrobial effect. However, due to exceedingly low solubility in aqueous media, none of the esters showed any activity.

GC–MS analyses of *F. ovina* aerial parts' essential oil revealed the presence of a number of rare aromatic esters of monoterpenic alcohols. The structures of these esters were corroborated by synthesis, and one of them, bornyl 4-methoxybenzoate, turned out to be a new natural compound. The antinociceptive activities of the oil and the new ester were assessed in mice using several different laboratory models. The oil exerted strong peripheral and moderate central analgesic activities. Surprisingly, mice treated with bornyl 4-methoxybenzoate had an increased sensitivity to the noxious stimulus compared to that of the control group. A dynamic hot plate test was used to demonstrate that bornyl 4-methoxybenzoate induces hyperalgesia and not allodynia. These results imply that the essential-oil constituents impart this spice species with both antinociceptive and hyperalgesic potentially flavor-related properties.

Benzyl isothiocyanate and 2-(α -L-rhamnopyranosyloxy)benzyl isothiocyanate were identified as the major constituents of the root and flower autolysates of *R. lutea*, respectively (the later represents a new natural product). These compounds showed significant antiproliferative effects against human A375 (melanoma) and MRC5 (fibroblast) cell lines, which could also explain the observed high cytotoxic activity of the tested autolysates. Cell cycle analysis revealed apoptosis as the probable mechanism of cell death. Tumor healing properties attributed to *R. lutea* in

the pre-modern texts were substantiated by the herein obtained results. Two isothiocyanates were found to be the major carriers of the observed activity. Although there was a relatively low differential effect of the plant metabolites on transformed and non-transformed cell lines, one can argue that the noted strong cytotoxicity provides first evidence that could explain the long forgotten use of this particular species.

Diethyl ether extract of *Daucus carota* flowers was subjected to several sequential SiO₂ medium pressure column chromatographies and two sesquiterpenic esters containing tiglate and angelate moieties were isolated. The structure of these compounds was elucidated by 1D and 2D NMR spectroscopy including a combination of NOESY, gradient HSQC, HMBC, and ¹H-¹H COSY and selective homonuclear decoupling experiments. These two constituents were 6,8-*O*-ditigloyl- and 6-*O*-angeloyl-8-*O*-tigloyl-(1(10)*E*,4*E*)-6 β ,8 α ,11-trihydroxygermacra-1(10)-dienes. Both esters showed a pronounced tendency to undergo [3,3]-sigmatropic rearrangement to the corresponding elemene derivatives under the conditions of GC, yielding broad overlapped GC-peaks. Two esters showed significant acute toxicity toward *A. salina*.

In our search for new promising cytotoxic agents we designed and prepared two new ferrocene-indole hybrid compounds, 2-(3-ferrocenylphenyl)-1*H*-indole and 2-(4-ferrocenylphenyl)-1*H*-indole, utilizing the Fischer indole synthesis as the key step. Detailed spectral analyses, including 1D- and 2D-NMR in various solvents, have been carried out to corroborate the structures of the synthesized compounds. In this work, we also present the first results of biological studies of these two compounds. Both compounds showed weak antiacetylcholinesterase activity but high cytotoxicity against rat peritoneal macrophages and toxicity against the crustacean *A. salina*. Also, both compounds showed significant myeloperoxidase inhibiting activity, thus suggesting a potential use in inflammatory disorders. The results of these tests are very encouraging as they also suggest possible cytotoxic activities of these compounds against human cancer cell lines.

Reduction of Biginelli compounds by LiAlH_4 was herein investigated for the first time. The reduction of urea-derived dihydropyrimidinones yielded 80–95% of hydrogenolysis products (4-aryl-5-(m)ethyl-6-methyl-3,4-dihydropyrimidin-2(1*H*)-ones; 11 examples), while the reduction of N-1-methylated Biginelli compounds gave the corresponding alcohols (4-aryl-5-((1)-hydroxy(m)ethyl)-6-methyl-3,4-dihydropyrimidin-2(1*H*)-ones; 4 examples) in 70–80% yield. The obtained alcohols could be readily dehydrated to vicinal bis(*exo*-methylene) derivatives (4-aryl-1-methyl-5-(m)ethylene-6-methylenetetrahydropyrimidin-2(1*H*)-ones; 4 examples) or isomerized to acyclic compounds (3-(1-aryl-2-methylene-3-oxobutyl)-1-methylureas; 2 examples) under mildly acidic conditions. The outcome of the reduction also depended on other structural features and reaction conditions such as: urea/thiourea and the type of 1,3-dicarbonyl compound, order of reagent addition, etc. LiAlH_4 -Reduction of Biginelli compounds affords a rapid approach to a library of diverse compounds of apparent synthetic utility and possible biological interest. The mechanism of this reduction was discussed and additionally elucidated through deuteration experiments and pK_a measurements. Selected reduction products of Biginelli compounds were assayed for acute toxicity towards *A. salina* and showed a moderate degree of toxicity.

7. LITERATURA

- Adams, P., Identification of Essential Oil Components By Gas Chromatography/Mass Spectrometry, 4th Edition, Allured Pub Corp., 2007.
- Ahmed, A.A., Bishr, M.M., El-Shanawany, M.A., Attia, E.Z., Ross, S.A., Pare P.W. *Phytochemistry* 66 (2005) 1680.
- Ahmed, Z.F., Rizk, A.M., Hammouda, F.M., Seif El-Nasr, M.M., *Planta Med.* 21 (1972) 35.
- Al-Khalil, S., Aqel, M., Afifi, F., Al-Eisawi, D., *J. Ethnopharmacol.* 30 (1990) 35.
- Al-Snafi, A.E., *IOSR J. Pharm. Biol. Sci.* 7 (2017) 72.
- Ates, M., Daniels, J., Arslan, Z., Farah, I.O., Rivera, H.F., *Environ. Sci. Process. Impact* 15 (2013) 225.
- Bahadori, M.B., Dinparast, L., Zengin, G., *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* 15 (2016) 1018.
- Barbachyn, M.R., Cleek, G.J., Dolak, L.A., Garmon, S.A., Morris, J., Seest, E.P., Thomas, R.C., Toops, D.S., Watt, W., Wishka, D.G., Ford, C.W., Zurenko, G.E., Hamel, J.C., Schaadt, R.D., Stapert, D., Yagi, B.H., Adams, W.J., Friis, J.M., Slatter, J.G., Sams, J.P., Oien, N.L., Zaya, M.J., Wienkers, L.C., Wynalda, M.A., *J. Med. Chem.* 46 (2003) 284.
- Bedoya, L.M., Sanchez-Palomino, S., Abad, M.J., Bermejo, P., Alcamí, J., *J. Ethnopharmacol.* 77 (2001) 113.
- Beletskaya, I.P., Tsvetkov, A.V., Latyshev, G.V., Tafeenko, V.A., Lukashev, N.V., *J. Organomet. Chem.* (2001) 653.
- Biginelli, P., *Gazz. Chim. Ital.* 23 (1893) 360.
- Björkqvist, B., Hase, A., *J. Chromatogr.* 435 (1988) 501.
- Blagojević, P., Radulović, N., Palić, R., Stojanović, G., *J. Agric. Food Chem.* 54 (2006) 4780.
- Bohlin, L., Bruhn, J.G., *Bioassay Methods in Natural Product Research and Drug Development*, Springer, 1999.
- Bohlmann, F., Zdero, C., *Chem. Ber.* 106 (1973) 3614.
- Bonjoch, J., Catena, J., Valls, N., *J. Org. Chem.* 61 (1996) 7106.
- Boufford, D.E., Kjær, A., Madsen, J.O., Skydstrup, T., *Biochem. Syst. Ecol.* 17 (1989) 375.
- Bremner, P., Rivera, D., Calzado, M.A., Obón, C., Inocencio, C., Beckwith, C., Fiebich, B.L., Muñoz, E., Heinrich, M., *J. Ethnopharmacol.* 124 (2009) 295.
- Cakilcioglu, U., Khatun, S., Turkoglu, I., Hayta, S., *J. Ethnopharmacol.* 137 (2011) 469.
- Cantrill, S., Milestone 10: (1951–1953) Ferrocene
<https://www.nature.com/milestones/milecrystal/full/milecrystal10.html> (*web stranici pristupljeno oktobra 2018.*)

- Carballo, J.L., Hernández-Inda, Z.L., Pérez, P., García-Grávalos, M.D., *BMC Biotechnol.* 2 (2002) 17.
- Carruthers, W., Coldham, I., *Modern Methods of Organic Synthesis*, Cambridge University Press, 2004.
- Chabner, B.A., Roberts, T.G., *Nat. Rev. Cancer.* 5 (2005) 65.
- Chaler, R., Canton, L., Vaquero, M., Grimalt J.O., *J. Chromatogr. A* 1046 (2004) 203.
- Cho, H., Takeuchi, Y., Ueda, M., Mizuno, A., *Tetrahedron Lett.* 29 (1988) 5405.
- Chohan, Z.H., *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.* 24 (2009) 169.
- Chohan, Z.H., Naseer, M.M., *Appl. Organomet. Chem.* 21 (2007) 1005.
- Cohen, F., Overman, L.E., *J. Am. Chem. Soc.* 123 (2001) 10782.
- Cole, R.A., *Phytochemistry* 15 (1976) 759.
- Connelly, N.G., Geiger, W.E., *Chem. Rev.* 96 (1996) 877.
- Costa, L.G., *Clin. Chim. Acta* 366 (2006) 1.
- Csámpai, A., Györfi, A.Z., Túrós, G.I., Sohár, P., *J. Organomet. Chem.* 694 (2009) 3667.
- Čolović, M.B., Krstić, D.Z., Lazarević-Pašti, T.D., Bondžić, A M, Vasić. V.M., *Curr. Neuropharmacol.* 11 (2013) 315.
- da Costa, J.G.M., Campos, A.R., Brito, S.A., Pereira, C.K.B., Souza, E.O., Rodrigues, F.F.G., *Pharmacogn. Mag.* 6 (2010) 331.
- Daniel, M., *Medicinal Plants: Chemistry and Properties*, First edition, CRC Press, 2006.
- Daxenbichler, M.E., Spencer, G.F., Carlson, D.G., Rose, G.B., Brinker, A.M., Powell, R.G., *Phytochemistry* 30 (1991) 2623.
- de Sousa, D.P., *Molecules*, 16 (2011) 2233.
- Desai, B., Kappe, C.O., *J. Comb. Chem.* 7 (2005) 641.
- Dinda, B., Saha, M.K., *J. Indian Chem. Soc.* 63 (1986) 764.
- do Amaral, J.F., Silva, M.I.G., de Aquino Neto, M.R.A., Neto, P.F.T., Moura, B.A., de Melo, C.T.V., de Araújo, F.L.O., de Sousa, D.P., de Vasconcelos, P.F., de Vasconcelos, S.M.M., de Sousa, F.C.F., *Biol. Pharm. Bull.* 30 (2007) 1217.
- Dockey, M., Tonkins, S., *Brine shrimp ecology*, British Ecological Society, 2009.
- Dondoni, A., Massi, A., Sabbatini, S., *Tetrahedron Lett.* 43 (2002) 5913.
- Dubar, F., Slomianny, C., Khalifé, J., Dive, D., Kalamou, H., Guérardel, Y., Grellier, P., Biot, C., *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 52 (2013) 7690.

- Duke, J.A., *Duke's Handbook of Medicinal Plants of the Bible*, First edition, CRC Press, Boca Raton, FL, 2007.
- Edelson, P.J., Cohn, Z.A., *J. Exp. Med.* 138 (1973) 318.
- Eichner, R.D., Smeaton, T.C., *Scand. J. Immunol.* 18 (1983) 259.
- Eigner, D., Scholz, D., *J. Ethnopharmacol.* 67 (1999) 1.
- Ergene, A., Guler, P., Tan, S., Hamzaoglu, E., Duran, A., *Afr. J. Biotechnol.* 5 (2006) 1087.
- Ettlinger, M.G., Kjær, A., *Recent Adv. Phytochem.* 1 (1968) 59.
- Ettlinger, M.G., Lundeen, A.J., *J. Am. Chem. Soc.* 78 (1956) 1952.
- Ettlinger, M.G., Lundeen, A.J., *J. Am. Chem. Soc.* 79 (1957) 1764.
- Evans, D.A., Rieger, D.L., Jones, T.K., Kaldor, S.W., *J. Org. Chem.* 55 (1990) 6260.
- Evans, W.C., *Trease and Evans' Pharmacognosy*, 13th edition, Bailliere Tindall, London, 1999.
- Fahey, J.W., Zalcman, A.T., Talalay, P., *Phytochemistry* 56 (2001) 5.
- Fenn, J.E., Udelsman, R., *J. Am. Coll. Surg.* 212 (2011) 413.
- Finholt, A.E., Bond, A.C., Schlesinger, H.I., *J. Am. Chem. Soc.* 69 (1947) 1199.
- Fiorina, V.J., Dubois, R.J., Brynes, S., *J. Med. Chem.* 21 (1978) 393.
- Fischer, E., Jourdan, F., *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* 16 (1883) 2241.
- Fischer, E.O., Pfab, W., *Z. Naturforsch. B* 7 (1952) 377.
- Flick, D.A., Gifford, G.E., *J. Immunol. Methods* 68 (1984) 167.
- Folkers, K., Johnson, T.B., *J. Am. Chem. Soc.* 55 (1933) 3784.
- Fouda, M.F.R., Abd-Elzاهر, M.M., Abdelsamaia, R.A., Labib, A.A., *Appl. Organomet. Chem.* 21 (2007) 613.
- Fujita, F., Moriyama, T., Higashi, T., Shima, A., Tominaga, M., *Br. J. Pharmacol.* 151 (2007) 134.
- Gadamer, J., *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* 30 (1897) 2327.
- Gebauer, M., *Bioorg. Med. Chem.* 15 (2007) 2414.
- Geoffroy, É.F., *Tractatus de material medica: sive de medicamentorum simplicium*, Nicolò Pezzana, Venezia, 1756.
- Ghannadi, A., Sajjadi, S.E., Beigihassan, A., *Daru J. Pharm. Sci.* 10 (2002) 165.
- Ghorab, M.M., Abdel-Gawad, S.M., El-Gaby M.S.A., *II Farmaco* 55 (2000) 249.

- Gielen, M., Tiekink, E., *Metallotherapeutic Drugs and Metal-Based Diagnostic Agents: The Use of Metals in Medicine*, John Wiley & Sons Ltd., Chichester, England, 2005.
- Gray, S.F., *A Supplement to the Pharmacopoeia*, third edition, T. and G. Underwood, London, 1824.
- Hadidi, K.A., Aburjai, T., Battah, A.K., *Fitoterapia* 74 (2003) 242.
- Haider, S., Nazreen, S., Alam, M.M., Gupta, A., Hamid, H., Alam, M.S., J. *Ethnopharmacol.* 138 (2011) 741.
- Halkier, B.A., Du, L., *Trends in Plant Sci.* 2 (1997) 425.
- Halkier, B.A., Gershenzon, J., *Annu Rev. Plant. Biol.* 57 (2006) 303.
- Hamidi, M.R., Jovanova, B., Panovska, T.K., *Maced. Pharm. Bull.* 60 (2014) 9.
- Hanahan, D., Weinberg, R.A., *Cell.* 100 (2000) 57.
- Heathcock, C.H., Blumenkopf, T.A., Smith, K.M., *J. Org. Chem.* 54 (1989) 1548.
- Hikino, H., Konno, C., Nagashima, T., Kohama, T., Takemoto, T., *Chem. Pharm. Bull.* 25 (1977) 6.
- Hosseinzadeh, H., Ramezani, M., Salmani, G., *J. Ethnopharmacol.* 73 (2000) 379.
- Houlton, A., Roberts, R.M.G., Silver, J., *J. Organomet. Chem.* 418 (1991) 107.
- Huang, S.H., Wu, L.W., Huang, A.C., Yu, C.C., Lien, J.C., Huang, Y.P., Yang, J.S., Yang, J.H., Hsiao, Y.P., Wood, G.W., Yu, C.S., Chung, J.G., *J. Agric. Food Chem.* 60 (2012) 665.
- Huang, Y.J., Yang, F.Y., Zhu, C.J., *J. Am. Chem. Soc.* 127 (2005) 16386.
- Hudlicky M., *Reductions in Organic Chemistry*, Ellis Horwood Ltd, 1984.
- Hung, R.J., Boffetta, P., Brennan, P., Malaveille, C., Gelatti, U., Placidi, D., Carta, A., Hautefeuille, A., Porru, S., *Carcinogenesis* 25 (2004) 973.
- Imrie, C., Loubster, C., Engelbrecht, P., McClelland, C. W., *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1* (1999) 2513.
- Imrie, C., Nonhebel, D.C., Pauson, P.L., *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* (1991) 2555.
- Iscan, G., Demirci, F., Kurkcuoglu, M., Kivanc, M., Baser, K.H.C., *Z. Naturforsch.* 58 (2003) 195.
- Iscan, G., Ozek, T., Ozek, G., Duran, A., Baser, K.H.C., *Chem. Nat. Comp.* 40 (2004) 544.
- Iyengar, R., Schildknecht, K., Aubé, J., *Org. Lett.* 2 (2000) 1625.
- Jain, R., Saxena, U., *J. Indian Chem. Soc.* 80 (2003) 656.
- Jin, T., Zhang, S., Li, T., *Synth. Commun.* 32 (2002) 1847.

- Jordan, V.C., *Eur. J. Cancer.* 44 (2008) 30.
- Joshi, N.K., Maharaj, N., Thomas, A., *Open Drug Discov. J.* 2 (2010) 89.
- Kappe C.O., *J. Org. Chem.*, 62 (1997) 7201.
- Kappe, C.O., *Eur. J. Med. Chem.* 35 (2000a) 1043.
- Kappe, C.O., *Acc. Chem. Res.* 33 (2000b) 879.
- Kappe, C.O., Uray, G., Roschger, P., Lindner, W., Kratky, C., Keller, W., *Tetrahedron* 48 (1992) 5473.
- Kartal, N., Sokmen, M., Tepe, B., Daferera, D., Polissiou, M., Sokmen, A., *Food Chem.* 100 (2007) 584.
- Kealy, T.J., Pauson, P. L., *Nature* 168 (1951) 1039.
- Khanina, E.L., Mucenice, D., Kadysh, V.P., Duburs, G., *Khim. Geterotsikl. Soedin.* (1986) 1223.
- Kim, H.S., Kim, Y.J., Lee, H.K., Ryu, H.S., Kim, J.S., Yoon, M.J., Kang, J.S., Hong, J.T., Kim, Y., Han, S.B., *Food Chem. Toxicol.* 50 (2012) 3190.
- Kim, S.H., Sehrawat, A., Singh, S.V., *Cancer Prev. Res.* 6 (2013) 782.
- Kirkland, D.F., Matsuo, M., Underhill, R.W., *Lloydia* 34 (1971) 195.
- Kjær, A., Gmelin, R., *Acta Chem. Scand.* 12 (1958) 1693.
- Klebanoff, J., *J. Bacteriol.* 95 (1968) 2131.
- Kodama, O., Miyakawa, J., Akatsuka, T., Kiyosawa, S., *Phytochemistry* 31 (1992) 3807.
- Kojima, H., Yanai, T., Toyota, A., *Planta Med.* 64 (1998) 380.
- Konrath, E.L., dos Santos Passos, C., Klein-Júnior, L.C., Henriques, A.T., *J. Pharm. Pharmacol.* 65 (2013) 1701.
- Kopf-Maier, P., Kopf, H., Neuse, E.W., *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* 108 (1984) 336.
- Ksouri, A., Dob, T., Belkebir, A., Krimat, S., Chelghoum, C., *J. Mater. Environ. Sci.* 6 (2015) 784.
- Kumarasamy, Y., Cox, P.J., Jaspars, M., Nahar, L., Sarker, S.D., *J. Ethnopharmacol.* 83 (2002) 73.
- Kuroyanagi, M., Ueno, A., Koyama, K., Natori, S., *Chem. Pharm. Bull.* 38 (1990) 55.
- Kürti, L., Czakó B., *Strategic Applications of Named Reactions in Organic Synthesis*, Elsevier Academic Press, 2005.
- Lamnaouera, D., Martin, M.-T., Molho, D., Bodo, B., *Phytochemistry* 28 (1989) 2711.

- Lamy, E., Hertrampf, A., Herz, C., Schuler, J., Erlacher, M., Bertele, D., Bakare, A., Wagner, M., Weiland, T., Lauer, U., Drognitz, O., Huber, R., Rohn, S., Giesemann, T., Mersch-Sundermann, V., 2013. PloS One, <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0070846>.
- Le Bars, D., Gozariu, M., Cadden, S.W., Pharmacol. Rev. 53 (2001) 597.
- Lee, H., Caterina, M.J., Eur. J. Phys. 451 (2005) 160.
- Lee, Y., Kim, Y.J., Choi, Y.J., Lee, J.W., Lee, S., Chung, H.W., Food Chem. Toxicol. 50 (2012) 2397.
- Leete, E., Marion, L., Can. J. Chem. 31(1953) 775.
- Li, J.J., Limberakis, C., Pflum, D.A., (2007) Modern Organic Synthesis in the Laboratory, First edition, Oxford University Press.
- Li, J.J., Name Reactions in Heterocyclic Chemistry, John Wiley & Sons, Hoboken, New Jersey, 2005.
- Lin, C.I., McCarty, R.M., Liu, H.W., Chem. Soc. Rev. 42 (2013) 4377.
- Lionetto, M.G., Caricato, R., Calisi, A., Giordano, M.E., Schettino, T., BioMed. Res. Int. (2013) <http://dx.doi.org/10.1155/2013/321213>
- Lis-Balchin, M., Geranium and Pelargonium, The genera *Geranium* and *Pelargonium*, Taylor & Francis, London, 2002.
- Lo, K.K., Lau, J.S., Zhu, N., New J. Chem. 30 (2006) 1567.
- Lotti, M., in: P.S. Spencer, H.H. Schaumburg (Eds.), Experimental and Clinical Neurotoxicology, second ed., Oxford University Press, New York, 2000, p. 898.
- Love, B., Flores, M., J. Org. Chem. 26 (1961) 3595.
- Maffei, M., Biochem. Syst. Ecol. 24 (1996) 531.
- Malle, E., Furtmuller, P.G., Sattler, W., Obinger, C., Br. J. Pharmacol. 152 (2007) 838.
- Marsh, R.E., Waser, J., Acta Cryst. B 26 (1970) 1030.
- Martínez, M., Del Ramo, J., Torreblanca, A., Díaz-Mayans, J., Aquaculture 172 (1999) 315.
- Matsuda, H., Ninomiya, K., Morikawa, T., Yoshikawa, M., Bioorg. Med. Chem. Lett. 8 (1998) 339.
- McChesney, J.D., Venkataraman, S.K., Henri, J.T., Phytochemistry 68 (2007) 2015.
- McLafferty, F.W., Turecek, F., Interpretation of Mass Spectra, 4th edition, University Science Books, Sausalito, California, 1993.
- Melnicoff, M.J., Horan, P.K., Morahan, P.S., Cell. Immunol. 118 (1989) 178.

- Meyer, B.N., Ferrigni, N.R., Putnam, J.E., Jacobsen, L.B., Nichols, D.E., McLaughlin, J.L., *Planta Med.* 45 (1982) 31.
- Michael, A.S., Thompson, C.G., Abramovitz, M., *Science* 123 (1956) 464.
- Mihajlovic, L.E., Savic, A., Poljarevic, J., Vuckovic, I., Mojic, M., Bulatovic, M., Maksimovic-Ivanic, D., Mijatovic, S., Kaluderovic, G.N., Stosic-Grujicic, S., Miljkovic, D., Grguric-Sipka, S., Sabo, T.J., *J. Inorg. Biochem.* 109 (2012) 40.
- Miller, S.A., Tebboth, J.A., Tremaine, J.F., *J. Chem. Soc.* (1952) 632.
- Mitić, K., Stanojević, S., Kuštrimović, N., Vujić, V., Dimitrijević, M., *Peptides* 32 (2011) 1626.
- Moshi, M.J., Innocent, E., Magadula, J.J., Otieno, D.F., Weisheit, A., Mbabazi, P.K., Nondo, R.S.O., *Tanz. J. H. Res.* 12 (2010) 63.
- Mosser, D.M., *J. Leukoc. Biol.* 73 (2003) 209.
- Namazi, H., Mirzaei, Y.R., Azamat, H., *J. Heterocycl. Chem.* 38 (2001) 1051.
- Neises, B., Steglich, W., *Angew. Chem. Int. Ed.* 17 (1978) 522.
- Neuse, E.W., *J. Inorg. Organomet. Polym. Mater.* 15 (2005) 3.
- Neuse, E.W., *Macromol. Symp.* 172 (2001) 127.
- Newman, D.J., Cragg, G.M., *J. Nat. Prod.* 70 (2007) 461.
- Nishimura, Y., Okamoto, Y., Ikunaka, M., Ohyama, Y., *Chem. Pharm. Bull.* 59 (2011) 1458.
- Oghiso, Y., Yamada, Y., Shibata, Y., *J. Leukoc. Biol.* 52 (1992) 421.
- Ojima, I., *J. Med. Chem.* 51 (2008) 2587.
- Olsen, O., Sørensen, H., *Phytochemistry* 18 (1979) 1547.
- Olsen, O., Sørensen, H., *Phytochemistry* 19 (1980) 1783.
- Olson, S.H., Carlson, M.D., Ostrer, H., Harlap, S., Stone, A., Winters, M., Ambrosone, C.B., *Gynecol. Oncol.* 93 (2004) 615.
- Ornelas, C., *New J. Chem.* 35 (2011) 1973.
- Osella, D., Ferrali, M., Zanello, P., Laschi, F., Fontani, M., Nervi, C., Cavigiolio, G., *Inorg. Chim. Acta* 306 (2000) 42.
- Oxford Diffraction, CrysAlis CCD and CrysAlis RED, Oxford Diffraction Ltd, Abingdon, England, 2008.
- Ozek, T., Demirci, B., Başer K.H.C., *Chem. Nat. Comp.* 38 (2002) 48.
- Ozek, T., Ozek, G., Başer K.H.C., Duran, A., *J. Essent. Oil Res.* 17 (2005) 605.
- Paavilainen, H.M., *Medieval Pharmacotherapy - Continuity and Change*, first edition, Brill, NV, Leiden, The Netherlands, 2009.

- Pakakasama, S., Chen, T.T., Frawley, W., *Int. J. Cancer* 106 (2003) 205.
- Park, T.J., Park, Y.S., Lee, T.G., Ha, H., Kim, K.T., *Biochem. Pharmacol.* 65 (2003) 83.
- Parra, L.A., Yhebra, R.S., Sardiñas, I.G., Buela, L.I., *Phytomed.* 8 (2001) 395.
- Passaro, L.C., Webster, F.X., *J. Agric. Food Chem.* 52 (2004) 2896.
- Patapoutian, A., Tate, S., Woolf, C.J., *Nat. Rev. Drug Discov.* 8 (2009) 55.
- Pauson, P.L., *J. Am. Chem. Soc.* 76 (1954) 2187.
- Piet, D.P., Schrijvers, R., Franssen, M.C.R., de Groot, A., *Tetrahedron* 51 (1995) 6303.
- Pliny, *Natural History, Volume VII, Books 24-27. Index of Plants*, Loeb Classical Library No. 393, Harvard University Press, Cambridge, 1956.
- Poli, F., Appendino, G., Sacchetti, G., Ballero, M., Maggiano, N., Ranelletti, F.O., *Phytother. Res.* 19 (2005) 152.
- Popova, M., Trusheva, B., Antonova, D., Cutajar, S., Mifsud, D., Farrugia, C., Tsvetkova, I., Najdenski, H., Bankova, V., *Food Chem.* 126 (2011) 1431.
- Pozzi, L.A., Maciaszek, J.W., Rock, K.L., *J. Immunol.* 175 (2005) 2071.
- Quirante, J., Dubar, F., González, A., Lopez, C., Cascante, M., Cortés, R., Forfar, I., Pradines, B., Biot, C., *J. Organomet. Chem.* 696 (2011) 1011.
- Radulović, N., Blagojević, P., Palić, R., *Nat. Prod. Commun.* 4 (2009) 1581.
- Radulović, N.S., Dekić, M.S., Stojanovic-Radić, Z.Z., Zoranić, S.K., *Chem. Biodivers.* 7 (2010) 2783.
- Radulović, N., Dekić, M., Stojanović-Radić, Z., *Food Chem.* 129 (2011) 125.
- Radulović, N.S., Dekić, M.S., Randelović, P.J., Stojanović, N.M., Zarubica, A.R., Stojanović-Radić, Z.Z., *Food Chem. Toxicol.* 50 (2012a) 2016.
- Radulović, N., Denić, M., Stojanović-Radić, Z., Skropeta D., *J. Am. Oil. Soc. Chem.* 89 (2012b) 2165.
- Radulović, N.S., Blagojević, P.D., Stojanović-Radić, Z.Z., Stojanović, N.M., *Curr. Med. Chem.* 20 (2013a) 932.
- Radulović, N.S., Blagojević, P.D., Randelović, P.J., Stojanović, N.M., *Curr. Top. Med. Chem.* 13 (2013b) 2134.
- Radulović, N.S., Mladenović, M.Z., Blagojević, P.D., Stojanović-Radić, Z.Z., Ilić Tomić, T., Senerović, L., Nikodinovic-Runić, J., *Food Chem. Toxicol.* 62 (2013c) 554.
- Rahmani, B., Shiraz, N.Z., Masnabadi, N., Masoudi, S., Monfared, A., Larijani, K., Rustaiyan, A., *J. Essent. Oil Res.* 20 (2008) 232.

- Rana, T., Characterization and Determination of Antioxidant and Antimicrobial Activity of Essential Oils of Some of the Species of Umbelliferae Family, PhD thesis, Government College University, Lahore, Pakistan, 2003.
- Rao, V.S., Menezes, A.M., Viana, G.S., *J. Pharm. Pharmacol.* 42 (1990) 877.
- Robinson, G.M., Robinson, R., *J. Chem. Soc., Trans.* 125 (1924) 827.
- Rosa, E.A.S., Rodrigues, A.S., *Hortscience* 36 (2001) 56.
- Rosenblum, M., Howells, W.G., Banerjee, A.K., Bennett, C., *J. Am. Chem. Soc.* 84 (1962) 2726.
- Sadraei, H., Asghari, G.R., Hajhashemi, V., Kolagar, A., Ebrahimi, M., *Phytomedicine* 8 (2001) 370.
- Sandkuhler, J., *Phys. Rev.* 89 (2009) 707.
- Schmiech, L., Uemura, D., Hofmann, T., *J. Agric. Food Chem.* 56 (2008) 10252.
- Schraudolf, H., *Experientia* 29 (1965) 520.
- Sharma, N., Gupta, P.C., Singh, A., Rao, C.V., *Der. Pharm. Lett.* 5 (2013) 162.
- Sharma, S.K., Kumar, N., Singh, S., Ali, M., *Asian J. Chem.* 20 (2008) 5455.
- Shiobara, Y., Asakawa, Y., Kodama, M., Yasuda, K., Takemoto, T., *Phytochemistry* 24 (1985) 2629.
- Singh, K., Singh, K., Biginelli Condensation: Synthesis and Structure Diversification of 3,4-Dihydropyrimidin-2(1*H*)-one Derivatives, in *Advances in Heterocyclic Chemistry*, ed. A. R. Katritzky, Academic Press, 2012, pp. 223–308.
- Sliskovic, I., Abdulhamid, I., Sharma, M., Abu-Soud, H.M., *Free Radical Biol. Med.* 47 (2009) 1005.
- Smith, M., *Organic Synthesis*, Third Edition, Academic Press, 2011
- Sollott, G.P., Peterson, W.R., *J. Org. Chem.* 34 (1969) 1506.
- Stout, R.D., Suttles, J., *J. Leukoc. Biol.* 76 (2004) 509.
- Sundberg, R.J., *The Chemistry of Indoles*, Academic Press, New York, 1970.
- Swarts, J.C., Vosloo, T.G., Cronje, S.J., Du Plessis, W.I., Van Rensburg, C.E., Kreft, E., Van Lier, J.E., *Anticancer Res.* 28 (2008) 2781.
- Sweet, F., Fissekis, J.D., *J. Am. Chem. Soc.* 95 (1973) 8741.
- Šarić-Kundalić, B., Dobeš, C., Klatte-Asselmeyer, V., Saukel, J., *J. Ethnopharmacol.* 133 (2011) 1051.
- Tamura, H., Miwa, M., *Chem. Lett.* 11 (1997) 1177.
- Tavares, A.C., Gonçalves, M.J., Cavaleiro, C., Cruz, M.T., Lopes, M.C., Canhoto, J., Salgueiro, L.R., *J. Ethnopharmacol.* 119 (2008) 129.

- Taylor, P., Radić, Z., *Annu. Rev. Pharmacol.* 4 (1994) 281.
- Top, S., Tang, J., Vessières, A., Carrez, D., Provot, C., Jaouen, G., *Chem. Commun.* (1996) 955.
- Traylor, T.G., Ware, J.C., *J. Am. Chem. Soc.* 89 (1967) 2304.
- Ulubelen, A., Goren, N., Jakupovic, J., *Phytochemistry* 26 (1986) 312.
- van Genderen, H.H., Jaarsma, J., Versluis, C., *Plant Sci.* 55 (1988) 231.
- van Rensburg, C.E., Van Staden, A.M., Anderson, R., Van Rensburg, E.J., *Mutat. Res.* 265 (1992) 255.
- van Vliet, M.C.A., Mandelli, D., Arends, I., Schuchardt, U., Sheldon, R.A., *Green Chem.* 3 (2001) 243.
- Vanhaecke, P., Persoone, G., Claus, C., Sorgeloos, P., *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 5 (1981) 382.
- Wang, L., Ma, Z.G., Wei, X.J., Meng, Q.Y., Yang, D.T., Du, S.F., Chen, Z.F., Wu, L.Z., Liu, Q., *Green Chem.* 16 (2014) 3752.
- WHO, World Health Statistics 2014
http://www.who.int/gho/publications/world_health_statistics/2014/en/ (*web stranici pristupljeno oktobra 2018.*)
- Wilkinson, G., Rosenblum, M., Whiting, M.C., Woodward, R.B., *J. Am. Chem. Soc.* 74 (1952) 2125.
- Wittstock, U., Halkier, B.A., *Trends Plant Sci.* 7 (2002) 263.
- Wong, C.H., Day, P., Yarmush, J., Wu, W., Zbuzek, U.K., *Anesth. Analg.* 79 (1994) 303.
- Xu, H., Blair, N.T., Clapham, D.E., *J. Neurosci.* 25 (2005) 8924.
- Yalcin, I., Charlet, A., Freund-Mercier, M.J., Barrot, M., Poisbeau, P., *J. Pain* 10 (2009) 767.
- Yasuhara, T., Nishimura, K., Yamashita, M., Fukuyama, N., Yamada, K.I., Muraoka, O., Tomioka, K., *Org. Lett.* 5 (2003) 1123.
- Yeary, R.A., *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 15 (1969) 666.
- Zhang, D.Z., Jia, X.D., Yang, C.X., Wang, X.C. *Heterocycles* 81 (2010) 1827.
- Zigeuner, G., Hamberger, H., Blaschke, H., Sterk, H., *Monatsh. Chem.* 97 (1966) 1408.
- Zovko, A., Sepcic, K., Turk, T., Faimali M., Garaventa, F., Chelossi, E., Paleari, L., Falugi, C., Aluigi, M.G., Angelini, C., Trombino, S., Gallus, L., Ferrando, S., *WSEAS Trans. Biol. Biomed.* 3 (2009) 58.

8. PRILOZI

SADRŽAJ

Germakron-1,10-epoksid (2-1)

- Prilog 1. ^1H NMR spektar
- Prilog 2. ^{13}C NMR spektar
- Prilog 3. ^1H - ^1H COSY spektar
- Prilog 4. Uvećanje ^1H - ^1H COSY spektra
- Prilog 5. NOESY spektar
- Prilog 6. Uvećanje NOESY spektra
- Prilog 7. HSQC spektar
- Prilog 8. HMBC spektar
- Prilog 9. Uvećanje HMBC spektra

Germakron-4,5-epoksid (2-2)

- Prilog 10. ^1H NMR spektar
- Prilog 11. Delovi ^1H NMR spektra
- Prilog 12. ^1H - ^1H COSY spektar
- Prilog 13. Uvećanje ^1H - ^1H COSY spektra
- Prilog 14. HSQC spektar
- Prilog 15. Uvećanje HSQC spektra
- Prilog 16. NOESY spektar
- Prilog 17. Uvećanje NOESY spektra
- Prilog 18. HMBC spektar
- Prilog 19. Uvećanje HMBC spektra
- Prilog 20. ^{13}C NMR spektar

Bornil-4-metoksibenzoat (BMB)

- Prilog 21. ^{13}H NMR spektar
- Prilog 22. ^{13}C NMR spektar
- Prilog 23. DEPT 135 spektar
- Prilog 24. Uvećanje ^1H NMR spektra
- Prilog 25. ^1H - ^1H COSY spektar
- Prilog 26. Uvećanje ^1H - ^1H COSY
- Prilog 27. HSQC spektar
- Prilog 28. HMBC spektar
- Prilog 29. NOESY spektar

2-(α -L-Ramnopiranoziloksi)benzil-izotiocijanat (4-1)

- Prilog 30. EI-MS spektar
- Prilog 31. ^1H NMR spektar
- Prilog 32. ^{13}C NMR i DEPT 135 spektri
- Prilog 33. HSQC spektar
- Prilog 34. Uvećanje HSQC spektra
- Prilog 35. HMBC spektar
- Prilog 36. Uvećanje HMBC spektra
- Prilog 37. ^1H - ^1H COSY
- Prilog 38. NOESY spektar
- Prilog 39. Metabolički profil autolizata cveta vrste *Reseda lutea*
- Prilog 40. Metabolički profil autolizata korena vrste *Reseda lutea*

Prilog 41. EI-MS spektar 2-(3-ferocenilfenil)-1*H*-indola (**5-1**)

Prilog 42. EI-MS spektar 2-(4-ferocenilfenil)-1*H*-indola (**5-2**)

2-(3-Ferocenilfenil)-1H-indol (5-3a)

Prilog 43. ¹H NMR spektar

Prilog 44. Uvećanje ¹H NMR

Prilog 45. ¹³C NMR spektar

Prilog 46. Uvećanje ¹³C NMR

Prilog 47. ¹H-¹H COSY spektar

Prilog 48. Uvećanje ¹H-¹H COSY spektra

Prilog 49. HSQC spektar

Prilog 50. Uvećanje HSQC spektra

Prilog 51. HMBC spektar

Prilog 52. Uvećanje HMBC spektra

Prilog 53. NOESY spektar

Prilog 54. Uvećanje NOESY spektra

2-(4-Ferocenilfenil)-1H-indol (5-3b)

Prilog 55. ¹H NMR spektar

Prilog 56. ¹³C NMR jedinjenja

Prilog 57. ¹H-¹H COSY spektar

Prilog 58. Uvećanje ¹H-¹H COSY spektra

Prilog 59. HSQC spektar

Prilog 60. HMBC spektar

Prilog 61. Uvećanje HMBC spektra

Prilog 62. NOESY spektar

NMR spektri Biđinelijevih jedinjenja i proizvoda redukcije Biđinelijevih jedinjenja

Prilog 63. Metil-4-fenil-6-metil-2-okso-1,2,3,4-tetrahidropirimidin-5-karboksilat (**6-1**)

Prilog 64. Metil-6-metil-2-okso-4-(*p*-tolil)-1,2,3,4-tetrahidropirimidin-5-karboksilat (**6-2**)

Prilog 65. Metil-6-metil-2-okso-4-(*m*-tolil)-1,2,3,4-tetrahidropirimidin-5-karboksilat (**6-3**)

Prilog 66. Prilog 66. Metil-6-metil-2-okso-4-(*o*-tolil)-1,2,3,4-tetrahidropirimidin-5-karboksilat (**6-4**)

Prilog 67. Metil-6-metil-4-(4-metoksifenil)-2-okso-1,2,3,4-tetrahidropirimidin-5-karboksilat (**6-5**)

Prilog 68. Metil-6-metil-4-(3-metoksifenil)-2-okso-1,2,3,4-tetrahidropirimidin-5-karboksilat (**6-6**)

Prilog 69. Metil-6-metil-4-(2-metoksifenil)-2-okso-1,2,3,4-tetrahidropirimidin-5-karboksilat (**6-7**)

Prilog 70. Metil-4-(4-fluorofenil)-6-metil-2-okso-1,2,3,4-tetrahidropirimidin-5-karboksilat (**6-8**)

Prilog 71. Metil-4-(3-fluorofenil)-6-metil-2-okso-1,2,3,4-tetrahidropirimidin-5-karboksilat (**6-9**)

Prilog 72. Metil-4-(2-fluorofenil)-6-metil-2-okso-1,2,3,4-tetrahidropirimidin-5-karboksilat (**6-10**)

Prilog 73. Metil-4-fenil-1,6-dimetil-2-okso-1,2,3,4-tetrahidropirimidin-5-karboksilat (**6-12**)

Prilog 74. Metil-4-(4-fluorofenil)-1,6-dimetil-2-okso-1,2,3,4-tetrahidropirimidin-5-karboksilat (**6-13**)

Prilog 75. Metil-1,6-dimetil-4-(3-metoksifenil)-2-okso-1,2,3,4-tetrahidropirimidin-5-karboksilat (**6-14**)

Prilog 76. Metil-1,6-dimetil-2-okso-4-(*p*-tolil)-1,2,3,4-tetrahidropirimidin-5-karboksilat (**6-15**)

Prilog 77. 4-fenil-5,6-dimetil-3,4-dihidropirimidin-2(1*H*)-on (**6-1a**)

Prilog 78. 5,6-dimetil-4-(*p*-tolil)-3,4-dihidropirimidin-2(1*H*)-on (**6-2a**)

Prilog 79. 5,6-dimetil-4-(*m*-tolil)-3,4-dihidropirimidin-2(1*H*)-on (**6-3a**)

Prilog 80. 5,6-dimetil-4-(*o*-tolil)-3,4-dihidropirimidin-2(1*H*)-on (**6-4a**)

- Prilog 81. 5,6-dimetil-4-(4-metoksifenil)-3,4-dihidropirimidin-2(1*H*)-on **(6-5a)**
 Prilog 82. 5,6-dimetil-4-(3-metoksifenil)-3,4-dihidropirimidin-2(1*H*)-on **(6-6a)**
 Prilog 83. 5,6-dimetil-4-(2-metoksifenil)-3,4-dihidropirimidin-2(1*H*)-on **(6-7a)**
 Prilog 84. 4-(4-fluorofenil)-5,6-dimetil-3,4-dihidropirimidin-2(1*H*)-on **(6-8a)**
 Prilog 85. 4-(3-fluorofenil)-5,6-dimetil-3,4-dihidropirimidin-2(1*H*)-on **(6-9a)**
 Prilog 86. 4-(2-fluorofenil)-5,6-dimetil-3,4-dihidropirimidin-2(1*H*)-on **(6-10a)**
 Prilog 87. 4-(furan-2-il)-5,6-dimetil-3,4-dihidropirimidin-2(1*H*)-on **(6-11a)**
 Prilog 88. 4-fenil-1,5,6-trimetil-3,4-dihidropirimidin-2(1*H*)-on **(6-12a)**
 Prilog 89. 4-fenil-5-(hidroksimetil)-1,6-dimetil-3,4-dihidropirimidin-2(1*H*)-on **(6-12b)**
 Prilog 90. 4-(4-fluorofenil)-5-(hidroksimetil)-1,6-dimetil-3,4-dihidropirimidin-2(1*H*)-on **(6-13b)**
 Prilog 91. 5-(hidroksimetil)-1,6-dimetil-4-(*p*-tolil)-3,4-dihidropirimidin-2(1*H*)-on **(6-15b)**
 Prilog 92. 1-metil-5,6-metilen-4-feniltetrahidropirimidin-2(1*H*)-on **(6-12c)**
 Prilog 93. 4-(4-fluorofenil)-1-metil-5,6-dimetilenetetrahidropirimidin-2(1*H*)-on **(6-13c)**
 Prilog 94. 1-metil-4-(3-metoksifenil)-5,6-dimetilentetrahidropirimidin-2(1*H*)-on **(6-14c)**
 Prilog 95. 1-metil-5,6-dimetilen-4-(*p*-tolil)tetrahidropirimidin-2(1*H*)-on **(6-15c)**
 Prilog 96. 3-(1-fenilbutil-2-metilen-3-okso)-1-metilurea **(6-12d)**
 Prilog 97. 1-(2-metilen-1-(3-metoksifenil)-3-oksobutil)-3-metilurea **(6-14d)**
 Prilog 98. Metil-4-fenil-6-metil-2-tiokso-1,2,3,4-tetrahidropirimidin-5-karboksilat **(6-16)**
 Prilog 99. 4-fenil-5,6-dimetil-3,4-dihidropirimidin-2(1*H*)-tion **(6-16a)**
 Prilog 100. 4-metil-5-metilen-6-feniltetrahidropirimidin-2(1*H*)-tion **(6-16b)**
 Prilog 101. 4,5-dimetil-2-(metiltio)-6-fenilpirimidin **(6-20)**
 Prilog 102. Metil-4-fenil-6-metil-2-(metiltio)-1,4-dihidropirimidin-5-karboksilat i metil-6-fenil-4-metil-2-(metiltio)-1,6-dihidropirimidin-5-karboksilat **(6-17a i 6-17b)**
 Prilog 103. 5-Acetil-4-fenil-1,6-dimetil-3,4-dihidropirimidin-2(1*H*)-on **(6-18)**
 Prilog 104. 5-(1-hidroksietil)-4-fenil-1,6-dimetil-3,4-dihidropirimidin-2(1*H*)-on **(6-18b)**
 Prilog 105. 5-acetil-4-fenil-6-metil-3,4-dihidropirimidin-2(1*H*)-on **(6-19)**
 Prilog 106. 5-etil-4-fenil-6-metil-3,4-dihidropirimidin-2(1*H*)-on **(6-19a)**
 Prilog 107. Diizopropil-4-fenil-1-metil-2-okso-1,2,3,4,5,8-heksahidropirimido[4,5-*d*]piridazin-6,7-dicarboksilat **(6-12e)**
 Prilog 108. Tabela S1a. ¹H NMR (400 MHz) i ¹³C NMR (100,6 MHz) hemijska pomeranja (ppm) jedinjenja **[6-1]-[6-15]**

6,8-O-Ditigloil-(1(10E),4E)-germakradien-6β,8α,11-triol

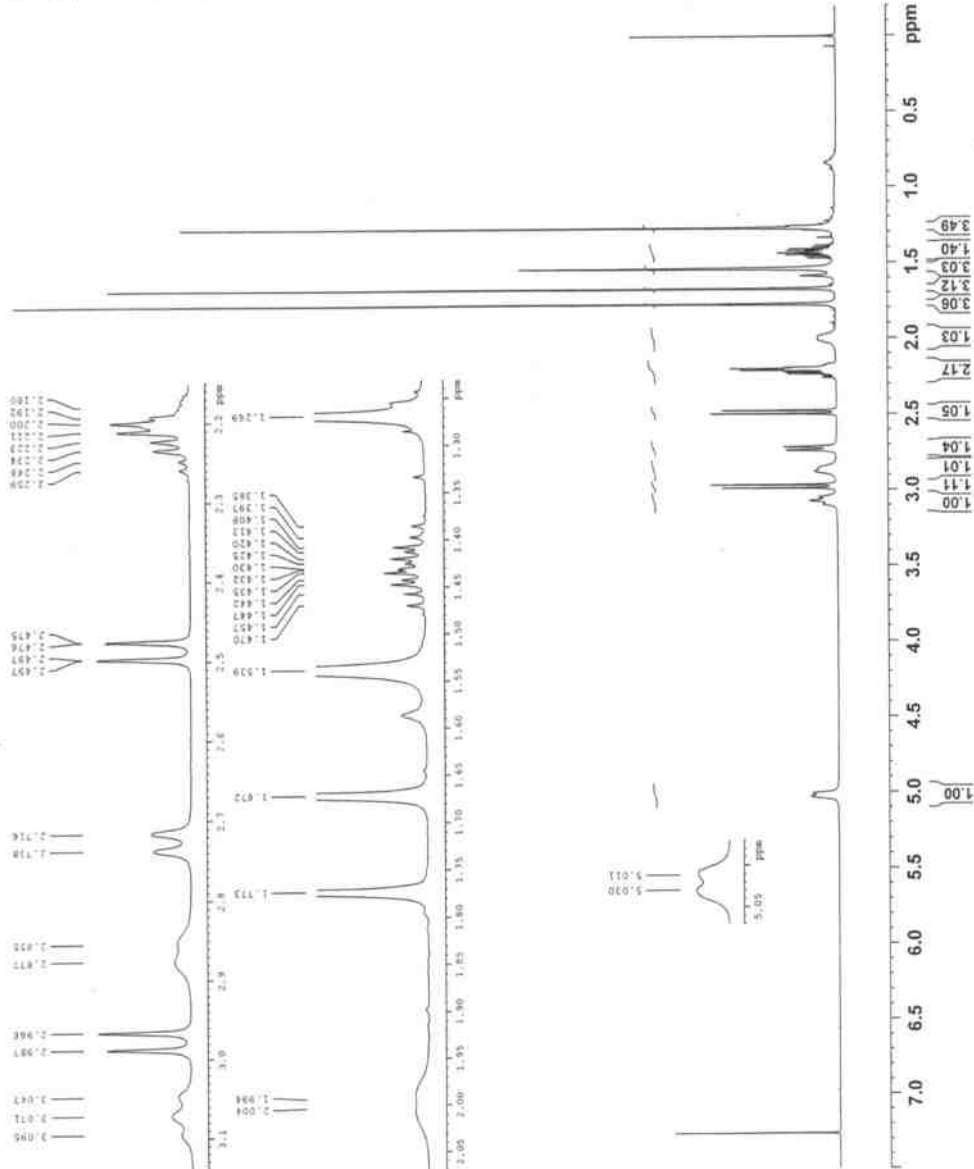
- Prilog 109. ¹H NMR spektar
 Prilog 110. ¹³C NMR spektar
 Prilog 111. HMBC spektar
 Prilog 112. HSQC spektar
 Prilog 113. NOESY spektar

6-O-Angeloil-8-O-tigloil-(1(10E),4E)-germakradien-6β,8α,11-triol

- Prilog 114. ¹H NMR spektar
 Prilog 115. ¹³C NMR spektar
 Prilog 116. ¹H-¹H COSY spektar
 Prilog 117. NOESY spektar
 Prilog 118. HSQC spektar
 Prilog 119. HMBC spektar

NAME **1044**
 EXPNO 1
 PROCNO 20100303
 Date_ 10.29
 Time 10.29
 INSTRUM spect
 PROBHD 5 mm BBO BB-1H
 PULPROG zgpg30
 TD 32768
 SFO1 500.136368 MHz
 F2 500.136368 MHz
 NUC1 1H
 NS 16
 DS 4
 SWH 4111.842 Hz
 FIDRES 0.125483 Hz
 AQ 3.9846387 sec
 RG 101
 DR 121.650 usec
 DE 6.50 usec
 TE 298.0 K
 D1 2.00000000 sec
 T00 1

===== CHANNEL f1 =====
 NUC1 1H
 P1 9.30 usec
 PL1 0.00 dB
 PL12 0.00 dB
 SFO1 27.37956238 MHz
 SF01 500.2618368 MHz
 SI 32768
 SF 500.2600118 MHz
 KW 0
 LB 0
 GB 0
 PC 1.00

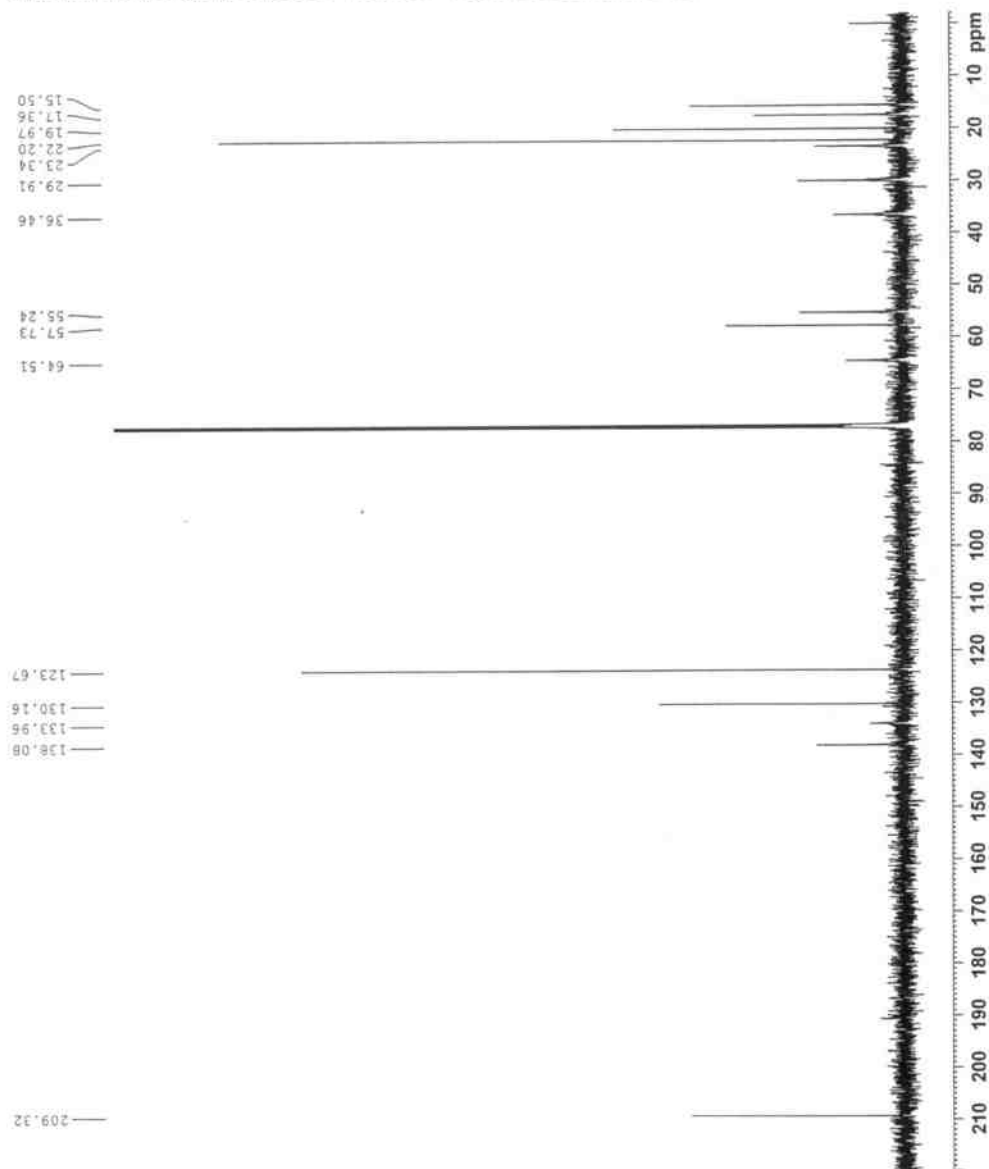


Prilog 1. ¹H NMR spektar germakron-1,10-epoksida (2-1)

NAME **NR2-4**
 EXPNO 2
 PROCNO 1
 Date_ 20100303
 Time 10.34
 INSTRUM spect
 PROBHD 5 mm BBO BB-1H
 PULPROG zgpg30
 TD 32768
 SOLVENT CDCl3
 NS 1024
 DS 4
 SWH 29761.904 Hz
 FIDRES 0.908261 Hz
 AQ 0.5505524 sec
 RG 812
 DM 16.800 usec
 DE 6.50 usec
 TE 298.0 K
 D1 2.0000000 sec
 D11 0.0300000 sec
 TDO 1

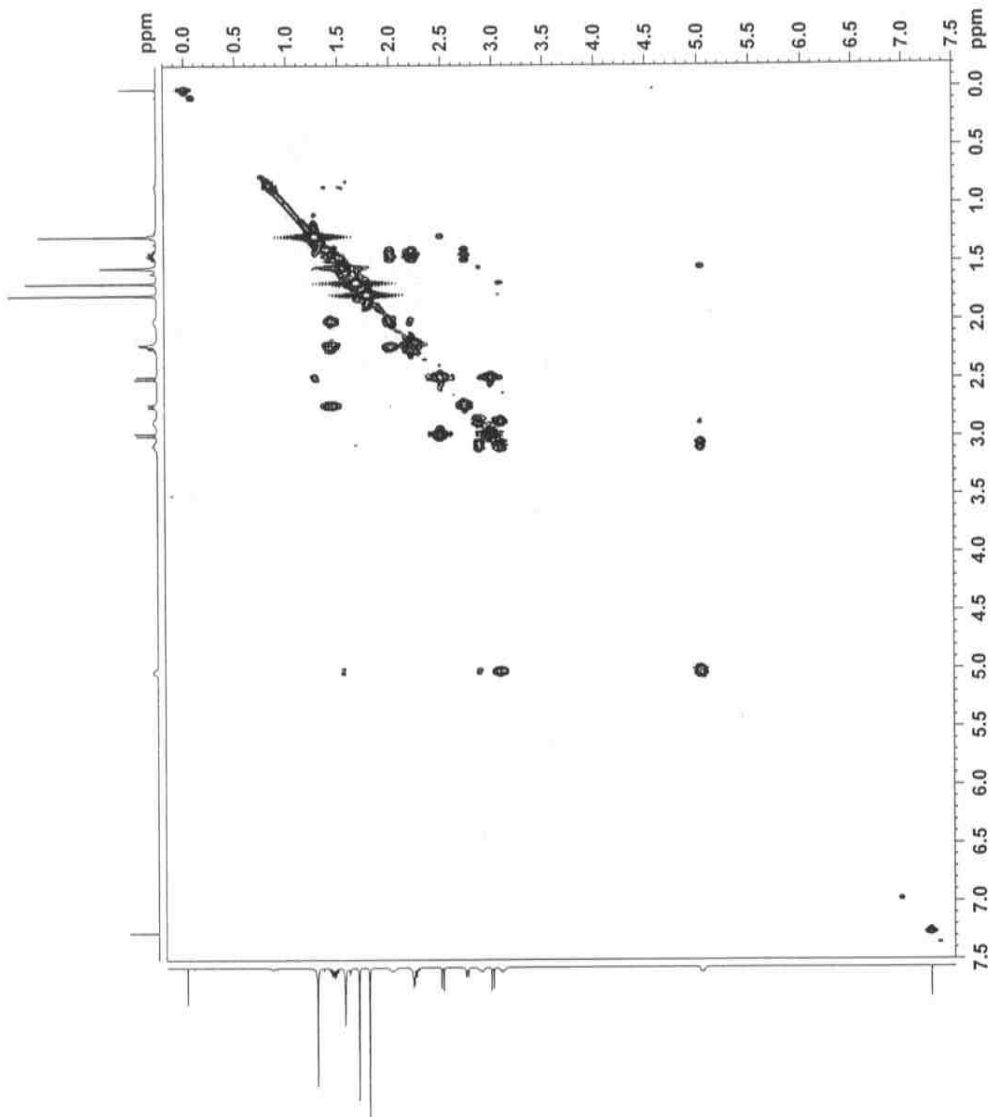
===== CHANNEL f1 =====
 NUC1 ¹³C
 P1 11.30 usec
 PL1 3.00 dB
 PL1W 32.2284892 W
 SFO1 125.8043140 MHz

===== CHANNEL f2 =====
 CPDPRG2 waltz16
 NUC2 1H
 P2 80.00 usec
 PCPD2 1.20 dB
 PL2 18.40 dB
 PL3 18.40 dB
 PL3W 20.76952171 W
 PL4W 0.39575211 W
 PL3W 32.2284892 W
 SFO2 500.13618370 MHz
 SF 52768
 WDW EM
 SSB 0
 LA 1.50 Hz
 GB 0
 PC 1.40

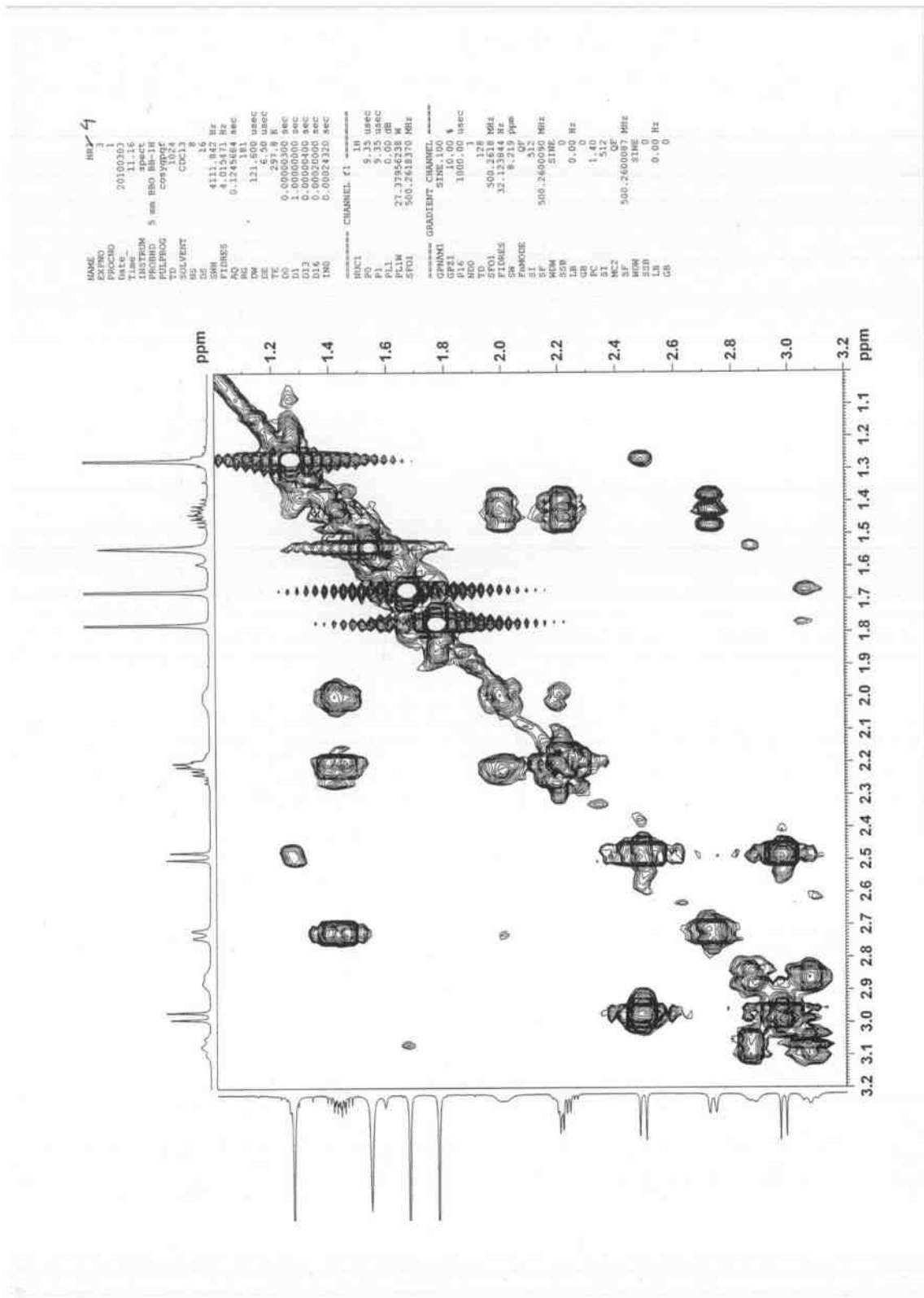


Prilog 2. ¹³C NMR spektar germakron-1,10-epoksida (2-1)

