



УНИВЕРЗИТЕТ У КРАГУЈЕВЦУ  
ПРИРОДНО-МАТЕМАТИЧКИ ФАКУЛТЕТ

Милан Младеновић

**КОРЕЛАЦИЈА БИОЛОШКИХ АКТИВНОСТИ  
СИНТЕТИСАНИХ ДЕРИВАТА 4-ХИДРОКСИКУМАРИНА И  
ЊИХОВИХ ФИЗИЧКО-ХЕМИЈСКИХ ПАРАМЕТАРА**

Докторска дисертација

Крагујевац, 2011





УНИВЕРЗИТЕТ У КРАГУЈЕВЦУ  
ПРИРОДНО-МАТЕМАТИЧКИ ФАКУЛТЕТ

Милан Младеновић

**КОРЕЛАЦИЈА БИОЛОШКИХ АКТИВНОСТИ  
СИНТЕТИСАНИХ ДЕРИВАТА 4-ХИДРОКСИКУМАРИНА И  
ЊИХОВИХ ФИЗИЧКО-ХЕМИЈСКИХ ПАРАМЕТАРА**

Докторска дисертација

Крагујевац, 2011





## ИДЕНТИФИКАЦИОНА СТРАНИЦА ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ

### *I. Аутор*

Име и презиме: **Милан Младеновић**

Датум и место рођења: **13.05.1984., Пирот**

Садашње запослење: **Природно-математички факултет, Универзитет у Крагујевцу**

### *II. Докторска дисертација*

Наслов: **Корелација биолошких активности синтетисаних деривата 4-хидроксикумарина и њихових физичко-хемијских параметара**

Број страница: **186**

Број слика: **45**, Број схема: **28**, Број табела: **24**

Број библиографских јединица: **195**

Установа и место где је израђен: **Природно-математички факултет, Крагујевац**

Научна област(УКД): **577.1, Хемија-Биохемија**

Ментор: **др Славица Солујић**

### *III. Оцена и одбрана*

Датум пријаве теме: **21. 06. 2010. године**

Број одлуке и датум прихватања докторске дисертације: **560/X-7, 23. 06. 2010.**

Комисија за оцену подобности теме и кандидата: **1877/8, 10. 11. 2010.**

- 1. др Славица Солујић, редовни професор ПМФ-а у Крагујевцу, научна област биохемија - ментор**
- 2. др Мирјана Михаиловић, виши научни сарадник на Институту за биолошка истраживања „Синиша Станковић”, научна област молекуларна биологија-члан**
- 3. др Мирослав Врвић, редовни професор Хемијског факултета, Универзитета у Београду, научна област биохемија-члан**

Комисија за оцену докторске дисертације: **690/XVI-1, 07.09.2011; 1233/12, 14.09.2011.**

- 1. др Славица Солујић, редовни професор ПМФ-а у Крагујевцу, научна област биохемија - ментор**
- 2. др Мирјана Михаиловић, виши научни сарадник на Институту за биолошка истраживања „Синиша Станковић”, научна област молекуларна биологија-члан**
- 3. др Мирослав Врвић, редовни професор Хемијског факултета, Универзитета у Београду, научна област биохемија – члан**

Комисија за одбрану докторске дисертације: **690/XVI-1, 07.09.2011; 1233/12, 14.09.2011.**

- 1. др Славица Солујић, редовни професор ПМФ-а у Крагујевцу, научна област биохемија - ментор**
- 2. др Мирјана Михаиловић, виши научни сарадник на Институту за биолошка истраживања „Синиша Станковић”, научна област молекуларна биологија-члан**
- 3. др Мирослав Врвић, редовни професор Хемијског факултета, Универзитета у Београду, научна област биохемија – члан**

Датум одбране дисертације:



*Ову докторску дисертацију посвећујем својој породици, мајци Лепосави и брату Ивану, као и фамилији, која ми је пружала сву неопходну подршку да истрајем при изради исте.*

*Такође, дисертацију посвећујем покојном оцу Профиру који није дочекао моје и братовљеве највеће успехе.*

*Захваљујем се проф. др Славици Солујић што ме је увела у предивни свет компјутационе биохемије, што је предложила тему докторске дисертације, као и на указаном поверењу као сараднику и на безграничној вери и оптимизму у тежаким тренутцима да ћемо успети да дисертацију приведемо крају.*

*Захваљујем се проф. др Слободану Сукдолаку и колеги др Ненаду Вуковићу на несебичној помоћи приликом израде докторске дисертације.*

*Свим колегама из лабораторије, са факултета и пријатељима бескрајно хвала на великој подршци!*

*На крају, посебну захвалницу дугујем мојој Виолети која је све тренутке током докторских студија и израде дисертације пролазила са мном, и без чијих савета и пружене велике љубави никада не бих истрајао!*



## ИЗВОД

Серија од седамнаест деривата 4-хидроксикумарина, супституисаних у положају 3 поларним функционалним групама, тестирани су као антимикуробни, антиоксидативни и антикоагулативни агенси.

Антимикуробна активност тестираних деривата **1-10c** одређена је дилуционом методом у *in vitro* условима при чему су деривати показали умерену активност.

Антиоксидативна активност *in vitro* деривата **1-10c** одређена је констатовањем тоталног антиоксидативног капацитета, способности неутрализације DPPH, пероксидног и хидрокси радикала и хелатизационог капацитета тестираних агенаса, при чему су сви деривати показали изразиту антиоксидативну активност.

Антикоагулативна активност *in vivo* деривата **1-10c** испитивана је након интраперитонеалне апликације деривата на лабораторијским пацовима Wistar соја и мерењем протромбинског времена. Деривати **1-10c** показали су одличну антикоагулативну активност након вишедневне апликације, нису изазвали инфламацију нити промене на јетри животиња.

Биолошки резултати су, након оптимизације једињења молекулско-механичким и квантно-механичким методама, поређени са њиховим физичко-хемијским параметрима, односно молекулским дескрипторима, што је резултовало формирањем осам статистички значајних 1D-QSAR једначина које су обухватиле студије антимикуробне (три једначине) и антиоксидативне активности (пет једначина), односно два статистички значајна 3D-QSAR модела који су обухватили студије антикоагулативне активности. QSAR студије искоришћене су при дизајну четрдесет шест нових активнијих деривата. Антимикуробна активност предвиђена је за десет нових деривата, антиоксидативна за двадесет, док је за шеснаест нових деривата предвиђен ниво антикоагулативне активности. QSAR студије употпуњење су и студијама хомологог моделовања, молекулског доковања и DFT механистичким студијама у циљу додатног објашњења високе активности тестираних деривата.



## SUMMARY

The series of seventeen 4-hydroxycoumarin derivatives, substituted at C-3 position with high polar scaffolds, were evaluated as antimicrobial, antioxidant and anticoagulant agents.

The *in vitro* antimicrobial activity of compounds **1-10c** was determined using the dilution method. During the evaluation of antimicrobial activity, coumarin derivatives showed moderate potential.

The compounds **1-10c** antioxidant activity *in vitro* was determined using *Total antioxidant capacity assay*, *DPPH radical scavenging assay*, *Lipid peroxidation in linoleic acid emulsion inhibition assay*, *Hydroxyl radical scavenging activity assay* and *Ferrous ion chelating ability assay*. During the evaluation of antioxidant activity, coumarin derivatives presented excellent activity.

The anticoagulant activity *in vivo* was evaluated after the continuous *intraperitoneal* administration of compounds **1-10c** to adult Albino Wistar rats and by measuring the prothrombin time. Administrated compounds presented excellent anticoagulant activity and induced no inflammation or change to the animal liver.

Biological results were correlated with various molecular descriptors, obtained after molecular-mechanic and quantum-mechanic optimization of coumarin compounds, which led to eight statistically significant 1D-QSAR equations, describing the antimicrobial (by three equations) and antioxidant activity (by five equations), and two statistically significant 3D-QSAR models describing the anticoagulant activity. Obtained QSAR model were used for design of fourthly six new derivatives with improved activity. The antimicrobial activity was predicted for ten new compounds, the antioxidant ability for twenty more, while the anticoagulant activity was proposed for sixteen new derivatives. QSAR studies were accompanied with homology modeling and molecular docking studies, as well with the DFT mechanistic studies which were all used for describing the high biological activity of tested compounds.





# САДРЖАЈ

## ИЗВОД

## SUMMARY

<b>1.</b>	<b>ОПШТИ ДЕО</b>	<b>1</b>
1.1.	Кумарини као биохемијски активна једињења	3
1.2.	Биолошка активност кумарина	10
1.2.1.	Антимикробна активност кумарина	13
1.2.2.	Антиоксидативна активност кумарина	22
1.2.3.	Антикоагулативна активност кумарина	27
1.3.	Метаболизам кумарина	37
1.4.	Компјутационе методе одређивања биоактивних конформација кумарина	39
1.5.	Методе дескрипције утицаја фармакофора у молекулима кумарина на биолошку активност	43
<b>2.</b>	<b>ЕКСПЕРИМЕНТАЛНИ ДЕО</b>	<b>45</b>
2.1.	Преглед синтетичких деривата 4-хидроксикумарина укључених у QSAR студије	47
2.2.	Припремни поступци за одређивање антимикробне активности деривата 4-хидроксикумарина у <i>in vitro</i> условима	52
2.2.1.	Засејавање култура на косу чврсту подлогу	53

2.2.2.	Припремање суспензије (инокулума) спора одређене концентрације	53
2.3.	Одређивање антимикуробне активности деривата 4-хидроксикумарина макродилуционом методом у <i>in vitro</i> условима	55
2.4.	Компјутационе методе одређивања вредности молекулских дескриптора и развоја QSAR студија антимикуробне активности	56
2.4.1.	Молекулска динамика	57
2.4.2.	Молекулска оптимизација	58
2.4.3.	Молекулски дескриптори	61
2.4.4.	QSAR студије антимикуробне активности	62
2.4.5.	Молекулско доковање	65
2.5.	Методе одређивање антиоксидативне активности испитиваних деривата 4-хидроксикумарина у <i>in vitro</i> условима	65
2.5.1.	Одређивање укупног антиоксидативног капацитета фосфолибденском методом	66
2.5.2.	Одређивање антиоксидативне активности DPPH методом	68
2.5.3.	Одређивање инхибиције липидне пероксидације амонијум-тиоцијанатном методом	69
2.5.4.	Одређивање способности неутрализације хидроксил радикала	70
2.5.5.	Одређивање хелатизационог капацитета	70
2.6.	Компјутационе методе одређивања вредности молекулских дескриптора и развоја QSAR студија антиоксидативне активности	71

2.6.1.	Молекулска динамика	71
2.6.2.	Молекулска оптимизација	72
2.6.3.	Молекулски дескриптори	76
2.6.4.	QSAR студије антиоксидативне активности	76
2.7.	Поступци за одређивање антикоагулативне активности у <i>in vitro</i> и <i>in vivo</i> условима	76
2.7.1.	Одређивање антикоагулативне активности <i>in vitro</i>	76
2.7.2.	Одређивање антикоагулативне активности <i>in vivo</i>	77
2.8.	Компјутационе методе одређивања вредности молекулских дескриптора и развоја 3D-QSAR студија антикоагулативне активности	80
2.8.1.	Молекулска динамика	81
2.8.2.	Преклапање молекула и формирање CoMFA и CoMSIA 3D-QSAR модела	82
2.8.3.	3D-QSAR студија антикоагулативне активности <i>in vivo</i>	83
2.9.	Механистичке студије антикоагулативне активности <i>in vivo</i> кумаринских деривата DFT методом	85
2.9.1.	Хомолого моделовање <i>VKORC1</i> пацова	85
2.9.2.	Молекулско доковање	86
2.9.3.	Механистичке студије инхибиције <i>VKORC1</i> кумаринским дериватима DFT методом	87

2.10.	Поступци одређивања биохемијских параметара јетре пацова након апликације кумаринских деривата <i>in vivo</i>	88
2.10.1.	Одређивање активности <i>аспартат</i> аминотрасферазе (кинетичком методом на 340 nm)	89
2.10.2.	Одређивање активности <i>аланин</i> аминотрасферазе (кинетичком методом на 340 nm)	89
2.10.3.	Одређивање активности <i>алкалне фосфатазе</i> (кинетичком методом на 405 nm)	90
2.10.4.	Одређивање активности $\gamma$ - <i>глутамил</i> трасферазе (кинетичком методом на 405 nm)	91
2.10.5.	Одређивање концентрације укупног билирубина (колориметријском методом на 550 nm)	92
2.10.6.	Одређивање концентрације укупног гвожђа (колориметријском методом на 595 nm)	92
2.10.7.	Одређивање концентрације укупних протеина (колориметријском методом на 540 nm)	93
2.10.8.	Одређивање концентрације фибриногена (колориметријском методом на 540 nm)	94
2.10.9.	Одређивање концентрације албумина (колориметријском методом на 628 nm)	95
3.	<b>РЕЗУЛТАТИ И ДИСКУСИЈА</b>	97
3.1.	Испитивање биохемијске активности деривата кумарина– преглед хемијске структуре	99

3.2.	Антимикробна активност деривата 4-хидроксикумарина испитивана у <i>in vitro</i> условима методом двоструког разблажења	101
3.3.	QSAR студије антимикробне активности	103
3.4.	Антиоксидативна активност деривата 4-хидроксикумарина у <i>in vitro</i> условима	115
3.4.1.	Укупан антиоксидативни потенцијал	115
3.4.2.	Одређивање способности неутрализације DPPH радикала	116
3.4.3.	Инхибиција липидне пероксидације у емулзији линолеинске киселине	120
3.4.4.	Одређивање способности неутрализације хидрокси радикала	122
3.4.5.	Хелатизациони капацитет	124
3.5.	QSAR студије антиоксидативне активности	126
3.6.	Антикоагулативна активност кумаринских деривата	136
3.6.1.	<i>In vitro</i> антикоагулативна активност	136
3.6.2.	<i>In vivo</i> антикоагулативна активност	137
3.6.3.	Одређивање метаболичких путева најактивнијих кумаринских деривата	139
3.7.	QSAR студије антикоагулативне активности	140
3.8.	Компјутационе студије механизма антикоагулативне активности у <i>in vivo</i> условима	149
3.9.	Биохемијски параметри серума и плазме лабораторијских животиња након апликације <i>in vivo</i> деривата кумарина	154

<b>4.</b>	<b>ЗАКЉУЧАК</b>	<b>157</b>
<b>5.</b>	<b>ЛИТЕРАТУРА</b>	<b>165</b>
<b>6.</b>	<b>ПРИЛОЗИ</b>	<b>177</b>

<b>Табела 1.</b>	Оптичка густина у функцији густине инокулума спора	<b>54</b>
<b>Табела 2.</b>	Структура С-3 остатака испитиваних деривата 4-хидроксикумарина	<b>100</b>
<b>Табела 3.</b>	MIC ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) вредности антимикробне активности деривата <b>1-8b</b>	<b>102</b>
<b>Табела 4.</b>	MIC ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) и $-\text{LogMIC}$ вредности антимикробне активности деривата <b>1-8b</b> и <b>2-10c</b> које су коришћене при развоју QSAR студија	<b>103</b>
<b>Табела 5.</b>	Вредности молекулских дескриптора деривата <b>1-10c</b> коришћених у QSAR судијама антимикробне активности	<b>104</b>
<b>Табела 6.</b>	Парцијална атомска наелектрисања фармакофора деривата <b>1-10c</b> коришћених у QSAR студијама антимикробне активности	<b>105</b>
<b>Табела 7.</b>	Корелациона матрица мерене антимикробне активности и молекулских дескриптора деривата <b>1-10c</b>	<b>109</b>
<b>Табела 8.</b>	Поређење MIC експерименталних резултата антимикробне активности деривата <b>1-10c</b> са резултатима QSAR студија	<b>110</b>
<b>Табела 9.</b>	Тотална антиоксидативна активност деривата <b>1-10c</b> и способност неутрализације DPPH радикала	<b>119</b>
<b>Табела 10.</b>	Способност инхибиције липидне пероксидације, неутрализације хидрокси радикала и хелатизације феро-јона деривата <b>1-10c</b>	<b>125</b>
<b>Табела 11.</b>	Енталпије дисоцијације 4-ОН везе и вредности молекулских дескриптора деривата <b>1-10c</b> коришћених у QSAR студијама антиоксидативне активности	<b>126</b>
<b>Табела 12.</b>	Корелациона матрица вредности молекулских дескриптора деривата <b>1-10c</b> и антиоксидативне активности	<b>133</b>
<b>Табела 13.</b>	Однос измерених и израчунатих вредности антиоксидативне активности деривата <b>1-10c</b> након QSAR студија	<b>134</b>
<b>Табела 14.</b>	Антикоагулативна активност кумаринских деривата <b>1-10c</b> <i>in vitro</i> и <i>in vivo</i> (након 24 h и петодневног третмана).	<b>138</b>
<b>Табела 15.</b>	Резултати CoMFA и CoMSIA регресионе анализе и предвиђене IC <sub>50</sub> и pIC <sub>50</sub> ново дизајнираних једињења	<b>148</b>
<b>Табела 16.</b>	Хепатотоксична активност кумаринских деривата <b>1-10c</b> и статус јетре након 24 h и петодневне апликације у концентрацији 0,5 mg/kg телесне масе	<b>155</b>

<b>Табела 17.</b>	Тотална антиоксидативна активност деривата <b>1-8b</b>	<b>176</b>
<b>Табела 18.</b>	Измерене апсорбанце раствора приликом неутрализације DPPH радикала дериватима <b>1-8b</b> након 30 и 60 мин	<b>177</b>
<b>Табела 19.</b>	Измерене апсорбанце раствора приликом неутрализације DPPH радикала дериватима <b>2-10c</b> након 30 и 60 мин	<b>178</b>
<b>Табела 20.</b>	Инхибиција липидне пероксидације дериватима <b>1-10c</b> након 24 сата	<b>179</b>
<b>Табела 21.</b>	Инхибиција липидне пероксидације дериватима <b>1-10c</b> након 48 сати	<b>180</b>
<b>Табела 22.</b>	Инхибиција липидне пероксидације дериватима <b>1-10c</b> након 72 сата	<b>181</b>
<b>Табела 23.</b>	Измерене апсорбанце и израчунати проценти инхибиције хидроксил радикала за деривате <b>1-10c</b>	<b>182</b>
<b>Табела 24.</b>	Измерене апсорбанце и израчунати проценти хелатизационог капацитета за деривате <b>1-10c</b>	<b>183</b>



<b>Схема 1.</b>	Интрамолекуларна резонантна стабилизација кумаринског молекула	<b>3</b>
<b>Схема 2.</b>	Електрон акцепторско дејство карбонилне групе на молекула кумарина	<b>4</b>
<b>Схема 3.</b>	Кето-енолна таутомерија молекула 4-хидроксикумарина	<b>4</b>
<b>Схема 4.</b>	Биосинтеза шикимске и префенске киселине	<b>5</b>
<b>Схема 5.</b>	Биосинтеза кумарина и 7-хидроксикумарина из префенске киселине	<b>6</b>
<b>Схема 6.</b>	Биосинтеза 4-хидроксикумарина	<b>8</b>
<b>Схема 7.</b>	<i>Anschutz</i> -ова синтеза 4-хидроксикумарина	<b>9</b>
<b>Схема 8.</b>	<i>Boyd-Roberston</i> -ова синтеза 4-хидроксикумарина	<b>9</b>
<b>Схема 9.</b>	<i>Zeigler-Junek</i> -ова синтеза 4-хидроксикумарина	<b>9</b>
<b>Схема 10.</b>	Синтеза 4-хидроксикумарина без присуства растварача	<b>10</b>
<b>Схема 11.</b>	<i>Mentzer-Vercier</i> -ова синтеза 3-супституисаног 4-хидроксикумарина	<b>10</b>
<b>Схема 12.</b>	Бисинтеза кумаринског прстена у новобиоцину	<b>16</b>
<b>Схема 13.</b>	Каскадни механизам коагулације крви	<b>29</b>
<b>Схема 14.</b>	Механизам активације фактора II, VII, IX и X витамином К	<b>30</b>
<b>Схема 15.</b>	Антикоагулативна активност варфарина на нивоу <i>витамин К-епоксид редуктазе</i>	<b>34</b>
<b>Схема 16.</b>	Прва фаза метаболизма кумаринског језгра	<b>37</b>
<b>Схема 17.</b>	Друга фаза метаболизма кумаринског језгра	<b>38</b>
<b>Схема 18.</b>	Преглед хемијске синтезе и хемијске структуре деривата 4-хидроксикумарина коришћених у експерименталном делу	<b>47</b>
<b>Схема 19.</b>	Редукција ресазурина у анаеробним условима	<b>56</b>
<b>Схема 20.</b>	Дизајнирани кумарински деривати са предвиђеним вредностима антимикуробне активности	<b>113</b>
<b>Схема 21.</b>	Механизам неутрализације DPPH <sup>•</sup> радикала антиоксидантом	<b>117</b>
<b>Схема 22.</b>	Механизам липидне пероксидације и инхибиторско дејство антиоксиданта	<b>120</b>
<b>Схема 23.</b>	Деградација 2-деоксирибозе након абстракције хидроксилног радикала и механизам инхибиције антиоксидантом	<b>122</b>
<b>Схема 24.</b>	Инхибиција настанка гвожђе-ферозин комплекса антиоксидантом	<b>124</b>
<b>Схема 25.</b>	Дизајнирани деривати 4-хидроксикумарина са предвиђеном антиоксидативном активношћу <i>in vitro</i>	<b>135</b>

<b>Схема 26.</b>	<b>Предложени метаболички путеви 2b и 4c</b>	<b>140</b>
<b>Схема 27.</b>	<b>Структуре новодизајнираних кумаринских антикоагуланата</b>	<b>147</b>
<b>Схема 28.</b>	<b>Предложени механизам антикоагулативне активности кумарина</b>	<b>150</b>

<b>Слика 1.</b>	Кумаринско језгро	<b>3</b>
<b>Слика 2.</b>	Структуре биолошки активних кумарина	<b>11</b>
<b>Слика 3.</b>	Новобиоцин и водоничне везе које остварује у активном центру <i>ДНК-гиразе</i> ; кристална структура новобиоцина у комплексу са <i>N</i> -терминалним фрагментом <i>ДНК-гиразе</i> Б <i>E. coli</i> , масе 24 kDa	<b>18</b>
<b>Слика 4.</b>	Модификоване структуре новобиоцина активне на <i>S. aureus</i>	<b>19</b>
<b>Слика 5.</b>	Ферунелол	<b>20</b>
<b>Слика 6.</b>	Најактивнији антимикуробни хетероарил дериват 4-хидроксикумарина	<b>20</b>
<b>Слика 7.</b>	С-3 ( <i>E</i> )-4-фенилбут-3-ен-2-он 4-хидроксикумарини са антимикуробном активношћу	<b>21</b>
<b>Слика 8.</b>	4-хидроксикумарин супституисан 1-ноненом на положају С-3 са антимикуробном активношћу	<b>21</b>
<b>Слика 9.</b>	Триазил деривати 4-метоксикумарина са антимикуробном активношћу	<b>21</b>
<b>Слика 10.</b>	<i>S</i> -триазинил уреа и тиоуреа деривати 4-хидроксикумарина са антимикуробном активношћу	<b>22</b>
<b>Слика 11.</b>	<i>N</i> -изопропил-3-нитроанилин дериват 4-хидроксикумарина са антиоксидативном активношћу	<b>26</b>
<b>Слика 12.</b>	<i>S</i> -3 ( <i>E</i> )-4-фенилбут-3-ен-2-он 4-хидроксикумарини са антиоксидативном активношћу	<b>26</b>
<b>Слика 13.</b>	3-карбоксамини 4-хидроксикумарини као инхибитори липидне пероксидације	<b>26</b>
<b>Слика 14.</b>	7-азометин деривати 4-хидроксикумарина као инхибитори липидне пероксидације	<b>26</b>
<b>Слика 15.</b>	Етил-2-ацетил-3-фенулбутаноат С-3 4-хидроксикумарини као антиоксиданти	<b>27</b>
<b>Слика 16.</b>	Структура варфарина	<b>32</b>
<b>Слика 17.</b>	Кристална структура варфарина и таутомерни облици у воденом раствору	<b>33</b>
<b>Слика 18.</b>	Синтетички антикоагуланти хемијски слични варфарину	<b>35</b>
<b>Слика 19.</b>	Пиридински, пиперидински и пиразолови деривати 4-хидроксикумарина као антикоагуланти	<b>36</b>

Слика 20.	Арил деривати варфарина као антикоагуланти	36
Слика 21.	Деривати дикумарола као антикоагуланти	36
Слика 22.	Прва фаза метаболизма варфарина	38
Слика 23.	Површина потенцијалне енергије	42
Слика 24.	Корелација експерименталних и израчунатих вредности антимикуробне активности деривата <b>1-10c</b> код <i>S. aureus</i>	106
Слика 25.	Корелација експерименталних и израчунатих вредности антимикуробне активности деривата <b>1-10c</b> код <i>E. Coli</i>	108
Слика 26.	Корелација експерименталних и израчунатих вредности антимикуробне активности деривата <b>1-10c</b> код <i>C.albicans</i>	109
Слика 27.	Конформација најактивнијих деривата кумарина <b>3b</b> и <b>9c</b> у активном центру <i>ДНК-гиразе</i>	111
Слика 28.	Конформација најактивнијих дизајнираних деривата кумарина <b>1d</b> , <b>2d</b> , <b>5d</b> и <b>7d</b> у активном центру <i>ДНК-гиразе</i>	114
Слика 29.	График зависности инхибиције DPPH радикала у односу на концентрацију деривата <b>1-10c</b> након 60 минута	118
Слика 30.	График зависности инхибиције хидроксил радикала у односу на концентрацију деривата <b>1-10c</b>	123
Слика 31.	Формирање Fe <sup>2+</sup> -ферозин комплекса	124
Слика 32.	Корелација експерименталних и израчунатих вредности способности неутрализације DPPH радикала дериватима <b>1-10c</b>	128
Слика 33.	Корелација експерименталних и израчунатих вредности способности неутрализације пероксидног радикала дериватима <b>1-10c</b>	129
Слика 34.	Енолизована хидроксилна група на положају 4 једињења <b>а) 6b</b> и <b>г) 4c</b> ; НОМО орбитале једињења <b>б) 6b</b> и <b>д) 4c</b> ; LUMO орбитале једињења <b>в) 6b</b> и <b>ђ) 4c</b>	130
Слика 35.	Корелација експерименталних и израчунатих вредности способности неутрализације хидроксил радикала дериватима <b>1-10c</b>	132
Слика 36.	Корелација експерименталних и израчунатих вредности способности хелатизације фери-јона дериватима <b>1-10c</b>	133
Слика 37.	Атом-по-атом преклапање конформација <b>1-10c</b>	140

<b>Слика 38.</b>	Корелација експерименталних и предвиђених $pIC_{50}$ вредности тренинг сета (квадрати) и тест сета (кругови) CoMFA методом	<b>141</b>
<b>Слика 39.</b>	CoMFA контуре <b>а)</b> стерних и <b>в)</b> електростатичких мапа <b>2b</b> ; <b>б)</b> стерних и <b>г)</b> електростатичких мапа <b>4c</b>	<b>142</b>
<b>Слика 40.</b>	Корелација експерименталних и предвиђених $pIC_{50}$ вредности тренинг сета (квадрати) и тест сета (троуглови) CoMSIA методом	<b>143</b>
<b>Слика 41.</b>	CoMSIA <b>а)</b> стерна, <b>б)</b> електростатичка и <b>в)</b> поља акцептора водоничних веза <b>2b</b> ; <b>г)</b> стерна, <b>д)</b> електростатичка и <b>ђ)</b> поља акцептора водоничних веза <b>4c</b>	<b>144</b>
<b>Слика 42.</b>	<b>а)</b> Поравњавање структура бактеријског и VKORC1 пацова; <b>б)</b> секундарна структура VKORC1 пацова; <b>в)</b> трансмембранска структура VKORC1 пацова	<b>145</b>
<b>Слика 43.</b>	Конформације једињења <b>а)</b> <b>2b</b> и <b>б)</b> <b>4c</b> унутар активног центра VKORC1 пацова	<b>146</b>
<b>Слика 44.</b>	DFT механистичке студије механизма антикоагулативног деловања <b>2b</b>	<b>152</b>
<b>Слика 45.</b>	DFT механистичке студије механизма антикоагулативног деловања <b>4c</b>	<b>153</b>



## ***1. ОПШТИ ДЕО***

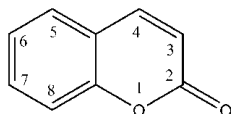
---





## 1.1 Кумарини као биохемијски активна једињења

**Хемија кумарина.** Молекули  $\alpha$ -пирона кондензовани са бензеновим прстеном називају се кумарини (Слика 1). По ИУПАС номенклатури, основни кумарински молекул назива се 2*H*-хромен-2-он, док се као атом на положају 1 обележава кисеоник из пиронског дела молекула. Хемијске особине молекула кумарина условљене су присуством лактонске структуре, двогубе везе  $\alpha$ -пирона и ароматичног прстена.



Слика 1. Кумаринско језгро

У реакцијама електрофилне супституције кумарини се понашају као ароматична једињења, при чему се електрофилни реагенси везују за бензенов прстен који подлеже реакцијама нитровања, сулфовања или диазотовања, најчешће у положајима С-6 и С-8 [1]. Овако диригована електрофилна супституција кумаринског аромата последица је интрамолекуларске резонанционе стабилизације и присуства позитивног наелектрисања на бензеновом прстену (Схема 1):

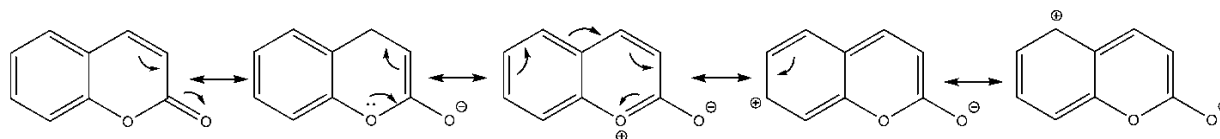
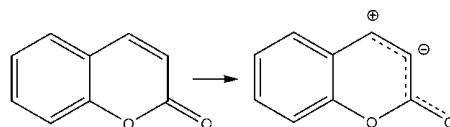


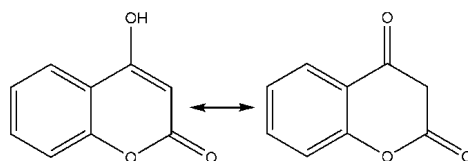
Схема 1. Интрамолекуларска резонантна стабилизација кумаринског молекула

Двострука веза 3,4-пиронског система у коњугацији са карбонилном групом чини јединствен систем у хемији. Електрон акцепторски карактер карбонилне групе доприноси смањењу електронске густине угљениковог атома на положају С-4 и њеном померању у смеру карбонилне групе. Због тога, С-4 постаје електрофилни а С-3 нуклеофилни центар пиронског прстена (Схема 2). Присуство неке електрон донорске групе у положају С-4, појачава нуклеофилност угљениковог атома у положају С-3.



**Схема 2.** Електрон акцепторско дејство карбонилне групе

4-Хидроксикумарин, чији су деривати и њихова биолошка активност предмет ове докторске дисертације, по хемијским особинама се разликују како од самог несупституисаног кумарина, тако и од осталих хидроксикумарина. Разлог је у постојању кето-енолне таутомерије хидроксилне групе и настанку  $\beta$ -кетоестарског система који знатно стабилизује кумарински прстен, повећавајући му ароматичност (Схема 3).



**Схема 3.** Кето-енолна таутомерија 4-хидроксикумарина

Бензенов прстен 4-хидроксикумарина мање је реактиван од обичног или кумаринског бензена, док  $\alpha$ -пиронски прстен под врло благим реакционим условима ступа у реакције супституције на положају С-3. Услед присуства хидроксилне групе, положај С-3 је реактиван, како према електрофилним, тако и према нуклеофилним агенсима [2,3].

**Биосинтеза кумарина у биљкама.** Кумарини су секундарни метаболити биљака и спадају у групу природних ароматичних једињења. Биосинтетишу се углавном у вишим биљкама из фамилија *Apiaceae*, *Asteraceae*, *Fabaceae*, *Rutaceae* и *Umbelliferatae* [4] а велика концентрација кумарина присутна је у зеленом чају и воћу. Основни пут биосинтезе кумарина одвија се преко пута биосинтезе шикимске киселине и њене трансформације до префенске киселине (Схема 4) [5]. Биосинтеза шикимске киселине јесте заједнички пут биосинтезе природних ароматичних једињења након процеса фотосинтезе. Пут шикимске киселине обухвата низ метаболичких трансформација шикимата из кога настају и кинска киселина (преко дехидрокинске киселине), протокатехинска и гална киселина (преко 5-дехидрошикимске киселине), 2-сукцинилбензоева киселина (преко хоризминске киселине) из које даље настају ализарин

и филохинони, хомогентизинска киселина (прекурсор пластохинона), *p*-кумаринска киселина и други секундарни биомолекули [5].

У даљем тексту ће детаљно бити представљена биосинтеза кумаринског језгра (Схеме 4, 5 и 6).

Биосинтеза кумарина започиње ароматизацијом шикимске киселине (Схема 4). Киселина се активира под дејством *шикимат-киназе* увођењем фосфатног остатка на положају С-5. Из активiranог облика, реакцијом са фосфоенолпируватом, под дејством *5-фосфоенолпирувилшикимат-5-фосфат-синтазе*, преко интермедијерног облика **III** настаје 3-енолпирувилшикимат-5-фосфат. Овај секундарни молекул је прекурсор хоризминске киселине која настаје елиминацијом ортофосфата са положаја С-5.

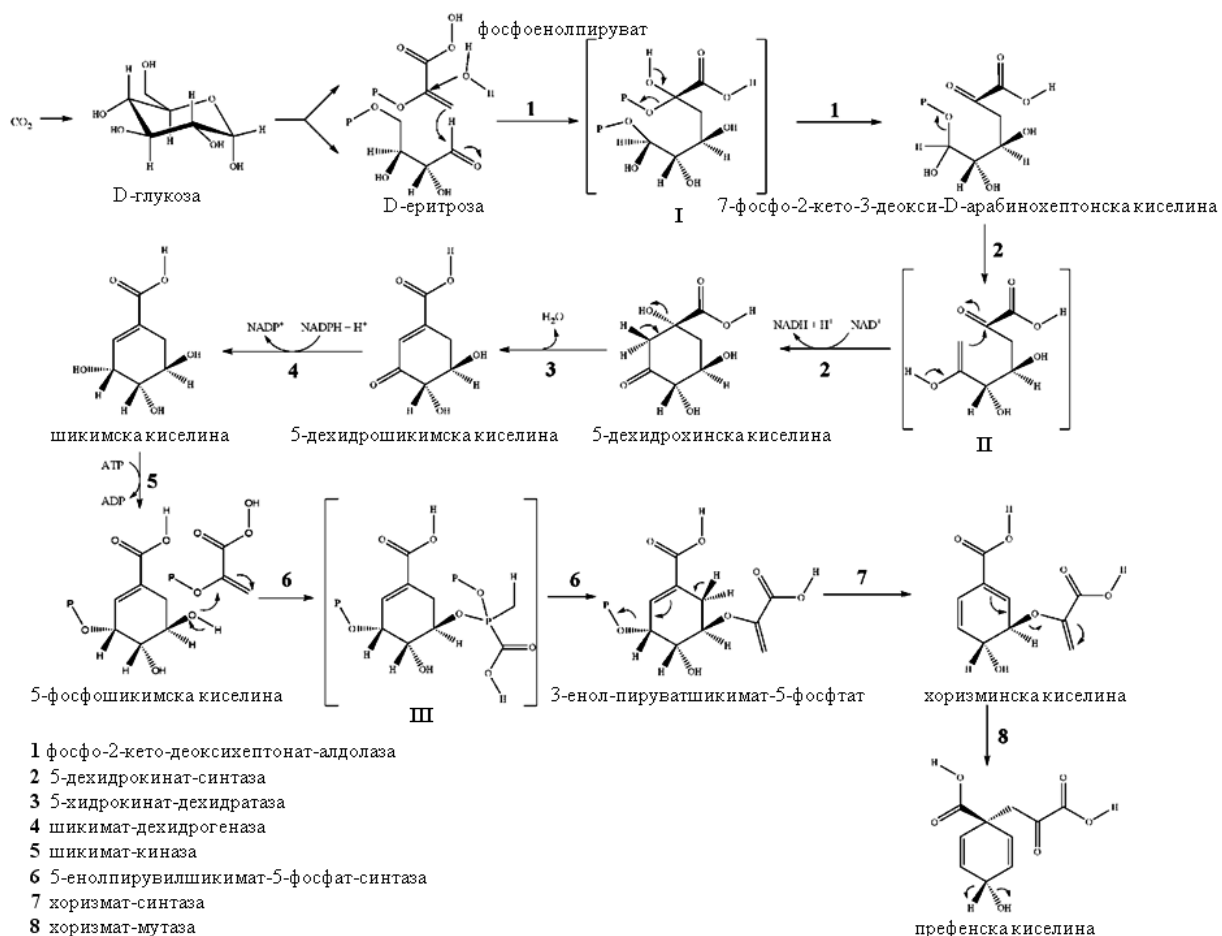


Схема 4. Биосинтеза шикимске и префенске киселине

Ензим који катализује конверзију је *хоризмат-синтаза*. Хоризминска киселина у прстену садржи две коњуговане двогубе везе; прва настаје интрамолекулским премештањем унутар прстена шикимата а друга елиминацијом протона са положаја С-2. Коњугација се прекида дејством *хоризмат-мутазе* која катализује и премештање угњеничног низа бившег фосфоенолпирувата са положаја С-3 на положај С-2. Производ који настаје је префенска киселина, први прави прекурсор кумарина.

Метаболички пут префенске киселине обухвата елиминацију преостале хидроксилне групе из прстена под дејством *префенат-дехидратазе* (Схема 5).