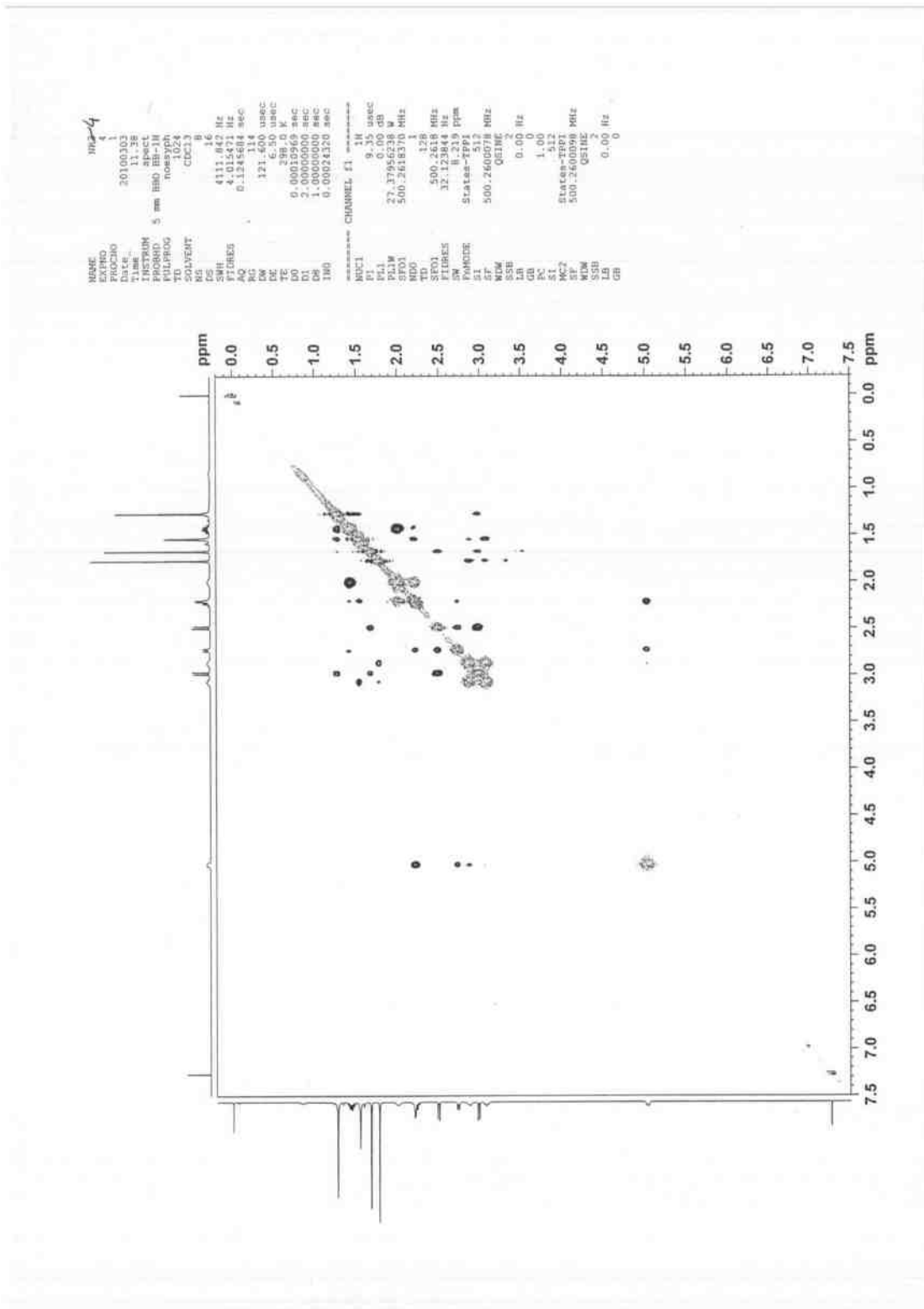
NAME **MB-4**
 EXPNO 3
 PROCNO 1
 Date_ 20100303
 Time 11.16
 PROBRM 1H
 PRNHD 5
 PULPROG 5
 TD 1024
 SOLVENT CDCl₃
 NS 16
 DS 16
 SWH 4111.842 Hz
 FIDRES 4.015471 Hz
 AQ 0.124584 sec
 RG 600
 RW 121.600 usec
 DE 6.50 usec
 TE 297.8 K
 D0 0.000000 sec
 D1 0.000000 sec
 D16 0.000000 sec
 D18 0.00220000 sec
 INO 0.0024370 sec
 ===== CHANNEL f1 =====
 NUC1 ¹H
 P1 9.35 usec
 PL 5.35 usec
 PL1 0.00 dB
 PL1W 27.37956238 W
 SFO1 500.2618370 MHz
 ===== CHANNEL f2 =====
 GFMNH1 SINE.100
 GP21 10.00 μs
 N16 1000.00 usec
 TD 128
 SFO1 500.2618 MHz
 FIDRES 32.123844 Hz
 SN 5.702 PPM
 SI 512
 SF 500.2600090 MHz
 SFO SINE
 WTM 0 Hz
 SSB 0 Hz
 GB 0 Hz
 PC 1.40
 SI 512
 MC2 OF
 SF 500.2600090 MHz
 SSB SINE
 LB 0 Hz
 GB 0



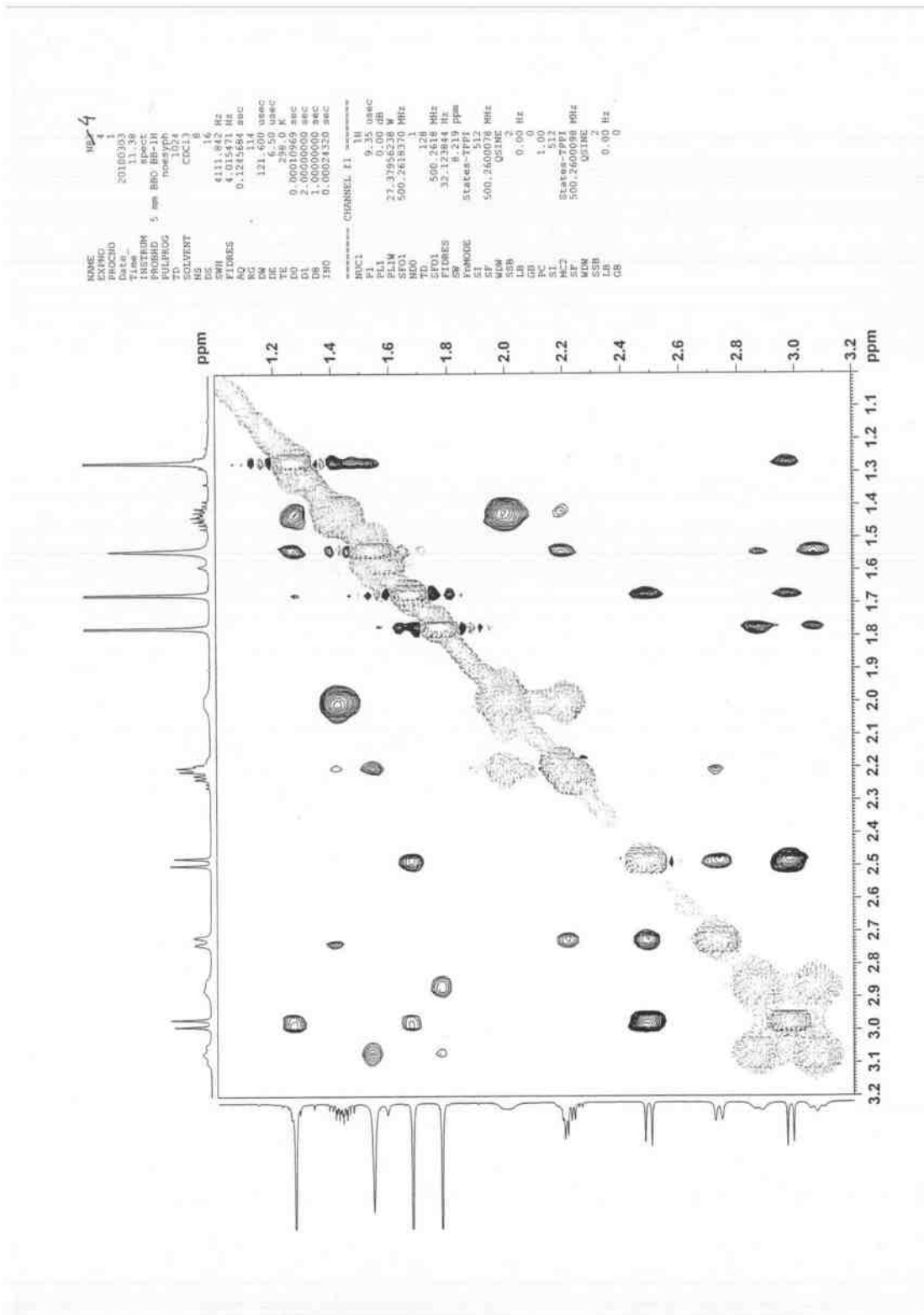
Prilog 3. ¹H-¹H COSY spektar germakron-1,10-epoksida (2-1)



Prilog 4. Uvećanje ^1H - ^1H COSY spektra germakron-1,10-epoksida (2-1)

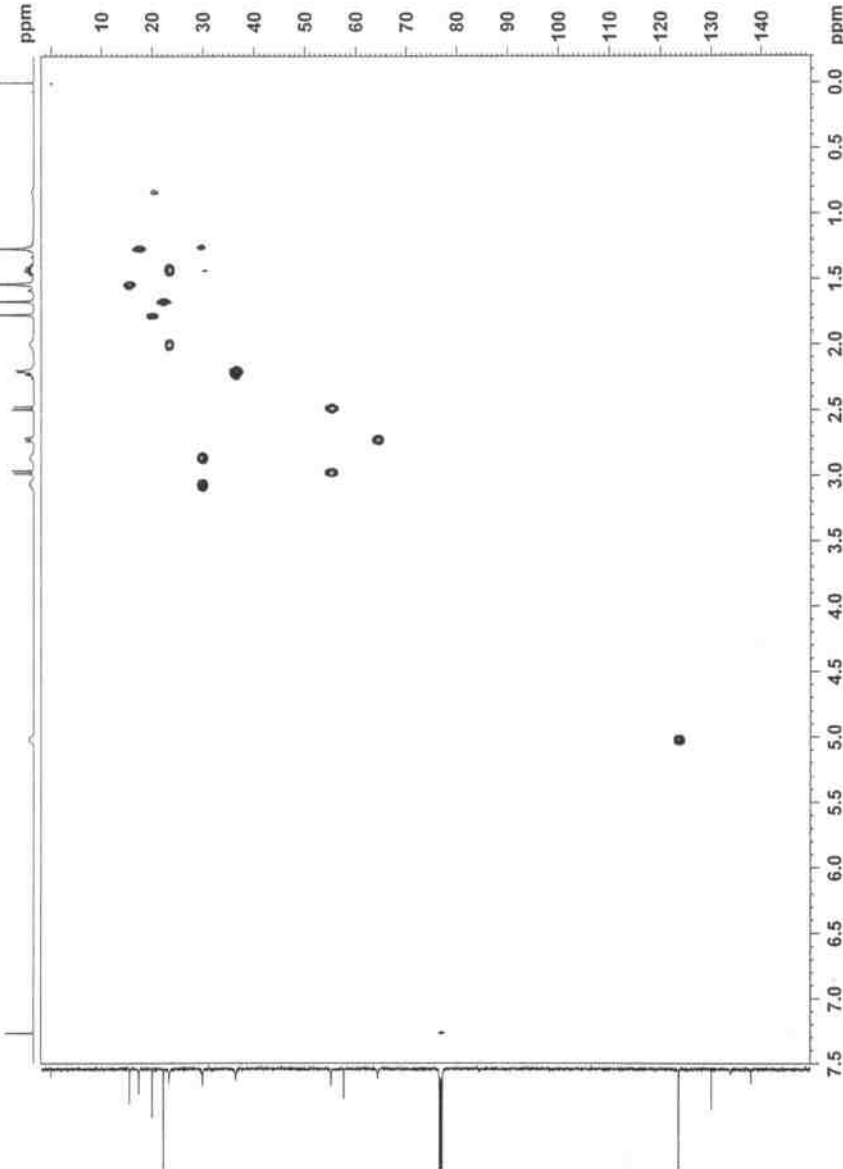


Prilog 5. NOESY spektar germakron-1,10-epoksida (2-1)

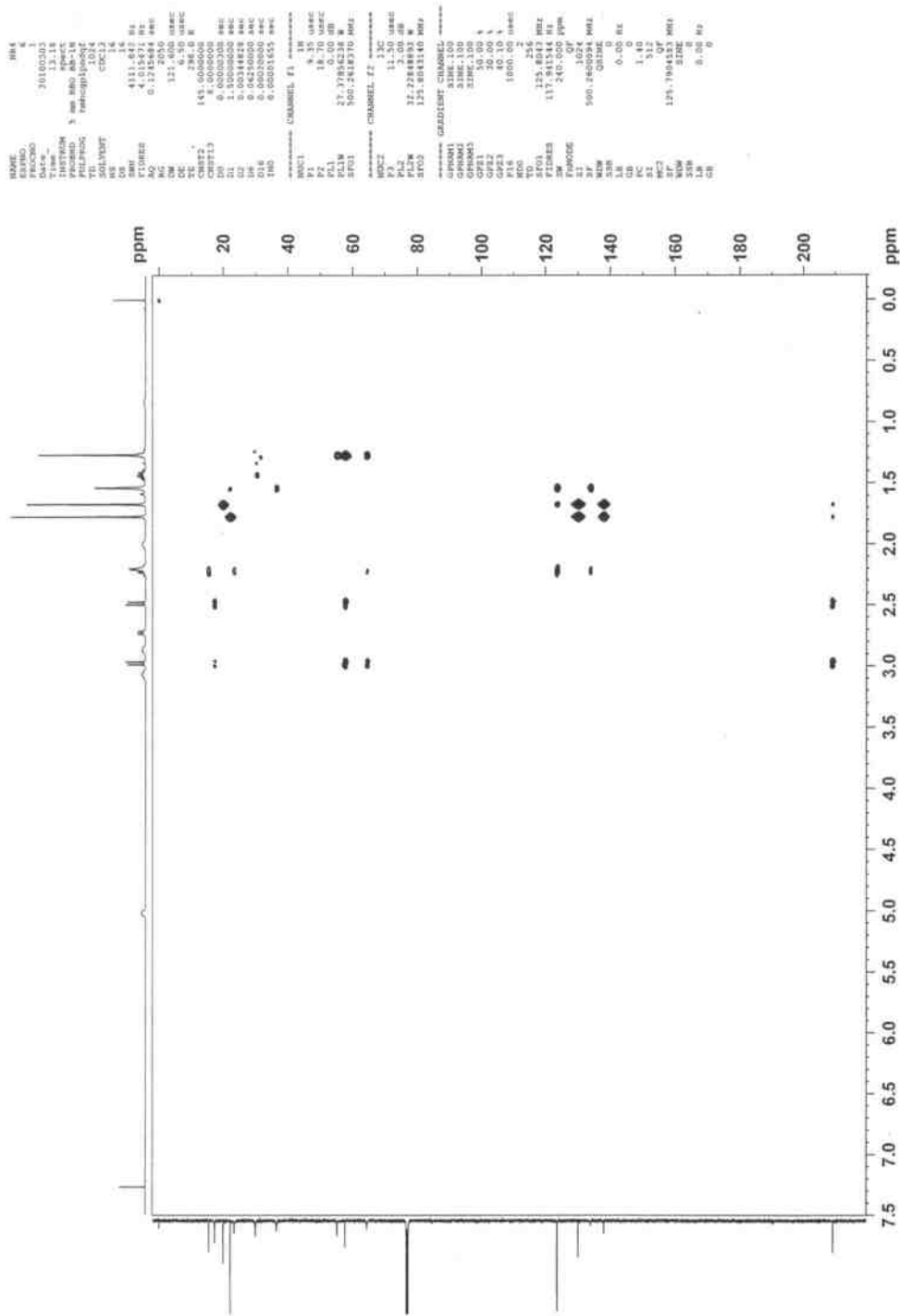


Prilog 6. Uvećanje NOESY spektra germakron-1,10-epoksida (2-1)

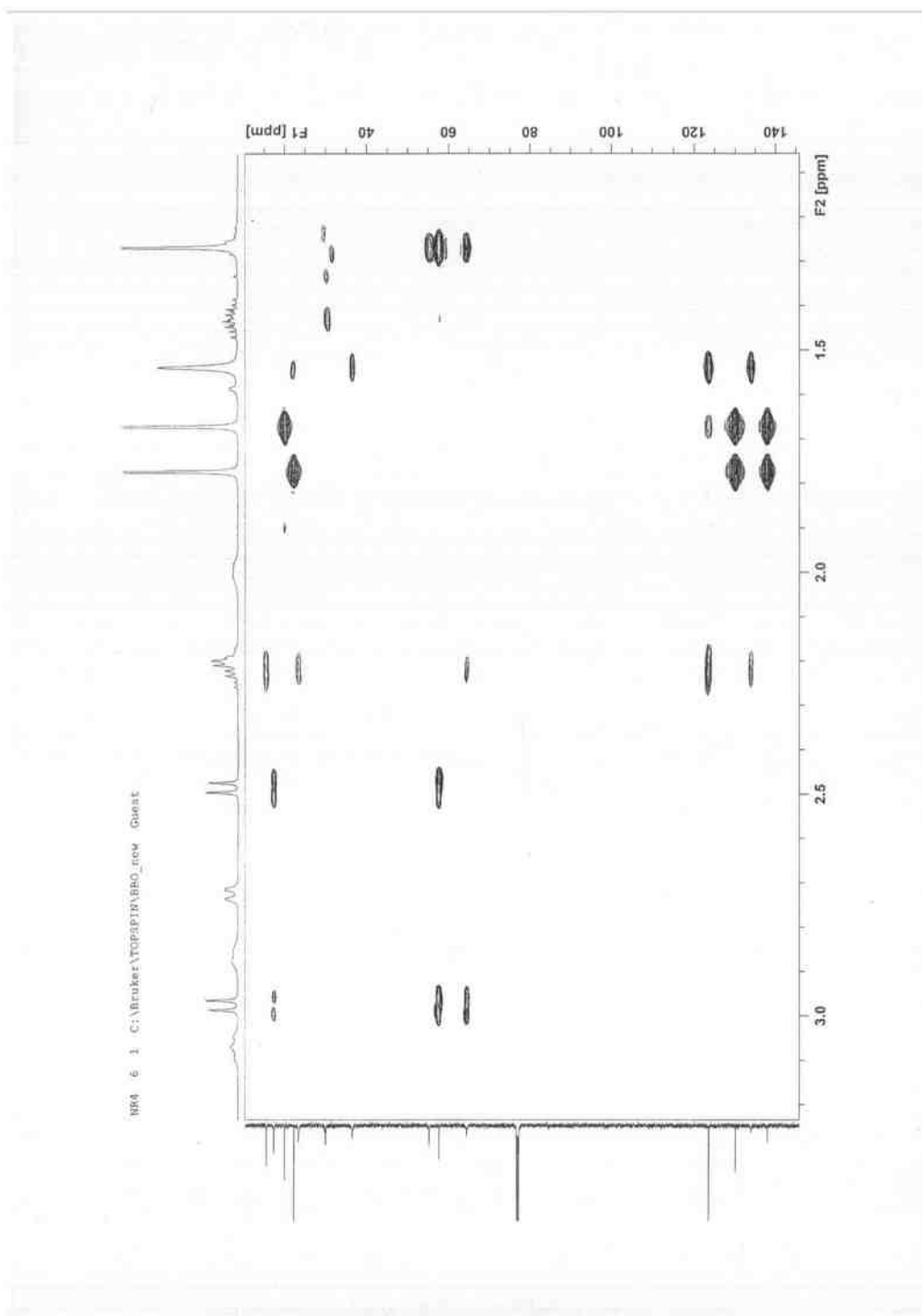
NAME: HEP 5
 EXPNO: 1
 F2 - F1: 241.020551
 Time: 12.39
 INSTRUM: spect
 PULPROG: zgpg30
 PRGNAME: HsQCet322
 F2: 107.9
 F1: 51.5
 ACQUIS: 2
 DS: 4
 SWH: 4111.846 Hz
 FIDRES: 0.1345688 Hz
 AQ: 4.2118473 Hz
 SFO: 121.600 MHz
 XCNTY: 4.50 MHz
 F2: 1875.8260000 MHz
 F1: 0.00003700 MHz
 D1: 0.0012144 sec
 D2: 0.0012144 sec
 D3: 0.0012144 sec
 D4: 0.0012144 sec
 D5: 0.0012144 sec
 D6: 0.0012144 sec
 D7: 0.0012144 sec
 D8: 0.0012144 sec
 D9: 0.0012144 sec
 D10: 0.0012144 sec
 D11: 0.0012144 sec
 D12: 0.0012144 sec
 D13: 0.0012144 sec
 D14: 0.0012144 sec
 D15: 0.0012144 sec
 D16: 0.0012144 sec
 D17: 0.0012144 sec
 D18: 0.0012144 sec
 D19: 0.0012144 sec
 D20: 0.0012144 sec
 D21: 0.0012144 sec
 D22: 0.0012144 sec
 D23: 0.0012144 sec
 D24: 0.0012144 sec
 D25: 0.0012144 sec
 D26: 0.0012144 sec
 D27: 0.0012144 sec
 D28: 0.0012144 sec
 D29: 0.0012144 sec
 D30: 0.0012144 sec
 D31: 0.0012144 sec
 D32: 0.0012144 sec
 D33: 0.0012144 sec
 D34: 0.0012144 sec
 D35: 0.0012144 sec
 D36: 0.0012144 sec
 D37: 0.0012144 sec
 D38: 0.0012144 sec
 D39: 0.0012144 sec
 D40: 0.0012144 sec



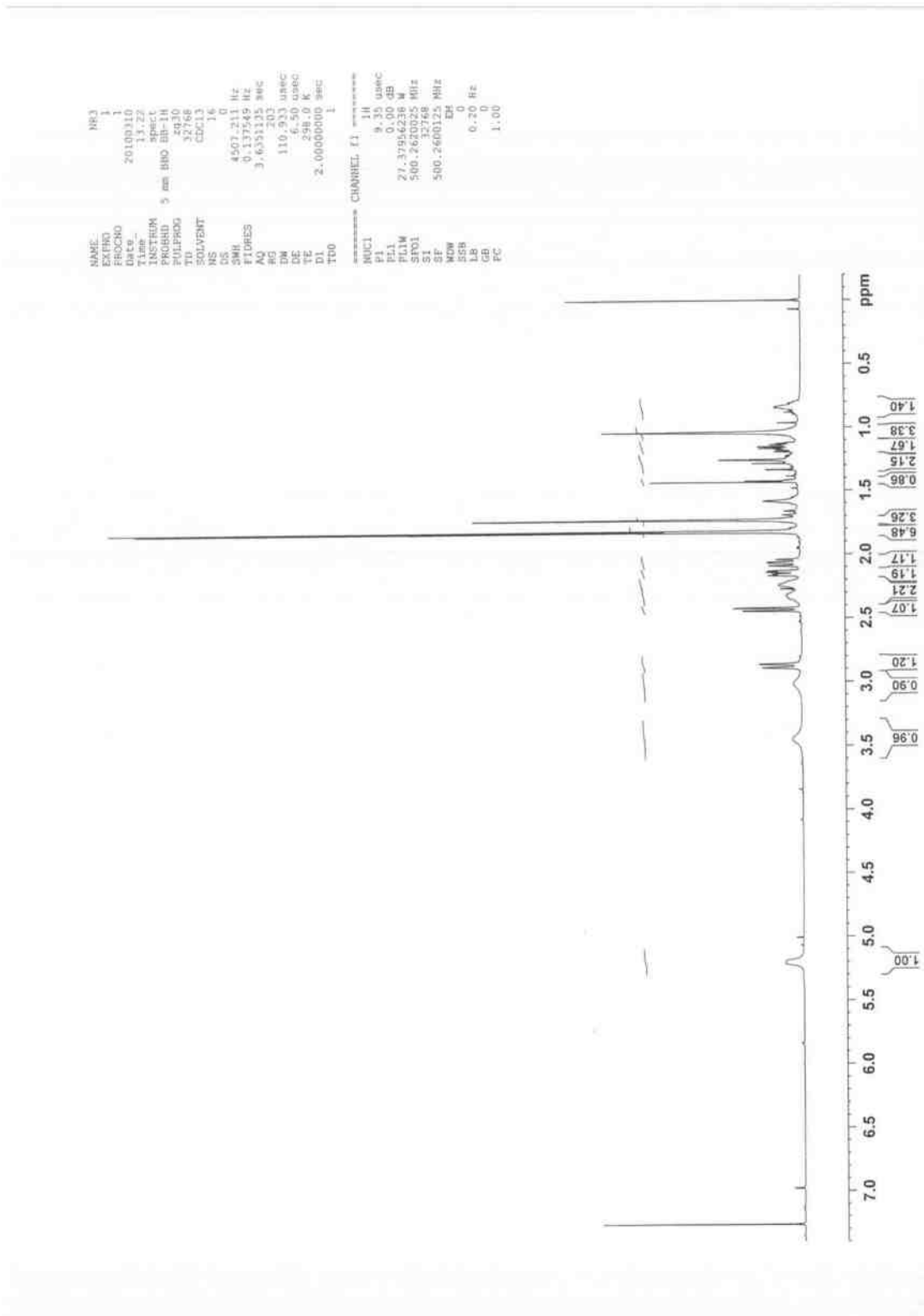
Prilog 7. HSQC spektar germakron-1,10-epoksida (2-1)



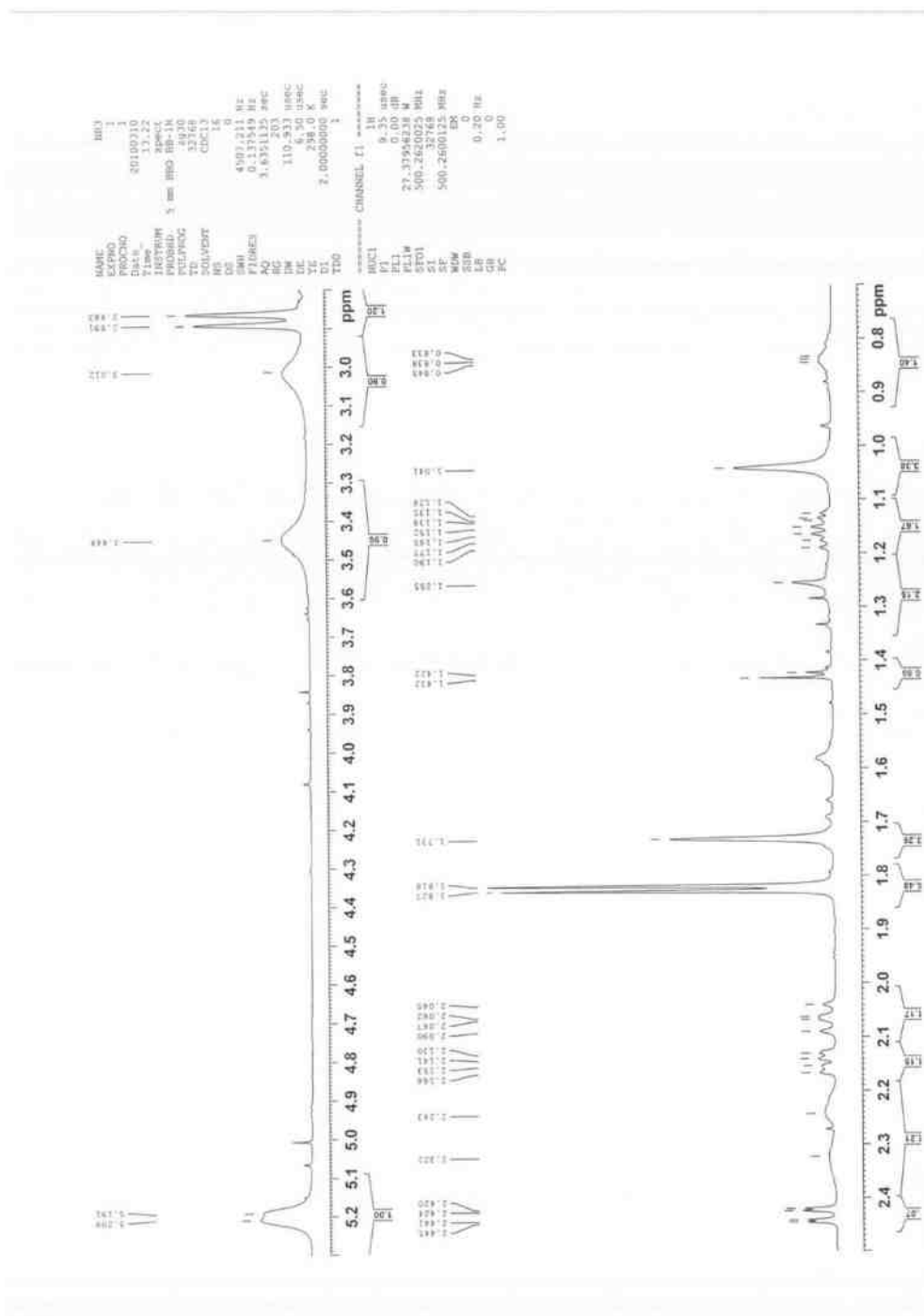
Prilog 8. HMBC spektar germakron-1,10-epoksida (2-1)



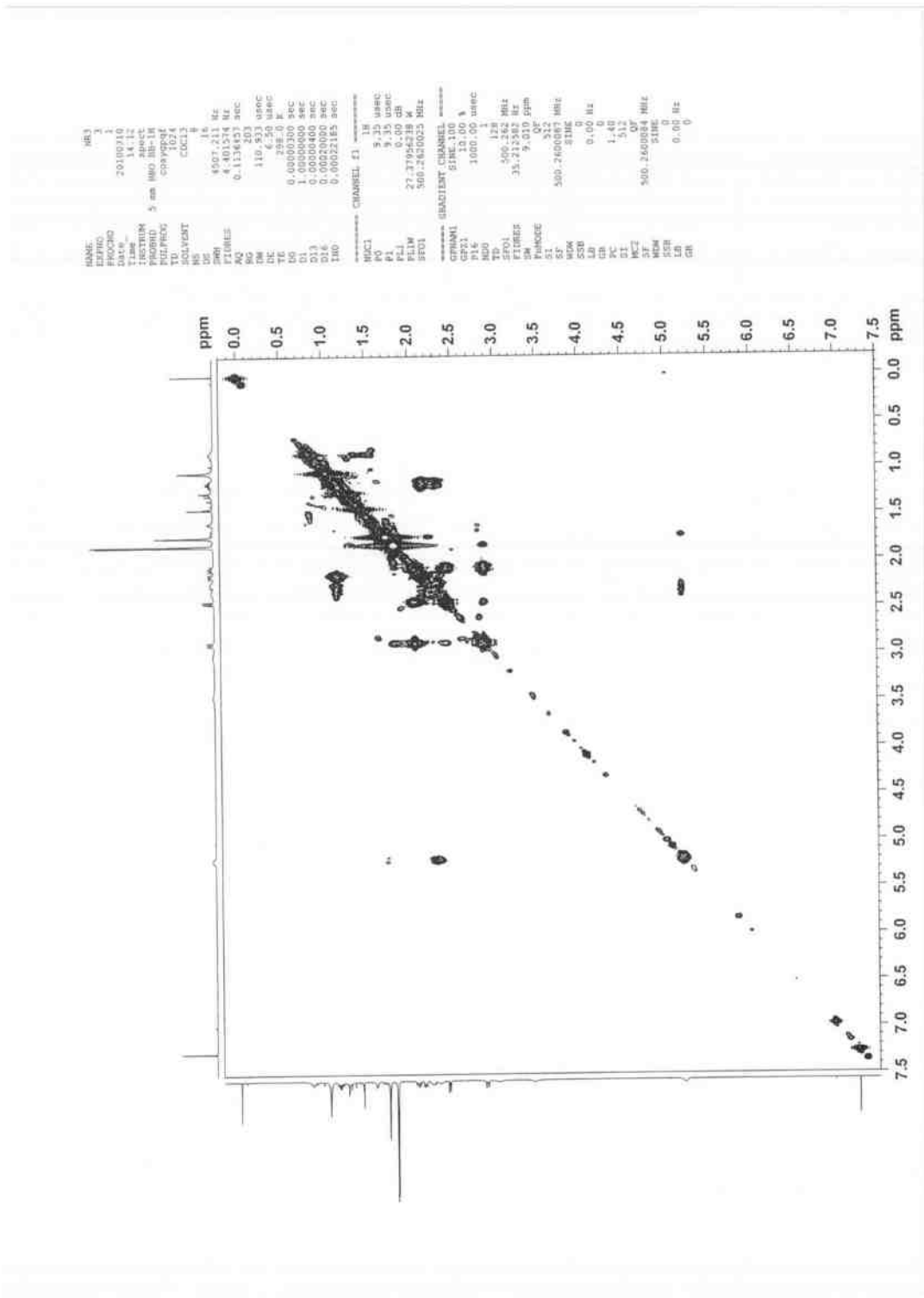
Prilog 9. Uvećanje HMBC spektra germakron-1,10-epoksida (2-1)



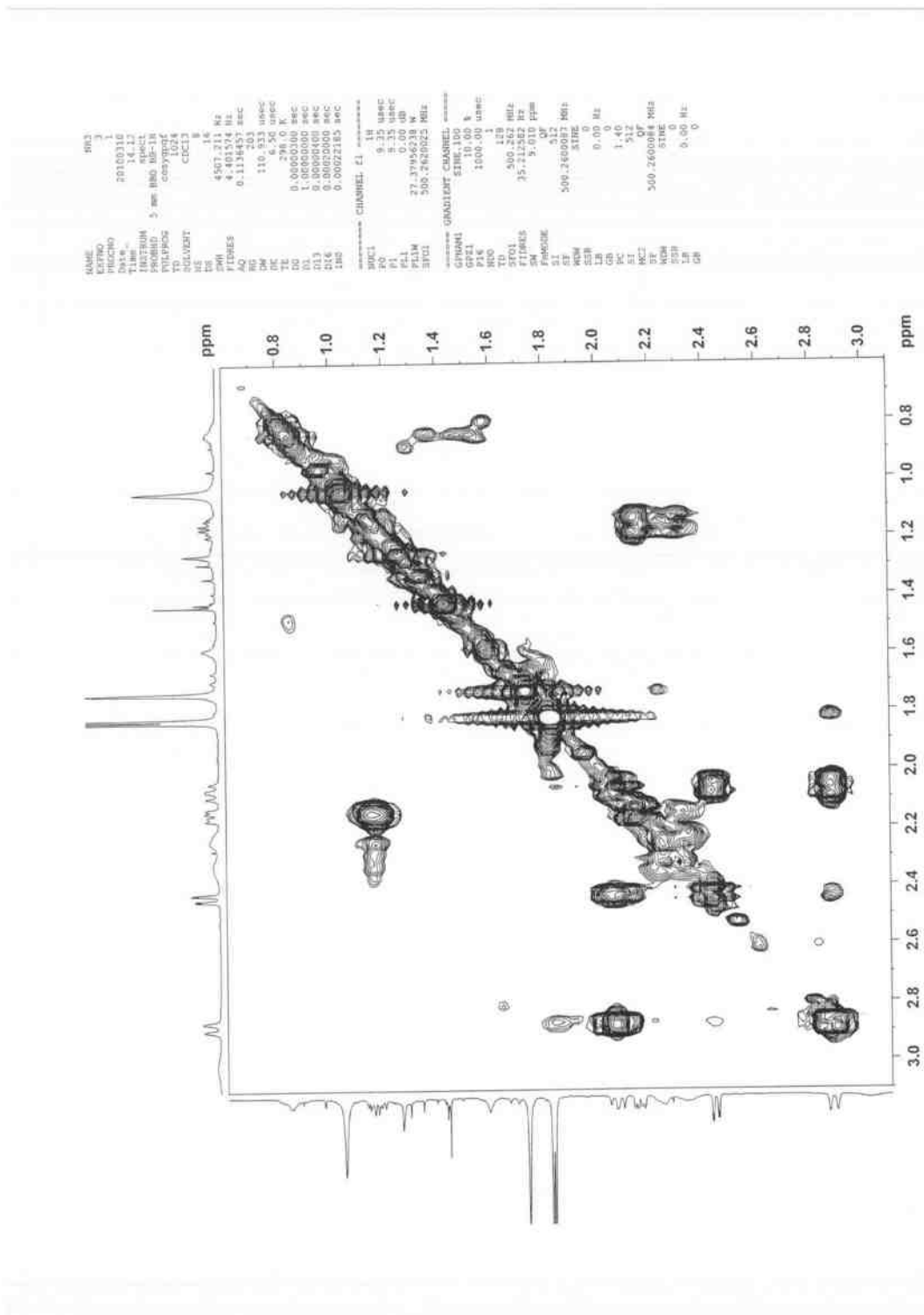
Prilog 10. ¹H NMR spektar germakron-4,5-epoksida (2-2)



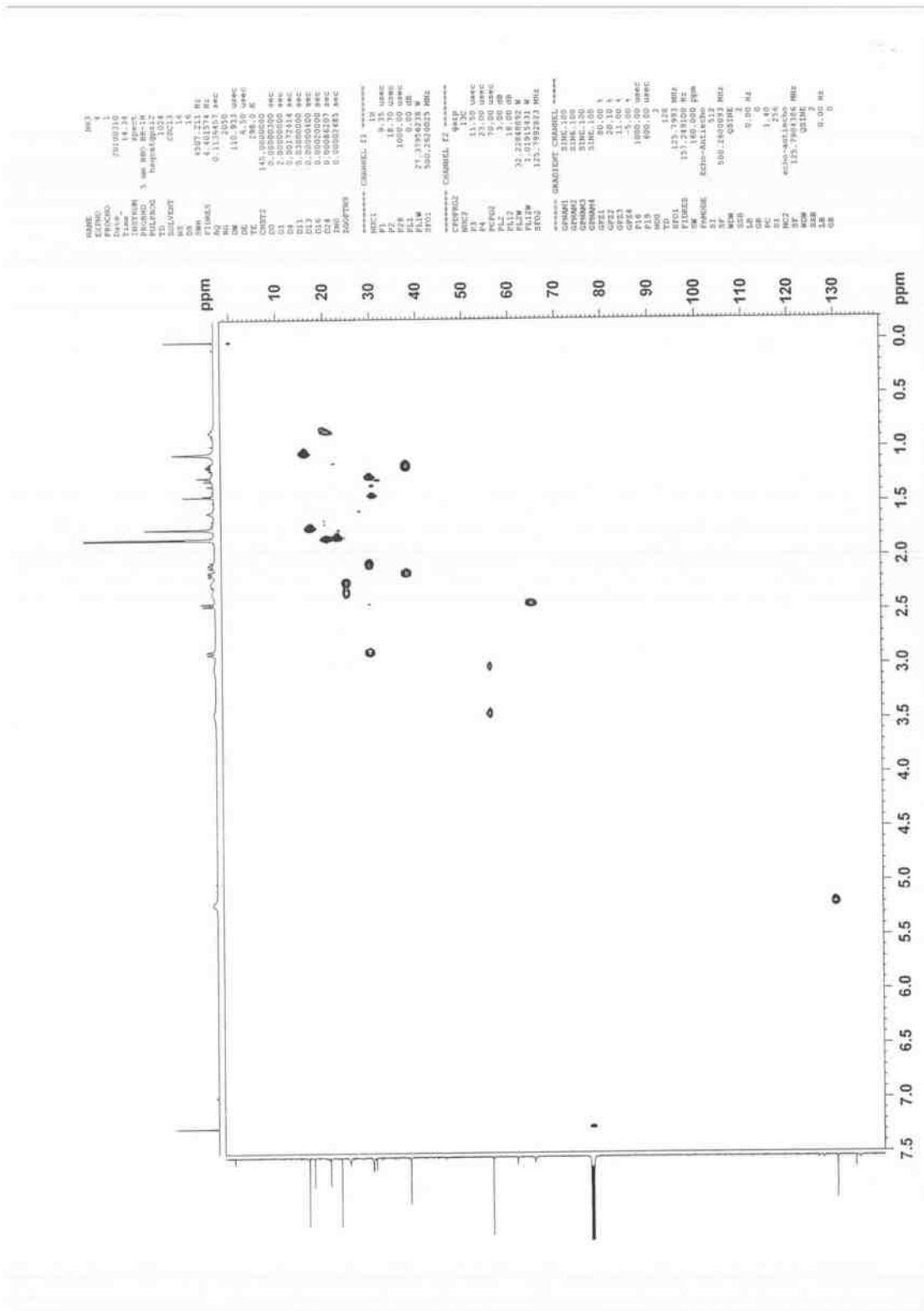
Prilog 11. Delovi ¹H NMR spektra germakron-4,5-epoksida (2-2)



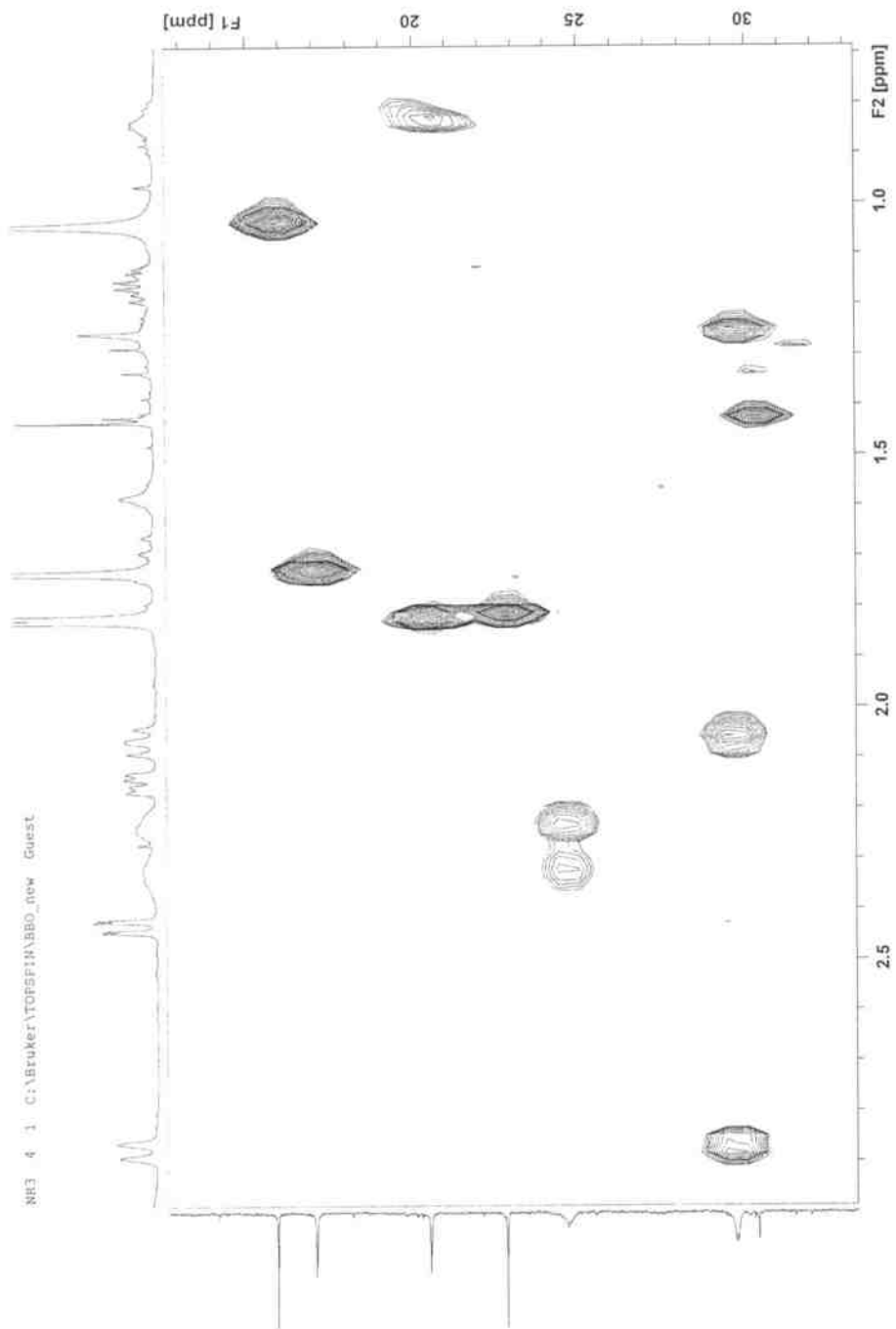
Prilog 12. ¹H-¹H COSY spektar germakron-4,5-epoksida (2-2)



Prilog 13. Uvećanje ^1H - ^1H COSY spektra germakron-4,5-epoksida (2-2)



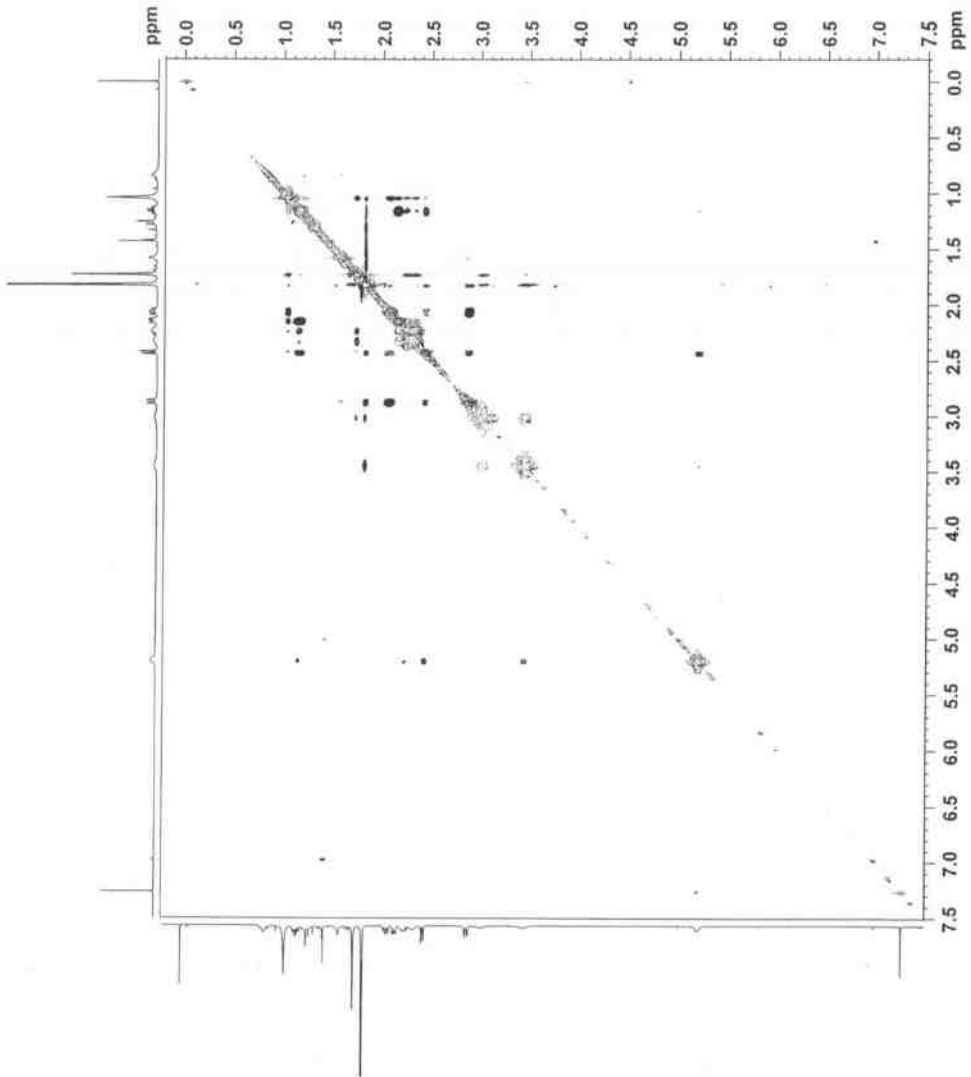
Prilog 14. HSQC spektar germakron-4,5-epoksida (2-2)



Prilog 15. Uvećanje HSQC spektra germakron-4,5-epoksida (2-2)

NAME: MFL3
 EXPNO: 5
 PROCNO: 1
 Date_ : 20100311
 Time: 15:50
 INSTRUM: spect
 PROBHD: 5 mm BB0-1H
 PULPROG: zgpg30
 SOLVENT: CDCl3
 NS: 16
 DS: 16
 SWH: 4500.211 Hz
 F2: 500.136195 MHz
 AQ: 0.252411 sec
 RG: 1118
 DW: 110.933 usec
 DE: 6.50 usec
 TE: 300.2 K
 D1: 0.0000000 sec
 D11: 2.0000000 sec
 D18: 1.0000000 sec
 ZNO: 0.0002185 sec

===== CHANNEL f1 =====
 NUCL1: 1H
 P1: 9.35 usec
 PL1: 0.00 dB
 PL12: 27.37956238 W
 PL13: 0.00 dB
 NUQ: 500.2650021 MHz
 TD: 256
 SF01: 500.262 MHz
 FIDRES: 17.606391 Hz
 SFO2: 500.136195 MHz
 F2RES: 0.0000000 Hz
 P2: 1024
 P3: 1024
 P4: 1024
 SF: 500.2600109 MHz
 Q1: 0.00 Hz
 Q2: 0.00 Hz
 Q3: 0.00 Hz
 Q4: 1.00 Hz
 SI: 1024
 ST: 1024
 SFO3: 500.2600109 MHz
 SFO4: 500.2600109 MHz
 SSB: 0.00 Hz
 LB: 0.00 Hz
 GB: 0
 PC: 1.00
 ST2: 1024
 ST3: 1024
 MCH: 500.2600109 MHz
 ZSB: 0.00 Hz
 LB: 0.00 Hz
 GB: 0

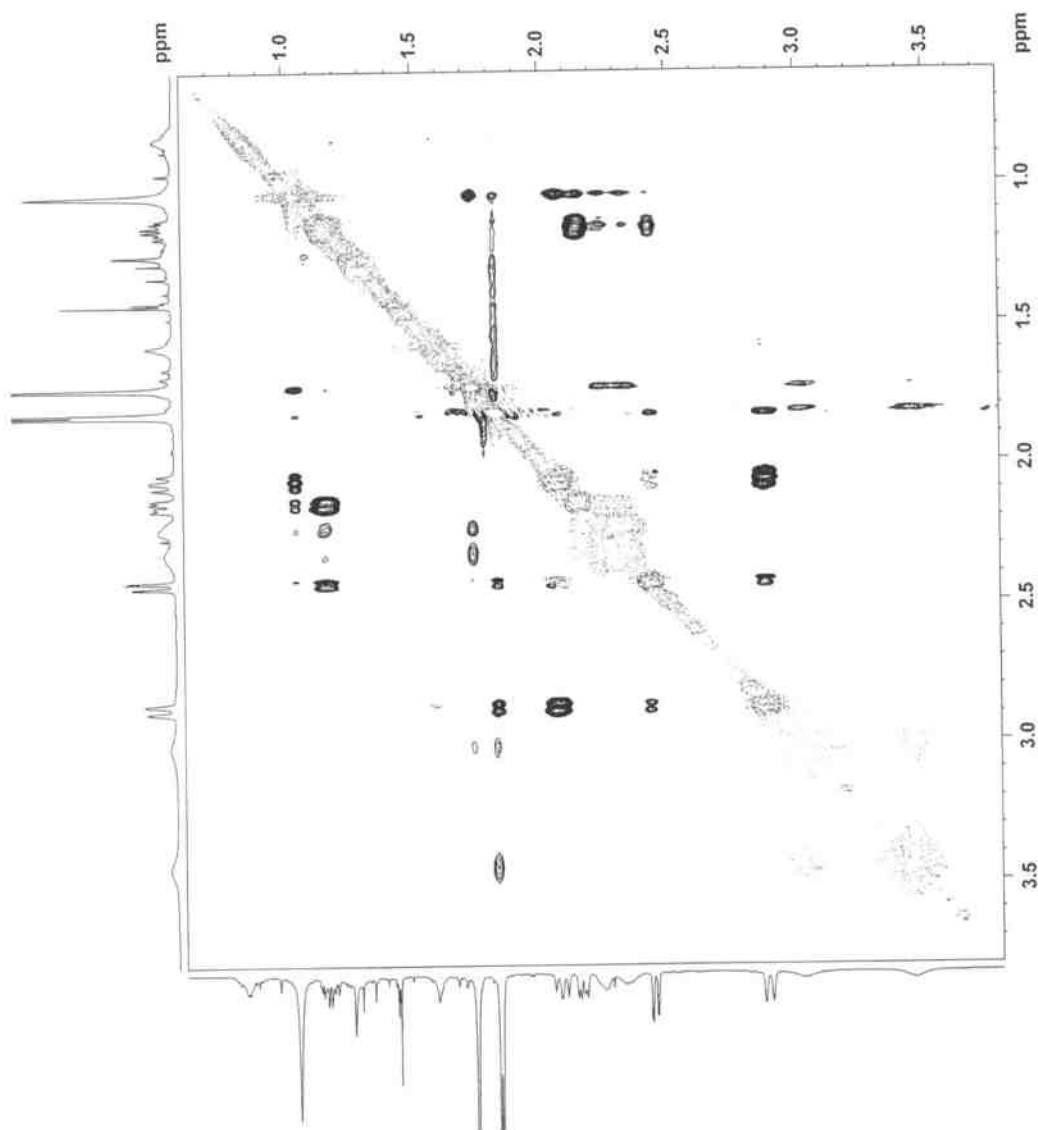


Prilog 16. NOESY spektar germakron-4,5-epoksida (2-2)

```

NAME          N03
EXPNO         5
PROCNO        1
Date_         20100210
Time          15.20
INSTRUM       5 mm BBO BEYER
PULPROG       zgpg30
TD            65536
SOLVENT       CDCl3
NS            16
DS            16
SWH           4500.214 Hz
FIDRES        0.7272415 sec
AQ            134
RG            110.933 usec
DE            110.933 usec
TE            298.0 K
DO            0.0009803 sec
D1            1.0000000 sec
D2            1.0000000 sec
D3            1.0000000 sec
TH0           0.00022185 sec
***** CHANNEL f1 *****
NUC1          1H
P1            9.35 usec
PL1           0.00 dB
PL12          23.3766298 MHz
PL13          500.1620023 MHz
PC            256
SFO1          500.262 MHz
FTRES         17.606291 Hz
SFO2          5.010 PPM
States-TPP1   0.0000000 sec
SFO3          500.26200109 MHz
AQ2           0.0310000 sec
WDW           COSYMC
SSB           2
LB            0.00 Hz
GB            0
PC            1.00
SI            164
SF2           500.26200108 MHz
SF3           500.26200108 MHz
WFM           COSYMC
SSB           2
LA            0
GB            0

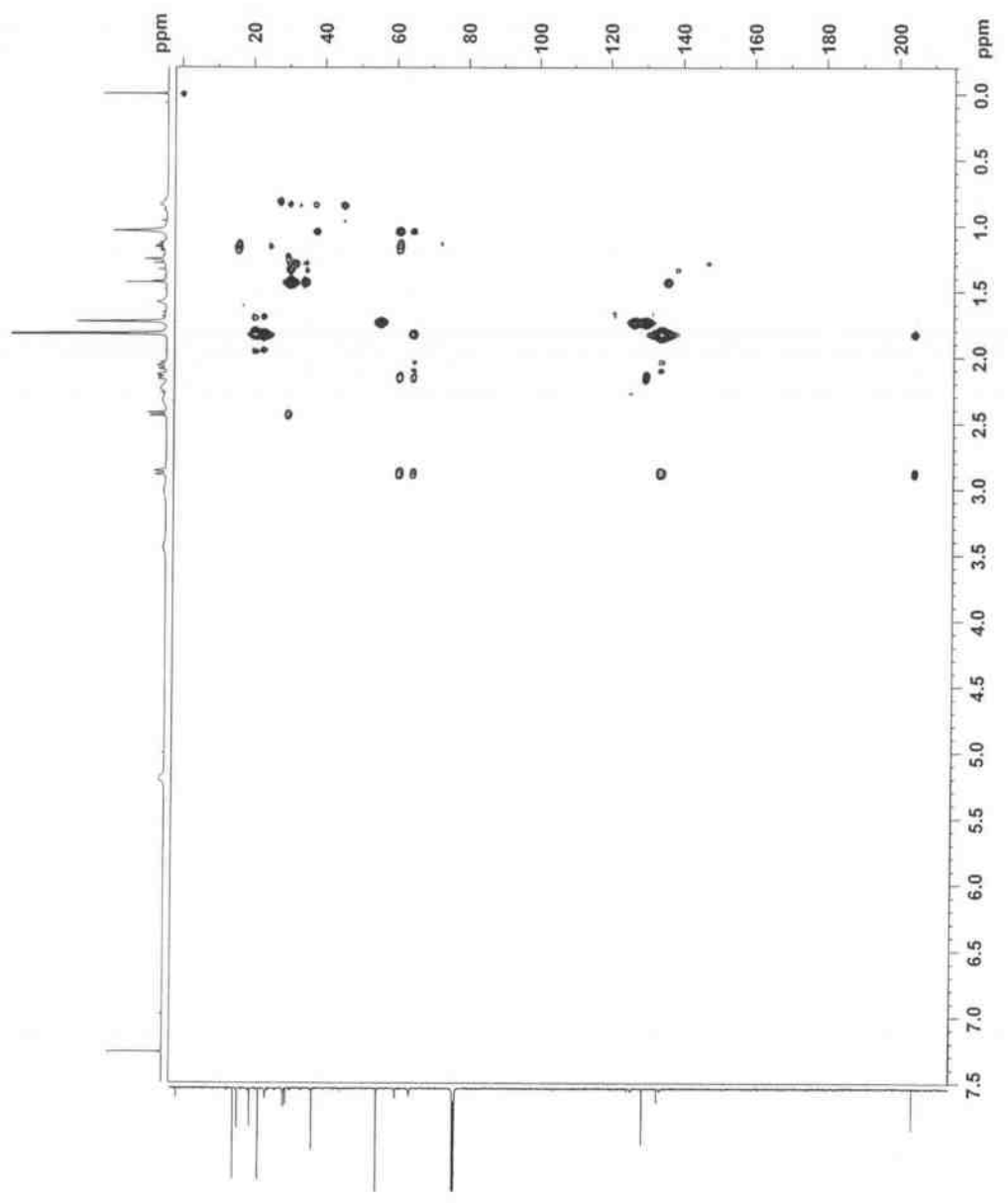
```



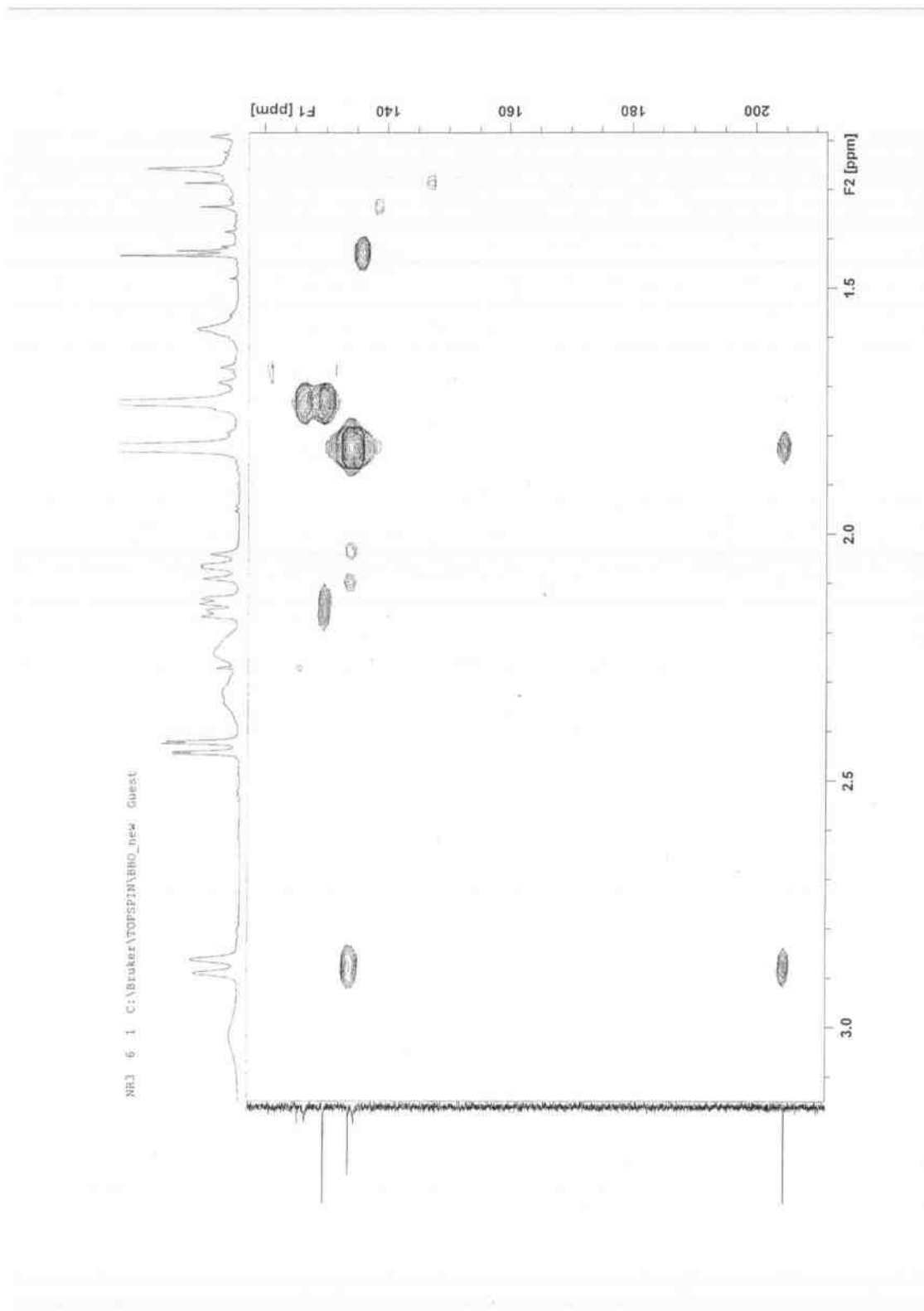
Prilog 17. Uvećanje NOESY spektra germakron-4,5-epoksida (2-2)

2-3 / 4

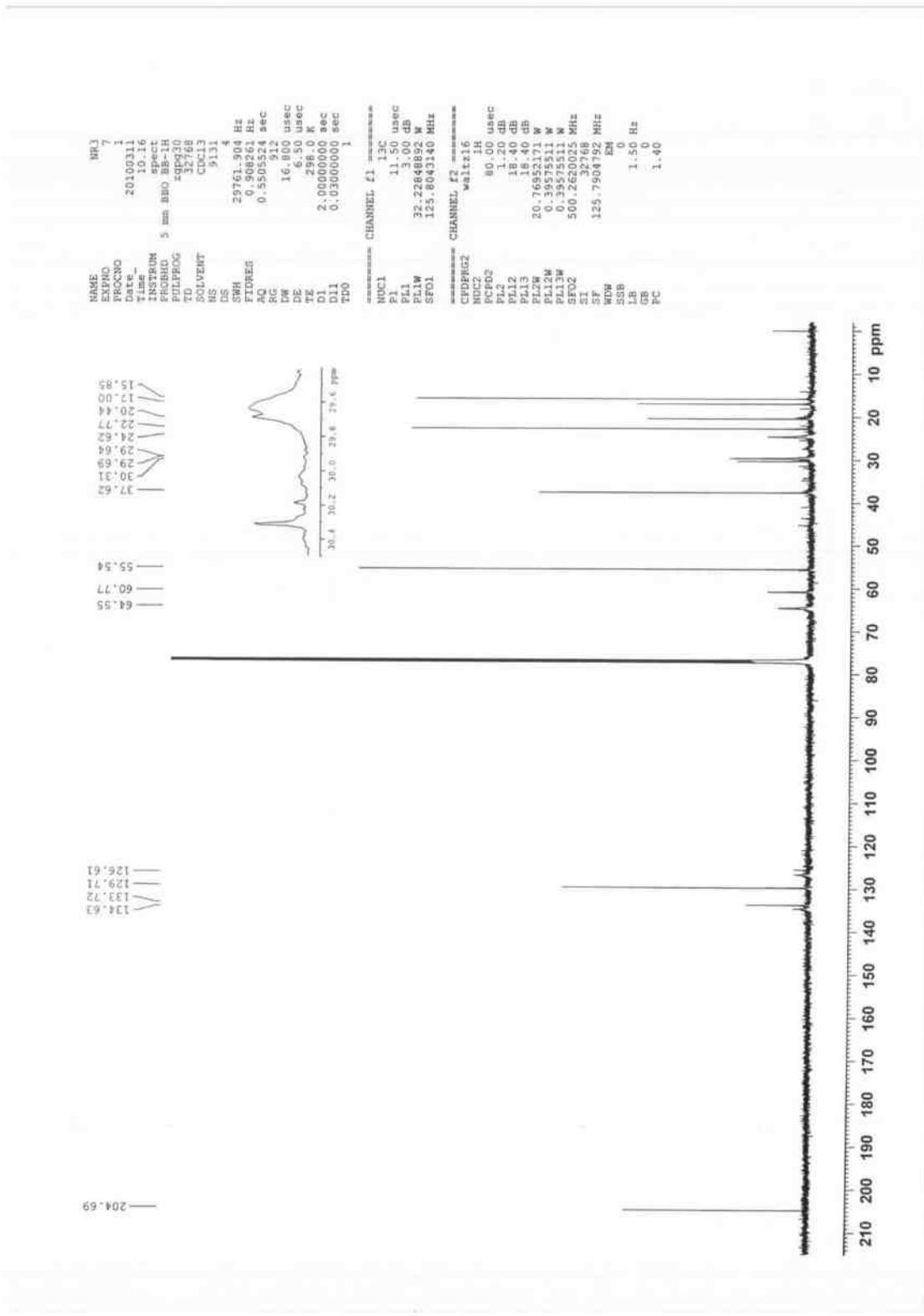
NAME: HR3
EXPNO: 8
PROCNO: 1
Date_0: 20100310
Time: 19:34
PROBHD: 5 mm BBO BB-1H
PULPROG: zgpg30
SOLVENT: DMSO-d6
DE: 64
TE: 300.2 K
F2: 4807.211 MHz
F1: 200.131 MHz
AQ: 0.22500000 sec
RG: 1024
AQ2: 110.933 usec
TE2: 300.2 K
F2: 145.0000000 MHz
F1: 0.0000000 MHz
CHUET1: 8.0000000 sec
G1: 1.500000000 sec
G2: 0.000000000 sec
G3: 0.000000000 sec
G4: 0.000000000 sec
G5: 0.000000000 sec
G6: 0.000000000 sec
G7: 0.000000000 sec
G8: 0.000000000 sec
G9: 0.000000000 sec
G10: 0.000000000 sec
G11: 0.000000000 sec
G12: 0.000000000 sec
G13: 0.000000000 sec
G14: 0.000000000 sec
G15: 0.000000000 sec
G16: 0.000000000 sec
G17: 0.000000000 sec
G18: 0.000000000 sec
G19: 0.000000000 sec
G20: 0.000000000 sec
G21: 0.000000000 sec
G22: 0.000000000 sec
G23: 0.000000000 sec
G24: 0.000000000 sec
G25: 0.000000000 sec
G26: 0.000000000 sec
G27: 0.000000000 sec
G28: 0.000000000 sec
G29: 0.000000000 sec
G30: 0.000000000 sec
G31: 0.000000000 sec
G32: 0.000000000 sec
G33: 0.000000000 sec
G34: 0.000000000 sec
G35: 0.000000000 sec
G36: 0.000000000 sec
G37: 0.000000000 sec
G38: 0.000000000 sec
G39: 0.000000000 sec
G40: 0.000000000 sec
G41: 0.000000000 sec
G42: 0.000000000 sec
G43: 0.000000000 sec
G44: 0.000000000 sec
G45: 0.000000000 sec
G46: 0.000000000 sec
G47: 0.000000000 sec
G48: 0.000000000 sec
G49: 0.000000000 sec
G50: 0.000000000 sec
G51: 0.000000000 sec
G52: 0.000000000 sec
G53: 0.000000000 sec
G54: 0.000000000 sec
G55: 0.000000000 sec
G56: 0.000000000 sec
G57: 0.000000000 sec
G58: 0.000000000 sec
G59: 0.000000000 sec
G60: 0.000000000 sec
G61: 0.000000000 sec
G62: 0.000000000 sec
G63: 0.000000000 sec
G64: 0.000000000 sec
G65: 0.000000000 sec
G66: 0.000000000 sec
G67: 0.000000000 sec
G68: 0.000000000 sec
G69: 0.000000000 sec
G70: 0.000000000 sec
G71: 0.000000000 sec
G72: 0.000000000 sec
G73: 0.000000000 sec
G74: 0.000000000 sec
G75: 0.000000000 sec
G76: 0.000000000 sec
G77: 0.000000000 sec
G78: 0.000000000 sec
G79: 0.000000000 sec
G80: 0.000000000 sec
G81: 0.000000000 sec
G82: 0.000000000 sec
G83: 0.000000000 sec
G84: 0.000000000 sec
G85: 0.000000000 sec
G86: 0.000000000 sec
G87: 0.000000000 sec
G88: 0.000000000 sec
G89: 0.000000000 sec
G90: 0.000000000 sec
G91: 0.000000000 sec
G92: 0.000000000 sec
G93: 0.000000000 sec
G94: 0.000000000 sec
G95: 0.000000000 sec
G96: 0.000000000 sec
G97: 0.000000000 sec
G98: 0.000000000 sec
G99: 0.000000000 sec
G100: 0.000000000 sec



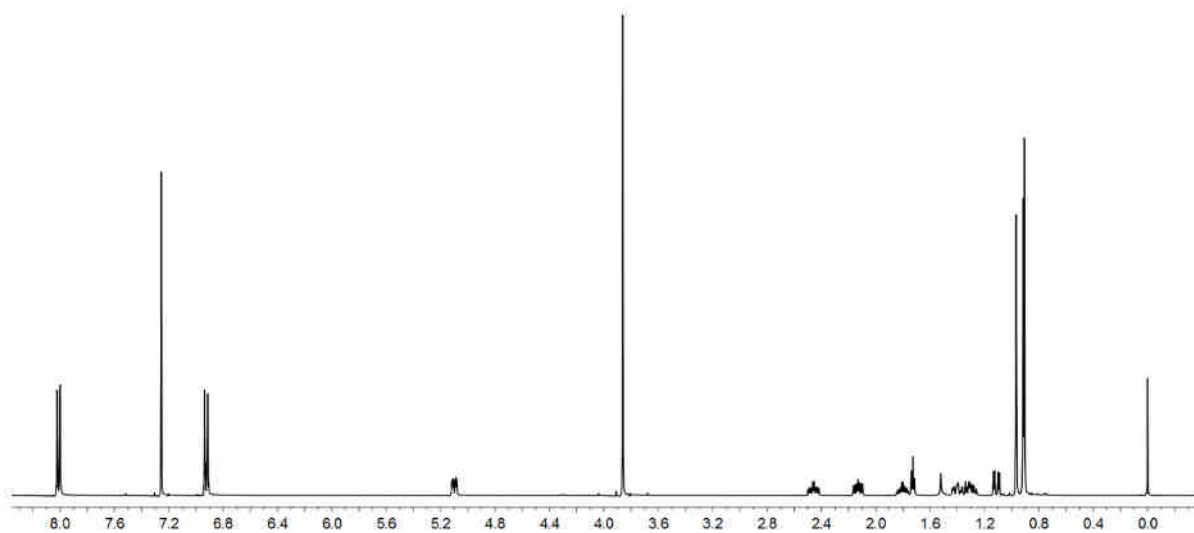
Prilog 18. HMBC spektar germakron-4,5-epoksida (2-2)



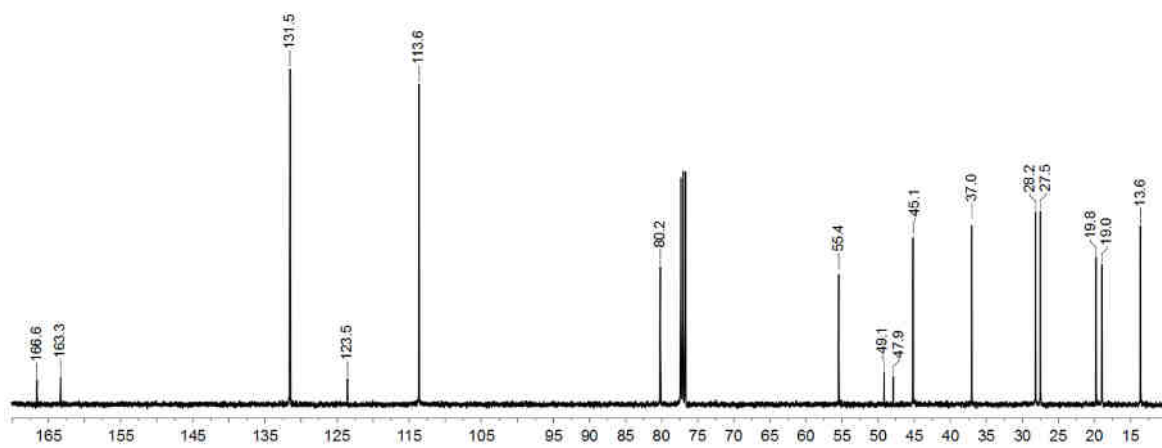
Prilog 19. Uvećanje HMBC spektar germakron-4,5-epoksida (2-2)



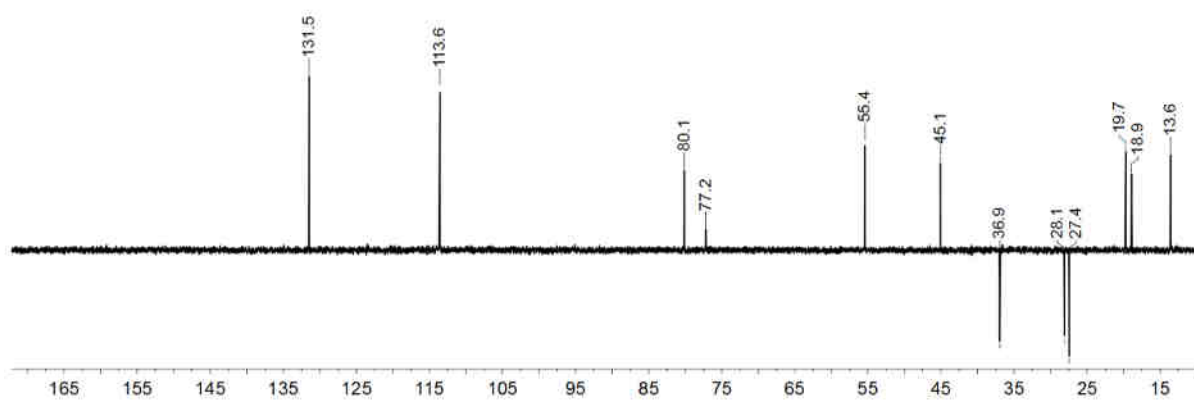
Prilog 20. ¹³C NMR spektar germakron-4,5-epoksida (2-2)



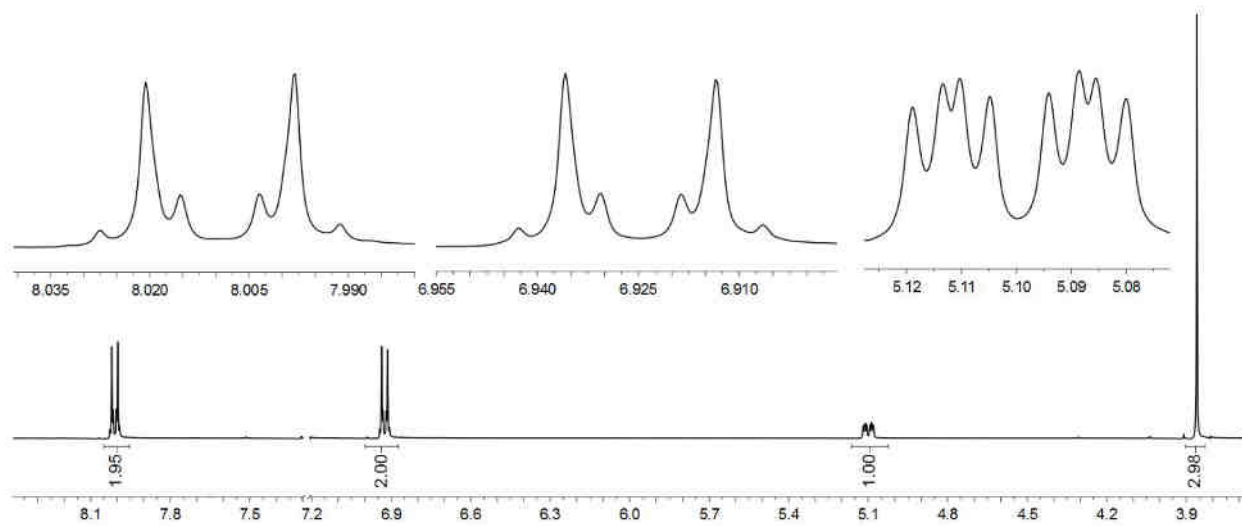
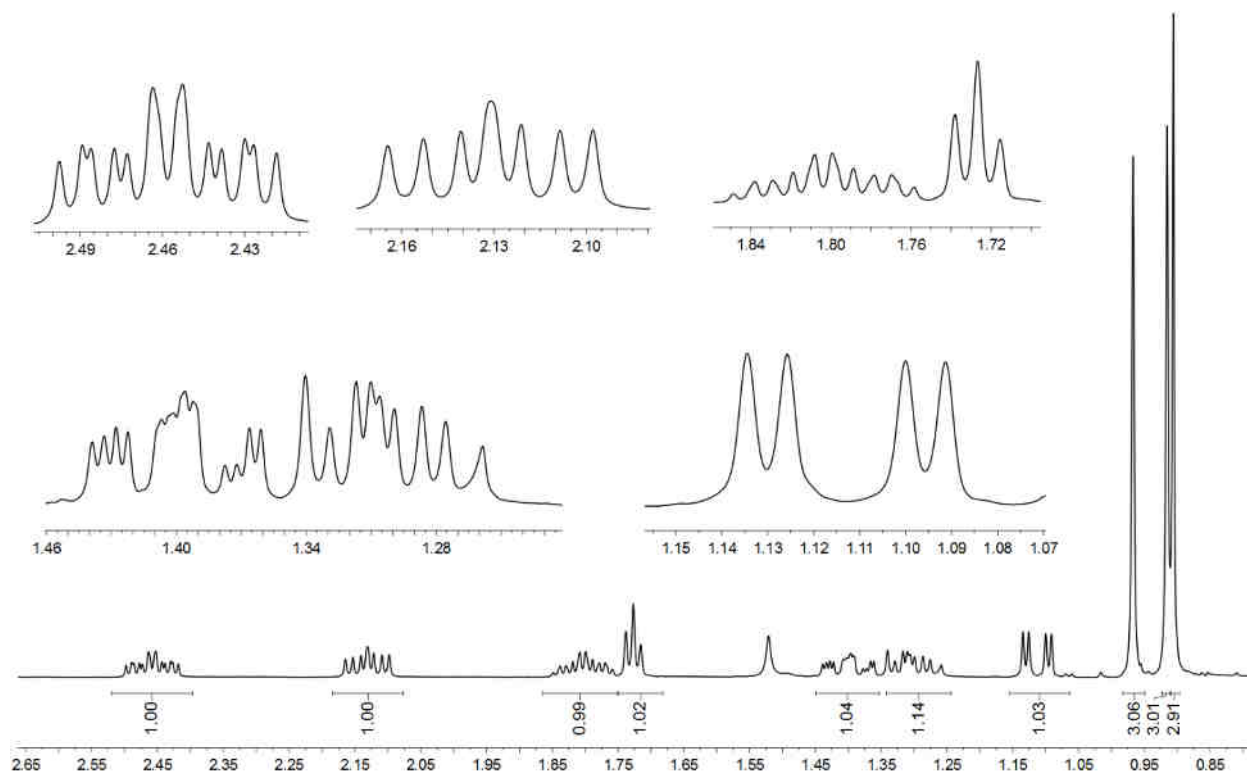
Prilog 21. ^1H NMR spektar bornil-4-metoksibenzoata



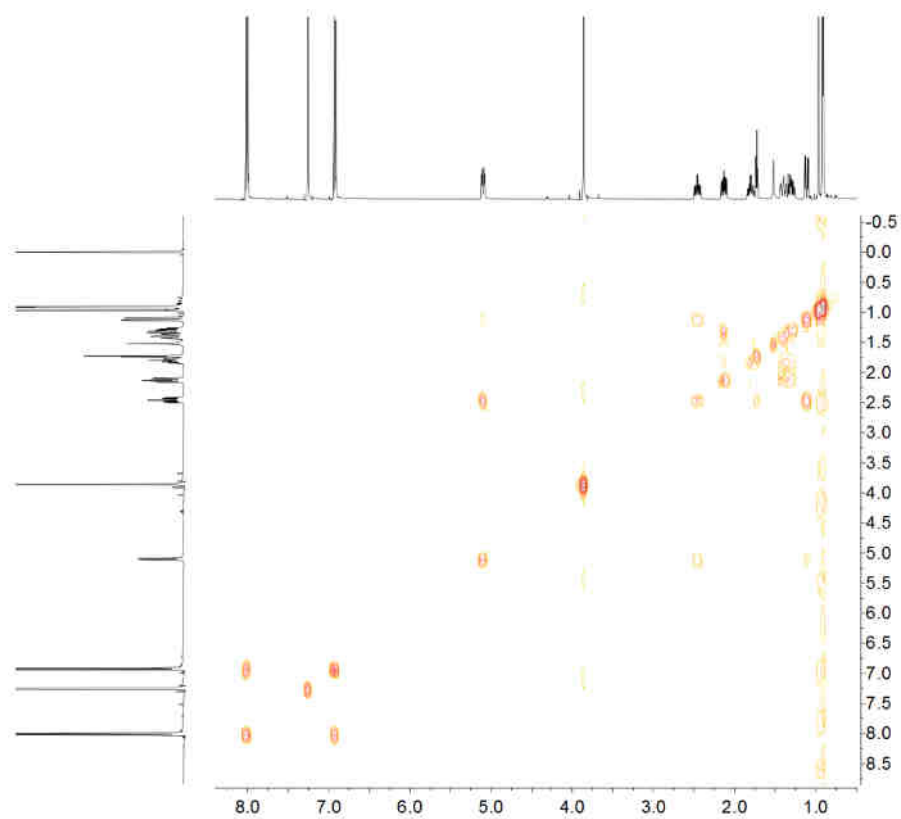
Prilog 22. ^{13}C NMR spektar bornil-4-metoksibenzoata



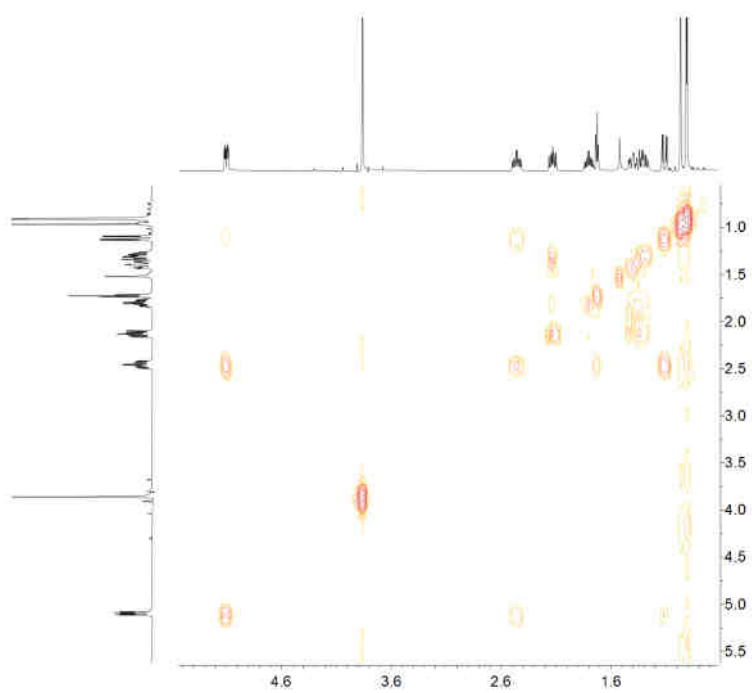
Prilog 23. DEPT 135 spektar bornil-4-metoksibenzoata. CH_3 i CH signali su iznad, a CH_2 signali ispod osnovne linije.



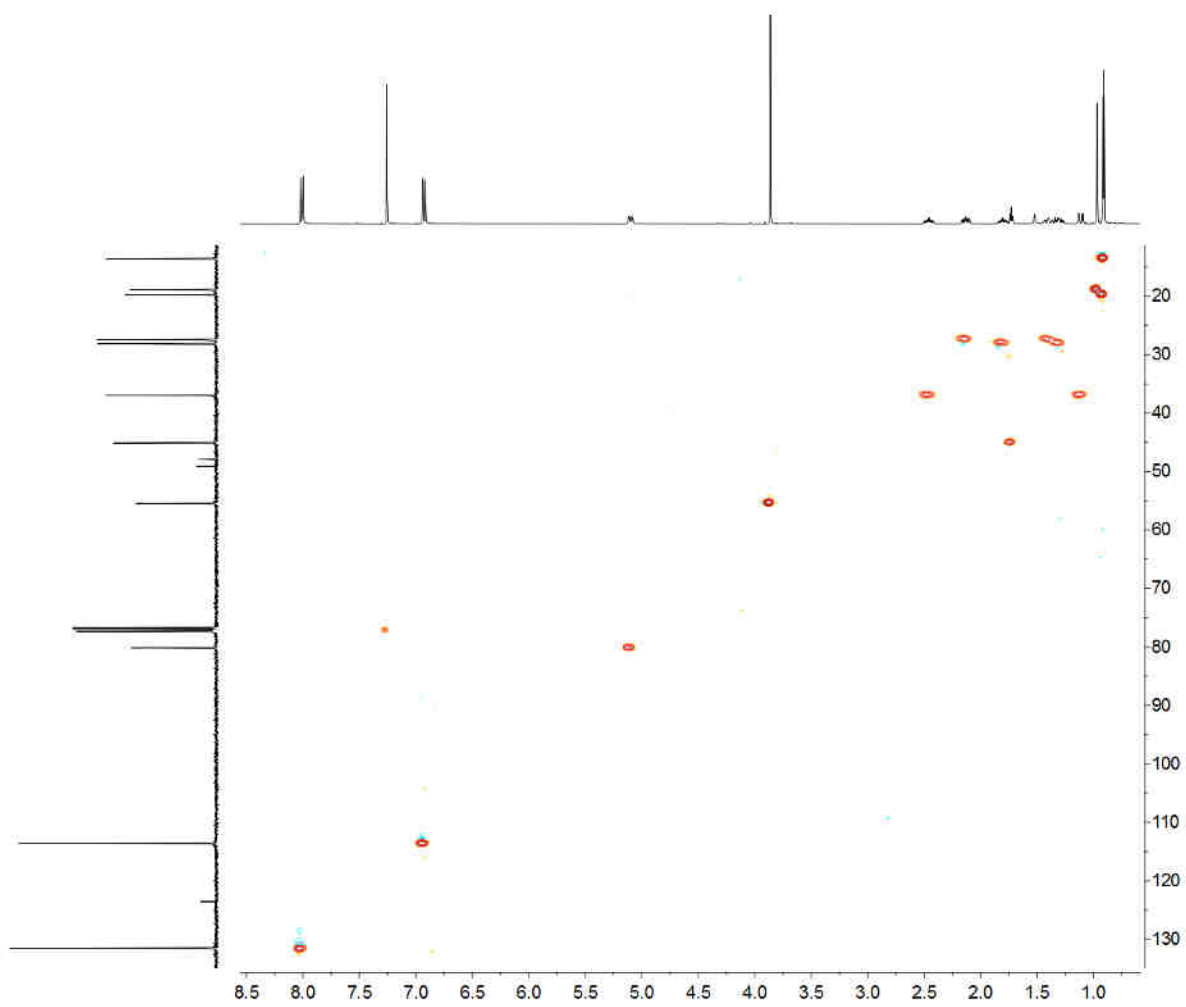
Prilog 24. Uvećanje ^1H NMR spektra bornil-4-metoksibenzoata



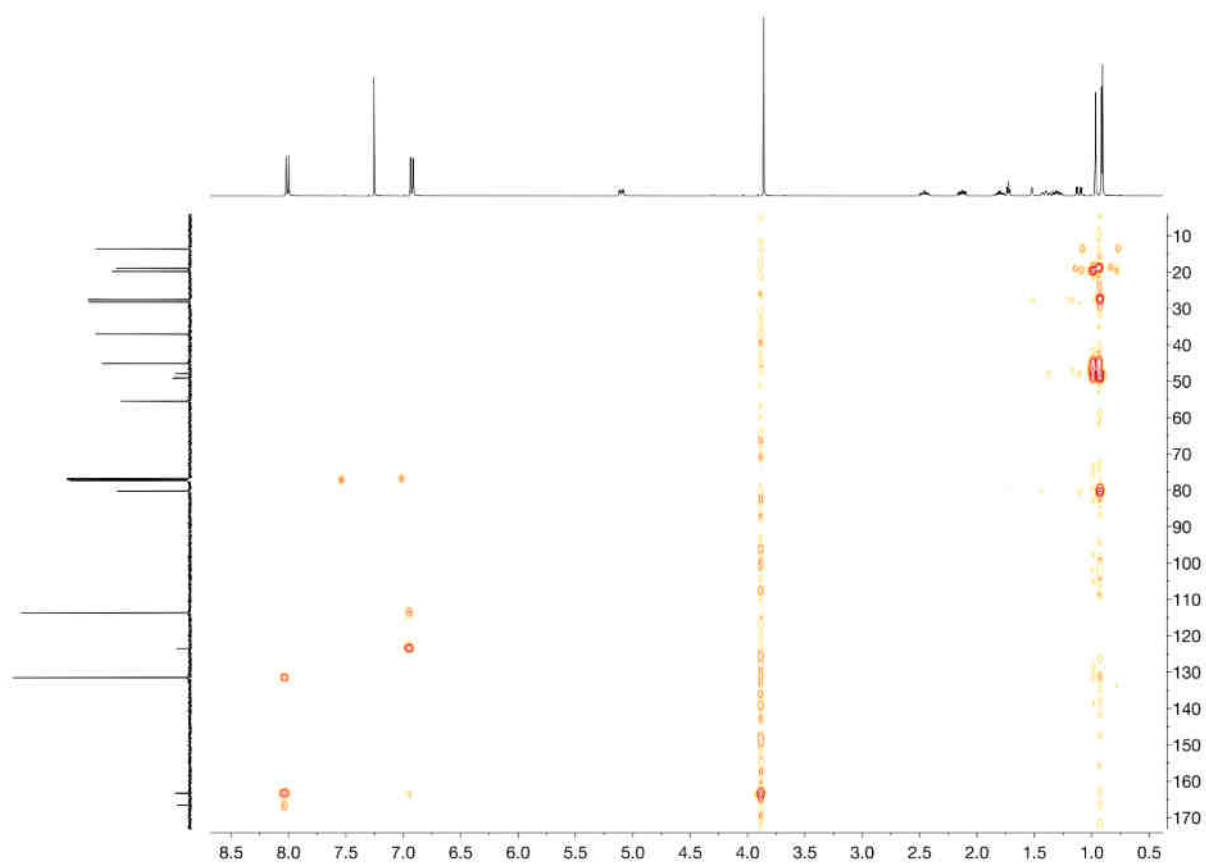
Prilog 25. ^1H - ^1H COSY spektar bornil-4-metoksibenzoata



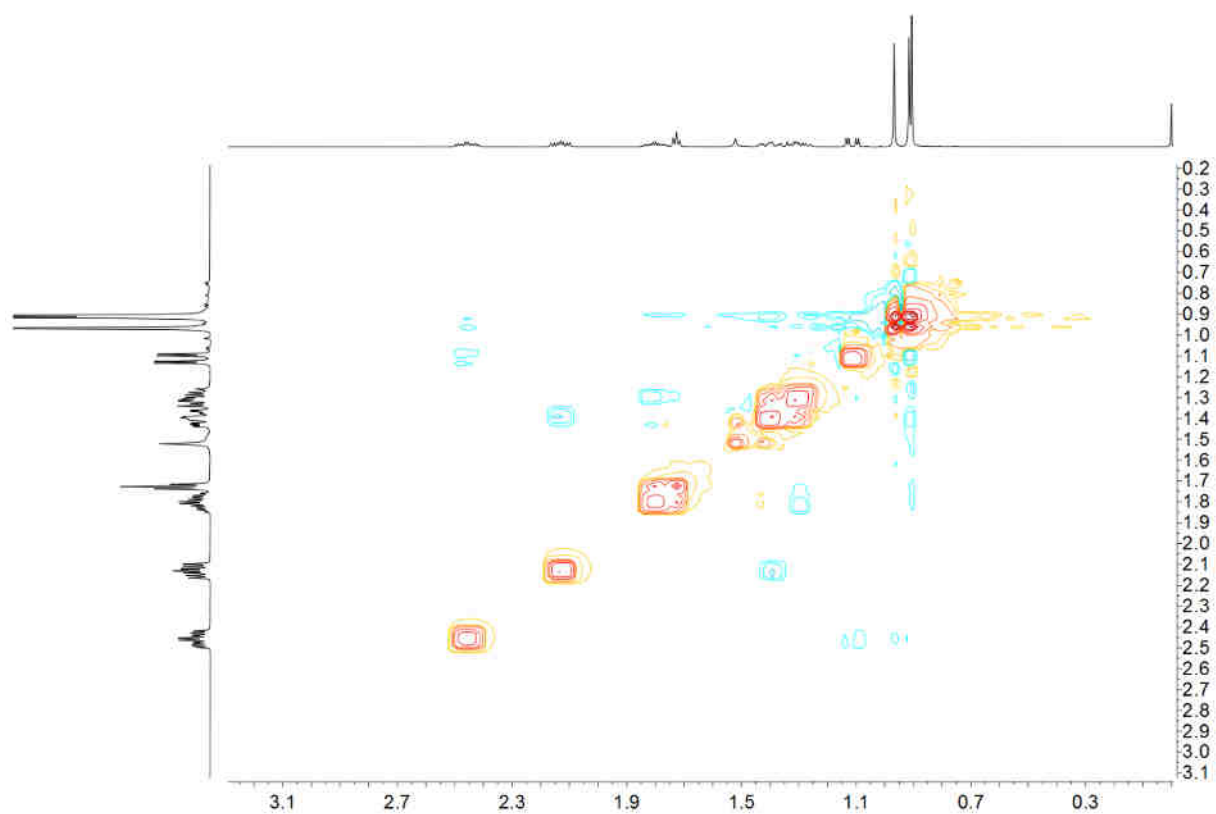
Prilog 26. ^1H - ^1H Uvećanje COSY spektra bornil-4-metoksibenzoata



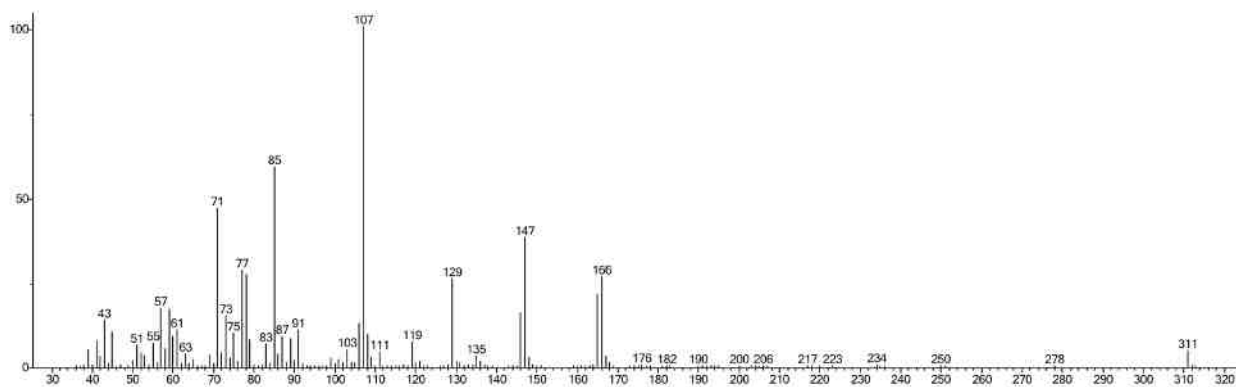
Prilog 27. HSQC spektar bornil-4-metoksibenzoata



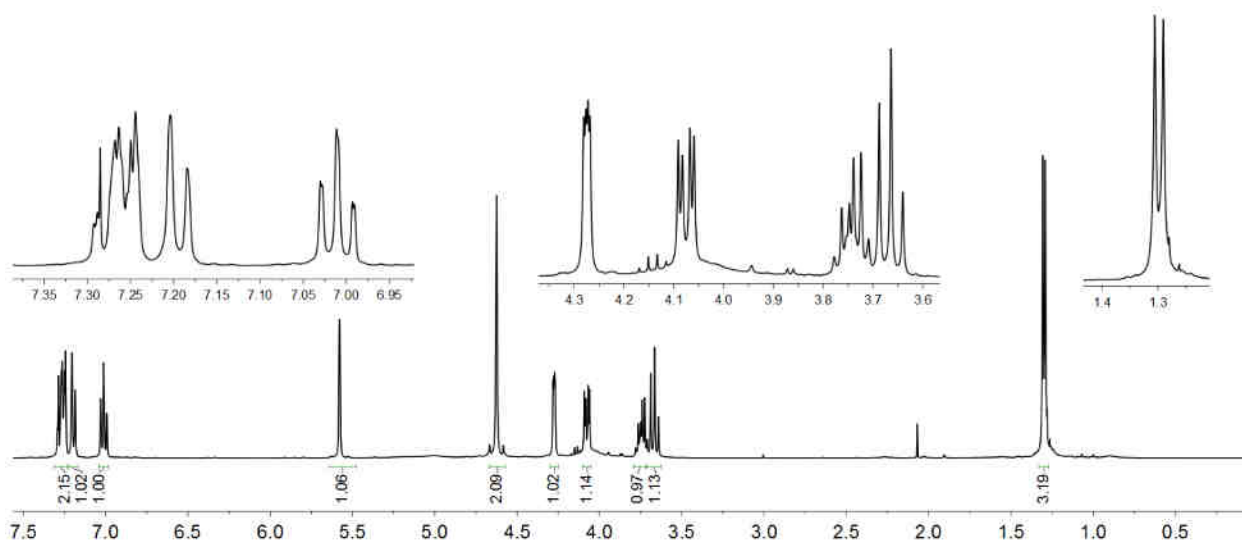
Prilog 28. HMBC spektar bornil-4-metoksibenzoata



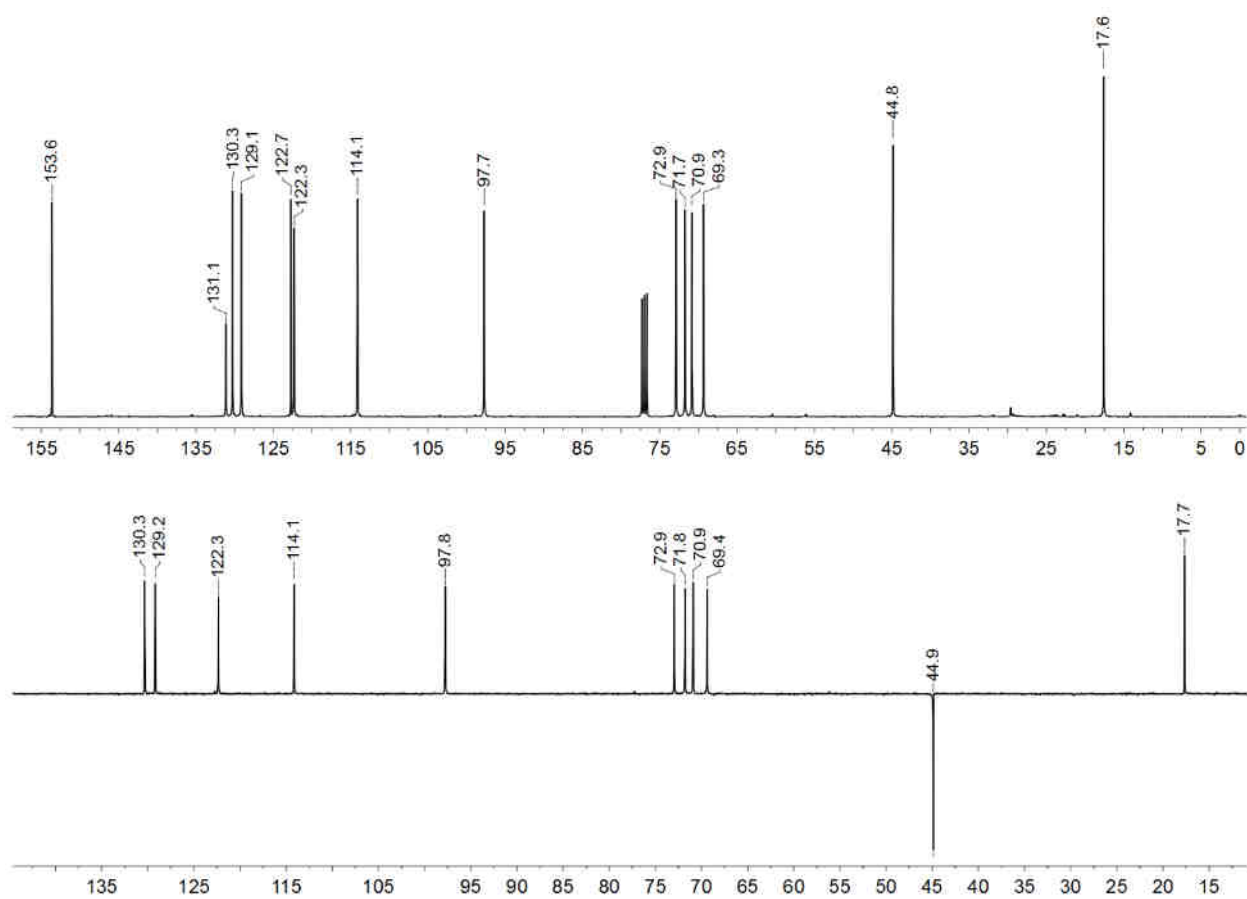
Prilog 29. NOESY spektar bornil-4-metoksibenzoata



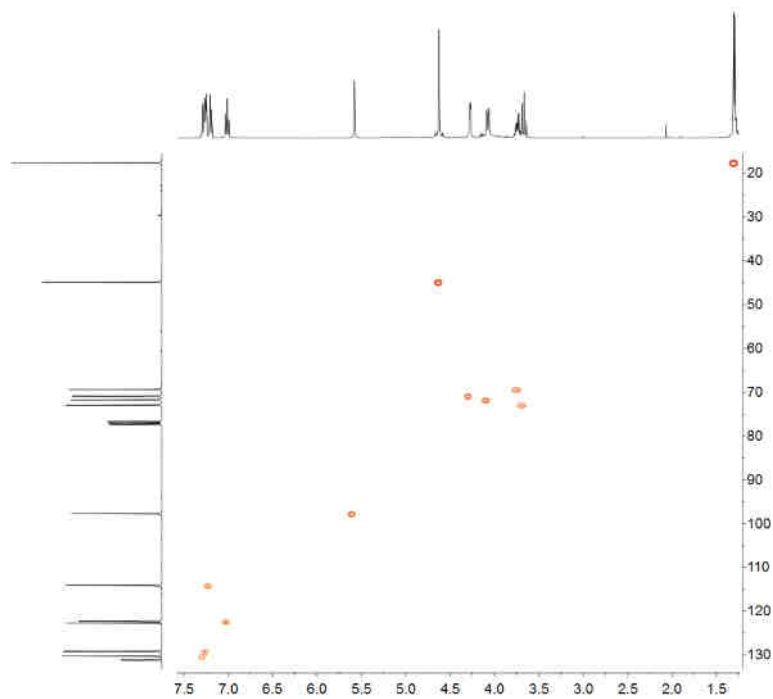
Prilog 30. EI-MS spektar 2-(α -L-ramnopyranosiloksi)benzil-izotiocijanata (**4-1**).



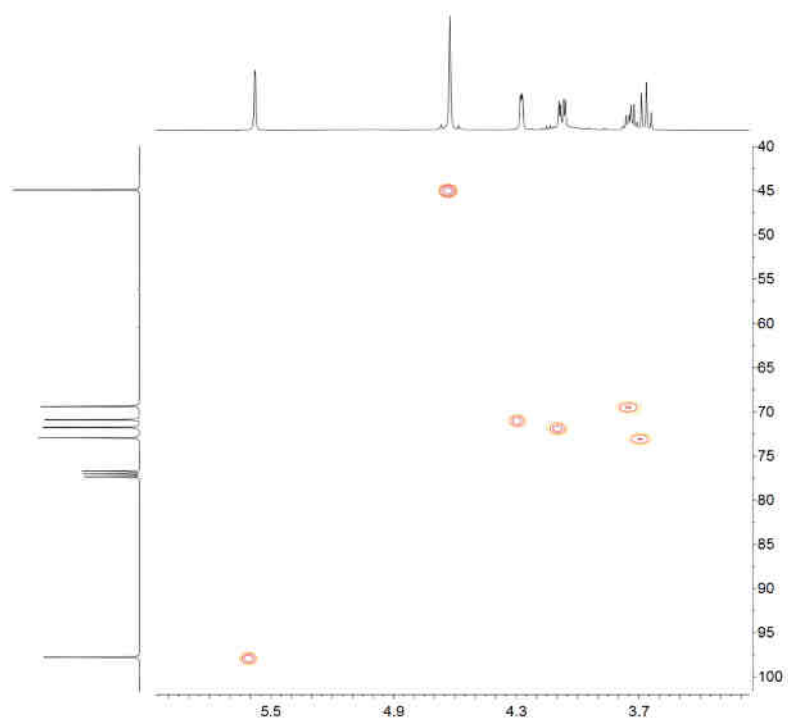
Prilog 31. ^1H NMR spektar 2-(α -L-ramnopiranoziloksi)benzil-izotiocijanata (**4-1**).



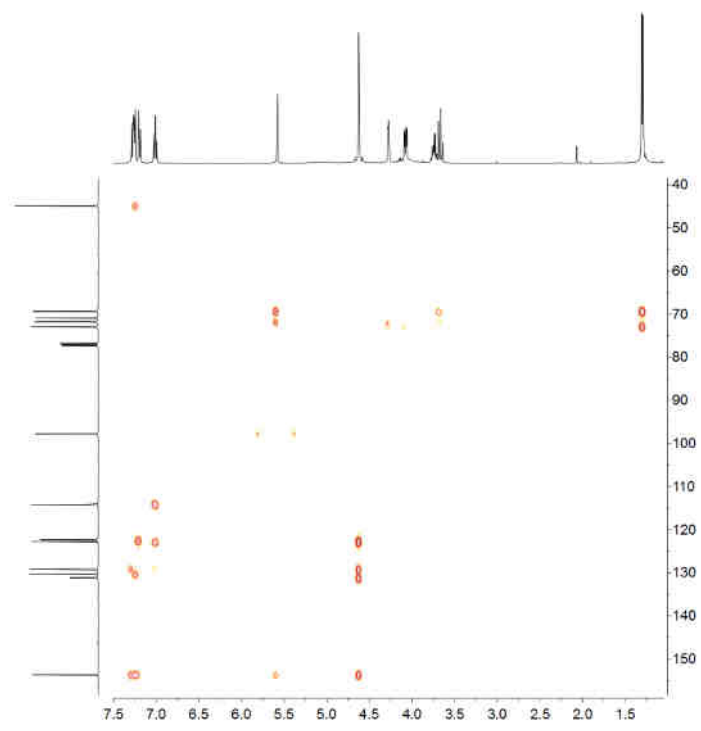
Prilog 32. ^{13}C NMR spektar (gore) i DEPT 135 spektar (dole) jedinjenja **4-1**.



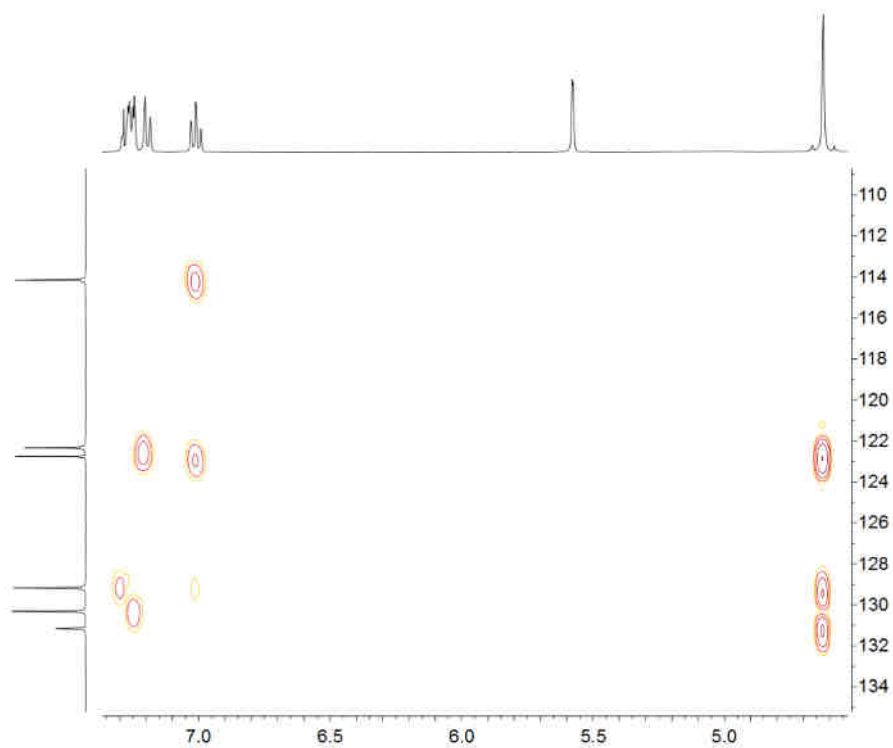
Prilog 33. HSQC spektar jedinjenja 4-1.



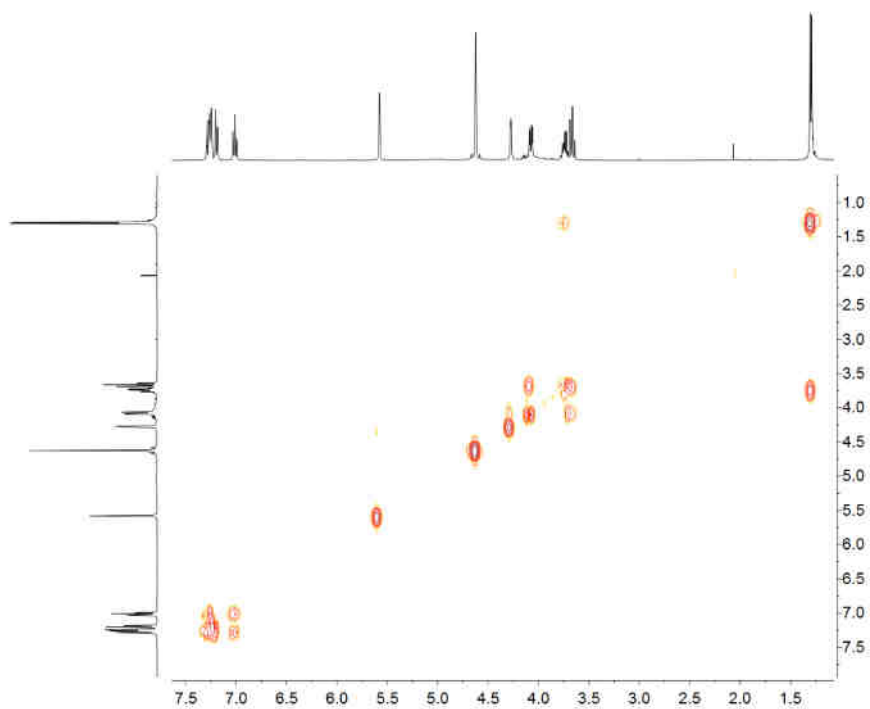
Prilog 34. Uvećanje HSQC spektra jedinjenja 4-1.



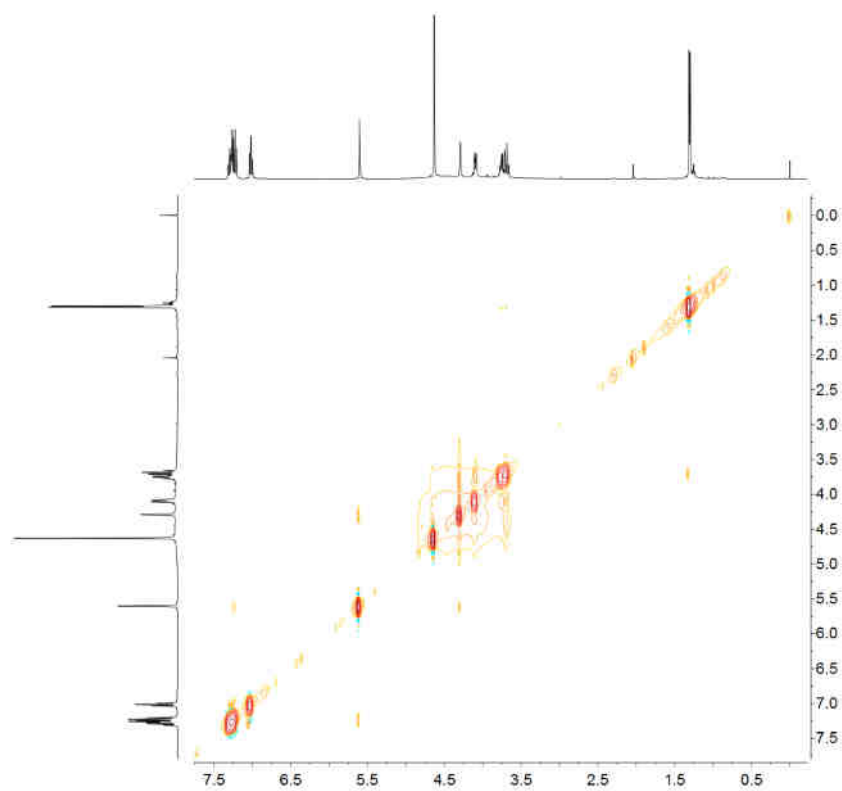
Prilog 35. HMBC spektar jedinjenja 4-1.



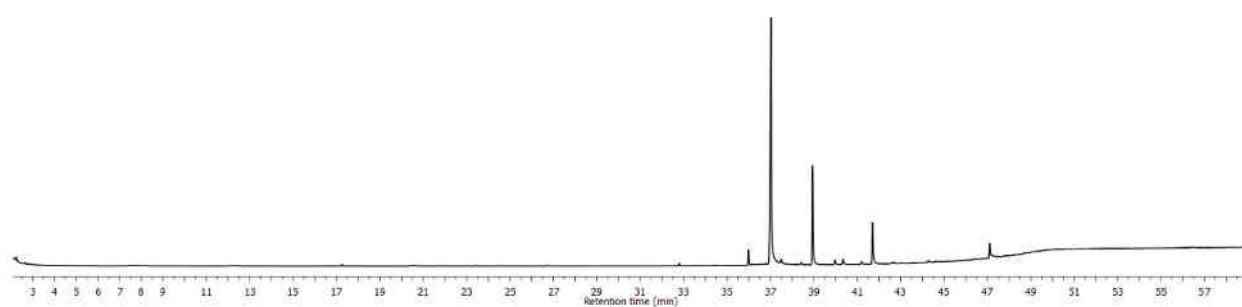
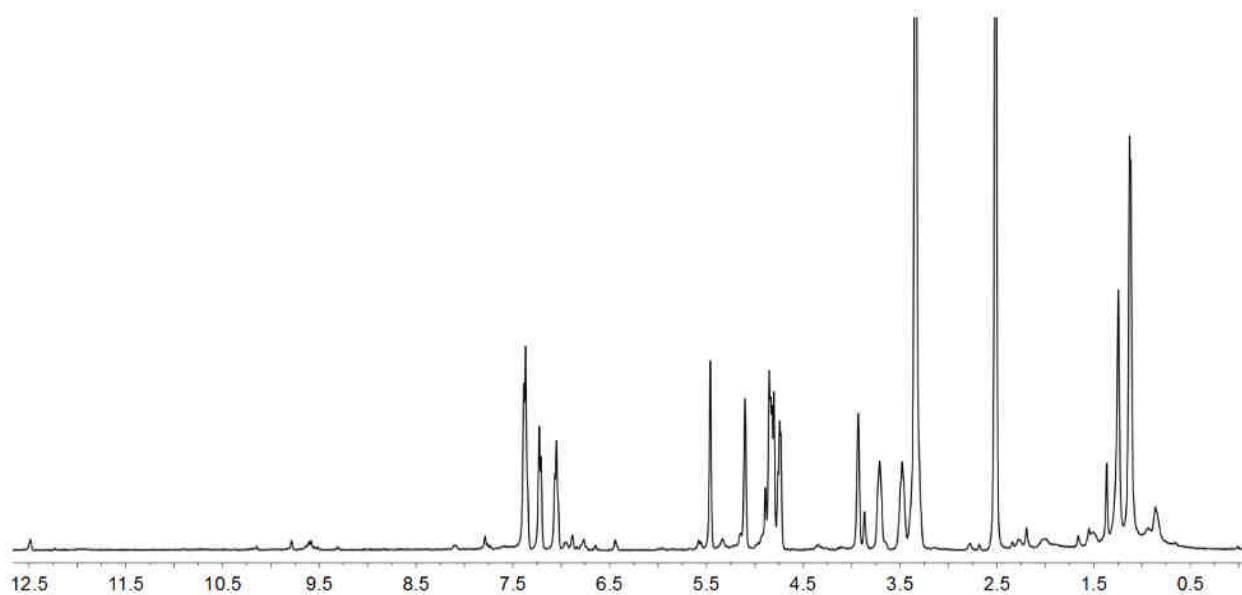
Prilog 36. Uvećanje HMBC spektra jedinjenja 4-1.



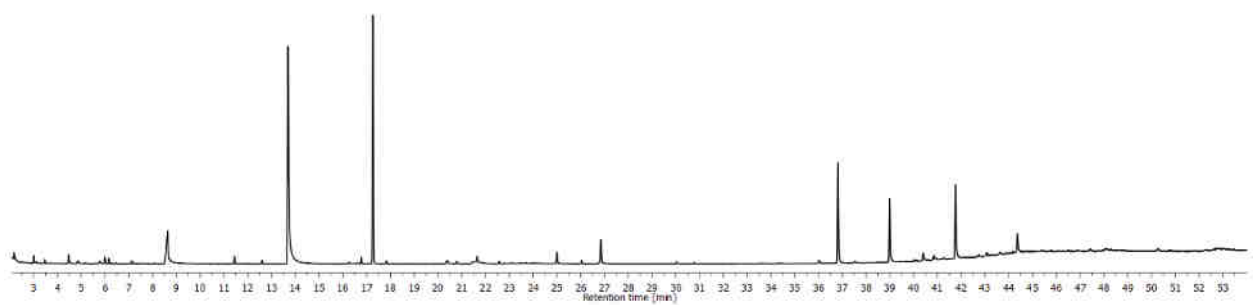
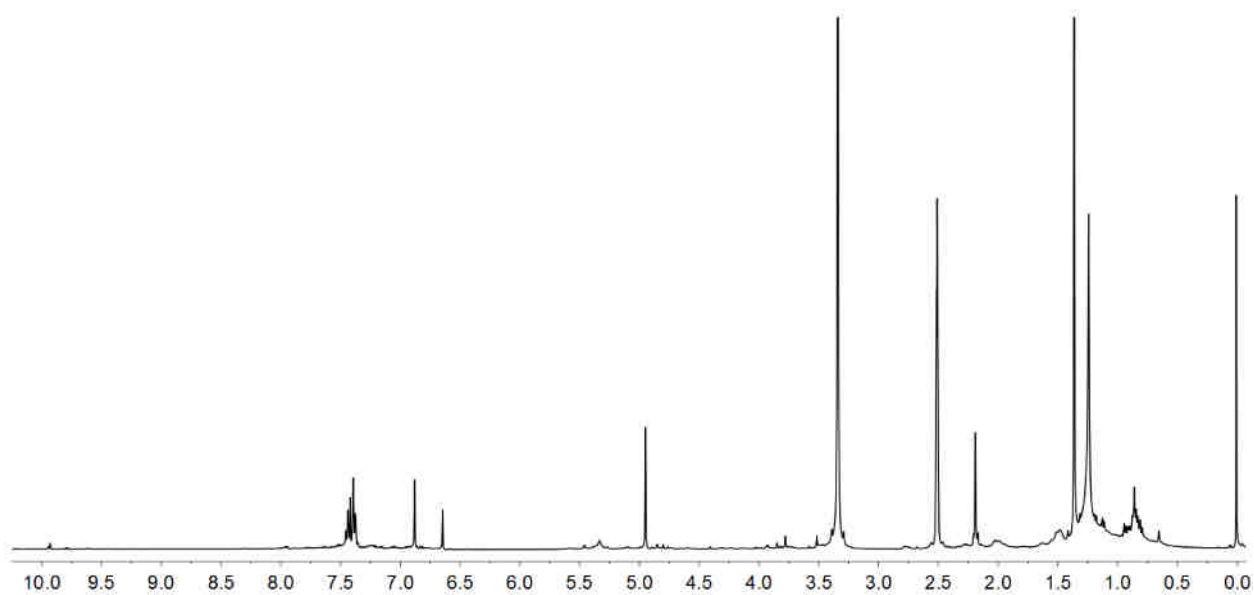
Prilog 37. ^1H - ^1H COSY spektar jedinjenja **4-1**.



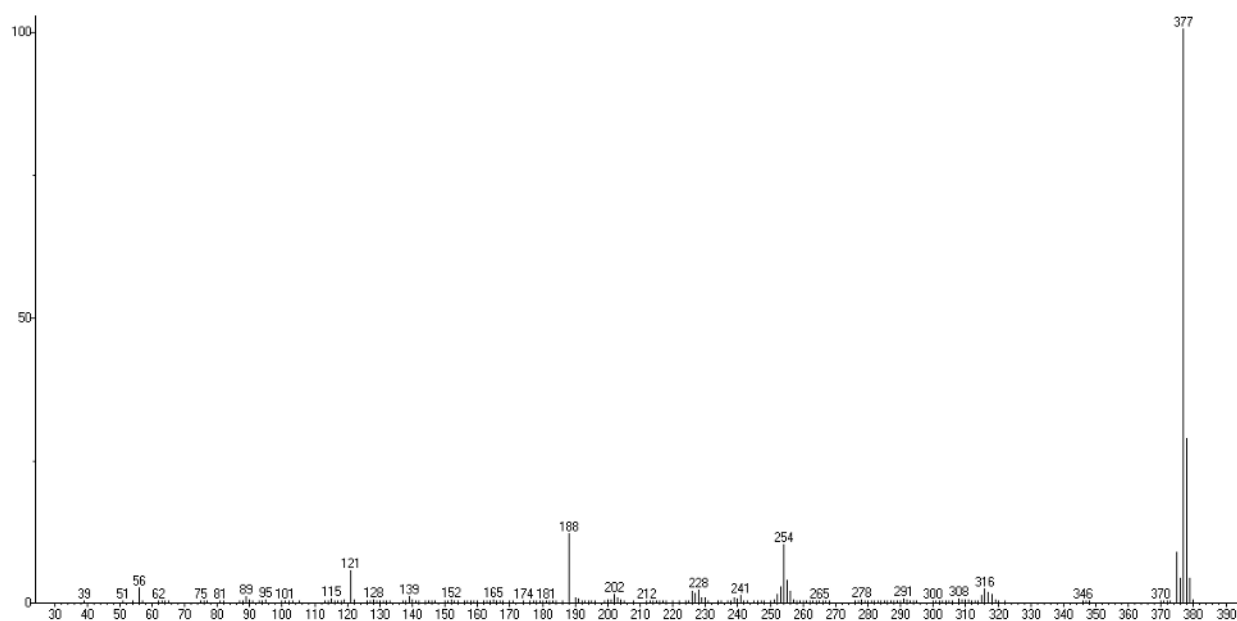
Prilog 38. NOESY spektar jedinjenja **4-1**.