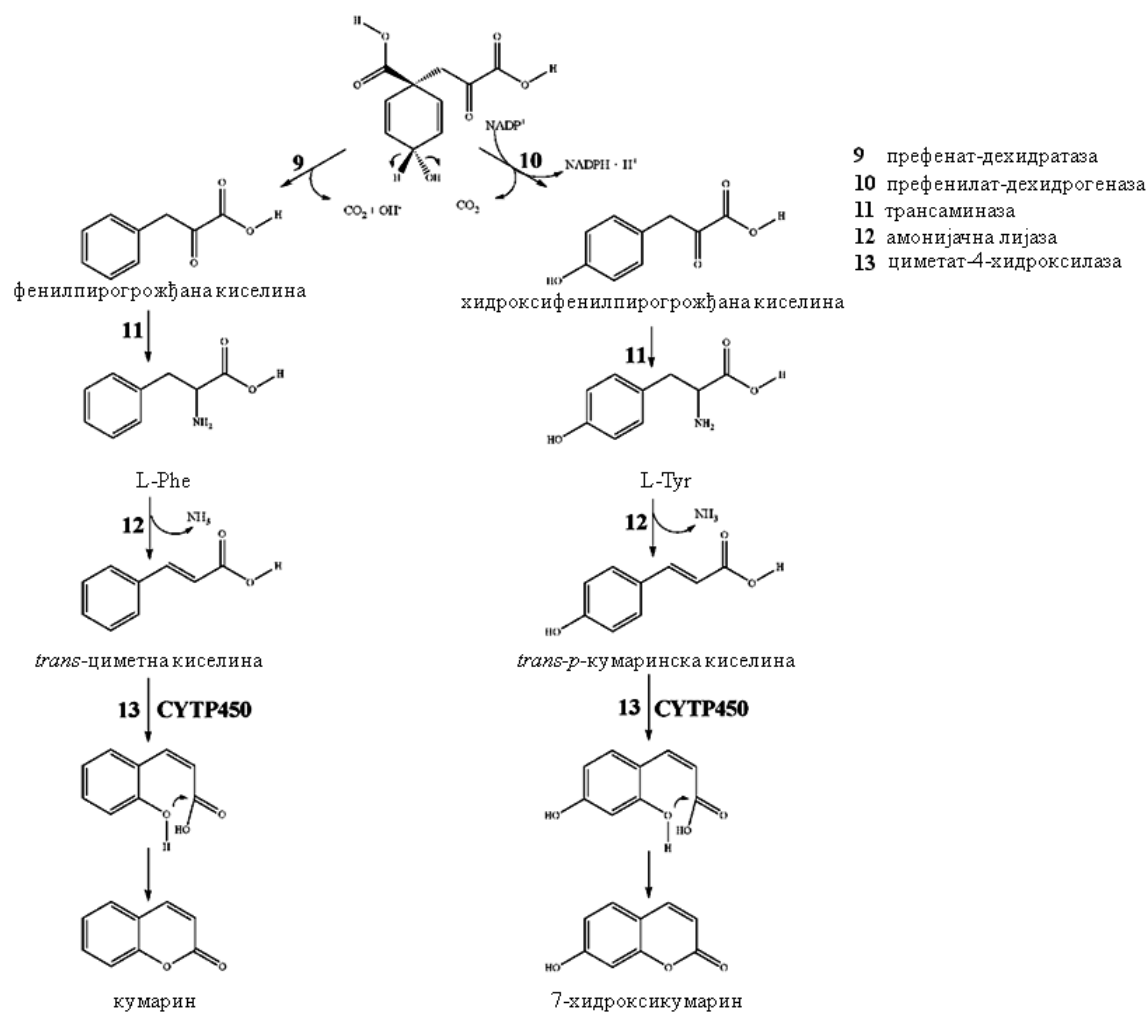


Схема 5. Биосинтеза кумарина и 7-хидроксикумарина из префенске киселине

Послевица елиминације је увођење треће двогубе везе у прстен и формирање ароматичног кумаринског молекула. Уз реакцију елиминације врши се и реакција декарбоксилације

остатка фосфоенолпирувата и формирања фенилпирогрохјане киселине која реакцијом трансминације постаје L-Phe. Уведена аминокиселинска група је супстрат *амонијачне лиаза* чијим се дејством добија бочна двострука веза, уз елиминацију амонијака. Настали производ се назива *trans*-циметна киселина и природни је супстрат за добијање кумаринског молекула. Киселина се трансформише увођењем *o*-хидроксилне групе дејством ензима *циметат-4-хидроксилаза* ензима из групе СУТ Р450. Истовремено се врши и изомеризација *trans*-двоструке везе у *cis*- након чега се одвија интрамолекуларна лактонизација *cis-o*-кумаринске киселине и наставак кумаринског језгра.

Алтернативни метаболички пут префенске киселине јесте њена редукција до *p*-хидроксифенилпирогрохјане киселине под дејством *префенат-дехидрогеназа* (Схема 5). Редукција је праћена и декарбоксилацијом. Остале реакције су аналогне основном метаболичком путу префената. Након трансминације *p*-хидроксифенилпирувата добија се аминокиселина L-Тур, која се потом катаболише до *trans-p*-кумаринске киселине. Њеном лактонизацијом, после увођења хидроксилне групе и изомеризације двогубе везе, биосинтезише се 7-хидроксикумарин, односно умбелиферон.

На почетку текста о биосинтези је напоменуто да се кумарини преференцијално биосинтезишу у биљкама. Међутим, 4-хидроксикумарин има другачији пут биосинтезе јер га биљке биосинтезишу само у синергији са гљивама (Схема 6) [6]. Биосинтеза 4-хидроксикумарина није нормалан физиолошки процес, као што је то биосинтеза кумарина и умбелиферона, већ започиње након руптуре ћелије биљке. Приликом труљења слатке детелине (*Melilotus albus*; *Fabaceae*) констатована је синергија са гљивама *Penicillium* и *Aspergillus* и измена метаболичког пута *trans*-циметне киселине (Схема 6). Она се хидроксикује до *trans-o*-кумаринске киселине и активира једним молекулом ацетил-коензима А. На *trans-o*-кумароил-КоА врши се адиција хидроксилне групе на егзогену двогубу везу при чему настаје 3-хидроксимелиотоил-КоА. Оксидацијом уведене хидроксилне групе на положају С-3 настаје 3-оксо-мелиотоил-КоА, природни супстрат за биосинтезу 4-хидроксикумарина. Након енолизације, из *cis*-енол-3-оксо-мелиотоил-КоА интрамолекуларном лактонизацијом настаје 4-хидроксикумарин.

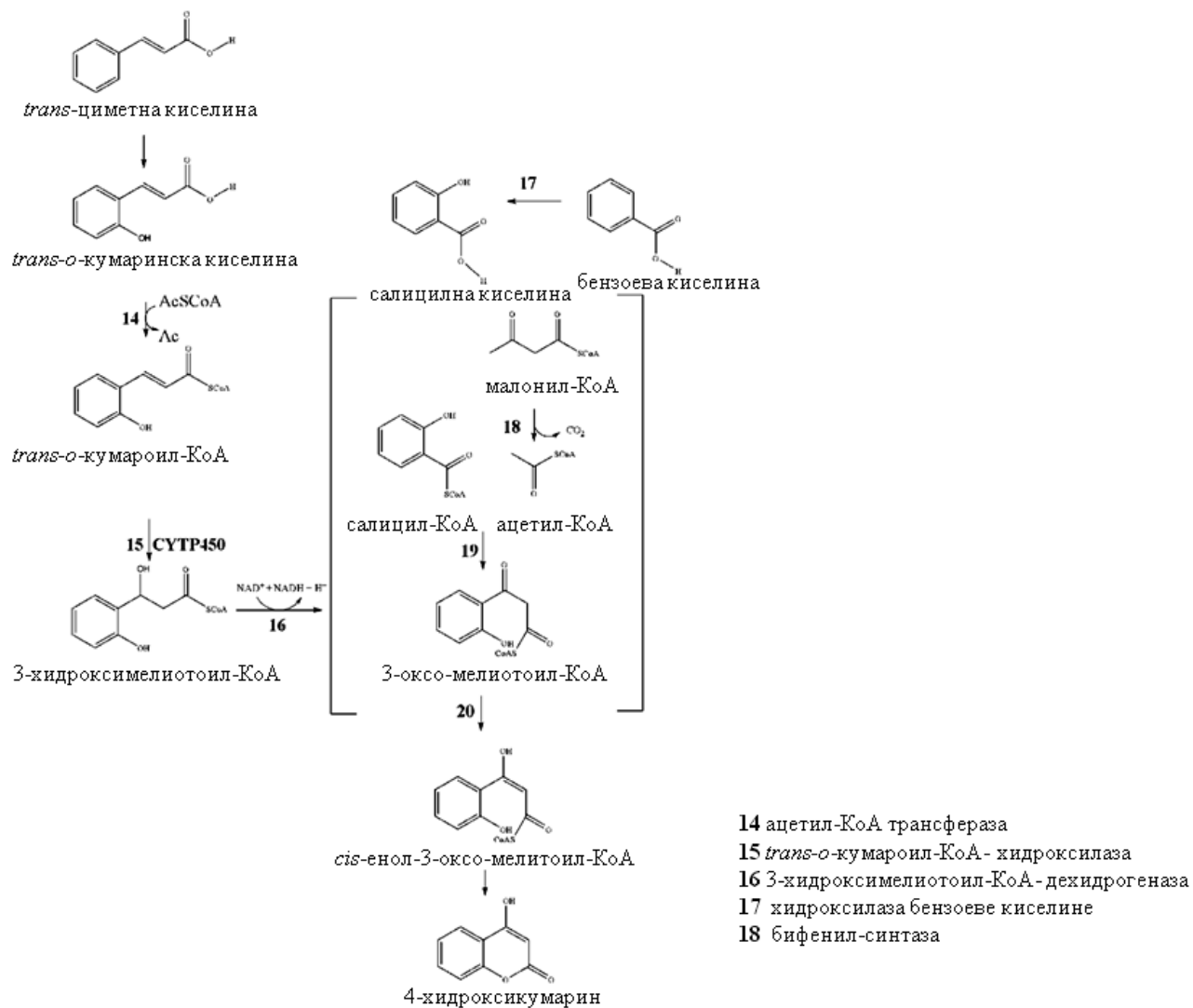


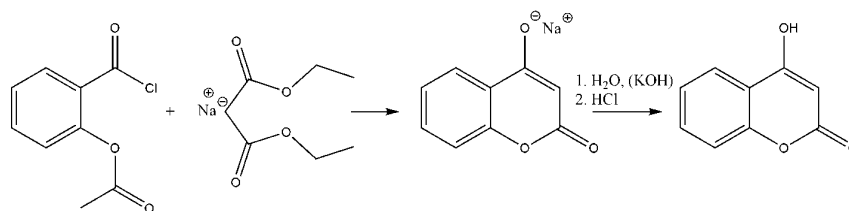
Схема 6. Биосинтеза 4-хидроксикумарина

Забележен је и пут биосинтезе 4-хидроксикумарина који не полази од шикимске киселине. Наиме, у синергији *Melilotus albus* и гљиве *Sorbus aucuparia* нотиран је ензим *бифенил-синтаза* који катализује адицију малонил-КоА на салицилат-КоА а чији је производ 3-оксо-мелиотоил-КоА (Схема 6) из кога настаје 4-хидроксикумарин.

Даља хидроксилација свих презентованих кумаринских молекула одвија се у метаболичким процесима кумарина и биће предмет излагања у даљем тексту.

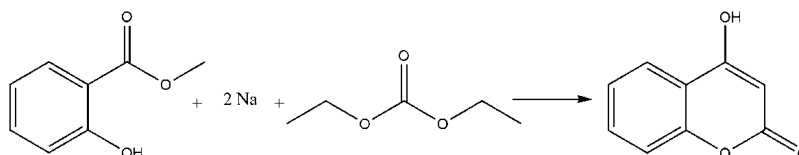
**Хемијска синтеза кумарина.** Описан је велики број метода за синтезу кумаринског молекула од којих већина обухвата кондензацију супституисаног фенола и деривата дикарбонских киселина [7-12].

Прву синтезу 4-хидроксикумарина [13] извршио је *Anschutz* 1903. године полазећи од хлорида ацетсалицилне киселине и диетилестра малонске киселине (Схема 7).



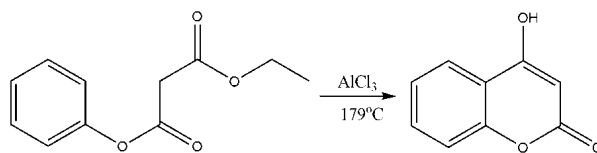
**Схема 7.** *Anschutz*-ова синтеза 4-хидроксикумарина

Сличну реакцију, полазећи од метилестра салицилне киселине извели су *Pauly* и *Lockermann* [14]. *J. Boyd* и *A. Robertson* [15] добили су 4-хидроксикумарин кондензацијом *o*-хидрокси-метилбензоата са диетилестром угљене киселине (Схема 8).



**Схема 8.** *Boyd-Robertson*-ова синтеза 4-хидроксикумарина

Деловањем безводног алуминијум-трихлорида на фенилмалонат, на повишеној температури, *E. Zeigler* и *H. Junek*, синтетисали су 4-хидроксикумарин [16] (Схема 9).

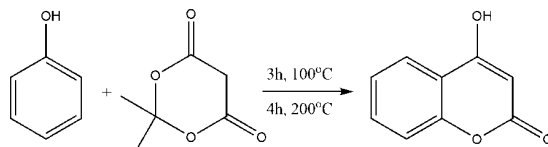


**Схема 9.** *Zeigler-Junek*-ова синтеза 4-хидроксикумарина

Модерно схватање синтезе 4-хидроксикумарина не разликује се у многоме у стратегији саме синтезе од првих изведених реакција јер се као полазни супстрат готово увек користи супституисани фенол. Тако је малу модификацију *Boyd-Robertson*-ове методе

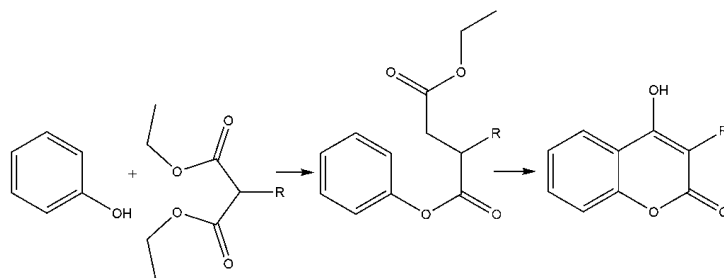
извео *Kasabe* са сарадницима, добивши 4-хидроксикумарин кондензацијом *o*-хидроксиацетофенона са диетилестром угљене киселине, у присуству металног натријума, на повишеној температури [17]. Коришћењем ригорознијих реакционих услова, услед присуства натријум-хидрида и хлороводоничне киселине у толуену као растварачу, *Zhao* и сарадници су наведену реакцију кондензације довели до високог приноса [18].

У модерном стремљењу ка *зеленој хемији*, односно хемијским реакцијама без присуства растварача, *Gao* и сарадници развили су методу синтезе 4-хидроксикумарина (Схема 10) кондензацијом фенола и Мелдрумове киселине, (2,2-диметил-1,3-диоксан-4,6-дион) у присуству Итоновог реагенса (7%-тни фосфорпентоксид у метансулфонској киселини) [19]. Производ се добија у високом приносу.



**Схема 10.** Синтеза 4-хидроксикумарина без присуства растварача

Једну од првих синтеза 3-супституисаних деривата 4-хидроксикумарина, који су и предмет испитивања у овој дисертацији извели су *Mentzer* и *Vercier* [20] кондензацијом  $\alpha$ -супституисаног диетилестра малонске киселине и фенола у екстремним температурним реакционим условима (Схема 11).



**Схема 11.** *Mentzer-Vercier*-ова синтеза 3-супституисаног 4-хидроксикумарина

## 1.2. Биолошка активност кумарина

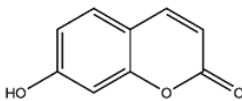
Кумарински деривати, природног и синтетичког порекла, предмет су интензивних фармаколошких испитивања и до сада су, као резултат, дефинисани многобројни видови



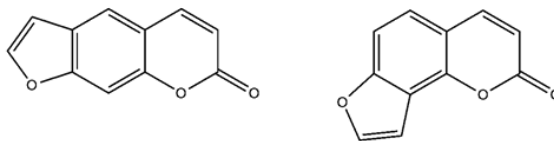
њихове активности. Готово да не постоји фармаколошко деловање које није констатовано код кумаринских деривата и због тога се за кумарине каже да су елитна класа секундарних биомолекула. Кумарински деривати су на основу структуре подељени у четири велике групе (Слика 2) [21]:

1. Прости кумарини, који обухватају најчешће 7-хидрокси, гликозидне, алкокси и алкил форме основног кумаринског молекула,
2. Фуранокумарини, линеарни или ангуларни деривати кумарина супституисани фуранским прстеном и њихови деривати и хомолози,
3. Пиранокумарини, линеарни или ангуларни деривати кумарина супституисани пиранским прстеном или његовим дериватима или биоизостерима,
4. Пирон-супституисани кумарини, деривати супституисани на пиранском прстену на положајима С-3 или С-4 (деривати 4-хидроксикумарина се сврставају у ову групу).

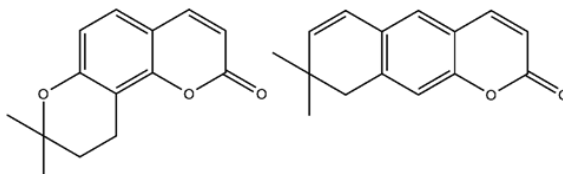
прости кумарини



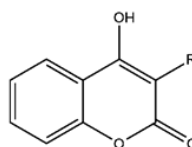
фуранокумарини



пиранокумарини



пирон-супституисани кумарини



Слика 2. Структуре биолошки активних кумарина

Не постоји егзактна корелација зависности биолошке активности у односу на структуру кумаринских деривата обзиром да често деривати који се истовремено могу

сврстати у две или више група, показују више од једне биолошке активности. Кумарини су тако окарактерисани као антиартеросклеротични, антиинфламаторни, антиканцерогени, антикоагулативни, антимикробни, антиоксидативни и анти-HIV агенси, затим као вазодилататори и стимулатори централног нервног система, итд. По физиолошком значају, одмах након антиканцерогене, антимикробне, антиоксидативне и антикоагулативне активности јесте инхибиција активности моноамино-оксидаза.

Ипак, дефинисани су поједини структурни аспекти као предуслови биолошке активности кумарина. Тако је присуство једне хидроксилне групе, најчешће у положају С-7, односно више њих, предуслов антиканцерогене и антиоксидативне активности. Хидроксилна група на положају С-4 и хидрофобни остатак на положају С-3 предуслов су антикоагулативне активности. Супституција положаја С-3 често је предуслов антимикробне активности, док је постојање пиранског прстена предуслов анти-HIV активности.

Прости кумарини, умбелиферон и његови алкил деривати [22] као и кондензати који су у положају С-3 супституисани ариліден- $\beta$ -кетоестрима [23] показују висок ниво антиканцерогене активности. Антиканцерогену активност испољавају и деривати кумаринског молекула супституисани у положају С-3 са 4,5-дихидропиразолом [24] и *N*-арил сулфонамидима [25]. Прости кумарини код којих је хидроксилна група у положају С-7 супституисана бензил групом а положај С-3 дериватизован неком поларном групом су изузетни MAO-A и MAO-B инхибитори, односно лекови против Паркинсонове болести [26]. Клинички инхибитор MAO-B је геипаварин [27].

Фуранокумарин псорален и његови деривати јесу антиканцерогени агенси [28] и инхибитори моноаминооксидазе [29]. Димери фуранокумарина јесу потентни инхибитори активности CYP3A4 [30].

Пиранокумарини своју физиолошку активност испољавају као антиканцерогени агенси уз постојање бензопирано[3,2-ц]хромен-6,8-дионске структуре, прстена затвореног кондензацијом 4-хидрокси групе и карбонилног остатка на положају С-3 као неопходног структурног фрагмента [31]. Два пиранокумарина, (+)-каланолид А и (-)-каланолид Б, супституисани додатним 3,6-дихидропираном у положајима С-5 и С-6, односно пропил

групом у положају С-4, инхибитори су реверсне *HIV-транскриптазе* [32] и користе се у терапији против HIV-а. Пиранокумаринска структура неопходна је и за испољавање вазодилататорског ефекта виснадина и његових деривата [33].

Пирон-супституисани кумарини дериватизовани алкил групама у положајима С-3 и С-4, односно алкокси групама у положају С-7 користе се као антиартериосклеротици, профилактици ангине пекторис [34]. Пирон-супституисани кумарини са антиинфламаторним дејством су они који су у положају С-4 супституисани са 4-арилосиметил функционалним групама [35].

Антимикробна, антиоксидативна и антикоагулативна активност 4-хидроксикумарина, односно пирон-супституисаних кумарина, јесу претмет ове докторске дисертације те ће наведени видови активности бити детаљније обрађени у секцијама које следе.

### **1.2.1. Антимикробна активност кумарина**

У терапији инфективних болести бактеријске етиологије, користе се антибиотици и хемиотерапеутици. Антибиотици су секундарни метаболити микроорганизама (бактерија и гљивица), док су хемиотерапеутици једињења синтетичког порекла [36]. Данас је ова подела тешко одржива обзиром на велики број деривата антибиотика добијених хемијским трансформацијама природних супстрата.

Антимикробна једињења делују на бактеријске ћелије бактериостатски (инхибирају раст и размножавање бактеријске ћелије) и бактерицидно (убијају бактеријску ћелију). Бактериостатска антимикробна активност дефинише се антибиограмом. Антибиограм представља мерило осетљивости културе на антибиотик или хемиотерапеутик те се, у зависности да ли се одређује дифузионом или дилуционом методом, може представити преко пречника зоне инхибиције у којој антибиотик или хемиотерапеутич спречава раст културе, односно минималне инхибиторске концентрације при којој терапеутик спречава раст и развој ћелија микроорганизама.

Антимикробни агенси, у зависности од своје структуре, делују различитим механизмима на раст и развој ћелије микроорганизама:

1. Инхибицијом синтезе ћелијског зида ( $\beta$ -лактами),
2. Инхибицијом функције цитоплазматске мембране (полимиксими),
3. Инхибицијом синтезе протеина на нивоу рибозома (аминогликозиди, тетрациклини, хлорамфеникол, макролиди),
4. Инхибицијом синтезе и репликације нуклеинских киселина (хинони, хинолони и **кумарини**),
5. Метаболичком инхибицијом (ПАБА, триптамин).

Изналажење нових антимикуробних једињења јесте константна потреба услед све веће резистентности сојева микроорганизама на постојеће терапеутике, осим у дозама леталним за хуману јединку [37]. Резистенција је нарочито изражена код култура *S. aureus*, *E. coli* и *C. albicans*. Култура *S. aureus* је G+ бактерија и један од најчешћих изазивача интрахоспиталних инфекција. Изазива пиогена обољења коже, поткожног ткива, дубоких ткива и органа као и токсемична обољења. Посебну пажњу изазивају метицилин резистентни сојеви *S. aureus* (MRSA) који показују отпорност на пеницилинске препарате и чије су инфекције често леталне. Култура *E. coli* јесте G- бактерија која изазива екстраинтестиналне инфекције и дијарејна обољења или ентероколитис. Култура *C. albicans* је диплоидна гљива и чест је узрочник оралних и гениталних инфекција код људи. Системске гљивичне инфекције, фунгемије, јесу данас важан узрочник морталитета код пацијената којима је значајно нарушен имунитет, нпр. код оболелих од сиде, након хемиотерапије, трансплатације органа или коштане сржи. Њена претерана концентрација узрокује кандидијазу. Ова болест је нарочито распрострањена код HIV–позитивних пацијената, а такође се може манифестовати и на крв у облику кандидинемије.

Кумарини антимикуробну активност испољавају као инхибитори формирања ДНК бактерија и гљива. Механизам антимикуробног деловања је потврђен клиничком употребом новобиоцина [38], 3-аминокумаринског секундарног метаболита културе *Streptomyces* који делује као моћни инхибитор Б субјединице бактеријске ДНК-*гиразе*. Изразиту антимикуробну активност испољавају и хлоробиоцин и коумермицин А1.

Новобиоцин јесте дериват 4-хидроксикумарина и спада у групу пирон-супституисаних кумарина. По номенклатури то је 4-хидрокси-3-[4-хидрокси-3-(3-метилбут-2-енил)бензамидо]-8-метоксикумарин-7-ил 3-О-карбамоил-5,5-ди-С-метил- $\alpha$ -L-

луксофуранозид (Слика 3), дериват чија је amino група на положају C-3 супституисана *p*-хидрокси-*m*-диметилаллилбензоевом киселином док је хидроксилна група на положају C-7 супституисана шећером новиозом. Хлоробиоцин се разликује од новобиоцина по томе што је положај C-8 кумаринског прстена супституисан атомом хлора док је положај C-3' новиозе супституисан 5-метил-2-пиролкарбоксилном групом. Структура коумермицина A<sub>1</sub> обухвата два кумарин-новиоза скелета повезаних 3-метил-2,4-дикарбоксилпиролом, док је супституција новиозе истоветна као код хлоробиоцина.

Биосинтеза кумаринског језгра новобиоцина, односно 3-амино-4,7-дихидрокси-2-*H*-хромен-2-она, почиње трансформацијом L-Тург насталог у путу префенске киселине (Схема 12). Биосинтеза кумаринског молекула почиње интеракцијом тирозина са *NovH* протеином бактерије који катализује везивање L-Тург на протеински носач пептидилног остатка (PNP). Други корак биосинтезе јесте аденилација тирозина на домену А до формирања L-тирозил-AMP-а уз учешће метаболичке енергије. Активирана amino киселина потом подлеже нападу протеинског сумпора при чему се гради L-тирозил-S интермедијер који се даље преводи у L-тирозил-S-*NovH*-ацил ензим, супстрат за хидроксилацију и формирање хидроксилне групе у положају C-4 кумарина. Хидроксилација је катализована NADP-зависним *NovI* ензимом који по механизму деловања јесте монооксигеназа из групе СУТР450. Оксидоредукциона равнотежа постиже се помоћу фередоксина (Fd) и *фередоксин редуктазе*. Пиронска двострука веза се формира након интеракције кумаринског комплекса са редуктазама *NovJ* и *NovK*. Метил група у положају C-8 уводи се катализом *NovO* ензима који је по типу *метил-трансфераза*. Увођење лактонског кисеоника последица је оксидације кумаринског молекула FAD-ависном *NovC* монооксигеназом након чега се прстен затвара нуклеофилним нападом хидроксилне групе на тиоестарски карбонилни центар и настаје amino-кумарин новобиоцина. Механизам ротације двогубе везе и стереохемијска промена amino групе из *trans*- у *cis*- положај према хидроксилној групи на положају C-4 није разјашњен али се одвија уз одлазак пантетеил-PNP комплекса.

Супституент amino групе се такође биосинтетише трансформацијама тирозина. Новиоза се биосинтетише кроз катаболизам глукозе.

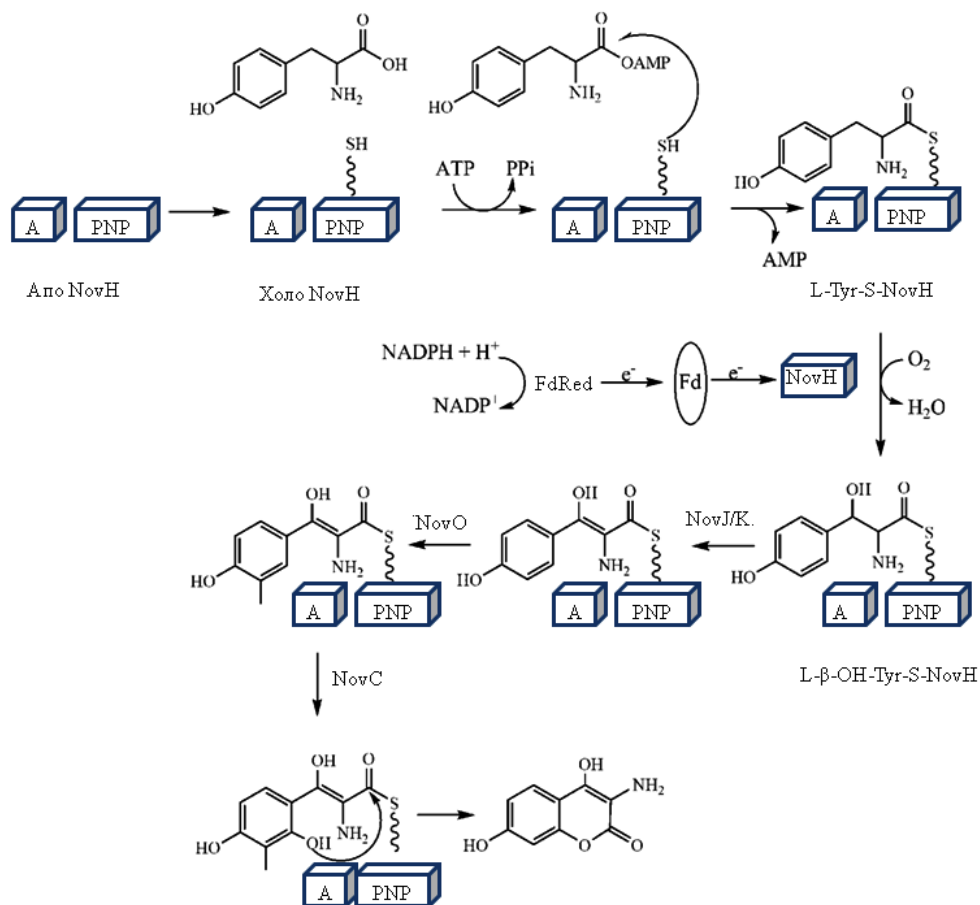


Схема 12. Биосинтеза кумаринског прстена у новобиоцину

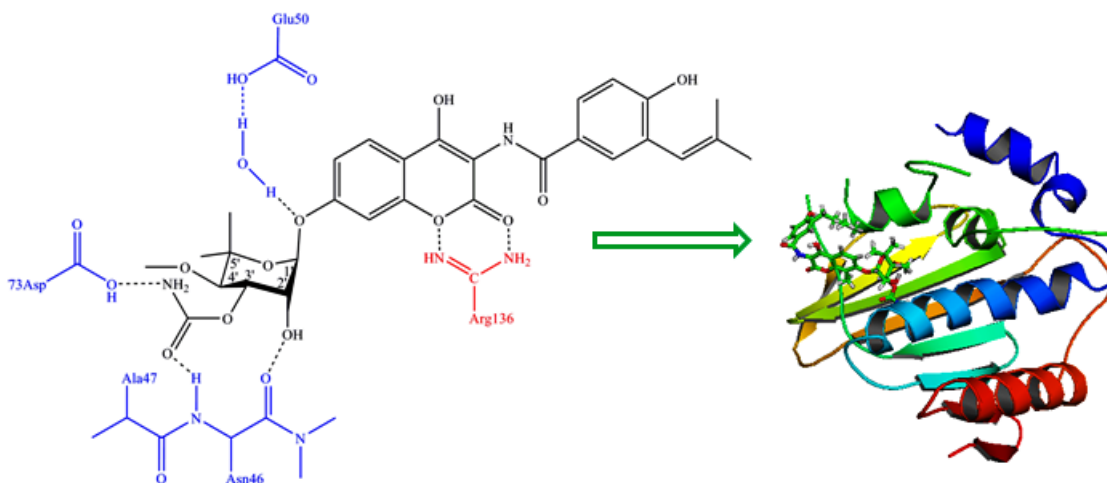
У бактеријама, бактериофагима, гљивама и неким вирусима који садрже ДНК, приликом расплетања нуклеотидних ланаца пре репликације, долази до додатног увијања на крају постојеће хеликоидне структуре и повећања торзионих сила у делу молекула који још није расплетен. Као резултат додатног увијања, у једном тренутку више не постоји интрамолекулски простор стабилизован водоничним везама те се крај ДНК молекула спаја у једну целину формирајући кругове, штитећи тако слободне 3' и 5' ковалентне крајеве макромолекула. Затворени кругови могу постојати у релаксираној или у „суперувијеној” (енг. supercoiling) форми [39]. „Суперувијање” настаје када се затворени кругови увијају око сопствене осе или када се увијају линеарни низови двоструких хеликса. Увијање се одвија у циљу контроле репликације ДНК и синтезе протеина.

ДНК *гираза* припада групи *изомераза* и катализује тополошке промене на ДНК па се због тога карактерише као *топоизомераза*. Кватернерна структура ензима се састоји од  $A_2B_2$  тетрамера. Биолошка функција топоизомераза се огледа у модификацији молекула ДНК у циљу смањења торзионог напона након формирања структуре суперувивања. Постоје две класе топоизомераза. Класа I прекида само један хеликс, врши раскидање једног круга супер-структуре и поновно спајање у енергетски релаксирану форму. Овакво раскидање не захтева метаболичку енергију. Класа II катализује истовремено раскидање оба ланца и њихово превођење до форме са нижом енергијом. Резултат деловања *ДНК-гиразе* јесте раскидање суперувивене структуре, односно превођење молекула ДНК у форму у којој је могућа репликација. У класи II, А субјединице катализују раскидање водоничних веза између комплементарних база док субјединице Б остварују интеракцију са бактеријском *АТРазом* и хидролизом молекула АТФ-а обезбеђују метаболичку енергију за процес.

Новобиоцин и остали аминокумарини, хлоробиоцин и коумермицин А1, испољавају своје антимикубно дејство као компетитивни инхибитори *АТРаза* везивањем за N-терминални фрагмент *ДНК-гиразе* Б масе 24 кДа [40]. Природни инхибитор *АТРаза* јесте аденилил- $\beta$ - $\gamma$ -иминодифосфат (ADPNP) чија је улога успоравања превођења негативне суперувивене форме ДНК до двоструког хеликса. ADPNP и новобиоцин деле врло мало структурних сличности али је њихово компетитивно везивање за *ДНК-гиразу* условљено малим, али значајним, степеном преклапања у везивању за активни центар ензима. Своју антимикубну активност новобиоцин остварује на врло елегантан начин: интерагујући са *АТРазом* спречава хидролизу АТФ-а и ускраћује метаболичку енергију молекулу ДНК неопходну са расплетање супер-структуре а самим тим и будућу синтезу протеина.

Након интеракције антибиотика са ензимом, у активном центру комплекса новобиоцин-*ДНК-гираза* формира се развијен систем водоничних веза чему нарочито доприноси остатак новиозе (Слика 3). Карбамоил група тако формира водоничне везе са атомом азота из пептидне везе Ala47 и слободном карбоксилном групом Asp73. Карбамоил фармакофора формира још три водоничне везе са молекулима воде стабилованим интеракцијама са аминокиселинама из контактеног центра. Хидроксилна

група новиозе на положају С-2' гради водоничну везу са карбонилним кисеоником из пептидне везе Asn46, док кисеоник С-4'-метокси групе формира интеракцију са остатком Asn46. Аминокиселина Asn46 остварује и стерне интеракције са метил групама са положаја С-4' и С-5'. Етарски кисеоник који повезује новобиозу са положајем С-7 кумарина је оријентисан тако да гради водоничну везу са бочним низом Glu50 а преко молекула воде. Насупрот новобиози, кумарински прстен формира само две водоничне везе, обе са гуанидном групом Arg136. Етарски и карбонилни атоми кисеоника формирају водоничне везе дужине 3,2 и 2,6 Å. Хидроксилна група на положају С-4 не остварује интеракције са активним центром ензима.



**Слика 3.** Новобиоцин и водоничне везе које остварује у активном центру *ДНК-гиразе*; кристална структура новобиоцина у комплексу са *N*-терминалним фрагментом *ДНК гиразе* Б *E. coli*, масе 24 kDa

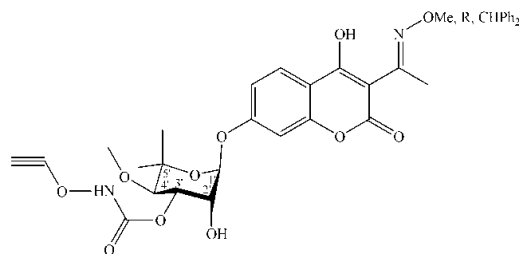
Додатну стабилизацију новобиоцина у активном центру ензима пружају и бројне хидрофобне интеракције. Тако су 5',5'-диметил и 4'-метокси групе шећерне компоненте антибиотика окружене хидрофобним џепом аминокиселина. Алкил остатак Arg76 лежи изнад док прстен Pro79 лежи испод равни кумаринског прстена. Остатак са амино стране молекула, 3''-изопентенил- 4''-хидробензоат окружује Pro79 и он нема значајну улогу у антимикуробној активности.

Новиоза самостално не показује антимикуробну активност. Њена активност у молекулу новобиоцина је вероватно последица интеракције кумаринског дела молекула са



аминокиселином Arg46, којом се шећер смешта у повољан положај према ензиму. Кристална структура новобиоцин-ДНК-гираза комплекса представљена је на Слици 3 (извор: PDB ID 1AJ6).

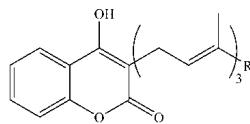
Новобиоцин показује изразиту антибактеријску активност и према G+ и према G- бактеријама. MIC према *S. aureus* показује при концентрацијама од 0,01-1 µg/mL [41] те је због јаког антимикуробног деловања коришћен и као клинички терапеутик против *S. aureus* резистенте на метицилин (MRSA). Нешто слабију активност новобиоцин показује код *E. coli* са MIC од 32-64 µg/mL [42]. Модификацијом молекула новиозе увођењем N-пропагилдоксикарбамата у положају C-3' и супституцијом положаја C-3 са различитим алкил дериватима Schiff-ове базе (Слика 4), добијена је активност нових деривата на ATCC сојеве и различите изолате *S. aureus* је у интервалу MIC од 0,04-20 µg/mL [43]. Модификацијом хлоробиоцина увођењем алкил супституената у положају C-3 и променама на прстену новиозе није дошло до повећања, већ до смањења активности [44] те је токсичност деривата новобиоцина и хлоробиоцина при дужој употреби и смањена активност хемијски модификованих деривата, усмерила испитивања антимикуробне активности нових кумаринских деривата из биљних и синтетичких извора.



Слика 4. Модификоване структуре новобиоцина активне на *S. aureus*

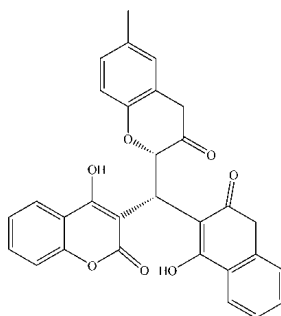
Прости кумарини дафненин, дафнин, ацетилумбелиферон и дафнорелин изоловани из *Daphne gnidium* L. су активни на многе културе међу којима су и *S. aureus*, *E. coli* и *C. albicans*, са MIC=100-500 µg/mL [45]. Прости и фуранокумарини изоловани из биљке *Prerocaulon* (*Asteraceae*) показали су значајан антифунгални потенцијал у интервалу MIC=31,25-250 µg/mL [46]. Из биљке *Ruta graveolens* изоловани су умбелиферон и 7-метоксиумбелиферон, 5- и 8- метоксипсорален и 4 хидроксикумарин. Изоловани деривати псоралена и фуранокумарина поседују изразиту антифунгалну активност на *Fusarium*

*oxy-sporum* [47]. Из биљке *Ferula communis* L. (Ариасеае) изоловани су деривати 4-хидроксикумарина ферунелола (Слика 5) који је у положају С-3 супституисан различитим пренил остацима. Деривати ферунелола показали су изразит степен инхибиције развоја *Mycobacterium* са МИС у интервалу 0,5-64 µg/mL [48].