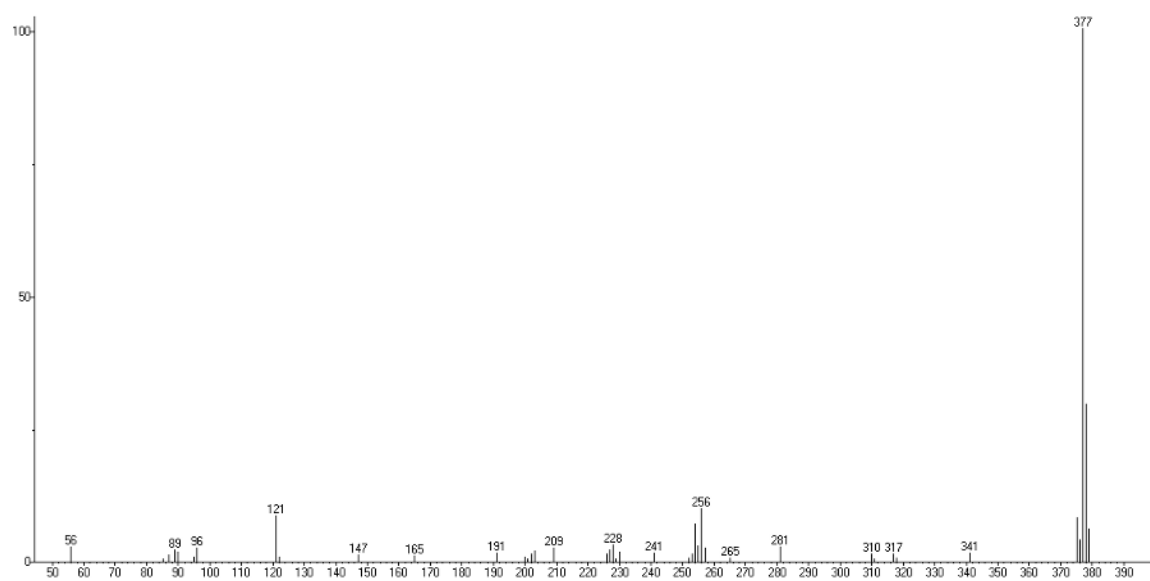
Prilog 39. Metabolički profil autolizata cveta vrste *Reseda lutea*: ^1H NMR spektar snimljen u $\text{DMSO-}d_6$ (gore), GC-MS hromatogram (dole).



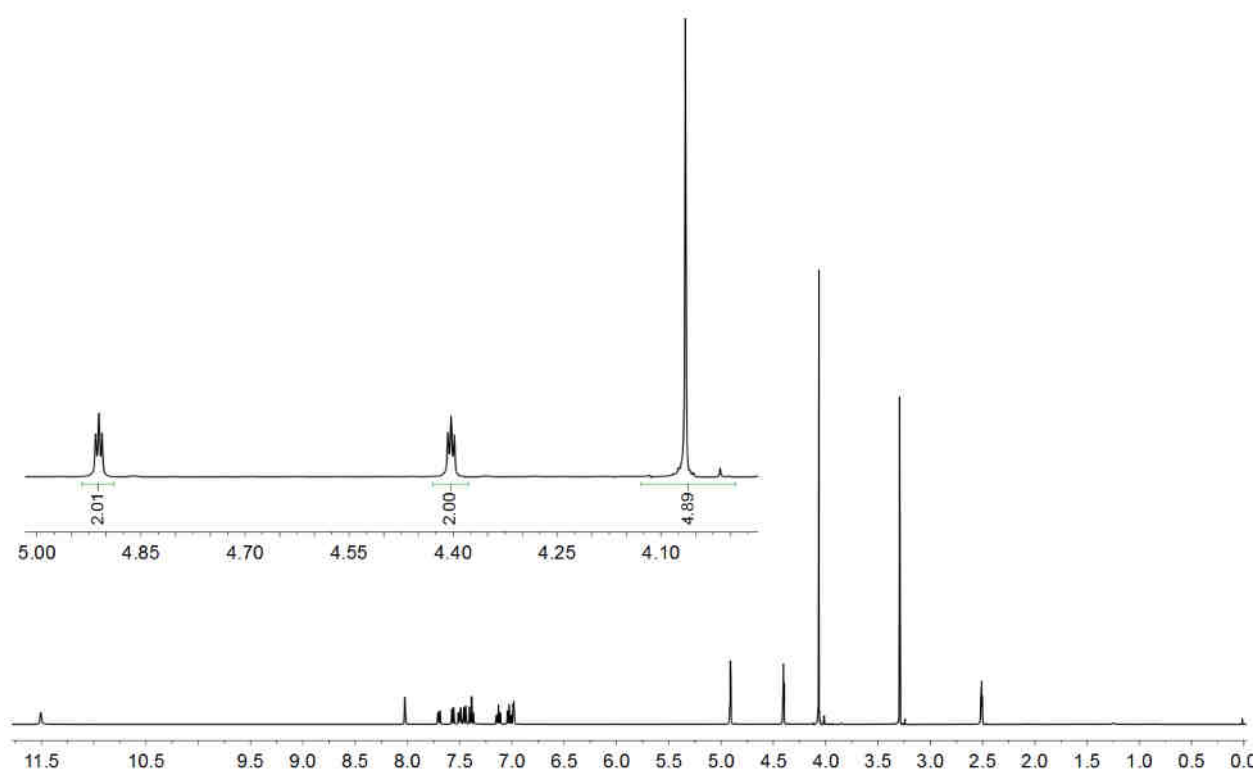
Prilog 40. Metabolički profil autolizata korena vrste *Reseda lutea*: ^1H NMR spektar snimljen u $\text{DMSO-}d_6$ (gore), GC-MS hromatogram (dole).



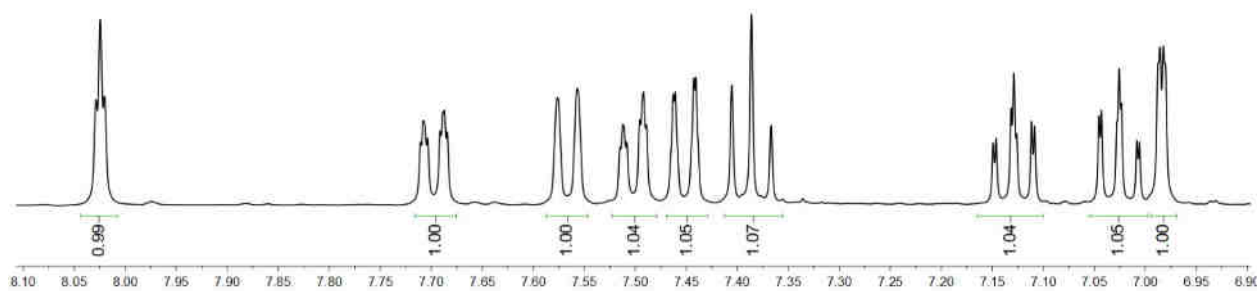
Prilog 41. EI-MS spektar 2-(3-ferocenilfenil)-1*H*-indola (**5-1**)



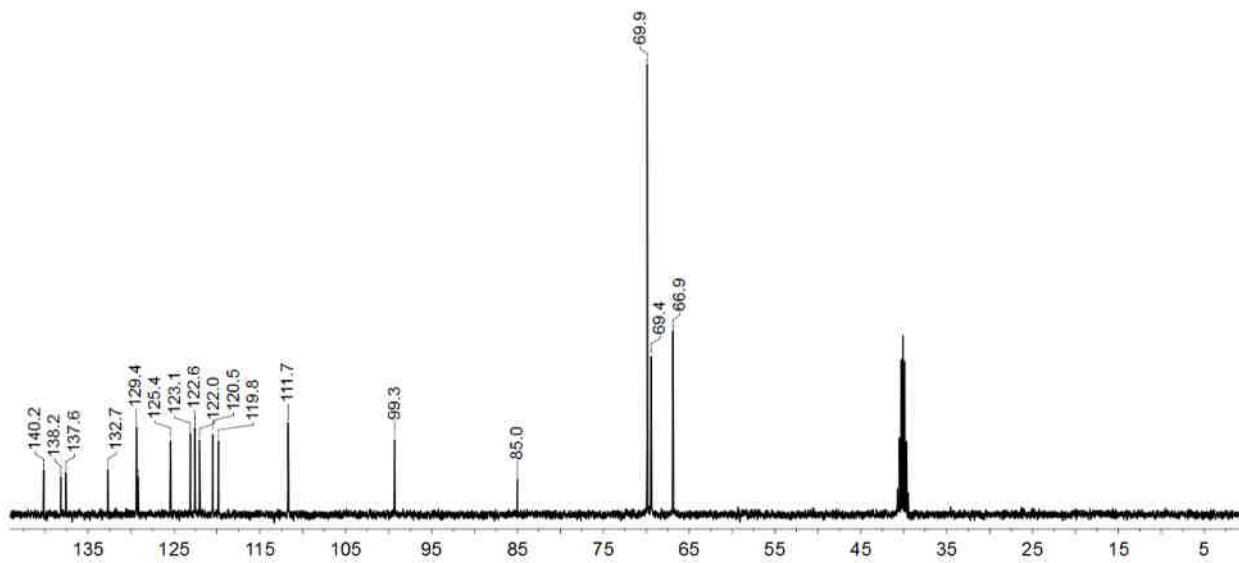
Prilog 42. EI-MS spektar 2-(4-ferocenilfenil)-1*H*-indola (**5-2**)



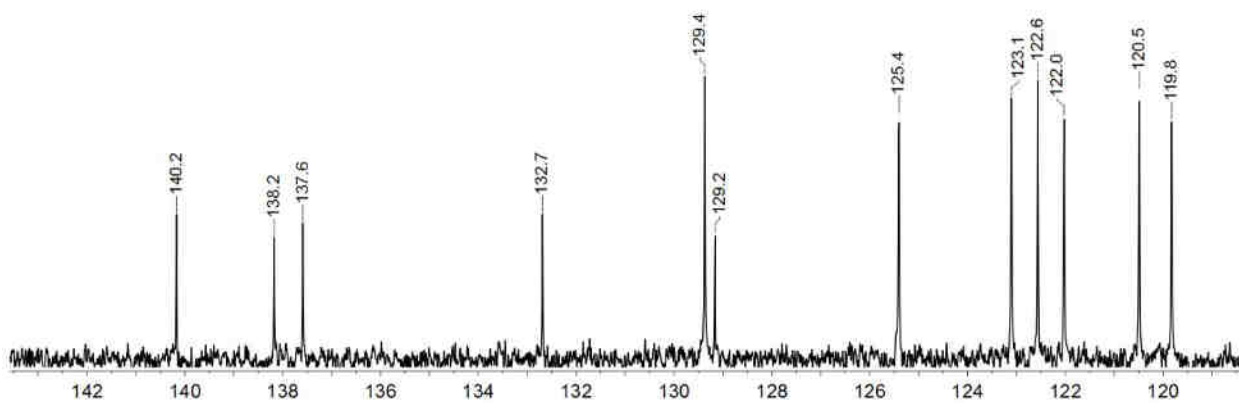
Prilog 43. ¹H NMR spektar jedinjenja **5-3a**.



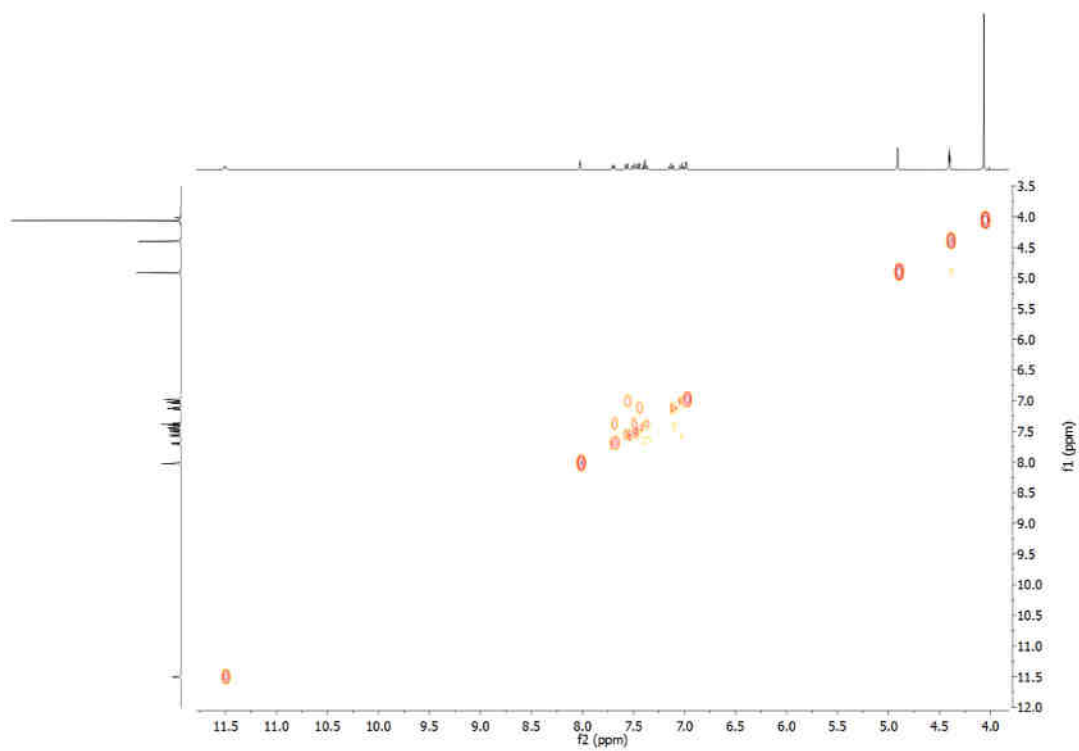
Prilog 44. Uvećanje ¹H NMR spektra jedinjenja **5-3a**.



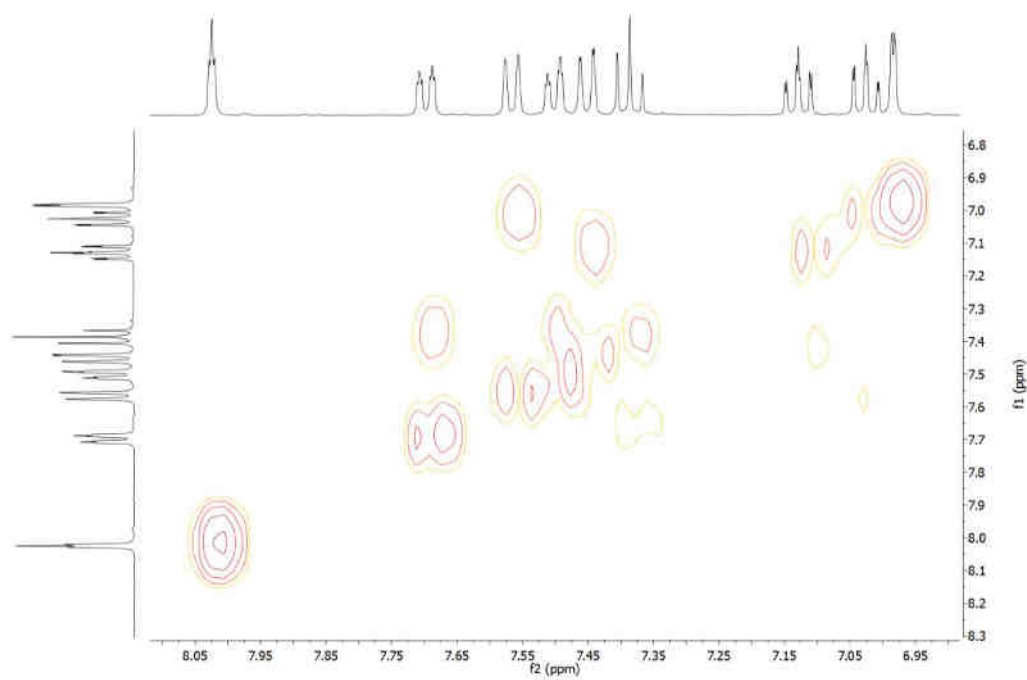
Prilog 45. ¹³C NMR spektar jedinjenja 5-3a.



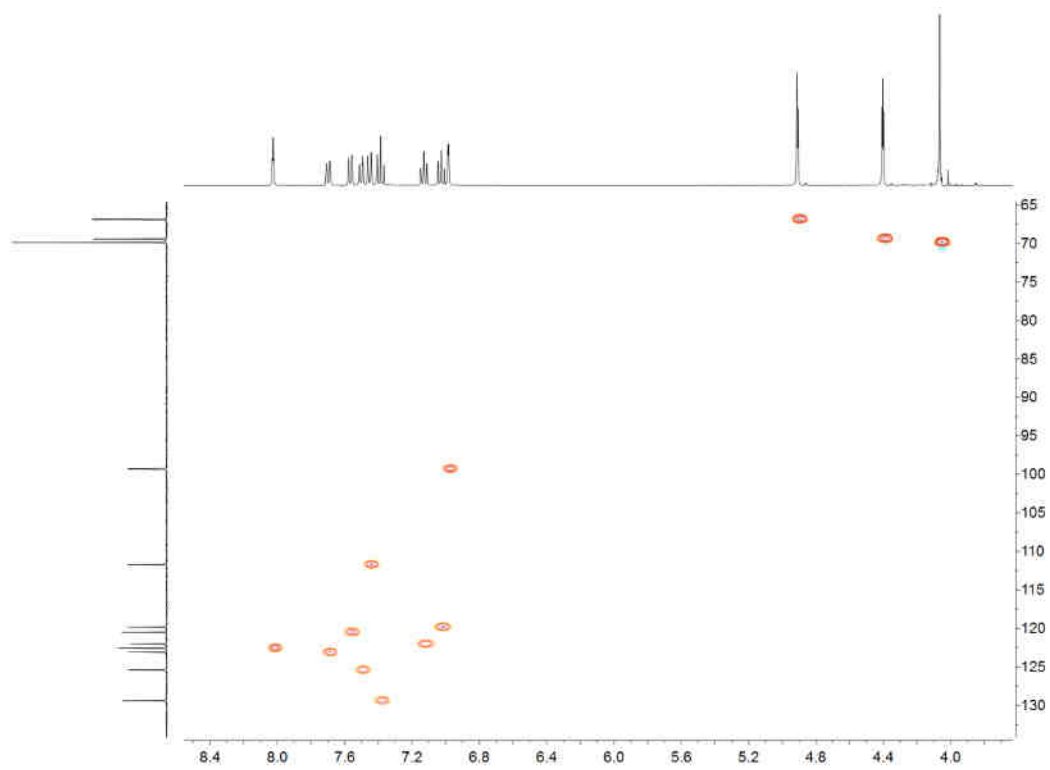
Prilog 46. Uvećanje ¹³C NMR spektra jedinjenja 5-3a.



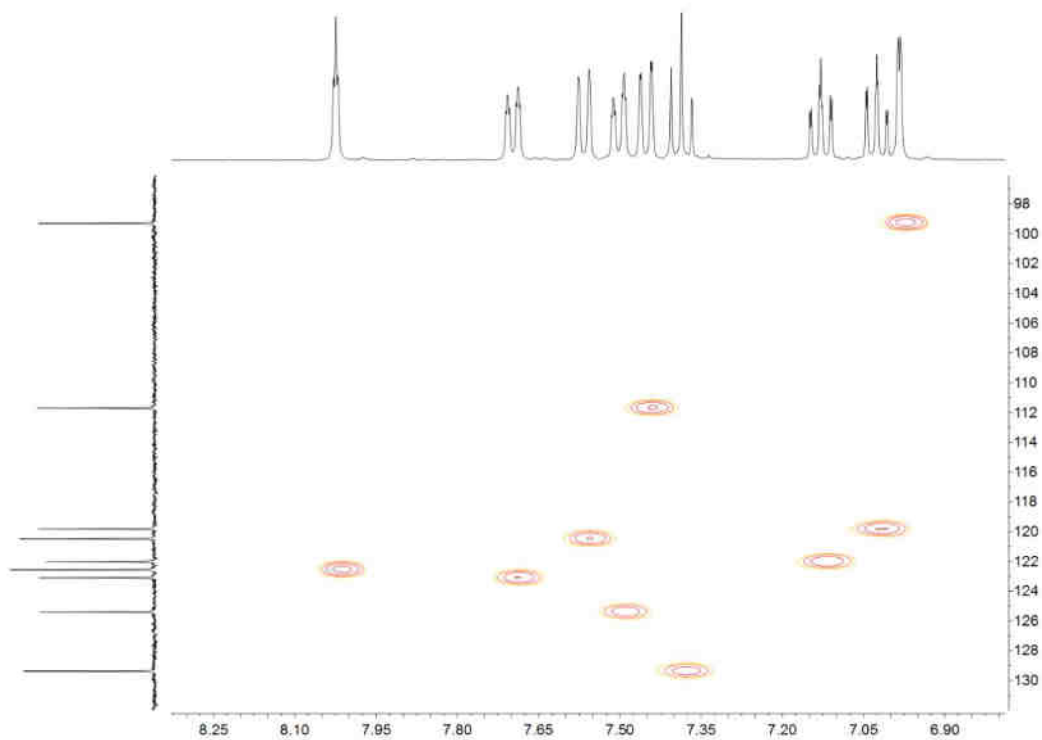
Prilog 47. ^1H - ^1H COSY spektar jedinjenja **5-3a**.



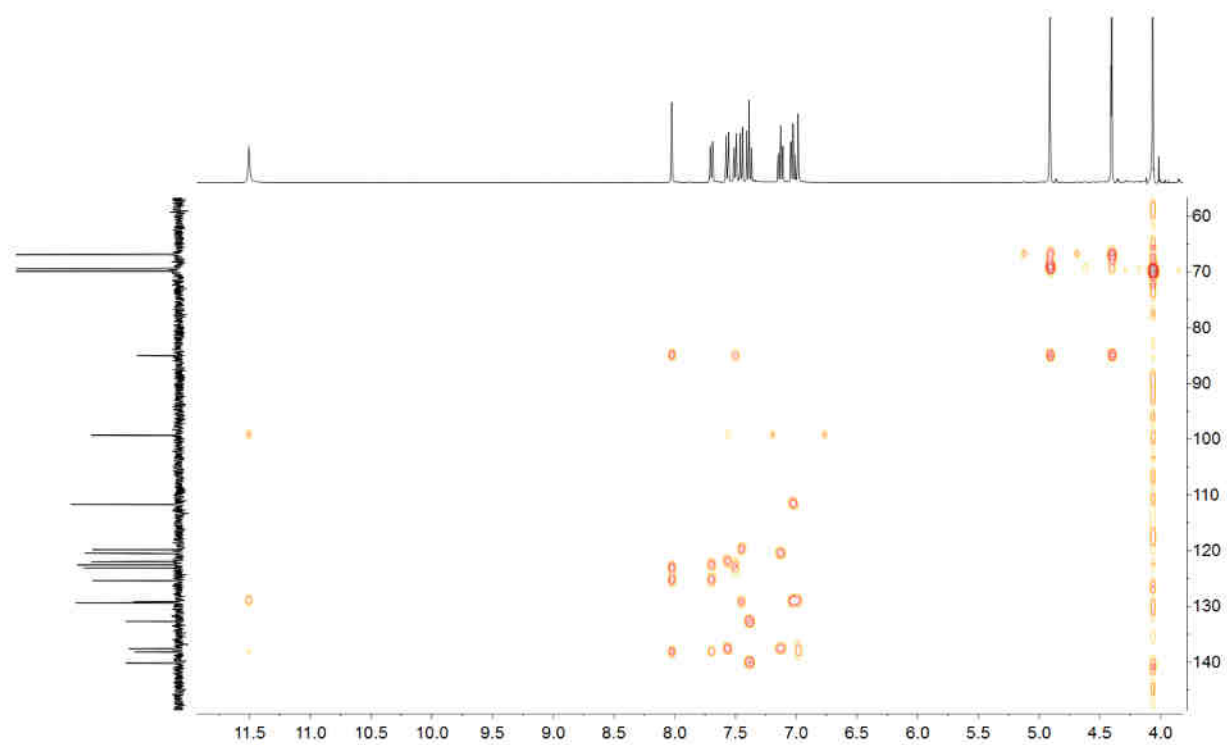
Prilog 48. Uvećanje ^1H - ^1H COSY spektra jedinjenja **5-3a**.



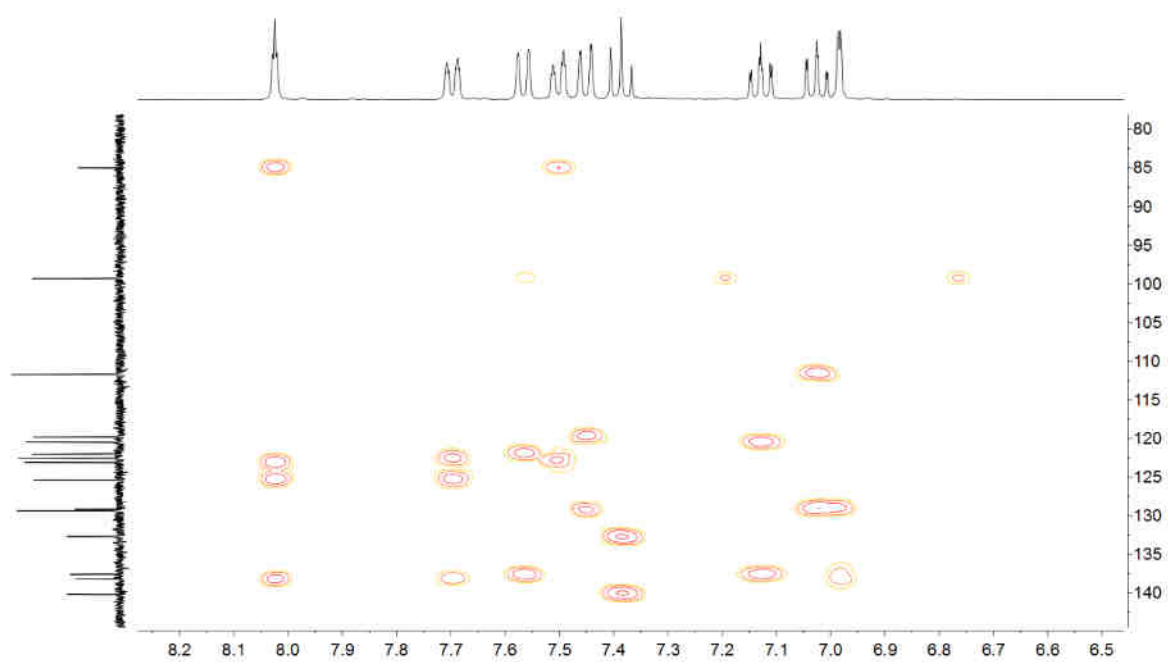
Prilog 49. HSQC spektar jedinjenja **5-3a**.



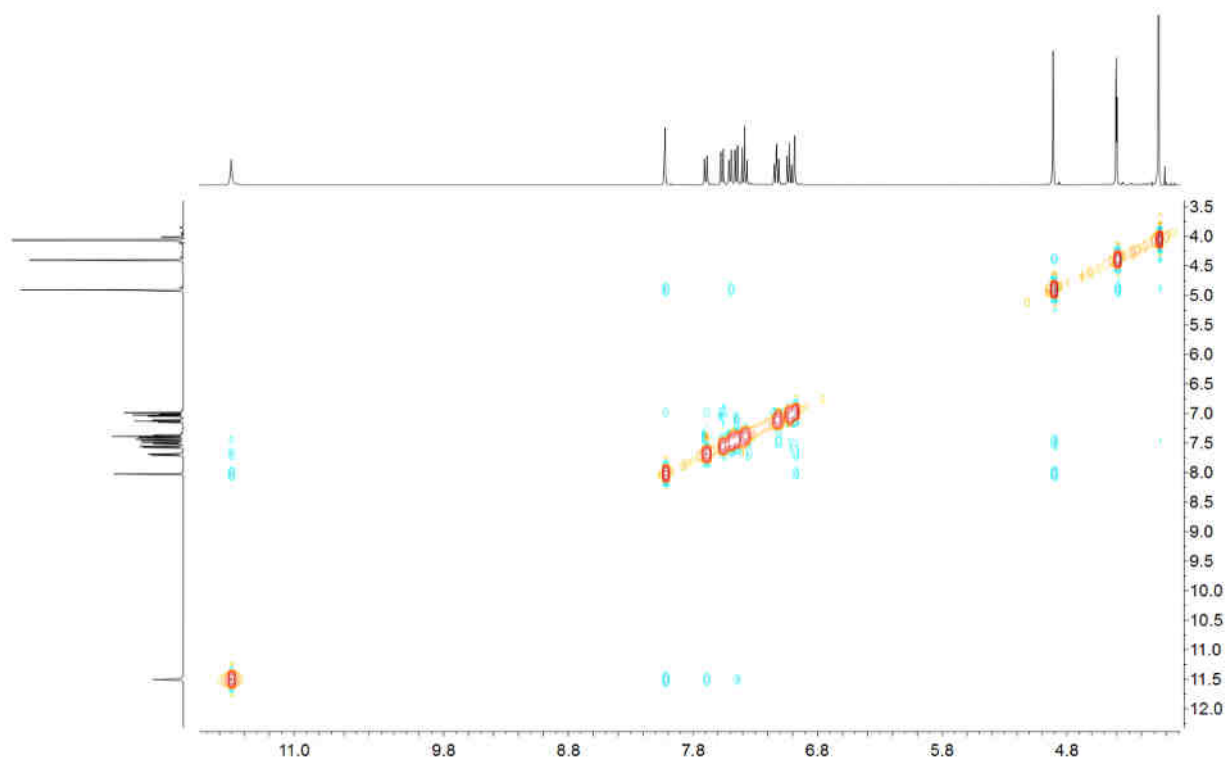
Prilog 50. Uvećanje HSQC spektra jedinjenja **5-3a**.



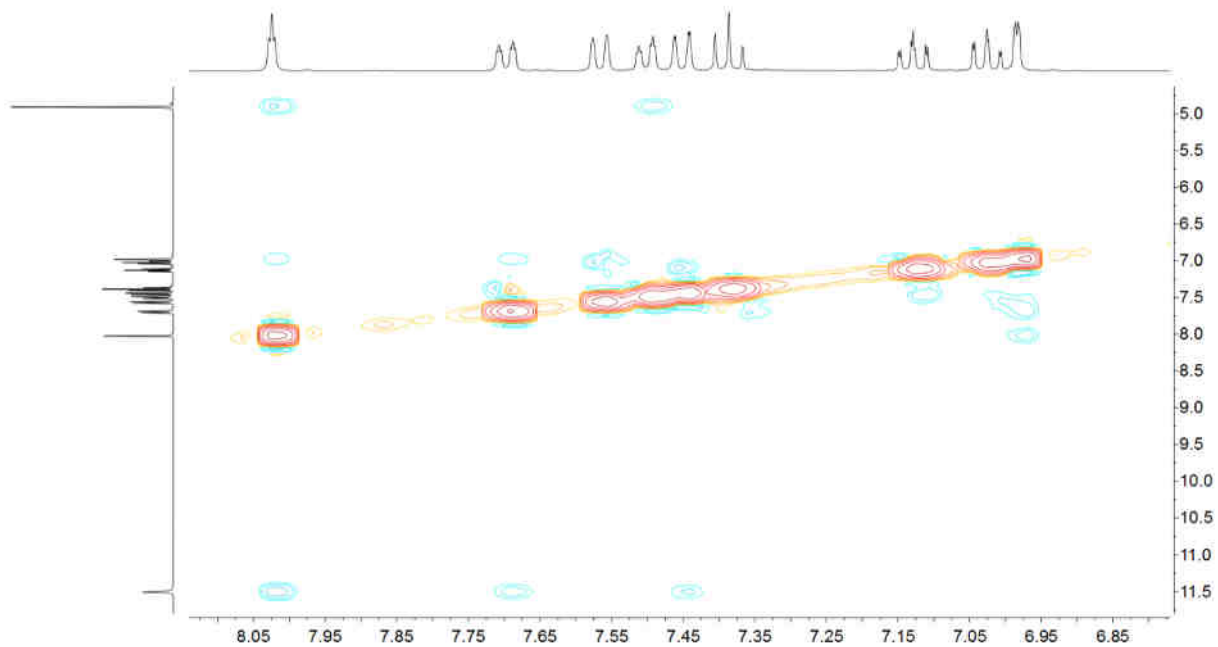
Prilog 51. HMBC spektar jedinjenja **5-3a**.



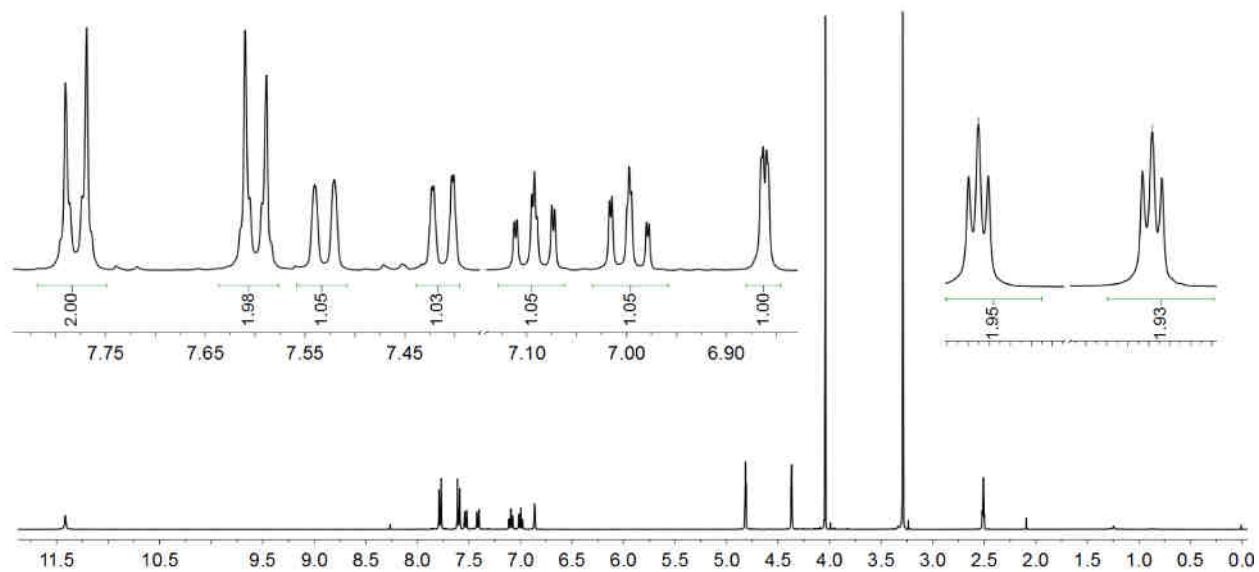
Prilog 52. Uvećanje HMBC spektra jedinjenja **5-3a**.



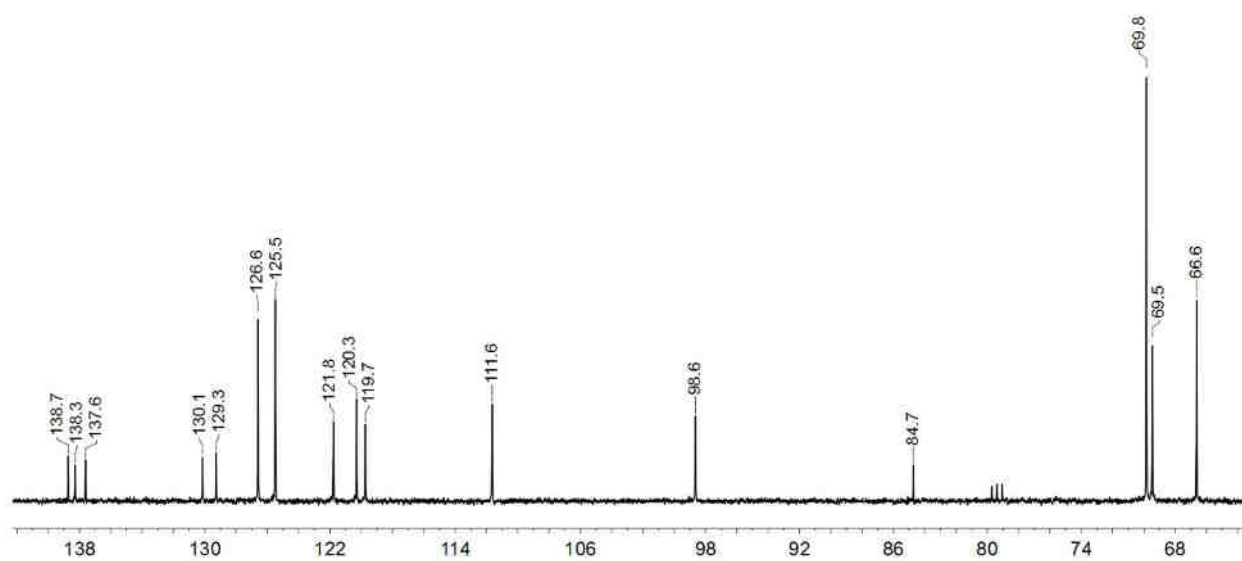
Prilog 53. NOESY spektar jedinjenja **5-3a**.



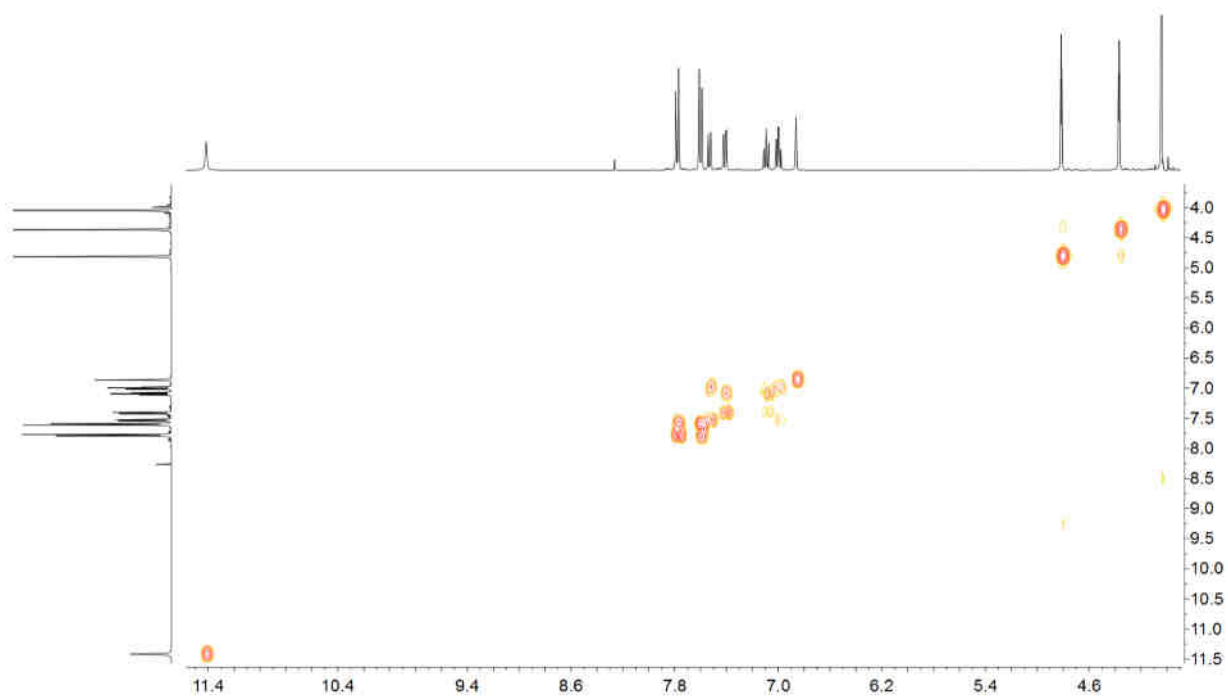
Prilog 54. Uvećanje NOESY spektra jedinjenja **5-3b**.



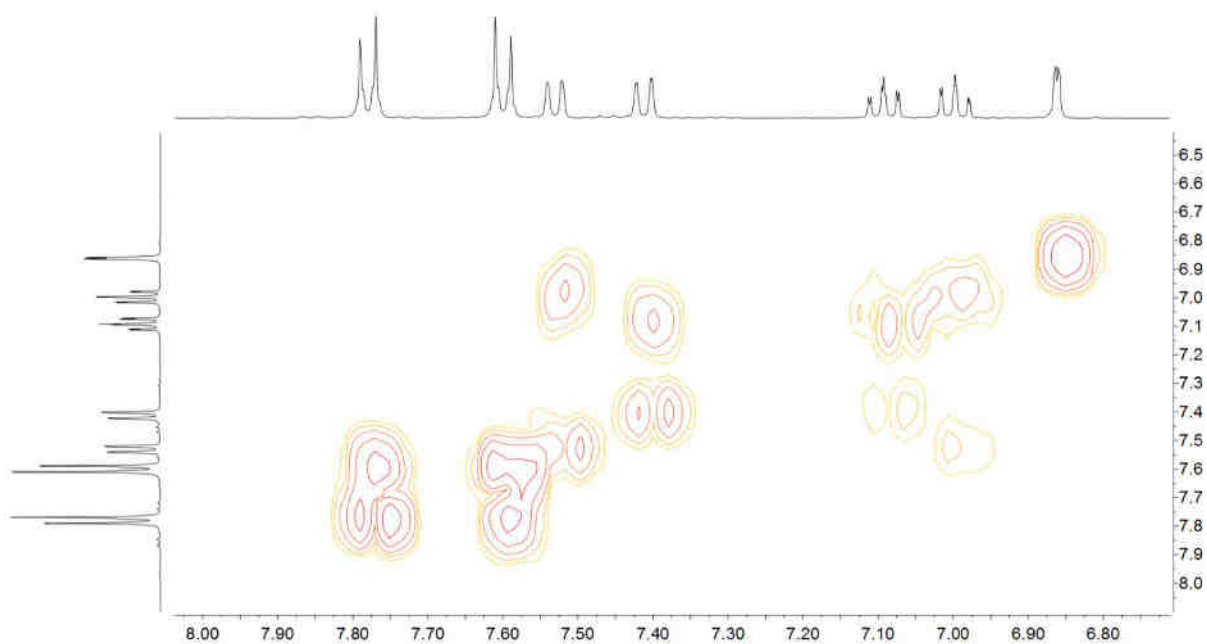
Prilog 55. ^1H NMR spektar jedinjenja **5-3b**.



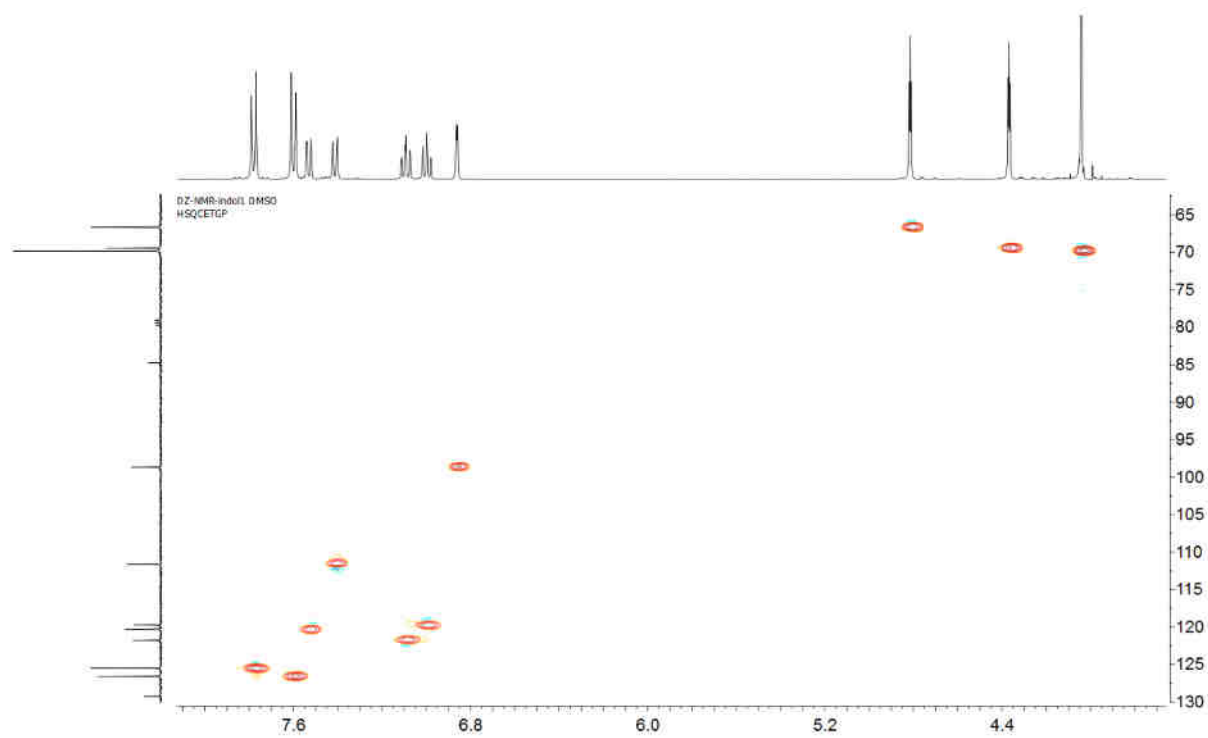
Prilog 56. ^{13}C NMR jedinjenja **5-3b**.



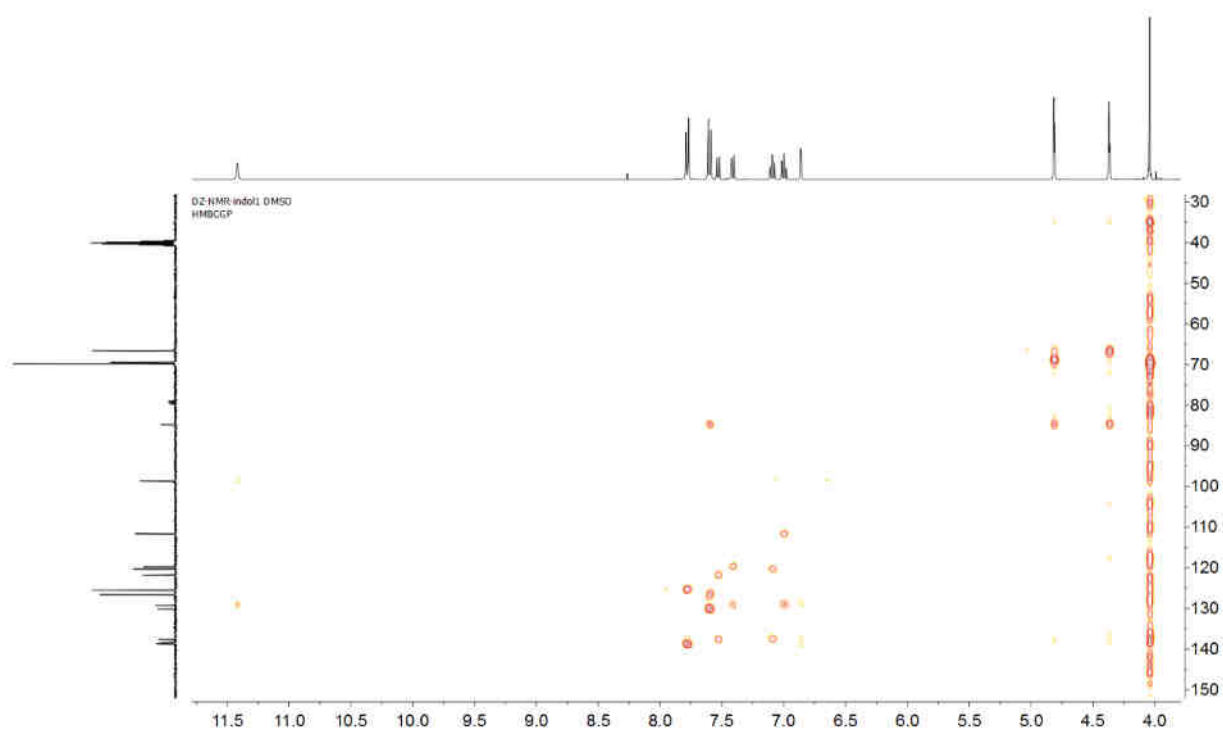
Prilog 57. ^1H - ^1H COSY spektar jedinjenja **5-3b**.



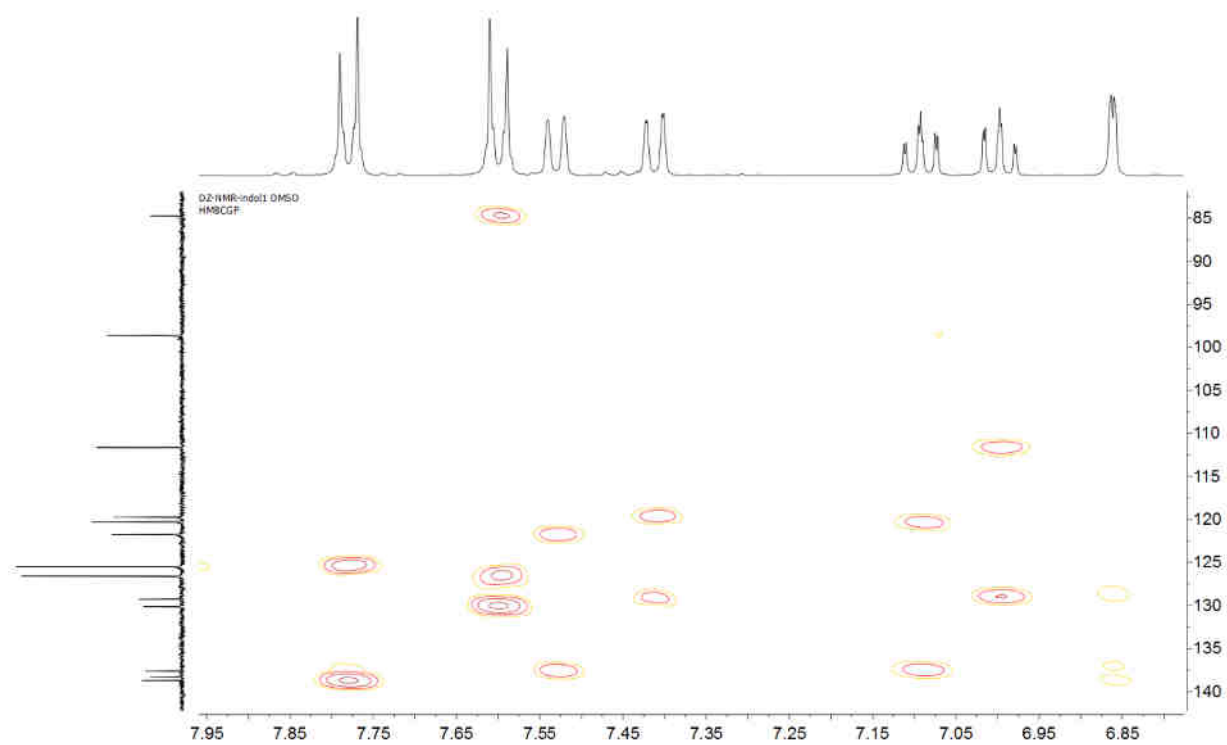
Prilog 58. Uvećanje ^1H - ^1H COSY spektra jedinjenja **5-3b**.



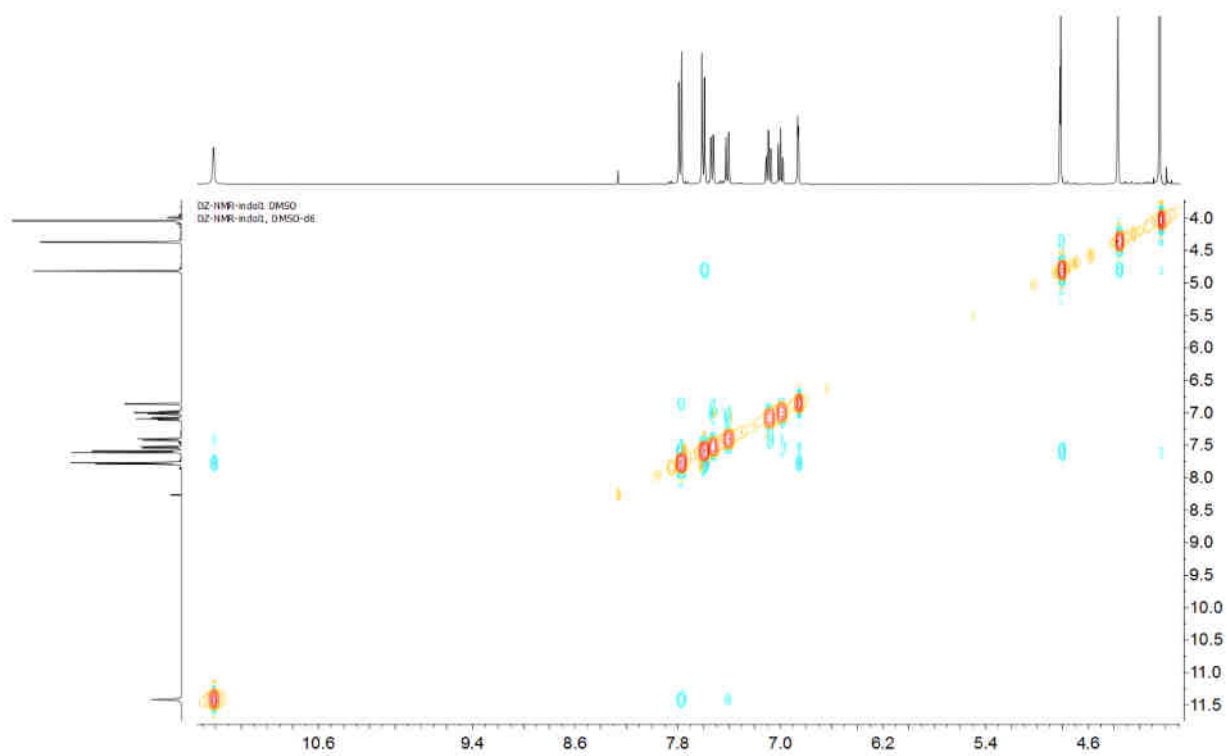
Prilog 59. HSQC spektar jedinjenja **5-3b**.



Prilog 60. HMBC spektar jedinjenja **5-3b**.

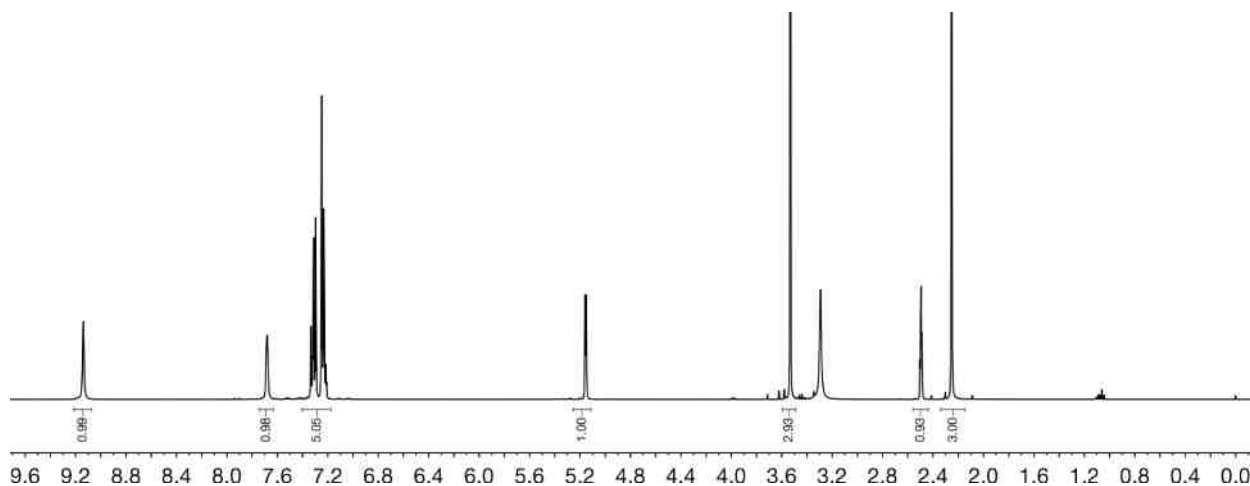
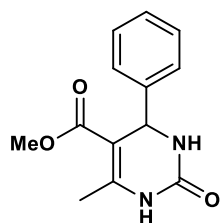


Prilog 61. Uvećanje HMBC spektra jedinjenja **5-3b**.

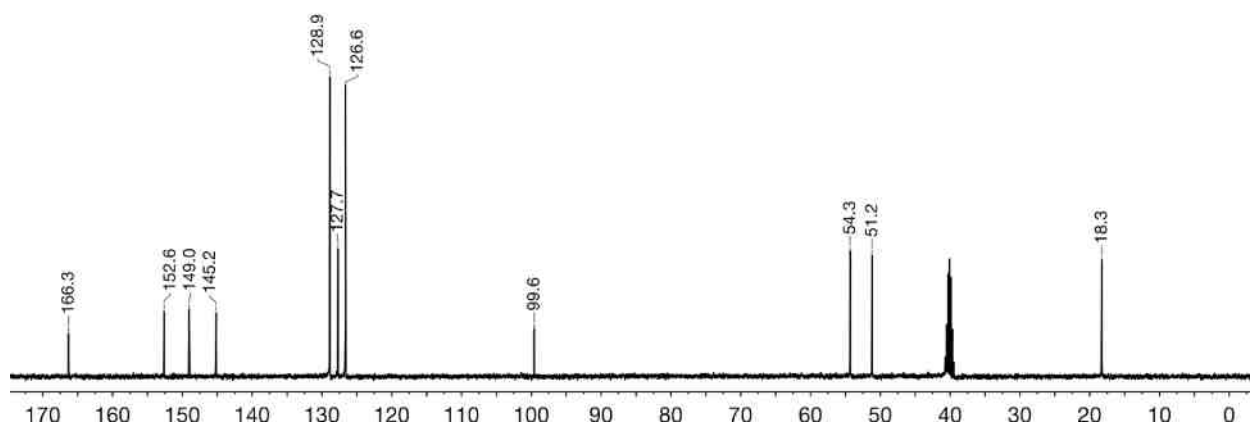


Prilog 62. NOESY spektar jedinjenja **5-3b**.

Prilog 63. Metil-4-fenil-6-metil-2-okso-1,2,3,4-tetrahidropirimidin-5-karboksilat (**6-1**)

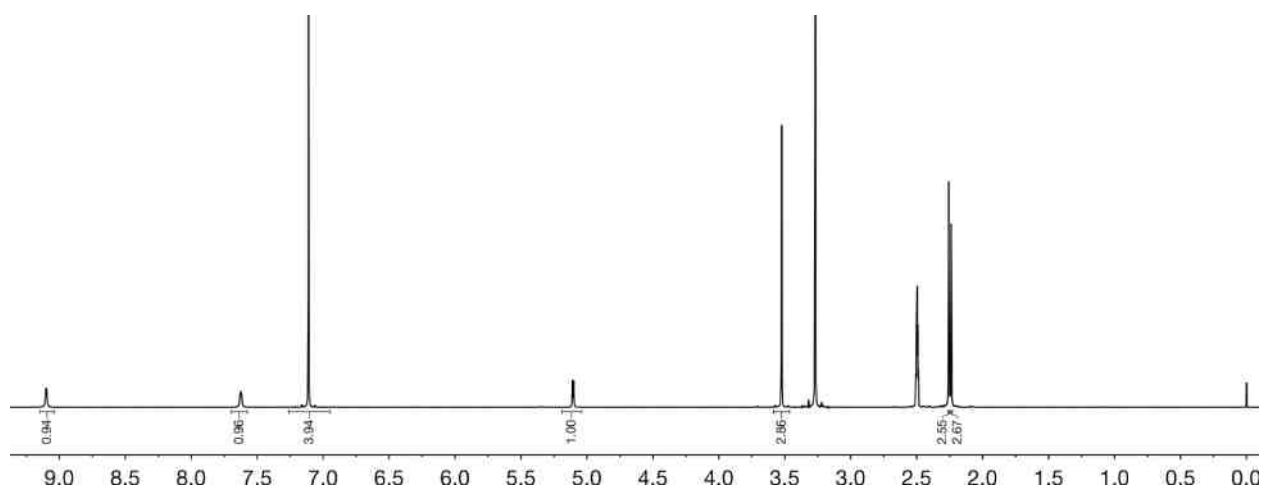
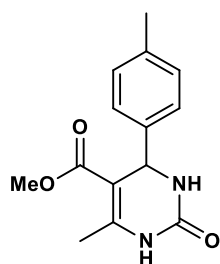


¹H NMR spektar jedinjenja **6-1** u CD₃SOCD₃ (400 MHz)

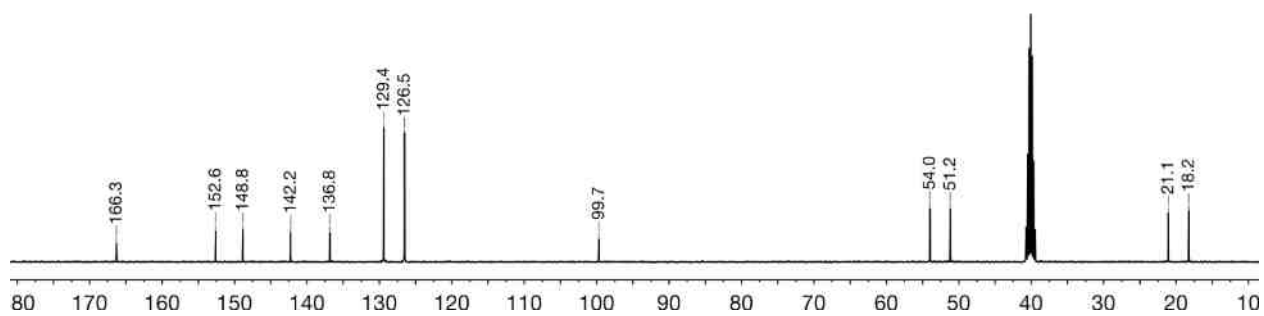


¹³C NMR spektar jedinjenja **6-1** u CD₃SOCD₃ (100,6 MHz)

Prilog 64. Metil-6-metil-2-okso-4-(*p*-tolil)-1,2,3,4-tetrahidropirimidin-5-karboksilat (6-2)

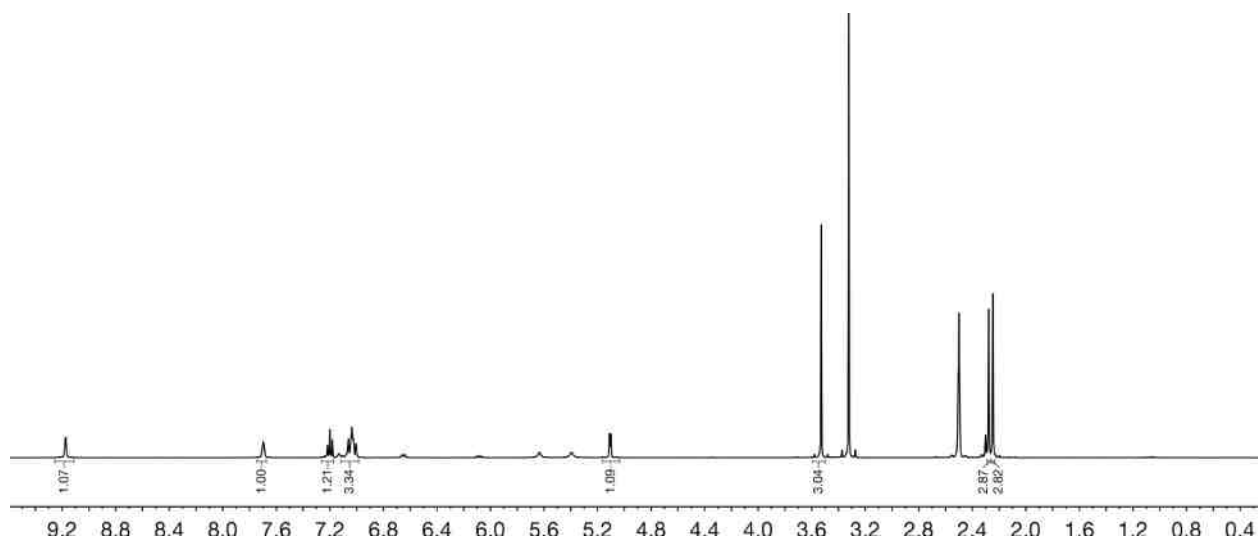
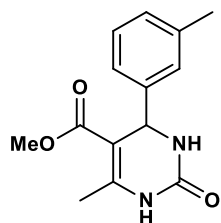


^1H NMR spektar jedinjenja **6-2** u CD_3SOCD_3 (400 MHz)

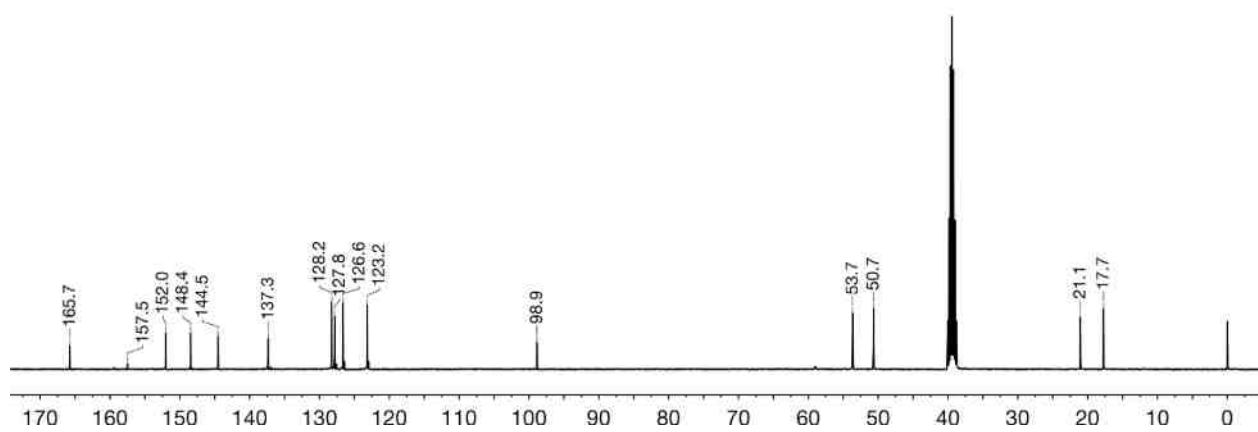


^{13}C NMR NMR spektar jedinjenja **6-2** u CD_3SOCD_3 (100,6 MHz)

Prilog 65. Metil-6-metil-2-okso-4-(*m*-tolil)-1,2,3,4-tetrahidropirimidin-5-karboksilat (**6-3**)

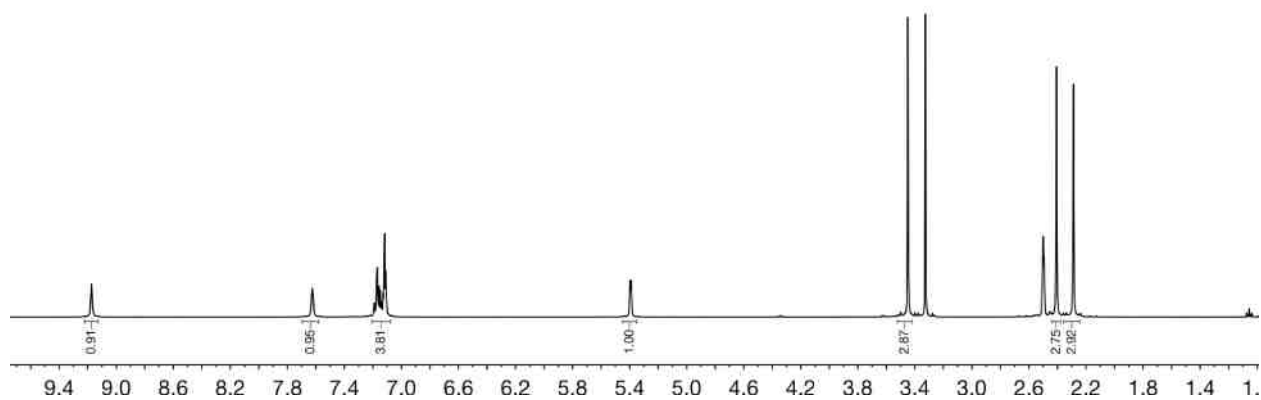
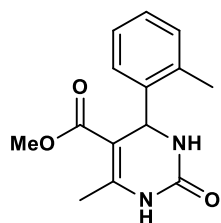


^1H NMR spektar jedinjenja **6-3** u CD_3SOCD_3 (400 MHz)

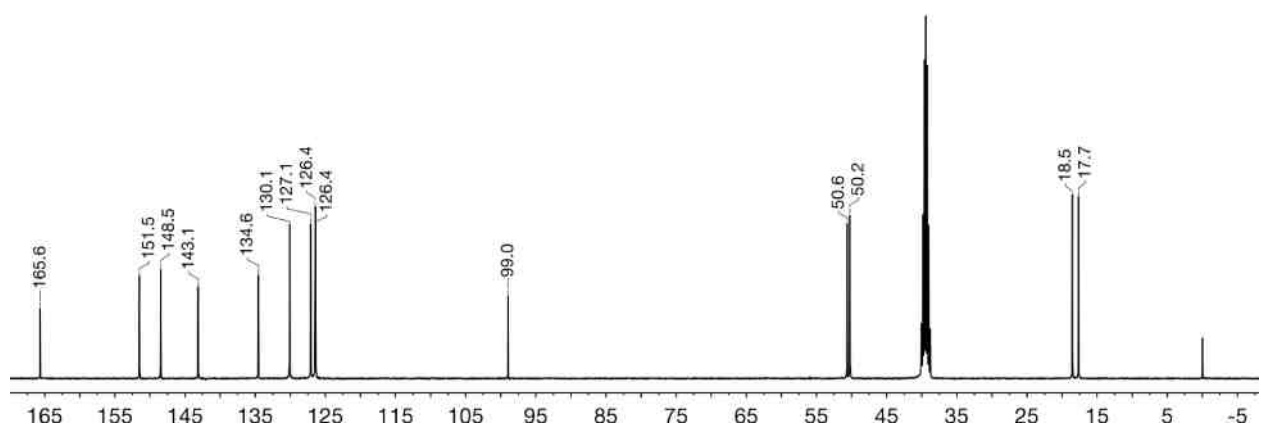


^{13}C NMR NMR spektar jedinjenja **6-3** u CD_3SOCD_3 (100,6 MHz)

Prilog 66. Metil-6-metil-2-okso-4-(*o*-tolil)-1,2,3,4-tetrahidropirimidin-5-karboksilat (**6-4**)

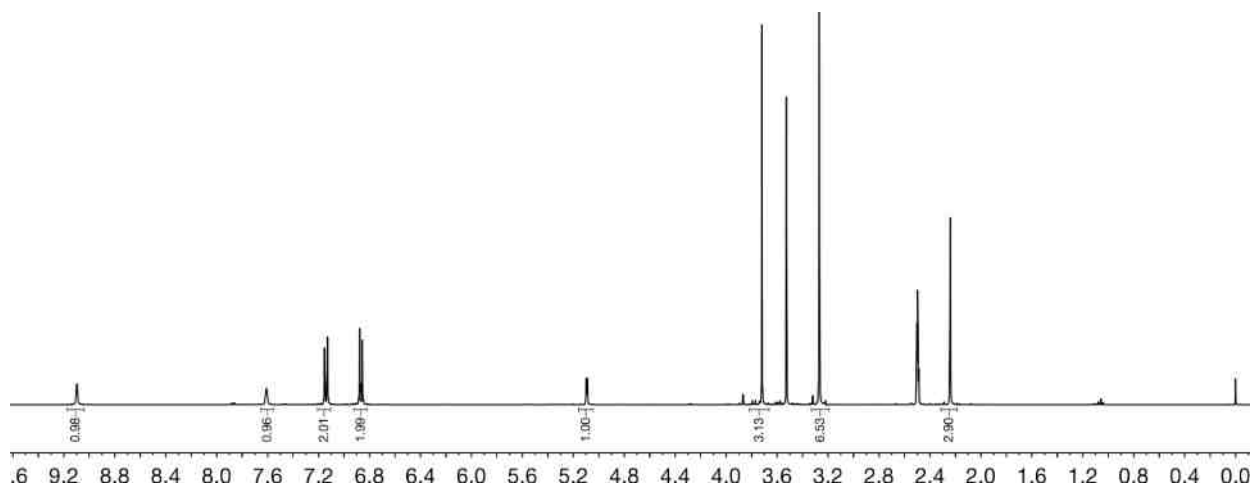
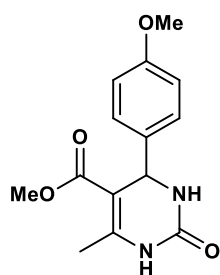


¹H NMR spektar jedinjenja **6-4** u CD₃SOCD₃ (400 MHz)

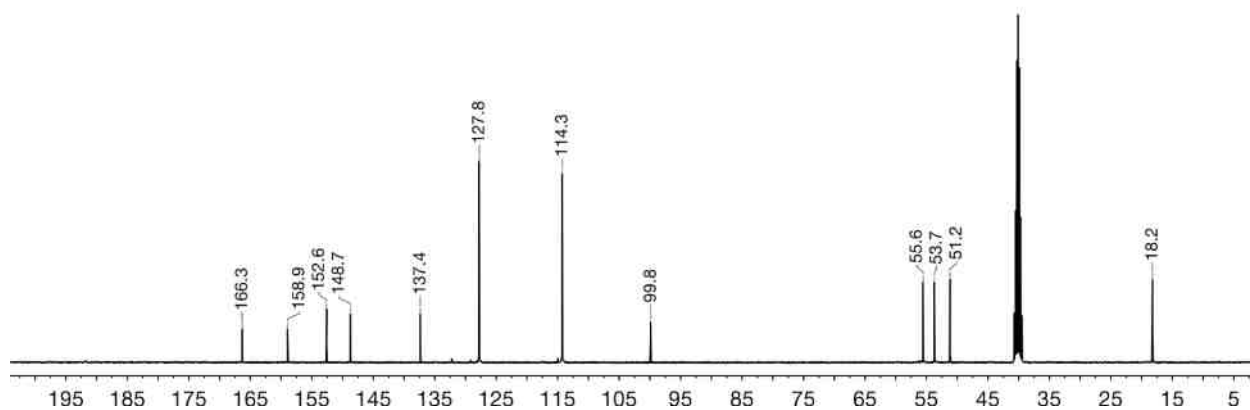


¹³C NMR NMR spektar jedinjenja **6-4** u CD₃SOCD₃ (100,6 MHz)

Prilog 67. Metil-6-metil-4-(4-metoksifenil)-2-okso-1,2,3,4-tetrahidropirimidin-5-karboksilat (**6-5**)

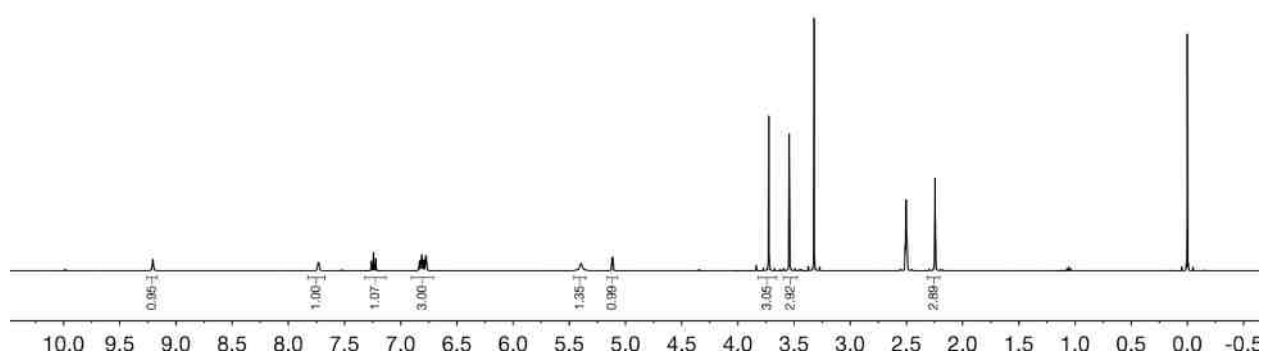
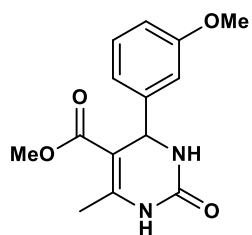


^1H NMR spektar jedinjenja **6-5** u CD_3SOCD_3 (400 MHz)

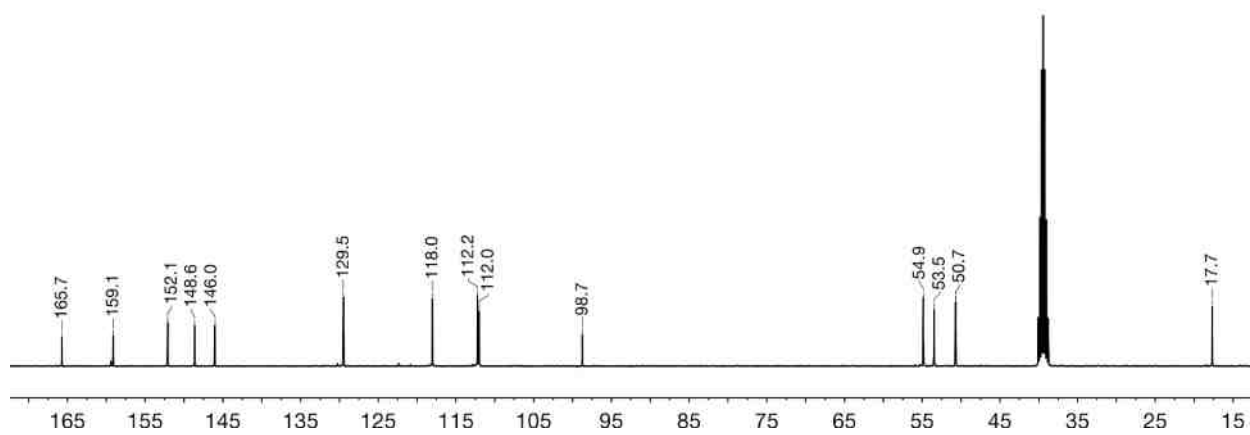


^{13}C NMR spektar jedinjenja **6-5** u CD_3SOCD_3 (100,6 MHz)

Prilog 68. Metil-6-metil-4-(3-metoksifenil)-2-okso-1,2,3,4-tetrahidropirimidin-5-karboksilat (**6-6**)

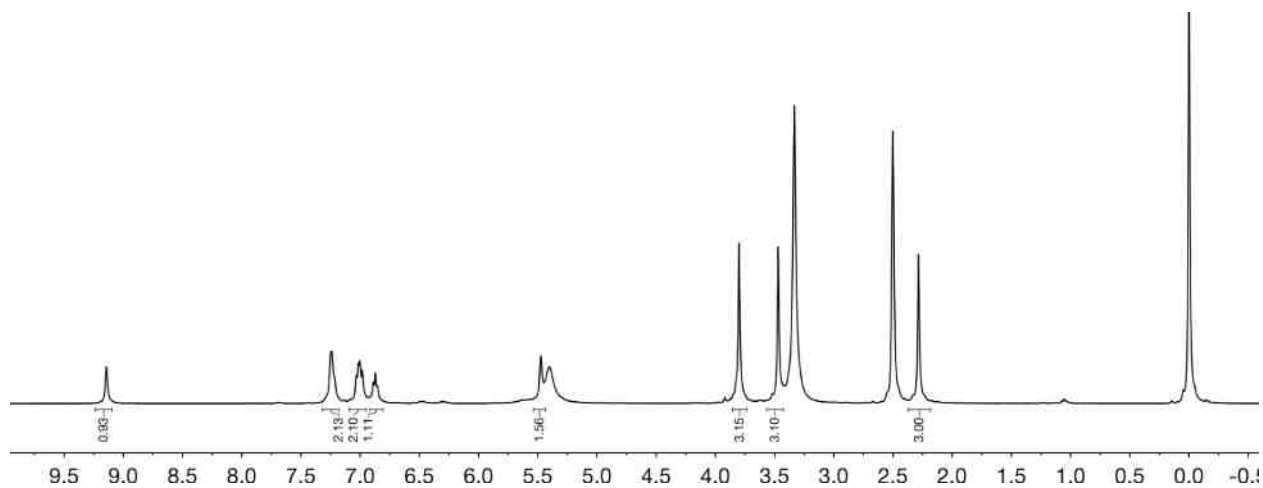
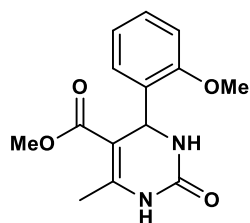


^1H NMR spektar jedinjenja **6-6** u CD_3SOCD_3 (400 MHz)

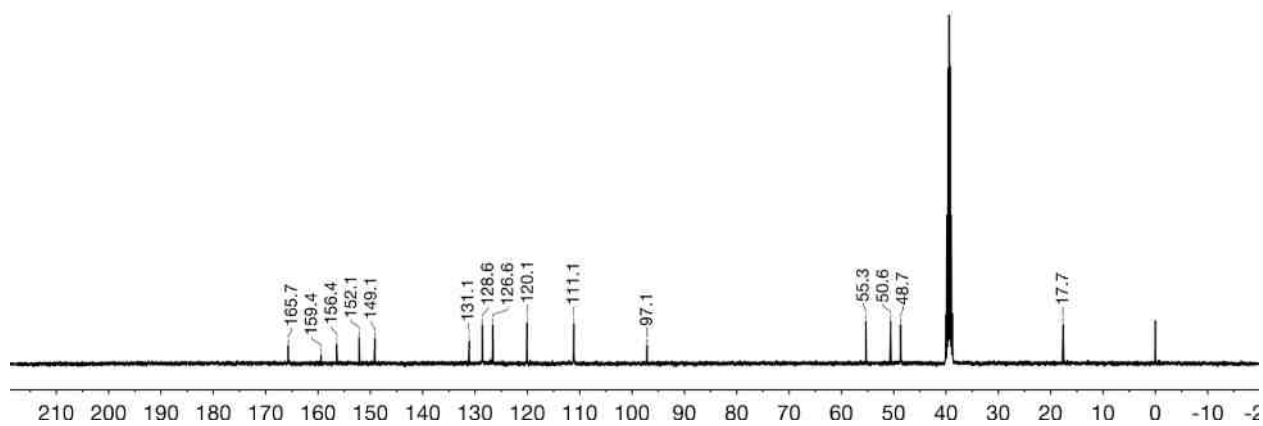


^{13}C NMR spektar jedinjenja **6-6** u CD_3SOCD_3 (100,6 MHz)

Prilog 69. Metil-6-metil-4-(2-metoksifenil)-2-okso-1,2,3,4-tetrahidropirimidin-5-karboksilat (**6-7**)

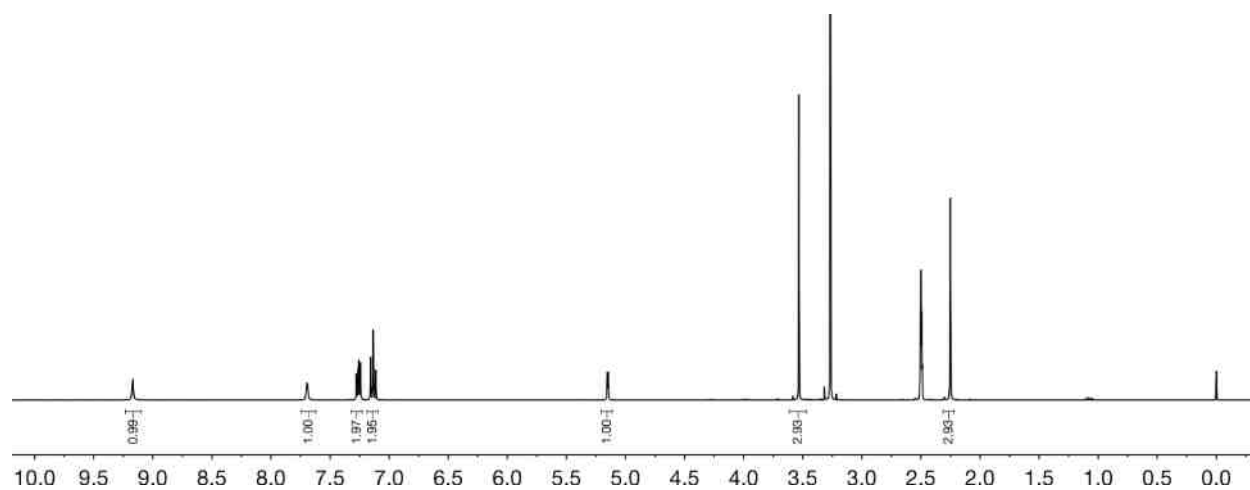
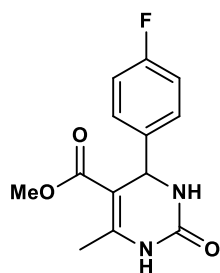


¹H NMR spektar jedinjenja **6-7** u CD₃SOCD₃ (400 MHz)

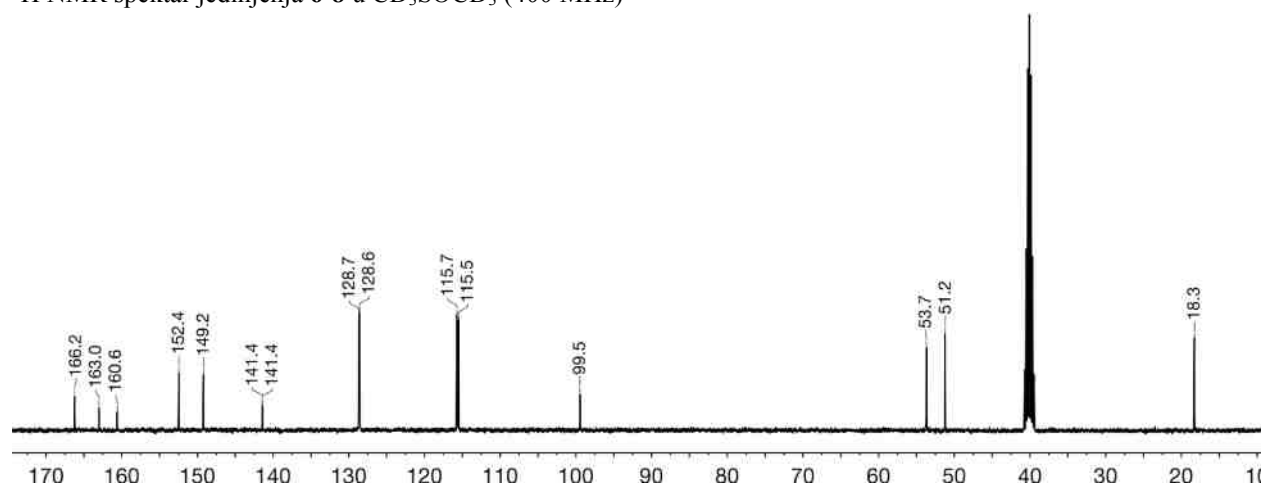


¹³C NMR spektar jedinjenja **6-7** u CD₃SOCD₃ (100,6 MHz)

Prilog 70. Metil-4-(4-fluorofenil)-6-metil-2-okso-1,2,3,4-tetrahidropirimidin-5-karboksilat (**6-8**)

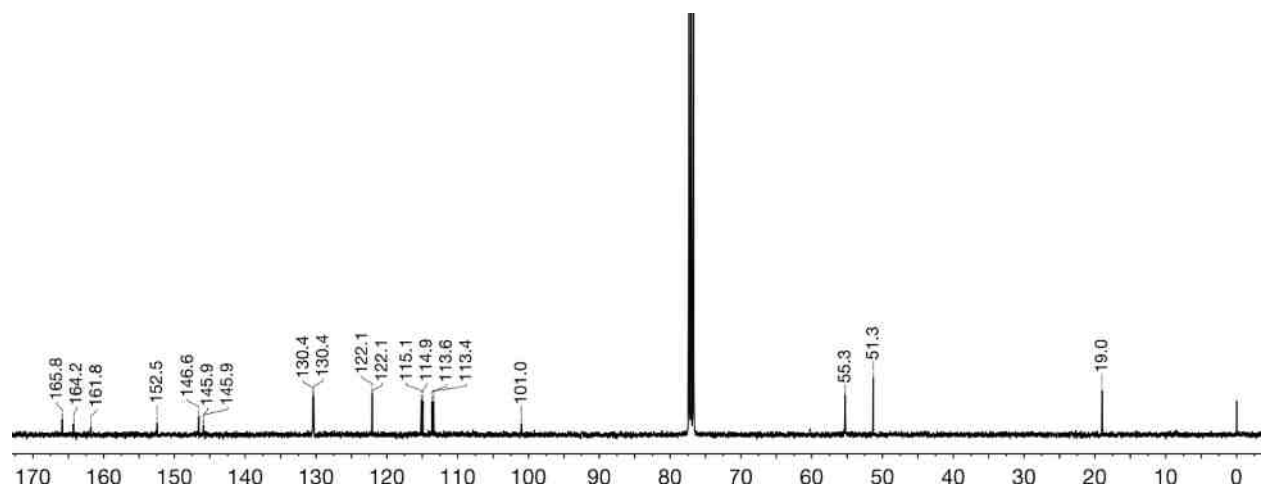
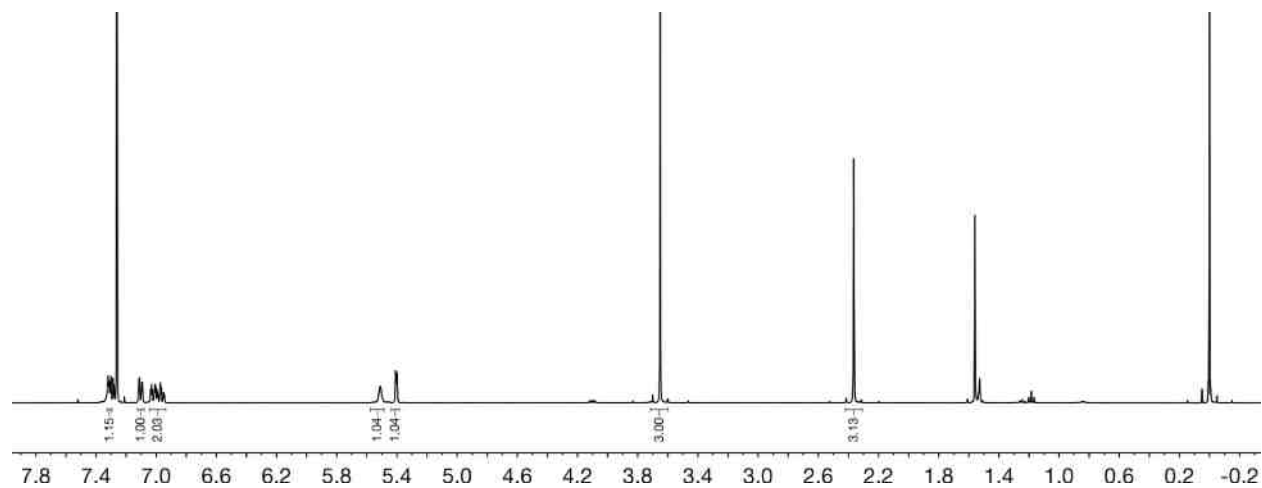
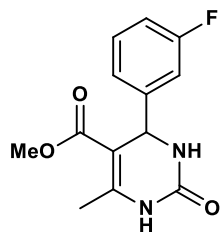


^1H NMR spektar jedinjenja **6-8** u CD_3SOCD_3 (400 MHz)

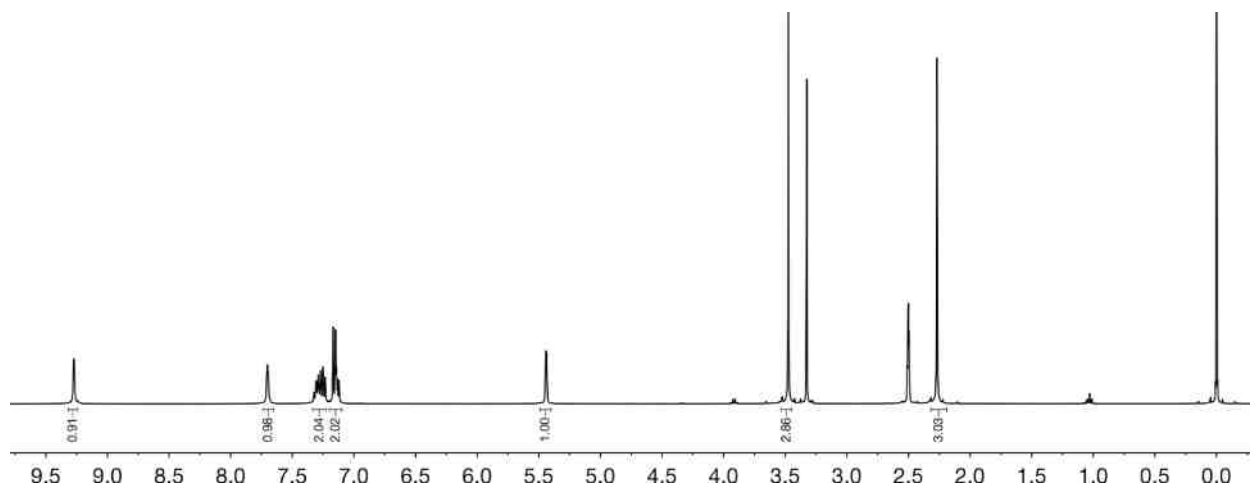
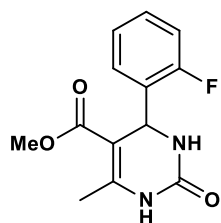


^{13}C NMR spektar jedinjenja **6-8** u CD_3SOCD_3 (100,6 MHz)

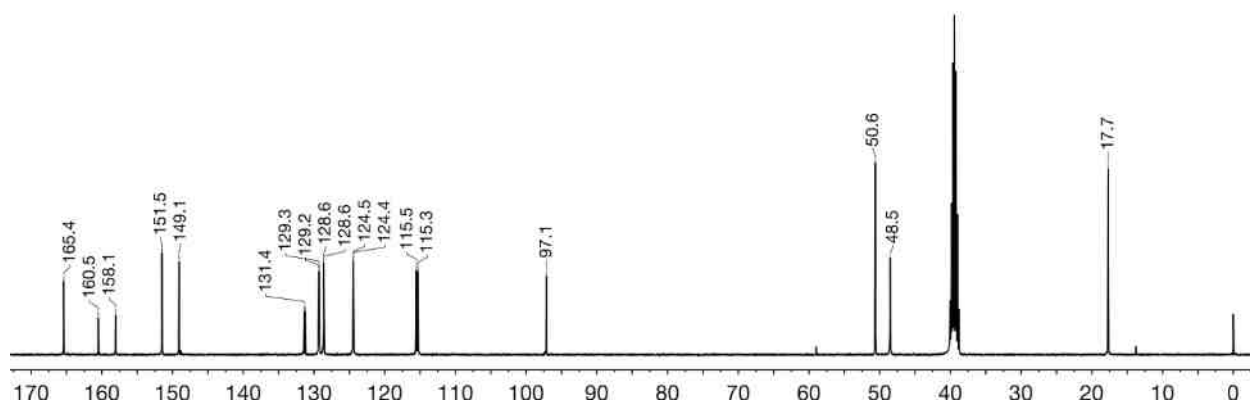
Prilog 71. Metil-4-(3-fluorofenil)-6-metil-2-okso-1,2,3,4-tetrahidropirimidin-5-karboksilat (**6-9**)



Prilog 72. Metil-4-(2-fluorofenil)-6-metil-2-okso-1,2,3,4-tetrahidropirimidin-5-karboksilat (**6-10**)

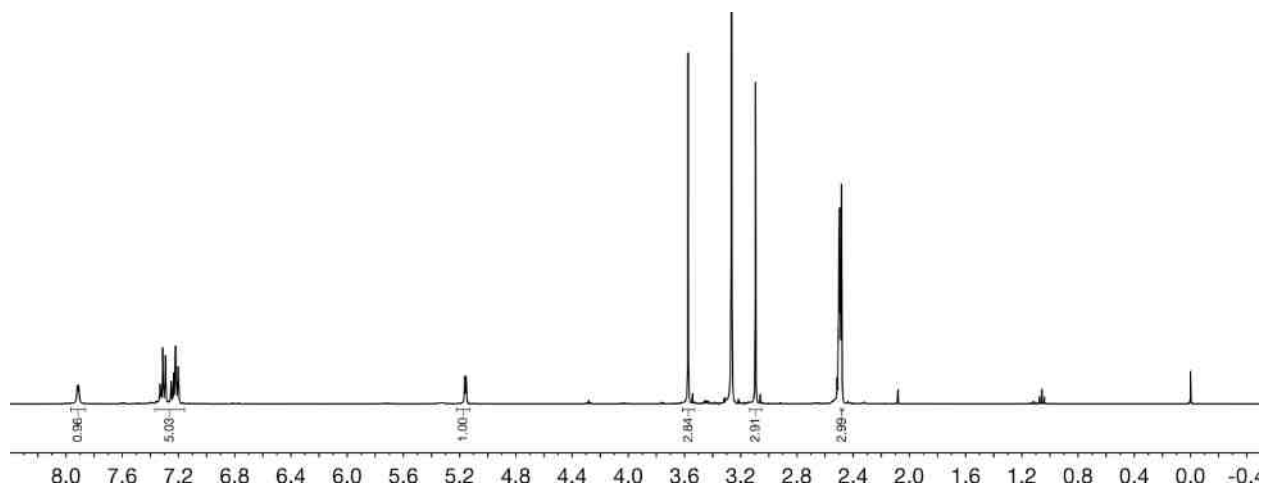
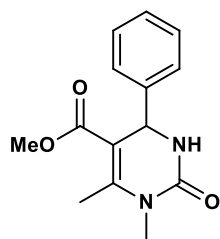


¹H NMR spektar jedinjenja **6-10** u CD₃SOCD₃ (400 MHz)

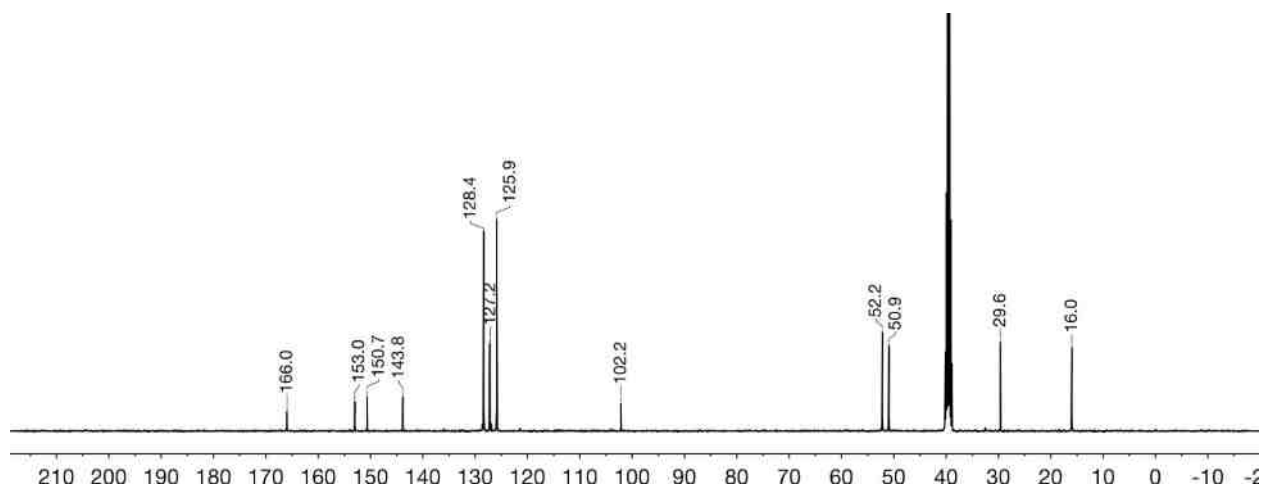


¹³C NMR spektar jedinjenja **6-10** u CD₃SOCD₃ (100,6 MHz)

Prilog 73. Metil-4-fenil-1,6-dimetil-2-okso-1,2,3,4-tetrahidropirimidin-5-karboksilat (**6-12**)

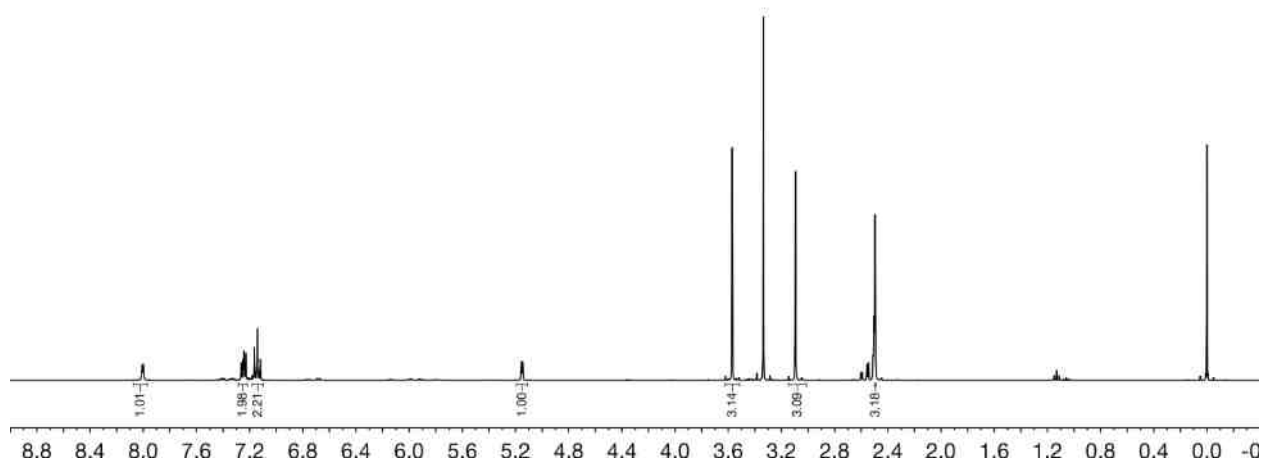
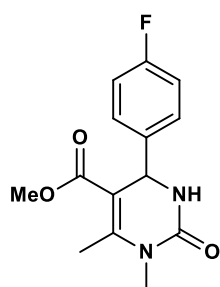


¹H NMR spektar jedinjenja **6-12** in CD₃SOCD₃ (400 MHz)

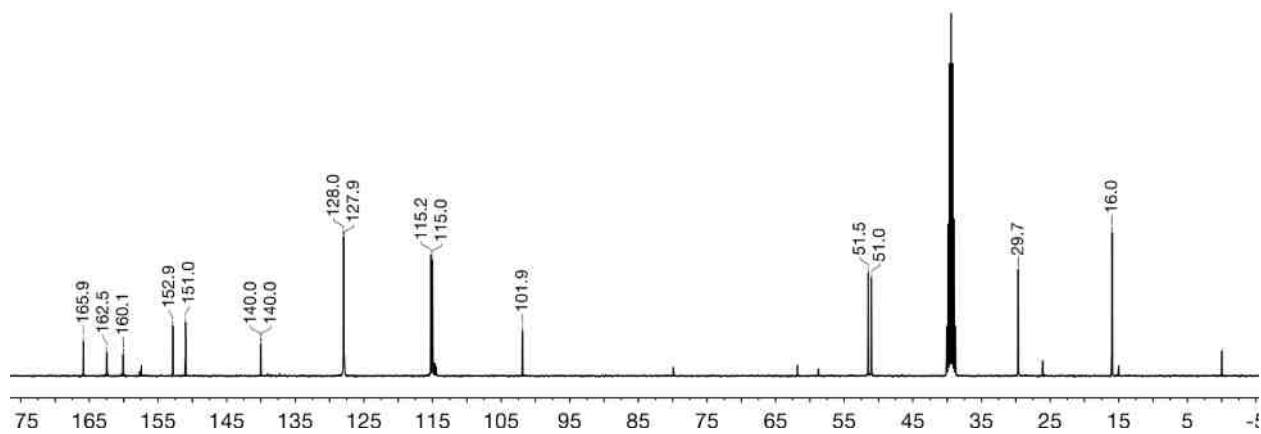


¹³C NMR spektar jedinjenja **6-12** in CD₃SOCD₃ (100,6 MHz)

Prilog 74. Metil-4-(4-fluorofenil)-1,6-dimetil-2-okso-1,2,3,4-tetrahidropirimidin-5-karboksilat (**6-13**)

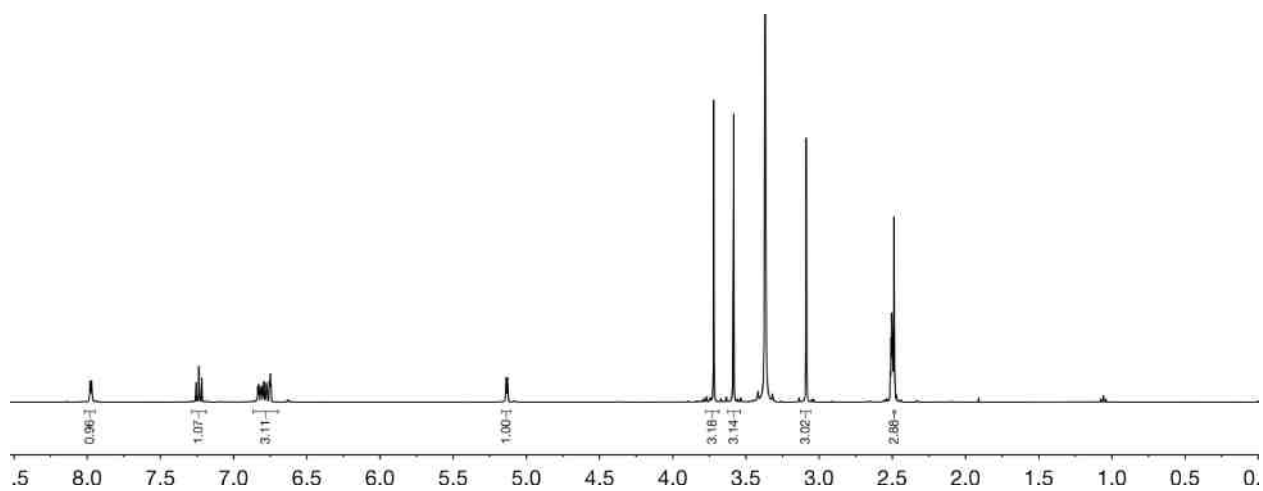
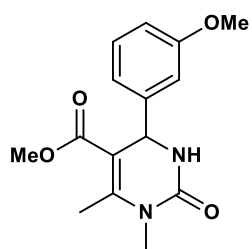


¹H NMR spektar jedinjenja **6-13** u CD₃SOCD₃ (400 MHz)

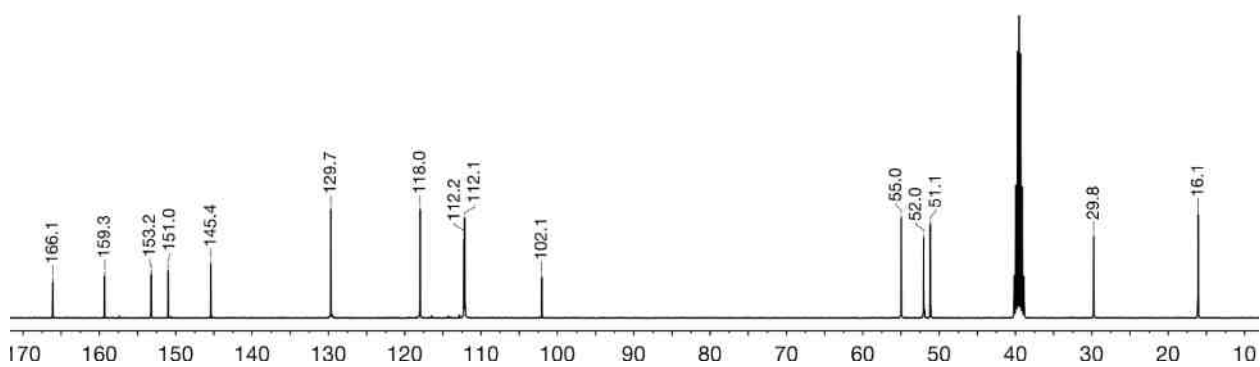


¹³C NMR spektar jedinjenja **6-13** u CD₃SOCD₃ (100,6 MHz)

Prilog 75. Metil-1,6-dimetil-4-(3-metoksifenil)-2-okso-1,2,3,4-tetrahidropirimidin-5-karboksilat (**6-14**)

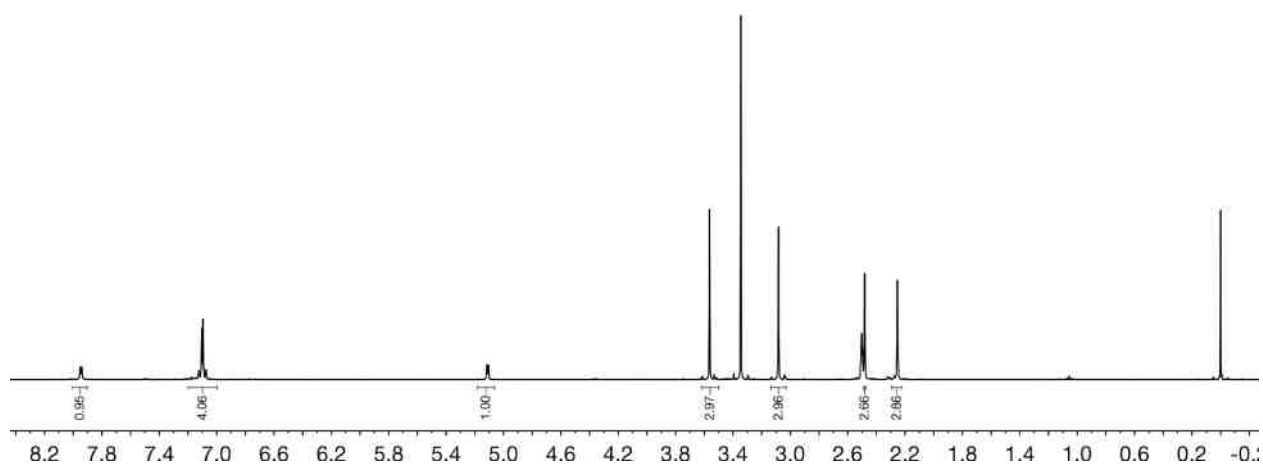
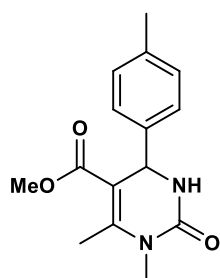


^1H NMR spektar jedinjenja **6-14** u CD_3SOCD_3 (400 MHz)

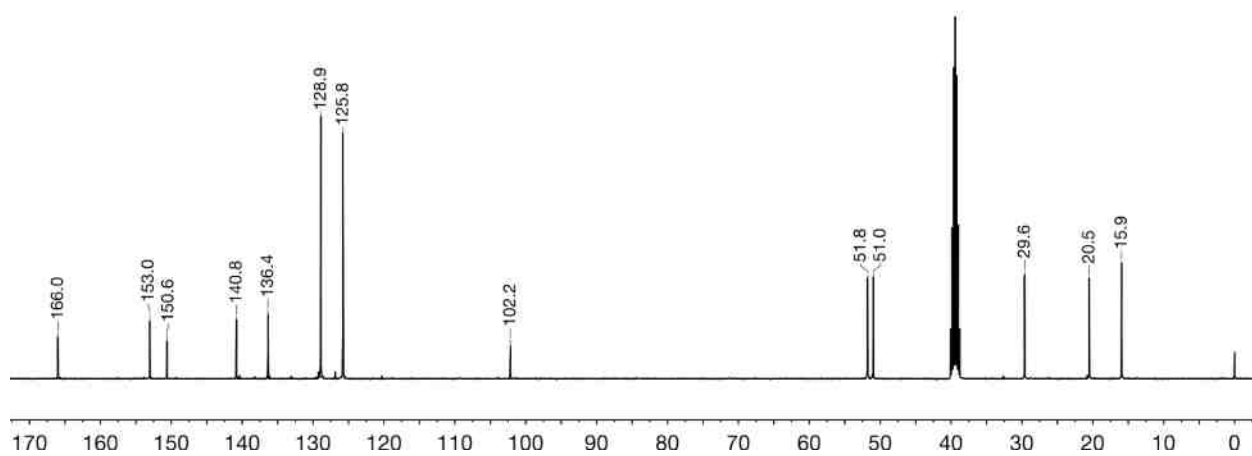


^{13}C NMR NMR spektar jedinjenja **6-14** u CD_3SOCD_3 (100,6 MHz)

Prilog 76. Metil-1,6-dimetil-2-okso-4-(*p*-tolil)-1,2,3,4-tetrahidropirimidin-5-karboksilat (**6-15**)

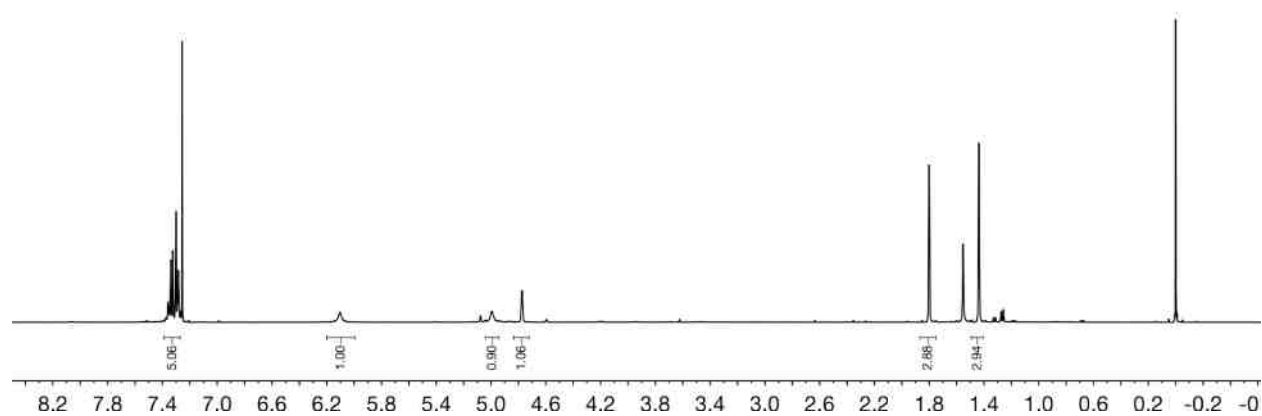
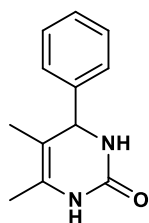


^1H NMR spektar jedinjenja **6-15** u CD_3SOCD_3 (400 MHz)

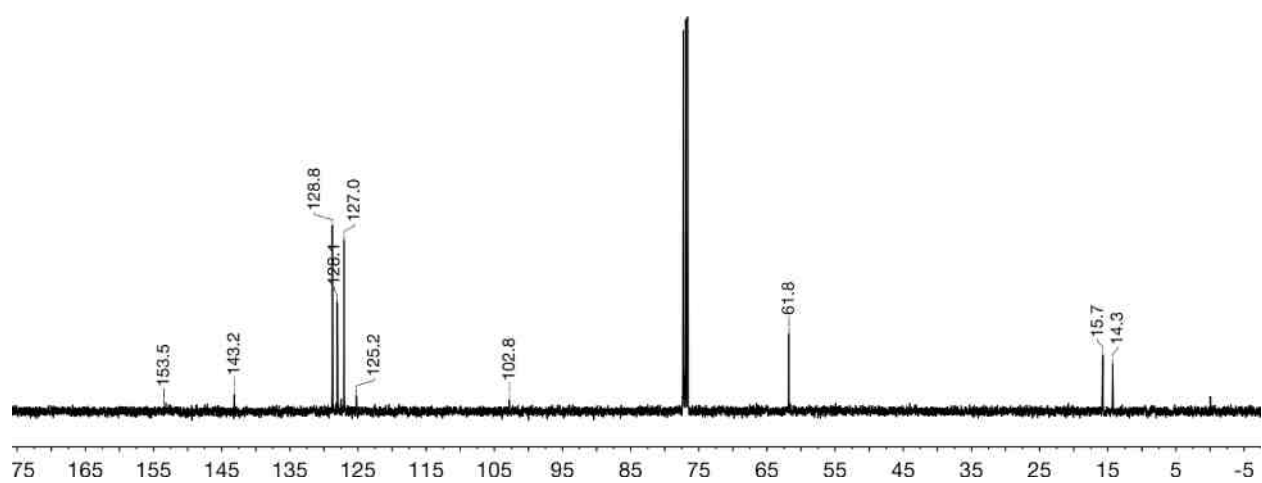


^{13}C NMR spektar jedinjenja **6-15** u CD_3SOCD_3 (100,6 MHz)

Prilog 77. 4-fenil-5,6-dimetil-3,4-dihidropirimidin-2(1*H*)-on (**6-1a**)

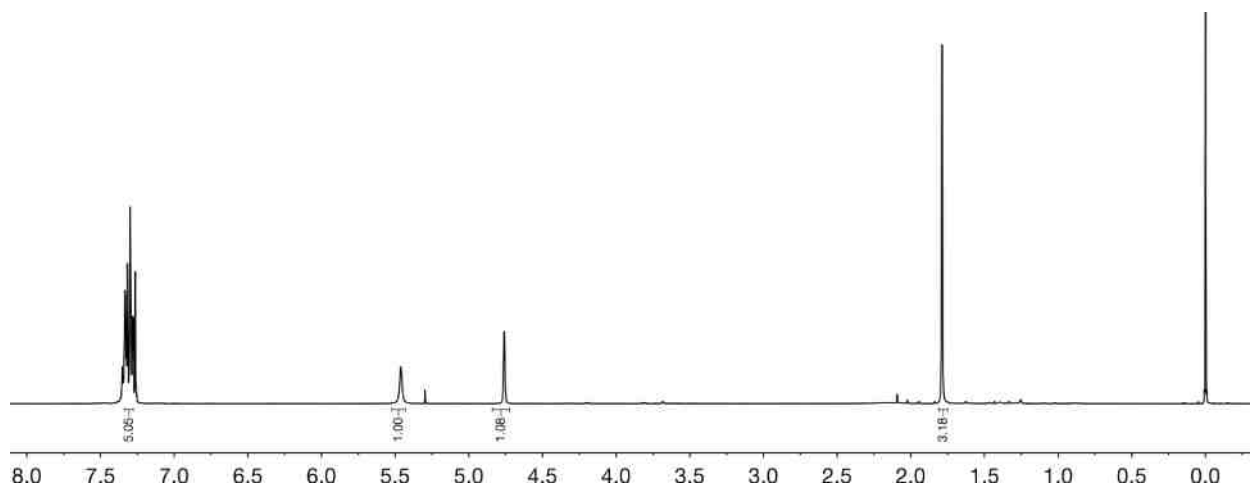
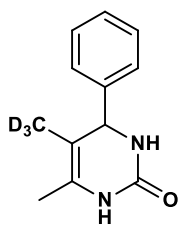


¹H NMR spektar jedinjenja **6-1a** u CDCl₃ (400 MHz)

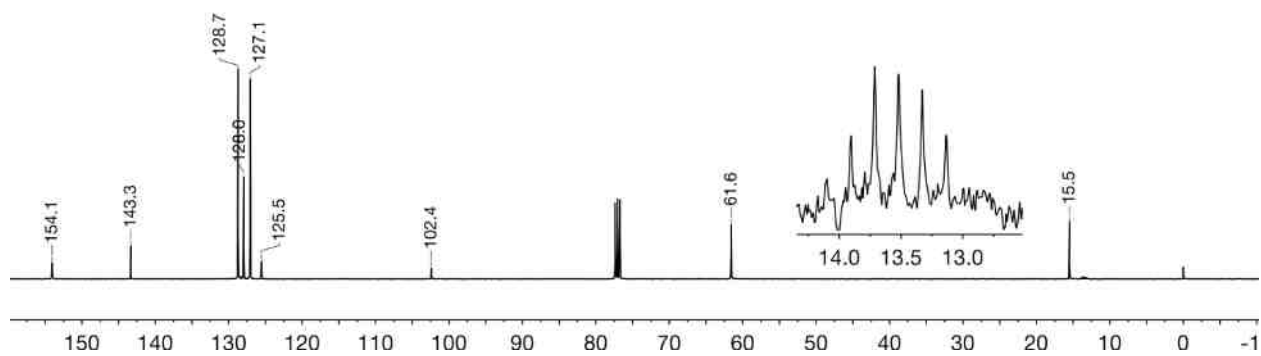


¹³C NMR spektar jedinjenja **6-1a** u CDCl₃ (100,6 MHz)

(6-1a, deuterisan na C-8)

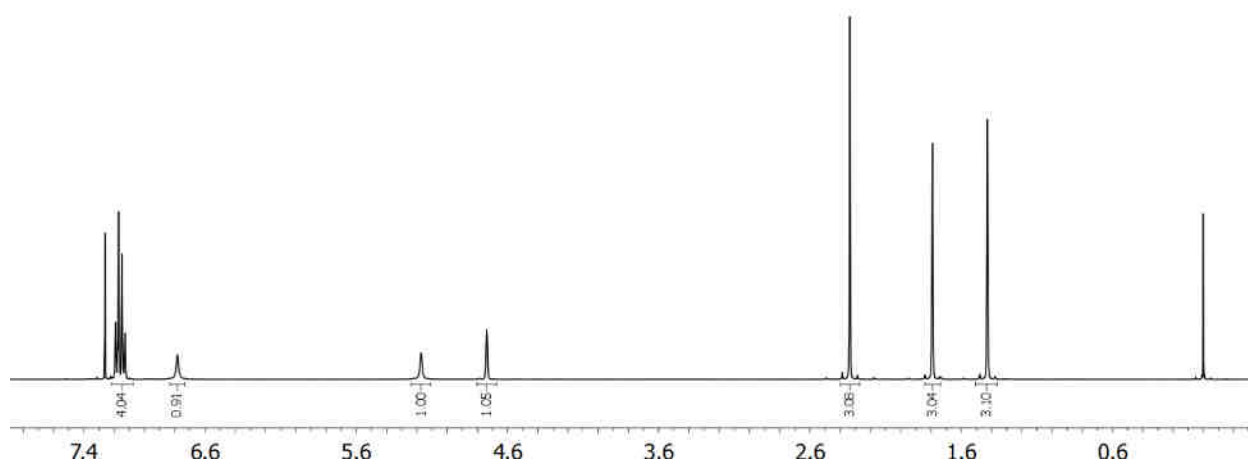
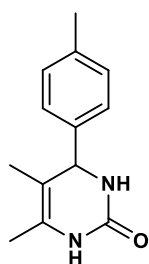


^1H NMR spektar jedinjenja **6-1a** (deuterisanog u položaju C-8) u CDCl_3 (400 MHz)

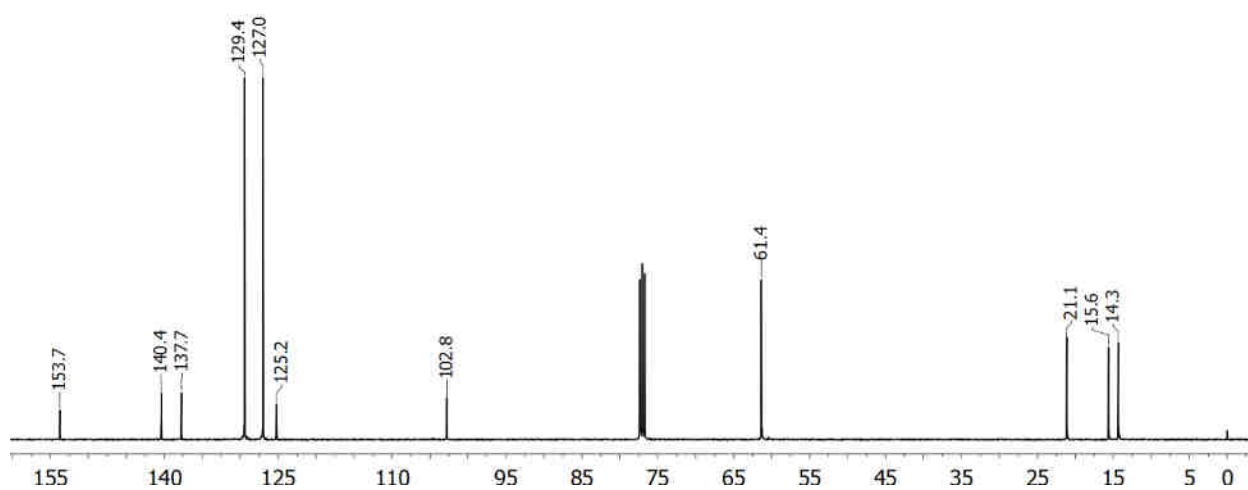


^{13}C NMR spektar jedinjenja **6-1a** (deuterisanog u položaju C-8) u CDCl_3 (100,6 MHz)

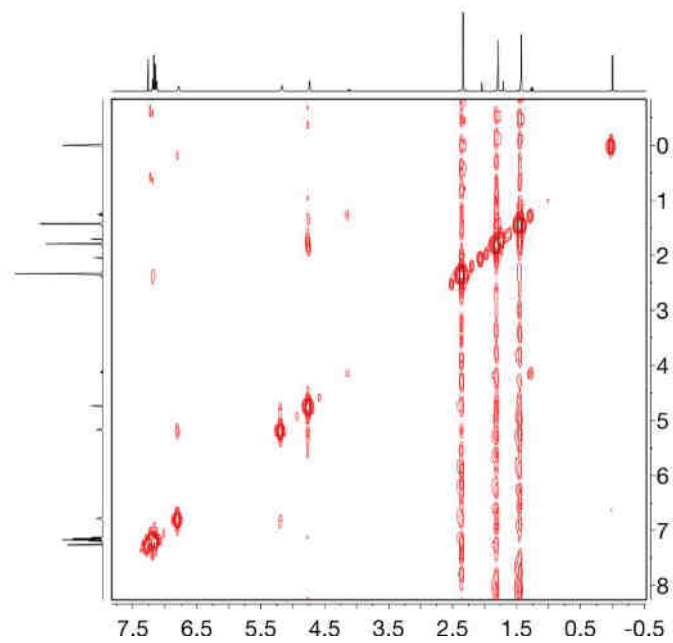
Prilog 78. 5,6-dimetil-4-(*p*-tolil)-3,4-dihidropirimidin-2(1*H*)-on (**6-2a**)