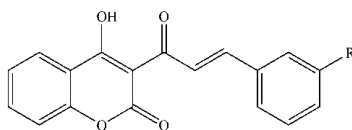
Слика 5. Ферунелол

Синтетички деривати кумарина показују знатно бољу антимикуробну активност од деривата биљног порекла. Тако је синтетички дериват 6-(бута-1,3-диен-2-ил)-7-метокси-2Н-хромен-2-он, показао изразиту антимикуробну активност у интервалу МИС=1,56-12,5 µg/mL на широк дијапазон бактерија [49]. Различити фенил деривати 3-нитрокумарина показали су антимикуробну активност према *S. aureus* при МИС вредностима мањим од 256 µg/mL док је активност према *C. albicans* констатована у интервалу МИС=64-1024 µg/mL [50]. Синтетички деривати кумарина који садрже језгра фуранокумарина и пиранокумарина нису нотирани као потентни инхибитори раста микроорганизама. Супротно томе, велика пажња усмерена је ка дериватизацији 4-хидроксикумаринског молекула. Хетероарил деривати 4-хидроксикумарина (Слика 6), који по структури представљају супституисане дикумароле, тестирани су као антимикуробни агенси дифузионом и дилуционом методом и на G<sup>+</sup> културе показали активност у интервалу МИС=12,5-50 µg/mL, на G<sup>-</sup> културе, у интервалу МИС=12,5-50 µg/mL и на гљиве МИС=25-100 µg/mL [51].



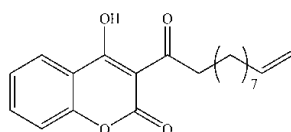
Слика 6. Најактивнији антимикуробни хетероарил дериват 4-хидроксикумарина

Деривати 4-хидроксикумарина чији је положај С-3 супституисан (*E*)-4-фенилбут-3-ен-2-он функционалним групама (Слика 7) показали су високу антимикробну активност према *S. aureus* са MIC=1,9-31,25 µg/mL односно према *B. subtilis* са MIC=1,0-31,25 µg/mL [52].



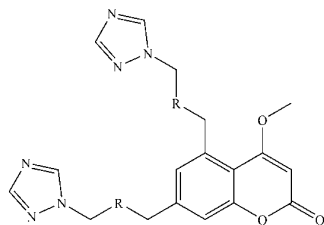
**Слика 7.** С-3 (*E*)-4-фенилбут-3-ен-2-он 4-хидроксикумарини са антимикробном активношћу

Супституција 4-хидроксикумарина и 4,7-дихидроксикумарина ацил остацима 1-нонена, 1-нонина као и виших масних киселина, стеарата и олеата, у положају С-3 довела је до значајане антимикробне активности на *S. aureus* у опсегу MIC=3,6-25,6 µg/mL [53].



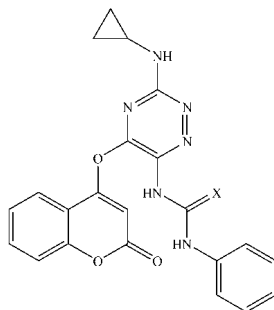
**Слика 8.** 4-хидроксикумарин супституисан 1-ноненом на положају С-3 са антимикробном активношћу

Значајна пажња у стратегији синтезе антимикробних једињења усмерена је ка синтези деривата 4-хидроксикумарина чији је протон у хидроксилној групи на положају С-4 супституисан алкил или арил остатком. Тако су деривати 4-метоксикумарина супституисани у положајима С-5 и С-7 триазил остацима (Слика 9) показали висок ниво антимикробне активности на широк спектар бактерија и гљива у опсегу MIC=2-64 µg/mL [54].



**Слика 9.** Триазил деривати 4-метоксикумарина са антимикробном активношћу

Сличан ниво активности постоји и код једињења чија је хидроксилна група на положају С-4 супституисана различитим С-триазинил уреа и тиоуреа дериватима [55].



**Слика 10.** S-триазинил уреа и тиоуреа деривати 4-хидроксикумарина са антимикробном активношћу

### 1.2.2. Антиоксидативна активност кумарина

Свеопште здравствено стање организма у многоме зависи од баланса између формирања и елиминације слободних радикала [56]. По хемијској структури, слободни радикали јесу атоми, јони или молекули који имају један или више неспарених електрона и који су узрок њихове високе и неселективне реактивности. Већина слободних радикала су краткоживећи и веома лако подлежу мономолекулским и бимолекулским реакцијама разлагања [57]. Слободни радикали настају термоллизом, електромагнетном радијацијом, редокс-реакцијама, ензимским и хемијским процесима [58].

Слободни радикали јесу метаболички конституенти многих нормалних и патофизиолошких процеса. У малим количинама настају током одвијања процеса ћелијског дисања на нивоу респираторног низа [59] те су стога учесници оксидоредукционих реакција на нивоу ћелије. Учествују и у одбрани организма против хемијских и биолошких агенаса или као одговор на руптуру ткива у виду повреде или оштећења ћелије [56].

Ланчане реакција слободних радикала на нивоу ћелије инициране су присуством реактивних врста кисеоника или азота у којима атоми кисеоника или азота поседују један или више неспарених електрона. Реактивне кисеоничне врсте (енг. reactive oxygen species, ROS) које настају у физиолошким процесима јесу хидропероксидни радикал ( $\text{HO}_2^{\cdot}$ ), супероксид радикал ( $\text{O}_2^{\cdot-}$ ), водоник пероксид ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), хидроксил радикал ( $\cdot\text{OH}$ ) и

синглетни кисеоник [60]. Реактивне азотове врсте (енг. reactive nitrogen species, RNS) које настају у физиолошким процесима јесу азот-моноксид ( $\text{NO}^\cdot$ ), азот-диоксид ( $\text{NO}_2^\cdot$ ), пероксонитрит ( $\text{ONOO}^\cdot$ ) и нитрозопероксикарбонат ( $\text{ONOOCO}_2^\cdot$ ) [60]. Уколико дође до повећања концентрације ROS или RNS у односу на нормалан ниво, реактивне врсте могу изазвати оксидативни стрес и оштећење ћелије интеракцијом и мењањем физиолошке активности липида, протеина, ДНК и угљених хидрата [61] што може довести чак и до ћелијске смрти [56]. Деловање ROS и RNS повезано је са настанком срчаних обољења, тромбозе [62], хипертензије [63], Alzheimer-ове и Parkinson-ове болести [64] и канцером изазваним прекидом у секундарној структури ДНК [65].

Ћелија се против неконтролисаног развоја слободних радикала бори ензимима попут *супероксид димутаза* [66], *каталазе* [67], *глутатион-S-трансферазе*, *глутатион редуктазе*, *глутатион пероксидазе* [67] али и неензимским биомолекулима попут витамина Е [68],  $\beta$ -каротена [69], аскорбинске киселине [70] или уносом природних и синтетичких фенолних једињења. Оксидоредукциони капацитет нових једињења претходно се контролише серијом *in vitro* (антиоксидативни капацитет, неутрализација DPPH, пероксидног и хидроксилног радикала, хелатизациони капацитет и др.) и *in vivo* (каталитичка активност ензима оксидационог стреса) тестова.

Нека једињења, попут хидроксикумарина [71] директно рекомбинују слободне радикале и прекидају иницијацију и пропагацију радикалских ланчаних реакција. Обзиром да припадају групи природних ароматичних једињења и понашају се као феноли [56], они делују као моћни хелатори метала и неутрализатори слободних радикала што резултује снажним антиоксидативним ефектом. Предност кумарина као антиоксиданата огледа се у томе што су пре свега конституенти биљне исхране и уносе се као *in vivo* антиоксидативни агенси. Да би кумарински молекул поседовао антиоксидативни капацитет мора да поседује бар једну хидроксилну групу [72].

По утврђивању кореалције између реактивних врста и њиховог учешћа у патогенези различитих обољења као и чињенице да се екстерном администрацијом антиоксиданата може утицати на успоравање развоја болести, кумаринима се придаје велика важност у борби против оксидативног стреса. Кумарини, било природног или синтетичког порекла, познати су као *in vitro* антиоксидативни агенси, али до сада, ни једно једињење није у употреби као клинички антиоксидант.

Природни биљни ресурси засад представљају највеће изворе кумарина као антиоксиданата. Носиоци антиоксидативне активности су углавном прости кумарини.

Из биљке *Cortex fraxini* изоловано је низ простих кумарина међу којима су скополетин, ескулетин, фракселетин, умбелиферон и дафнетин приказали способност неутрализације DPPH радикала у интервалу  $IC_{50}= 17,8-37,63 \mu\text{M/mL}$ , односно ОН радикала у интервалу  $IC_{50}= 40,5-218 \mu\text{M/mL}$  [73]. Као најактивнији антиоксидант нотиран је ескулетин. Врло сличан хемијски састав констатован је анализом кореанских медицинских биљака, чији су кумарински деривати поред способности неутрализације DPPH радикала ( $IC_{50}= 1,1-31,86 \mu\text{M/mL}$ ) приказали и значајан хелитизациони капацитет са вредношћу  $IC_{50}= 9,1-200 \mu\text{M/mL}$  [74]. Прости кумарини изоловани су и из *Haplorappus multifolius*, при чему су 6-хидрохи-7-[(*E,E*)-3',7'-диметил-2',4',7'-октатриенилокси] кумарин и 7-[(*E*)-3'-метил-4'-хидрохи-2'-бутенилокси] кумарин показали високу способност неутрализације DPPH радикала у интервалу  $IC_{50}= 109,3-251,5 \mu\text{M/mL}$  [75]. Из биљака *Acacia nicotica* L. [72] и *Geranium mallichanum* [76] изоловани су умбелиферон и 7-метоксиумбелиферон, деривати са изразитом способношћу неутрализације DPPH радикала.

Фуранокумарини јесу доминантни антиоксиданти изоловани из биљке *Angelica dahuricae*. Два деривата изолована из ове биљке, 4-метокси-7H-фууро[3,2-г]хромен-7-он и 4-хидрокси-9-(3-метилбут-2-енил)-7H-фууро[3,2-г]хромен-7-он показали су изразиту способност неутрализације DPPH радикала са измереним  $IC_{50}$  вредностима од  $6,1 \mu\text{M/mL}$  и  $9,4 \mu\text{M/mL}$  [77].

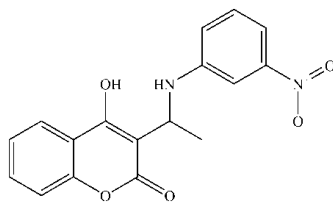
Сложенији хемијски састав изолованих кумарина констатован је код биљке *Ferulago campestris* (Ариасеае) где су поред деривата умбелиферона изоловани и гранидивитин, агасил и бензиол аегелинол, деривати пиранокумарина аегенилола, чије је антиоксидативно дејство потврђено хемилуминесценцијом на узорцима крви пацијената оболелих од канцера [78]. Прости, фурано- и пиранокумарини и њихови гликозиди типа мармесинина, нонадекина, колмбианетин-О-β-D-глукопиранозида, (*S*)-пеуцеданол-7-О-β-D-глукопиранозида, (*S*)-пеуцеданол-3'-О-β-D-глукопиранозида, скимина, апиозилскимина, изоапиозилскимина и манолиозида изоловани су из биљке *Angelica gigas* такође су показали антиоксидативну активност на нивоу ћелија канцера [79].

Посебна пажња се посвећује кумаринима као инхибиторима липидне пероксидације у мицеларном систему јер се тиме дефинише антиоксидативни потенцијал кумарина на нивоу ћелијске мембране. Природни кумарини умбелиферон, његов дериват скополетин, затим 4-хидроксикумарин и 5,7-дихидрокси-, 6,7-дихидрокси- и 7,8-дихидрокси-4-метилкумарини су јаки инхибитори липидне пероксидације на мицеларном нивоу што је изражено преко релативне антиоксидативне ефикасности [80]. Новији механизми дејства природних кумаринских деривата као инхибитора липидне пероксидације огледају се у спречавању цитотоксичности хидропероксида на ћелијском нивоу [81].

Литературни подаци не приказују биљни свет као богат дериватима 4-хидроксикумарина те је антиоксидативни капацитет ових једињења, осим самог 4-хидроксикумарина, мало познат. Због тога је хемијска дериватизација 4-хидроксикумарина и самих пирон-супституисаних кумарина атрактивна са становишта антиоксидативне активности и биће презентована у даљем тексту.

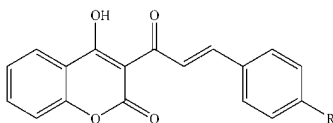
Дериватизацијом 4-метилкумарина добијен је висок ниво способности неутралзације DPPH радикала са измереним  $IC_{50}$  вредностима од 0,01 до 97,2  $\mu\text{M}/\text{mL}$  [82]. Највећу активност међу синтетисаним дериватима показао је 7,8-дихидрокси-4-метилкумарин, док је завидан ниво активности нотиран и код деривата чија је хидроксилна група у положају С-6 супституисана ацетатом ( $IC_{50}=2,35 \mu\text{M}/\text{mL}$ ) и код самог 6-хидрокси-4-метилкумарина ( $IC_{50}=3,13 \mu\text{M}/\text{mL}$ ). Најслабија активност констатована је код 4-метилкумарина.

Дериватизација 4-хидроксикумарина представља модерно и актуелно поглавље у синтетичкој хемији антиоксиданата чему у прилог говори свега неколико публикованих референци. Серија синтетисаних деривата 4-хидроксикумарина који у положају С-3 садрже изопропил-*N*-амино и имино-фенил супституенте (Слика 11) приказали су способност неутрализације DPPH радикала у интервалу  $IC_{50}=25,0-58,8 \mu\text{M}/\text{mL}$  за аминоксидне форме и  $IC_{50}=152,1-441,5 \mu\text{M}/\text{mL}$  за имино форме [83]. Поред неутрализације DPPH радикала, деривати су показали антиоксидативну активност према пероксидном и хидроксилом радикалу, као и велики хелатизациони капацитет.



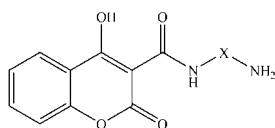
**Слика 11.** *N*-изопропил-3-нитроанилин дериват 4-хидроксикумарина са антиоксидативном активношћу

Деривати 4-хидроксикумарина супституисани у положају С-3 (*E*)-4-фенилбут-3-ен-2-он остацима као и њихови халкони (Слика 12) показали су антиоксидативни капацитет у интервалу  $IC_{50}=2,10-3,03 \mu\text{M/mL}$  [84].



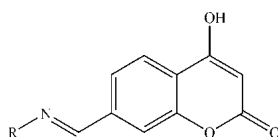
**Слика 12.** *S*-3 (*E*)-4-фенилбут-3-ен-2-он 4-хидроксикумарини са антиоксидативном активношћу

Деривати 4-хидроксикумарина који су на положају С-3 супституисани 3-карбоксаминидима (Слика 13) и липоил-3-карбоксаминидима јесу снажни инхибитори липидне пероксидације [85].



**Слика 13.** 3-карбоксамини 4-хидроксикумарина као инхибитори липидне пероксидације

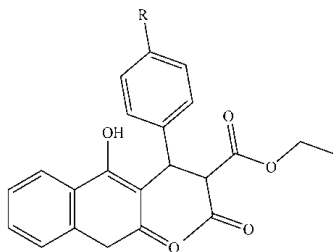
Сличну активност показују и 7-азометин деривати 4-хидроксикумарина (Слика 14) [86].



**Слика 14.** 7-азометин деривати 4-хидроксикумарина као инхибитори липидне пероксидације



Антиоксидативни капацитет хемилуминисценцијом показан је код деривата 4-хидроксикумарина чији је положај С-3 супституисан различитим етил 2-ацетил-3-фенулбутаноатима (Слика 15) [87].



**Слика 15.** Етил-2-ацетил-3-фенулбутаноати 4-хидроксикумарина ако антиоксиданти

### 1.2.3. Антикоагулативна активност кумарина

Хемостаза [88] је физиолошки процес сталног одржавања равнотеже између механизма који доводе до згрушавања крви и механизма који то згрушавање спречавају. Као резултат ове равнотеже крв несметано циркулише. Такође, хемостаза представља природни прекид крварења из повреде или оштећеног крвног суда, као и спречавање изласка крви кроз незлеђен крвни суд. Да би се процес остварио, неопходно је учешће неколицине васкуларних и тромбоцитних фактора као и механизма који спречавају прекомерно нагомилавање тромбоцита и фибрина на месту повреде крвног суда. Тромбоза је, са друге стране, физиолошки процес који се одвија при оштећењу или уклањању крвних судова ендотелијума. И хемостаза и тромбоза подразумевају исти физиолошки процес—коагулацију крви.

Приликом оштећења крвног суда, хемостазу чине васкуларна, тромбоцитна и фаза каскадне коагулације крви, која, међусобним деловањем фактора коагулације, резултује стварањем крвног угрушка (коагулума). У васкуларној фази хемостазе одвија се иницијална вазоконструкција повређеног крвног суда са циљем да смањи циркулацију крви ка повреди. Вазоконструкција се продужава и појачава накнадним деловањем серотонина и тромбоксана А<sub>2</sub>, који се ослобађају при агрегацији тромбоцита. Процес се наставља тромбоцитном фазом при чему се врши формирање слободног и привременог угрушка на месту повреде. Тромбоцити се везују за колаген на месту повреде крвног суда

и активирају се тромбином, формираним у коагулационој каскади на лицу места, или отпуштањем ADP-а из других активираних тромбоцита. Уз активацију, тромбоцити мењају облик и, уз присуство фибриногена, врше агрегацију до формирања хемостазног чепа (код хемостазе) или тромба (код тромбозе) у фази коагулације. Коагулацијска фаза хемостазе одвија се добро познатим каскадним механизмом у коме учествује тринаест фактора коагулације и представља процес стварања фибринског угрушка (коагулума), којим се једино може зауставити крварење из већих крвних судова. Фактори коагулације представљају инактивне протеине, зимогене, који током каскаде прелазе у активну форму.

Процес коагулације може се поделити у три фазе. У првој фази коагулације (унутрашњи и спољашњи пут) ствара се активни тромбoplastин (*протромбиназа*) У другој фази, под дејством *протромбиназе* долази до претварања протромбина у тромбин. У трећој фази, под дејством тромбина, растворљиви фибриноген се претвара у нерастворни фибрин. Физиолошка равнотежа успоставља се парцијалним или комплетним растварањем чепа или тромба плазмином [89].

Кумарини своју физиолошку улогу као антикоагуланти испољавају током фазе коагулације на унутрашњем путу. Унутрашњи пут (Схема 13) укључује факторе XII, XI, IX, VII и X, као и прекаликреин, високомолекуларни кининоген,  $Ca^{2+}$  и тромбоците. Он представља најдужу фазу коагулације која просечно траје 3-6 минута. Резултује продукцијом фактора Ха, активне форме фактора X. Унутрашњи пут започиње активирајућом површином, негативно наелектрисаном "контактном фазом" на крвном суду коју чине колаген и мембране тромбоцита и за чију су анјонску површину везани прекаликреин, кининоген и фактори XII и XI. На овај начин зимогени (неактивирани фактори коагулације) пристижу на место оштећења у близини фактора XII. Када се структуре контактне фазе приближе активирајућој површини, фактор XII се активира протеолизом коју катализује каликреин. Протеолизу активира фактор XI који се том приликом везује електростатичким интеракцијама за НМВ кининоген. Настали фактор XIIа делује на прекаликреин да би се продуковало још каликреина, започињући реципрочну активацију. Потом фактор XIIа активира фактор XI до XIа и такође индукује отпуштање брадикинина из кининогена.

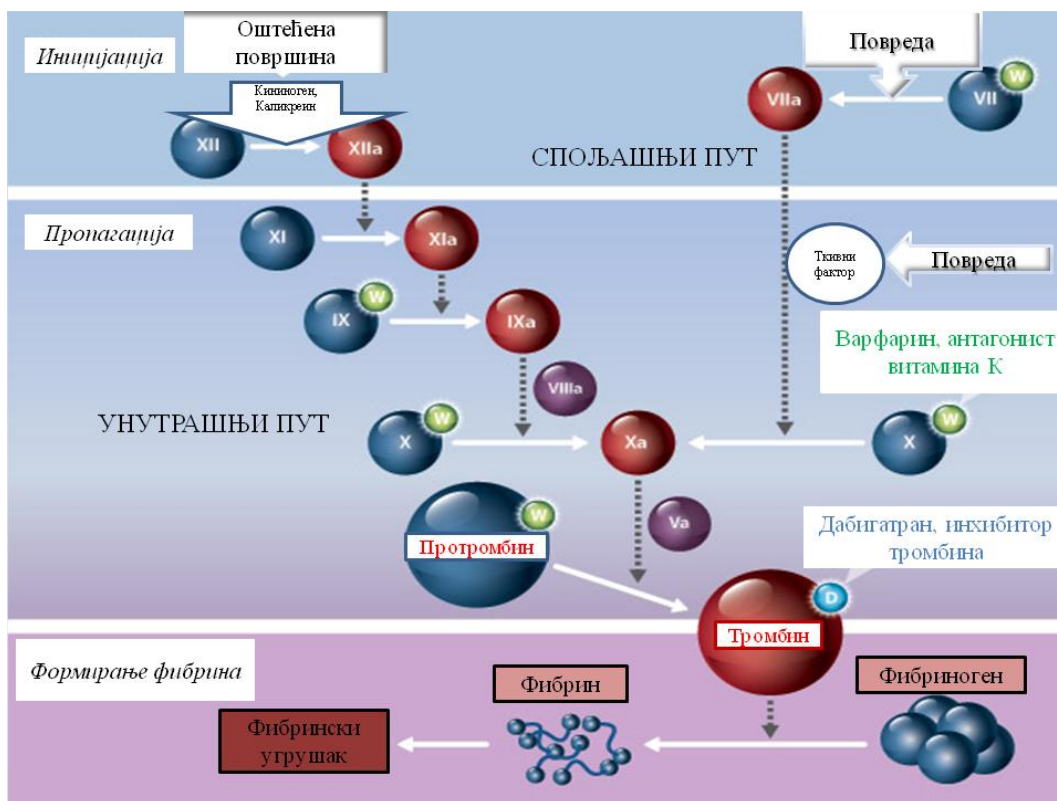
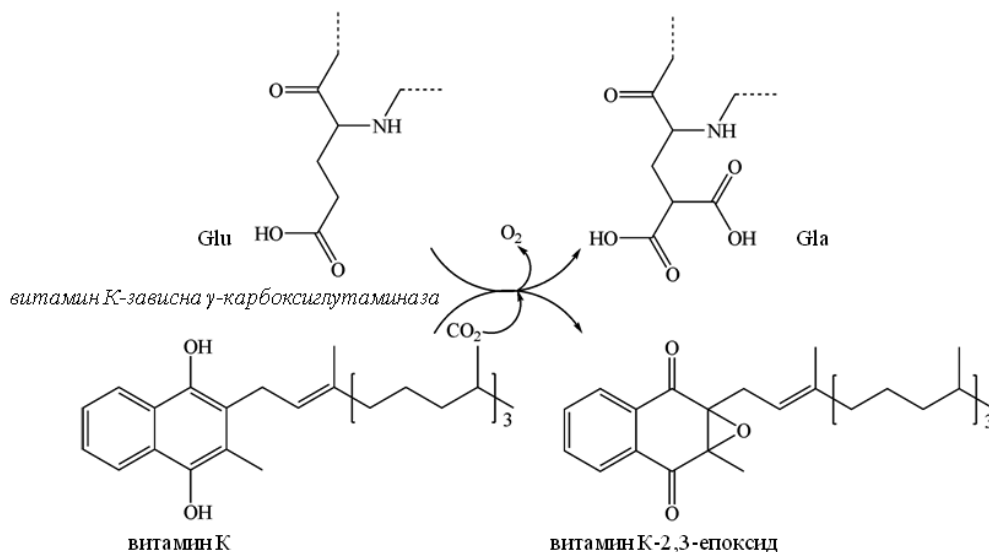


Схема 13. Каскадни механизам коагулације крви

Кумарини своју антикоагулативну активност остварују на нивоу фактора II (протромбина), VII (проконвертина), IX (антихемофилног фактора Б, Christmas-овог фактора) и X (Stuart-Prower-овог фактора). Фактор XIa, у присуству  $\text{Ca}^{2+}$ , активира фактор IX, зимоген који садржи витамин К- зависне  $\gamma$ -карбоксиглутамат остатке (Gla) након чега долази до активације и *серин протеазе*, фактора IX. Протромбин је мономерни гликопротеин синтетисан у јетри који садржи десет Gla остатка. У хепатоцитима, витамин К је коензим карбоксилазе која катализује посттранслаторну карбоксилацију глутаминске киселине фактора II, VII, IX и X до  $\gamma$ -глутаминске киселине [90] (Шема 14). У исто време долази до трансформације витамина К до витамин К-2,3-епоксида, природног супстрата *витамин К-епоксид редуктазе*, субјединице 1 (VKORC1). Ензим *витамин К-епоксид редуктаза* катализује раскидање епоксидне везе и редукцију витамина К до нативне, хидрохинонске, форме којом се започиње нови циклус активације фактора II, VII, IX и X. Преко  $\gamma$ -глутаминске киселине се поменути фактори коагулације везују за фосфолипиде мембране тромбоцита посредством јона калцијума који прави калцијумове мостове. На

овај начин омогућено је њихово активно учешће у процесу коагулације. Серин протеаза, фактор IX, даље катализује раскидање Arg371-Иле372 везе у фактору X услед чега долази до стварања дволанчане серин протеазе, фактора Xa.



**Схема 14.** Механизам активације фактора II, VII, IX и X витамином К

Спољашњи пут (Схема 13) укључује ткивни фактор, факторе VII и X, као и јоне калцијума, а резултује продукцијом фактора Xa. Пут се одвија много брже од унутрашњег пута и траје око 10 секунди. Фактор Xa се налази на месту где се унутрашњи и спољашњи пут спајају и води ка финалном, заједничком путу каскаде. Ткивни фактор III и фактор VII, гликопротеин који се синтетише у јетри, јединствени су у спољашњем путу. Фактор VII садржи  $\gamma$ -карбоксиглутаминску киселину и везује се за ткивни фактор само у присуству калцијума. Комплекс III-VII- $\text{Ca}^{2+}$  је каталитички активан и доводи до настанка фактора X.

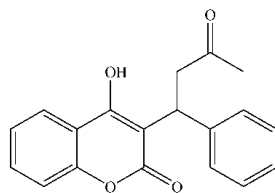
Друга важна интеракција између унутрашњег и спољашњег пута је та да комплекс ткивног фактора и фактора VIIa такође активира фактор IX из унутрашњег пута. Данас се сматра да је формирање комплекса ткивног фактора кључни корак у иницирању згрушавања крви *in vivo*. Фактор Xa, створен у унутрашњем или спољашњем путу, активира протромбин (фактор II) до тромбина (фактор IIa), који даље преводи фибриноген у фибрин у заједничком путу коагулације. И унутрашњи и спољашњи коагулациони пут

доведе до формирања фибрина. Активирање фактора X у Ха врши се хидролизом фактора X у положајима 145 и 161 елиминацијом 6 аминокиселина.

Као што је раније поменуто, коагулациони систем је у динамичкој равнотежи у којој се фибрински угрушци стално стварају и растварају. Процес растварања се назива фибринолиза. Ензим који регулише фибринолизу назива се плазмин.

Механизам кумаринске инхибиције коагулације крви одвија се на нивоу VKORC1, ензима лоцираног у мембрани ендоплазматичног ретикулума човека, мишева и пацова [90]. Дужина секвенце код поментих врста варира: секвенца хуманог протеина садржи 163, а мишјег и пацовског 161 аминокиселину [91]. Секундарну структуру VKORC1 престављају четири трансмембранска  $\alpha$ -хеликса од којих је најзначајнији хеликс са остацима 127-148 јер се у њему налази и активни центар ензима кога чине аминокиселине на положајима 130-140 [90,92], Ala-Phe-Cys-Ile-Val-Cys-Ile-Thr-Tyr-Ala. Структурни мотив Cys-Ile-Val-Cys у пределу 132-135 представља каталитички центар VKORC1 на чијем се нивоу врши инхибиција кумаринима [92] и на коме се приликом редукције епоксида са завршетком дејства ензима гради дисулфидна веза [91]. За остатак Thr138-Tyr139-Ala140 везују се кумарински антикоагуланти [90]. Висок степен хомологије у секвенци VKORC1 животиња и људи чини механизам коагулације идентичним.

Минимални структурни захтеви који су потребни да би неко једињење било антикоагулант су хидроксилна група у положају C-4 и неполарни остатак у положају C-3 [93]. Клинички антикоагулант варфарин, синтетички дериват 4-хидроксикумарина (Слика 16) те захтеве испуњава. У структури варфарина, положај C-3 у молекулу 4-хидроксикумарина супституисан је 2-фенилпентан-2-он групом, уз велики допринос бензеновог прстена у липофилности. Након примене варфарина као ротендицида, нашао је своје место у хуманој медицини, у превенцији тромбозе и емболизма (абнормалне формације и миграције крвног угрушка). Као антикоагулант, варфарин делује као инхибитор редукције епоксидне форме витамина K, те на тај начин спречава поновно започињање коагулационог циклуса овог витамина [93]. Транспортни систем варфарина код људи и мишева је албумин [94].



Слика 16. Структура варфарина

Приликом третирања лабораторијских животиња примењује се орална апликација (лат. *per os*) [95] или ињектирање директно у абдомен (интраперитонеално, лат. *i.p.*) [96]. Оптимална доза за третитање животиња, при којој се не констатују нежељена дејства, јесте 0,3 mg/kg [95] и при чему је протромбинско време (време превођења протромбина у тромбин), којим се дефинише деловање кумарина као антикоагуланата на унутрашњем путу, у интервалу 25,7±2,4 до 58,2±19,2 секунди.

Један од највећих изазова у лечењу варфарином представља његово дозирање код људи. Концентрацију варфарина приликом терапије венозног тромбоемболизма је потребно одређивати за сваког пацијента понаособ, услед постојања две врсте мутација које се јављају на VKORC1 и код људи и код животиња [90]. Приликом преписивања терапије, концентрација варфарина се одређује на основу INR вредности а сам лек се користи кад је INR пацијента 2,5–3,5 (или чак 3,0–4,5) [97]. Принцип успешне хумане терапије варфарином је дугорочно лечење малим дозама. Обично је дужина терапије од 3 до 12 месеци са просечном концентрацијом од 4 mg/дневно [98]. Летална доза варфарина на животињском моделу јесте LD<sub>50</sub>=50 mg/kg [99] док је код човека терапија ограничена на максималних 10 mg/дневно [98].

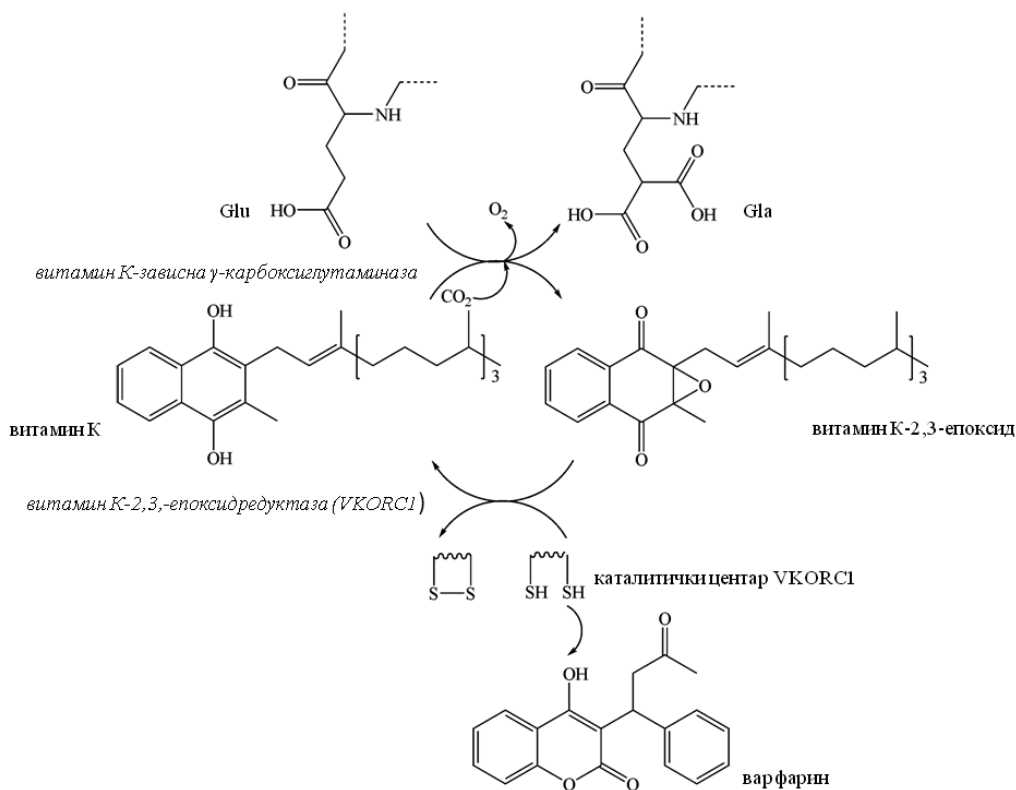
Механизам деловања варфарина јесте актуело питање и то из најмање два разлога. Први је тај да, због трансмембранске природе VKORC1, не постоји снимљена кристалографска структура варфарин-VKORC1 комплекса, те је непознаница у којој форми варфарин остварује интеракцију са ензимом. Друго питање је на који начин варфарин врши инхибицију редукције епоксидне форме витамина К и како долази до формирања дисулфидне везе?

У кристалној структури варфарин је у облику цикличног хемикетала, форми у којој не остварује интеракције са својом молекулском метом (Слика 17, ХЦФ). У воденом





аминокиселине у SH форми одвија на хинонску форму витамин К-епоксида, наводећи при томе и да се варфарин на почетку интеракције са VKORC1 налази у својој 4-OH форми, али и да током интеракције са ензимом, прелази у хинонску форму чија структура није дефинисана (Схема 15) [90]. Данас је уважено мишљење да варфарин у својој депротонованој форми, која кореспондира хинонској структури витамина К, делује као конкуритивни инхибитор хинонске структуре витамина К [103]. Оно што није прецизирано јесте како у ћелији депротонована форма настаје и која је од могућих три (ДОФ, ДОТГ или ДОХФ) активна. Питање структуре варфарина током интеракције са каталитичком аминокиселином јесте значајно јер до сада није идентификован метаболит варфарин-2,3-епоксид, те је због тога таква форма варфарина искључена. Такође, није прецизиран ни вид интеракције варфарина са каталитичким центром.



**Схема 15.** Антикоагулативна активност варфарина на нивоу *витамин К-епоксид редуктазе*

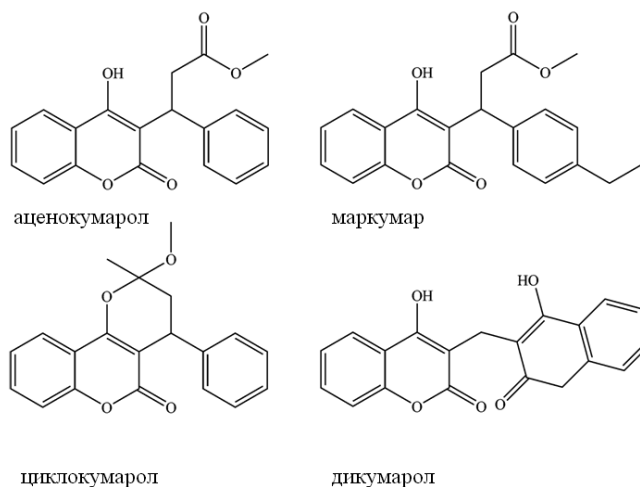
Иако је антикоагулативна активност варфарина клинички потврђена и као лек је у употреби деценијама, познати су бројни нежељени ефекти варфарина због којих се налаже



константна потреба за синтезом нових кумаринских антикоагуланата. Уколико се примењује током трудноће, варфарин може изазвати крварења у фетусу, спонтани побачајај, прерано рођење али и смрт плода [104] а код новорођенчета урођене дефекте [105] (носна хипоплазија, сужење носног моста, сколиоза као и калцификација кичме, бедрене кости и костију пете, абнормалности удова), брахидактију, сметње средишњег нервног система, дефекте ока [104, 105].

Код одраслих пацијената један од најопаснијих ризика континуиране терапије варфарином је унутрашње крварење [106]. Ризик од крварења се повећава ако је INR пацијента изван распона (због случајног или намерног предозирања) а може довести и до искашљавања крви, појаве модрица, крварења из носа или десни, крви у мокраћи или столицу. Ретка, али озбиљна компликација током лечења варфарином је варфарин некроза [106].

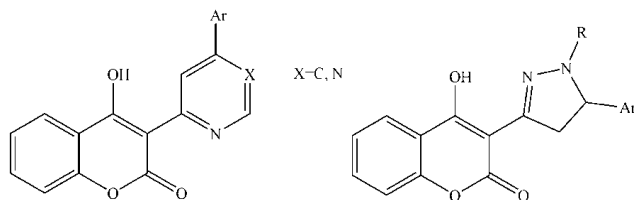
Аналози варфарина, аценокумарол, маркумар, циклокумарол и диккумарол, такође се клинички примењују али показују слична нежељена дејства (Слика 18).



**Слика 18.** Синтетички антикоагуланти хемијски слични варфарину

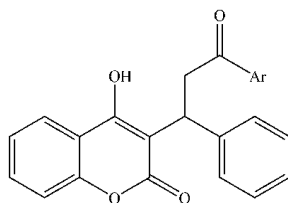
Модерна стратегија у синтези кумаринских деривата као антикоагуланата све више елиминира присуство фенил групе из С-3 остатка или је супституише. Литературних података са новим синтетичким дериватима кумарина, ипак, нема много. Пиридин, пиперидин и пирозол деривати 4-хидроксикумарина (Слика 19) аплицирани на

лабораторијским пацовима у концентрацији 150 mg/kg условљавају вредности коагулационог времена у интервалу  $CT=8,17-22,5$  и протромбинског времена у интервалу  $PT=11,52-241,02$  секунди [107].