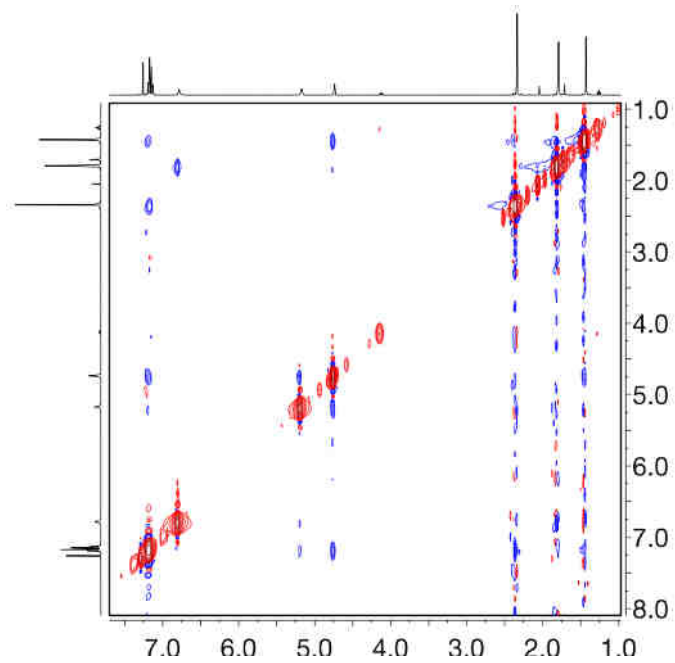
¹H NMR spektar jedinjenja **6-2a** u CDCl₃ (400 MHz)



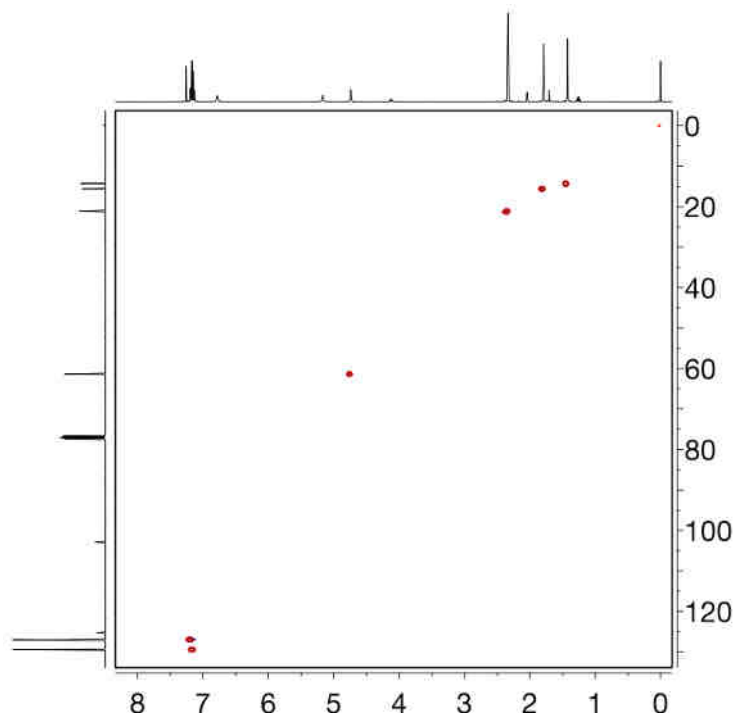
¹³C NMR spektar jedinjenja **6-2a** u CDCl₃ (100,6 MHz)



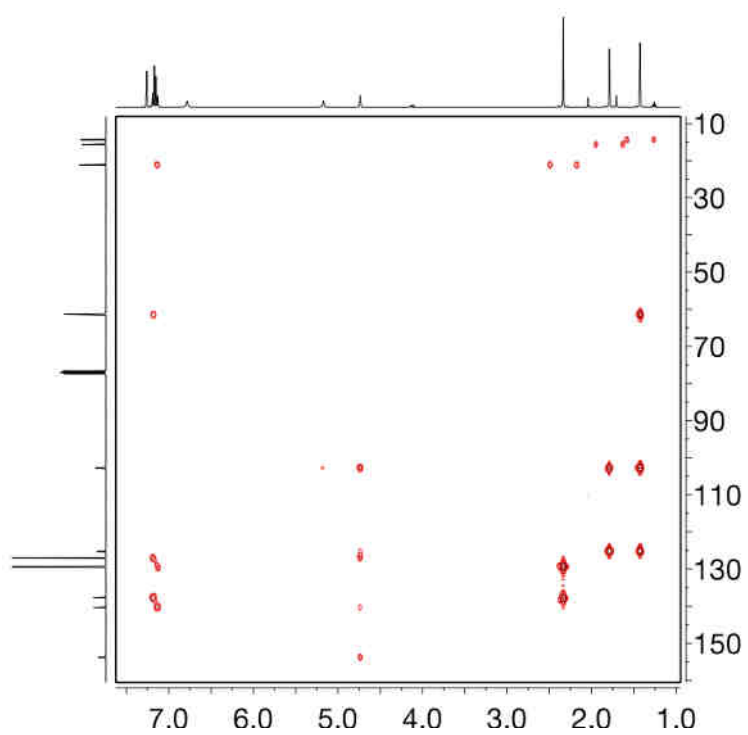
^1H - ^1H COSY spektar jedinjenja **6-2a** u CDCl_3 (400 MHz)



NOESY spektar jedinjenja **6-2a** u CDCl_3 (400 MHz)

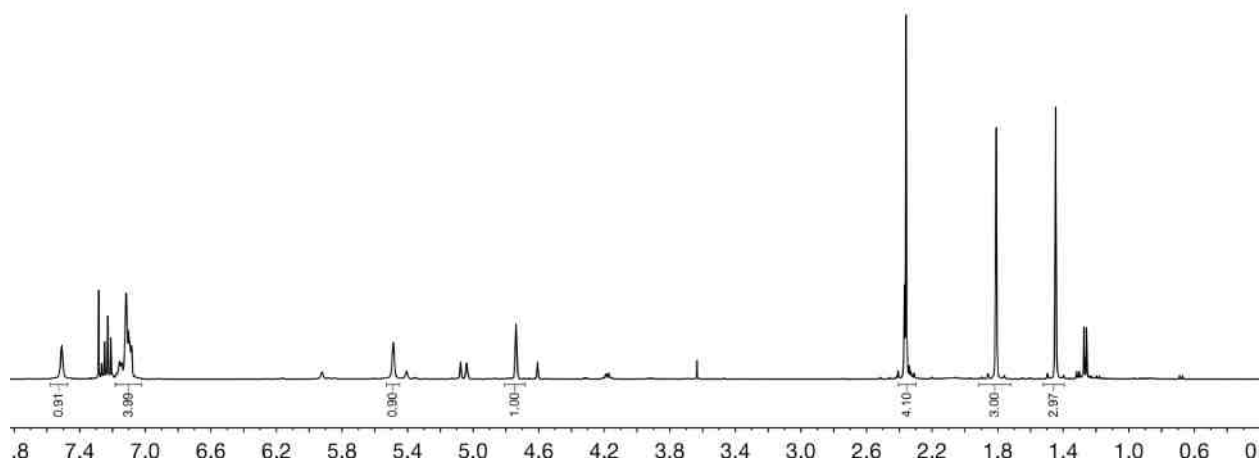
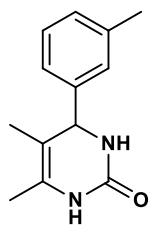


HSQC spektar jedinjenja **6-2a** u CDCl_3

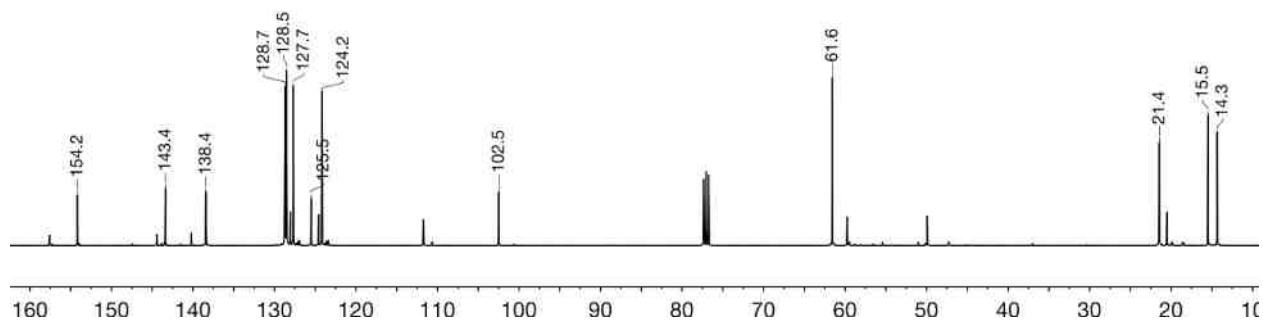


HMBC spektar jedinjenja **6-2a** u CDCl_3 (400 i 100,6 MHz)

Prilog 79. 5,6-dimetil-4-(*m*-tolil)-3,4-dihidropirimidin-2(1*H*)-on (**6-3a**)

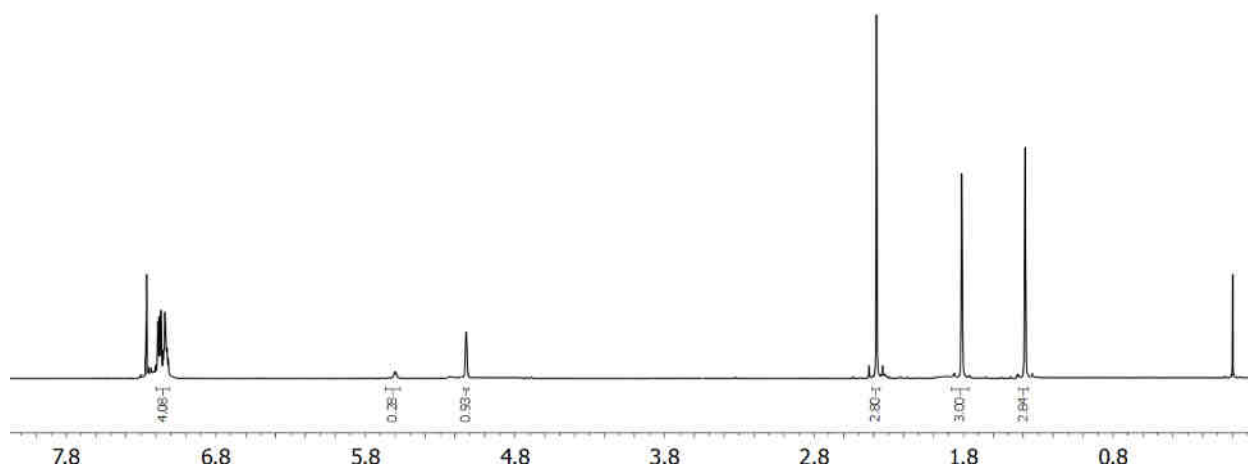
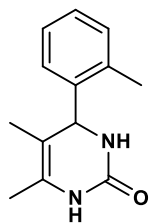


¹H NMR spektar jedinjenja **6-3a** u CDCl₃ (400 MHz)

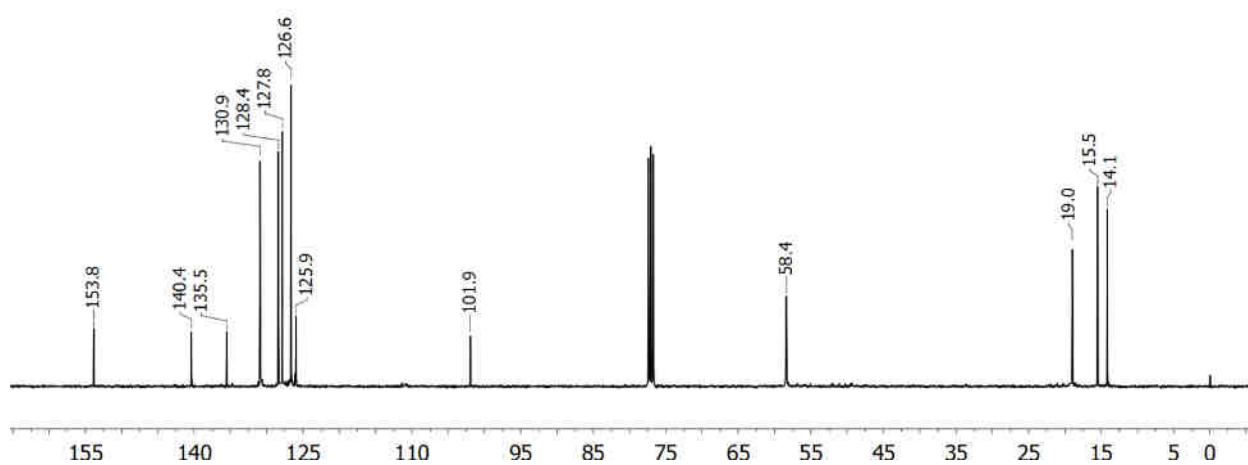


¹³C NMR spektar jedinjenja **6-3a** u CDCl₃ (100,6 MHz)

Prilog 80. 5,6-dimetil-4-(*o*-tolil)-3,4-dihidropirimidin-2(1*H*)-on (**6-4a**)

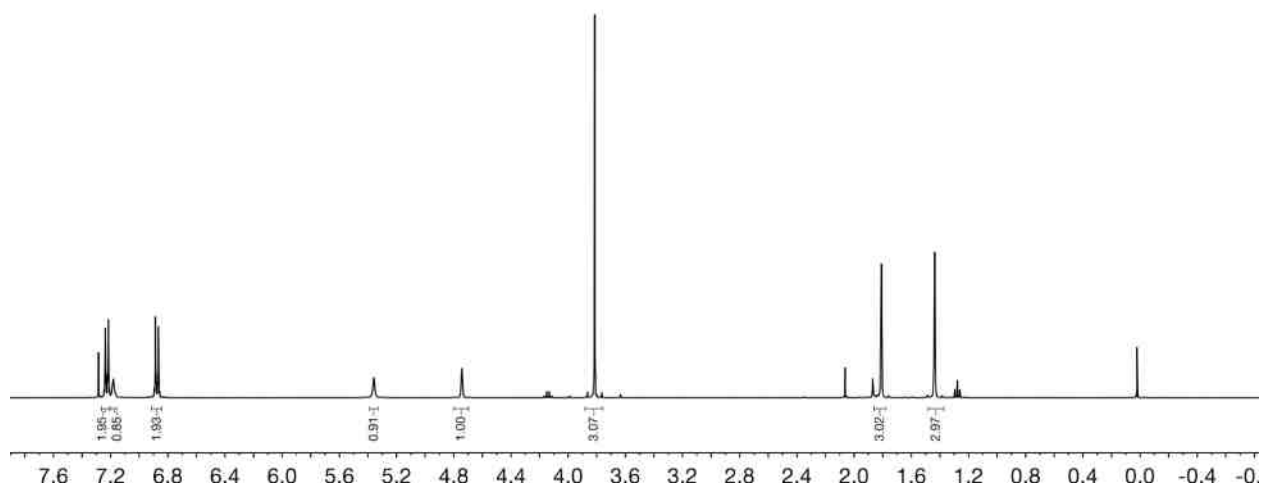
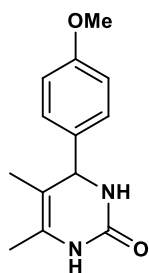


¹H NMR spektar jedinjenja **6-4a** u CDCl₃ (400 MHz)

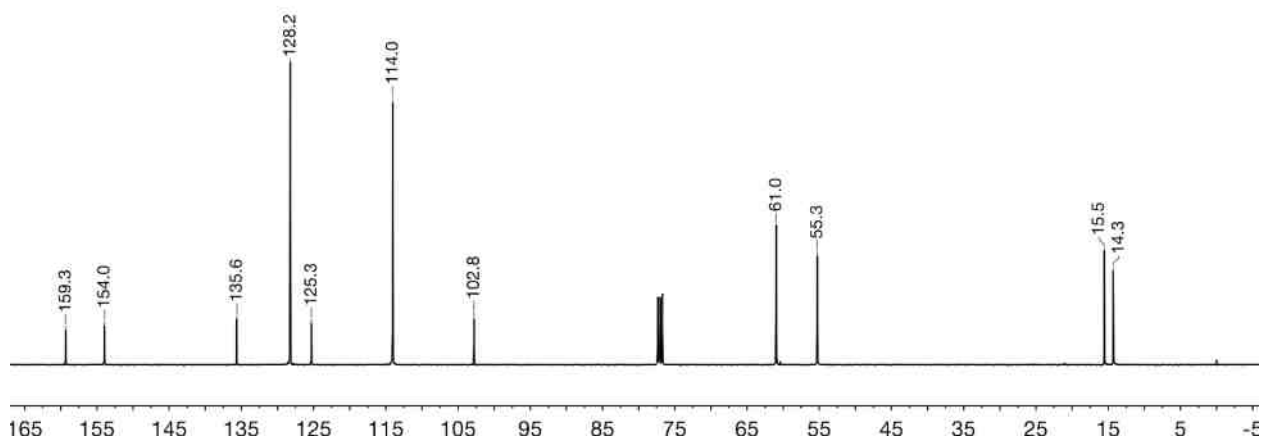


¹³C NMR spektar jedinjenja **6-4a** u CDCl₃ (100,6 MHz)

Prilog 81. 5,6-dimetil-4-(4-metoksifenil)-3,4-dihidropirimidin-2(1H)-on (**6-5a**)

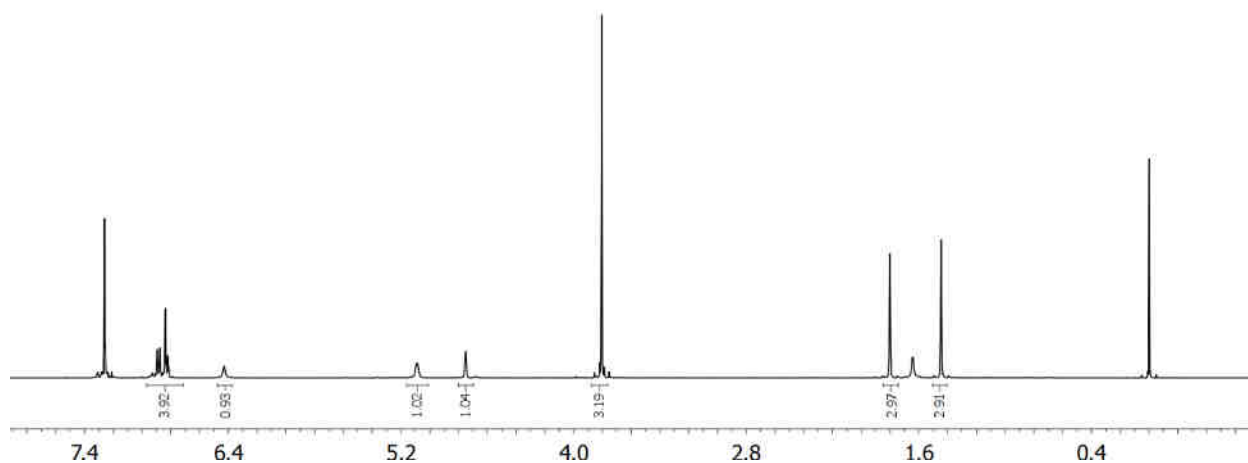
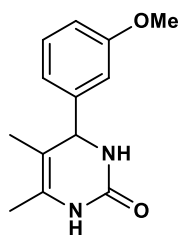


¹H NMR spektar jedinjenja **6-5a** u CDCl₃ (400 MHz)

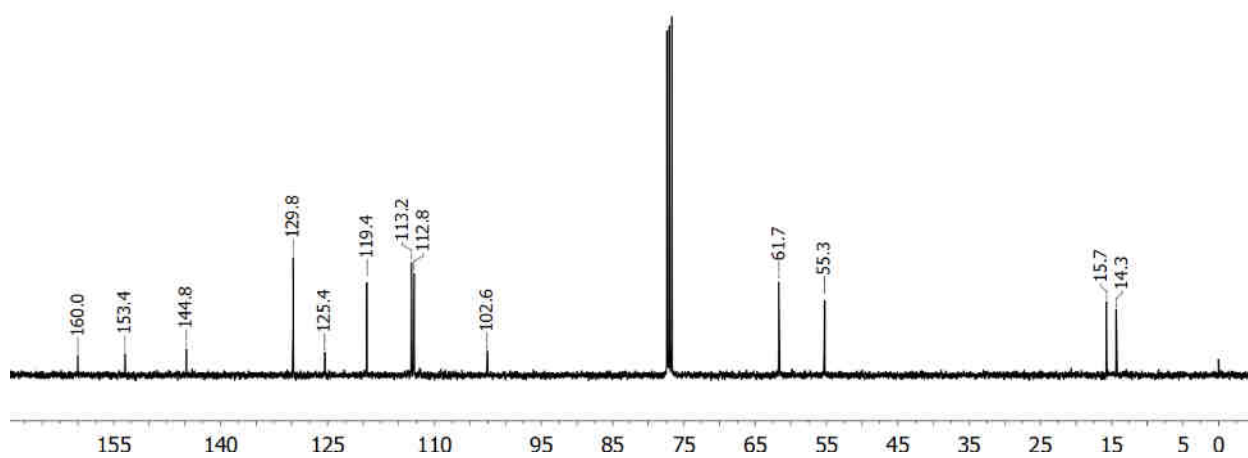


¹³C NMR spektar jedinjenja **6-5a** u CDCl₃ (100,6 MHz)

Prilog 82. 5,6-dimetil-4-(3-metoksifenil)-3,4-dihidropirimidin-2(1H)-on (**6-6a**)

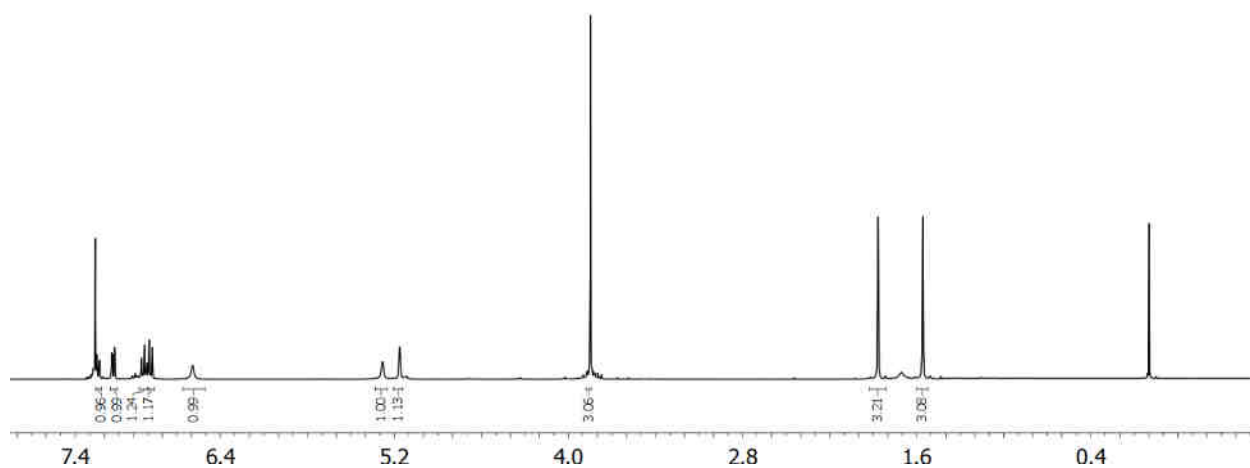
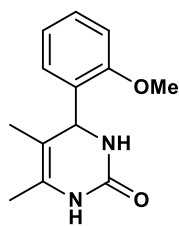


¹H NMR spektar jedinjenja **6-6a** u CDCl₃ (400 MHz)

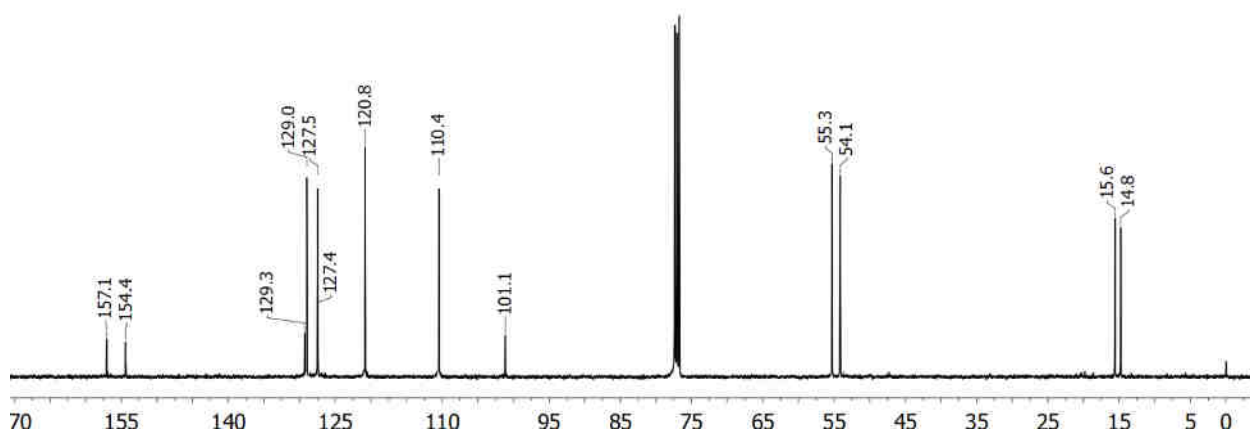


¹³C NMR spektar jedinjenja **6-6a** u CDCl₃ (100,6 MHz)

Prilog 83. 5,6-dimetil-4-(2-metoksifenil)-3,4-dihidropirimidin-2(1H)-on (**6-7a**)

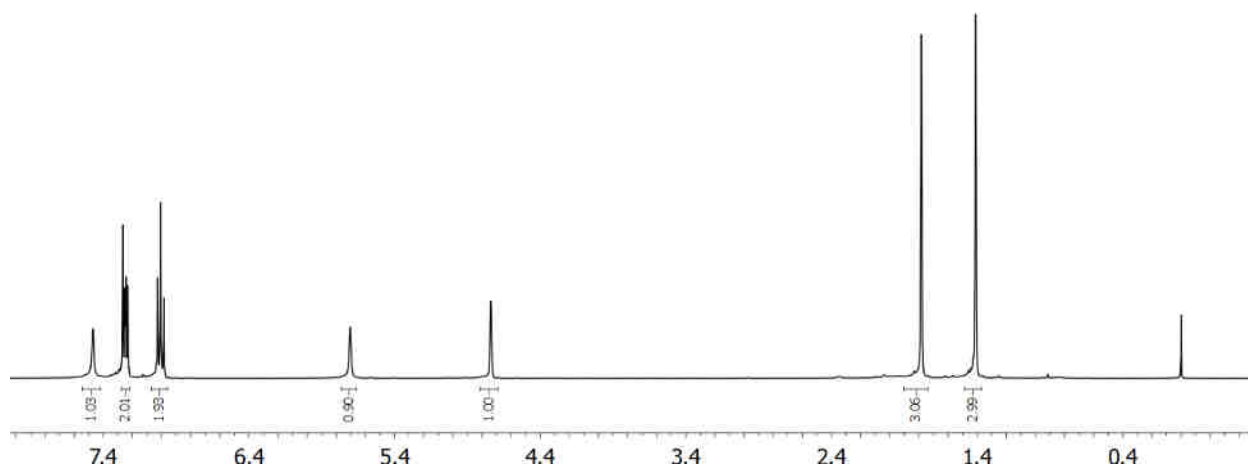
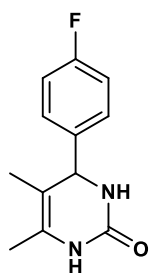


¹H NMR spektar jedinjenja **6-7a** u CDCl₃ (400 MHz)

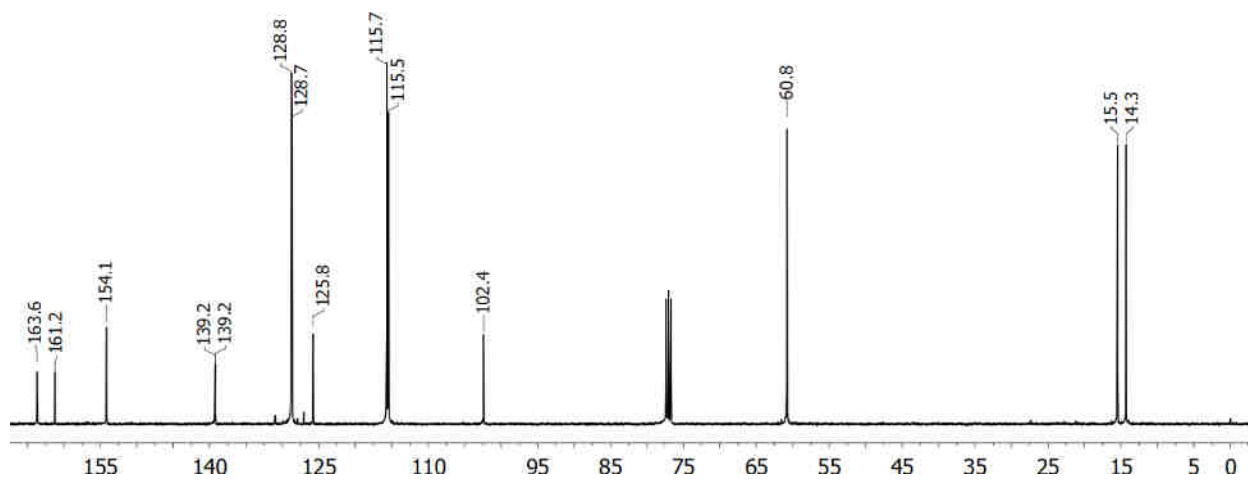


¹³C NMR spektar jedinjenja **6-7a** u CDCl₃ (100,6 MHz)

Prilog 84. 4-(4-fluorofenil)-5,6-dimetil-3,4-dihidropirimidin-2(1H)-on (**6-8a**)

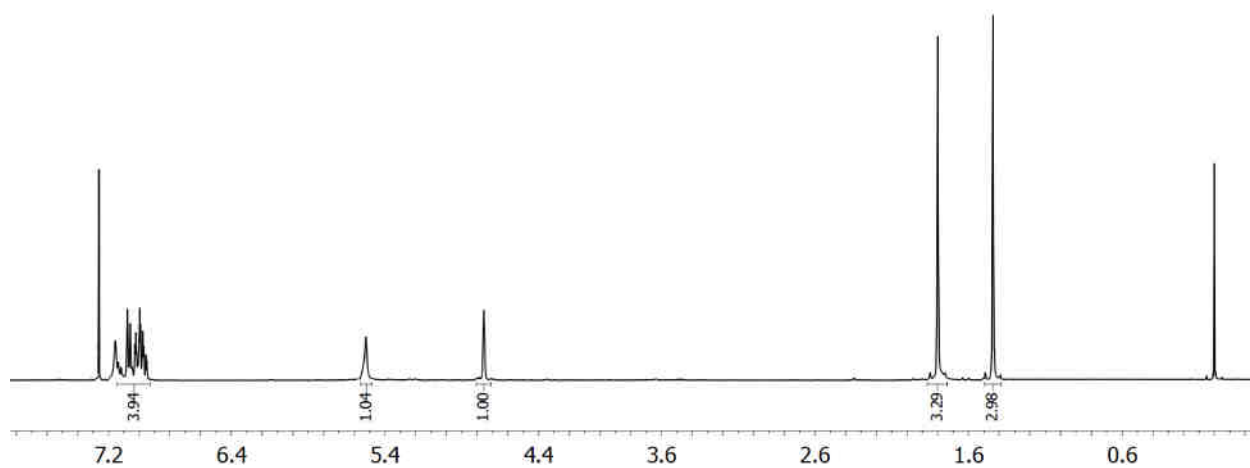
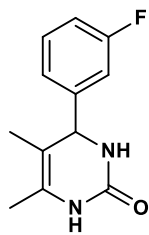


¹H NMR spektar jedinjenja **6-8a** u CDCl₃ (400 MHz)

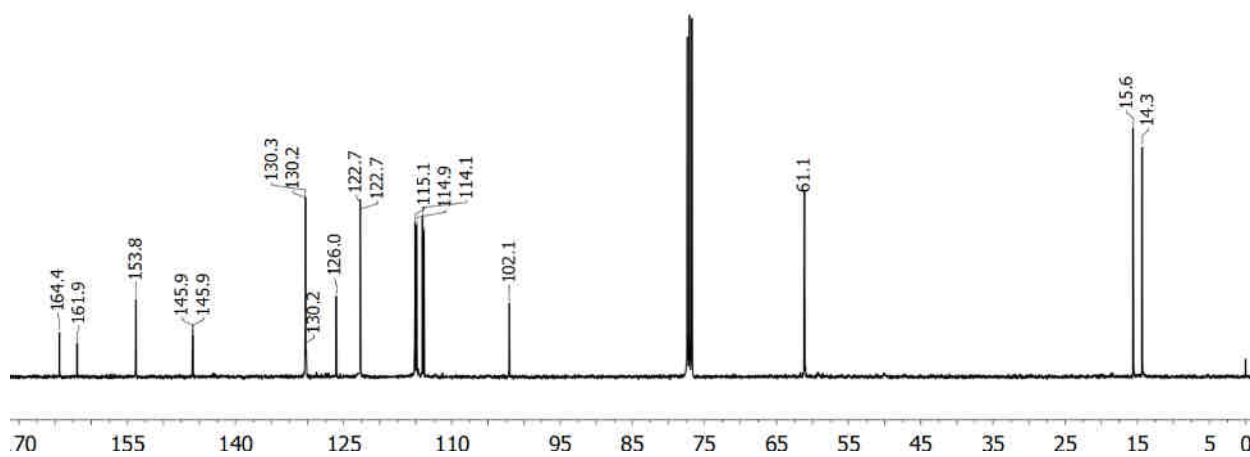


¹³C NMR spektar jedinjenja **6-8a** u CDCl₃ (100,6 MHz)

Prilog 85. 4-(3-fluorofenil)-5,6-dimetil-3,4-dihidropirimidin-2(1*H*)-on (**6-9a**)

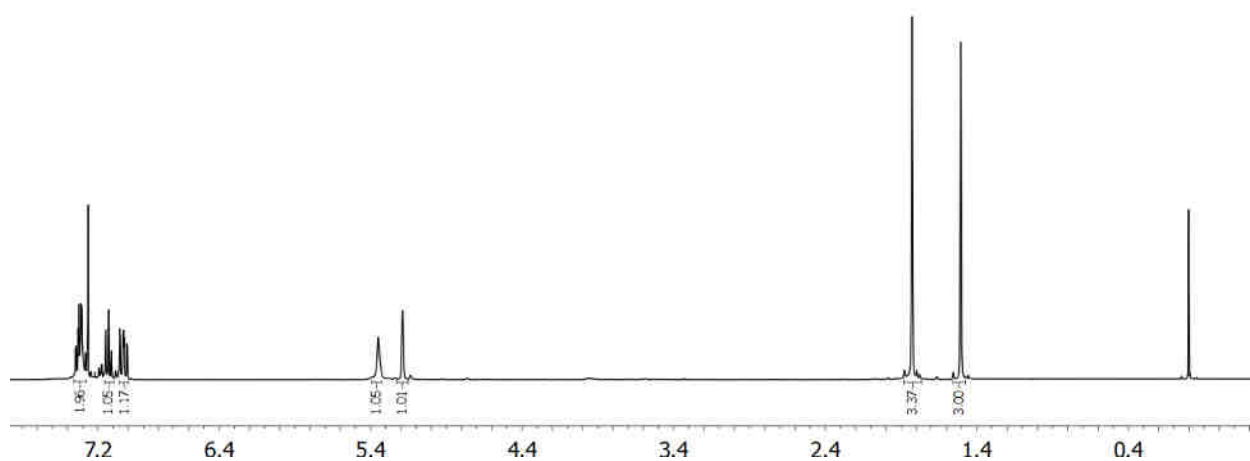
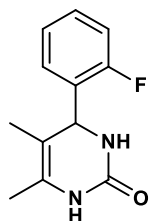


^1H NMR spektar jedinjenja **6-9a** u CDCl_3 (400 MHz)

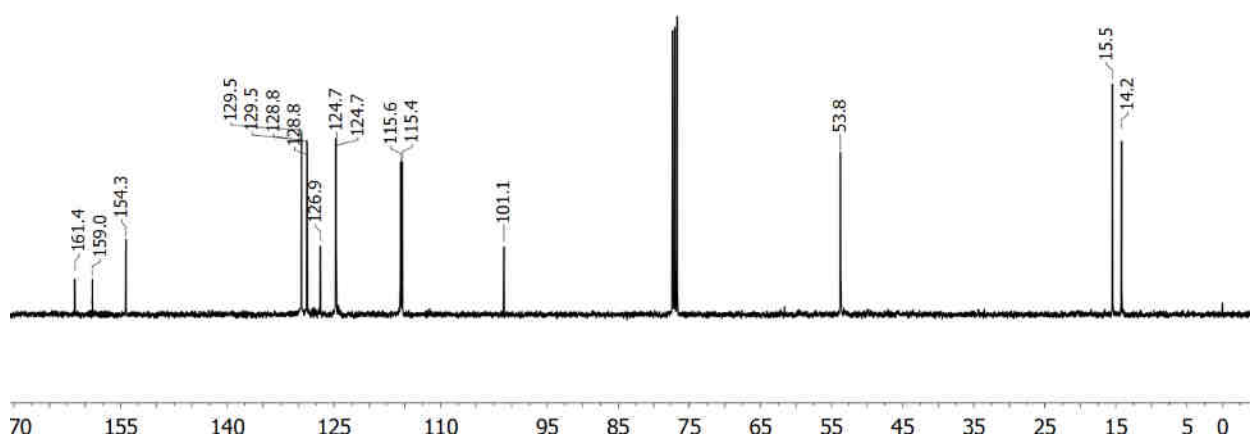


^{13}C NMR spektar jedinjenja **6-9a** u CDCl_3 (100,6 MHz)

Prilog 86. 4-(2-fluorofenil)-5,6-dimetil-3,4-dihidropirimidin-2(1*H*)-on (**6-10a**)

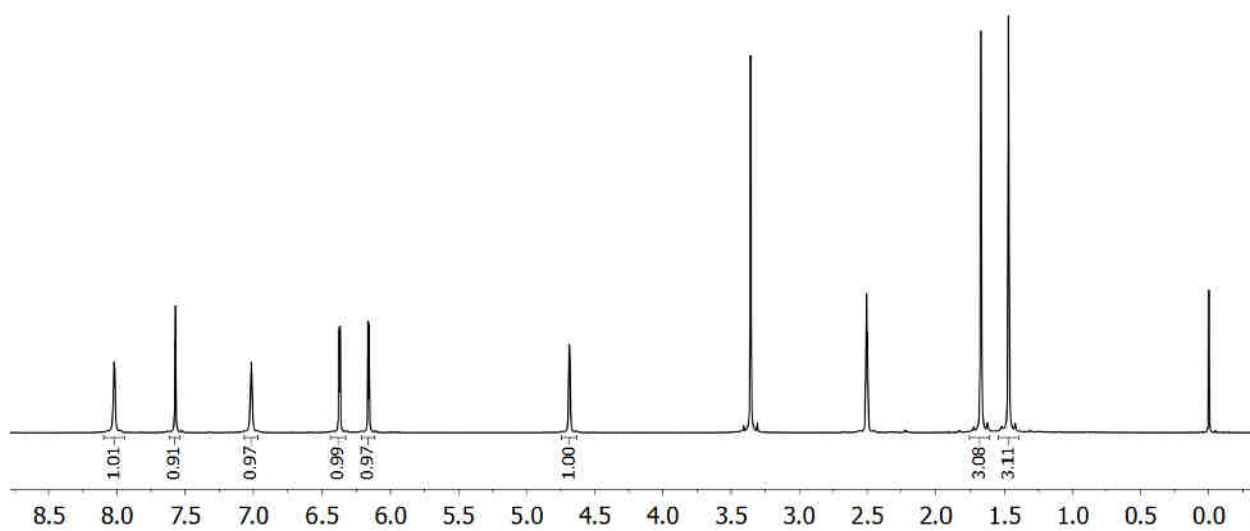
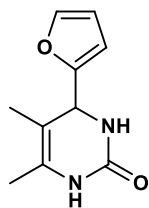


^1H NMR spektar jedinjenja **6-10a** u CDCl_3 (400 MHz)

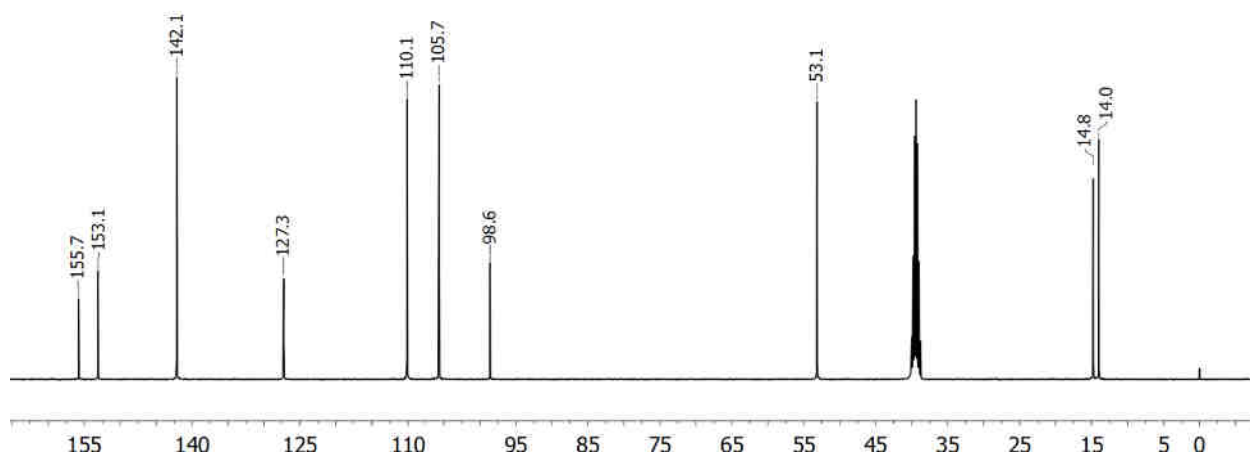


^{13}C NMR spektar jedinjenja **6-10a** u CDCl_3 (100,6 MHz)

Prilog 87. 4-(furan-2-il)-5,6-dimetil-3,4-dihidropirimidin-2(1H)-on (**6-11a**)

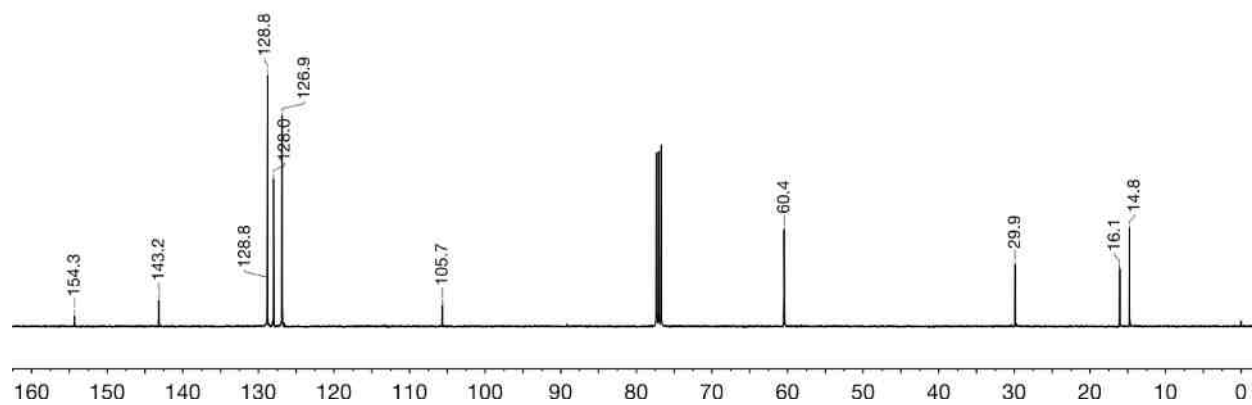
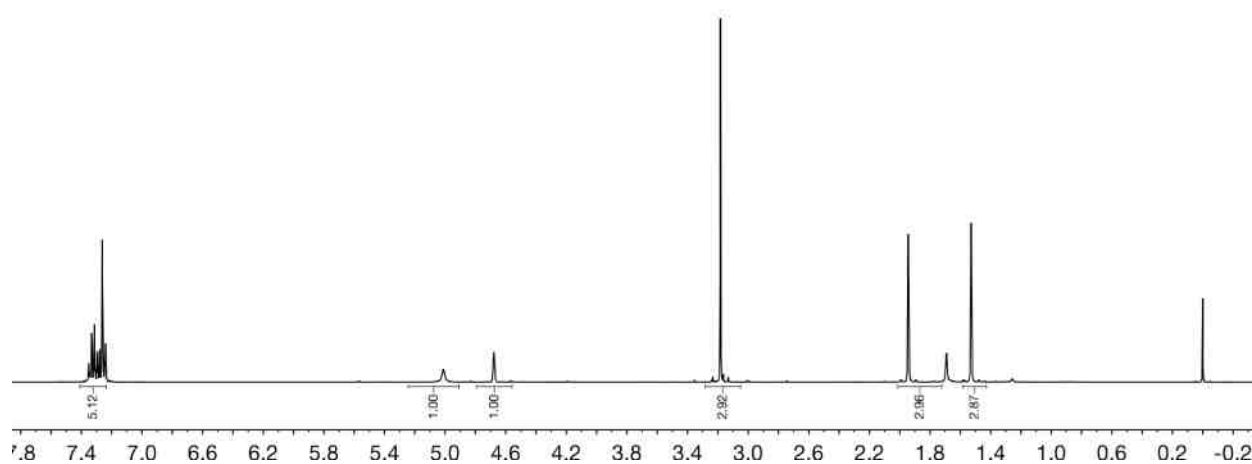
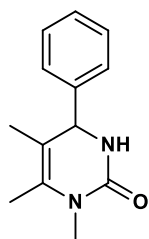


¹H NMR spektar jedinjenja **6-11a** u CD₃SOCD₃ (400 MHz)

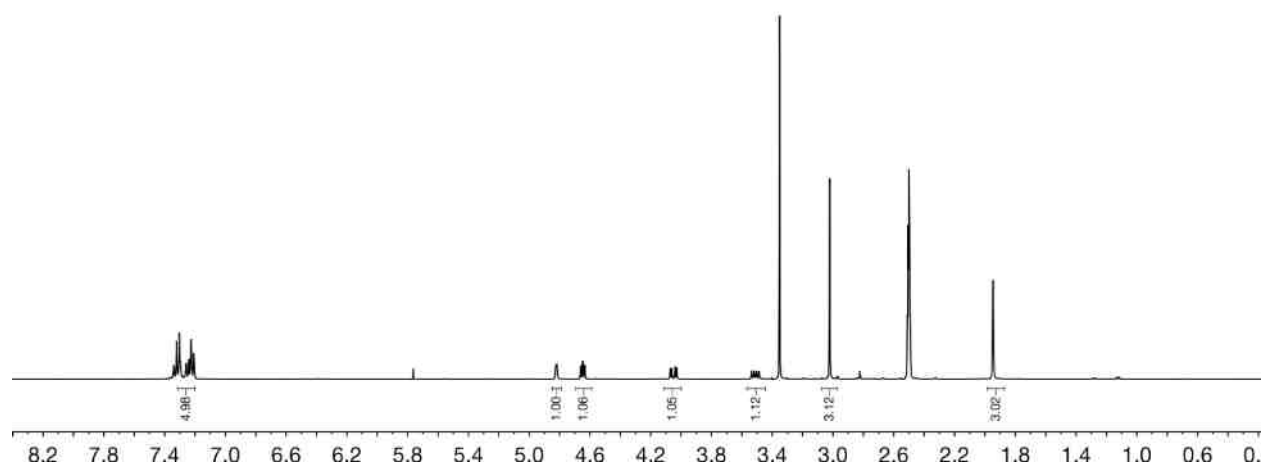
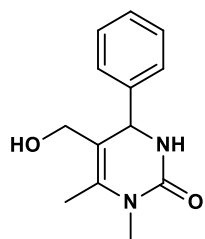


¹³C NMR spektar jedinjenja **6-11a** in CD₃SOCD₃ (100,6 MHz)

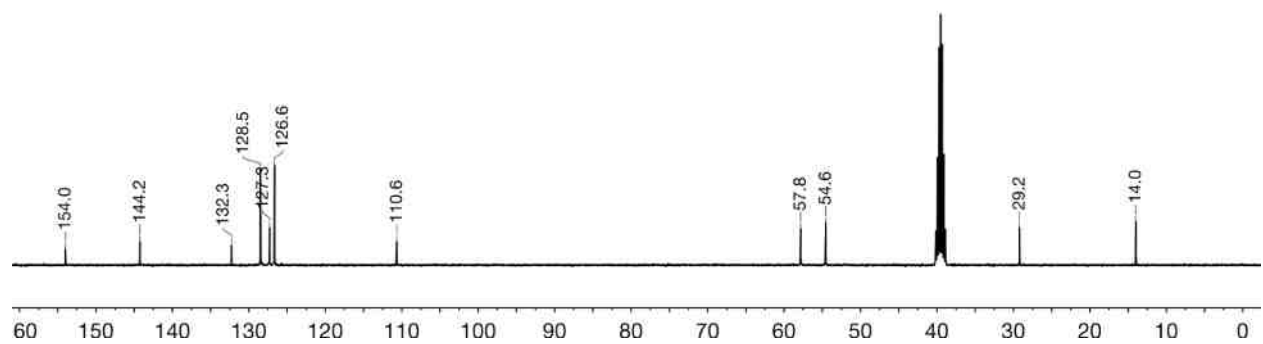
Prilog 88. 4-fenil-1,5,6-trimetil-3,4-dihidropirimidin-2(1H)-on (**6-12a**)



Prilog 89. 4-fenil-5-(hidroksimetil)-1,6-dimetil-3,4-dihidropirimidin-2(1*H*)-on (**6-12b**)

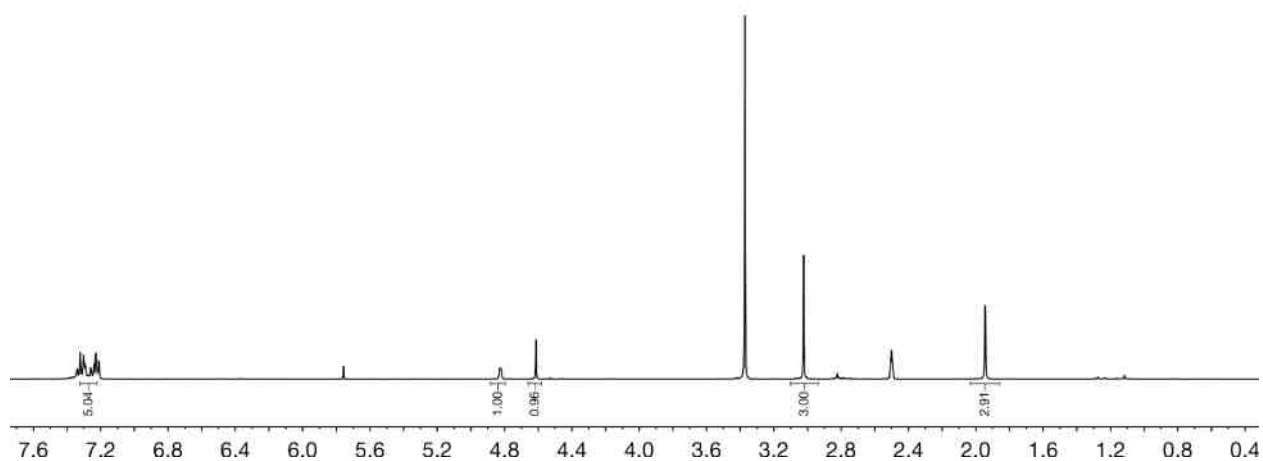
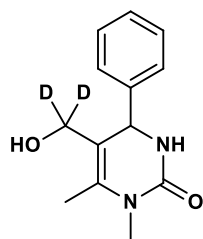


¹H NMR spektar jedinjenja **6-12b** u CD₃SOCD₃ (400 MHz)

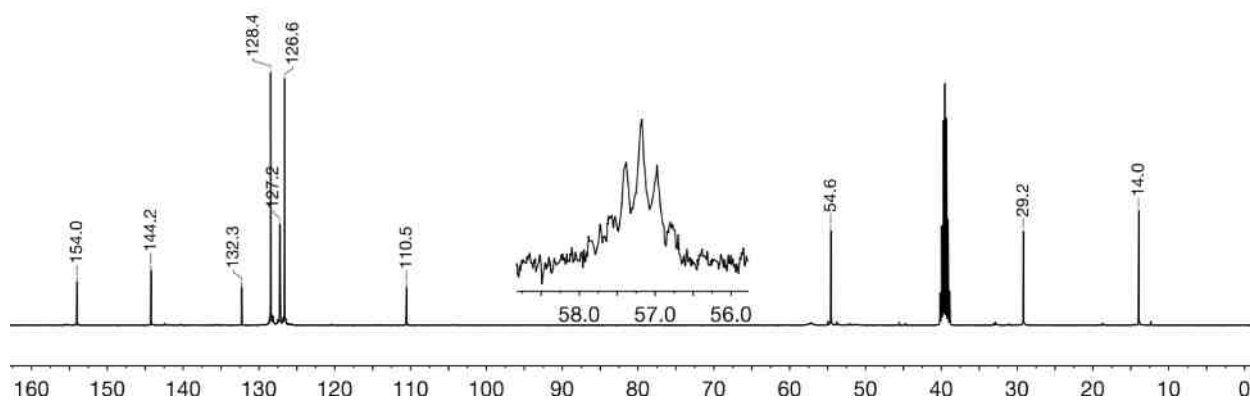


¹³C NMR spektar jedinjenja **6-12b** u CD₃SOCD₃ (100,6 MHz)

(12b, deuterisan u položaju C-8)

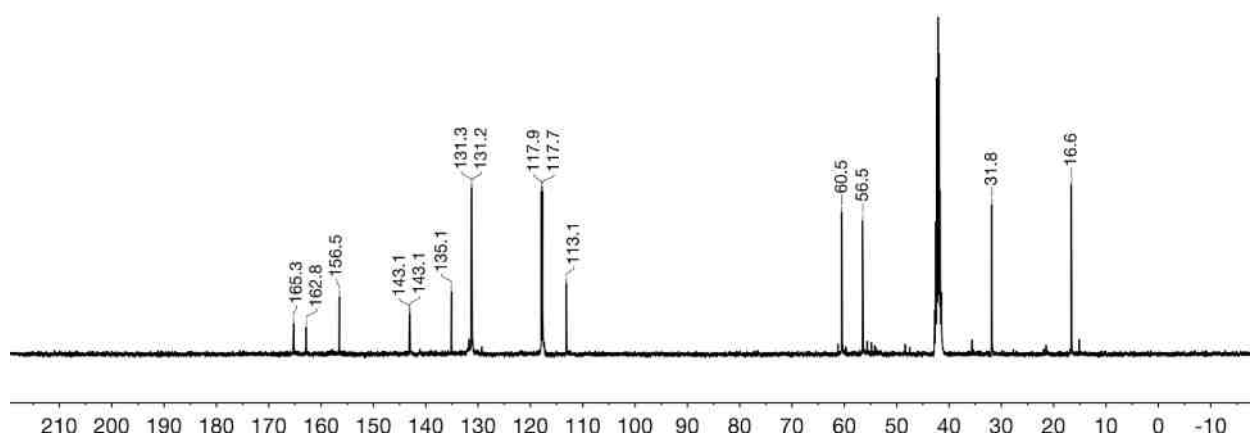
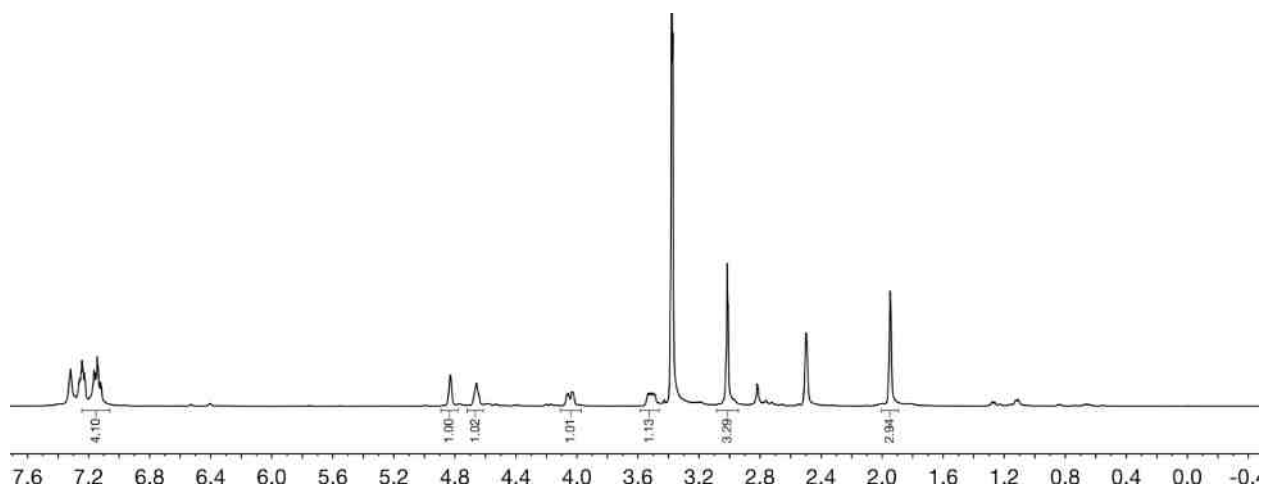
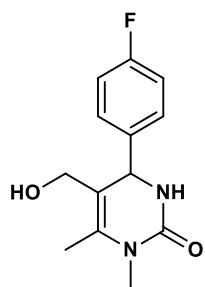


^1H NMR spektar jedinjenja **6-12b** deuterisanog u položaju C-8 u CD_3SOCD_3 (400 MHz)

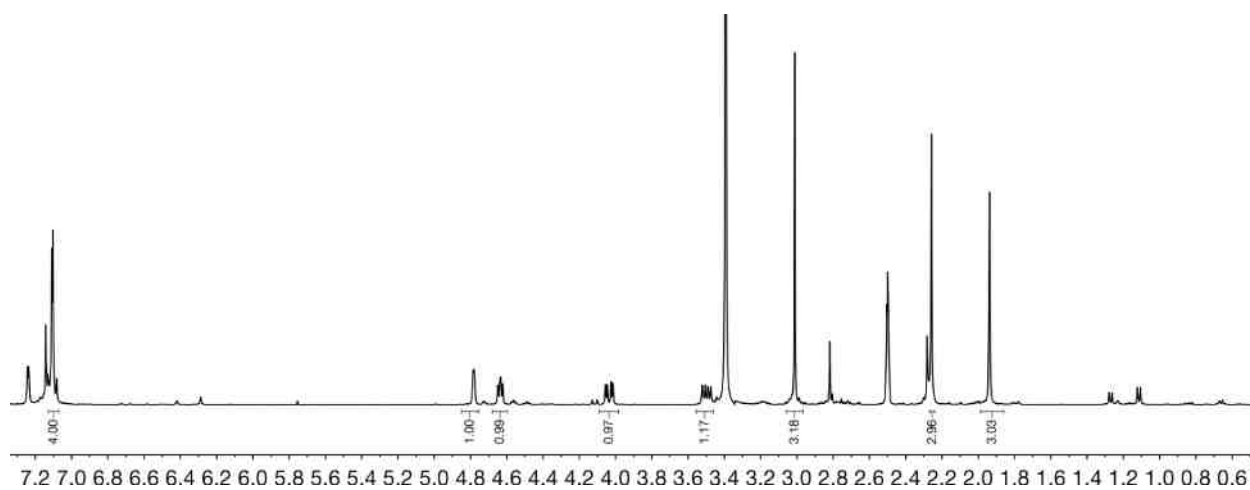
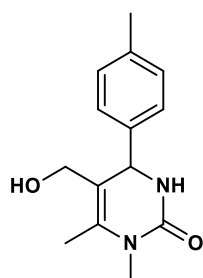


^{13}C NMR spektar jedinjenja **6-12b** deuterisanog u položaju C-8 u CD_3SOCD_3 (100,6 MHz)

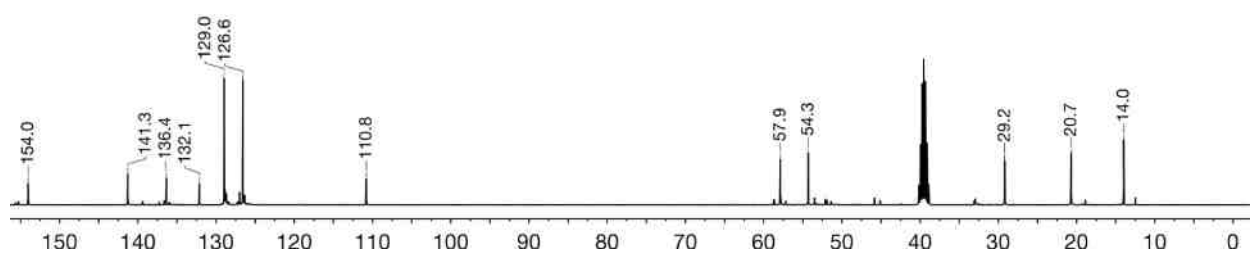
Prilog 90. 4-(4-fluorofenil)-5-(hidroksimetil)-1,6-dimetil-3,4-dihidropirimidin-2(1H)-on (**6-13b**)



Prilog 91. 5-(hidroksimetil)-1,6-dimetil-4-(*p*-tolil)-3,4-dihidropirimidin-2(1*H*)-on (**6-15b**)

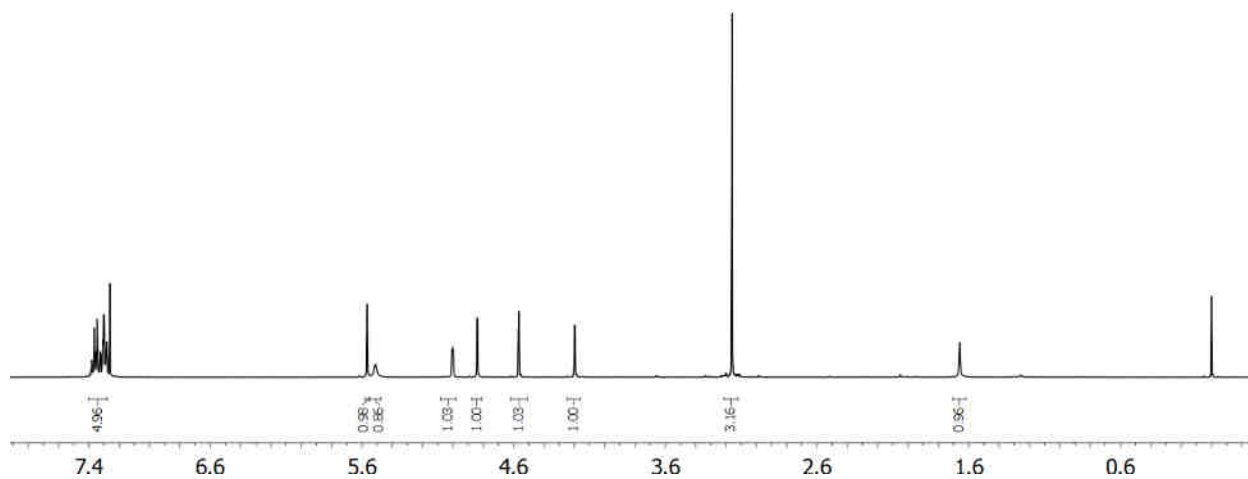
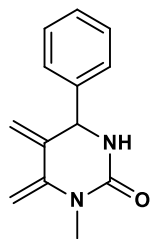