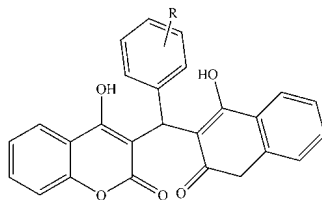
**Слика 19.** Пиридински, пиперидински и пиазолови деривати 4-хидроксикумарина као антикоагуланти

Арил деривати варфарина (Слика 20) у концентрацији од 20,95-250 mg/kg повећавају коагулационо време до вредности од  $CT=92,75-628,62$  секунди [108].



**Слика 20.** Арил деривати варфарина као антикоагуланти

Дикумарол је такође супституисан екстерним ароматом (Слика 21) те су такви деривати у концентрацији 2-10 mg/kg повећали коагулационо време до вредности од  $CT=117,9-1136,1$  секунди [109].



**Слика 21.** Нови деривати дикумарола као антикоагуланти

### 1.3. Метаболизам кумарина

Метаболички путеви кумаринског језгра добро су познати (Схема 16). Доминантни пут у првој фази метаболизма кумаринског молекула јесте хидроксилација у положају С-7 катализована ензимом СYP2A6 који припада групи *цитохром оксидаза* P450 [110]. Алтернативни путеви у првој фази одвијају се хидроксилацијом у осталим положајима или отварањем кумаринског језгра и формирањем *o*-хидроксипропанове киселине или *o*-хидроксифенилацеталдехида који се формира неензимским путем из нестабилног кумарин 3,4-епоксида и чијом се оксидацијом добија *o*-хидроксифенилсирћетна киселина.

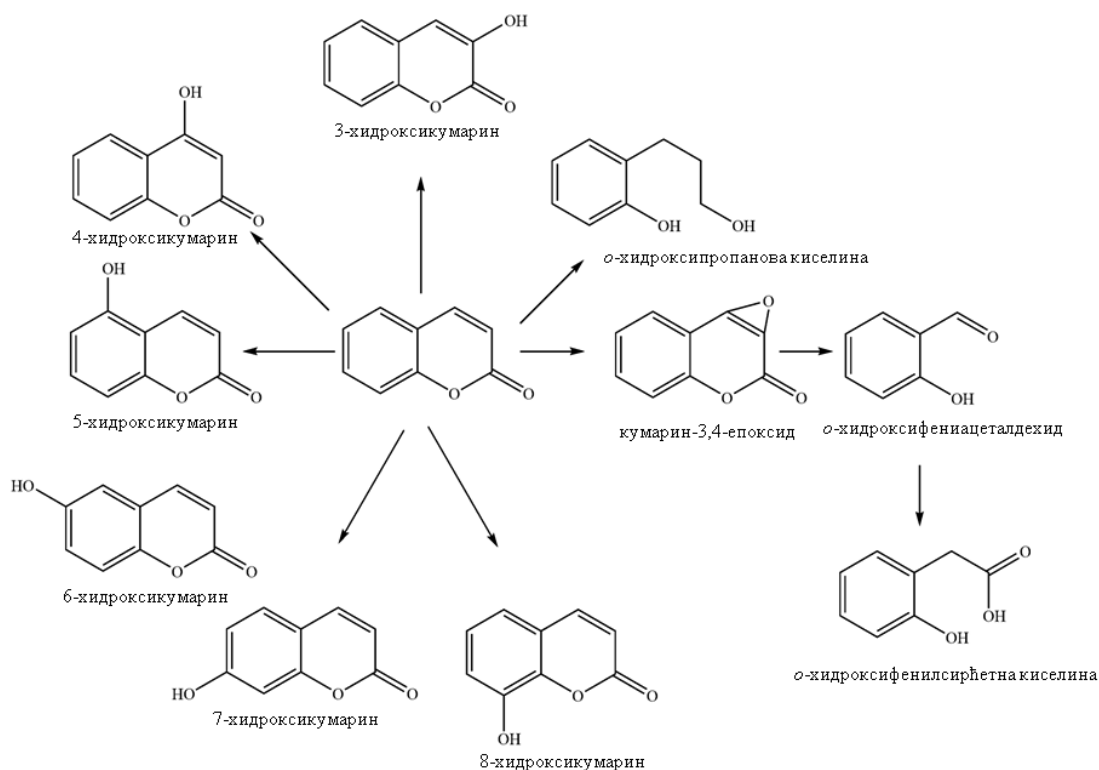


Схема 16. Прва фаза метаболизма кумаринског језгра

Друга фаза метаболизма одвија се биотрансформацијом 7-хидроксикумарина до глукуронида, под утицајем *UDP-глукуронилтрансферазе*, и екскрецијом кумаринског гликозида путем урина (Схема 17) [111]. Мањи обим друге фазе метаболизма одвија се сулфоновањем хидроксилне групе у положају С-7 дејством *сулфотрансферазе*.

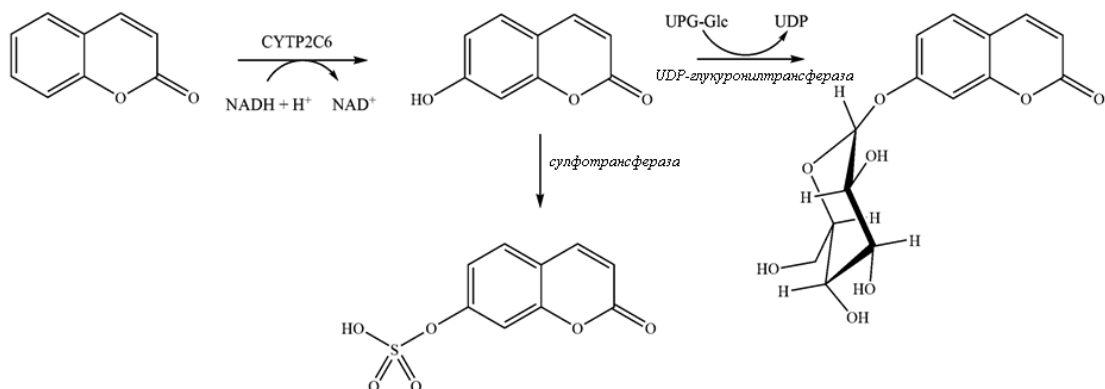
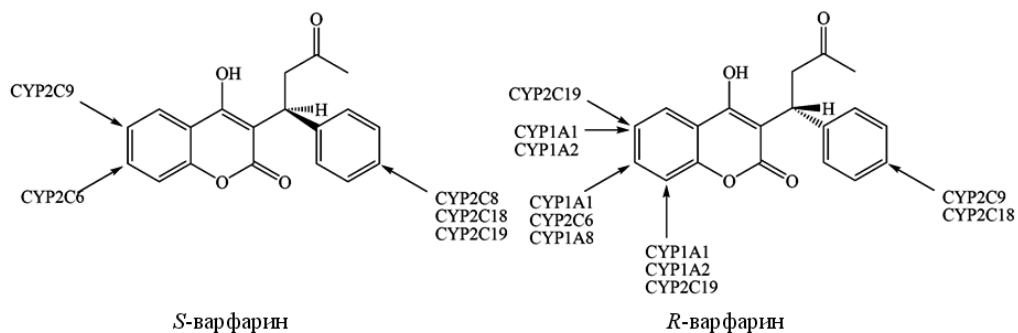


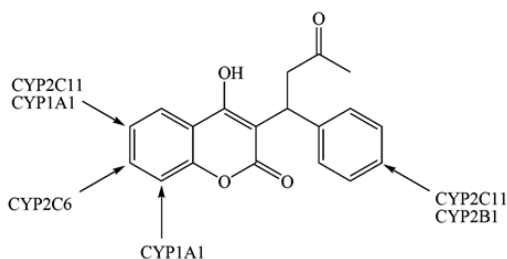
Схема 17. Друга фаза метаболизма кумаринског језгра

Иако се о метаболизму новобиоцина, клиничког антимикуробног агенса, мало зна, по његовој апликацији вероватно долази до хидролизе гликозидне везе и укључивања новиозе и 4-хидроксикумарина у катаболизам угљених хидрата и кумарина. Метаболичке трансформације варфарина, као клиничког антикоагуланта су добро познате. Варфарин је рацемска смеша два енантиомера (*R*)- и (*S*)- облика, од којих сваки има другачији метаболички пут у првој фази (Слика 22).

прва фаза метаболизма код човека



прва фаза метаболизма код мишева и пацова



Слика 22. Прва фаза метаболизма варфарина

S-варфарин има пет пута већи потенцијал од R-енантиомера као антагонист витамина К [112]. Прва фаза метаболизма оба енантиомера код човека и глодара одвија се хидроксилацијом на различитим положајима деловањем различитих оксидаза из CYP450 групе а доминантан метаболички пут (80%) је хидроксилација у положају C-7 која се код оба енантиомера одвија дејством CYP2C6. Код R-енантиомера констатован је висок проценат деривата варфарина са хидроксилом групом у положајима C-7 и C-8 [113]. Фенил група из остатка на положају C-3 такође подлеже хидроксилацији у првој фази метаболизма и то у *p*-положају.

Основна разлика у првој фази метаболизма код човека и односу на метаболизам код мишева и пацова огледа се у различитим врстама CYP450 ензима које катализују процесе хидроксилације.

Екскреција варфарина се врши урином након везивања хидроксилене групе у положају C-7 за глукуронску киселину, катализованог *UDP-глукуронилтрансферазом*.

#### **1.4. Компјутационе методе одређивања биоактивних конформација кумарина**

Комјутациона хемија јесте есенцијални сегмент у развоју и откривању нових структура лекова у модерној медицинској хемији [114]. Различитим техникама молекулског моделирања данас се једноставно откривају биоактивне конформације нових једињења, њихове интеракције на рецепторском или ензимском нивоу те се на основу сазнања о интеракцијама скраћује поступак у планирању хемијске синтезе елиминисањем бројних фармакофора које не би допринеле биолошкој активности.

Различите операције током молекулског моделирања одвијају се помоћу алгоритама којима се рачуна структура и физичко-хемијски параметри молекула од интереса у реалном систему растварача. Методе се данас могу поделити на молекулско-механичке и квантно-механичке.

Применом алгоритама молекулске механике, једначине којима се описује кретање атома унутар молекула користе законе класичне физике. Обрзиром на чињеницу да се кретање описујем класичном Newton-овом једначином кретања, оно је временски зависно те се конформационе промене унутар молекула могу пратити трајекторијама. Суштина

метода јесте да посматрају атомско језго без кретања електрона. У основи, молекула се третира као скупина сфера (атома) које су повезане еластичним силама (везама). Једначине које проистичу из класичне физике користе се да би се израчунале интератомске интеракције и енергије (поља сила) које су резултат скраћивања и издуживања веза, савијања углова, не-везивних интеракција и торзионих енергија. Оваква израчунавања за нове структуре захтевају коришћење емпиријских података који описују интеракције између различитих атома (дужине веза, наелектрисање атома, торзиони и диедарски угао...) у познатим једињењима и који су имплементирани у сам алгоритам. Енергије молекула које се израчунавају молекулском механиком као апсолутне величине немају никаквог значаја али се користе прилом поређења различитих конформација истог молекула. Молекулско-механичке методе су брзе и компјутерски веома мало захтевне али имају и својих ограничења. Молекулска механика се користи приликом:

- Минимизације енергије
- Идентификације стабилне конформације
- Израчунавања енергије специфичне конформације
- Генерисања различитих конформација истог молекула
- Проучавања молекулског кретања

Ипак, методама молекулске динамике не могу се израчунавати електронска својства молекула јер кретање електрона није укључено у израчунавања. Овај недостатак се превазилази кванто-механичким израчунавањима.

Методе кванте механике користе законе квантне физике за израчунавање особина молекула од интереса разматрајући интеракције између електрона и атомских језгара унутар молекула. Атоми се не третирају као свере али се приликом израчунавања користе неке апроксимације. Тако се језгра посматрају као непокретна, што је логична апроксимација обзиром да је кретање електрона у атому неупоредиво брже. Пошто се сматра да се електрони крећу око непокретног језгра, могуће је израчунати електронску енергију независно од енергије језгра. Друга апроксимација јесте да се електрони крећу независно једни од других. Оптимизација молекула није временски зависна већ је енергетски зависна. Кванто-механичке методе се могу поделити у две велике класе :семи-емпиријске и *ab initio* методе. Семи-емпиријске методе се могу примењивати само за

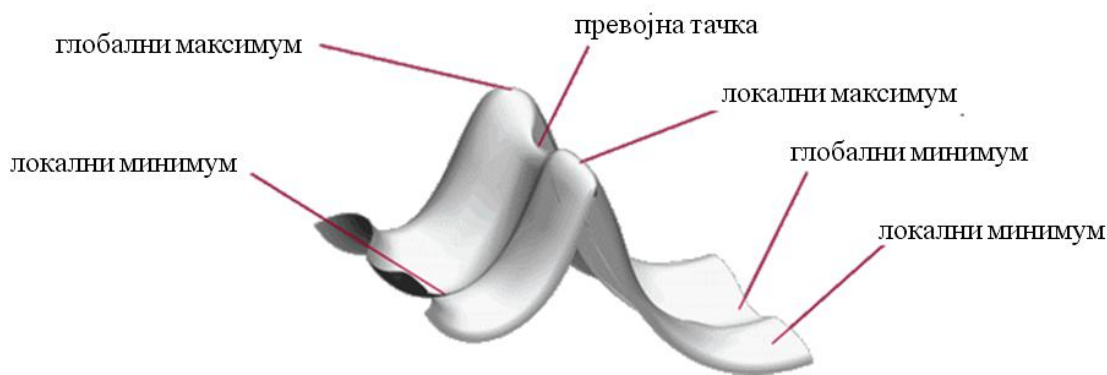
валенционе електроне, брже су од *ab initio*, могу се примењивати и за веће молекуле и донекле користе постојеће параметре за већ дефинисане хемијске везе. Међутим, одликују се мањом тачношћу у односу на *ab initio* методе, нарочито на пољу израчунавања фреквенција молекула. *Ab initio* методе не захтевају претходно дефинисане податке за атоме и везе, већ се структура рачуна из почетка и најниже енергетско стање молекула зависи искључиво од интраелектронских интеракција у молекулу. Могу се применити на молекуле који садрже свега неколико десетина атома. Због тога су ове методе знатно спорије, компјутерски захтевније али веће тачности у односу на емпиријски познате величине. Квантно-механичка израчунавања користе се код:

- Израчунавања енергија молекулских орбитала и њихових коефицијената
- Енталпије формирања специфичне конформације
- Добијања парцијалних атомских наелектрисања израчунатих из молекулско-орбиталних коефицијената
- Израчунавања електростатичких потенцијала
- Израчунавања фреквенција
- Израчунавања диполних момената
- Израчунавања геометрија прелазних стања и њихових енергија
- Израчунавања енергија раскидања веза

У новије време развијена је теорија функционалних густина као трећа велика класа квантно-механичких метода која је наведена израчунавања подигла на виши ниво а о којој ће бити више речи у *Експерименталном делу*.

Већина физичко-хемијских параметара од интереса у студијама заснованим на молекулском моделирању (равнотежне геометрије, геометрије прелазних стања, конформације, топлота реакције, енергија активације, вибрационе фреквенције...) директно следе из конструкције површине потенцијалне енергије тј. дијаграма зависности енергије у односу на реакционе координате (Слика 23). Релативне стабилности конформера молекула одређене су њиховим релативним положајем на површини потенцијалне енергије. Комбинацијом молекулско-механичких и квантно-механичких метода конструкција криве потенцијалне енергије је олакшана јер се недостаци једне методе могу једноставно надоместити применом друге и обрнуто.

Сваки конформер (или прелазно стање) током оптимизације поседује одређену енергију. Енергетски минимуми и максимуми на криви потенцијалне енергије се једним именом називају стационарне тачке. Енергетски минимуми на криви називају се локални минимуми и одговарају стабилним конформацијама. Неки енергетски минимуми могу бити сувише реактивни да би били изоловани и окарактерисани као стабилни те се стога називају интермедијерима. Онај енергетски минимум који поседује најнижу енергију назива се глобални минимум и представља биоактивну конформацију молекула.



Слика 23. Површина потенцијалне енергије

Све до сада наведене методе користе се приликом одређивања биоактивне конформације новог молекула. Како су данас махом познати механизми деловања молекула на рецепторском и ензимском нивоу, односно на ћелијском нивоу, развијене су компјутационе методе сагледавања тих интеракција. Ако су познате структуре мноштва молекула који у интеракцији са одређеним рецептором или ензимом показују биолошку активност, користи се техника виртуалног сортирања (енг. virtual screeneng) претраживањем постојећих база података у циљу нотирања функционалних група које су одговорне за биолошку активност и њихове имплементације у нове структуре. Интеракције новосинтетисаних молекула са познатом молекулском метом (рецептором или ензимом) могу се са великом дозом тачности предпоставити методом молекулског доковања без претходног кристалографског или NMR снимања комплекса лиганд-протеин. Уколико тродимензионална структура молекулске мете није позната, она се може формирати техником хомологог моделовања користећи структуру темплата из хомологе



серије протеина, и као таква користити у испитивању интеракција унутар лиганд-протеин комплекса.

### **1.5. Методе дескрипције утицаја фармакофора у молекулима кумарина на биолошку активност**

Све наведене технике користе се за дефинисање функционалних група које су носиоци биолошке активности неког молекула у његовој биоактивној конформацији. Иницијална рационализација молекула, односно успостављање корелације између присутне функционалне групе и биолошке активности успоставља се SAR (енг. structure-activity relationships) анализом [115]. Речју, SAR анализом се дефинише које функционалне групе унутар молекула доприносе активности а које не. Наведене функционалне групе или делови молекула који доприносе активности молекула називају се фармакофорама.

Анализом активности молекула SAR методом не може се објаснити понашање молекула у реалном систему, тј. пролазак кроз ћелијску мембрану, електронске и стерне интеракције са молекулском метом и сл., те су из тог разлога развијене математичке методе дескрипције утицаја физичко-хемијских параметара молекула на активност. Метода којом се оваква корелација постиже назива се квантитативна дескрипција зависности биолошке активности у односу на структуру (енг. quantitative structure-activity relationships, QSAR) а чијом се употребом успоставља корелација између биолошке активности и физичко-хемијских параметара молекула, односно молекулских дескриптора.

Модерна дефиниција молекулског дескриптора каже да је молекулски дескриптор финални резултат логичких и математичких процедура које трансформишу хемијску информацију приказани преко симболичке репрезентације молекула у корисни број или резултат неког стандардног експеримента [116]. То практично значи да вредност сваке физичко-хемијске особине молекула (растворљивост, вредности енергија, стерне и површине доступне растварачу...) директно произилази након молекулске оптимизације и проналажења биоактивне конформације истог.

Корелацијом биолошке активности са вредностима молекулских дескриптора различитим статистичким методама добија се QSAR једначина којом се описује активност молекула. Данас је развијено више QSAR метода [117]:

- 1D-QSAR метода којом се врши корелација активности са основним особинама молекула какве су растворљивост, киселост, рефрактивност, енергије и сл., а која се заснива на Hanch-овој једначини (1):

$$\log\left(\frac{1}{C}\right) = k_1 \pi + k_2 \sigma + k_3 E + k_4 \quad (1)$$

где су  $k$  константе регресионе анализе а  $\pi$ ,  $\sigma$  и  $E$  фактори липофилности, стерних и електронских интеракција, који се најчешће користе у методи,

- 2D-QSAR метода која успоставља корелацију између активности и фактора конективности молекула и која се заснива на Free-Wilson-овом приступу,
- 3D-QSAR метода којом се успоставља корелиција између активности и поља која описују не-ковалентне интеракције лиганда са рецептором или ензимом,
- 4D-QSAR метода која проширује 3D-QSAR методом конформацијом лиганда као значајном варијаблом,
- 5D-QSAR метода којом се успоставља корелација између активности и енергија израчунатих након везивања лиганда за рецептор 4D-QSAR методом,
- 6D-QSAR метода којом се укључују солватациони модели у 5D-QSAR.

QSAR једначине се успостављају из два разлога: да би се успоставила корелација између активности и структуре тестираних једињења и да би се на основу добијених једначина предвиделе биолошке активности нових хомолога и тако олакшао избор једињења у новој синтези.

Све наведене компјутационе методе имају значајну улогу у модерној медицинској хемији и биохемији те су коришћене и за потребе израде ове докторске дисертације приликом квантификације активности синтетисаних деривата 4-хидроксикумарина.

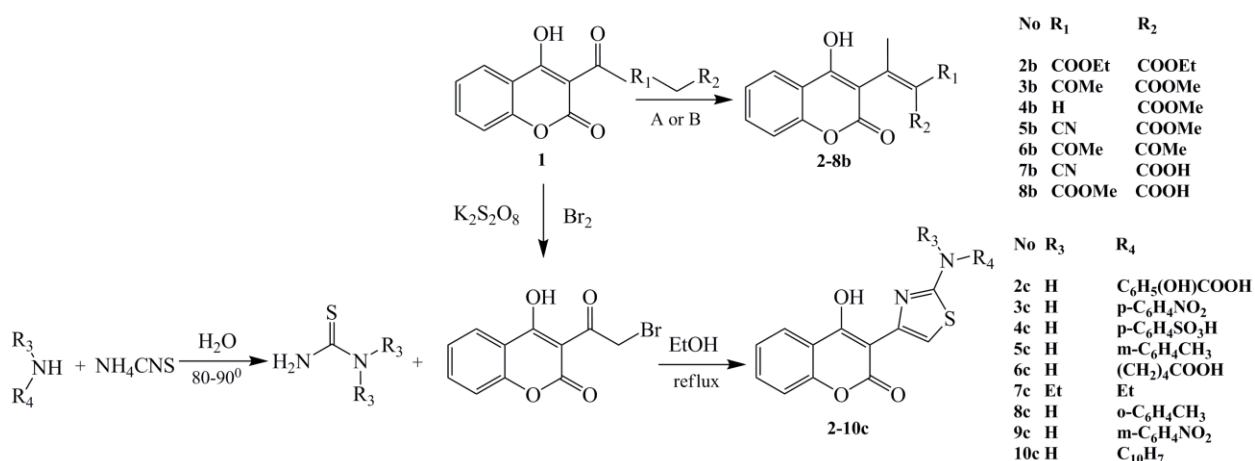
## ***2. ЕКСПЕРИМЕНТАЛНИ ДЕО***

---



## 2.1. Преглед синтетичких деривата 4-хидроксикумарина укључених у QSAR студије

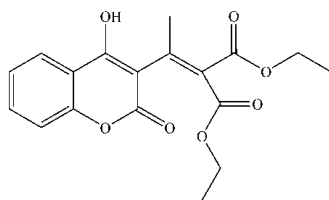
Кумарински деривати, укључени у испитивања антимикуробне, антиоксидативне и антикоагулативне активности и њихових QSAR студија, добивени су функционализацијом положаја С-3 полазног једињења 3-ацетил-4-хидрокси-2H-хромен-2-она **1**, хемијским путем (Схема 18) [118,119]. QSAR студије обухватају испитивање 17 деривата 4-хидроксикумарина означених као **2b-8b** и **2c-10c**, који у положају 3 садрже различите карбонилне, карбоксилне (**2-8b**) и тиазолинске (**2-10c**) фармакофоре. Испитивањем активности **17** синтетисаних деривата испуњен је битан услов да је за добијање статистички значајних QSAR једначина потребан минимум од 15 структурно различитих једињења.



**Схема 18.** Преглед хемијске синтезе и хемијске структуре деривата 4-хидроксикумарина коришћених у експерименталном делу

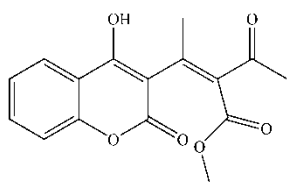
Поступци хемијске синтезе и идентификације хемијске структуре применом одговарајућих физичко-хемијских анализа (IR, <sup>1</sup>H NMR, MS) испитиваних деривата кумарина су приказани у литературним изворима [118, 119].

Спектрални подаци којима се потврђује структура испитиваних кумаринских деривата **2-8b** и **2-10c** као и номенклатура синтетисаних једињења наведени су у тексту који следи:



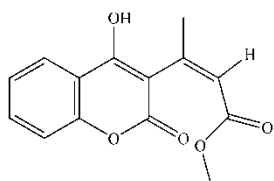
Диетил 2-(1-(4-хидрокси-2-оксо-2H-хромен-3-ил)етилиден) малонат (**2b**): принос: 96%; т.т. 224-226 °C; IR (KBr,  $\text{cm}^{-1}$ ):  $\nu_{\text{OH}}$  3434,  $\nu_{\text{CH}_3}$  и  $\nu_{\text{CH}_2}$  2949 and 2841,  $\nu_{\text{C=O}}$  1731 (лактон и естар),  $\nu_{\text{C=C}}_{\text{ар}}$ , 1611, 1546 и 1496,  $\nu_{\text{C-O-C}}$  1368 и 1032;  $^1\text{H-NMR}$  ( $\delta$  ppm):

1.23 (m, 6H,  $\text{CH}_3$ ), 4.21 (q, 4H,  $4\text{CH}_2$ ), 7.31-7.83 (m, 4H, H-5, H-6, H-7, H-8), 16.73 (bs, 1H, OH-4); MS: m/z (%): 346 ( $\text{M}^+$ ); Израчунато за  $\text{C}_{18}\text{H}_{18}\text{O}_7$  (М. м. 346.33) (%): C: 62.42, H: 5.24; нађено C: 62.44, H: 5.23.



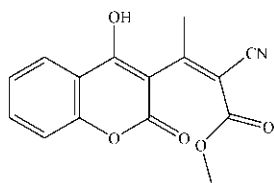
(Z)-метил 2-ацетил-3-(4-хидрокси-2-оксо-2H-хромен-3-ил) бут-2-еноат (**3b**): Принос: 97%; т.т. 237-239 °C; IR (KBr,  $\text{cm}^{-1}$ ):  $\nu_{\text{OH}}$  3433,  $\nu_{\text{CH}_3}$ , 2948, 2930, 2856,  $\nu_{\text{C=O}}$  1730 (лактон и естар),  $\nu_{\text{C=O}}$  1700,  $\nu_{\text{C=C}}_{\text{ар}}$  1610, 1545, 1495 1369,  $\nu_{\text{C-O-C}}$  1032 и 1024;  $^1\text{H-NMR}$  ( $\delta$  ppm):

2.20 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ ), 2.26 (s, 3H,  $\text{CO-CH}_3$ ), 3.81 (s, 3H,  $\text{COO-CH}_3$ ), 7.29-7.83 (m, 4H, H-5, H-6, H-7, H-8), 17.01 (bs, 1H, OH-4); MS: m/z (%): 302 ( $\text{M}^+$ ); Израчунато за  $\text{C}_{16}\text{H}_{14}\text{O}_6$  (М. м. 302.28) (%): C: 63.57, H: 4.67; нађено C: 63.55, H: 4.71.



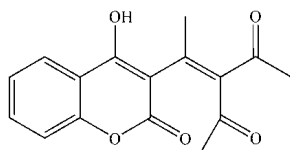
(Z)-метил 3-(4-хидрокси-2-оксо-2H-хромен-3-ил)бут-2-еноат (**4b**): Принос: 96%; т.т. 222-223 °C; IR (KBr,  $\text{cm}^{-1}$ ):  $\nu_{\text{OH}}$  3422,  $\nu_{\text{CH}_3}$  2949, 2930,  $\nu_{\text{C=O}}$  2841, 1729 (лактон и естар),  $\nu_{\text{C=C}}_{\text{ар}}$  1609, 1542, 1491,  $\nu_{\text{C-O-C}}$  1364, 1033, 1023;  $^1\text{H-NMR}$  ( $\delta$  ppm): 2.22 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ ), 3.86 (s, 3H,  $\text{COO-CH}_3$ ), 5.76 (s, 1H,  $\text{C=C-H}$ ), 7.29-7.82 (m, 4H, H-5, H-6, H-7, H-8), 17.11 (bs, 1H, OH-4);

MS: m/z (%): 260 ( $\text{M}^+$ ); Израчунато за  $\text{C}_{14}\text{H}_{12}\text{O}_5$  (М. м. 260.24) (%): C: 64.61, H: 4.65; нађено C: 64.63, H: 4.69.

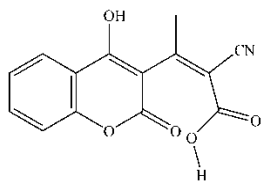


(Z)-метил 2-цијано-3-(4-хидрокси-2-оксо-2H-хромен-3-ил)бут-2-еноат (**5b**): Принос: 94%; т.т. 247-249 °C; IR (KBr,  $\text{cm}^{-1}$ ):  $\nu_{\text{OH}}$  3434,  $\nu_{\text{CH}_3}$  2949, 2929, 2854,  $\nu_{\text{C}\equiv\text{N}}$  2231,  $\nu_{\text{C=O}}$  1731 (лактон и естар),  $\nu_{\text{C=C}}_{\text{ар}}$  1611, 1546, 1497,  $\nu_{\text{C-O-C}}$  1368, 1032, 1025;  $^1\text{H-NMR}$  ( $\delta$  ppm):

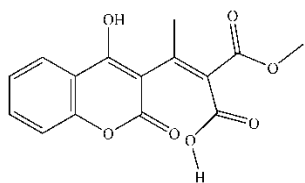
2.23 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ ), 3.80 (s, 3H,  $\text{COO-CH}_3$ ), 7.29-7.83 (m, 4H, H-5, H-6, H-7, H-8), 17.06 (bs, 1H, OH-4); MS: m/z (%): 285 ( $\text{M}^+$ ); Израчунато за  $\text{C}_{15}\text{H}_{11}\text{NO}_5$  (М. м. 285.06) (%): C: 63.16, H: 3.89, N: 4.91; нађено C: 63.18, H: 3.84, N: 4.95.



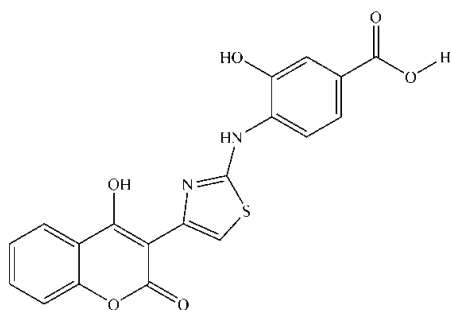
3-(1-(4-хидрокси-2-оксо-2H-хромен-3-ил)етилиден)пентан-2,4-дион (**6b**): Принос: 94%; т.т. 241-243 °C; IR (KBr,  $\text{cm}^{-1}$ ):  $\nu_{(\text{OH})}$  3434,  $\nu_{(\text{CH}_3)}$  2949, 2929,  $\nu_{(\text{C}=\text{O})}$  1731 (лактон),  $\nu_{(\text{C}=\text{O})}$  1697, 1686,  $\nu_{(\text{C}=\text{C})_{\text{ар}}}$  1610, 1544, 1496,  $\nu_{(\text{C}-\text{O}-\text{C})}$  1371, 1032;  $^1\text{H-NMR}$  ( $\delta$  ppm): 2.23 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ ), 2.29 (s, 3H,  $\text{CO}-\text{CH}_3$ ), 7.31-7.83 (m, 4H, H-5, H-6, H-7, H-8), 17.01 (bs, 1H, OH-4); MS: m/z (%): 286 ( $\text{M}^+$ ); Израчунато за  $\text{C}_{16}\text{H}_{14}\text{O}_5$  (М. м. 286.28) (%): C: 67.13, H: 4.93; нађено C: 67.15, H: 4.87.



(Z)-метил-2-цијано-3-(4-хидрокси-2-оксо-2H-хромен-3-ил)бут-2-енолна киселина (**7b**): Принос: 84%; т.т. 256-257 °C; IR (KBr,  $\text{cm}^{-1}$ ):  $\nu_{(\text{OH})}$  3433 (кумарин),  $\nu_{(\text{OH})}$  3100 ( $\text{COOH}$ ),  $\nu_{(\text{CH}_3)}$  2947, 2927,  $\nu_{(\text{C}=\text{O})}$  1731,  $\nu_{(\text{C}=\text{O})}$  1699 ( $\text{COOH}$ ),  $\nu_{(\text{C}=\text{C})_{\text{ар}}}$  1611, 1543, 1495,  $\nu_{(\text{C}-\text{O}-\text{C})}$  1371, 1032;  $^1\text{H-NMR}$  ( $\delta$  ppm): 2.24 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ ), 7.31-7.83 (m, 4H, H-5, H-6, H-7, H-8), 12.37 (bs, 1H,  $\text{COOH}$ ), 17.13 (bs, 1H, OH-4); MS: m/z (%): 271 ( $\text{M}^+$ ); Израчунато за  $\text{C}_{14}\text{H}_9\text{NO}_5$  (М. м. 271.22) (%): C: 62.00, H: 3.34, N: 5.16; нађено C: 62.05, H: 5.11, N: 5.21.

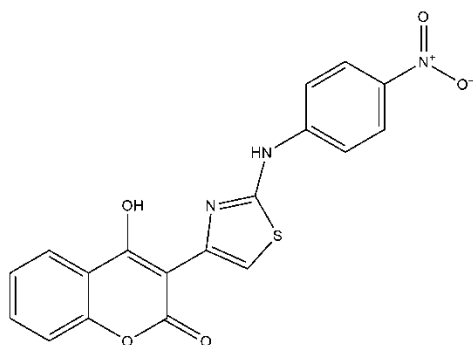


(Z)-2-ацетил-3-(4-хидрокси-2-оксо-2H-хромен-3-ил)бут-2-енолна киселина (**8b**): Принос: 87%; т.т. 229-231 °C; IR (KBr,  $\text{cm}^{-1}$ ):  $\nu_{(\text{OH})}$  3437 (кумарин),  $\nu_{(\text{OH})}$  3111 ( $\text{COOH}$ ),  $\nu_{(\text{CH}_3)}$  2991,  $\nu_{(\text{C}=\text{O})}$  1727 (лактон),  $\nu_{(\text{C}=\text{O})}$  1699, 1689 ( $\text{COOH}$  и кето група),  $\nu_{(\text{C}=\text{C})_{\text{ар}}}$  1601, 1541, 1491,  $\nu_{(\text{C}-\text{O}-\text{C})}$  1369, 1031;  $^1\text{H-NMR}$  ( $\delta$  ppm): 2.21 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ ), 2.28 (s, 3H,  $\text{CO}-\text{CH}_3$ ), 7.31-7.83 (m, 4H, H-5, H-6, H-7, H-8), 12.65 (bs, 1H,  $\text{COOH}$ ), 17.17 (bs, 1H, OH-4); MS: m/z (%): 288 ( $\text{M}^+$ ); Израчунато за  $\text{C}_{15}\text{H}_{12}\text{O}_6$  (М.м. 271.22) (%): C: 62.50, H: 4.20; нађено C: 62.55, H: 4.21.



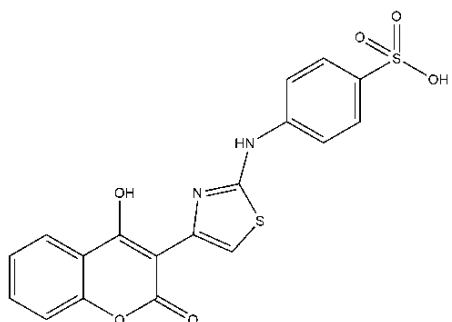
2-Хидрокси-4-[4-(4-хидрокси-2-оксо-2H-хромен-3-ил)-тиазол-2-иламино]-бензојева киселина (**2c**): Принос 79 %, т.т. 282-284 °C; IR (KBr);  $\nu_{\text{max}}$  ( $\text{cm}^{-1}$ ): 3413, 3295, 3184, 3028, 1637, 1599, 1525, 1506, 1468, 1450, 1390, 1304, 1259, 1228, 1179, 1152, 1141, 1073, 905, 775;  $^1\text{H-NMR}$  (200 MHz,  $\text{DMSO}-d_6$ );  $\delta$  (ppm), J (Hz): 6,21 (s, 1H, 3''-H), 6,23 (d, 1H, 5''-H,  $J_{5'',6''}=8,5$  Hz), 7,3 (m, 1H, 6-H), 7,4 (dd, 1H, 8-H,  $J_{8,7}=8,3$  Hz,  $J_{8,6}=1,1$  Hz), 7,6 (dd, 1H, 5-H,  $J_{5,6}=7,8$  Hz,  $J_{5,7}=1,7$  Hz), 7,7 (m, 1H, 7-H), 7,73 (d, 1H, 6''-H,  $J_{6'',5''}=8,5$  Hz), 7,83 (s, 1H, 5'-H), 10,1 (bs, 2''-OH), 12,11 (s, 1H, 2'-NH), 12,52 (широк синглет, 1H, OH из

COOH), 13,27 (широк синглет, 1H, 4-OH, брза измена са D<sub>2</sub>O); Израчунато за C<sub>19</sub>H<sub>12</sub>N<sub>2</sub>O<sub>6</sub>S (М. м. 396,37) (%): C: 57,57; H: 3,05; N: 7,07; нађено: C: 56,90; H: 3,01; N: 7,14.



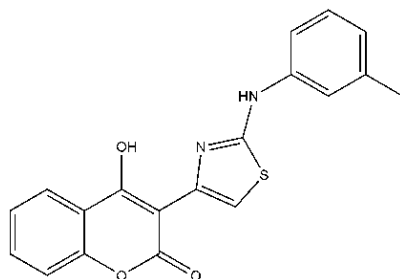
*4-Хидрокси-3-[2-(4-нитро-фениламино)-тиазол-4-ил]-хромен-2-он (3c):* Принос 82 %, т.т. 227-230 °C; IR (KBr);  $\nu_{\max}$  (cm<sup>-1</sup>): 3414, 3134, 1682, 1636, 1608, 1519, 1465, 1425, 1369, 1261, 1213, 1098, 783, 764; <sup>1</sup>H NMR (200 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>);  $\delta$  (ppm), J (Hz): 7,3 (m, 1H, 6-H), 7,35 (d, 2H, J<sub>3'',2''</sub>=J<sub>5,6</sub>=8.2 Hz, 3''-H, 5''-H), 7,4 (dd, 1H, 8-H, J<sub>8,7</sub>=8,3 Hz, J<sub>8,6</sub>=1,1 Hz), 7,6 (dd, 1H, 5-H, J<sub>5,6</sub>=7.8

Hz, J<sub>5,7</sub>=1,7 Hz), 7,7 (m, 1H, 7-H), 8,03 (d, 2H, J<sub>2'',3''</sub>=J<sub>6'',5''</sub>=8,2 Hz, 2''-H, 6''-H), 8,10 (s, 1H, 5'-H), 10,22 (s, 1H, 2'-NH), 13,25 (широк синглет, 1H, 4-OH, брза измена са D<sub>2</sub>O); Израчунато за C<sub>18</sub>H<sub>11</sub>N<sub>3</sub>O<sub>5</sub>S (М. м. 381,36) (%): C: 56,69; H: 2,91; N: 11,02; нађено: C: 57,05; H: 2,93; N: 10,95.