¹H NMR spektar jedinjenja **6-15b** u CD₃SOCD₃ (400 MHz)

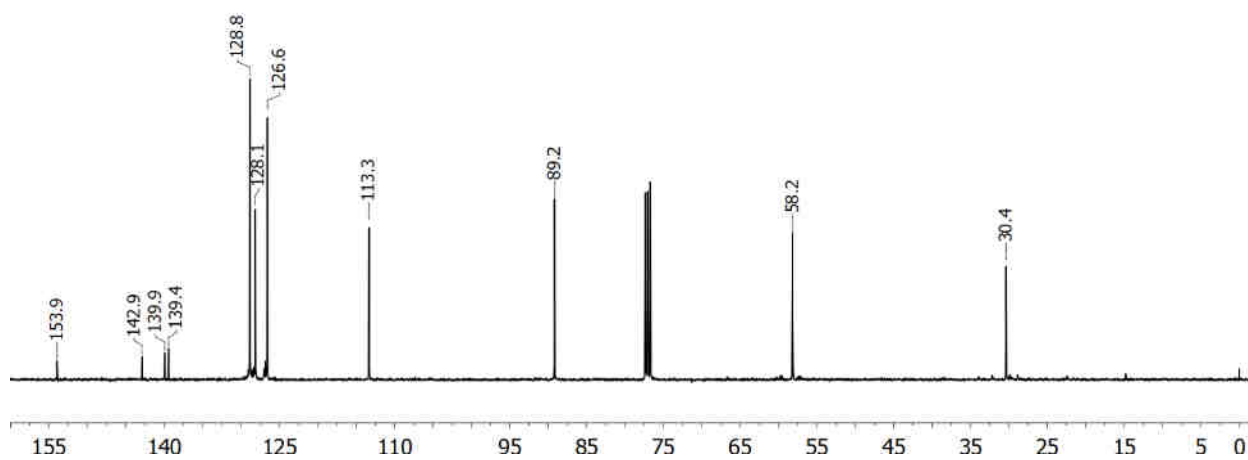


¹³C NMR spektar jedinjenja **6-15b** u CD₃SOCD₃ (100,6 MHz)

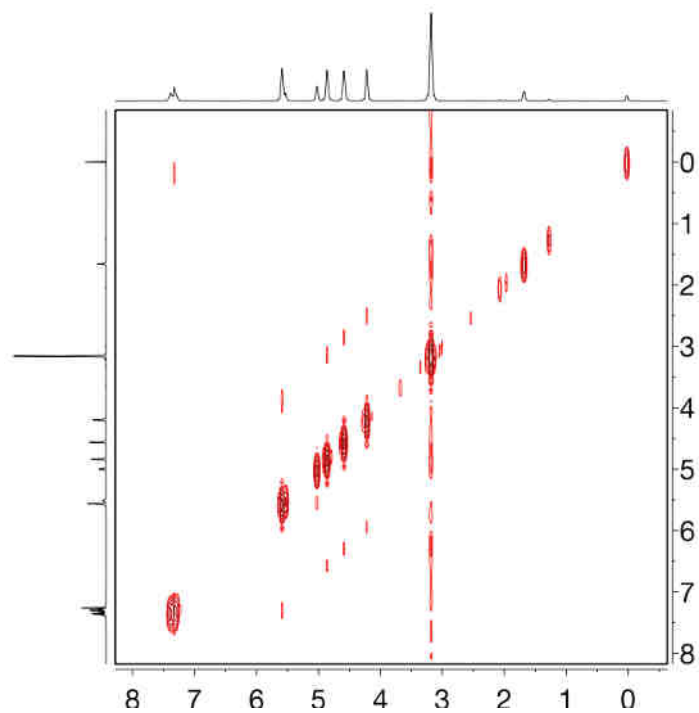
Prilog 92. 1-metil-5,6-metilen-4-feniltetrahidropirimidin-2(1H)-on (**6-12c**)



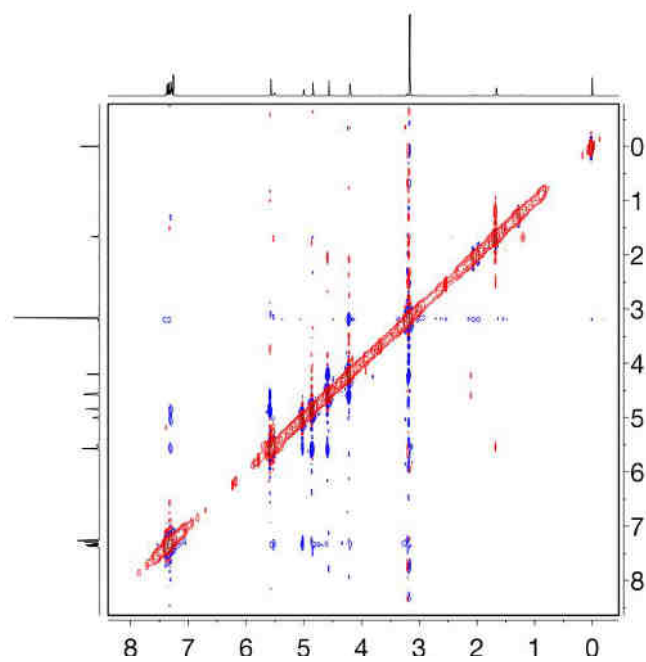
¹H NMR spektar jedinjenja **6-12c** u CDCl₃ (400 MHz)



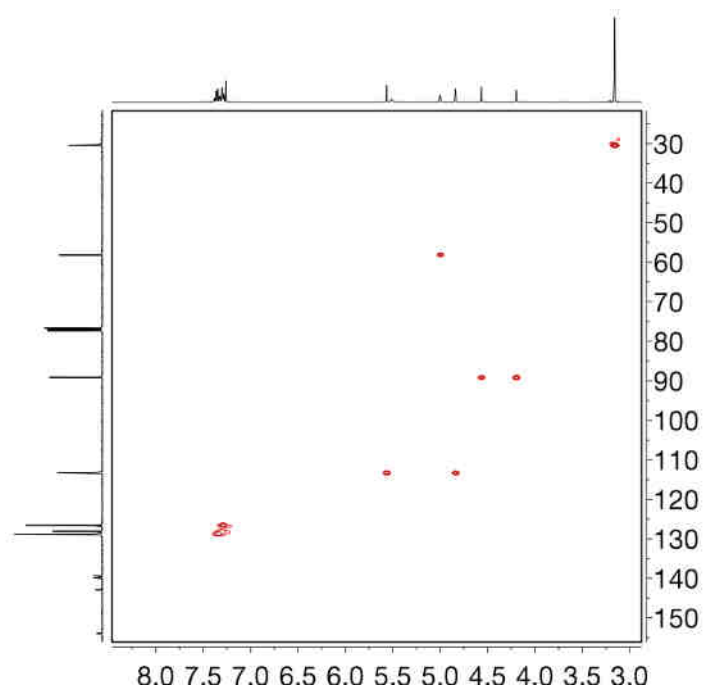
¹³C NMR spektar jedinjenja **6-12c** u CDCl₃ (100,6 MHz)



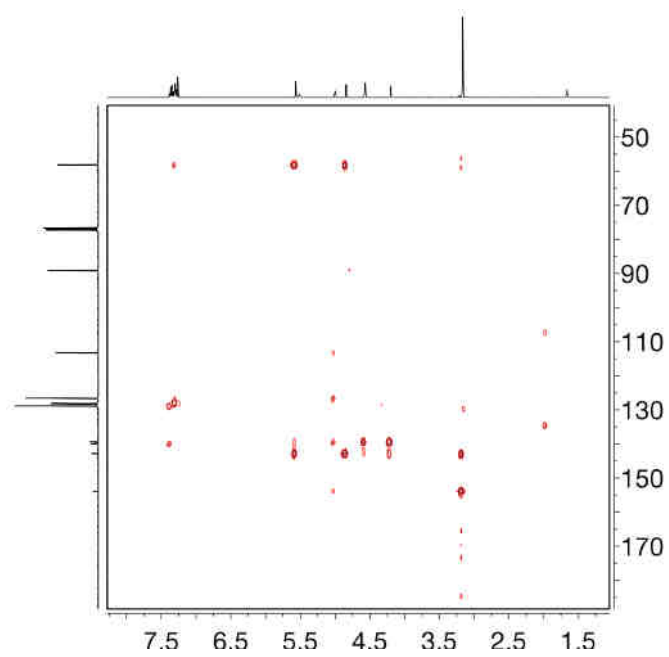
^1H - ^1H COSY spektar jedinjenja **6-12c** u CDCl_3 (400 MHz)



NOESY spektar jedinjenja **6-12c** u CDCl_3 (400 MHz)

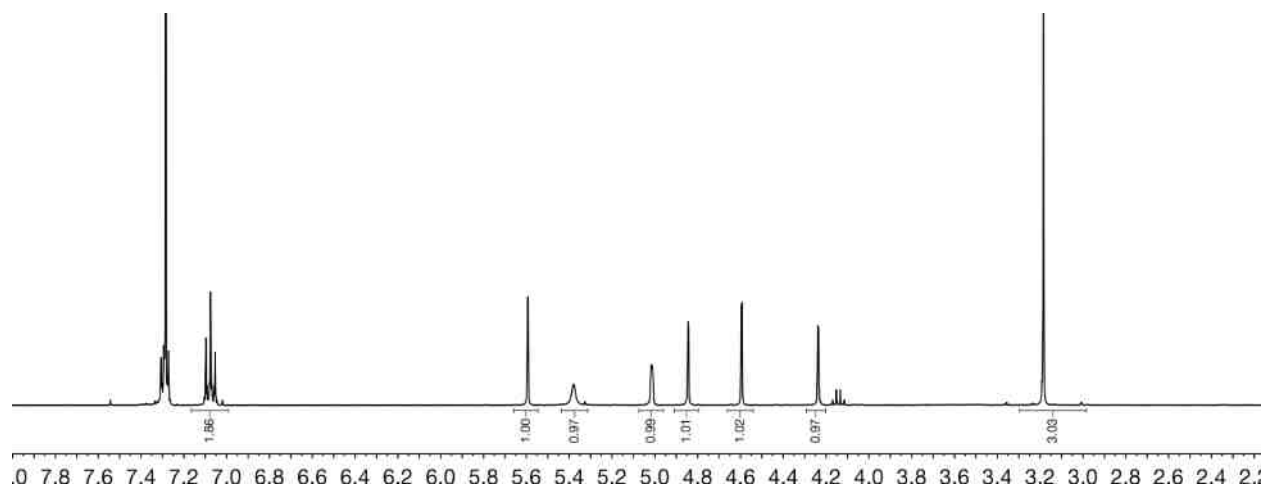
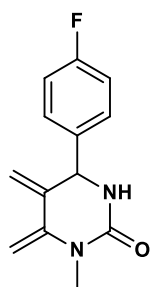


HSQC spektar jedinjenja **6-12c** u CDCl_3

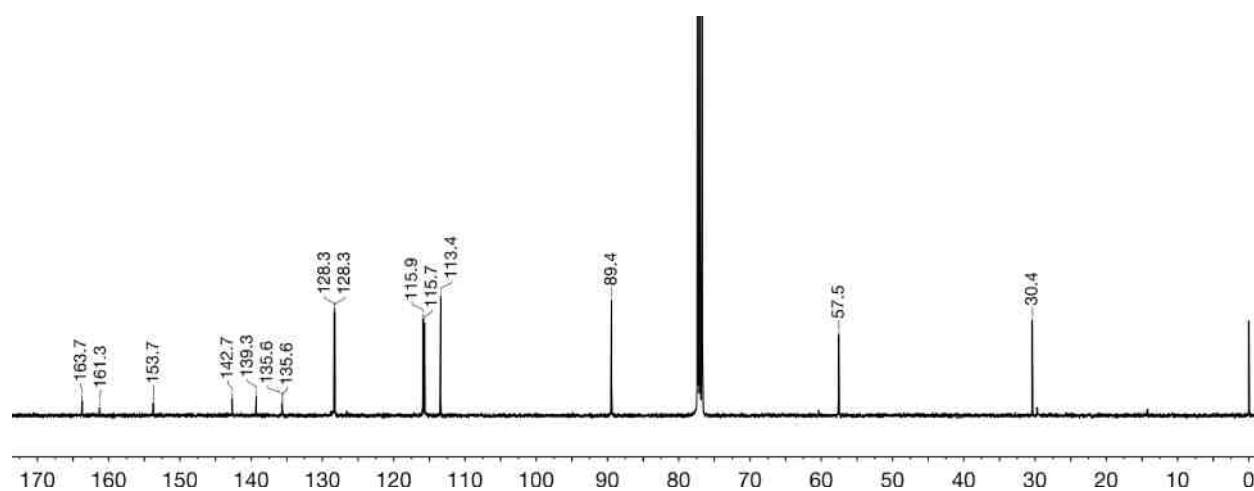


HMBC spektar jedinjenja **6-12c** u CDCl_3

Prilog 93. 4-(4-fluorofenil)-1-metil-5,6-dimetilenetrahidropirimidin-2(1H)-on (**6-13c**)

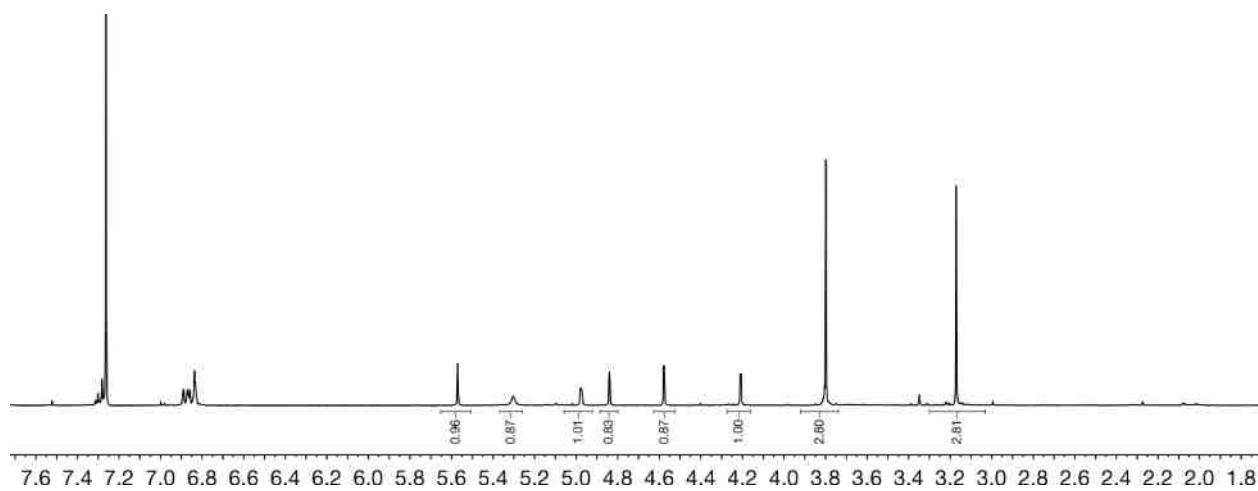
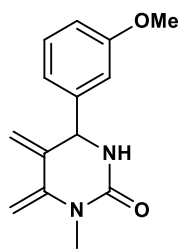


¹H NMR spektar jedinjenja **6-13c** u CDCl₃ (400 MHz)

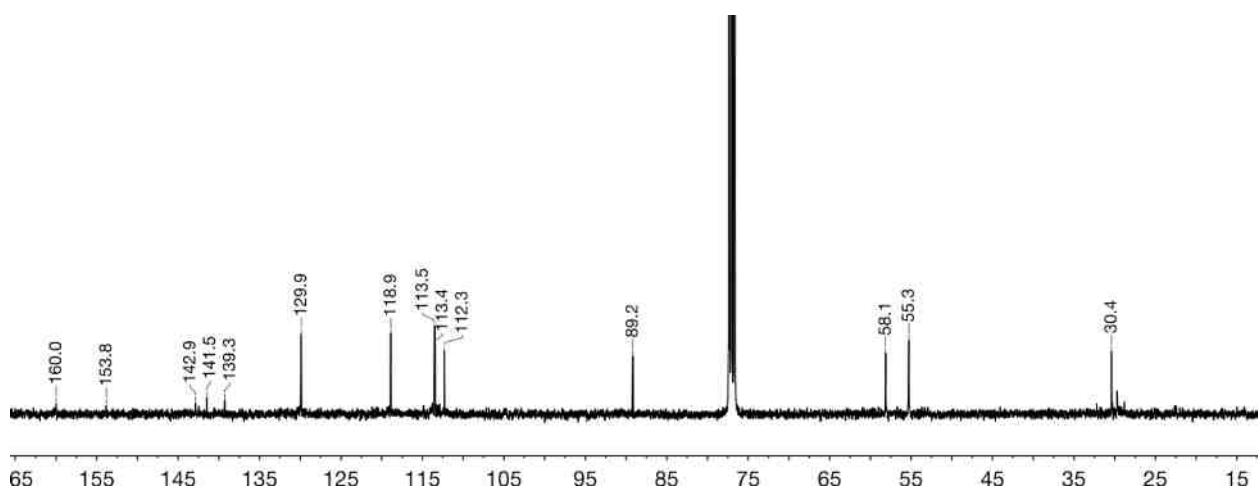


¹³C NMR spektar jedinjenja **6-13c** u CDCl₃ (100,6 MHz)

Prilog 94. 1-metil-4-(3-metoksifenil)-5,6-dimetilentetrahidropirimidin-2(1H)-on (**6-14c**)

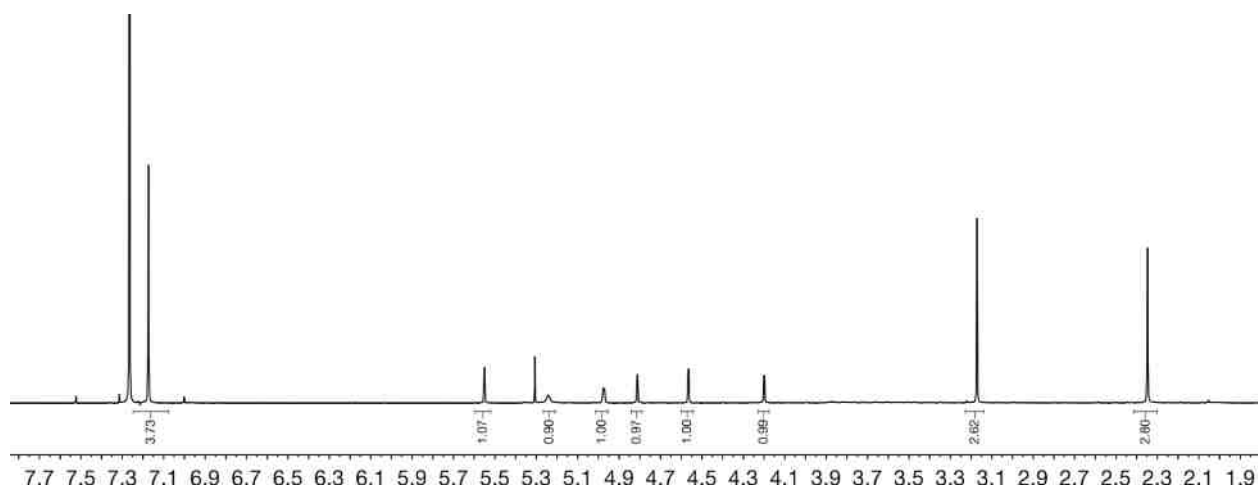
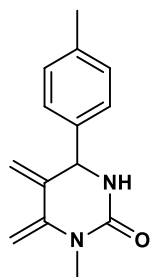


¹H NMR spektar jedinjenja **6-14c** u CDCl₃ (400 MHz)

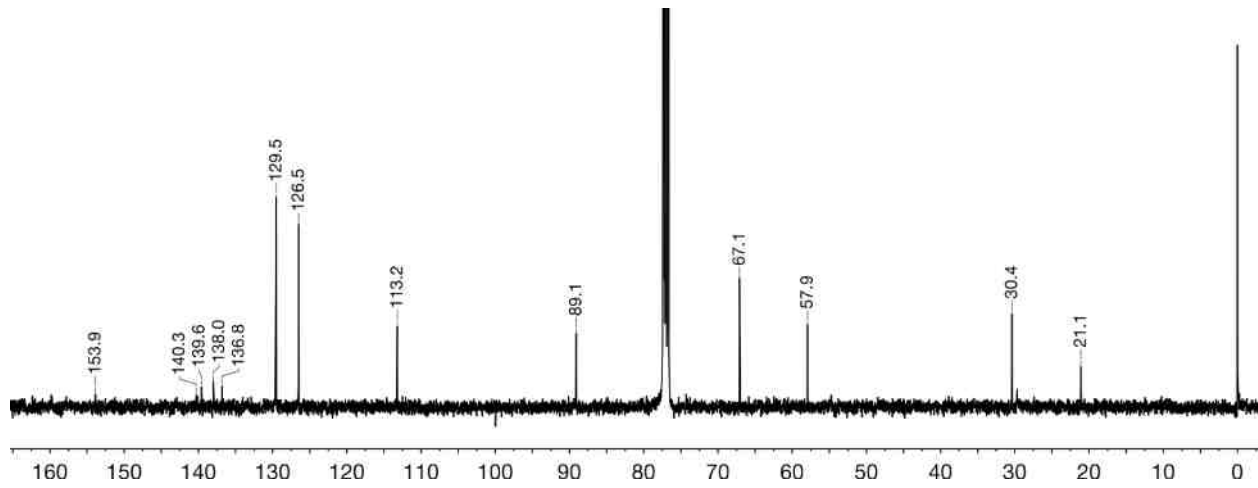


¹³C NMR spektar jedinjenja **6-14c** u CDCl₃ (100,6 MHz)

Prilog 95. 1-metil-5,6-dimetilen-4-(*p*-tolil)tetrahidropirimidin-2(1*H*)-on (**6-15c**)

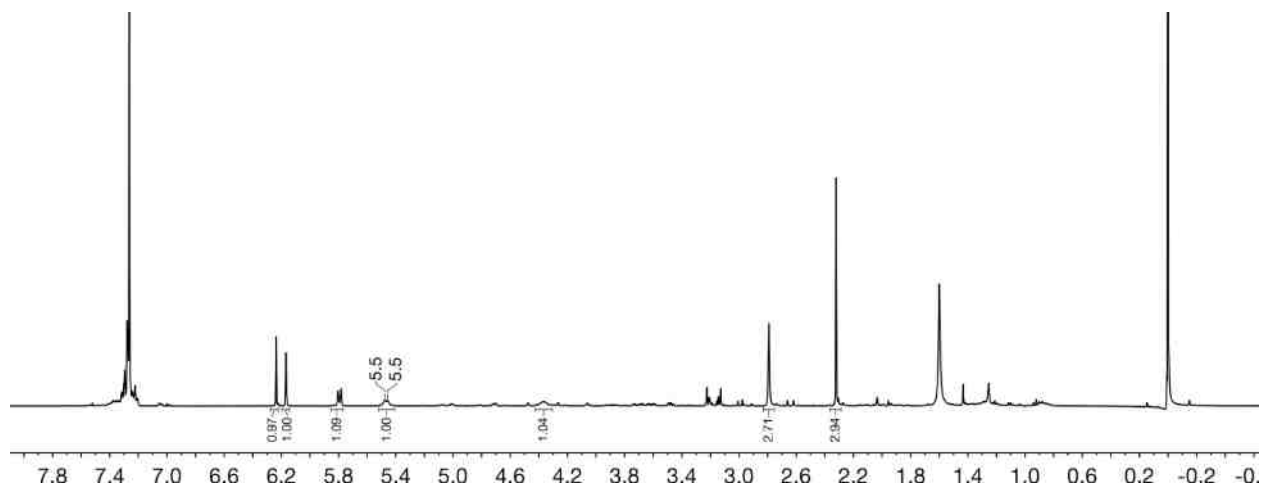
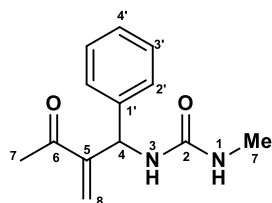


^1H NMR spektar jedinjenja **6-15c** u CDCl_3 (400 MHz)

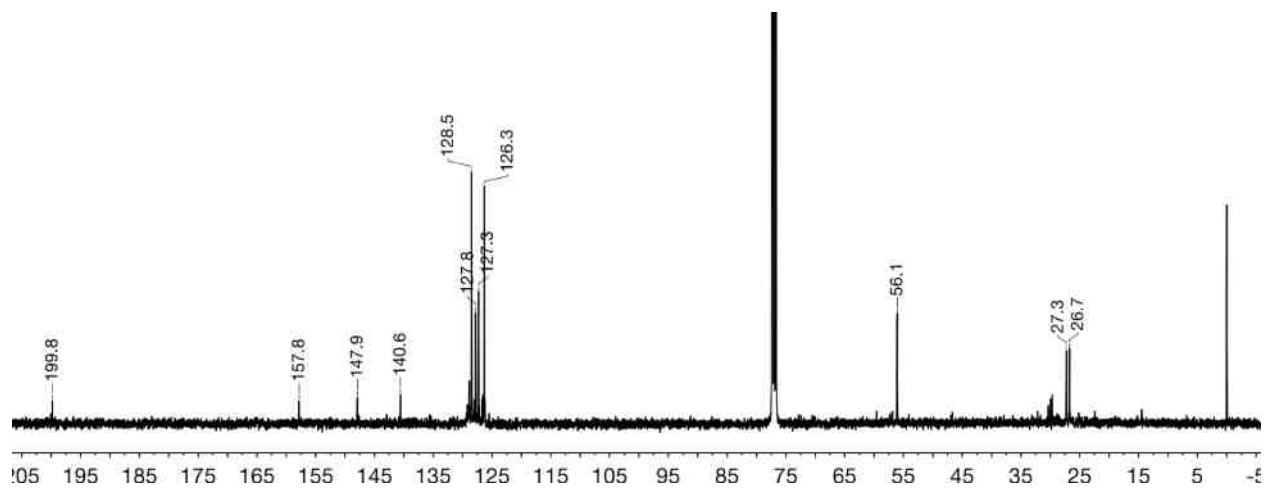


^{13}C NMR spektar jedinjenja **6-15c** u CDCl_3 (100,6 MHz)

Prilog 96. 3-(1-fenilbutil-2-metilen-3-okso)-1-metilurea (**6-12d**)

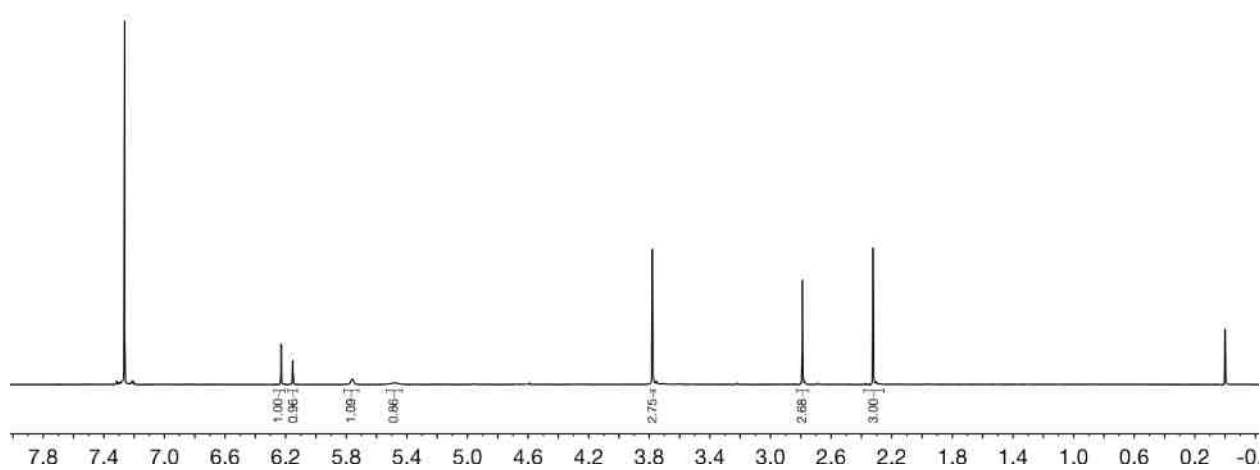
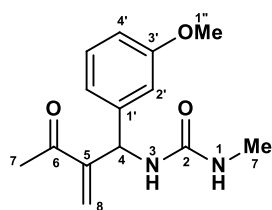


^1H NMR spektar jedinjenja **6-12d** u CDCl_3 (400 MHz)

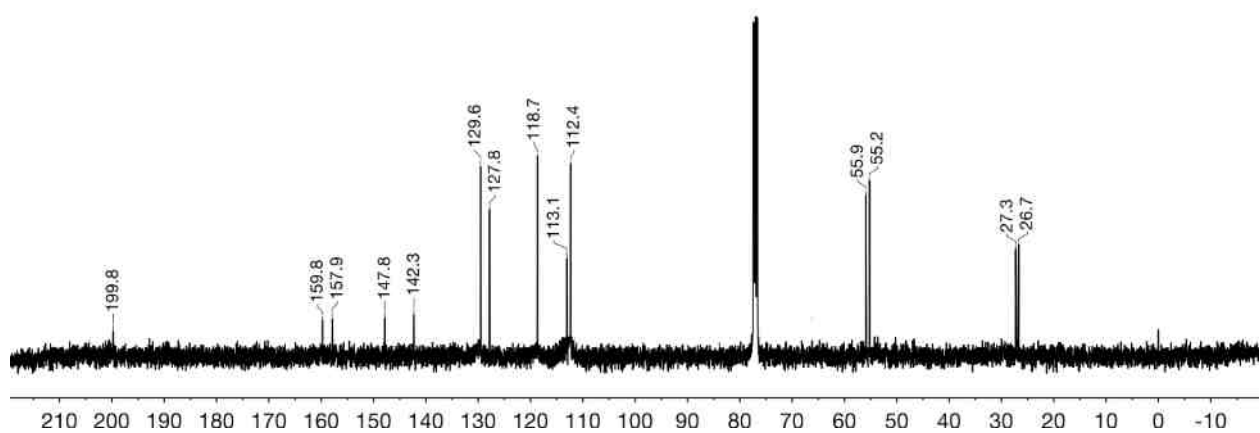


^{13}C NMR spektar jedinjenja **6-12d** u CDCl_3 (100,6 MHz)

Prilog 97. 1-(2-metilen-1-(3-metoksifenil)-3-oksobutil)-3-metilurea (**6-14d**)

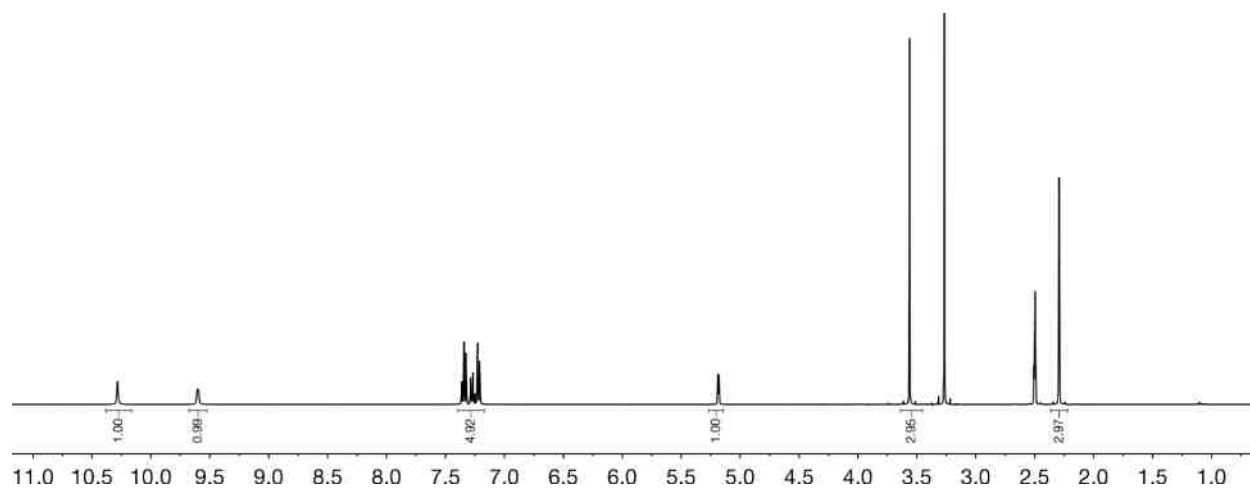
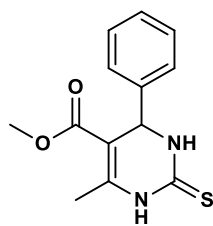


^1H NMR spektar jedinjenja **6-14d** u CDCl_3 (400 MHz)

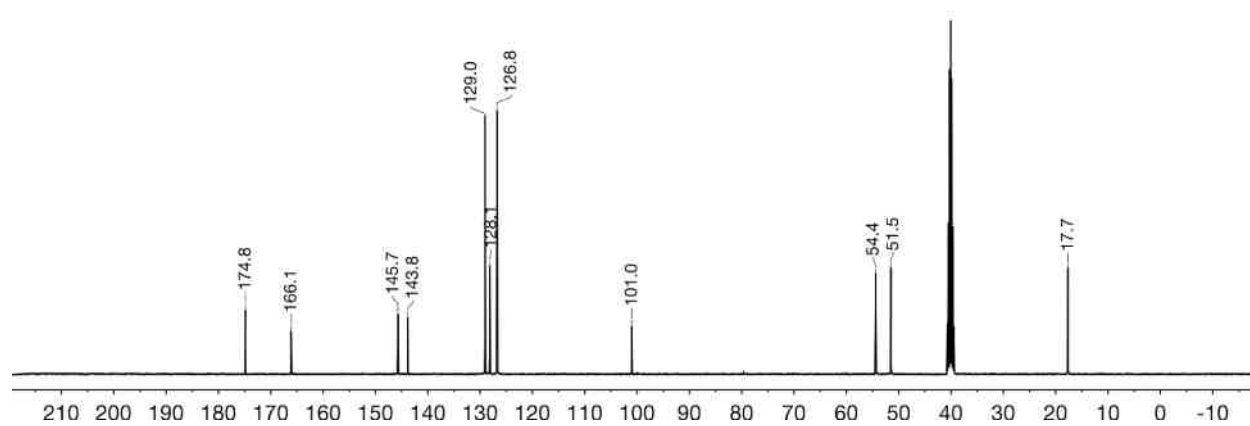


^{13}C NMR spektar jedinjenja **6-14d** u CDCl_3 (100,6 MHz)

Prilog 98. Metil-4-fenil-6-metil-2-tio-1,2,3,4-tetrahidropirimidin-5-karboksilat (**6-16**)

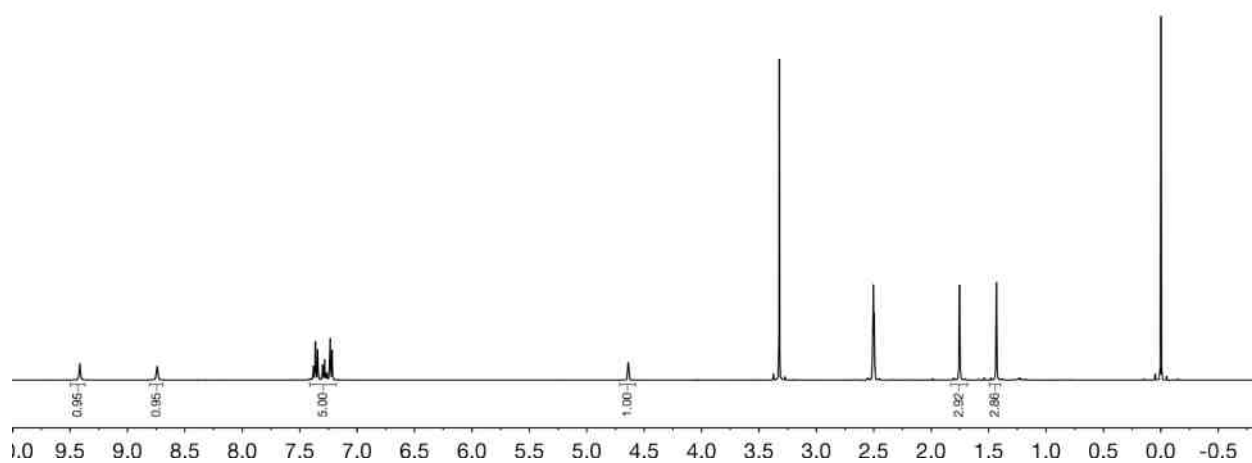
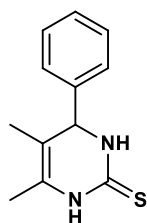


^1H NMR spektr jedinjenja **6-16** u CD_3SOCD_3 (400 MHz)

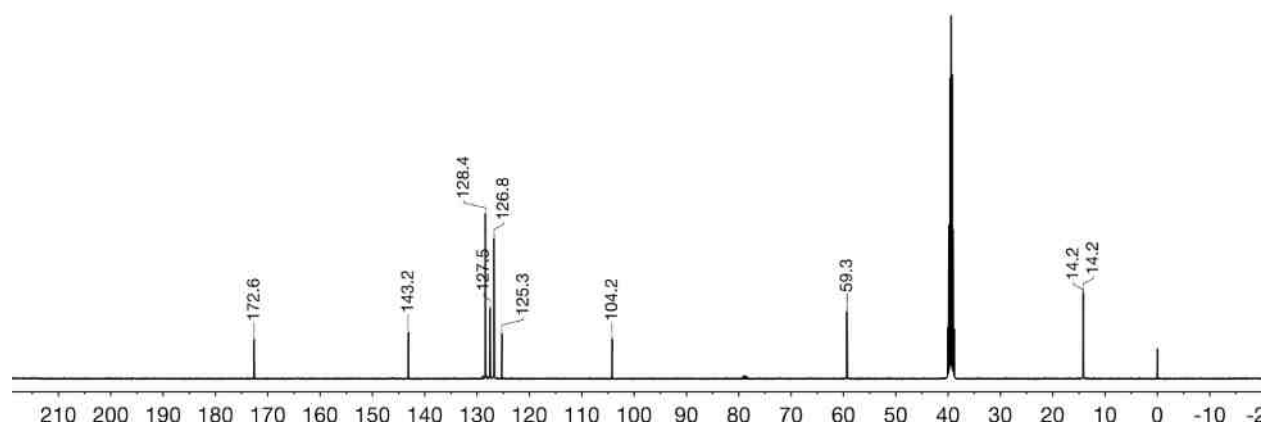


^{13}C NMR spektr jedinjenja **6-16** u CD_3SOCD_3 (100,6 MHz)

Prilog 99. 4-fenil-5,6-dimetil-3,4-dihidropirimidin-2(1*H*)-tion (**6-16a**)

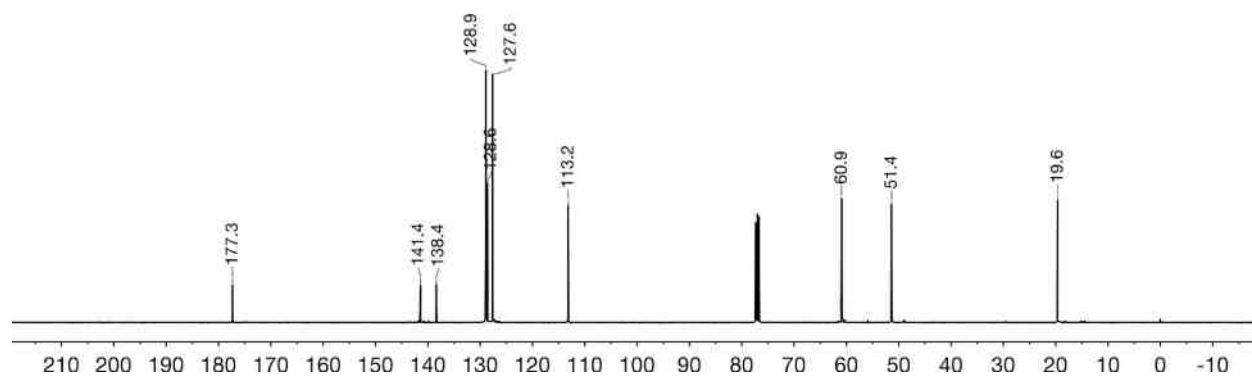
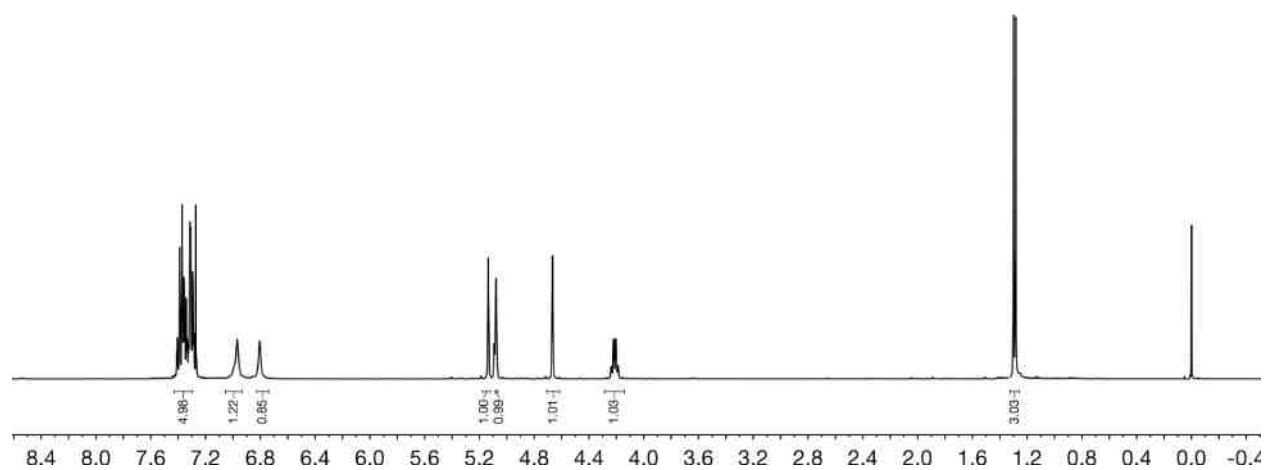
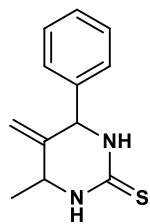


¹H NMR spektar jedinjenja **6-16a** u CD₃SOCD₃ (400 MHz)

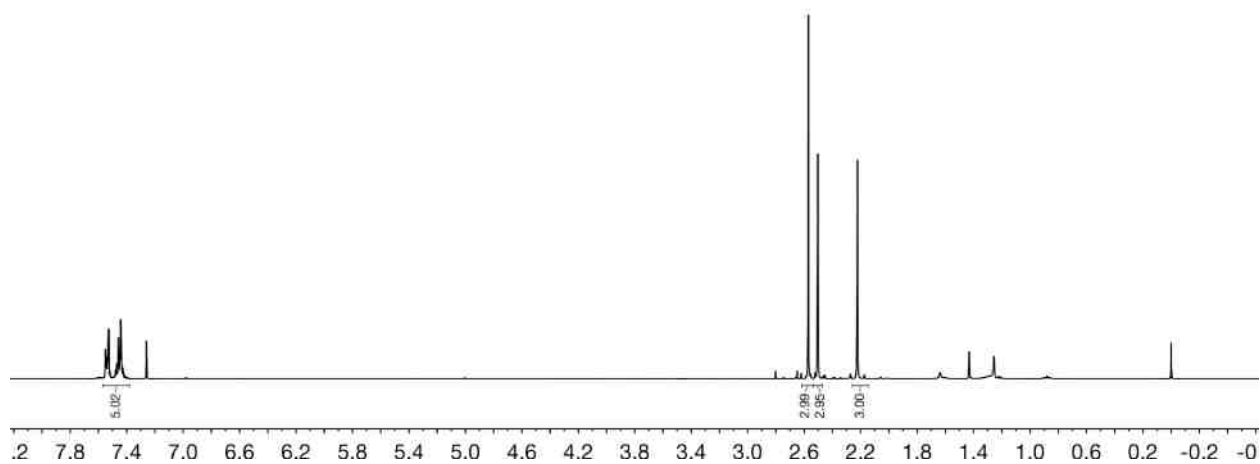
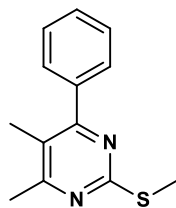


¹³C NMR spektar jedinjenja **6-16a** u CD₃SOCD₃ (100,6 MHz)

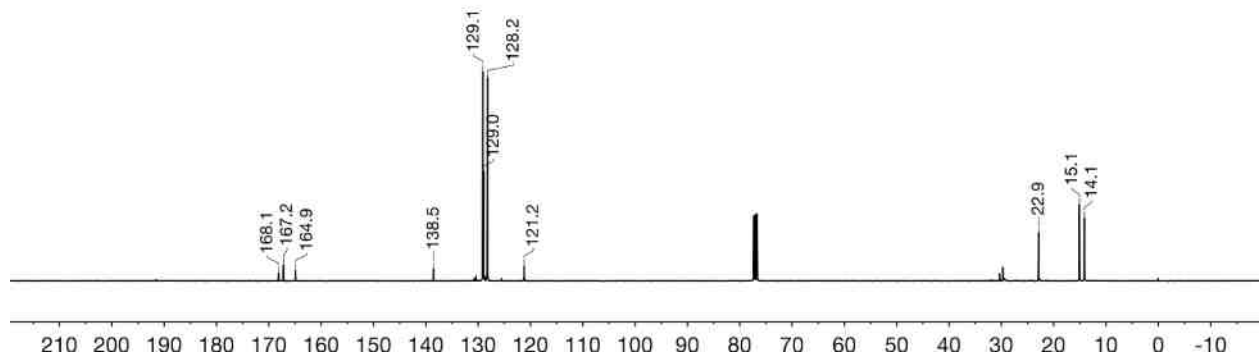
Prilog 100. 4-metil-5-metilen-6-feniltetrahidropirimidin-2(1H)-tion (**6-16b**)



Prilog 101. 4,5-dimetil-2-(metiltilio)-6-fenilpirimidin (**6-20**)

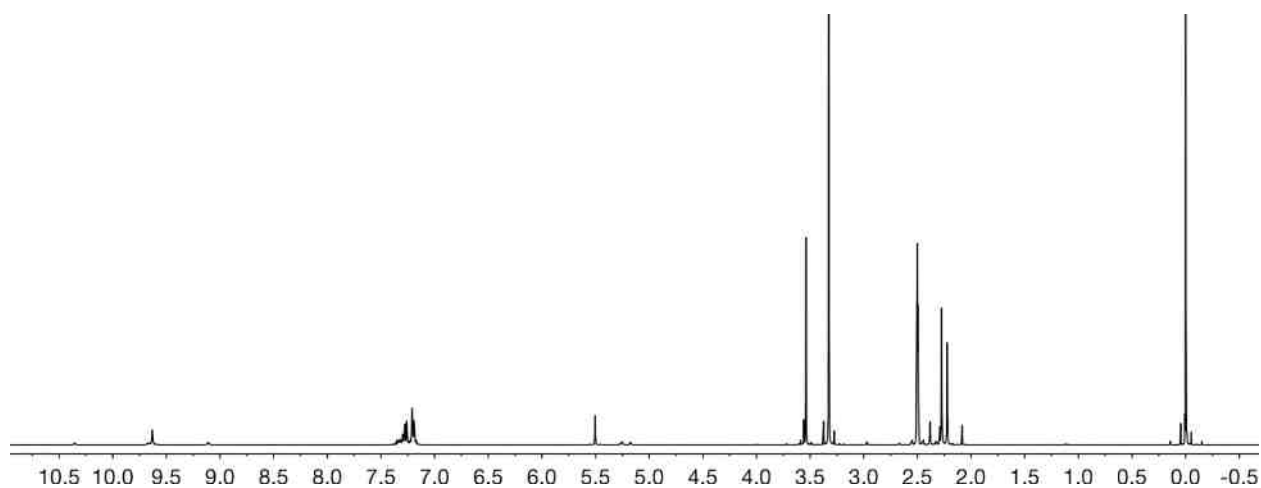
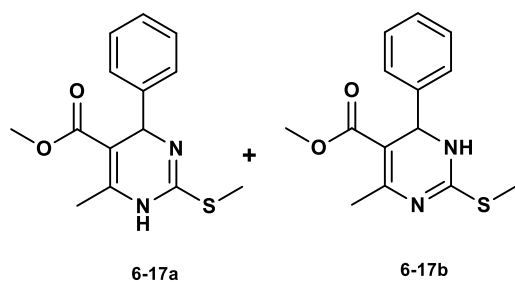


¹H NMR spektar jedinjenja **6-20** u CDCl₃ (400 MHz)

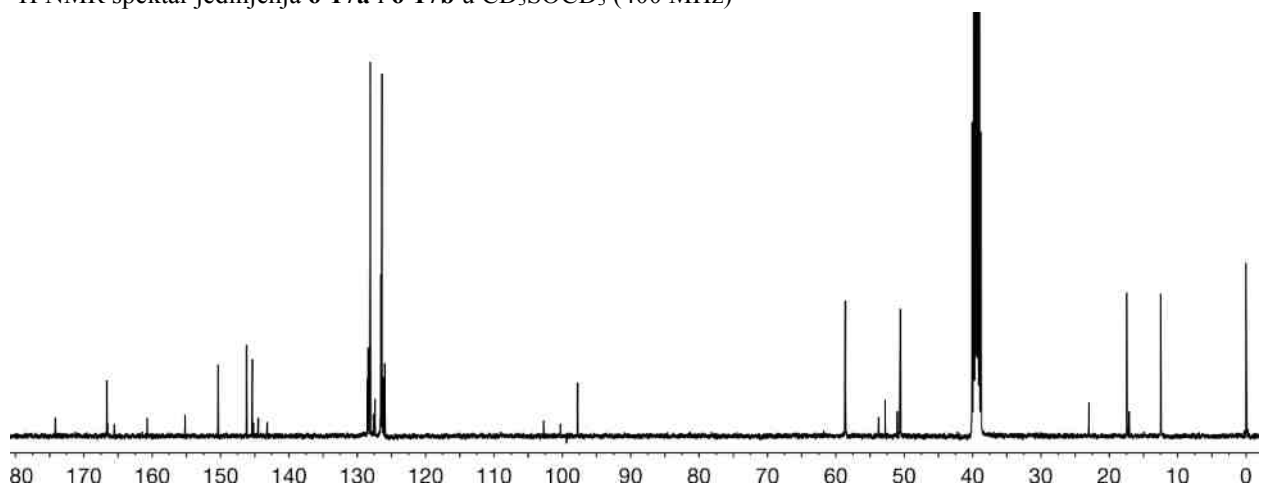


¹³C NMR spektar jedinjenja **6-20** u CDCl₃ (106,6 MHz)

Prilog 102. Metil-4-fenil-6-metil-2-(metiltio)-1,4-dihidropirimidin-5-karboksilat i metil-6-fenil-4-metil-2-(metiltio)-1,6-dihidropirimidin-5-karboksilat (smeša tautomera, **6-17a** i **6-17b**)

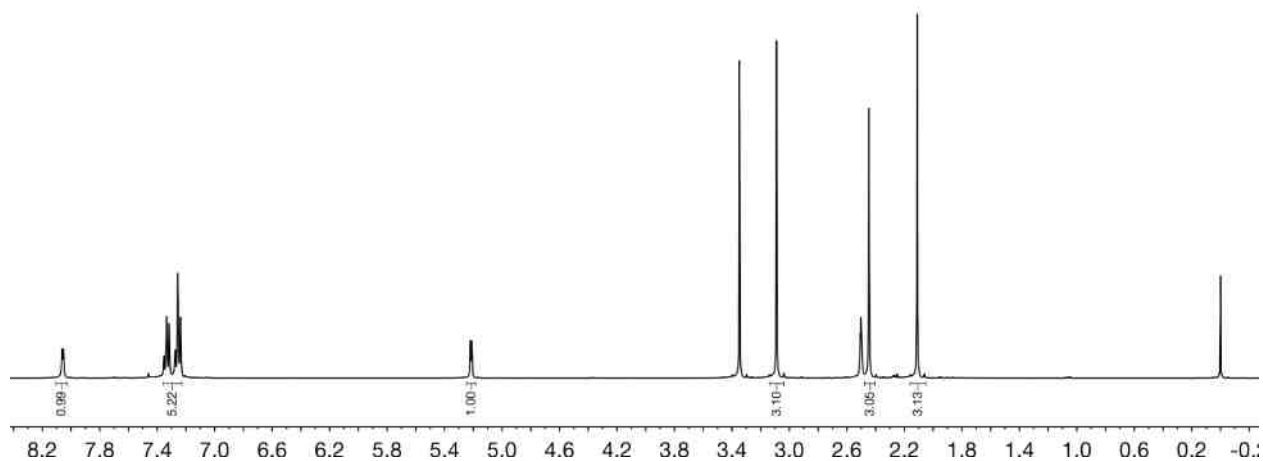
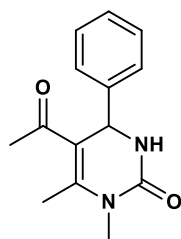


^1H NMR spektar jedinjenja **6-17a** i **6-17b** u CD_3SOCD_3 (400 MHz)

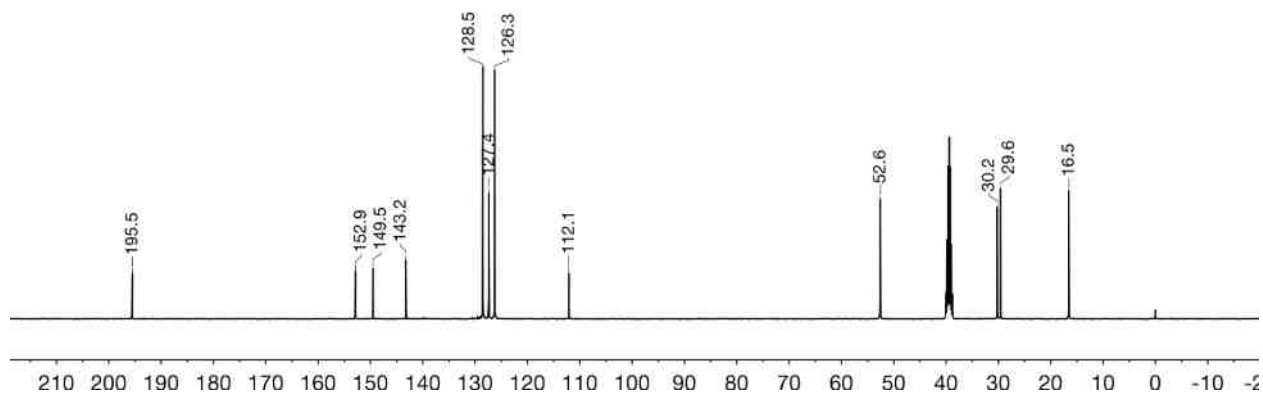


^{13}C NMR spektar jedinjenja **6-17a** i **6-17b** u CD_3SOCD_3 (100,6 MHz)

Prilog 103. 5-Acetil-4-fenil-1,6-dimetil-3,4-dihidropirimidin-2(1H)-on (**6-18**)

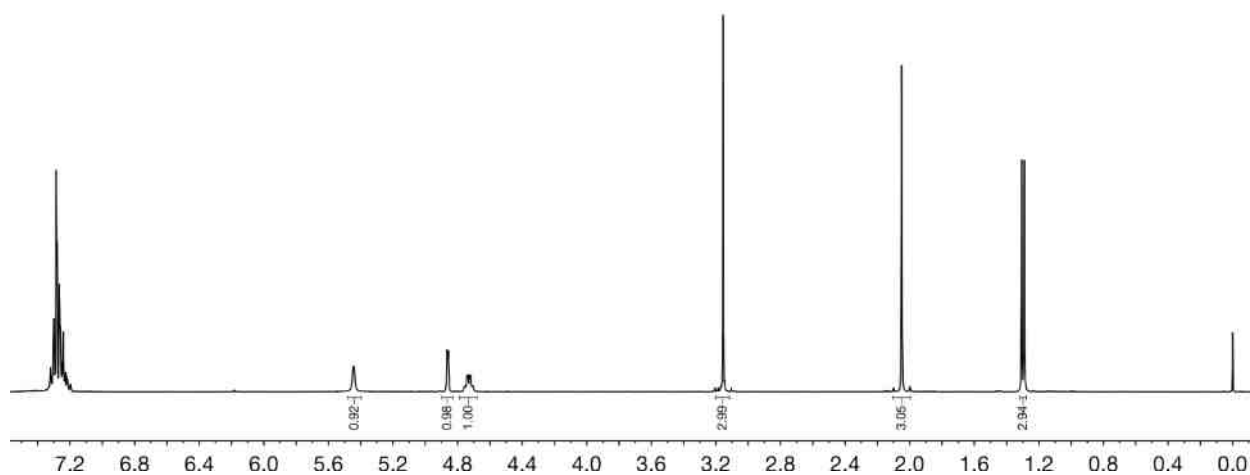
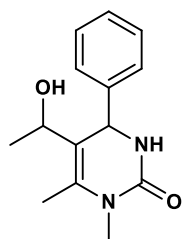


^1H NMR spektar jedinjenja **6-18** u CD_3SOCD_3 (400 MHz)

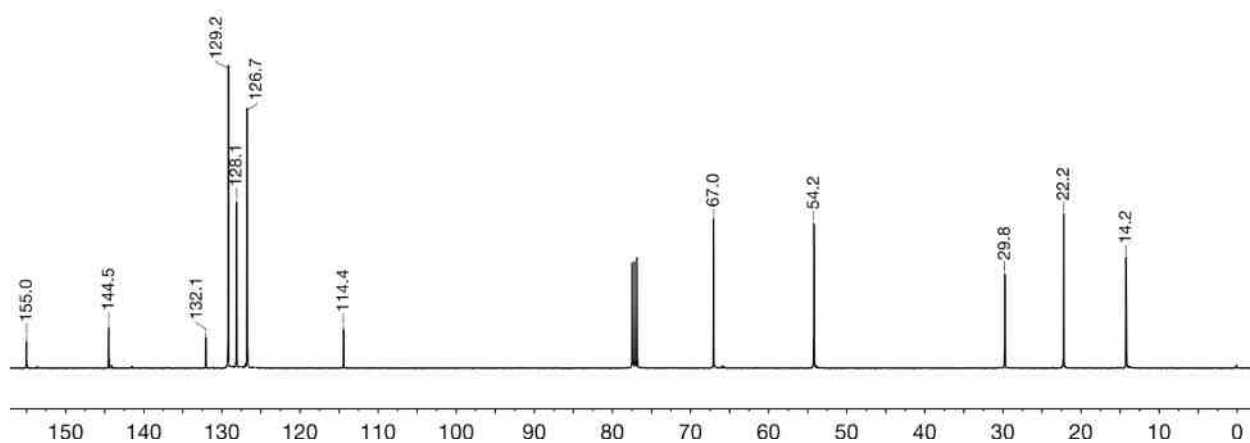


^{13}C NMR spektar jedinjenja **6-18** u CD_3SOCD_3 (100,6 MHz)

Prilog 104. 5-(1-hidroksietil)-4-fenil-1,6-dimetil-3,4-dihidropirimidin-2(1H)-on (**6-18b**)

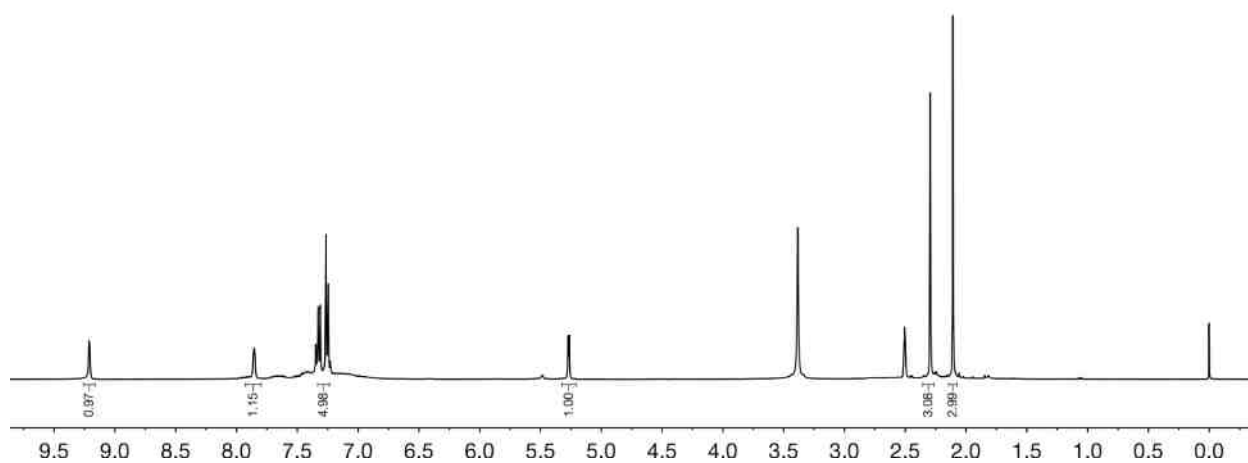
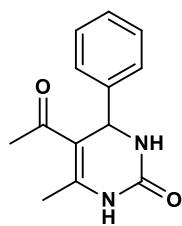


^1H NMR spektar jedinjenja **6-18b** u CDCl_3 (400 MHz)

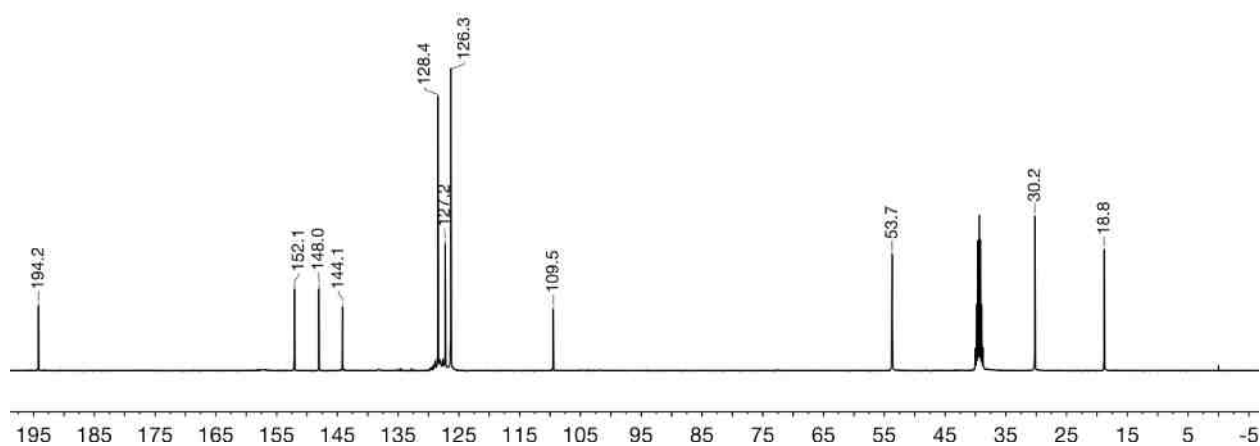


^{13}C NMR spektar jedinjenja **6-18b** u CDCl_3 (100,6 MHz)