*4-[4-(4-Хидрокси-2-оксо-2H-хромен-3-ил)-тиазол-2-иламино]-бензенсулфонска киселина (4c):* Принос 72 %; т.т. 247-249 °C; IR (KBr);  $\nu_{\max}$  (cm<sup>-1</sup>): 3436, 3180, 3061, 2910, 1694, 1611, 1551, 1493, 1216, 1188, 1164, 1127, 1099, 1037, 1012, 820, 751; <sup>1</sup>H NMR (200 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>);  $\delta$  (ppm), J (Hz): 7,0 (d, 2H, 3''-H, 5''-H, J<sub>3'',2''</sub>=J<sub>5'',6''</sub>=9

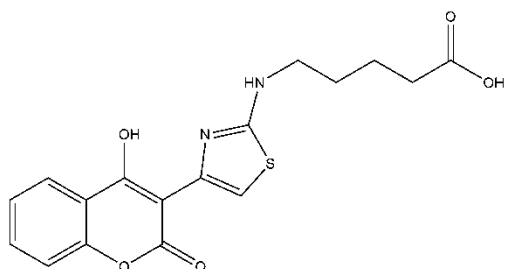
Hz), 7,3 (m, 1H, 6-H), 7,4 (dd, 1H, 8-H, J<sub>8,7</sub>=8,3 Hz, J<sub>8,6</sub>=1.1 Hz), 7,6 (dd, 1H, 5-H, J<sub>5,6</sub>=7,8 Hz, J<sub>5,7</sub>=1,7 Hz), 7,7 (m, 1H, 7-H), 7,78 (s, 1H, 5'-H), 8,03 (d, 2H, J<sub>2'',3''</sub>=J<sub>6'',5''</sub>=9 Hz, 2''-H, 6''-H), 10,31 (s, 1H, S-OH), 10,94 (s, 1H, 2'-NH), 13,24 (широк синглет, 1H, 4-OH, брза измена са D<sub>2</sub>O); Израчунато за C<sub>18</sub>H<sub>12</sub>N<sub>2</sub>O<sub>6</sub>S<sub>2</sub> (М. м. 416,43) (%): C: 51,92; H: 2,90; N: 6,73; нађено: C: 51,90; H: 2,87; N: 6,75.



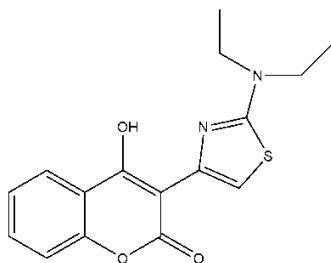
*4-Хидрокси-3-(2-т-толиламино-тиазол-4-ил)-хромен-2-он (5c):* Принос 84 %; т.т. 270-273 °C; IR (KBr);  $\nu_{\max}$  (cm<sup>-1</sup>): 3412, 3067, 2974, 2938, 1681, 1607, 1585, 1518, 1465, 1369, 1261, 1098, 967, 791, 755; <sup>1</sup>H NMR (200 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>);  $\delta$  (ppm), J (Hz): 2.20 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 6,6 (d, 1H, J<sub>6'',5''</sub>=7,5 Hz, 6''-



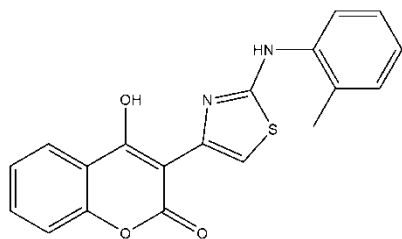
H), 7,2 (m, 1H, 5''-H), 7,3 (m, 1H, 6-H), 7,4 (dd, 1H, 8-H,  $J_{8,7}=8,3$  Hz,  $J_{8,6}=1,1$  Hz), 7,44 (d, 1H,  $J_{4'',5''}=8,5$  Hz, 4''-H), 7,5 (s, 1H, 2''-H), 7,6 (dd, 1H, 5-H,  $J_{5,6}=7,8$  Hz,  $J_{5,7}=1,7$  Hz), 7,7 (m, 1H, 7-H), 8,08 (s, 1H, 5'-H), 9,60 (s, 1H, 2'-NH), 15,30 (широк синглет, 1H, 4-OH, брза измена са D<sub>2</sub>O); Израчунато за C<sub>19</sub>H<sub>14</sub>N<sub>2</sub>O<sub>3</sub>S (M. m. 350,39) (%): C: 65,13; H: 4,03; N: 7,99; нађено: C: 65,10; H: 3,99; N: 8,03.



5-[4-(4-Хидрокси-2-оксо-2H-хромен-3-ил)-тиазол-2-иламино]-пентанска киселина (6c): Принос 71 %; т.т. 224-225 °C; IR (KBr);  $\nu_{\max}$  (cm<sup>-1</sup>): 3416, 3114, 3084, 2926, 2853, 1690, 1614, 1549, 1496, 1270, 1200, 1106, 1033, 1000, 890, 759; <sup>1</sup>H NMR (200 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>);  $\delta$  (ppm), J (Hz): 1,5-1,6 (m, 4H, 2''-H, 3''-H), 2,2 (t, 2H, J=7 Hz), 3,1 (t, 2H, J=7,1 Hz, 1''-H), 7,4 (dd, 1H, 8-H,  $J_{8,7}=8,3$  Hz,  $J_{8,6}=1,1$  Hz), 7,3 (m, 1H, 6-H), 7,6 (dd, 1H, 5-H,  $J_{5,6}=7,8$  Hz,  $J_{5,7}=1,7$  Hz), 7,7 (m, 1H, 7-H), 7,9 (s, 1H, 5'-H), 8,87 (s, 1H, 2'-NH), 9,26 (s, 1H, 5''-OH), 14,98 (s, 1H, 4-OH); Израчунато за C<sub>17</sub>H<sub>16</sub>N<sub>2</sub>O<sub>5</sub>S (M. m. 360,38) (%): C: 56,66; H: 4,47; N: 7,77; нађено: C: 57,01; H: 4,23; N: 7,58;

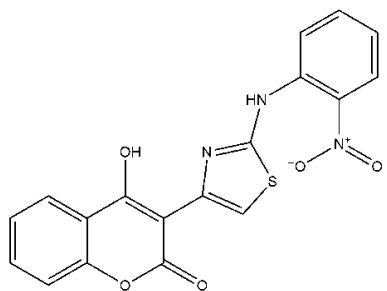


3-(2-Диетиламино-тиазол-4-ил)-4-хидрокси-хромен-2-он (7c): Принос 63 %; т.т. 245-247 °C; IR (KBr);  $\nu_{\max}$  (cm<sup>-1</sup>): 3413, 3067, 3054, 1693, 1621, 1578, 1544, 1413, 1348, 1274, 791, 754; <sup>1</sup>H NMR (200 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>);  $\delta$  (ppm), J (Hz): 1,04 (t, 6H, 2''-H, J=8,5 Hz), 3,11 (q, 4H, J=8,5 Hz, 1''-H), 7,3 (m, 1H, 6-H), 7,4 (dd, 1H, 8-H,  $J_{8,7}=8,3$  Hz,  $J_{8,6}=1,1$  Hz), 7,6 (dd, 1H, 5-H,  $J_{5,6}=7,8$  Hz,  $J_{5,7}=1,7$  Hz), 7,64 (s, 1H, 5'-H), 7,7 (m, 1H, 7-H), 14,89 (широк синглет, 1H, 4-OH, брза измена са D<sub>2</sub>O); Израчунато за C<sub>16</sub>H<sub>16</sub>N<sub>2</sub>O<sub>3</sub>S (M. m. 316,37) (%): C: 60,74; H: 5,10; N: 8,85; нађено %: C: 60,70; H: 5,15; N: 8,82.



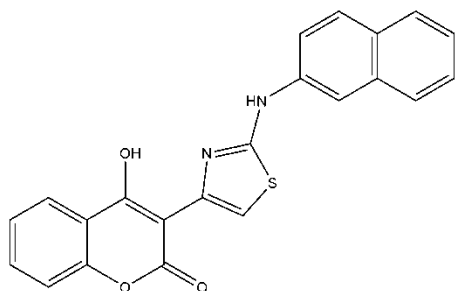
4-Хидрокси-3-(2-о-толиламино-тиазол-4-ил)-хромен-2-он (8c): Принос 54 %; т.т. 236-238 °C; IR (KBr);  $\nu_{\max}$  (cm<sup>-1</sup>): 3414, 3301, 3040, 2982, 1690, 1605, 1577, 1521, 1412, 1293, 1270, 1182, 1111, 1035, 949, 753, 738; <sup>1</sup>H NMR (200 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>);  $\delta$  (ppm), J (Hz): 2,10 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 6,4 (d, 1H,  $J_{3'',4''}=8$  Hz, 3''-H), 6,5 (m, 1H, 5''-H), 6,8 (d, 1H,  $J_{6,5}=7,5$  Hz), 6,83 (m, 1H, 4''-H), 7,3 (m, 1H, 6-

H), 7,4 (dd, 1H, 8-H,  $J_{8,7}=8,3$  Hz,  $J_{8,6}=1,1$  Hz), 7,6 (dd, 1H, 5-H,  $J_{5,6}=7,8$  Hz,  $J_{5,7}=1,7$  Hz), 7,7 (m, 1H, 7-H), 7,85 (s, 1H, 5'-H), 9,20 (s, 1H, 2'-NH), 14,80 (широк синглет, 1H, 4-OH, брза измена са D<sub>2</sub>O); Израчунато за C<sub>19</sub>H<sub>14</sub>N<sub>2</sub>O<sub>3</sub>S (М. м. 350,39) (%): C: 65,13; H: 4,03; N: 7,99; нађено: C: 65,09; H: 3,97; N: 8,05.



4-Хидрокси-3-[2-(3-нитро-фениламино)-тиазол-4-ил]-хромен-2-он (9c): Принос 67 %; т.т. >300°C; IR (KBr);  $\nu_{\max}$  (cm<sup>-1</sup>): 3415, 3279, 3083, 1675, 1615, 1552, 1527, 1492, 1413, 1353, 1269, 1157, 1118, 760; <sup>1</sup>H NMR (200 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>);  $\delta$  (ppm), J (Hz): 6,91 (d, 1H,  $J_{4'',5''}=8,5$  Hz, 4''-H), 7,2 (m, 1H, 5''-H), 7,3 (m, 1H, 6-H), 7,4 (dd, 1H, 8-H,  $J_{8,7}=8,3$  Hz,  $J_{8,6}=1,1$  Hz),

7,43 (s, 1H, 2''-H), 7,5 (d, 1H,  $J_{6'',5''}=8$  Hz, 6''-H), 7,6 (dd, 1H, 5-H,  $J_{5,6}=7,8$  Hz,  $J_{5,7}=1,7$  Hz), 7,7 (m, 1H, 7-H), 7,91 (s, 1H, 5'-H), 8,74 (s, 1H, 2'-NH), 14,15 (широк синглет, 1H, 4-OH, брза измена са D<sub>2</sub>O); Израчунато за C<sub>18</sub>H<sub>11</sub>N<sub>3</sub>O<sub>5</sub>S (М. м. 381,36) (%): C: 56,69; H: 2,91; N: 11,02; нађено %: C, 57,07; H, 2,85; N, 10,98.



4-Хидрокси-3-(2-(нафтален-1-иламино)тиазол-4-ил)-2H-хромен-2-он (10c): Принос 82 %; т.т. 278-280 °C; IR (KBr);  $\nu_{\max}$  (cm<sup>-1</sup>): 3413, 3287, 3054, 1693, 1621, 1578, 1544, 1413, 1348, 1274, 791, 754; <sup>1</sup>H NMR (200 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>);  $\delta$  (ppm), J (Hz): 6,5 (d, 1H,  $J_{2'',3''}=8,2$  Hz, 2''-H), 7,15 (m, 2H, 3''-H, 4''-H), 7,3 (m, 1H, 6-H), 7,4 (dd,

1H, 8-H,  $J_{8,7}=8,3$  Hz,  $J_{8,6}=1,1$  Hz), 7,45-7,52 (m, 2H, 6''-H, 7-H), 7,56 (m, 2H, 5''-H, 6''-H), 7,6 (dd, 1H, 5-H,  $J_{5,6}=7,8$  Hz,  $J_{5,7}=1,7$  Hz), 7,7 (m, 1H, 7-H), 7,87 (s, 1H, 5'-H), 8,57 (s, 1H, 2'-NH), 15,54 (широк синглет, 1H, 4-OH, брза измена са D<sub>2</sub>O); Израчунато за C<sub>22</sub>H<sub>14</sub>N<sub>2</sub>O<sub>3</sub>S (М. м. 386,42) (%): C: 68,38; H: 3,65; N: 7,25; нађено %: C: 68,29; H: 3,72; N: 7,29.

## 2.2. Припремни поступци за одређивање антимикуробне активности деривата 4-хидроксикумарина у *in vitro* условима

Експерименту одређивања антимикуробне активности претходи низ припремних поступака као што су стерилизација посуђа, припрема одређених хранљивих подлога, пресејавање култура на косом агару у циљу добијање култура одређене старости, као и

пресејавање култура на измењену подлогу додатком одређене концентрације испитиваног деривата кумарина. Наведени припремни поступци комплетно су урађени према предвиђеном протоколу публикованом од стране Националног комитета за клиничке лабораторијске стандарде САД (енг. National Committee for Clinical Laboratory Standards, NCCLS) [120]. Припремни поступци за чврсте подлоге, на којима се врши засејавање култура, и течне подлоге у којим се одређује антибиограм, приказани су у Прилогу 1.

### **2.2.1. Засејавање култура на косу чврсту подлогу**

Засејавање култура на хранљиве подлоге јесте процес преношења микроорганизама из њихове природне средине на хранљиву подлогу и врши се у циљу умножавања микроорганизама, њихове идентификације и испитивања осетљивости микроорганизама на антибиотике и хемиотерапеутике [121]. На припремљену косу хранљиву подлогу се засејавају одговарајуће културе. Засејавање се може извршити бактериолошком петљом или иглом а у посебним случајевима микропипетом, у зависности од врсте узорка. Основни предуслов јесте потпуна стерилност која се постиже у стерилној комори.

Радна површина се пре засејавања дезинфикује етанолом. Простор за пресејавање култура се претходно стерилише UV лампом у периоду од 24 сата. Додатна стерилност постиже се и пресејавањем култура близу пламена. Засејавање се врши бактериолошком езом која се сукцесивно стерилише у пламену до усијања и потапањем у раствор етанола пре и након засејавања.

Коси агар се засејава на површини косине. Прилоком уношења културе езом, најпре се дотакне капљица воде на дну косог агара која се кондензовала при хлађењу подлоге. Потом се извлачењем езе из епрувете по површини косине потезом у облику изувијане линије унета култура распореди по подлози.

Бактерије се инкубирају 24 часа на 37°C, док се гљиве развијају 72 сата на истој температури. Искоришћене старе културе се након пресејавања уништавају стерилизацијом.

### **2.2.2. Припремање суспензије (инокулума) спора одређене концентрације**

Густина инокулума је важан параметар при формирању антибиограма јер представља концентрацију културе на којој се тестира антибиотик. Препоручено је да она

износи  $1 \times 10^4$ - $1 \times 10^6$  CFU/mL за бактерије и  $1 \times 10^3$ - $1 \times 10^4$  CFU/mL за гљиве (енг. Colony forming unit, CFU). Већом густином се скраћује лаг фаза, односно фаза развића, док превише брз раст смањује зоне инхибиције [122].

Један од начина одређивања густине тест суспензије је коришћење нефелометрије или спектрофотометрије. Овом методом се густина инокулума одређује McFarland-овим стандардима. Припрема ових стандарда се врши мешањем одређене запремине 1% сумпорне киселине и 1,175% баријум хлорида да би се добио раствор баријум-сулфата специфичне оптичке густине. Најчешће коришћен McFarland-ов стандард је 0,5 McFarland (99,5 mL 1% сумпорне киселине и 0,5 mL баријум-хлорида) (Табела 1). По припреми се стандард разлије у тест епрувете и затвори. Епрувете се чувају у мраку на собној температури а стандард одговара турбидитету суспензије спора од  $1,5 \times 10^8$  CFU/mL [123]. На основу зависности турбидитета суспензије и концентрације спора, у експерименту се прави суспензија спора жељене концентрације.

**Табела 1.** Оптичка густина у функцији густине инокулума спора

Стандард	Густина инокулума x 10 <sup>6</sup> CFU/mL	Оптичка густина на 550 nm (E)
0,5	150	0,125
1	300	0,250
2	600	0,500
3	900	0,700
4	1200	1,000
5	1500	1,250

У епрувету у којој се налази пресејана култура одређене старости (24 часа старе културе бактерија и 72 сата старе културе гљива), додаје се стерилна дестилована вода. Трљањем међу длановима се, потом, култура раствара све док боја раствора не постане потпуно мутна. Тада се 1 mL концентроване суспензије одпипетира у чисту епрувету са металним затварачем и дода 5 mL стерилне дестиловане воде. Спектрофотометријски се мери оптичка густина на 550 nm, при чему се врши додавање стерилисане дестиловане воде или нативног раствора микроорганизама у циљу добијања  $A_{550 \text{ nm}} = 0,045$  за бактерије и  $A_{550 \text{ nm}} = 0,03$  за гљиве (Табела 1). Тиме се постиже да густина суспензије спора буде

$5,6 \times 10^6$  CFU/mL за бактерије и  $3 \times 10^4$  CFU/mL за гљиве. Припремљена суспензија спора чува се у фрижидеру до извођења експеримента.

### 2.3. Одређивање антимикробне активности деривата 4-хидроксикумарина макродилуционом методом у *in vitro* условима

У експеримент су укључене следеће културе: G+ бактерије: *Staphylococcus aureus* (ATCC 25925), *Staphylococcus aureus* (FSB 30), G- бактерије: *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Micrococcus lysodeikticus* (ATCC 4698) и гљива: *Candida albicans* (ATCC 10259).

Антимикробна активност [118] деривата 4-хидроксикумарина, са различито супституисаним карбонилним и карбоксилним фармакофорама у положају 3, је у овом раду први пут тестирана те се у старту експеримента пошло од различитих полазних концентрација испитиваних једињења. Тако је за полазни 3-ацетил-4-хидроксикумарин, **1**, за све стандардне сојеве микроорганизама полазна концентрација била 3000  $\mu\text{g/mL}$  у 96% етанолу, док је за *S. aureus* (FSB 30), као предпостављено резистентнију културу, почетна концентрација била 4000  $\mu\text{g/mL}$  у 96% етанолу. За остала једињења **2-8b**, полазне концентрације биле су 4000  $\mu\text{g/mL}$  у 96% етанолу. Полазна концентрација стандарда стрептомицина за бактерије, и кетоконазола за гљиву, била је 500  $\mu\text{g/mL}$ .

У десет епрувета се стерилном пипетом одмери се по 1 mL течне подлоге. У прву епрувету додаје се по 1 mL раствора тестираног супстрата, односно стандардног антибиотика одређене концентрације. Раствори подлоге и супстрата се мешају до хомогенизације. Потом се пипетом узима 1 mL добивеног раствора из прве епрувете и преноси у другу. Сукцесивним двоструким разблаживањем полазног раствора супстрата, добија се серија раствора тестираних једињења, односно стандардних једињења. Тако је за полазно једињење **1**, концентрација тест једињења у припремљеним растворима у опсегу 5,86-3000  $\mu\text{g/mL}$  за све стандардне сојеве микроорганизама, док је за *S. aureus* (FSB 30) концентрација у опсегу 7,8125-4000  $\mu\text{g/mL}$ . За остала једињења означена **2-8b**, концентрације је у опсегу 7,8125-4000  $\mu\text{g/mL}$ . Концентрација стандарда је у области 7,8125-500  $\mu\text{g/mL}$ . Затим се у све епрувете додаје по 0,1 mL припремљене суспензије спора чија је густина инокулума дефинисана 0,5 McFarland-овим стандардом ( $1 \times 10^6$  CFU/mL за бактерије и  $1 \times 10^4$  CFU/mL за гљиве). По истеку 24 сата развоја бактерија и 72

сата за гљиву, на температури од 38°C, вредности минималне инхибиторске концентрације уочавају се визуелно, након додавања ресазурина (0,02 mL 0,05% раствора) као индикатора, променом боје раствора из плаве у љубичасту (Схема 19). Минимална инхибиторна концентрација је концентрација последње епрувете у експерименту у којој није дошло до промене боје индикатора.

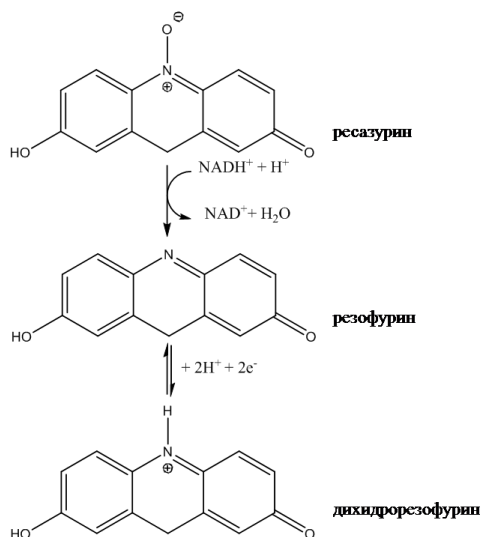


Схема 19. Редуција ресазурина у анаеробним условима

Контроле пробе припремају се додатком 0,1 mL суспензије спора, односно 96% етанола медијуму. Резултати антимикробне активности деривата означених **1-8b** приказани су у Табелама 3 и 4 у поглављу *Резултати и дискусија*. Антимикробна активност деривата **2-10c** коришћена је из литературног извора [119] и приказана је у Табели 4 поглавља *Резултати и дискусија*.

#### 2.4. Компјутационе методе одређивања вредности молекулских дескриптора и развоја QSAR студија антимикробне активности

Антимикробна активност кумаринских деривата испитивана је на бактеријама и гљивама док се QSAR студије базирају на резултатима антимикробне активности код бактерија *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* и гљиве *Candida albicans*.

За потребе QSAR студија извршене су карактеризације молекулске динамике, молекулске оптимизације и одређивања молекулских дескриптора.

### 2.4.1. Молекулска динамика

Иницијалне структуре свих кумаринских деривата нацртане су помоћу софтвера Spartan 2002 [124] за Windows оперативни систем. Почетне геометрије свих једињења су сачуване за даљу оптимизацију у PDB (Protein Data Bank) формату.

Структуре су имплементиране у софтвер MacroModel [125], који је део пакета за молекулску динамику Maestro. По извршавању енергетске минимизације почетне геометрије, односно лоцирања почетне најстабилније конформације молекула (енергетског минимума), извршена је оптимизација молекулско-механичким и квантно-механичким прорачунима [114].

Параметри атома и молекулских веза су подешени **OPLS2005** (енг. Optimized Potentials for Liquid Simulations) пољем сила [126] специјализованом за симулирање понашања молекула у течности, у циљу проналажења биоактивне конформације молекула у медијуму. Поља сила представљају једначине и скупове емпиријских параметара потребних за рачунање енергије из молекулске геометрије новог молекула.

Имплицитном солватацијом [127] (континуалном солватацијом) на бази генерализоване Born-ове једначине (енг. Generalized Born/surface area, GB/SA), дефинише се слободна енергија супстрат-растварач система и начин интеракције приступне површине растварача као непрекидног медијума (енг. Accesible Surface Area, ASA) са супстратом. Како су супстрати коришћени у експерименту растворни у етанолу и диметил сулфоксиду, начињења је апроксимација постављања молекула у вакуму, јер MacroModel не садржи поља сила поменутих растварача.

Даљине не-везивних van der Waals-ових интеракција, односно интеракција молекула који нису међусобом повезани ковалентном везом, су констатоване до растојања од 8 Å, док су електростатичке интеракције мерене до домета од 20 Å.

Све слободне, ротабилне, везе су постављене као оне код којих је торзиона ротација могућа.

Температура система је постављена на 310 K, симулирајући температуру инкубације микроорганизама након аплицирања супстрата.

Систематско конформационално претраживање сваког молекула је извршено у 500 корака Monte Carlo конформационом анализом [128], уз 100 корака по ротабилној вези, до

разлика у енергији конформације од 0,001 кЈ/mol. Monte Carlo метода симулира операције загревања и хлађења молекула да би генерисала конформације молекула. Алгоритам насумице ротира слободне везе док се ригидне везе у прстеновима сакупљају и издужују све док се не достигне геометрија са минимумом енергије. Иницијално, молекул се посматра као систем на високој температури и поседује значајну количину енергије те довољно је флексибилан да се креће у интервалу конформација са најнижом и највишом енергијом. Што се више конформера истражује, температура система опада, чинећи да је молекул све мање склон кретању ван конформације најниже енергије, те тако све више заузима конформацију другог молекула са нижом енергијом од сопствене.

Као биолошки активне конформације су узете све оне са енергијом до  $\Delta E=10$  кЈ/mol већом од енергије најстабилније конформације [129].

Након конформационог претраживања, све активне конформације се стављају у тзв. јато сличних конформација, односно кластер (енг. clustering) где се упоређује енергија најповољније конформације са енергијом најповољније конформације из кластера. Ако је вредност енергије истоветна, та конформација се потврђује као структура локалног минимума.

Све добијене структуре локалног минимума су сачуване у PDB формату као припремљене за семи-емпиријске и DFT оптимизације.

#### 2.4.2. Молекулска оптимизација

Изабране геометрије молекула **1–10c** су потом подвргнуте семи-емпиријској PM6 (енг. parametric method 6) и оптимизацији по теорији функционалних густина (енг. Density functional theory, DFT) насталом еволуцијом из *ab initio* прорачуна, у циљу потврде локалних минимума структура и дефинисању молекулских дескриптора.

Семи-емпиријска израчунавања извршена су помоћу софтвера MOPAC2009 [130] (енг. Molecular Orbital Package) имплементираног у софтверски пакет Vega ZZ верзије 2.4.0. [131] за Win32 платформе. Параметри оптимизације у MOPAC2009 се задају кључним речима, односно командама за извршење алгорита оптимизације.

Кључне речи за оптимизацију једињења **1-8b** семи-емпиријском методом:



*PM6 CHARGE=0.00 PRECISE GEO-OK AUX(0) EF GNORM=0.01 EPS=24.3 LET  
DDMIN=0.01*

Кључне речи за оптимизацију једињења **2-10c** семи-емпиријском методом:

*PM6 CHARGE=0.00 PRECISE GEO-OK AUX(0) EF GNORM=0.01 EPS=48  
LETDDMIN=0.01*

Кључном речју *PM6* [132] се врши оптимизација структуре до минимума енергије *parametric method 6* нивоом семи-емпиријске теорије. *PM6* представља математичку параметризацију *s*, *p* и *d* атомских орбитала.

Синтагма *CHARGE=0.00* значи да је укупно наелектрисање система неутрално.

Кључна реч *PRECISE* означава поступак у коме се сваки корак спуштања енергије система изводи 100 пута у циљу веће тачности прорачуна.

Командом *GEO-OK AUX(0)* се сваки конформер са сувише високом енталпијом формирања и градијентом конвергенције одбацује те се оптимизација наставља ка нижим енергијама уз константно спуштање вредности енталпије формирања.

Команда *EF* [133] (енг. Eigenvector following) представља стандардну рутину оптимизације у МОРАС за системе који имају мање од 2 000 атома.

Рутина *GNORM=0.01* (енг. Gradient norm) представља процедуру поступног нормирања енергије система, којом се захтева да сваку наредни конформер има за 0,01 kcal/mol/Å мању енергију од претходног.

Кључном речју *EPS* се подешавају диелектричне константе растварача. Тако је  $\epsilon=24,3$  диелектрична константа етанола која се користи за симулирање претраживања конформације деривата **1-8b** у растварачу коришћеном у експерименту, док је  $\epsilon=48$  диелектрична константа DMSO у којем су растворни деривати **2-10c**.

Команда *LETDDMIN=0.01* јесте крајњи критеријум завршетка оптимизације којим се превазилази немогућност семи-емпиријским метода да изврше уравнотежење сила унутар молекула, чија вредност мора бити једнака нули или одговарајућој врло блиској вредности. У тражењу структуре минимума обично је пожељно да енергија опада у свакој итерацији ако су вредности константе сила неутралне. Код неких врло крутих система (кумарински деривати) где је уравнотежење сила отежано, обично се узима мала апроксимација енергије *LETDDMIN=0.01* (енг. *LET* „нека буде”). Управо је неадекватно

рачунање сила унутар молекула један од недостатака семи-емпиријских израчунавања који се, ипак, веома лако превазилази квантно-механичким прорачунима.

DFT прорачуни су извршени комерцијалним софтвером CS Gaussian 03 [134] да би се ниво нормирања енергије спустио на вредност  $10^{-6}$ , израчунале силе, фреквенције и енергије унутар молекула и добиле вредности парцијалних атомских наелектрисања молекула у растварачу.

DFT [135] метода представља трећу класу електронских структурних метода. Метода је атрактивна јер укључује ефекте електронске корелације унутар молекула и користи чињеницу да електрони међусобно реагују док се крећу и покушавају да се „склоне један другом с пута”. Речју, оптимизација молекула је постављена тако да се тражи највеће могуће растојање једног атома од другог да би се што више смањила колизија међу електронима.

Кључне речи за оптимизацију једињења **1-8b** DFT методом:

# OPT FREQ B3LYP/6-31(D) SCRF=(SOLVENT=ETHANOL) TEST

Кључне речи за оптимизацију једињења **2-10c** DFT методом:

# OPT FREQ B3LYP/6-31(D) SCRF=(SOLVENT=DMSO) TEST

Кључна реч *OPT* представља команду којом се захтева оптимизација геометрије молекула до проналажења глобалног минимума.

Реч *FREQ* представља команду за рачунање фреквенција система. У реалном систему, језгра у молекулу су у перманентном покрету [136]. У стању равнотеже, вибрације које настају услед кретања су стварне и предвидиве, те се молекули могу идентификовати на основу својих карактеристичних спектра. Рачунањем фреквенција предвиђају се IR спектри, рачунају се константе силе унутар молекула, идентификује се природа стационарне тачке на крају оптимизације, рачунају се термалне карактеристике једињења.

DFT метода бира се из софтвера Gausview 3.07, графичког корисничког интерфејса софтвера Gaussian 03, преко B3LYP [137] (енг. Becke, three-parameter, Lee-Yang-Parr) апроксимације Schrödinger-ове таласне једначине. B3LYP је хибридна функционална

апроксимација, односно поједностављено математичко решавање временски зависне таласне једначине за оптимизовано једињење у сегментима атомизационих енергија, дужина веза и фреквенција.

Изабрани базни сет, односно математички начин сагледавања атомских и молекулских орбитала био је *split-valence double-zeta 6-31G(d)* [138].

Кључним речима *SCRF=(SOLVENT=ETHANOL/DMSO)* бира се начин солватације и жељени растварач.

Кључном речју *TEST* бирамо да се наш прорачун не шаље Gaussian бази података.

Након завршене оптимизације, конструкцијом криве површине потенцијалне енергије, утврђено је да све структуре локалних минимума поседују најнижу енергију, односно да представљају глобалне минимуме.

### 2.4.3. Молекулски дескриптори

Како је QSAR антимикуробне активности базиран на класичној Hansch–овој теорији утицаја физичко-хемијских параметара на активност молекула, у разматрање је узет стандарни сет термодинамичких **logP**, **MR**, **lipole**; електронских **HOMO**, **LUMO**, **парцијална атомска наелектрисања**; и стерних **CAA**, **CMA**, **CSEV**, **ovality** молекулских дескриптора. Све вредности молекулских дескриптора добије су из Vega ZZ и Gaussian 03 излазних фајлова.

Партициони коефицијент, **logP** [139], представља мерило хидрофобности молекула и дефинише његово понашање између хидрофилне и липофилне фазе, тј. пролаза кроз мембрану у ћелију и обрнуто. Дескриптор је важан јер молекулско препознавање снажно зависи од хидрофобних интеракција лиганда и рецептора. Негативне вредности **logP** указују на то да је лиганд хидрофилан, док позитивне указују да је хидрофобан.

Молекулска рефрактивност, **MR** [139], је мера запремине молекула, а конкретно се односи на способност поларизације лиганда. Коефицијент у QSAR једначини испред **MR** је често врло тежак за тумачење, мада се узима да његова негативна вредност значи да лиганд има стерних сметњи у интеракцији са рецептором, док позитивна вредност индицира добру диполну оријентацију лиганда и олакшану интеракцију.

Дескриптор **lipole** је мера липофилне дистрибуције унутар молекула [140].

Енергија **НОМО** [141] (енг. highest occupied molecular orbital) орбитале представља највиши енергетски ниво у лиганду попуњен електронима. Аналогно **LUMO** [141] (енг. lowest unoccupied molecular orbital) енергија је најнижи енергетски ниво лиганда који не садржи електроне. Обе енергетске вредности су мерило електронских интеракција лиганда са рецептором. У стабилним молекулима, енергија електронима окупираних орбитале има негативне вредности и обрнуто, те су они лиганди који имају високе енергије **НОМО** блиске 0 eV јаки нуклеофили и предају своје електроне **LUMO** орбитали рецептора, као што су и лиганди са ниском **LUMO** енергијом јаки електрофили и лако примају електроне са рецептора.

Концепт примене **парцијалних атомских наелектрисања** [142] се своди на корелацију вредности наелектрисања одређене фармакофоре са вредношћу измерене биолошке активности лиганда. Што је вредност константе линеарне регресије  $r$  већа, то се тврди да разматрана фармакофора има већи удео у активности.

Конолијева приступна област (енг. Connolly accessible area, **CAA**) [143] представља површину молекула расположиву за интеракцију са растварачем, односно тачку преклапања сферне површине коју формира растварач око лиганда и van der Waals-ове површине атома лиганда. Конолијева молекулска област (енг. Connolly molecular area, **CMA**) [143] представља контактну површину која настаје када сферна површина растварача први пут пређе преко молекула. Што су ове вредности веће, лакша је интеракција лиганда са растварачем. Конолијева запремина коју не додирује растварач (енг. Connolly Solvent-Excluded Volume, **CSEV**) [143] је запремина која настаје између површине лиганда и површине растварача те што је њена вредност мања, лиганд лакше интерагује са растварачем, односно повећава се његова активност.

Индекс овалности, **ovality** [140], представља мерило одступања облика лиганда од идеалне сфере. За сферу има вредност једнаку јединици а расте са повећањем одступања од сферног облика.

#### 2.4.4. QSAR студије антимикуробне активности

QSAR једначине добијене су статистичком методом линеарне регресионе анализе за више варијабли, односно вишеструке регресионе анализе [139] (енг. Multiple regression

analysis, MRA) која је и најчешће коришћена математичка метода при формирању 1D-QSAR једначина. Регресиона анализа је моћан математички алат за успостављање корелација између независних варијабли  $X$ , какви су молекулски дескриптори и зависне вредности  $Y$ , каква је биолошка активност. Метода се показала јако поуздана када се користе вредности 15–20 независних варијабли. При формирању једначина у овој дисертацији коришћен је линарни Нансх-ов приступ [139], чија формулација има следећи облик (2):

$$\text{Log } \frac{1}{c} = a\sigma + b\pi + ck \quad (2)$$

Математичка дефиниција вишеструке регресионе анализе представљена је једначином (3):

$$Y_i = b + aX_i + E_i \quad (3)$$

Оваквом формулацијом вишеструка регресиона анализа добија облик обичне једначине праве где вредност  $b$  представља одсечак на  $Y$  оси, док је  $a$  коефицијент нагиба праве. Да би се регресиона анализа извршила на тачан и адекватан начин, одређени постулати морају бити узети у обзир:

1. Независне варијабле, односно физичко-хемијски параметри, се мере без експерименталних грешака.
2. За било коју задату вредност  $X$ ,  $Y$  вредности су независне и понашају се по закону нормалне дистрибуције. Термин  $E_i$  се односи на грешку и у нормалној дистрибуцији има вредност једнаку нули.
3. Очекивана вредност  $Y$  за било који вредност  $X$  лежи на правој линији.
4. Вредност дисперзије око регресионе линије је константна. „Најбоља” права линија за модел црта се између добијених вредности тако да збир квадрата (енг. sum of squares, SS) вертикалних дистанци од вредносних тачака буде минималан (једначина 4). Вредност  $Y$  је добијена експериментом док је  $Y_{\text{израчунато}}$  (енг  $Y_{\text{calc}}$ ) вредност биолошке активности предвиђена регресионом анализом. Тада је збир квадрата представљен једначином:

$$SS = \sum(Y_{\text{измерено}} - Y_{\text{израчунато}})^2 \quad (4)$$

Експерименталне и израчунате вредности, као и грешке, представљају се на следећи начин (5-7):

$$Y_{\text{измерено}} = b + aX_i + E_i \quad (5)$$

$$Y_{\text{израчунато}} = b + aX_i + E_i \quad (6)$$

$$E_i = Y_{\text{измерено}} - aX_i - b \quad (7)$$

Даљим математичким модулацијама се из ових једначина добијају вредности  $a$  и  $b$ .

5. Степен поклапања добијене и израчунате вредности се дефинише коефицијентом корелације  $r$ . Што је вредност већа, регресија је поузданија, а вредности веће од 0,9 су значајне за QSAR једначине. Са друге стране, стандардна девијација показује одступања израчунатих вредности од средње вредности резултата и дефинише се једначином 8:

$$s = \sqrt{\frac{\sum \Delta^2}{n-k-1}} = \sqrt{\frac{SSQ}{n-k-1}} \quad (8)$$

То је апсолутна мера квалитета регресије и требала би да има вредност врло блиску нули. ФишEROVA вредност  $F$ , наредни важан статистички параметар, представља мерило статистичког значаја добијених једначина. Што је вредност већа, једначина је поузданија. Рачуна се на следећи начин (9):

$$F_{k_2-k_1, n-k_2} = \frac{(SS_1 - SS_2)}{SS_2} = \frac{(n-k-1)}{k_2 - k_1} \quad (9)$$

Сва статистичка израчунавања извршена су помоћу комерцијалног софтвера OriginPro8 [144]. У поступку је коришћена метода избацивања једне непоуздане варијабле (енг. leave-one-out), помоћу Student-овог  $t$  теста. Она варијабла која је у корелацији имала највишу  $t$  вредност, одбацивана је до нивоа добијања највеће  $F$  вредности. Такође су прорачуном добијени и  $Q^2$  као квадратна вредност предиктивне моћи регресионог коефицијента и  $s$ -PRESS као збир квадрата предиктивних остатака  $SS$ .

#### 2.4.5. Молекулско доковање

Молекулско доковање извршено је помоћу софтвера Autodock 4.2 [145] у специјализованом интерфејсу AutoDockTools (ATD) за Linux оперативни систем. Као одговарајући циљни ензим, молекулску мету, изабран је *N*-терминални крај Б субјединице ДНК *giraze* бактерије *E.coli*, тежине 24 kDa, у комплексу са инхибитором хлоробиоцином, преузет са Brookhaven Protein Data Bank (PDB ID код: 1KZN) [146]. Овај протеински хомолог био је захвалан за експерименте, како бактерија тако и гљиве, јер примарна структура ДНК *giraze* бактерија и гљива има висок степен идентичности, са истоветним активним центром. Као корак припреме протеина за доковање, уклоњени су молекули воде и инхибитора помоћу некомерцијалног софтвера USCF Chimera [147].

Димензије координатне мреже око активног центра ензима су постављене да буду наведене величине: 34 Å x 34 Å x 34 Å, са растојањем од 0,375 Å између сваке тачке координатне мреже. Координате активног центра ензима задате су следећим параметрима:  $x=17,507$ ;  $y=32,5$ ;  $z=38,164$ . Глобална оптимизација је започета са 200 насумице добијених координација лиганда са максимумом од  $1,0 \times 10^6$  енергетских евалуација.

Доковање је извршено помоћу Lamarckian-овог генетског алгорита [148] (енг. Genetic Algorithm, GA) у 100 корака са толеранцијом померања лиганда унутар активног центра од 0,5 Å. Lamarckian-ов генетски алгорита је базиран на биолошким законима генетике и еволуције. У компјутационој хемији и молекулском доковању, одређена конформација лиганда у протеину је дефинисана као скуп вредности које се описују translацијом, оријентацијом и конформацијом лиганда. Свака од ових варијабли у GA кореспондира са геном у протеину. Сама конформација лиганда одговара генотипу, док његове атомске координате одговарају фенотипу. Тако, свака конформациона промена лиганда унутар активног центра ензима, у циљу проналажења конформације са минимумом енергије и највећом константном инхибиције, кореспондира променама положаја гена унутар протеина у циљу добијања најбољег генетског материјала.

#### 2.5. Методе одређивање антиоксидативне активности испитиваних деривата 4-хидроксикумарина у *in vitro* условима

Код синтетичких деривата кумарина су испитивани укупан антиоксидативни капацитет, антиоксидативна активност DPPH методом, инхибиција липидне

пероксидације, одређивање способности неутрализације хидроксил радикала и одређивање хелатизационог капацитета.

### **2.5.1. Одређивање укупног антиоксидативног капацитета фосфомолибденском методом**

Укупни антиоксидативни капацитет је иницијални тест антиоксидативне активности испитиване врсте којим се потврђује или негира оксидоредукциона способност потенцијалног антиоксиданта. Одређује се фосфомолибденском методом по Prieto-у [149]. Метода се заснива на редукцији Мо(VI) до Мо(V) након додавања потенцијалног антиоксиданта и формирању фосфомолибденског комплекса тамно-зелене боје, у киселој средини.

**Поступак.** Припреми се серија раствора кумарина из серије **1-10c** и аскорбинске киселине (**Asc**) концентрације 1000  $\mu\text{g/mL}$  у метанолу. У серију од осам епрувета дода се по 1 mL раствора метанола након чега се у прву епрувету дода 1 mL полазног раствора тестираног супстрата, односно аскорбинске киселине, предходно наведене концентрације. Потом се, након мешања, пипетом узима 1 mL раствора из прве епрувете и преноси у другу. Надаље се сукцесивним двоструким разблаживањем добија серија раствора тестираних једињења, односно аскорбинске киселине, концентрације 3,901-500  $\mu\text{g/mL}$ .

Раствори тестираних кумаринских деривата (100  $\mu\text{L}$ ), односно аскорбинске киселине, различитих концентрација, одмере се у епрувете и комбинују са 1 mL раствора реагенса који садржи 0,6 М сумпорну киселину, 28 mM натријум фосфат и 4 mM аминијум молибдат. Након мешања, раствори се инкубирају на температури од 95°C, у току 90 минута и потом оставе да се охладе. Исти поступак се примењује и за бланко раствор, који уместо 100  $\mu\text{L}$  тестираног једињења садржи 100  $\mu\text{L}$  метанола. Апсорбанца добијених раствора, у односу на бланко пробу, мерена је на собној температури на спектрофотометру Perkin-Elmer Lambda 25 UV/Vis. Вредност апсорбанце је средња вредност три мерења.

Резултати укупног антиоксидативног капацитета се изражавају као број еквивалената аскорбинске киселине. Из једначине праве која се формира након мерења апсорбанце аскорбинске киселине као стандарда, добија се функционална зависност



концентрације аскорбинске киселине у односу на апсорбанцу. Једначина праве (10) има следећи облик:

$$Y_i = AX_i + B \quad (10)$$

где су:  $Y_i$  концентрације раствора аскорбинске киселине,  $A$  нагиб праве,  $X_i$  апсорбанце инкубираних раствора аскорбинске киселине,  $B$  одсечак праве на  $Y$  оси. Линеарна регресија за раствор аскорбинске киселине извршена је помоћу статистичког софтвера OriginPro 8. Када се измерене вредности апсорбанци испитиваних раствора унесу у једначину линеарне регресионе анализе, израчунава се антиоксидативни капацитет као број  $\mu\text{g}/\text{mL}$  еквивалената аскорбинске киселине. Високе експерименталне вредности антиоксидативне активности указују на висок антиоксидативни потенцијал испитиваног једињења.

Истовремено, резултати укупног антиоксидативног капацитета представљени су и као  $EC_{50}$  вредности, односно концентрације тестираног једињења које смањују полазну концентрацију слободне радикалске врсте за 50%. Укупни антиоксидативни капацитет кумаринских деривата израчунат је на основу формуле (11):

$$\text{TAC} (\%) = [(A_{\text{бланко раствор}} - A_{\text{узорак}}) / A_{\text{бланко раствор}}] \times 100 \quad (11)$$

Конструисана је зависност процента инхибиције у односу на концентрацију кумаринских деривата и унета у статистички софтвер OriginPro 8. За израчунавање  $TAC_{50}$  коришћен је нелинеарни алгоритам јер је зависност инхибиције у функцији концентрације сигмоидна крива (енг. Nonlinear Curve Fit Growth/Sigmoidal Dose-response function) Добијена једначина (12) има следећи облик:

$$Y = A1 + \frac{A2 - A1}{1 + 10^{(log X_0 - X)p}} \quad (12)$$

где су:  $Y$  су апсорбанце мерених раствора,  $X$  су концентрације тестираних деривата,  $X_0$ ,  $A1$ ,  $A2$  и  $p$  су статистички параметри. Решавањем једначине (12) по  $X$  добија се следећа једначина (13):

$$X = \log X_0 - \frac{\log\left(\frac{A_2 - A_1}{Y - A_1} - 1\right)}{p} \quad (13)$$

Када се у једначини (13) узме да је  $Y = 50$ , израчунавањем се добија вредност  $EC_{50}$ .

### 2.5.2. Одређивање антиоксидативне активности DPPH методом

Могућност неутрализације стабилног DPPH<sup>•</sup> радикала кумаринским дериватима испитивана је модификованом методом по Такао-у Watanabe-у, Yagi-у и Sakata-у [150]. Метода неутрализације DPPH<sup>•</sup> радикала се широко примењује при одређивању антиоксидативне активности на дугоживећим радикалима и представља стандардну методу утврђивања опште антиоксидативне активности испитиваног једињења

**Поступак.** Припреми се серија раствора кумаринских деривата из серије **1-10с**, стандарда аскорбинске киселине (**Asc**) и бутилованог хидрокситолуена (**BHT**) концентрације 1000 µg/mL у метанолу. Пре извођења експеримента припреми се свеж раствор 1,1-дифенил-2-пикрил-хидразида (DPPH) концентрације 80 µg/mL. Раствор радикала се до употребе чува у фрижидеру, у нормалном суду обавијеном алуминијумском фолијом.

У осам епрувета се одмери по 2 mL метанола. У прву епрувету се дода 2 mL полазног раствора тестираног супстрата, односно стандарда, аскорбинске киселине и бутилованог хидрокситолуена. Потом се пипетом из прве епрувете узима 2 mL измешаног раствора и пребаци у другу епрувету. Даљим сукцесивним разблажењем припремају се серије раствора концентрације 3,901-500 µg/mL. У сваки од разблажених раствора дода се по 2 mL раствора DPPH а после 30 минута и 60 минута мери умањење апсорбанце раствора на таласној дужини од 517 nm, у односу на бланко пробу. Процент инхибиције се израчунава по формули (11):

$$IC (\%) = [(A_{\text{бланко раствор}} - A_{\text{узорак}}) / A_{\text{бланко раствор}}] \times 100.$$

Вредности  $IC_{50}$  се рачунају по формули (13).

### 2.5.3. Одређивање инхибиције липидне пероксидације амонијум-тиоцијанатном методом

Метода се заснива на иницирању аутооксидације липида на повишеној температури [151].

**Поступак.** Припрема се серија раствора кумаринских деривата из серије **1-10с**, стандарда аскорбинске киселине (**Asc**) и бутил хидроксилтолуена (**BHT**) концентрације 1000 µg/mL у метанола. Емулзија линолеинске киселине се припрема мешањем 0,2804 g линолеинске киселине, 0,2804 g емулзионог средства Tween 20 и 50 mL фосфатног пуфера концентрације 0,2 M до pH=7. Хомогенизација се изводи интензивним мешањем раствора. Нормални суд са припремљеном емулзијом линолеинске киселине се обложи алуминијумском фолијом и остави у фрижидеру.

У серију од осам епрувета одмери се по 0,5 mL метанола. У прву епрувету се дода 0,5 mL полазног раствора тестираног супстрата, односно стандарда аскорбинске киселине и бутилованог хидрокситолуена. Потом се пипетом из прве епрувете узима 0,5 mL измешаног раствора и пребацује у другу епрувету. Даљим сукцесивним разблажењем се припремају серије свих раствора концентрације 3,901-500 µg/mL. По разблажењу се у растворе кумарина и стандарда додаје емулзија линолеинске киселине (2,5 mL, 0,02 M, pH=7) и фосфатни пуфер (2,5 mL, 0,2 M и pH=7). Након мешања, раствори се инкубирају у мраку, на температури од 37°C да би се убрзао процес пероксидације.

Током процеса инкубације, у различитим временским интервалима (након 24 h, 48 h, 72 h и 96 h) узимају се аликвоти раствора од 100 µL и степен аутооксидације се одређује додавањем 4,7 mL 75% раствора етанола, 100 µL 30% раствора амонијум тиоцијаната и 100 µL 0,02 M раствора фери хлорида у 3,5 % раствору хлороводоничне киселине. После три минута, мерењем апсорбанце раствора на 500 nm одређује се степен инхибиције пероксидације линолеинске киселине. Као тест раствор у контролној проби узима се етанол. Процент инхибиције се израчунава по формули (11):

$$I (\%) = [(A_{\text{контролна проба}} - A_{\text{узорок}}) / A_{\text{контролна проба}}] \times 100.$$

Вредности  $I_{50}$  се рачунају по формули (13).

#### 2.5.4. Одређивање способности неутрализације хидроксил радикала

Способност кумаринских деривата као супстрата погодних за неутрализацију хидроксил радикала насталих у Фентоновој реакцији [152] одређена је по методи Halliwell–а, Gutteridge–а и Auroma-а [153].

**Поступак.** Припреми се серија раствора кумаринских деривата из серије **1–10с**, стандарда аскорбинске киселине (**Asc**) и бутил хидроксилтолуена (**BHT**) концентрације 1000 µg/mL у метанолу.

У серију од осам епрувета одмери се по 1 mL метанола. У прву епрувету се потом дода 1 mL полазног раствора тестираног супстрата, односно аскорбинске киселине и бутилованог хидрокситолуена. Потом се пипетом из прве епрувете узима 1 mL измешаног раствора и пребацује у другу епрувету. Даљим сукцесивним разблажењем се припремају серије свих раствора концентрације 3,901-500 µg/mL.

У 100 µL тестираног узорка дода се 500 µL 5,6 mM раствора 2-деоксирибозе растворене у  $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{NaOH}$  пуферу (50 mM, pH=7,4). Потом се дода и 200 µL смеше 100 µM  $\text{FeCl}_3$  и 104 µM EDTA (1:1 v/v), и 100 µL 104 µM раствора  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Целокупни садржај епрувете се пажљиво хомогенизује и инкубира на 50°C у току од 30 минута, уз повремено мешање. Након тога се смеси додаје 1 mL 2,8% раствора трихлорсирћетне киселине (ТСА) и 1 mL 1% раствора тиобарбитурне киселине (ТВА). Реакциона смеша се поново инкубира на 50°C, у току од 30 минута. Степен оксидације деоксирибозе се одређује мерењем апсорбанце узорака на 532 nm (у односу на дестиловану воду као стандард). Процент инхибиције се рачуна према једначини (11):

$$\text{OH} (\%) = [(A_{\text{бланко раствор}} - A_{\text{узорак}}) / A_{\text{бланко раствор}}] \times 100.$$

Вредности  $\text{OH}_{50}$  се рачунају по формули (13).

#### 2.5.5. Одређивање хелатизационог капацитета

Одређивање способности кумаринских деривата да врше инхибицију стварања комплекса  $\text{Fe}^{2+}$ -ферозин вршено је методом по Carter-у [154].

**Поступак.** Припреми се серија раствора кумаринских деривата из серије **1–10с**, стандарда аскорбинске киселине (**Asc**) и бутил хидроксилтолуена (**BHT**) концентрације 1000 µg/mL у метанолу.

У 1 mL испитиваног узорка додаје се 1 mL 0,125 mM раствора FeSO<sub>4</sub> и 1 mL 0,3125 mM раствора ферозина. Смеша се остави да одстоји 10 мин након чега се врши мерење апсорбанце узорка на 562 nm (у односу на метанол као бланко пробу, тј. стандард). Способност испитиваних деривата кумарина да у наведеним експерименталним условима хелатизују феро јон рачуна се према једначини (11):

$$CE (\%) = [(A_{\text{бланко раствор}} - A_{\text{узорак}}) / A_{\text{бланко раствор}}] \times 100.$$

Вредности CE<sub>50</sub> се рачунају по формули (13).

## **2.6. Компјутационе методе одређивања вредности молекулских дескриптора и развоја QSAR студија антиоксидативне активности**

За потребе QSAR студија антиоксидативне активности испитиваних кумаринских деривата извршене су карактеризације молекулске динамике, молекулске оптимизације и одређивања молекулских дескриптора.

### **2.6.1. Молекулска динамика**

Иницијалне структуре су нацртане помоћу софтвера Spartan сачуване за даљу оптимизацију у PDB формату.

Структуре су потом имплементиране у интерфејс софтвера VegaZZ којим је извршена енергетска минимизација почетне геометрије помоћу AMMP (енг. Another Molecular Mechanics Package) програма [155]. Параметри атома и молекулских веза су подешени **OPLS2005** пољем сила. Свим молекулима су додељена Gaisteiger-ова наелектрисања.

Даљине не-везивних van der Waals интеракција су констатоване до растојања од 8 Å, док су електростатичке интеракције мерене до домета од 20 Å.

Све слободне, ротабилне, везе су постављене као оне код којих је торзиона ротација могућа.

Систематско конформационо претраживање сваког молекула је извршено Boltzman-овом методом у 1000 корака. По методи, број торзија које могу да се истражују у везама које могу слободно да ротирају је неограничен. Почетна конформација подлеже термалним претурбацијама у којима се одабране торзије насумице ротирају. Овакве насумичне претурбације се одвијају све док се не постигне тражена девијација торзионог угла. Вредност стандардне девијације (енг. Root mean square deviation, RMSD) је експериментом подешена на 60°. Када се овај услов постигне извршава се спуштање енергије конформера до 0,01 kJ/mol у 3000 корака. Температура је подешена на 375,15 К. Диелектрична константа је подешена на 33,6 тако да симулира растворљивост кумаринских деривата у метанолу.

Као биолошки активне конформације су узете све оне конформације са енергијом до  $\Delta E=10$  kJ/mol већом, од енергије најстабилније конформације.

Све добијене структуре локалног минимума су сачуване у PDB формату као припремљене за семи-емпиријске и кванто-менахичке оптимизације

## 2.6.2. Молекулска оптимизација

Изабране геометрије молекула **1-10c** су потом подвргнуте семи-емпиријској PM6 и DFT оптимизацији у циљу потврде локалних минимума структура и дефинисању молекулских дескриптора.

Семи-емпиријска израчунавања извршена су помоћу софтвера MOPAC2009.

Кључне речи за оптимизацију једињења **1-10c** семи-емпиријском методом су:

*PM6 CHARGE=0.00 ISCF PRECISE GEO-OK AUX(0) EF GNORM=0.01 NSPA=92  
EPS=24.3 LET DDMIN=0.01*

Поред кључних речи које су детаљно описане у секцији **2.4.2.**, за оптимизацију кумаринских деривата, коришћена је и рутина *ISCF* (енг. self-consisted field method) којом се сваки атом ставља у интеракцију са електричним пољем које стварају остали атоми. Методом се стопа конформационо прилагођавање молекула након достизања енергетски најповољније структуре, постигнуте у међусобној интеракцији атома у молекулу.

Командом  $NSPA=92$  се сваки атом у молекулу исцртава као идеална сфера помоћу одређеног броја геометријских сегмента, 92 тачке које су испреплетане линијама. Тако се атому омогућава што боље пријањање растварача испитиваном молекулу у континуалном COSMO (енг. COnductor-like-Screening MOdel) солватационом моделу [156] који се постиже „бесконечно растварање” молекула у растварачу.

DFT прорачуни су извршени комерцијалним софтвером CS Gaussian 03. Примарни циљ оптимизације био је добијање енергетске структуре глобалног минимума за сваки молекул. Секундарни циљ оптимизације био је израчунавање енталпије раскидања 4-ОН везе кумаринских деривата и локализација молекулских орбитала погодних за апстракцију слобоних радикала.

Антиоксидант предаје свој протон слободном радикалу по следећој шеми (14):



где је  $R_1OO\cdot$  било која слободна радикалска врста (овде је за пример узет пероксидни радикал) а  $ROH$  антиоксидант. Да би неко алифатично или ароматично једињење показивало антиоксидативни капацитет, неопходно је да поседује бар једну слободну хидроксилну групу. Поред експерименталних мерења, корисно је познавати и енталпију раскидања О-Н везе унутар антиоксиданта, како би се његов потенцијал што боље описао.

Енталпија раскидања везе (енг. Bond dissociation enthalpy, BDE) је параметар којим се одређује лакоћа отпуштања једног протона према радикалу. Антиоксидант је утолико јачи уколико лакше подлеже кето-енолној таутомерији, односно лакше препушта свој протон слободном радикалу [157]. Тако, што је BDE мања, антиоксидант је јачи. Након израчунавања BDE могуће је утврдити која је то хидроксилна група (ако антиоксидант поседује више од једне) одговорна за антиоксидативну активност. Енталпија раскидања везе рачуна се према формули (15):

$$BDE_S = H_{KOH} - H_{KO\cdot} - H_H\cdot \quad (15)$$

где је:  $H_{KOH}$  енталпија формирања основног кумаринског молекула,  $H_{KO\cdot}$  је енталпија формирања кумаринског радикала који се ствара након апстракције водоничног радикала

од стране слободног радикала и  $H_N$  је енталпија водоничног радикала. На основу формуле (14), неопходно је извршити три оптимизације по једињењу: оптимизовати основни молекула кумарина, кумарински радикал и водонични радикал.

Кључне речи за DFT оптимизацију једињења **1-10c** као основних молекула је:

```
# OPT FREQ (RO)B3LYP/6-31(D) SCRF=(CPCM.SOLVENT=METHANOL) POP=(NBO, SAVENBO) TEST
```

Кључне речи за DFT оптимизацију једињења из серије **1-10c** као радикала је:

```
# OPT FREQ (U)B3LYP/6-31(D) SCRF=(CPCM.SOLVENT=METHANOL) TEST
```

Кључне речи за DFT оптимизацију једињења водоничног радикала је:

```
# OPT FREQ (U)B3LYP/6-31(D) SCRF=(CPCM.SOLVENT=METHANOL) TEST
```

Неке од коришћених кључних речи детаљно су описане у секцији **2.4.2**. Основни молекули кумарина оптимизовани су *RO* (енг. restricted open shell) рутином. Сама команда *restricted* (енг. *ограничен*) значи да се молекула посматра као систем у коме нема неспарених електрона. Супротно томе, радикалски молекули и атом водоника, који садрже по један неспарени електрон, оптимизовани су рутином *U* (енг. unrestricted open shell).

Gaussian-ом се добија серија термохемијских величина које се користе у израчунавању енталпије дисоцијације везе а преко енталпије формирања сваке молекулске врсте, изражене формулом (16):

$$\Delta_f H = \sum(E^f + N_{\text{кор}}) \quad (16)$$

где су:  $\Delta_f H$  енталпија формирања молекулске врсте,  $E^f$  укупна електронска енергија и  $N_{\text{кор}}$  термална корекција за енталпију. Укупна електронска енергија изражава се преко вредности тоталне енергије  $E^0$ , електронске енергије и енергије нулте тачке (енг. zero point energy, ZPE). ZPE је корекција на електронску енергију молекула која се прави да би се узели у обзир ефекти молекулских вибрација које постоје чак и на  $0^\circ\text{K}$ . На вредност



укупне електронске енергије утичу и транслаторна  $E^{\text{транс}}$ , ротациона  $E^{\text{рот}}$  и вибрациона енергија  $E^{\text{виб}}$ . Када се у обзир узму сви наведени доприноси енергије, израз за енталпију формирања молекулске врсте (16) поприма следећи облик (17):

$$\Delta_f H = \sum(E^0 + E^{\text{транс}} + E^{\text{рот}} + E^{\text{виб}} + ZPE + H_{\text{кор}}) \quad (11)$$

Истоветно се израчунавају енталпије формирања кумаринског молекула, кумаринског радикала и водоничног радикала. Када су све те вредности познате, на основу једначине (15) израчунава се енталпија хомолитичког раскидања везе у 4-ОН групи кумарина према следећој једначини (18):

$$BDE = \Delta_f H_{\text{кумарин}} - \Delta_f H_{\text{кумарински радикал}} - \Delta_f H_{\text{водонични радикал}} \quad (18)$$

Понашање кумарина у одговарајућем растварачу дефинисано је *CPCM* поларизованим проводничким типом калкулационог модела (енг. conductor polarizable calculation model) укљученим преко кључних речи *SCRF=(CPCM.SOLVENT=METHANOL)* и који је у сагласности са *COSMO* моделом код семи-емпиријских израчунавања.

Након оптимизације основних молекула кумарина, анализа атомских орбитала, дужина и ред везе у молекулу, хибридизација атома и тачна локализација молекулских орбитала дефинисани су *NBO* анализом (енг. natural bond orbital analysis) помоћу кључних речи *POP=(NBO, SAVENBO)*.

Након завршене оптимизације, конструкцијом криве површине потенцијалне енергије, утврђено је да све структуре локалних минимума поседују најнижу енергију, односно да представљају глобалне минимуме.

### 2.6.3. Молекулски дескриптори

*QSAR* студије антиоксидативне активности базиране су превасходно на вредностима електронских дескриптора, описаних у секцији 2.4.3. Вредности парцијалних атомских наелектрисања појединих функционалних група обележене су са *Q*.

#### 2.6.4. QSAR студије антиоксидативне активности

QSAR једначине добијене су статистичком методом линеарне регресионе анализе за више варијабли, односно вишеструке регресионе анализе (MRA) описаној у секцији 2.4.4. Све вредности антиоксидативне активности тестираних деривата приказане су као негативни логаритми концентрација, односно  $pEC_{50}$ .

#### 2.7. Поступци за одређивање антикоагулативне активности у *in vitro* и *in vivo* условима

Синтетисани деривати кумарина (1-10с) испитивани су као потенцијални антикоагуланти крви у *in vitro* и *in vivo* условима.

##### 2.7.1. Одређивање антикоагулативне активности *in vitro*

*In vitro* антикоагулативна активност кумаринских деривата 1-10с одређена је методом по Quick-у [158] на узорку припремљене хумане плазме крвне групе A<sup>+</sup> која је добијена из лабораторије за хематологију, Клиничко-болничког центра у Крагујевцу. Квалитет хумане плазме потврђује се одређивањем Howel-овог времена, односно времена коагулације рекалцификоване плазме. Нормалне вредности Howel-овог времена су у интервалу од 60-180 секунди [159].

**Поступак одређивања Howel-овог времена.** У серолошку епрувету одмери се 0,1 mL плазме и 0,1 mL физиолошког раствора NaCl. Епрувета се термостатира у воденом купатилу 1-2 минута. Након термостатирања плазми се додаје 0,1 mL 25 mmol/L CaCl<sub>2</sub> и активира се штоперица. Уз опрезно нагињање епрувете сваких 15 секунди посматра се моменат настанка коагулума плазме. Хронометар се зауставља када се опази формирање фибрина.

Раствори кумаринских деривата припремљени су по патентираном методу припреме варфарина као клиничког антикоагуланта [160]. Концентрација од 10 mg кумарина растворена је у 10 mL смеше растварача који је припремљен мешањем 2 mL 96% EtOH, 1 mL 0.9% NaCl, 6 mL 20% глицерола и 1 mL фосфатног пуфера, pH=7). Тестирани раствори кумарина били су концентрације 1 mg/mL. По истој процедури припремљен је и раствор варфарина.

Поступак одређивања протромбинског времена по Quick-у [158]. Аликвоту од 100  $\mu\text{L}$  хумане плазме додаје се 100  $\mu\text{L}$  раствора испитиваног кумарина. Третирана плазма се након хомогенизације инкубира у интервалу од 1 минута на 37°C. По инкубацији, плазми се додаје 200  $\mu\text{L}$  ензима *тромбокиназе* у виду реагенса Thromborel®S (Dade Behring, Siemens AG, Munich, Germany), хуманог плацентног тромбoplastина са  $\text{CaCl}_2$ , претходно раствореног по процедури произвођача и загрејаног на 37°C. По додатку реагенса стартује се штоперица. Узорак се захвата пластичном стерилном езом а протромбинско време дефинише се као време формирања фибринске опне на врху езе. Контролна плазма, односно хумани материјал без кумарина, подвргава се идентичној процедури одређивања протромбинског времена. Резултати се представљају и у виду INR вредности.

### 2.7.2. Одређивање антикоагулативне активности *in vivo*

Одређивање антикоагулативне активности *in vivo* тестираних кумаринских деривата извршено је на албино лабораторијским пацовима из соја Wistar. Животиње старости 2,5 месеци и масе 220-250 g, су укључене у експеримент. Чуване су у адекватним условима на  $22\pm 2^\circ\text{C}$  и 50% влажности ваздуха, у интервалима светлости и мрака дугим по 12 сати. Примењивана је нормална исхрана животиња комерцијално доступном храном. Животиње су третиране по протоколима одобреним од стране Етичког комитета за рад са експерименталним животињама, Института за биолошка истраживања у Београду, публикованим од стране Националног Института за здравље САД (публикација број 85/23, ревидирана 1986. године).

Приликом третирања кумаринским дериватима животиње су подељене у три групе. Прве две групе животиња (по три животиње за сваки кумарински дериват) третиране су интраперитонеално једном дозом етанолских раствора испитиваних кумарина концентрације 0,1 и 0,5 mg по килограм телесне масе [161]. Животиње су жртвоване 24 h након администрације. Из сакупљене крви припремљени су плазма и серим који су даље коришћени за одређивање биохемијских параметара. По одређивању протромбинског времена, одабрани кумарински деривати, **2b**, **4c**, **5c** и **9c** (Табела 14), поново су аплицирани на трећој групи животиња тако да су животиње третиране интраперитонеално једном дозом кумарина у концентрацији 0,5 mg/kg на сваких 24 h, узастопно пет дана.

Животиње су жртвоване шестог дана. Као позитивна контрола коришћен је етанолски раствор варфарина истих концентрација и при идентичним условима, док је негативна контрола био 96% раствор етанола. Избор две концентрације је у функцији адекватног биолошког одговора и израчунавања  $IC_{50}$ , односно концентрације кумарина која повећава протромбинско време за 50%.  $IC_{50}$  вредности коришћене су у QSAR студијама *in vivo* антикоагулативне активности.

**Припремање узорака плазме.** Један запремински део раствора натријум-цитрата масене концентрације 0,11 mol/L пажљиво је помешан са девет запреминских делова крви, да би се избегло формирање пене. Раствор је моментално центрифугиран 15 минута на 1500 x g, на собној температури. По завршетку центрифугирања, плазма је одпипетирана у епендорфе и подвргнута дубоком замрзавању на  $-80^{\circ}C$  у течном азоту. Коагулациони параметри плазме пацова одређивани су на THROMBOSTAT фибринтајмеру.

**Поступак одређивања протромбинског времена по Quick-у [158].** Аликвот од 100  $\mu L$  плазме пацова која садржи тестирани кумарински дериват, или је позитивна или негативна контрола, одмери се у пластичну чашу фибринтајмера. Плазма се инкубира у преинкубационом блоку у интервалу од 1 минута на  $37^{\circ}C$ . По инкубацији, плазма се преноси у мерни део где се аутоматски, по подавању 200  $\mu L$  *тромбокиназе*, укључује хронометар који мери време настанка фибринског конца. Резултати се представљају и у виду INR вредности чија се вредност одређује на основу референтних вредности Dade Behring.

**Поступак одређивања тромбинског времена [159].** У пластичне чаше фибринтајмера које садрже магнет пипетира се 0,1 mL плазме пацова и 0,1 mL диетилбарбитуратног пуфера (pH= 7,6) и инкубира на  $37^{\circ}C$ . Тест чаше се пребаце у мерни део где се додаје тест тромбин 3И/И (Dade Behring). По додавању тромбина аутоматски се укључује хронометар који мери време настанка фибринског конца.

**Анализа метаболичких деривата најактивнијих кумаринских деривата.** Четврта група животиња (по две животиње за сваки дериват) третирана је кумаринима **2b**, **4c**, **5c** и **9c**, интраперитонеално три дана концентрацијом кумарина од 1 mg/kg при чему је у интервалу од 24 часа, након сваке апликације у метаболичким кавезима сакупљан урин. Поред тестираних једињења, животиње су третиране и варфарином и десеторазблаженим апсолутним етанолом као контролним једињењима. За проверу

методе, остављена је и посебна група животиња која није третирана антикоагулантима а њихов урин као бланко проба. Урин је одмах подвргнут дубоком замрзавању.

Припрема узорка за потврду методе извршена је додавањем 0,5  $\mu\text{M}$  тестираних деривата у бланко узорке и мешањем [162]. У 1 mL помешаног узорка урина додато је 50  $\mu\text{L}$  1M мравље киселине до рН вредност узорка 3,0-4,0.

Обрада узорака који су садржали метаболите аплицираних једињења почела је одмрзавањем урина и сједињавањем узорака истих деривата. Прва група узорака подвргнута је ензимској хидролизи евентуално насталог глукуронида. Аликвотима од 1 mL урина додато је 100  $\mu\text{L}$  ацетатног пуфера до рН 5,0 узорци су инкубирани у временском интервалу од 14 сати на 37°C у присуству 50  $\mu\text{L}$   $\beta$ -глукуронидазе активности 9000 U/mL. Хидролизоване узорци су, након инкубације, додатком 100  $\mu\text{L}$  1M мравље киселине пуферисани до рН=3,0-4,0 Друга група узорака није подвргнута хидролизи већ је заједно са свим осталим узорцима пречишћена за потребе анализе метаболита.

**Пречишћавање узорака** започето је центрифугирањем на 17500 обртаја по минути у интервалу од 10 минута. Супернатанту је додато 1 mL метанола и 2 mL дестиловане воде. Аликвоти од 1000  $\mu\text{L}$  припремљених узорака урина пропуштани су кроз хроматографске кетрице типа Sep Pak C<sub>18</sub> (130 mg, 1mL) произвођача Waters (Eschborn, Germany). Пропуштање узорака је извршено под благим притиском и протоком течности од 1,5 mL/мин. Након испирања колоне са 500  $\mu\text{L}$  раствора ацетонитрил-вода (30:70 v/v) у 25 mM мрављој киселини (рН=3,0), узорци су растворени испирањем са 1000  $\mu\text{L}$  раствора ацетонитрил-вода (40:60 v/v) у 25 mM амонијаку (рН 10,0). Елуати су потом упарени под вакуумом у интервалу од 30 мин до финалне запремине од 500-600  $\mu\text{L}$ . Аликвоти су потом анализирани гасно-масеним анализатором.

**Снимање узорака урина** извршено је на квадруполном гасно-масеном анализатору Hewlett Packard 6890N (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA), опскрбљеним HP 5MS колоном димензија 30 m x 0,25 mm, односно дебљином филма од 0,25  $\mu\text{m}$ . Параметри анализе су задати HP Enhanced ChemStation софтвером. Анализа је извршена у три корака. Први корак је сачињавао снимање спектра етанолских раствора **2b**, **4c**, **5c** и **9c** ради утврђивања вредности молекулских јонова  $M^+$ . Као референтно кумаринско једињење са хидроксилном групом у положају 7 снимљен је умбелиферон. Анализом узорака бланко урина и урина са варфарином и етанолом, констатовани су

различити пикови. Други корак анализе присутних метаболита у узорцима урина био је усмерен ка детекцији аплицираних једињења у узорцима урина, коришћених за потврду методе. Снимање је изведено у моду скенирања узорка. Анализа хидролизованних узорка урина урађена је компаративно са засићеним урином у моду сканирања као и моду симулације присутних јона (енг. Selected ion monitoring, SIM). Циљ SIM анализе било је констатовање  $M^{+}+17$  јона у узорку, односно детекција 7-хидрокси метаболита аплицираног једињења. У SIM моду су праћени следећи јони:  $m/z$  91, 126, 147, 162 (молекула кумарина) [163] и 362 за **2b**;  $m/z$  91, 126, 147, 162 и 432 за **4c**;  $m/z$  91, 126, 147, 162 и 366 за **5c**;  $m/z$  91, 126, 147, 162 и 397 за **9c**. За потребе снимања, гасно-масеном анализатору су задати следећи услови: температуре инјектора и преносне линије су подешене на 290°C; иницијална температура пећи је подешена на 200°C са повећањем од 15°C/min до 290°C (изотермално за 30 мин); носећи гас хелијум са протоком од 1,3 mL по минути; ињекциона запремина 3  $\mu$ L; температура јонског извора 230°C; температура квадрупола 150°C; распон масених јединица при скенирању 50-550 amu на 1800 eV; брзина скенирања 3,12 сканова по секунди, пауза између два снимања 100 ms.

Нехидролизоване узорци нису снимани због присуства шећерне компоненте и могућности оштећења колоне.

## **2.8. Компјутационе методе одређивања вредности молекулских дескриптора и развоја 3D-QSAR студија антикоагулативне активности**

Механизам антикоагулативне активности кумарина своди се на њихово везивање за субјединицу 1 витамин К-епоксид редуктазе те је стога њихова активност описана 3D-QSAR студијама које дефинишу ензим-супстрат интеракције. За потребе 3D-QSAR студија извршене су карактеризације молекулске динамике, структурног поравнања свих молекула и одређивања молекулских дескриптора.

### **2.8.1. Молекулска динамика**

Иницијалне структуре свих кумаринских деривата нацртане су у софтверу Spartan 2002 и сачуване PDB формату.

Структуре су потом имплементирани у MacroModel којим је извршена енергетска минимизација почетне геометрије до градијента од 0,05 kJ/Å.

Параметри атома и молекулских веза су подешени **OPLS2005** пољем сила.

Даљине не-везивних van der Waals-ових интеракција констатоване до растојања од 8 Å, док су електростатичке интеракције мерене до домета од 20 Å.

Конформациона претрага извршена је Monte Carlo методом у три узастопна корака молекулске динамике. У првом кораку, молекулима је задата иницијална температура од 310 K, симулирајући тако телесну температуру пацова. Молекулска динамика извршена је у еквилибрационом времену од 10 ps са трајањима временских корака (енг. time step) од 1,5 fs на константој температури 310 K. Еквилибрационо време представља време које се задаје молекулу да се уравнотежи на почетку симулације. Еквилибрационо време се такође назива и временска константа. Трајање временског корака представља интеграцију једначина кретања молекула по времену током симулације при чему мања fs вредност значи прецизније дефинисање кретања молекула. Симулационо време кретања било је 10 ps. У другом кораку, молекули су охлађени на 150 K док је молекулска динамика изведена у симулационом времену од 20 ps, са истим трајањем временског корака и временском константом од 5 ps. Смањивање временске константе за пола, апроксимативно представља полу-време еквилибрације молекула, што је довело до постепеног хлађења молекула у другом кораку. Последњим кораком молекулске динамике молекули су охлађени на 50 K у симулационом времену од 20 ps. На добијеним геометријама извршена је енергентска минимизација у 250 корака. Сви процеси молекулске динамике извршени су имплицитном солватацијом помоћу GB/SA рутине. Имплицитна солватација омогућила је да се хлађење одвија као да је изведено у воденом купатилу. Оваквим приступом молекулске динамике избегнуто је коришћене семи-емпријских и DFT метода молекулске оптимизације и постигнут је већи степен реалности у постигнутим активним геометријама тестираних једињења у *in vivo* условима.

Све добијене структуре локалног минимума су сачуване у PDB формату као припремљене за CoMFA и CoMSIA моделирање.

### **2.8.2. Преклапање молекула и формирање CoMFA и CoMSIA 3D-QSAR модела**

3D-QSAR студије антикоагулативне активности *in vivo* успостављене су коришћењем метода упоредне анализе молекулских поља (енг. Comparative Molecular Field Analysis, CoMFA) односно упоредне анализе показатеља сличности молекула (енг.



Comparative Molecular Similarity Indices Analysis, CoMSIA). Најважнији корак у 3D-QSAR анализи јесте почетно релативно поравњање индивидуалних активних конформација у односу на структуру најактивнијег једињења и њихово смештање у просторни мрежу [114].

CoMFA методологија се базира на предпоставци да интеракције у дрога-рецептор комплексу нису ковалентног, већ електростатичког и стерног типа, и да је промена у биолошкој активности молекула условљена променама у стерним или електростатичким пољима молекула. У методологији, наелектрисања и стерне интеракције се не посматрају парцијално, на сваком атому понаособ као у 1D-QSAR-у, већ се посматра њихова дистрибуција преко целог молекула успостављањем мапа молекуског, електростатичког и стерног потенцијала. Да би се облик молекула окарактерисао у QSAR табели, јачине стерних (Lennard-Jones-ових) и електростатичких (Coulomb-ових) поља су представљене као међупростори преко одређених региона молекула. Они делови молекула преко којих се успостављају наведена поља нотирају се као фармакофоре. Интензитети стерног и електростатичког поља мере се у односу на тачке из којих је изграђена просторна решетка те се вредности записују у QSAR табели. На тај начин, биолошка активност се дефинише као (19):

$$A = C + \sum_{i=1}^N \sum_{j=1}^P C_{ij} S_{ij} \quad (19)$$

где је  $A$ -активност,  $S_{ij}$  вредност поља сила за  $j$ -ти атом на  $i$ -тој тачки просторне решетке,  $C_{ij}$  регресионе вредности за  $S_{ij}$ .