Prilog 105. 5-acetil-4-fenil-6-metil-3,4-dihidropirimidin-2(1H)-on (6-19)

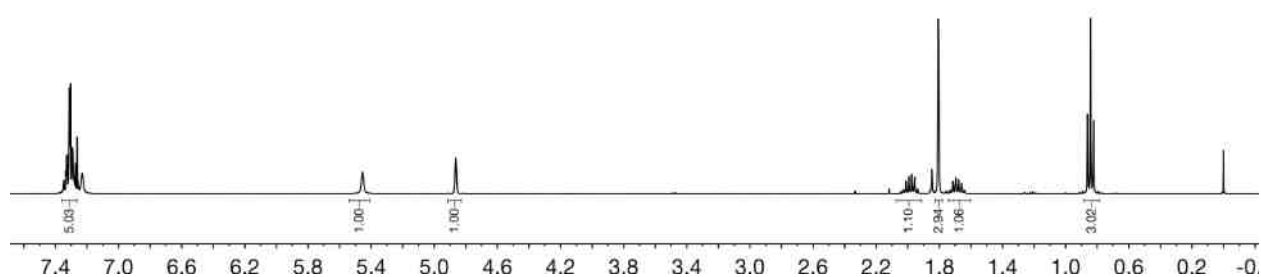
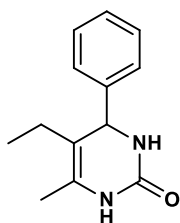


¹H NMR spektar jedinjenja 6-19 u CD₃SOCD₃ (400 MHz)

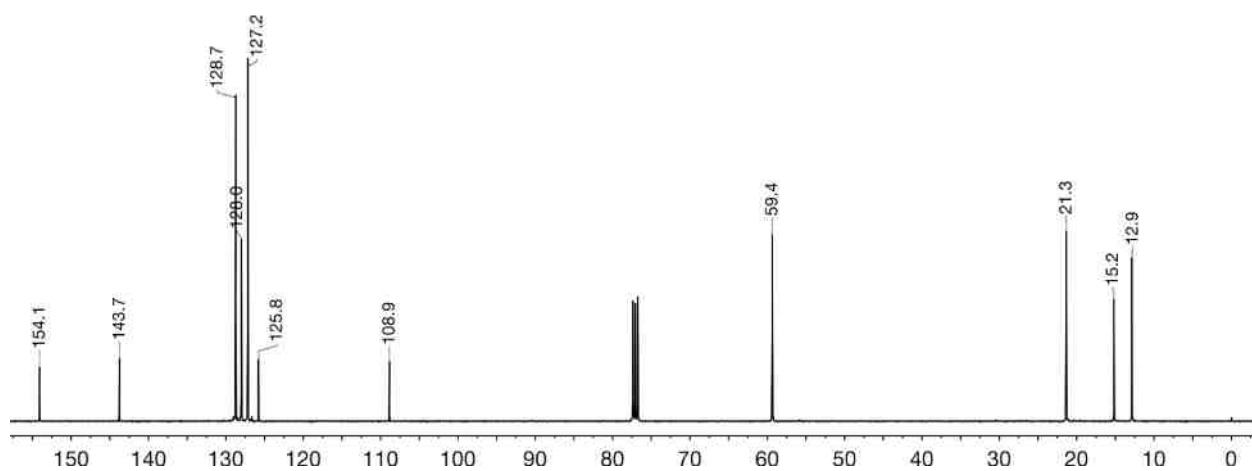


¹³C NMR spektar jedinjenja 6-19 u CD₃SOCD₃ (100,6 MHz)

Prilog 106. 5-etil-4-fenil-6-metil-3,4-dihidropirimidin-2(1H)-on (**6-19a**)

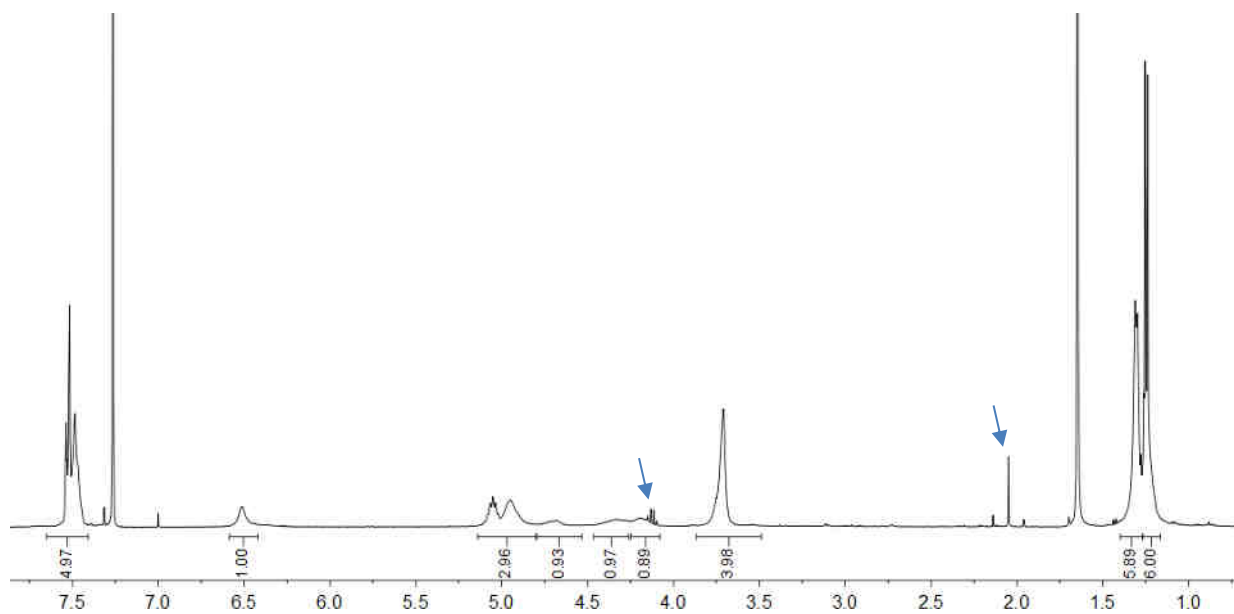
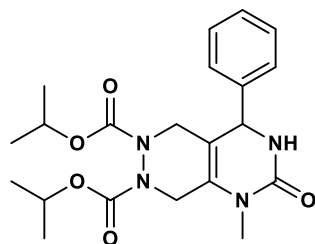


¹H NMR spektar jedinjenja **6-19a** u CD₃SOCD₃ (400 MHz)

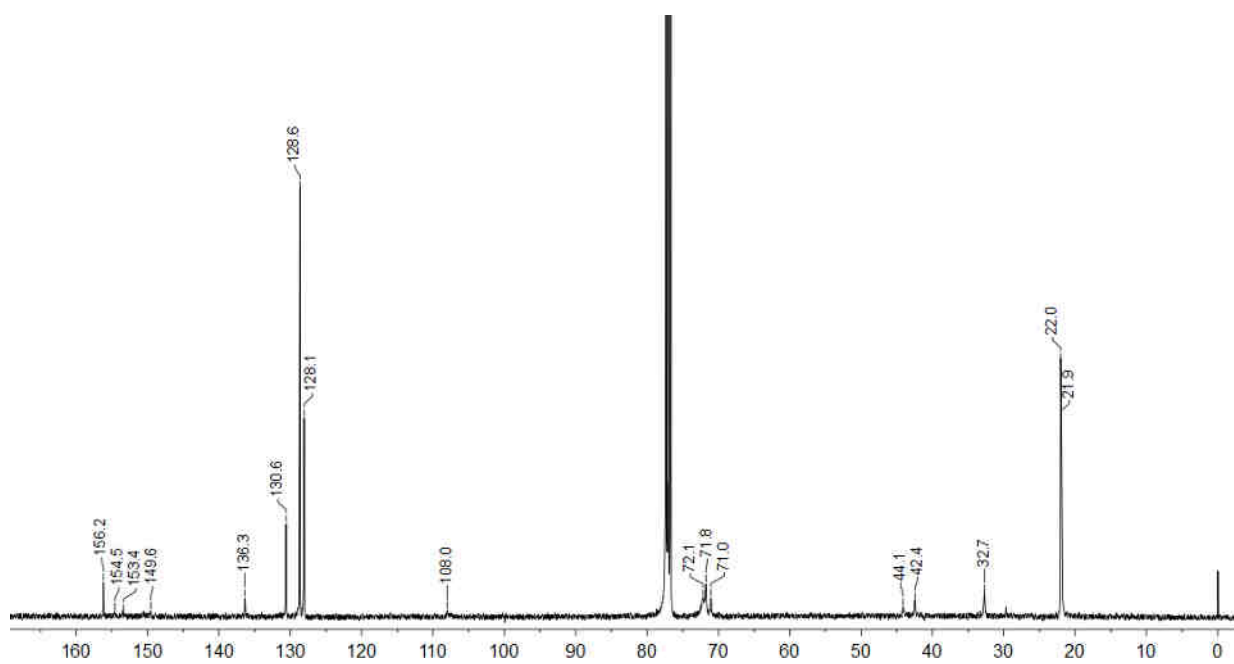


¹³C NMR spektar jedinjenja **6-19a** u CD₃SOCD₃ (100,6 MHz)

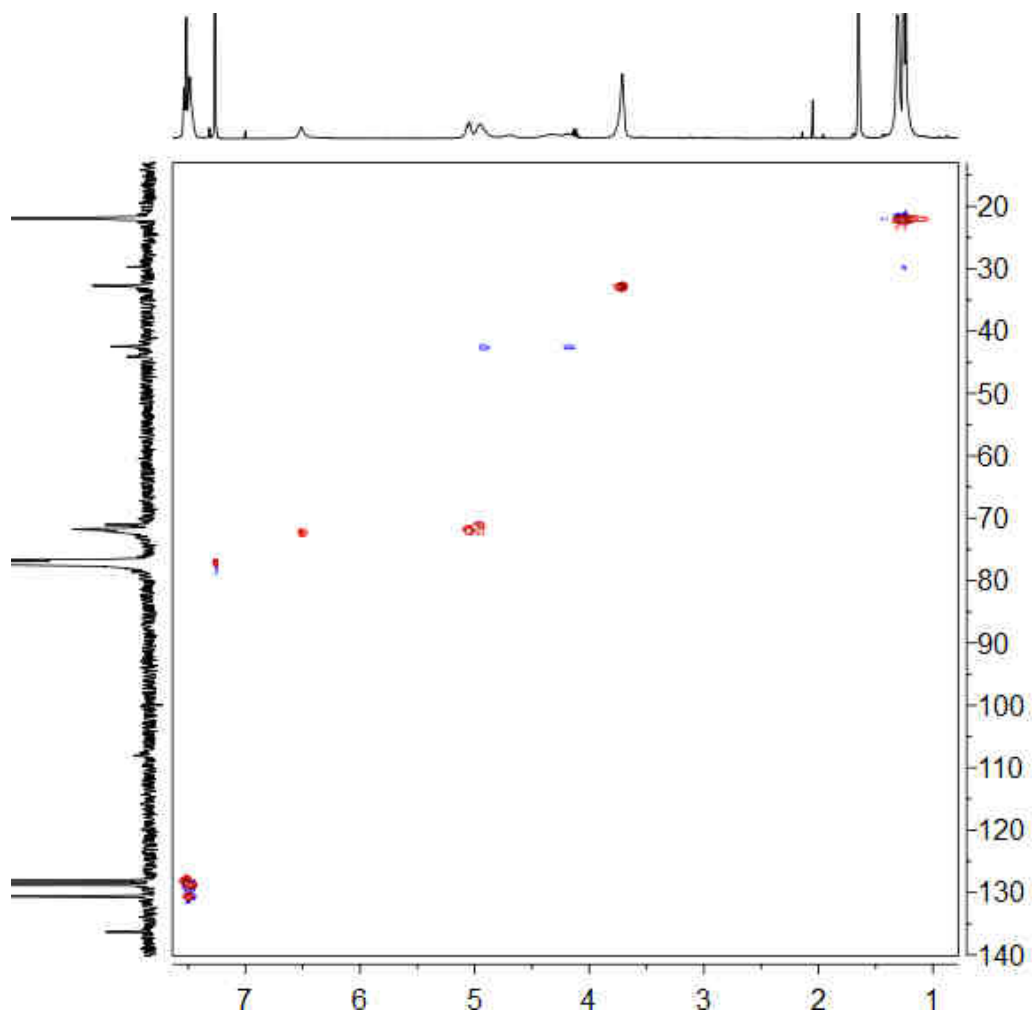
Prilog 107. Diizopropil-4-fenil-1-metil-2-okso-1,2,3,4,5,8-heksahidropirimido[4,5-*d*]piridazin-6,7-dikarboksilat (**6-12e**)



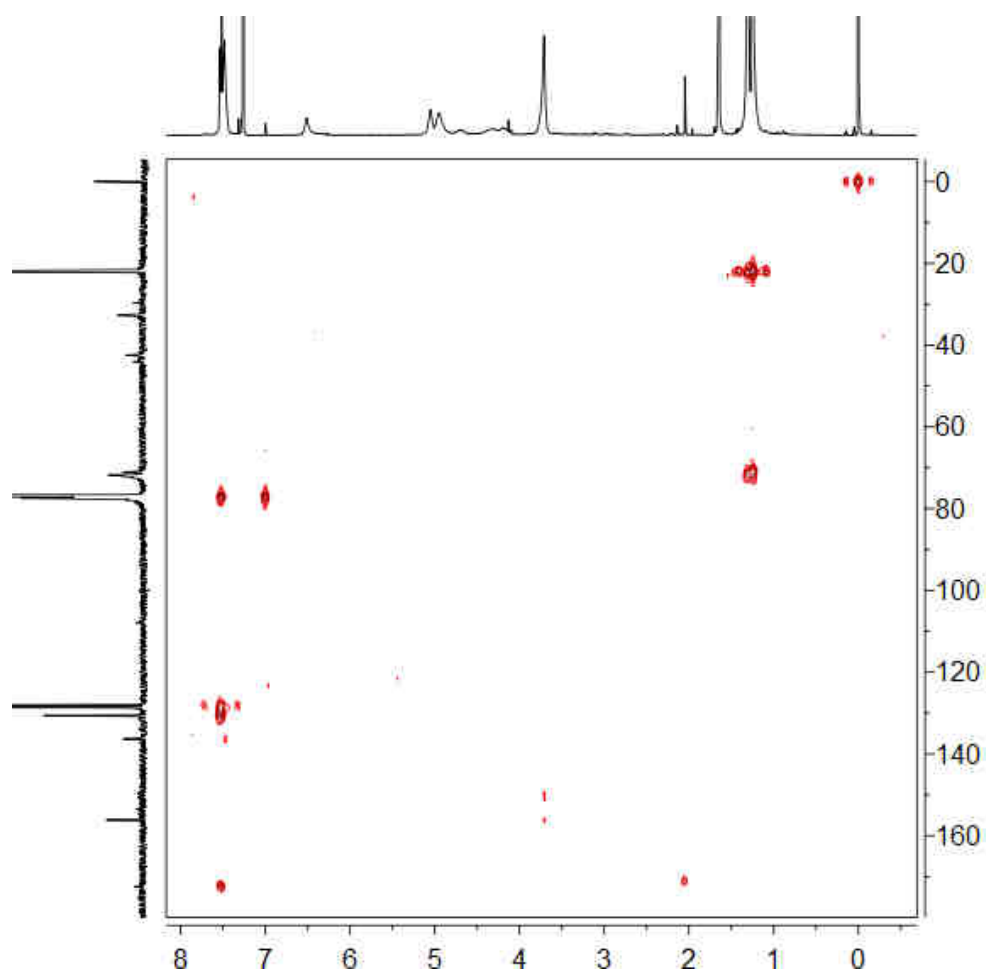
^1H NMR spektar jedinjenja **6-12e** u CDCl_3 (400 MHz). Signali označeni strelicama potiču od tragova EtOAc u uzorku.



^{13}C NMR spektar jedinjenja **6-12e** u CDCl_3 (100,6 MHz).



HSQC spektar jedinjenja **6-12e** u CDCl_3



HMBC spektar jedinjenja **6-12e** u CDCl₃

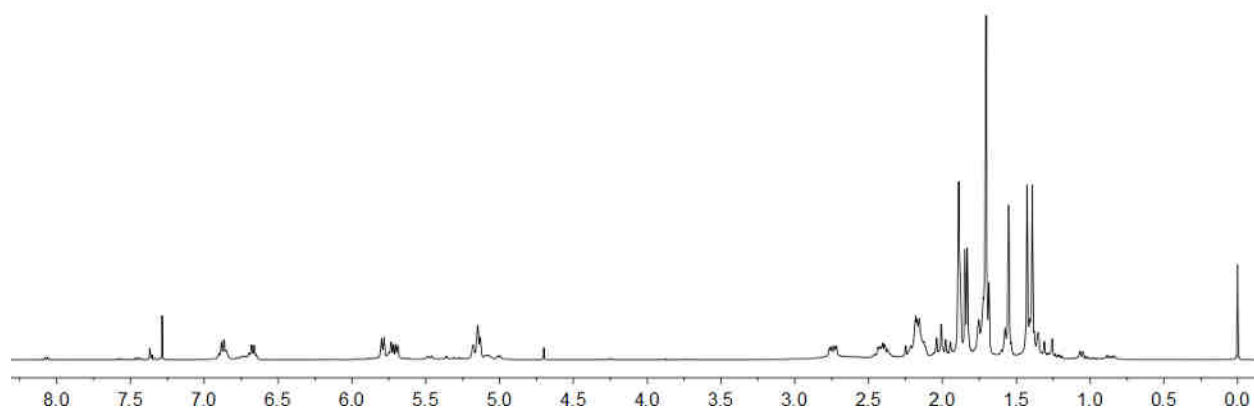
Prilog 108.

Tabela S1a. ¹H NMR (400 MHz) i ¹³C NMR (100,6 MHz) hemijska pomeranja (ppm) jedinjenja [6-1]-[6-10] u CD₃SOCD₂

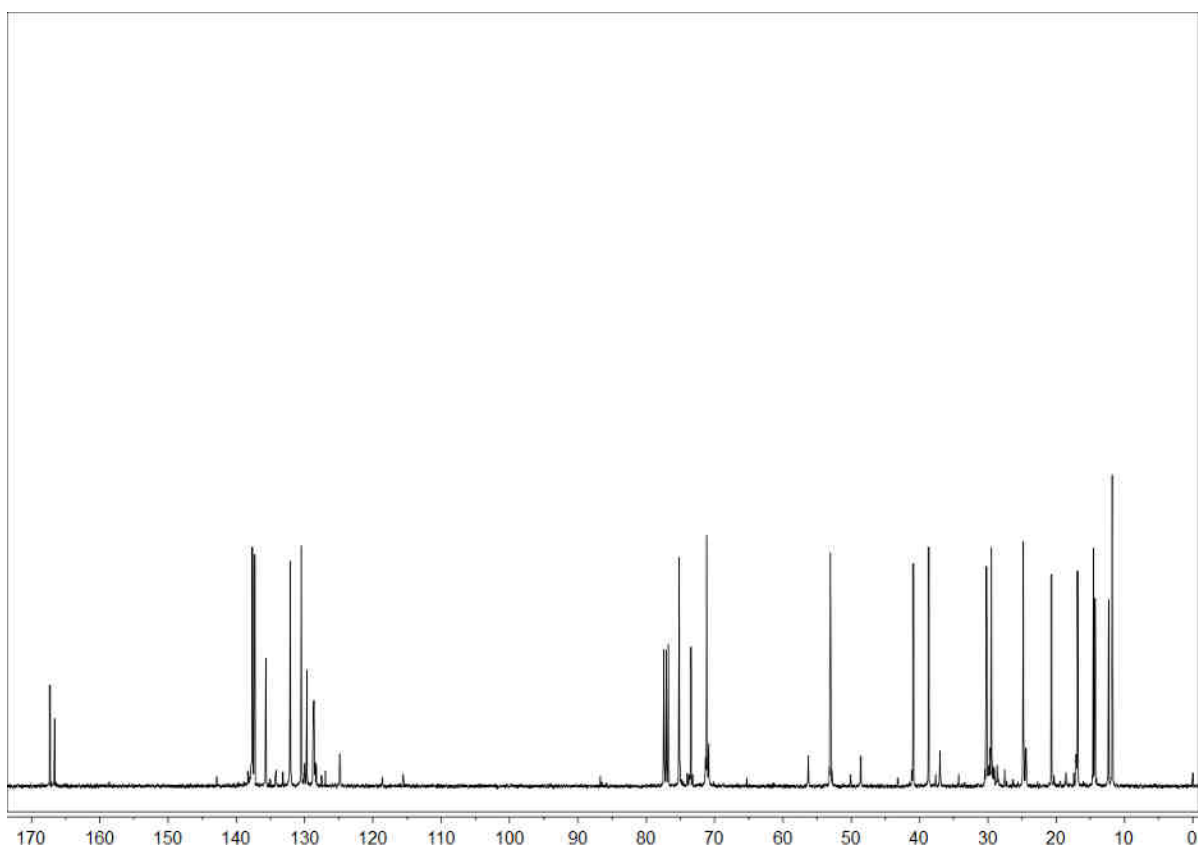
Signal	1		2		3		4		5		6		7		8		9		10	
	¹³ C	¹ H	¹³ C	¹ H	¹³ C	¹ H	¹³ C	¹ H	¹³ C	¹ H	¹³ C	¹ H	¹³ C	¹ H	¹³ C	¹ H	¹³ C	¹ H	¹³ C	¹ H
C-2	152,6		152,6		152,0		151,1		152,6		152,1		152,1		152,4		152,5		151,5	
C-4	54,3	5,16	54,0	5,10	53,7	5,10	50,2	5,39	53,7	5,09	53,5	5,12	55,3	5,48	53,7	5,15	55,3	5,40	48,5	5,44
C-5	99,6		99,7		98,9		99,0		99,8		98,7		97,1		99,5		101,0		97,1	
C-6	149,0		148,8		148,4		148,5		148,7		148,6		149,1		149,2		146,6		149,1	
C-7	18,3	2,25	18,2	2,24	17,7	2,25	17,7	2,29	18,2	2,24	17,7	2,25	17,7	2,28	18,3	2,25	19,0	2,36	17,7	2,27
C-8	166,3		166,3		165,7		165,6		166,3		165,7		165,7		166,2		165,8		165,4	
C-1'	145,2		142,2		144,5		143,1		137,4		146,0		131,1		141,4		145,9		131,3	
C-2'	126,6		126,5	7,11	126,6	7,03	134,6		127,8	7,14	112,2	6,78	159,4		128,6	7,26	113,5	7,02	159,3	
C-3'	128,9	7,16-	129,4	(4H)	137,3		130,1	7,12	114,3	6,87	159,1		111,1	6,99	115,6	7,13	163,0		115,4	7,14
C-4'	127,7	7,36	136,8		127,8	7,06	127,1	7,12	158,9		112,0	6,83	120,0	6,87	161,8		115,0	6,97	129,3	7,30
C-5'		(5H)			128,2	7,20	126,4	7,17			129,5	7,24	126,6	7,02			130,4	7,29	124,4	7,15
C-6'					123,2	7,01	126,4	7,17			118,0	6,81	128,6	7,23			122,1	7,10	128,6	7,24
C-1''			21,1	2,26	21,1	2,28	18,5	2,41	55,6	3,72	54,9	3,72	48,7	3,80						
CO ₂ Me	51,2	3,53	51,2	3,52	50,7	3,53	50,6	3,45	51,2	3,53	50,7	3,54	50,6	3,47	51,2	3,53	51,3	3,65	50,6	3,47
NH-1		9,14		9,10		9,17		9,17		9,10		9,21	/			9,17		7,32		9,27
NH-3		7,68		7,62		7,70		7,63		7,61		7,73	/			7,69		5,51		7,70

Tabela S1b. ¹H NMR (400 MHz) i ¹³C NMR (100,6 MHz) hemijska pomeranja (ppm) jedinjenja [6-12]-[6-15] u CHCl₃

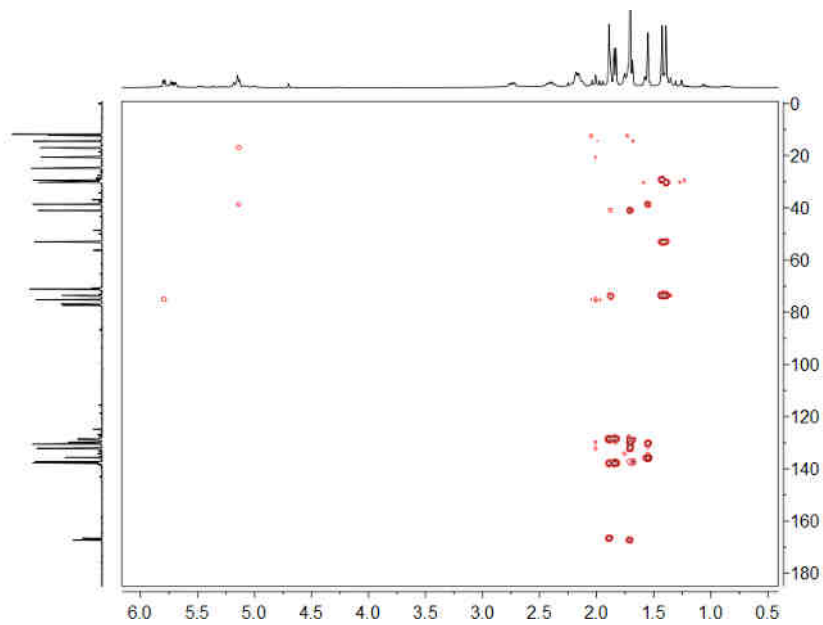
Signal	12		13		14		15	
	¹³ C	¹ H	¹³ C	¹ H	¹³ C	¹ H	¹³ C	¹ H
C-2	153,0		152,8		153,2		153,0	
C-4	52,2	5,16	51,5		52,0	5,13	51,8	5,12
C-5	102,2		101,9		102,1		102,2	
C-6	150,7		151,0		151,0		150,6	
C-7	16,0	2,48	16,0	2,50	16,1	2,49	15,9	2,48
C-8	166,0		165,9		166,1		166,6	
C-1'	143,8		140,0 (<i>d</i> , <i>J</i> =3,0 Hz)		145,4		140,8	
C-2'	125,9		127,9 (<i>d</i> , <i>J</i> =8,1 Hz)	7,25 (2H)	112,1	6,75	125,8	
C-3'	127,2	7,15-7,35 (5H)	115,1 (<i>d</i> , <i>J</i> =21,2 Hz)	7,14 (2H)	159,3		128,9	7,10 (4H)
C-4'	128,4		161,3 (<i>d</i> , <i>J</i> =243,4 Hz)		112,1	6,82	136,4	
C-5'					129,7	7,24		
C-6'					118,0	6,78		
C-1''					55,0	3,72	20,5	2,25
CO ₂ Me	50,9	3,57	51,0	3,57	51,1	3,58	51,0	3,56
N-Me	29,6	3,10	29,7	3,10	29,8	3,09	29,6	3,08
NH-3		7,91		8,00		7,97		7,95



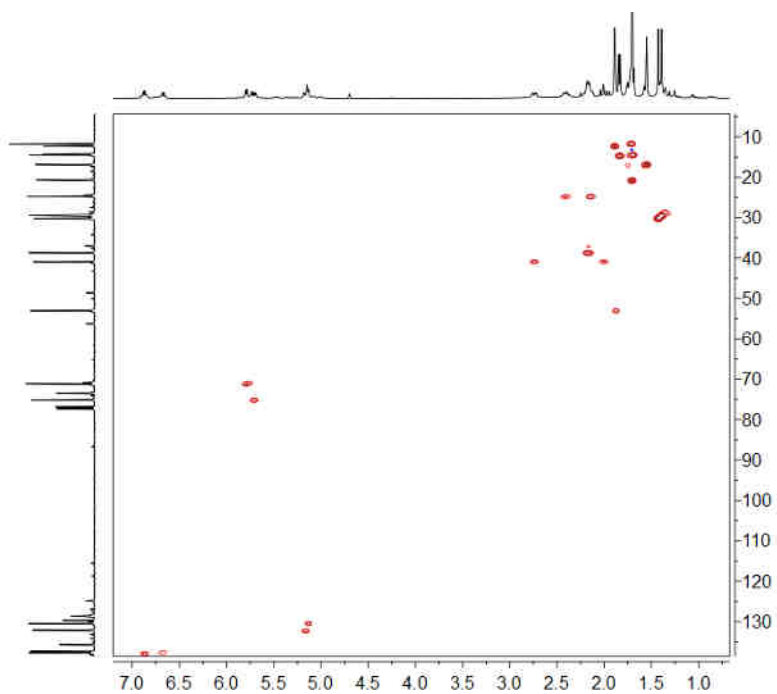
Prilog 109. ^1H NMR spektar jedinjenja 7-1.



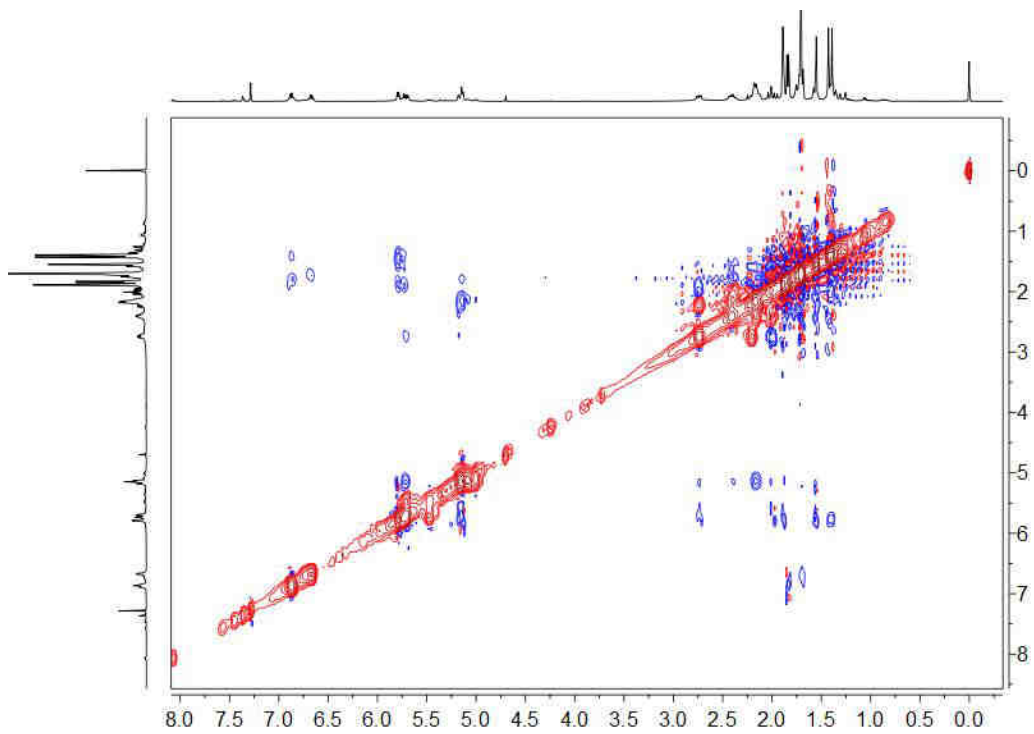
Prilog 110. ^{13}C NMR spektar jedinjenja 7-1.



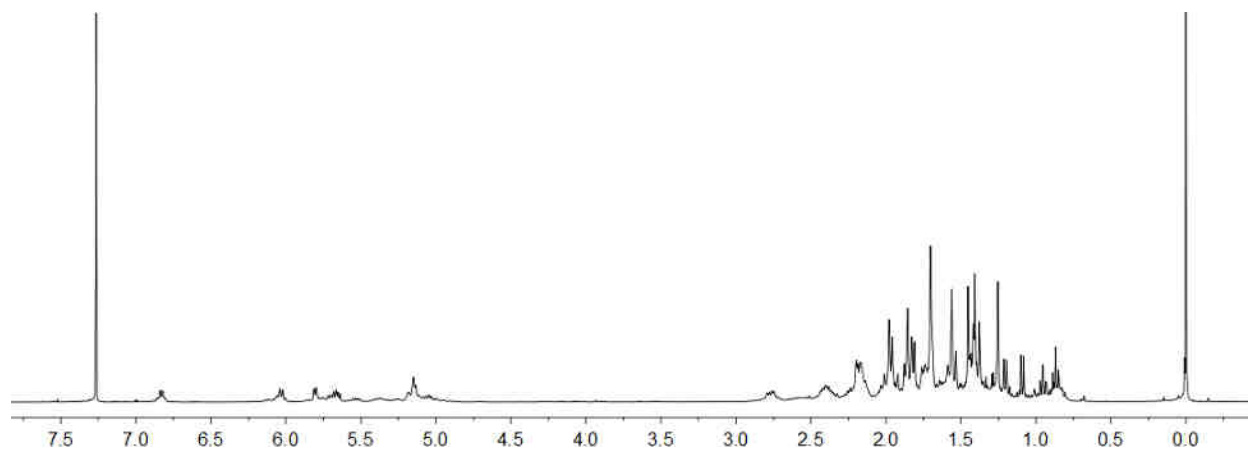
Prilog 111. HMBC spektar jedinjenja 7-1.



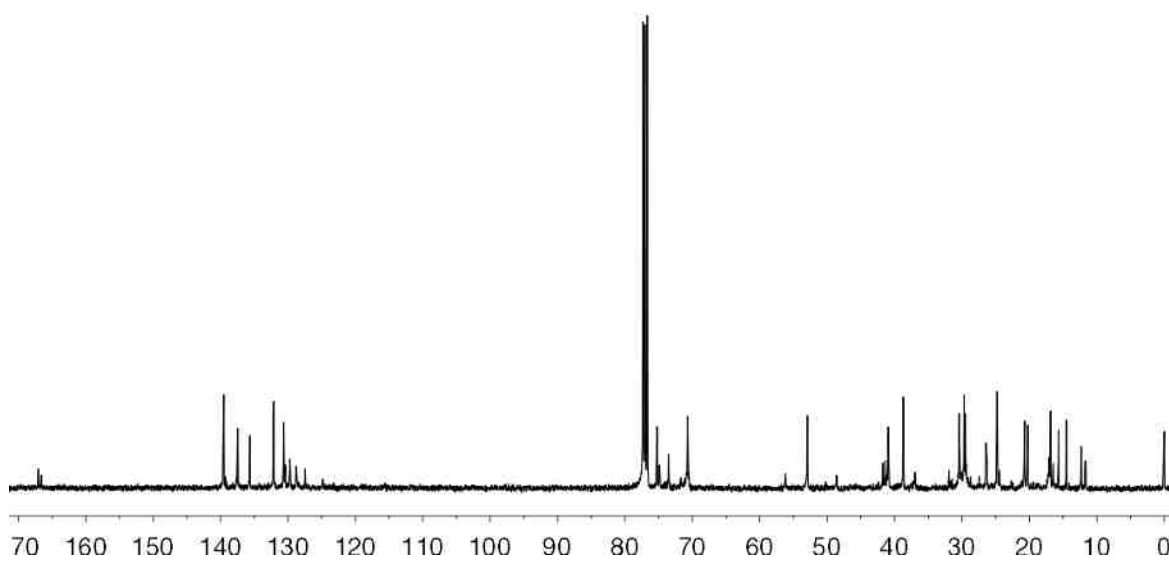
Prilog 112. HSQC spektar jedinjenja 7-1.



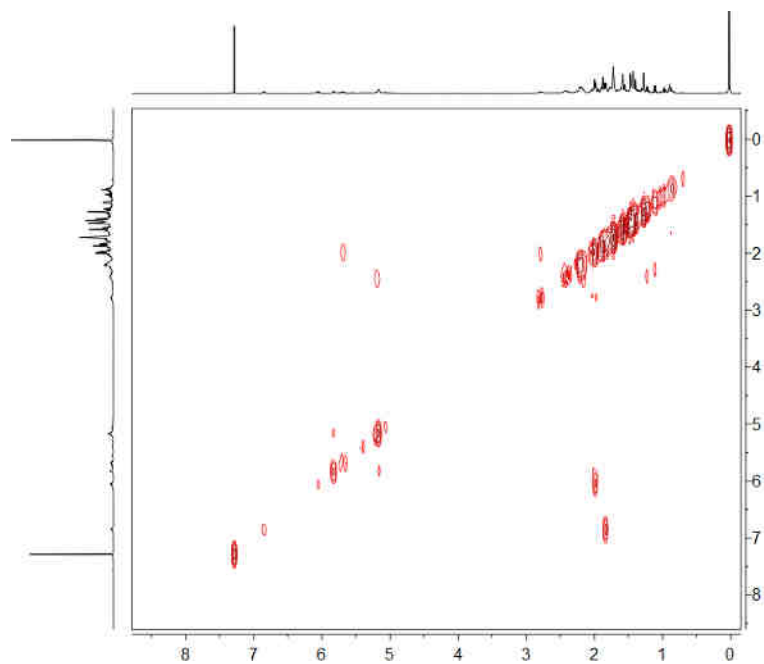
Prilog 113. NOESY spektar jedinjenja 7-1.



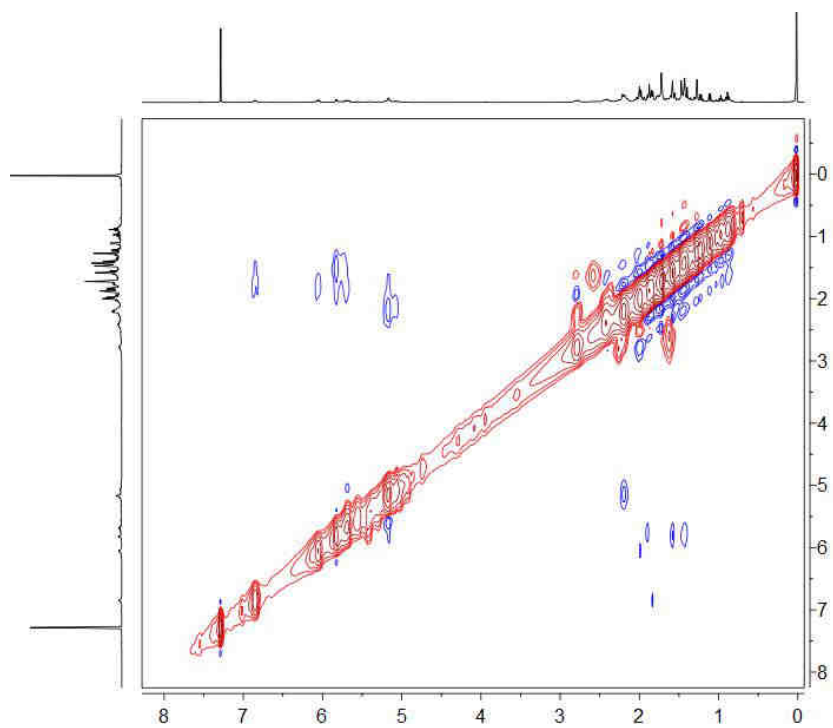
Prilog 114. ^1H NMR spektar jedinjenja 7-2.



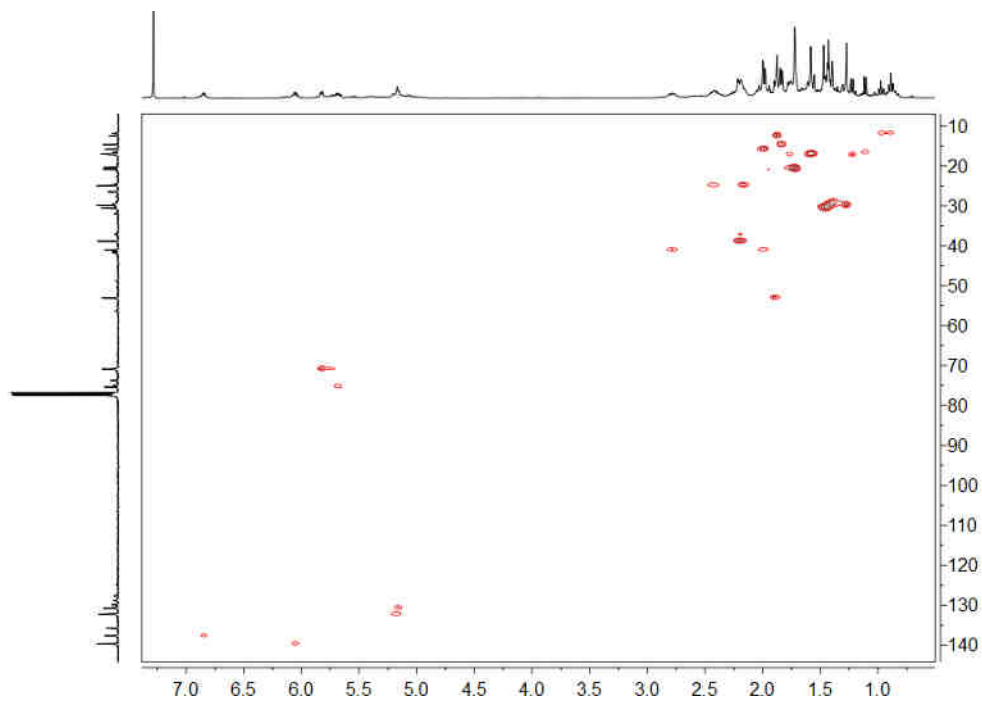
Prilog 115. ^{13}C NMR spektar jedinjenja 7-2.



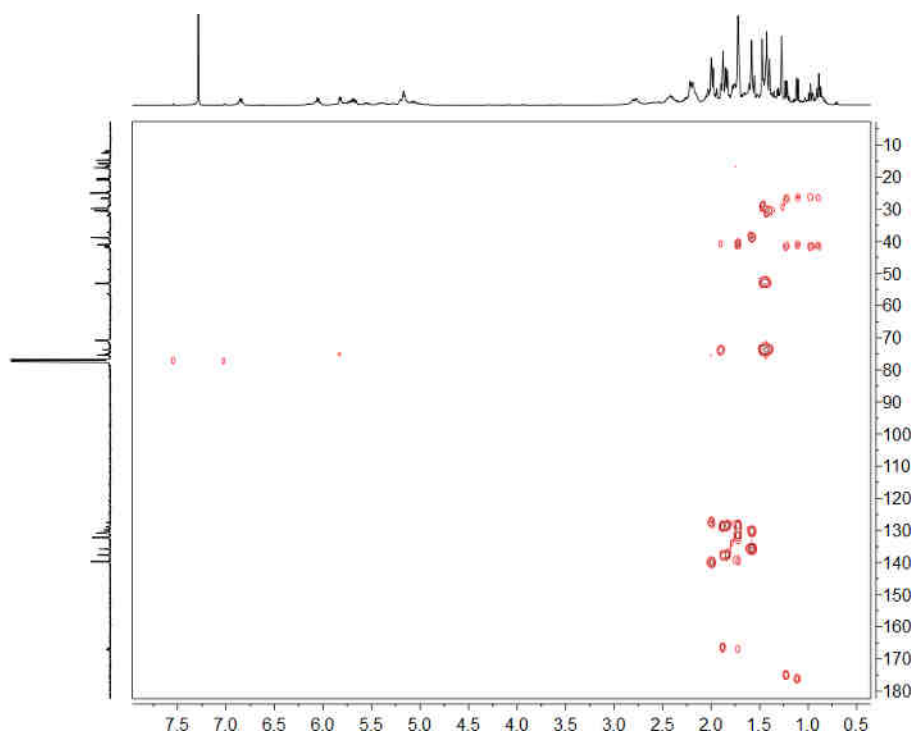
Prilog 116. ^1H - ^1H COSY spektar jedinjenja 7-2.



Prilog 117. NOESY spektar jedinjenja 7-2.



Prilog 118. HSQC spektar jedinjenja 7-2.



Prilog 119. HMBC spektar jedinjenja 7-2.

DRAGAN ZLATKOVIĆ

LIČNE INFORMACIJE

Rođen u Skoplju, Republika Makedonija, 26. avgusta 1984.
Email dragan.zlatkovic@gmail.com
Internet stranica https://www.researchgate.net/profile/Dragan_Zlatkovic/

OBLASTI INTERESOVANJA

Fitohemija • Etnofarmakologija • Organska sinteza • Mehanizmi organskih reakcija • NMR spektroskopija • Gasna hromatografija-masena spektrometrija

RADNO ISKUSTVO:

*Prirodno-matematički
fakultet, Niš*

Saradnik (2011-2012), istraživač-pripravnik (2012–2014) i istraživač saradnik (2014–) na projektu “Kombinatorne biblioteke heterogenih katalizatora, prirodnih proizvoda, modifikovanih prirodnih proizvoda i njihovih analoga: put ka novim biološki aktivnim agensima”, Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije.

Angažovan u nastavi na predmetu Principi organske sinteze (2011/12) i Organska hemija II (2014/15; 2016/17; 2017/18).

OBRAZOVANJE

Srednja škola

(2003) Gimnazija “Bora Stanković” u Nišu, kao nosilac Vukove diplome. Osvajao je prva mesta na republičkim takmičenjima iz hemije za srednjoškolce 2001. i 2002.

Diplomirani hemičar

(2011) Departman za hemiju, PMF Niš, prosečna ocena 9,36. Dobitnik je nagrade fonda “Ana Bjelečić i Ivan Marković” za najboljeg diplomiranog studenta Departmana za hemiju u 2011.

*Doktor hemijskih
nauka*

(2011-) Departman za hemiju, PMF Niš, prosečna ocena 10,0 u dasadašnjem toku studija. Naziv prijavljene teze: “Nova biološki aktivna sintetska aza-heterociklična jedinjenja i novi sekundarni metaboliti iz odabranih biljnih vrsta: sinteza, izolovanje i spektralna karakterizacija”.

OSTALO

Član je Srpskog hemijskog društva, Kluba mladih hemičara Srbije i Srpskog društva za fitohemiju i fitomedcinu.

Dobitnik stipendije za mlade istraživače na Međunarodnom simpozijumu o etarskim uljima (ISEO) 2018. (*Young Scientist Registration Fellowship*).

Realizator radionice „GC-MS made easy: AMDIS in the analysis of complex mixtures of volatiles“ na simpozijumu ISEO 2018.

Učešće na projektu „Noć istraživača 2014“ - SCIMPONICOM (Science in Motion for Friday Night Commotion 2014) koji se finansira iz projekta HORIZONT 2020.

Učešće u organizaciji Republičkih takmičenja iz hemije 2012, 2013. i 2016.

Služi se engleskim (C2), francuskim (B1) i nemačkim (B2) jezikom.

BIBLIOGRAFIJA

Radovi koji su proistekli iz ove disertacije: 1, 3, 5, 6, 7, 8, 10.

Radovi objavljeni u međunarodnom časopisu izuzetne vrednosti (M21a)

1. N.S. Radulović, **D.B. Zlatković**, T. Ilić-Tomić, L. Senčević, J. Nikodinovic-Runic, Cytotoxic effect of *Reseda lutea* L.: A case of forgotten remedy. *Journal of Ethnopharmacology* **2014**, *153*, 125–132. doi: 10.1016/j.jep.2014.01.034. IF(2015) = 3,333
2. N.S. Radulović, M.M. Todorovska, **D.B. Zlatković**, N.M. Stojanović, P.J. Randjelović, Two goitrogenic 1,3-oxazolidine-2-thione derivatives from Brassicales taxa: Challenging identification, occurrence and immunomodulatory effects. *Food and Chemical Toxicology* **2017**, *110*, 94–108. doi: 10.1016/j.fct.2017.10.005. IF(2016) = 3.,78

Radovi objavljeni u vrhunskim međunarodnim časopisima (M21)

3. **D.B. Zlatković**, N.S. Radulović, Reduction of Biginelli compounds by LiAlH_4 : a rapid access to molecular diversity. *RSC Advances* **2016**, *6*, 115058–115067. doi: 10.1039/C6RA24535H. IF(2014) = 3,840
4. N.S. Radulović, S.I. Filipović, **D.B. Zlatković**, M. Đorđević, N.M. Stojanović, P.J. Randjelović, K.V. Mitić, T.M. Jevtović-Stoimenov, V.M. Randelović, Immunomodulatory pinguisane-type sesquiterpenes from the liverwort *Porella cordaeana* (Porellaceae): the “new old” furanopinguisanol and its oxidation product exert mutually different effects on rat splenocytes. *RSC Advances* **2016**, *6*, 41847–41860. doi: 10.1039/C6RA04308A. IF(2014) = 3,840
5. N.S. Radulović, **D.B. Zlatković**, *n*-Octyl esters of long-chain fatty acids are not anthropogenic pollution markers, *Environmental Chemistry Letters* **2014**, *12*, 303–312. doi: 10.1007/s10311-013-0443-1. IF(2015) = 2,918.
6. N.S. Radulović, **D.B. Zlatković**, P.J. Randelović, N.M. Stojanović, S.B. Novaković, H. Akhlaghi, Chemistry of spices: bornyl 4-methoxybenzoate from *Ferula ovina* (Boiss.) Boiss. (Apiaceae) induces hyperalgesia in mice. *Food & Function* **2013**, *4*, 1751–1758. doi: 10.1039/c3fo60319a. IF(2013) = 2,907

Radovi objavljeni u istaknutim međunarodnim časopisima (M22)

7. N. Radulović, **D. Zlatković**, M. Dekić, Z. Stojanović-Radić, Further Antibacterial *Geranium macrorrhizum* L. Metabolites and Synthesis of Epoxygermacrones, *Chemistry & Biodiversity* **2014**, *11*, 542–550. doi: 10.1002/cbdv.201300295. IF(2012) = 1,808
8. N. Radulović, **D. Zlatković**, K. Mitić, P. Randelović, N. Stojanović, Synthesis, spectral characterization, cytotoxicity and enzyme-inhibiting activity of new ferrocene-indole hybrids, *Polyhedron* **2014**, *80*, 134–141, doi: 10.1016/j.poly.2014.03.006. IF(2015) = 2,108

Rad objavljen u međunarodnom časopisu (M23)

9. N. Radulović, **D. Zlatković**, B. Zlatković, D. Đoković, G. Stojanović, R. Palić, Chemical composition of leaf and flower essential oils of *Conium maculatum* from Serbia, *Chemistry of Natural Compounds*, **2008**, *44*, 390–392. doi: 10.1007/s10600-008-9074-3. IF(2009) = 0,572

Rad objavljen u nacionalnom časopisu (M52)

10. **D.B. Zlatković**, N.S. Radulović, Study of lithium aluminium hydride reduction of 5-acetyl-1,6-dimethyl-4-phenyl-3,4-dihydropyridin-2(1H)-one. *Facta Universitatis, Series Physics, Chemistry and Technology* **2017**, *15*, 17–22. doi: 10.2298/FUPCT1701017Z

Radovi saopšteni na nacionalnim i međunarodnim naučnim skupovima objavljeni u izvodu (M64 i M34)

1. Zlatković, D., Radulović, N. Essential-oil composition and chemotypification of *Achillea atrata* L. subsp. *multifida* from Bulgaria. In: *Natural Volatiles and Essential Oils, Vol. 4, Issue 3, 2017*, Pécs, Hungary, September 10 – 13, 2017, p. 127. (M34)
2. Zlatković, D., Radulović, N. Photochemical irradiation of verbenone as a source of natural product diversification. In: *Natural Volatiles and Essential Oils, Vol. 4, Issue 3, 2017*, Pécs, Hungary, September 10 – 13, 2017, p. 128.
3. Zlatković, D., Radulović, N. LiAlH_4 reduction of Biginelli compounds: NMR study of the reaction products. In: *19th Central and Eastern European NMR Symposium & Bruker Users' Meeting, Book of Abstracts*, September 5 – 8, 2017, Timișoara (Romania), p. 18. (M34)
4. Todorovska, M.M., Radulović, N.S., Zlatković, D.B. 5-Phenyl-1,3-oxazolidine-2-thione, a volatile from dyer's rocket (*Reseda luteola* L.), undergoes thermal isomerization under GC conditions. In: *The 3rd International Conference on Natural Products Utilization: from Plants to Pharmacy Shelf (ICNPU-2017)*. October, 18 – 21, 2017, Bansko, (Bulgaria), p. 326. (M34)
5. Radulović, N.S., Filipović, S.I., Zlatković, D.B., Đorđević, M.R., Stojanović, N.M., Randjelović, P.J., Mitić, K.V., Jevtović-Stoimenov T.M., Randelović, V.M. Structural revision of α -furanopinguisanol. In: *18th Central and Eastern European NMR Symposium & Bruker Users' Meeting, Programme and Book of Abstracts*, September 18 – 20, 2016, Sofia (Bulgaria), p. 49. (M34)
6. Filipović, S.I., Radulović, N.S., Zlatković, D.B., Đorđević, M.R., Randelović, V.N. The “new old” α -furanopinguisanol and its oxidation product from the essential oil of the liverwort *Porella cordaeana* (Hub.) Moore (Porellaceae). In: *Programme, Book of Abstracts and Participants List of the 47th International Symposium on Essential Oils, Nice (France)*, September 11 – 14, 2016, p. 77. (M34)
7. Stojanović, N.M., Radulović, N.S., Filipović, S.I., Zlatković, D.B., Đorđević, M.R., Randjelović, P.J., Mitić, K.V., Jevtović-Stoimenov, T.M., Randelović, V.M. Immunomodulatory activity of pinguisane-type sesquiterpenes from the essential oil of the liverwort *Porella cordaeana* (Hub.) Moore (Porellaceae). In: *Programme, Book of Abstracts and Participants List of*

- the 47th International Symposium on Essential Oils*, Nice (France), September 11 – 14, 2016, p. 139. (M34)
8. Todorovska, M.M., Radulović, N.S., Zlatković, D.B., Stojanović, N.M., Randelović, P.J., Ilić, M. Effects of two volatile 2-oxazolidinethione derivatives from *Draba lasiocarpa* Rochel (Brassicaceae) and *Reseda lutea* L. (Resedaceae) on macrophage viability and nitric oxide production. In: *Programme, Book of Abstracts and Participants List of the 47th International Symposium on Essential Oils*, Nice (France), September 11 – 14, 2016, p. 145. (M34)
 9. Dekić, M., Radulović, N.S., Zlatković, D.B., Stojanović-Radić, Z. Further antibacterial *Geranium macrorrhizum* L. essential-oil constituents and the synthesis of epoxygermacrones (Apiaceae). In: *Natural Volatiles and Essential Oils, Special Issue 2014*, Istanbul (Turkey), September 7 – 10, 2014, p. 122. (M34)
 10. Radulović, N.S., Zlatković, D.B., Randelović, P.J., Stojanović, N.M., Akhlaghi, H. Chemical composition and antinociceptive properties of *Ferula ovina* (Umbelliferae). In: *Program, Book of Abstracts and Participants List of the 43rd International Symposium on Essential Oils*, Lisboa (Portugal), September 5 – 8, 2012, p. 33. (M34)
 11. Radulović, N.S., Zlatković, D.B. *n*-Octyl esters of long-chain fatty acids are not anthropogenic pollution markers. In: *Book of Abstracts of the Congress of Chemists and Technologists of Macedonia*, Ohrid (Republic of Macedonia), October 8 – 11, 2014, p. 133. (M64)
 12. Radulović, N.S., Zlatković, D.B., Randelović, P.J., Stojanović, N.M., Novaković, S.B., Akhlaghi, H. Chemistry of spices: bornyl 4-methoxybenzoate from *Ferula ovina* (Boiss.) Boiss. (Apiaceae) induces hyperalgesia in mice. In: *Book of Abstracts of the Congress of Chemists and Technologists of Macedonia*, Ohrid (Republic of Macedonia), October 8 – 11, 2014, p. 58. (M64)
 13. Zlatković, D.B., Radulović, N.S., Ilić-Tomić, T., Senerović, L., Nikodinovic-Runic, J. Cytotoxic effect of *Reseda lutea* L.: A case of forgotten remedy. In: *Program and Book of Abstracts of the 51th Meeting of the Serbian Chemical Society*, Niš (Serbia), June 5 – 7, 2014, p. 60. (M64)
 14. Radulović, N.S., Zlatković, D.B. Analyses of waxes from *Hyacinthella leucophaea* (K. Koch) Schur. In: *Book of abstracts of the 11th Symposium on the Flora of Southern Serbia and Neighboring Regions*, Vlasina (Serbia), June 13 – 15, 2013, p. 88. (M34)
 15. Radulović, N.S., Zlatković, D.B. Sastav voska biljne vrste *Heracleum sphondylium* L. (mečja šapa): Jesu li *n*-oktil estri masnih kiselina zaista markeri otpadnih voda u živom svetu? In: *Program i kratki izvodi radova Prve konferencije mladih hemičara Srbije*, Belgrade (Serbia), October 19 – 20, 2012, p. HA P32. (M64)
 16. Radulović, N.S., Zlatković, D.B., Dekić, M., Stojanović-Radić, Z. Germacrone epoxides from *Geranium macrorrhizum* L. isolation, synthesis, spectral characterization and antimicrobial activity. In: *Programme and Book of Abstracts of the 50th Meeting of the Serbian Chemical Society*, Belgrade (Serbia), June 14 – 15, 2012, p. 108. (M64)
 17. Zlatković, D.B., Radulović, N.S., Mitić, K., Randelović, P., Stojanović, N. Toxicity and acetylcholinesterase inhibiting activity of novel ferrocene-indole hybrids. In: *Programme and Book of Abstracts of the 52nd Meeting of the Serbian Chemical Society*, Novi Sad (Serbia), May 29 – 30, 2015, p. 113. (M64)
 18. Zlatković, D.B., Radulović, N.S. Diesters of a highly oxygenated germacrane derivative from *Daucus carota* L. In: *Book of abstracts of the 12th Symposium on the Flora of Southeastern Serbia and Neighboring Regions*, Kopaonik (Serbia), June 16 – 19, 2016, p. 118. (M34)
 19. Zlatković, D.B., Radulović, N.S., Ilić-Tomić, T., Senerović, L., Nikodinovic-Runic, J. Cytotoxic isothiocyanates from *Reseda lutea* L. In: *Book of abstracts of the 12th Symposium on the Flora of Southeastern Serbia and Neighboring Regions*, Kopaonik (Serbia), June 16 – 19, 2016, pp. 120. (M34)
 20. Zlatković, D.B., Radulović, N.S. Neočekivani proizvod reakcije oksidativnog kuplovanja eugenola. In: *Program i kratki izvodi radova Treće konferencije mladih hemičara Srbije*, Belgrade (Serbia), October 24, 2015, p. 47. (M64)
 21. Radulović, N.S., Filipović, S.I., Zlatković, D.B., Đorđević, M. R. Revizija stereohemije furanopingvizanola, In: *Kratki izvodi radova Četvrte konferencije mladih hemičara Srbije*, Belgrade (Serbia), November 5, 2016, p. 31. (M64)
 22. Zlatković, D., Radulović, N., Đorđević, M. Reduction of Biginelli compounds by LiAlH₄: a rapid access to molecular diversity, In: *XII students' congress of the Society of Chemists and Technologists of Macedonia, Book of Abstracts*, Skopje (Macedonia), October 12 – 14, 2017, p. 8. (M64)
 23. Đorđević, M., Radulović, N., Blagojević, P., Zlatković, D., Structural revision of aristol: a fresh look at the oxidative coupling of thymol under iodination conditions. In: *XII students' congress of the Society of Chemists and Technologists of Macedonia, Book of Abstracts*, Skopje (Macedonia), October 12 – 14, 2017, p. 7. (M64)
- Predavanja po pozivu sa skupa nacionalnog značaja (M61)*
1. Radulović, N.S.; Zlatković, D.B.; Randelović, P.J.; Stojanović, N.M.; Akhlaghi, H. Sastav voska biljne vrste *Heracleum sphondylium* L. (mečja šapa): jesu li *n*-oktil estri masnih kiselina zaista markeri otpadnih voda u živom svetu?, In: *Program i kratki izvodi radova Prve konferencije mladih hemičara Srbije*. Beograd (Srbija), October 19 – 20, 2012, p. HA PP4.

ИЗЈАВА О АУТОРСТВУ

Изјављујем да је докторска дисертација, под насловом

„Нова биолошки активна синтетска аза-хетероциклична једињења и нови секундарни метаболити из одабраних биљних врста: синтеза, изоловање и спектрална карактеризација“

која је одбрањена на Природно-математичком факултету Универзитета у Нишу:

- резултат сопственог истраживачког рада;
- да ову дисертацију, ни у целини, нити у деловима, нисам пријављивао на другим факултетима, нити универзитетима;
- да нисам повредио ауторска права, нити злоупотребио интелектуалну својину других лица.

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци, који су у вези са ауторством и добијањем академског звања доктора наука, као што су име и презиме, година и место рођења и датум одбране рада, и то у каталогу Библиотеке, Дигиталном репозиторијуму Универзитета у Нишу, као и у публикацијама Универзитета у Нишу.

У Нишу, 03.11. 2018.

Потпис аутора дисертације:

Златан Ђ. Злашковић
(Име, средње слово и презиме)

**ИЗЈАВА О ИСТОВЕТНОСТИ ЕЛЕКТРОНСКОГ И ШТАМПАНОГ ОБЛИКА
ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ**

Наслов дисертације: Нова биолошки активна синтетска аза-хетероциклична једињења и нови секундарни метаболити из одабраних биљних врста: синтеза, изоловање и спектрална карактеризација

Изјављујем да је електронски облик моје докторске дисертације, коју сам предао за уношење у Дигитални репозиторијум Универзитета у Нишу, истоветан штампаном облику.

У Нишу, 03.11.2018.

Потпис аутора дисертације:

Зрџан Б. Злашкиновић
(Име, средње слово и презиме)

ИЗЈАВА О КОРИШЋЕЊУ

Овлашћујем Универзитетску библиотеку „Никола Тесла“ да у Дигитални репозиторијум Универзитета у Нишу унесе моју докторску дисертацију, под насловом:

„Нова биолошки активна синтетска аза-хетероциклична једињења и нови секундарни метаболити из одабраних биљних врста: синтеза, изоловање и спектрална карактеризација“

Дисертацију са свим прилозима предао/ла сам у електронском облику, погодном за трајно архивирање.

Моју докторску дисертацију, унету у Дигитални репозиторијум Универзитета у Нишу, могу користити сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons), за коју сам се одлучио/ла.

1. Ауторство (CC BY)
2. Ауторство – некомерцијално (CC BY-NC)
3. Ауторство – некомерцијално – без прераде (CC BY-NC-ND)
4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима (CC BY-NC-SA)
5. Ауторство – без прераде (CC BY-ND)
6. Ауторство – делити под истим условима (CC BY-SA)

У Нишу, 03.11.2018.

Потпис аутора дисертације:

Драган Ђ. Златићковић
(Име, средње слово и презиме)