CoMSIA методологија након формирања поља врши упоређивање сличних структура у групи међусобно изравњаних молекула, укључујући способност формирања водоничних веза као и успостављање стерних и електростатичких поља. Овом техником се утврђују заједничке карактеристике поравњаних молекула, односно фармакофоре које су значајне за везивање у рецептору. Јачине молекулских поља се на истоветан начин уносе у у QSAR табелу. Дефинисање активности је истоветно као код CoMFA.

CoMFA и CoMSIA модели добијени су коришћењем софтвера Sybyl-X верзије 1.1. [164]. Сви молекули су међусобно преклопљени у односу на структуру молекула 2H-хромена, заједничког језгра за све кумаринске деривате. Једињења су потом насумице



подељена у две групе. Једну групу је сачињавало 10 једињења експерименталног сета док је преосталих 6 једињења чинило тест сет. Подела је извршена тако да обе под-групе једнако представљају добро и хемијске и биолошке особине свих тестираних суспрата.

CoMFA дескриптори сачињени од стерних и електростатичких поља израчунати су на свакој од тачака просторне мреже чије је растојање било 2 Å. Поља су се простирали до растојања 4 Å у све три димензије. Потенцијали van der Waals-ових и Coulomb-ових интеракција, који представљају стерна и електростатичка поља, израчунати су помоћу Tripos поља сила. У CoMFA методи,  $sp^3$  хибридизовани атом угљеника коришћен је као пробни атом на основу кога су израчунате јачине стерних и електростатичких поља. Вредности енергија стерних и електростатичких поља ограничене су на максималне вредности од 30 kcal/mol.

Стерни, електростатички, хидрофобни и потенцијали поља донора и акцептора водоничних веза у CoMSIA методи израчунати су на свакој од тачака просторне мреже чије је растојање било 2 Å. Пробни угљеников атом са наелектисањем +1 имао је радијус од 1 Å и поседовао је хидрофобне и особине грађења водоничних веза +1.

Фактор опадања свих мерених величина по тачки просторне мреже за обе методе био је 0,3.

### 2.8.3. 3D-QSAR студија антикоагулативне активности *in vivo*

Биолошка активност у 3D-QSAR студијама представља се у облику  $pIC_{50}$  вредности па је биоактивна концентрација антикоагуланата изражена као вредност која повећава протромбинско време за 50%. Вредности  $IC_{50}$  кумаринских деривата израчунате су из криве линеарне зависности која се успоставља између активне концентрације и биолошког одговора [165]. При успостављању корелације узете су вредности протромбинских времена након апликације кумарина у концентрацији од 0,1 mg/kg, као и средње вредности протромбинских времена за она једињења, која су аплицирана више пута у концентрацији 0,5 mg/kg.  $pIC_{50}$  вредности добијене су логаритмовањем реципрочних вредности  $IC_{50}$ .

Линеарна корелација биолошких активности са вредностима CoMFA и CoMSIA поља извршена је регресионом методом најмањих парцијалних квадрата (енг. partial least-squares, PLS). Метода се користи када је број независних варијабли, односно молекулских

дескриптора, много већи од броја зависних варијабли, односно броја једињења са дефинисаном биолошком активношћу, те је онемогућено једноставно израчунавање X вредности из једначине линеарне регресионе анализе. Математичка дефиниција PLS методе превазилази оквире овог текста и знатно је компликованија од MRA анализе. Процедура се одвија тако што се изнова и изнова тражи најбоља једначина која описује зависност биолошке активности у односу на молекулске дескрипторе, односно табеларно квантификоване вредности израчунатих поља око молекула. Као резултат процеса, број дескриптора се постепено редукује тако што се одстрањују они који немају релацију са активношћу. Када се нова једначина формира, она се одмах пореди са претходно одбаченом и тај процес се назива упоредна валидација (енг. cross-validation). Са одстрањивањем молекулских дескриптора истовремено се елиминише и молекул на који се дескриптори односе. Упоредном валидацијом се процењује како QSAR једначина предвиђа биолошку активност молекула који је елиминисан па се након враћања молекула врши нова валидација током које се елиминише наредни молекул и тако све док се не добије најбоља QSAR једначина.

Број преосталих једињења у једначини, односно повољних молекулских дескриптора, квантификује се корелационим коефицијентом упоредне анализе,  $q^2$ . Коефицијент представља предиктивну моћ анализе те се као квалитетна анализа сматра она где је  $q^2$  веће од 0,6. Вредност коефицијента се рачуна као (20):

$$q^2 = 1 - \frac{\sum Y_{\text{предвиђено}} - Y_{\text{стварно}})^2}{\sum Y_{\text{предвиђено}} - Y_{\text{средње}})^2} \quad (20)$$

где је  $Y_{\text{предвиђено}}$  предвиђена вредност биолошке активности,  $Y_{\text{стварно}}$  измерена експериментална вредност и  $Y_{\text{средње}}$  најбоља процена свих средњих вредности које се могу предвидети.

Још један значајан статистички параметар јесте невалидовани коефицијент анализе,  $r^2$ , изражен као степен варијације између зависне варијабле, односно израчунате вредности биолошке активности добијене регресионом анализом и њене стварне вредности.

## 2.9. Механистичке студије анктикоагулативне активности *in vivo* кумаринских деривата DFT методом

Компјутационе механистичке студије антикоагулативне активности најактивнијих кумаринских деривата извршене су након формирања хомолог модела *VKORC1* пацова, молекулског доковања најактивнијих деривата у активном центру ензима и квантно-механичких израчунавања реакционих путева предложеног менахизма.

### 2.9.1. Хомолого моделовање *VKORC1* пацова

Хомолого моделовање јесте компјутациона метода формирања тродимензионалне структуре протеина на основу познате структуре протеина из хомологе серије [166]. Техника се користи када не постоји већ публикован модел молекулске мете од интереса у протеинској бази података (PDB). Хомолого моделовање протеина одвија се у неколико фаза: одабир темплата и иницијално поређење секвенци темплата и протеина који се моделује, исправљање грешака у секвенци, формирање пептидног низа, моделовање структура насумице увијања, моделовање R остатака аминокиселина, оптимизација хомологог модела и његова валидација.

Пацовски *VKORC1* јесте трансмембрански протеин, до сада није изолован и није снимљена његова кристалографска структура. Због тога је за потребе хомологог моделовања као структурни темплат искоришћен његов бактеријски хомолог.

Секвенца *Rattus norvegicus VKORC1* преузета је са Swiss-Prot/Uniprot базе података (UniProt ID: Q6TEK4) [167]. Као структура хомолога узета је терцијарна структура витамин K епоксид-редуктазе *Synechococcus sp.* резолуције 3.60 Å (PDB ID: 3KP9 chain A) [168], пронађена претрагом помоћу PSIBLAST претраживача. Упоредивањем секвенци модела и темплата установљен је висок степен индентичности од 55,48% у региону трансмембранске структуре животињског *VKORC1* (Cys132-Cys135). Упоредивање секвенци модела и темплата извршено је помоћу CLUSTALW 1.83 [169] софтвера. Хомолого моделовање *VKORC1* пацова извршено је помоћу Swiss-Model [170] софтвера, користећи аутоматску компаративну методу у моду за поравњање структура. Валидација модела извршена је помоћу софтвера PROCHECK [171], при чему је установљено да је вредност G-фактора већа од -0,5, што сугерише да је моделовање било успешно.

Трансмембранска структура *VKORC1* пацова изграђена је додавањем ћелијске мембране помоћу VegaZZ која се састојала од 128 молекула 1,2-димиристоил-SN-3-фосфорилхолина (DMPC), 11 атома хлора и 3655 молекула воде. Структура трансмембранског протеина је након формирања подвргнута Monte Carlo молекулској динамици да би била доведена у стање равнотеже, односно минимума енергије. Молекулска динамика изведена је помоћу софтвера NAMD [172] имплементираниог у Vega ZZ користећи CHARMM22 PROT поље сила, специјализовано за протеине. Систему су додата Gasteiger-ова наелектрисања и атоми водоника помоћу *psfgen* пакета. Почетни систем је релаксиран у 10 000 корака да би се уклониле неповољне интеракције. Након минимизације енергије извршена је молекулска динамика у 10 000 корака на 720 ps и 2 fs, на 310 K. Температура је контролисана помоћу Langevin-ове динамике са фактором одбацивања  $5 \text{ ps}^{-1}$ . Термодинамичка својства генерисаног протеина, температура и енергија, праћена су током симулације до постизања константне вредности. Након динамике, структура трансмембранског протеина је подргнута минимизацији енергије у 100 000 корака.

### 2.9.2. Молекулско доковање

Новокреирана структура *VKORC1* искоришћена је као циљни ензим при молекулском доковању. Са протеина су уклоњени неполарни атоми водоника а додата су Gasteiger-ова наелектрисања и параметри растварача воде. Молекулима лигананда дефинисане су ригидне и ротабилне везе помоћу AutoDockTools. Молекулско доковање извршено је помоћу AutoDock 4.2. Димензије координатне мреже су постављене да буду  $18 \text{ \AA} \times 24 \text{ \AA} \times 32 \text{ \AA}$  са простором између две тачке у мрежи од  $0,375 \text{ \AA}$ . Координате активног центра у коме се налазе Tyr138, Thr139 и Ala140 дефинисане су као  $x=26,863$ ,  $y=68,637$ ,  $z=13,538$ . Lamarckian Genetic Algorithm је коришћен приликом претраживања конформација лигананда у активном центру. Оптимизација конформација лигананда започета је са 200 насумице позиционираних конформација, максимумом од  $1,0 \times 10^6$  енергетских евалуација и 27 000 генерисаних суб-конформација за сваку конформацију. Конформационо претраживање извршено је у 100 корака са толеранцијом између геометрија од  $0,5 \text{ \AA}$ .

Молекулско-механички приступ искоришћен је у анализи резултата доковања. Ензим-суспстрат комплекс је учитан у MacroModel и минимизиран у 10 000 корака до градијента од 0,01 kcal/Å mol. Током минимизације коришћено је AMBER поље сила, специјализовано за протеине, уз континуалну солватацију у води као растварачу, GB/SA рутином. Обзиром на чињеницу да се комплекс састојао од великог броја атома, извршена је селекција оних атома који су се налазили на растојању од 5 Å од каталитичког центра, укључујући и атоме инхибитора. Селектовани атоми су подвргнути поновној минимизацији у циљу постизања што боље оријентације лиганда у активном центру која укључује формирање водоничних веза и van der Walls-ове интеракције.

### 2.9.3. Механистичке студије инхибиције VKORC1 кумаринским дериватима DFT методом

Предложени механизам антикоагулативне активности најјактивних кумарина у складу је са виђењем процеса коагулације Oldenburg-a и сарадника [90] као и Deerfield и сарадника. [103].

Механистичке студије изведене су помоћу Gaussian 03 софтвера. Стартне геометрије најактивнијих једињења *in vivo*, **2b**, **4c**, **5c** и **9c** и варфарина, оптимизоване су на DFT B3LYP 6-311G(d,p) нивоу теорије. Геометријски параметри свих стационарних тачки оптимизовани су до локалног минимума у води ( $\epsilon=78,36$ ) помоћу CPCM солватационог модела.

Кључне речи за оптимизацију једињења **2b**, **4c**, **5c**, **9c** и варфарина:

# OPT FREQ B3LYP/6-311(D,P) SCRF=(CPCM.SOLVENT=WATER) POP=(NBO, SAVENBO)  
TEST

Геометрије прелазних стања (ТС) изграђене су помоћу Gaussview 3.07 и оптимизоване помоћу DFT B3LYP 6-311G++(d,p) нивоа теорије, у води као растварачу, помоћу CPCM модела. Прелазна стања су формирана на основу растојања између 4-хидрокси групе кумарина и активног центра VKORC1 добијених приликом анализе резултата молекулског доковања.

Кључне речи за оптимизацију једињења **2b**, **4c**, **5c**, **9c** и варфарина:

# OPT=(CALCF, TS, NOEIGEN) FREQ=NORAMAN RB3LYP/6-311++(D,P) SCRF=(CPCM.SOLVENT=WATER) TEST

Командом *CALCF* рачунају се константе сила унутар молекула током квантно-механичке оптимизације.

Кључном речи *TS* покреће се алгоритам за тражење конформације прелазног стања.

Прелазно стање се лоцира једном имагинарном фреквенцијом система. Кључном речју *NOEIGEN* се омогућава да се све имагинарне фреквенције које не одговарају прелазном стању одбаце и да се оптимизација заврши тек онда када имагинарна фреквенција одговара стварном прелазном стању.

Командом *FREQ=NORAMAN* тражи се од алгоритма да не рачуна Раман-ове фреквенције.

Структуре прелазних стања потвђене су рачунањем реалних реакционих координата (енг. Intrinsic reaction coordinates, IRCs) које повезују термодинамички процес настанка производа реакције из реактаната преко прелазних стања.

Кључне речи за дефинисање реакционих координата:

# IRC=CALCF RB3LYP/6-311++(D,P) SCRF=(CPCM.SOLVENT=WATER) TEST

## **2.10. Поступци одређивања биохемијских параметара јетре пацова након апликације кумаринских деривата *in vivo***

У серуму су одређени: концентрације ензима *аспартат аминотрасферазе* (AST), *аланин аминотрасферазе* (ALT), *алкалне фосфатазе* (ALP) и *γ-глутамилтрасферазе* (γ-GT), односно укупне количине билирубина, протеина, албумина, глобулина и гвожђа. Сви параметри су одређени према клиничким протоколима Интернационалне Федерације за Клиничку Хемију (енг. International Federation of Clinical Chemistry, IFCC).

### 2.10.1. Одређивање активности *аспартат аминотрансферазе* (кинетичком методом на 340 nm)

Каталитичка активност *аспартат аминотрансферазе* мери се на основу реакције трансминације апсартата и редукције насталог оксалацетата [173].

Основни реагенси са одређивање каталитичке активности AST припремају се мешањем следећих реагенаса:

**Реагенс А (пуфер/ензим реагенс):** Tris/HCl пуфер 100 mmol/L (pH=7,8), L-Asp 300 mmol/L, *лактат дехидрогеназа*  $\geq 900$  U/L, *малат дехидрогеназа*  $\geq 600$  U/L,

**Реагенс Б (супстрат):**  $\alpha$ -кетоглутарат 60 mmol/L NADH 0,9 mmol/L,

**Радни реагенс:** Аликвот од 1 ml реагенса Б помеша се са 1 m реагенса А и хомогенизује уз пажљиво мешање,

**Узорак за анализу:** крвни серум

У претходно термостатирану кивету на 37°C пипетирати 100  $\mu$ L серума и 1000  $\mu$ L радног реагенса. Раствор се пажљиво промеша и након 1 минута се унесе у Perkin-Elmer Lambda 25 UV/Vis спекрофотометар и чита апсорбанца на 340 nm. Апсорбанца се поново читава након 1, 2 и 3 минута. Након читавања апсорбанци израчунава се разлика између иза стопних мерења и бележи просечна разлика у апсорбанцама по минути ( $\Delta A$ /мин). Каталитичка активност AST рачуна се по формули (21):

$$\frac{\Delta A}{\text{мин}} \times \frac{V_T \times 10^6}{\epsilon \times l \times V_c} = U/L \quad (21)$$

где је  $V_T$  укупна запремина раствора,  $V_c$  запремина анализираног узорка,  $\epsilon$  моларна апсорбанца NADH на 340 nm ( $\epsilon_{\text{NADH}}=6300$ ),  $l$  дебљина кивете од 1 cm, 1 U/L 0,0166  $\mu$ кат.

### 2.10.2. Одређивање активности *аланин аминотрансферазе* (кинетичком методом на 340 nm)

Каталитичка активност *аланин аминотрансферазе* мери се на основу реакције трансминације L-аланина и редукције насталог пирувата [174].

Основни реагенси са одређивање каталитичке ALT припремају се мешањем следећих реагенаса:

**Реагенс А (буфер/ензим реагенс):** Tris/HCl буфер 150 mmol/L (pH 7,5), L-Ala 750 mmol/L, лактат дехидрогеназа  $\geq 1200$  U/L,

**Реагенс Б (супстрат):**  $\alpha$ -кетоглутарат 90 mmol/L NADH 0,9 mmol/L,

**Радни реагенс:** Аликвот од 1 ml реагенса Б помеша се са 1 ml реагенса А и хомогенизује уз пажљиво мешање.

**Узорак за анализу:** крвни серум

У претходно термостатирану кивету на 37°C пипетирати 100  $\mu$ L серума и 1000  $\mu$ L радног реагенса. Раствор се пажљиво промеша и након 1 минута се унесе у Perkin-Elmer Lambda 25 UV/Vis спекрофотометар и чита апсорбанца на 340 nm. Апсорбанца се поново читава након 1, 2 и 3 минута. Након читавања апсорбанци израчунава се разлика између изаstopних мерења и бележи просечна разлика у апсорбанцама по минути ( $\Delta A/\text{мин}$ ). Каталитичка активност ALT рачуна се по формули (21).

### 2.10.3. Одређивање активности *алкалне фосфатазе* (кинетичком методом на 405 nm)

Каталитичка активност *алкалне фосфатазе* мери се на основу реакције хидролитичке дефосфорилације p-нитрофенолфосфата [175].

Основни реагенси са одређивање каталитичке активности ALP припремају се мешањем следећих реагенаса:

**Реагенс А:** AMP 420 mmol/L, магнезијум-ацетат 2,4 mmol/L, ZnSO<sub>4</sub> 1,2 mmol/L, HEDTA 2,4 mmol/L, (pH=10,7),

**Реагенс Б (супстрат):** 4-нитрофенилфосфат (4-NPP) 16,3 mmol/L,

**Радни реагенс:** Аликвот од 1 ml реагенса Б помеша се са 1 ml реагенса А и хомогенизује уз пажљиво мешање.

**Узорак за анализу:** крвни серум

У претходно термостатирану кивету на 37°C пипетирати 20  $\mu$ L серума и 1000  $\mu$ L радног реагенса. Раствор се пажљиво промеша и након 1 минута се унесе у Perkin-Elmer Lambda 25 UV/Vis спекрофотометар и чита апсорбанца на 340 nm. Апсорбанца се поново читава након 1, 2 и 3 минута. Након читавања апсорбанци израчунава се разлика између изаstopних мерења и бележи просечна разлика у апсорбанцама по минути ( $\Delta A/\text{мин}$ ). Каталитичка активност ALP рачуна се по формули (22):



$$\frac{\Delta A}{\text{мин}} \times 2757 = U/L \quad (22)$$

#### 2.10.4. Одређивање активности $\gamma$ -глутамилтрансферазе (кинетичком методом на 405 nm)

Серумска  $\gamma$ -глутамилтрансфераза катализује реакцију кондензације глицил-глицина и L- $\gamma$ -глутамил-3-карбокси-4-нитроанилида при чему настају L- $\gamma$ -глутамил-глицилглицин и 5-амино-2-нитробензоат, чија концентрација се мери спектрофотометријски на 405 nm [175].

Основни реагенси са одређивање каталитичке активности  $\gamma$ -GT припремају се мешањем следећих реагенаса:

**Реагенс А:** глицил-глицин 100 mmol/L, Tris/HCl пуфер 100 mmol/L (pH 8,25),

**Реагенс Б (супстрат):** L- $\gamma$ -глутамил-3-карбокси-4-нитроанилид 4 mmol/L,

**Радни реагенс:** Аликвот од 1 mL реагенса Б помеша се са 4 mL реагенса А и хомогенизује уз пажљиво мешање.

**Узорак за анализу:** крвни серум

**Бланко проба:** дестилована вода, реагенс А

У претходно термостатиране кивете на 37°C пипетирати 1000  $\mu$ L радног реагенса и 100  $\mu$ L дестиловане воде и мешањем направити слепу пробу, односно 1000  $\mu$ L радног реагенса и 100  $\mu$ L серума. Раствори се пажљиво промешају и након 1 минута унесу у Perkin-Elmer Lambda 25 UV/Vis спекрофотометар и читају апсорбанце на 405 nm. Апсорбанце се поново читавају након 1, 2 и 3 минута. Након читавања апсорбанци израчунава се разлика између изаstopних мерења и бележи просечна разлика у апсорбанцама узорка и следеће пробе по минути ( $\Delta A/\text{мин}$ ). Каталитичка активност  $\gamma$ -GT рачуна се по формули (23):

$$\frac{\Delta A}{\text{мин}} \times 1309 = \left( \frac{\Delta A}{\text{мин}_{\text{узорак}}} - \frac{\Delta A}{\text{мин}_{\text{бланко}}} \right) \times 1309 = U/L \quad (23)$$

### 2.10.5. Одређивање концентрације укупног билирубина (колориметријском методом на 550 nm)

Билирубин реагује са диазо-једињењима градећи црвено обојени комплекс. Реакција се потом прекида додатком аскорбинске киселине која разара преосталу диазо боју. Концентрација укупног билирубина у серуму одређује се додатком Фелинговог раствора II при чему комплекс мења боју из црвене у плаву [176].

Основни реагенси са одређивање количине укупног серумског билирубина јесу:

**Реагенс А:** кофеин-бензоат (260 mmol/L кофеина, 964 mmol/L натријум-ацетата, 520 mmol/L натријум-бензоата и 2,69 mmol/L Na<sub>2</sub>EDTA),

**Реагенс Б:** диазо реагенс I (29 mmol/L сулфанилне киселине, 175 mmol/L HCl), диазо реагенс II (72 mmol/L натријум-нитрит); 10 mL реагенса I помеша се са 0,25 mL реагенса II,

**Реагенс В:** аскорбинска киселина 227 mmol/L,

**Раствор Г (Фелинг II):** K,Na-тартарат 1,24 mmol/L, NaOH 2,5 mol/L

**Узорак за анализу:** крвни серум

Раствор за одређивање укупног билирубина припрема се мешањем 2,0 mL реагенса А, 1,0 mL серума и 0,5 mL реагенса Б. Раствор се добро измеша и остави да стоји 10 мин након чега се додаје 0,1 mL реагенса В и 1,4 mL реагенса Г. Слепа проба припрема се мешањем 2,0 mL реагенса А, 0,1 mL реагенса В и 0,5 mL реагенса Б. Раствор се добро измеша и остави да стоји 10 мин након чега се додаје 1,4 mL реагенса Г. Укупни билирубин одређује се према формули (24):

$$(A_{y6} - A_{сп}) \times 73,5 = \mu\text{mol/L} \quad (24)$$

### 2.10.6. Одређивање концентрације укупног гвожђа (колориметријском методом на 595 nm)

Тривалентно гвожђе се у киселој средини одваја од свог носача *трансферина* и редукује до Fe<sup>2+</sup>. Дивалентно гвожђе се потом комплексира са хромогеном, при чему се гради плаво обојени комплекс [177].

Основни реагенси са одређивање концентрације серумског гвожђа јесу:

**Реагенс А (хромоген):** ферен 22,2 mmol/L,

**Реагенс Б (редукционо средство):** аскорбинска киселина 1,3 mmol/L,

**Реагенс В (пуфер):** ацететани пуфер 0,087 mol/L (pH 4,65), DMSO, сурфакант

**Реагенс Г:** стандард CAL

**Узорак за анализу:** крвни серум

Бланко проба припрема се мешањем 2 mL реагенса В, 0,1 mL реагенса Б и 0,5 mL дестиловане воде која не садржи гвожђе. Узорак за анализу припрема се мешањем 2 mL реагенса В, 0,1 mL реагенса Б и 0,5 mL серума. Стандардни раствор припрема се мешањем 2 mL реагенса В, 0,1 mL реагенса Б и 0,5 mL реагенса Г. Очитају се иницијалне апсорбанце узорка и стандарда на 595 nm у односу на бланко пробу и сваком од наведених раствора дода по 0,1 mL реагенса А. Раствори се поново измешају, инкубирају 15-20 мин на 20-25°C и очитају се апсорбанце на 595 nm. Разлика између апсорбанци раствора изражава се као  $\Delta A = \text{финална } A - \text{иницијална } A$ . Концентрација гвожђа рачуна се по формули (25):

$$\frac{\Delta A_{\text{узорак}}}{\Delta A_{\text{стандард}}} \times C_{\text{стандард}} = C_{Fe} \quad (25)$$

#### **2.10.7. Одређивање концентрације укупних протеина (колориметријском методом на 540 nm)**

Метода се заснива на грађењу биуретског комплекса протеина са јонима бакра при чему настаје комплекс интензивно љубичасте боје [178].

Основни реагенси са одређивање концентрације укупних протеина у серуму јесу:

**Реагенс А (биуретски реагенс):** Растворити K,Na-тартарат 9 g, NaOH 8 g, CuSO<sub>4</sub> 3 g, KJ 5 g у 1000 mL дестиловане воде,

**Реагенс Б (стандардни раствор протеина):** препарат стандардизован у лабораторији по Kjeldahl-овој методи, 5 g/L хуманог албумина,

**Реагенс В:** NaCl 154 mmol/L

**Узорак за анализу:** крвни серум.

**Бланко проба:** NaCl, реагенс А

Раствор за анализу припрема се мешањем 5 mL реагенса А и 0,1 mL серума. Стандардни раствор се припрема мешањем 5 mL реагенса А и 0,1 mL реагенса Б. Слепа проба се припрема мешањем 5 mL реагенса А и 0,1 mL NaCl. По приправљању, раствори

се остављају 30 мин на собној температури. Затим се мери апсорбанца анализе ( $A_A$ ) и стандарда ( $A_C$ ) према слепој проби на 540 nm. Укупна количина протеина рачуна се према формули (26):

$$\frac{A_A}{A_C} \times C_{СТ} = g/L \quad (26)$$

### 2.10.8. Одређивање концентрације фибриногена (колориметријском методом на 540 nm)

Фибриноген из плазме одређује се након разблаживања узорка физиолошким раствором, таложења фибриногена са  $\text{CaCl}_2$  и додатка раствора тромбина. Добијени фибрински конци се исперу физиолошким раствором и растворе у  $\text{NaOH}$  а затим се одреде биуретском методом [179].

Основни реагенси са одређивање концентрације фибриногена у плазми јесу:

**Реагенс А (биуретски реагенс):** припрема се мешањем 100 mL раствора А и 400 mL раствора Б.

Раствор А: 45 g  $\text{K}_2\text{Na}$ -тартарата растворити у 250 mL дестиловане воде и пренети у нормални суд од 1000 mL, 45 g  $\text{CuSO}_4$  растворити у 200 mL дестиловане воде и пренети у исти нормални суд, 24 g  $\text{NaOH}$  растворити у 200 mL дестиловане воде и пренети у исти нормални суд. Долити дестиловане воде до 2/3 суда и затим додати 5 g  $\text{KJ}$  и допунити суд до црте.

Раствор Б: Растворити 5 g  $\text{KJ}$  у 1000 mL 0,6 M  $\text{NaOH}$ .

**Реагенс Б:**  $\text{NaCl}$  154 mmol/L,

**Реагенс В (стандард протеина):** 5 g/L хуманог албумина

**Реагенс Г:**  $\text{CaCl}_2$  22,52 mmol/L

**Реагенс Д:** раствор тромбина (100 NIN U/mL)

**Узорак за анализу:** цитратна плазма

У епрувату одмерити 2,5 mL реагенса Б, 0,5 mL плазме и 2,5 mL реагенса Г или Д. Садржај у епрувети добро промешати и инкубирати 30 мин на 37°C. Фибрински конач покупити стакленим штапићем, неколико пута испрати физиолошким раствором, затим просушити на филтер папиру и пренети три чисте епрувете у које се додаје: за апсорбанцу анализе 0,1 mL реагенса Б и 5 mL реагенса А, за апсорбанцу стандарда 0,1 mL реагенса В

и 5 mL реагенса А и за апсорбанцу следеће пробе 0,1 mL реагенса Б и 5 mL реагенса А. Епрувете оставити 15 мин у воденом купатилу на 60°C да се фибрински конци растворе и биуретска реакција развије. Након тога епрувете охладити на собну температуру а анализу и стандард снимити на 540 nm према слепој проби. Концентрација фибриногена одређује се према формули (27):

$$\frac{A_A}{A_C} \times C_{СТ} \times 11 = g/L \quad (27)$$

#### 2.10.9. Одређивање концентрације албумина (колориметријском методом на 628 nm)

Концентрација албумина у серуму одређује се после везивања протеина са индикатором бромкрезол-зеленим и мерењем апсорбционог максимума на 628 nm [179].

Основни реагенси са одређивање концентрације албумина су:

**Реагенс А:** Растворити 105 mg бромкрезол-зеленог, 8,85 g ћилибарне киселине, 100 mg натријум-азида и 4 mL Брија-35 у 950 mL воде. Подесити рН на 4,15 са 6 M NaOH и допунити до 1L,

**Реагенс Б (слепа проба):** припрема се као реагенс А, без додатка индикатора,

**Реагенс В (стандардни албумин):** 6 g хуманог серумског албумина и 50 mL натријум-азида растворити у 100 mL воде уз благо мешање. Садржај албумина одредити биуретском методом.

**Узорак за анализу:** серум

Узорак за анализу припрема се мешањем 5,0 mL реагенса А и 0,02 mL серума. Контролна проба се припрема мешањем 5,0 mL реагенса А и 0,02 mL реагенса В, слепа проба припрема се мешањем 5,0 mL реагенса Б и 0,02 mL дестиловане воде. Нула спектофотометра подешава се помоћу дестиловане воде. Очитава се апсорбанца следеће пробе и бојеног реагенса (мора бити око 0,150) и подешава нула према њој. Додаје се узорак у одговарајућој епрувети, промеша се и чита апсорбанца након 30 секунди на 628 nm. Концентрација албумина израчунава се на основу једначине (28):

$$\frac{A_A}{A_C} \times 60 = g/L \quad (28)$$

Количина глобулина у серуму одређује се из разлике количине укупних протеина и албимина.

### ***3. РЕЗУЛТАТИ И ДИСКУСИЈА***

---





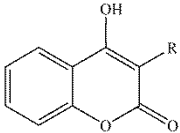

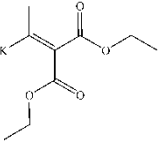
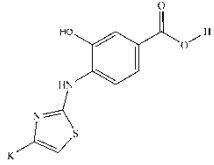
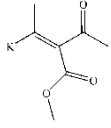
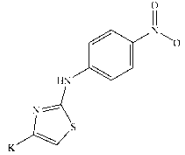
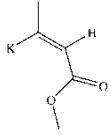
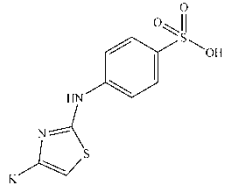
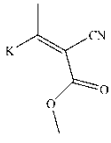
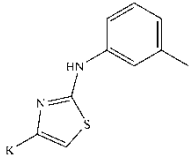
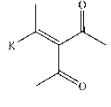
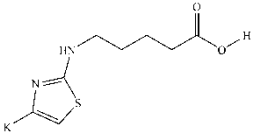
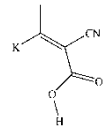
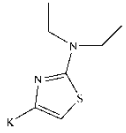
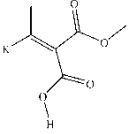
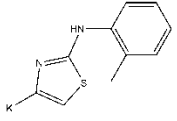
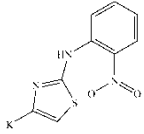
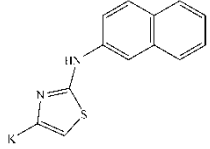
### 3.1. Испитивање биохемијске активности деривата кумарина–преглед хемијске структуре

У експерименте испитивања биохемијске активности укључено је 17 С-3 деривата 4-хидроксикумарина чије хемијске структуре су представљене у Табели 2. Испитивана једињења добивена су реакцијама хемијске синтезе из полазног кумарина **1** који на положају С-3 има ацетил групу.

У Табели 2 приказане су структуре уведених фармакофора у основни кумарински молекул. У дериватима **2-8b**, ацетил група 4-хидроксикумарина супституисана је проп-1-ен структурним фрагментом који битно одређује стереохемију С-3 остатка а на коме се налазе различито супституисане карбонилне и карбоксилне функционалне групе. Тако, дериват **2b** садржи карбоксиетил групе у *cis*- и у *trans*-оријентацији у односу на метил групу проп-1-ен фрагмента. Једињења **3b**, **4b** и **5b** поседују заједнички структурни фрагмент у виду метилестарске функционалне групе у *trans*-положају док се ацетил група, атом водоника и цијано група налазе у *cis*-положају. У структури деривата **6b**, ацетил групе се налазе у обе структурне оријентације према метил групи. Заједнички структурни фрагмент деривата **7b** и **8b** јесте карбоксилна група у *trans*-положају док је *cis*-положај ових деривата супституисан цијано и карбоксиметил групом.

У групи деривата кумарина **2-10c**, на С-3 остатку су присутне три основне функционалне групе: тиазолински прстен, *N*- и *S*-хетероароматични прстен са две двогубе везе, амино група, која са тиазолином чини аминотиазолинску структуру и супституисане *N*-фенил групе, изузев код деривата **7c** где је амино група супституисана са два етил остатка. Нарочита пажња усмерена је ка супституцији фенил остатка увођењем *o*-хидрокси и *p*-карбокси група у деривату **2c**, *p*- и *m*-нитро група у дериватима **3c** и **9c** и *p*-сулфо групе у деривату **4c** у циљу веће хидрофилности, односно задржавањем високог нивоа хидрофобности увођењем *o*- и *m*-метил група у дериватима **8c** и **5c** и нафтил групе у деривату **10c**, што је од битне важности за понашање ових једињења у *in vitro* и *in vivo* експериментима.

Табела 2. Структура С-3 остатака испитиваних деривата 4-хидроксикумарина

Кумарин (К)	С-3 остатак (R)	С-3 остатак (R)	
	<p><b>1</b></p> 		
	<p><b>2b</b></p> 	<p><b>2c</b></p> 	
	<p><b>3b</b></p> 	<p><b>3c</b></p> 	
	<p><b>4b</b></p> 	<p><b>4c</b></p> 	
	<p><b>5b</b></p> 	<p><b>5c</b></p> 	
	<p><b>6b</b></p> 	<p><b>6c</b></p> 	
	<p><b>7b</b></p> 	<p><b>7c</b></p> 	
	<p><b>8b</b></p> 	<p><b>8c</b></p> 	
			<p><b>9c</b></p> 
			<p><b>10c</b></p> 

### 3.2. Антимикробна активност деривата 4-хидроксикумарина испитивана у *in vitro* условима методом двоструког разблажења

У Табели 3 приказани су резултати антимикробне активности кумаринских деривата **1-8b** и **2-10c** на изабране културе бактерија и гљива.

У поређењу са стандардом стрептомицином (MIC=31,25 µg/mL), кумарински деривати **1-8b** показали су умерену до слабу антибактеријску активност са MIC вредностима у интервалу од 90-500 µg/mL за чисте културе, односно 940 µg/mL за изолат *S. aureus* (Табела 3).

Полазно једињење **1**, у положају C-3 супституисано ацетил групом, показало је најјачу активност на чисту културу *S. aureus* и најслабију активност код *S. aureus* изолата. Овако драстична разлика која се огледа у десет пута мањој активности код *S. aureus* изолата, показује да ацетил група не доприноси активности код G<sup>+</sup> бактерија, док је ацетил фармакофора ефикаснији инхибитор раста G<sup>-</sup> бактерија *E. coli* и *M. lysodeikticus* са MIC вредностима од 190 µg/mL.

Функционализацијом положаја C-3, најпре проп-1-ен структурним фрагментом а затим и надградњом фрагмента различито супституисаним карбонилним и карбоксилним фармакофорама, добила се делимична конзистентност у резултатима антимикробне активности деривата **2-8b**. Тако су сви **2-8b** деривати показали истоветан ниво активности код *S. aureus* (MIC=130 µg/mL) и слабију антимикробну активност код изолата исте културе, али већу активност у односу на полазно једињење **1**. Једињења **3b** и **4b**, која у *trans*-положају имају карбоксиметил остатке, показала су исти ниво активности код *E. coli* и *M. lysodeikticus* (MIC=130 µg/mL), док је трансформација *trans*-фармакофоре у ацетил облик код **6b**, довело до значајног, двоструког смањења активности код G<sup>-</sup> бактерија. Различита *cis*-функционализација, у истим једињењима, није доприносила повећању активности. Међутим, драстичан пад антимикробне активности јавља се код једињења **7b** према *E. coli* и *M. lysodeikticus* са MIC вредностима од 500 µg/mL. Ово једињење у *cis*-положају има цијано групу, а на месту *trans*-естарске групе присутна је карбоксилна група. Једињење **8b**, које у *cis* положају има метил-супституисану карбоксилну групу а у

*trans*-положају карбоксилну групу показало је исти ниво антибактеријске и антифунгалне активности.

Активност према гљиви показали су деривати **1**, **3b** и **8b**. Висок ниво активности примећен је код деривата **1** са MIC од 90 µg/mL (Табела 3), а изразито слабу антифунгалну активност имају деривати **4b** и **7b**.

Табела 3. MIC (µg/mL) вредности антимикуробне активности деривата **1-8b**

Једињења	Културе				
	<i>S. aureus</i>	<i>S. aureus</i> (FSB 30)	<i>M. lysodieticus</i>	<i>E. coli</i>	<i>C. albicans</i>
<b>1</b>	90±0,35 <sup>a</sup>	940±0,24	190±0,35	190±0,35	90±0,05
<b>3b</b>	130±0,22	500±0,76	130±0,34	130±0,34	130±0,15
<b>4b</b>	130±0,50	500±0,24	130±0,25	130±0,25	250±0,25
<b>6b</b>	130±0,45	130±0,34	250±0,55	250±0,55	130±0,15
<b>7b</b>	130±0,35	500±0,45	500±0,35	500±0,35	500±0,35
<b>8b</b>	130±0,26	130±0,62	130±0,35	130±0,35	130±0,55
C <sup>b</sup>	31,25±0,07	31,25±0,35	31,25±0,07	31,25±0,07	
K <sup>b</sup>					1,95±0,05

<sup>a</sup> Резултати представљају средњу вредност три мерења након 24 часа; <sup>b</sup>C=стрептомицин;

<sup>b</sup>K=кетоконазол

Зарад формирања квалитетних QSAR студија антимикуробне активности кумаринских деривата, осим резултата за једињења **1-8b** укључени су и претходно публиковани резултати антимикуробне активности једињења **2-10c** [119]. Резултати антимикуробне активности једињења **1-10c** према ATCC културама *S. aureus*, *E. coli* и *C. albicans* приказани су у Табели 3 и употребљени су за 1D-QSAR студије корелирањем са термодинамичким, електронским и стерним молекулским дескрипторима. Поређењем резултата структурно различитих деривата, може се закључити да су тиазолински деривати **2-10c** знатно активнији од једињења **1-8b**, али је ниво активности многоструко нижи у поређењу са стандардима.

Као вредности зависне варијабле, односно измерене биолошке активности, узети су негативни логаритми MIC, чије су вредности приказане у Табели 4. Вредности молекулских дескриптора приказаних у Табели 5 су добијени из излазних фајлова семи-емпиријске оптимизације.

Табела 4. MIC ( $\mu\text{g/mL}$ ) и  $-\text{Log MIC}$  вредности антимикуробне активности деривата **1-8b** и **2-10c** које су коришћене при развоју QSAR студија

Једињења	<i>S. aureus</i>		<i>E. coli</i>		<i>C. albicans</i>	
	MIC <sup>a</sup> (10 <sup>-6</sup> g/mL); -LogMIC					
<b>1</b>	90±0,35 <sup>a</sup>	4,046	190±0,35	3,721	90±0,05	4,406
<b>3b</b>	130±0,22	3,886	130±0,34	3,886	130±0,15	3,886
<b>4b</b>	130±0,50	3,886	130±0,25	3,886	250±0,25	3,602
<b>6b</b>	130±0,45	3,886	250±0,55	3,602	130±0,15	3,886
<b>7b</b>	130±0,35	3,886	500±0,35	3,301	500±0,35	3,301
<b>8b</b>	130±0,26	3,886	130±0,35	3,886	130±0,55	3,886
<b>2c</b>	125±0,25	3,904	250±0,55	3,602	62,5±0,55	4,204
<b>3c</b>	125±0,25	3,904	62,5±0,25	4,204	62,5±0,55	4,204
<b>4c</b>	62,5±0,29	4,204	62,5±0,10	4,204	62,5±0,15	4,204
<b>5c</b>	62,5±0,24	4,204	125±0,50	3,904	31,25±0,10	4,505
<b>6c</b>	250±0,35	3,602	125±0,35	3,904	62,5±0,15	4,205
<b>7c</b>	250±0,55	3,602	125±0,45	3,904	31,25±0,55	4,505
<b>8c</b>	250±0,36	3,602	250±0,12	3,602	125±0,15	3,904
<b>9c</b>	31,25±0,21	4,505	62,5±0,09	4,204	31,25±0,25	4,505
<b>10c</b>	125±0,38	3,903	125±0,25	3,904	62,5±0,55	4,204

<sup>a</sup> Резултати представљају средњу вредност три мерења

У светлу приказаних резултата антимикуробне активности може се закључити да је најактивније једињење **9c**, *m*-NO<sub>2</sub> *N*-тиазолински дериват, са MIC у интервалу од 31,25-62,5  $\mu\text{g/mL}$  (Табела 3). У групу активних деривата, осим **9c**, налазе се и деривати **1** и **3b**, најактивнији из прве групе испитиваних хемиотерапеутика.

### 3.3. QSAR студије антимикуробне активности

QSAR студије антимикуробне активности деривата **1-10c** извршене су линеарном регресионом анализом са више варијабли, MLR. Вредности молекулских дескриптора коришћених у анализи приказани су у Табелама 5 и 6. Статистичка анализа извршена је помоћу софтвера OriginPro 8 методом избацивања једне компоненте у регресионој анализи, односно, након извршене линеарне регресије извршена је анализа резултата међусобног поклапања  $-\text{LogMIC}$  и вредности молекулских дескриптора преко Student-ове *t*-вредности. Дескриптор са највишом вредношћу је елиминисан а преостали су подвргнути новој линеарној регресији све док није достигнута највиша *F* вредност.

Анализа вредности молекулских дескриптора довела је до даљег разумевања активности испитиваних деривата. Тако, разматрајући појам растворљивости тестираних једињења преко партиционог коефицијента, може се закључити да су једињења **1-8b** хидрофилна (негативна вредност  $\log P$ ) док су тиазолински деривати липофилни (позитивне вредности  $\log P$ ). Упоредивањем вредности добијене активности (Табела 4) са вредностима партиционог коефицијента (Табела 5) јасно се уочава да липофилна једињења показују већи ниво активности, што није тешко разумети услед њиховог олакшаног проласка кроз ћелијску мембрану и лакшег транспорта до циљног места, *ДНК гиразе*. Са електронског аспекта, једињења **2-10c** јесу нешто слабији нуклеофили од кондензата **1-8b**, али су као такви много активнији. Оно што се може закључити из вредности стерних параметара јесте да су тестирани молекули јако волуминозни и да као такви могу имати отежану интеракцију са циљним ензимом.

**Табела 5.** Вредности молекулских дескриптора деривата **1-10c** коришћених у QSAR судијама антимицробне активности

Једињење	$\log P$	MR	lipole	HOMO	LUMO	CAA	CMA	CSEV	ovality
<b>1</b>	-0,529	51,062	2,161	-9,989	-1,490	335,170	156,104	124,411	1,368
<b>3b</b>	-1,318	75,494	1,622	-10,015	-1,562	466,977	236,476	203,327	1,590
<b>4b</b>	-0,035	66,062	1,646	-9,958	-1,537	424,305	205,095	165,182	1,495
<b>6b</b>	-1,679	75,277	1,905	-9,977	-1,453	444,049	223,344	192,322	1,561
<b>7b</b>	-1,765	67,538	2,645	-10,040	-1,646	424,466	207,570	171,656	1,482
<b>8b</b>	-1,709	66,570	2,507	-10,037	-1,694	426,269	208,634	173,406	1,512
<b>2c</b>	1,216	96,238	0,557	-9,042	-1,449	566,431	291,664	246,339	1,645
<b>3c</b>	3,129	95,320	2,244	-9,003	-1,954	542,789	279,873	233,719	1,604
<b>4c</b>	0,702	65,468	1,415	-8,999	-1,621	572,035	296,286	249,537	1,654
<b>5c</b>	2,904	95,722	2,513	-8,900	-1,135	521,823	269,577	225,940	1,608
<b>6c</b>	1,921	88,488	0,281	-8,923	-0,936	552,855	279,213	230,128	1,680
<b>7c</b>	1,856	84,807	1,112	-8,890	-0,950	478,322	244,811	208,372	1,588
<b>8c</b>	3,380	93,722	2,552	-8,913	-1,072	521,339	268,518	225,738	1,604
<b>9c</b>	3,129	95,320	2,101	-8,972	-1,759	538,849	281,111	237,198	1,614
<b>10c</b>	3,603	104,966	3,169	-8,866	-1,231	558,547	292,497	247,999	1,641

У Табели 6 представљена су парцијална атомска наелектрисања кисеоника, азота и сумпора у функционалним групама за које се предпоставља да ће ступити у интеракције са молекулском метом, *ДНК гиразом*, изачуната квантно-механичком оптимизацијом. Овакав начин дефинисања фармакофоре у виду директне корелације наелектрисања

функционалне групе са биолошком активношћу је новијег типа и представља увод у 3D-QSAR методе.

**Табела 6.** Парцијална атомска наелектрисања појединих фармакофора деривата **1-10c** коришћена у QSAR студијама антимикуробне активности

Парцијална атомска наелектрисања фармакофора у једињењима										
<b>Фармакофоре</b>	<b>1</b>	<b>3b</b>	<b>4b</b>	<b>6b</b>	<b>7b</b>	<b>8b</b>				
<b>4-ОН</b>	-0,625	-0,646	-0,637	-0,648	-0,614	-0,625				
<b>О-лактон</b>	-0,523	-0,523	-0,522	-0,522	-0,515	-0,515				
<b>СО-лактон</b>	-0,474	-0,491	-0,493	-0,491	-0,473	-0,464				
<b>СО-карбонилна</b>	-0,456	-0,609	-0,604	-0,613 <sup>a</sup>		-0,513				
				0,225 <sup>a</sup>						
<b>СО-карбоксилна</b>		-0,743	-0,747	-0,745	-0,496	-0,488				
<b>ОН-карбоксилна</b>		-0,507	-0,492		-0,579	-0,586				
<b>CN</b>					-0,475					
<b>Фармакофоре</b>	<b>2c</b>	<b>3c</b>	<b>4c</b>	<b>5c</b>	<b>6c</b>	<b>7c</b>	<b>8c</b>	<b>9c</b>	<b>10c</b>	
<b>4-ОН</b>	-0,638	-0,644	0,204	-0,617	-0,675	-0,671	-0,646	-0,637	-0,648	
<b>О-лактон</b>	-0,522	-0,520	-0,114	-0,599	-0,531	-0,532	-0,523	-0,522	-0,522	
<b>СО-лактон</b>	-0,492	-0,490	-0,195	-0,499	-0,515	-0,516	-0,491	-0,493	-0,491	
<b>N-тиазол</b>	-0,582	0,604	-0,261	-0,681	-0,673	-0,659	-0,609	-0,604	-0,613	
<b>S-тиазол</b>	0,230	0,244	0,296	0,458	0,261	0,259	0,221	0,235	0,225	
<b>N-амин</b>	-0,750	-0,744	-0,262	-0,753	-0,610	-0,419	-0,743	-0,747	-0,745	
<b>СО-карбоксилна</b>	-0,467				-0,468					
<b>ОН-карбоксилна</b>	-0,582				-0,563					
<b>ОН-фенил</b>	-0,638									
<b>N-нитро</b>		-0,374						-0,386 <sup>b</sup>		
<b>O-нитро</b>		-0,400 <sup>b</sup>						-0,392 <sup>b</sup>		
		-0,401 <sup>b</sup>						-0,386		
<b>S-сулфо</b>			0,758							
<b>O-сулфо</b>			-0,282 <sup>b</sup>							
			-0,259 <sup>b</sup>							
<b>ОН-сулфо</b>			-0,256							

<sup>a</sup>Две карбонилне групе у једињењу **6b**; <sup>b</sup>Две O-нитро групе у једињењима **3c** и **9c**; <sup>b</sup>Две O-сулфо групе у једињењу **4c**.

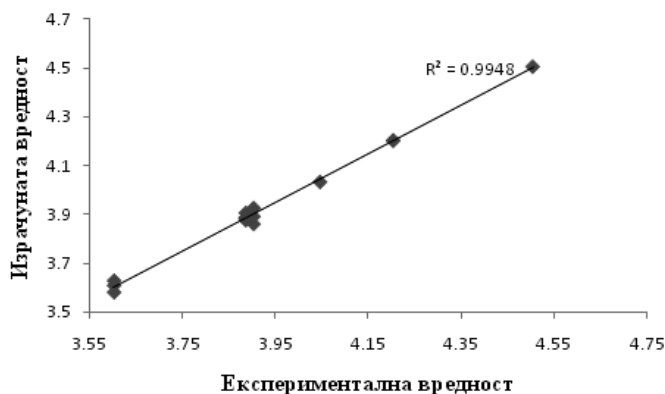
Резултат линеарне регресионе анализе са више варијабли представљен је у статистички значајним QSAR моделима активности код *S. aureus*, *E. coli* и *C. albicans*. Ове културе су изабране као најчешћи узрочници инфекција микроорганизама, односно због све веће резистенције које развијају на антибиотике и хемиотерапеутике.

QSAR студија антимиотробне активности код *S. aureus*:

$$\begin{aligned}
 -\text{Log MIC} = & 18,2669(\pm 2,82) - 0,0701(\pm 0,01) \times \text{MR} - 0,3670(\pm 0,03) \times \log P \\
 & + 1,0871(\pm 0,30) \times \text{НОМО} - 0,1682(\pm 0,01) \times \text{CAA} - 0,5095(\pm 0,02) \times \text{CMA} \\
 & - 7,8116(\pm 0,76) \times \text{O-лактон} + 1,6749(\pm 0,44) \times \text{N-тиазол} \\
 & - 1,4266(\pm 0,23) \times \text{S-тиазол} - 0,2159(\pm 0,01) \times \text{CSEV} \quad (29)
 \end{aligned}$$

$$n=15 \quad r=0,997 \quad s=0,03 \quad F=104,2987 \quad Q^2=0,995 \quad s\text{-PRESS}=0,005$$

Једначина којом се описује активност на *S. aureus* (29) јако је специфична управо за ову културу, на шта нам указује позитивна вредност испред 18.2669, на почетку једначине. Позитивни утицаји енергије НОМО орбитале и наелектрисања азотовог атома из тиазолинског прстена наглашавају да нуклеофилност кумаринских деривата има велики значај за активност. Међутим, негативни предзнаци испред моларне рефрактивности и осталих стерних дескриптора, указују на неповољну просторну оријентацију С-3 остатка при интеракцији са ДНК *гиразом*. Модел је статистички врло значајан:  $F=104,2987$ ,  $r$  (99,7%). На Слици 24 престављен је график односа експерименталне и израчунате активности деривата **1-10c** код *S. aureus*.



**Слика 24.** Корелација експерименталних и израчунатих вредности антимиотробне активности деривата **1-10c** код *S. aureus*

Валидација QSAR методе врши се конструисањем корелационе матрице активности и молекулских дескриптора (Табела 7) и приказом односа експериментално добијене и израчунате вредности биолошке активности (Табела 8). Формирањем графика



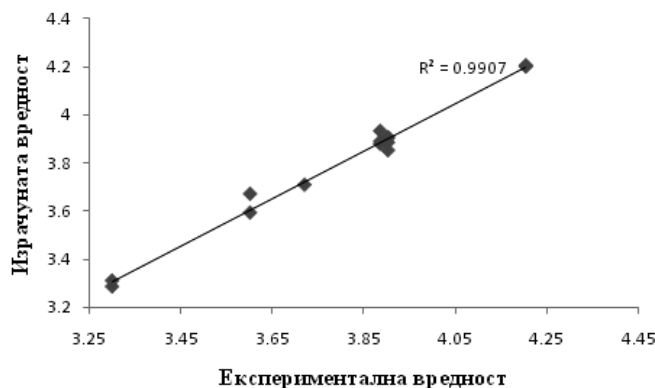
односа експерименталних и израчунатих резултата дефинише се потенцијал QSAR модела у предвиђању активности нових, структурно сличних али не и експериментално потврђених, једињења.

QSAR студија антимицробне активности код *E. coli*:

$$\begin{aligned}
 -\text{Log MIC} = & 18,5685(\pm 1,95) + 0,9195(\pm 0,12) \times \log P - 0,1766(\pm 0,04) \times \text{lipole} \\
 & - 0,8233(\pm 0,15) \times \text{virtual log } P + 1,0722(\pm 0,12) \times \text{LUMO} \\
 - & 0,0270(\pm 0,01) \times \text{CAA} + 7,0623(\pm 1,39) \times 4\text{-OH} - 8,4340(\pm 1,84) \times \text{CO-лактон} \\
 & - 1,4566(\pm 0,69) \times N\text{-амин} + 1,7931(\pm 0,81) \times N\text{-тиазол} \\
 & - 0,6662(\pm 0,47) \times S\text{-тиазол} - 22,4376(\pm 1,83) \times \text{ovality} \quad (30) \\
 n=15 \quad r=0,995 \quad s=0,059 \quad F=28,8394 \quad Q^2=0,991 \quad s\text{-PRESS}=0,011
 \end{aligned}$$

Као и претходна, једначина (30) је врло специфична. Значајно је и то што на активност тестираних деривата код *E. coli* значајну улогу има и њихова растворљивост што је назначено позитивним предзнаком испред **log P**, за разлику од негативног утицаја растворљивости код G+ културе. Резултат није тешко разумети обзиром на чињеницу да је ћелијски зид G- култура делом изграђен и од липидне компоненте а повећана липофилност деривата доприноси олакшаном пролазу кроз мембрану, до цитоплазме. Супротно, зидови G+ бактерија немају липидну компоненту у својој структури због чега фактор растворљивости није битан за активност испитиваних једињења. Наелектрисања хидроксилне групе на положају 4 и азотовог атома из тиазолина значајно доприносе активности код *E. coli*. Овакав утицај поменутих фармакофора представља их као могуће центре активности кумаринских деривата у интеракцији са ензимом *ДНК гиразом*. Сличан утицај квантификован је и у активности код *S. aureus*. Корелациони фактор између активности и наелектрисања  $Q_{4\text{-OH}}$  јесте  $r_{4\text{-OH}} = 0.603$ . Нешто мање негативан утицај него у моделу 1. има наелектрисање атома сумпора из тиазолина са корелационим коефицијентом  $r_S = 0.942$ . Оно што је занимљиво јесте да у оба наведена модела није забележен утицај фармакофора из остатка **1-8b** деривата, што одлично кореспондира са њиховом ниском активношћу. Код активности деривата кумарина на *E. coli* приметан је утицај електрофилног карактера деривата. Само партиципирање НОМО/LUMO енергија у QSAR једначинама нам говори да у интеракцији са циљним ензимом дефинитивно долази

до трансфера електрона. Такође, изражен је и неповољан стерни утицај који је нарочито наглашен са јако негативним коефицијентом испред дескриптора **ovality**. Модел је статистички значајан:  $F=28,8394$ ,  $r$  (99,5%). На Слици 25 је представљен график односа експерименталне и израчунате активности деривата **1-10c** код *E. coli*.

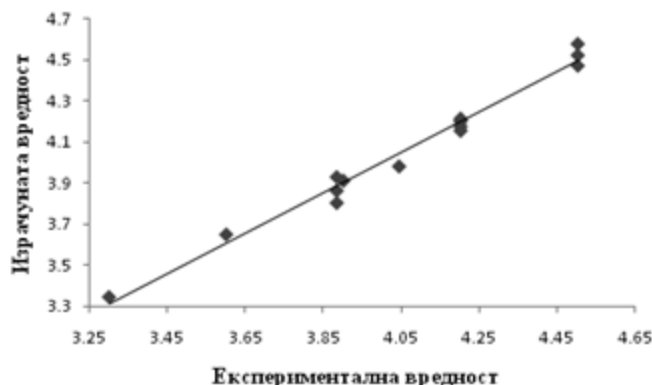


Слика 25. Корелација експерименталних и израчунатих вредности антимицробне активности деривата **1-10c** код *E. Coli*

QSAR студија антимицробне активности код *C. albicans*:

$$\begin{aligned}
 -\text{Log MIC} = & -3,3032(\pm 1,43) + 0,9667(\pm 0,10) \times \log P - 1,1485(\pm 0,13) \times \text{НОМО} \\
 & - 0,5781(\pm 0,10) \times \text{LUMO} - 0,054(\pm 0,01) \times \text{CAA} + 0,0713(\pm 0,01) \times \text{CMA} \\
 & - 0,6944(\pm 0,24) \times 4\text{-OH} + 1,2423(\pm 0,31) \times \text{S-тиазол} \\
 & + 10,2506(\pm 1,41) \times \text{ovality} \quad (31) \\
 n=15 \quad r=0,991 \quad s=0,068 \quad F=42,6548 \quad Q^2=0,983 \quad s\text{-PRESS}=0,028
 \end{aligned}$$

Једначина (31) представља дескрипцију антифунгалне активности. Сама једначина није специфична, мада јесте статистички значајна ( $F=42,6548$ ,  $r$  (99,1%)), те се као таква може узети као валидна. Антифунгална активност тестираних деривата значајно зависи од њихове растворљивости. У једначини (31) се први пут уочавају и позитиван утицај стерне оријентације С-3 остатка као и наелектрисања атома сумпора из тиазолинског прстена. На овај начин се потврђује изузетно велики утицај тиазолинске фармакофоре на укупну активност. На Слици 26 је представљен график односа експерименталне и израчунате активности деривата **1-10c** код *C.albicans*.



Слика 26. Корелација експерименталних и израчунатих вредности антимицробне активности деривата **1-10c** код *S.albicans*

У Табели 7 су приказани међусобни утицаји свих дескриптора и њихов утицај на активност деривата **1-10c** и даља валидација успостављених QSAR модела.

Табела 7. Корелациона матрица мерене антимицробне активности и молекулских дескриптора деривата **1-10c**

	<sup>a</sup> Д1	Д2	Д3	Д4	Д5	Д6	Д7	Д8	Д9	Д10	Д11	Д12	Д13	Д14	<sup>b</sup> К1	К2	К3
Д1	1,00																
Д2	0,43	1,00															
Д3	0,35	0,99	1,00														
Д4	0,39	0,35	0,25	1,00													
Д5	0,77	0,54	0,46	0,45	1,00												
Д6	0,64	0,59	0,43	0,46	0,98	1,00											
Д7	0,35	0,43	0,47	0,44	0,96	0,96	1,00										
Д8	0,56	0,37	0,11	0,78	0,37	0,19	0,23	1,00									
Д9	0,12	0,6	0,66	0,12	0,54	0,43	0,46	0,00	1,00								
Д10	0,28	0,95	0,89	0,23	0,62	0,61	0,22	0,00	0,94	1,00							
Д11	0,11	0,72	0,68	0,27	0,63	0,64	0,58	0,00	0,36	0,44	1,00						
Д12	0,29	0,47	0,34	0,61	0,15	0,15	0,19	0,00	0,18	0,19	0,36	1,00					
Д13	0,36	0,44	0,95	0,25	0,31	0,37	0,31	0,00	0,62	0,55	0,34	0,95	1,00				
Д14	0,13	0,78	0,66	0,14	0,72	0,74	0,64	0,15	0,73	0,78	0,66	0,23	0,47	1,00			
К1	0,45	0,52	0,94	0,00	0,44	0,53	0,57	0,00	0,00	0,84	0,32	0,36	0,96	0,66	1,00		
К2	0,77	0,00	0,00	0,88	0,94	0,51	0,53	0,96	0,54	0,26	0,58	0,21	0,19	0,34	0,55	1,00	
К3	0,75	0,00	0,00	0,96	0,12	0,35	0,15	0,93	0,24	0,00	0,00	0,00	0,00	0,10	0,52	0,75	1,00

<sup>a</sup>Д1 *log P*; Д2 *MR*; Д3 *HOMO*; Д4 *LUMO*; Д5 *САА*; Д6 *СМА*; Д7 *CSEV*; Д8 *ovality*; Д9 *4-OH*; Д10 *O-лактон*; Д11 *СО-лактон*; Д12 *N-амин*; Д13 *N-тиазол*; Д14 *S-тиазол*;

<sup>b</sup>К1 *S. aureus*; К2 *E. coli*; К3 *C. albicans*

Сумарно, резултати QSAR студија у корелацији са експерименталним резултатима антимикуробне активности приказани су у Табели 8.

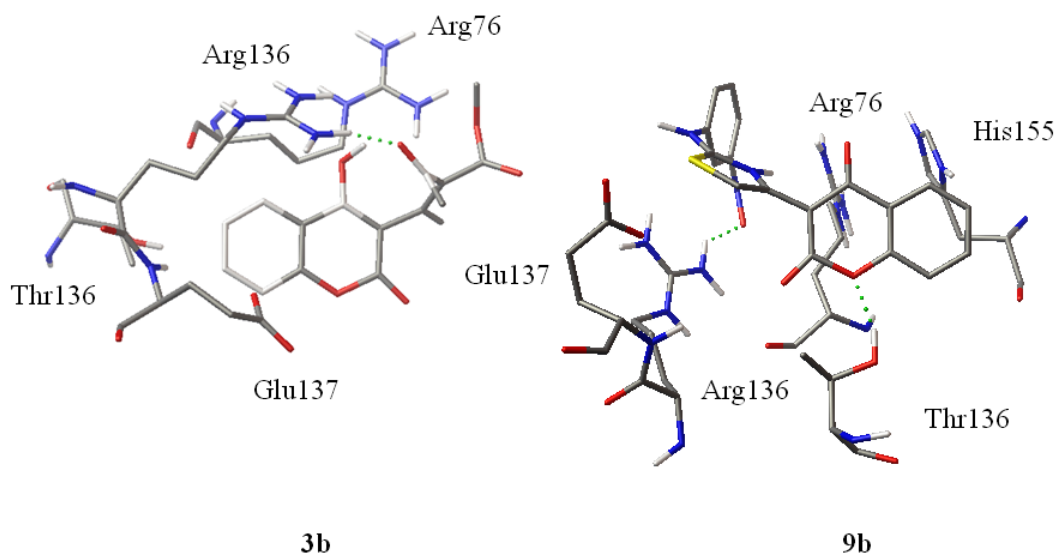
**Табела 8.** Поређење MIC експерименталних резултата антимикуробне активности деривата **1-10c** са резултатима QSAR студија

Једињење	<i>S. aureus</i>		<i>E. coli</i>		<i>C. albicans</i>	
	Експерим.	Израчун.	Експерим.	Израчун.	Експерим.	Израчун.
<b>1</b>	90±0,35 <sup>a</sup>	103	190±0,35	195	90±0,05	92
	4,046 <sup>b</sup>	3,984	3,721	3,708	4,046	4,035
<b>3b</b>	130±0,22	156	130±0,34	132	130±0,15	130
	3,886	3,806	3,886	3,878	3,886	3,885
<b>4b</b>	130±0,50	222	130±0,25	129	250±0,25	132
	3,886	3,625	3,886	3,888	3,602	3,878
<b>6b</b>	130±0,45	116	250±0,55	255	130±0,15	129
	3,886	3,932	3,602	3,592	3,886	3,889
<b>7b</b>	130±0,35	112	500±0,35	519	500±0,35	124
	3,886	3,947	3,301	3,284	3,301	3,908
<b>8b</b>	125±0,26	136	130±0,35	117	130±0,55	130
	3,886	3,865	3,886	3,932	3,886	3,886
<b>2c</b>	125±0,25	62,5	250±0,55	491	62,5±0,55	137
	3,904	4,206	3,602	3,309	4,204	3,862
<b>3c</b>	125±0,25	60	62,5±0,25	62,5	62,5±0,55	145
	3,904	4,217	4,204	4,204	4,204	3,839
<b>4c</b>	62,5±0,29	62,5	62,5±0,10	62,6	62,5±0,15	63
	4,204	4,204	4,204	4,203	4,204	4,205
<b>5c</b>	62,5±0,24	33,5	125±0,50	124	31,25±0,10	62
	4,204	4,475	3,904	3,906	4,505	4,205
<b>6c</b>	250±0,35	66	125±0,35	125	62,5±0,15	234
	3,602	4,179	3,904	3,902	4,205	3,630
<b>7c</b>	250±0,55	26,2	125±0,45	131	31,25±0,55	245
	3,602	4,581	3,904	3,884	4,505	3,610
<b>8c</b>	250±0,36	121	250±0,12	214	125±0,15	262
	3,602	3,914	3,602	3,670	3,904	3,582
<b>9c</b>	31,25±0,21	30	62,5±0,09	63,1	31,25±0,25	31
	4,505	4,526	4,204	4,200	4,505	4,508
<b>10</b>	125±0,38	69,5	125±0,25	141	62,5±0,55	118
	3,903	4,158	3,904	3,851	4,204	3,928

<sup>a</sup>MIC вредности; <sup>b</sup>-Log MIC вредности

Изведене QSAR студије показале су да растворљивост деривата, односно лакоћа њиховог проласка кроз ћелијски зид има великог значаја на активност код *E. coli* и *C. albicans* а даља тумачења резултата базирана су на интеракцији кумарина са ДНКгиразом.

Кристалографски подаци комплекса новобиоцина и хлоробиоцина са ДНК *гиразом* показују да се у интеракцији антибиотика са р24 сегментом *N*-терминалног домена Б-субјединице ензима формирају само две водоничне везе између језгра кумарина и Arg136 и то преко лактонске структуре. Студије молекулског доковања на тестираним дериватима који не садрже молекул шећера изведене су за три једињења: на деривату **1** као полазном при синтези, као и на **3b** и **9c** као најбољим представницима својих група. При том су циљане интеракције С-3 остатка, преваходно са Arg136, да би се анализа ограничила строго на кумаринску структуру а за чију је намену конформациони простор ограничен на три аминокиселине из активног центра: Arg76, Pro79 и Arg136. Резултати конформационе анализе представљени су на Слици 27. Оријентације преосталих аминокиселина из активног центра *гиразе* Glu50, Arg76 и Pro79 око тестираних деривата биле су у сагласности са кристалографским подацима.



Слика 27. Конформација најактивнијих деривата кумарина **3b** и **9c** у активном центру ДНК *гиразе*

У својој енергетски најповољнијој конформацији (потврђеној након изведеног *clustering-a*), једињење **1** гради са Arg136 само једну водоничну везу и то преко лактонског кисеоника са NH<sub>2</sub> делом гуанидо групе аминокиселине. У питању је слаба водонична интеракција са дужином од 2,214 Å. Као последица оваквог везивања, предвиђена константа инхибиције једињења **1** је  $K_i=3,67$  mM.

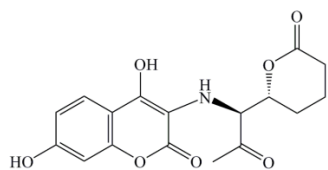
Једињење **3b** у интеракцији са активним центром такође остварује само једну водоничну везу, али преко свог С-3 остатка, тако што се кисеоник из ацетил групе везује за аминокиселину гуанидо групу Arg136 (Слика 27). Оваква, јака водонична веза, дужине 1,768 Å, заједно са стабилизацијом кумаринског језгра слабир интеракцијама са Thr163, условила је и јачу инхибиторску активност **3b** са константом инхибиције од  $K_i=1,5$  mM. Надаље, гуанидо група аминокиселине са С-5 атомом кумаринског језгра формира *pi*-катјон интеракцију, што додатно повећава активност **3b** у односу на **1**.

Најјактивније једињење **9c** (Табела 3) поседује два доворска центра за формирање водоничних веза са ензимом. Прва, слабија водонична веза остварена је између кисеоника лактонске структуре кумарина и аминокиселине која до сада није нотирана као активни центар, Thr163. Веза се остварује са хидроксилом групом R остатка аминокиселине и дужине је 2,027 Å (Слика 27). Друга водонична веза дужине 1,879 Å формирана је између једног кисеоника из *m*-NO<sub>2</sub> групе фармакофора супституента и гуанидо функције Arg136. Додатна јонска интеракција остварена је између атома сумпора из тиазолинског прстена и карбоксилног остатка Glu137. Врло повољно „паковање” деривата **9c** у активном центру ензима условило је ниску вредност константе инхибиције од 947,82 μM. Велика разлика у активности у односу на **1** и **3b** може се приписати и постојању додатне водоничне везе.

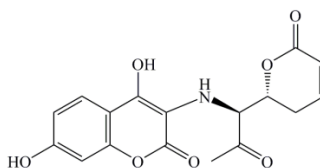
Наведеном просторном оријентацијом активних фармакофора тестираних једињења, на одличан начин су потврђене извршене SAR и QSAR студије.

На основу значајних информација добивених из SAR, QSAR и студија молекулског доковања, извршено је дизајнирање десет нових једињења **1-10d** са знатно побољшаним предвиђеним MIC и  $K_i$  вредностима (Схема 20). Дизајн је био усмерен ка изостављању остатка новобиозе, увођењу додатне хидроксилене групе на положају С-7, која би активирала ароматични део молекула, те додатну структурну модификацију С-3 остатка. Тако је структурно нефаворизирана проп-1-ен-2-ил фармакофора модификована увођењем активних азотових и сумпорних биоизостера, док су карбонилне и карбоксилне функционалне групе преведене у различите кисеоничне цикличне структуре у светлу чињенице да су управо цикличне структуре допринеле већој активности деривата из **c** групе. Принципи тиазолинског остатка су задржани, уз одговарајуће структурне модификације. Сва дизајнирана једињења су компјутационо оптимизирана на истоветан

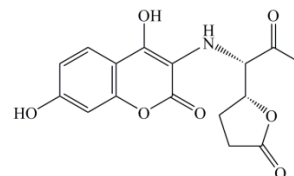
начин тестираним агенсима, те су добијене вредности молекулских дескриптора и парцијалних атомских наелектрисања замењене у постојећим QSAR једначинама у интерфејсу софтвера OriginPro. За поновно израчунавање биолошке активности линеарном регресионом анализом са више варијабли коришћена је опција *RECALCULATE* (енг. поново израчунати, прерачунати).



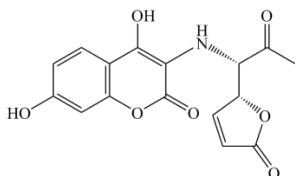
**1d**  $K_i = 7.87 \mu\text{M}$ ; MIC = 10  $\mu\text{g/mL}$



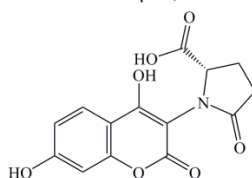
**2d**  $K_i = 23.06 \mu\text{M}$ ; MIC = 15  $\mu\text{g/mL}$



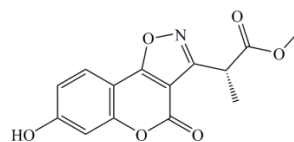
**3d**  $K_i = 428.36 \mu\text{M}$ ; MIC = 25  $\mu\text{g/mL}$



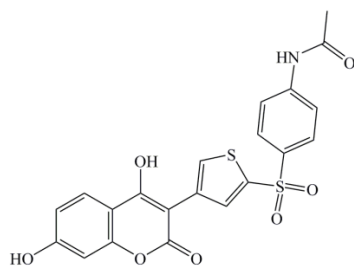
**4d**  $K_i = 38.96 \mu\text{M}$ ; MIC = 10  $\mu\text{g/mL}$



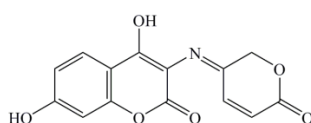
**5d**  $K_i = 96 \mu\text{M}$ ; MIC = 25  $\mu\text{g/mL}$



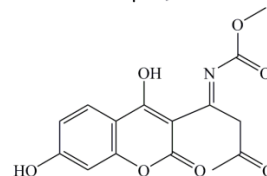
**6d**  $K_i = 128 \mu\text{M}$ ; MIC = 18  $\mu\text{g/mL}$



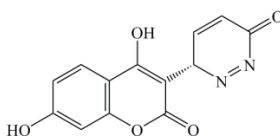
**7d**  $K_i = 90.06 \mu\text{M}$ ; MIC = 3  $\mu\text{g/mL}$



**8d**  $K_i = 284.54 \mu\text{M}$ ; MIC = 15  $\mu\text{g/mL}$



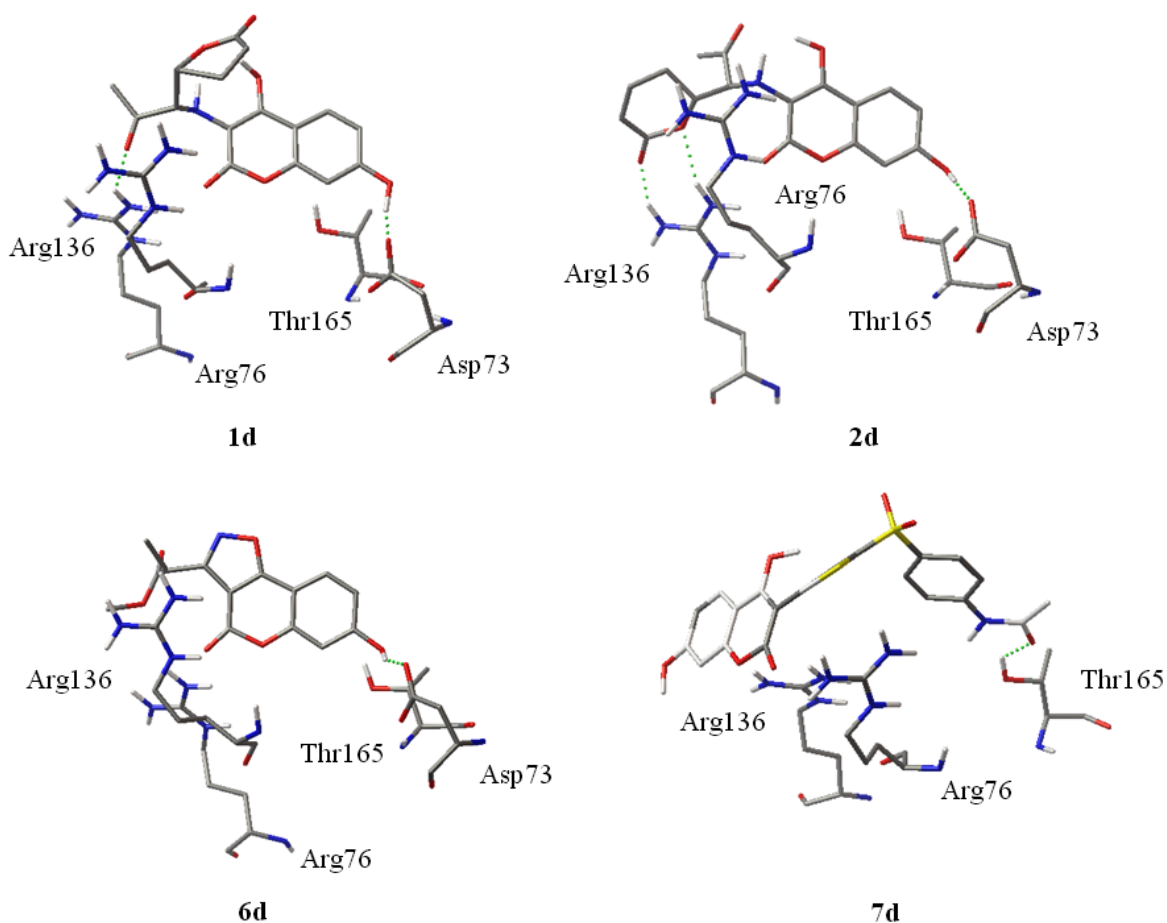
**9d**  $K_i = 47.55 \mu\text{M}$ ; MIC = 15  $\mu\text{g/mL}$



**10d**  $K_i = 275.18 \mu\text{M}$ ; MIC = 7.5  $\mu\text{g/mL}$

**Схема 20.** Дизајнирани кумарински деривати са предвиђеним вредностима антимикробне активности

Ниво предвиђене активности био је у интервалу MIC=3-25  $\mu\text{g/mL}$  односно, активност ових структура је многоструко већа. Након добијених резултата, најактивнија дизајнирана једињења су подвргнута молекулском доковању чији су резултати представљени на Слици 28.



Слика 28. Конформација најактивнијих дизајнираних деривата кумарина **1d**, **2d**, **5d** и **7d** у активном центру ДНК *гиразе*

Једињење које се показало као добар кандидат за будућу синтезу јесте **7d**, са предвиђеним вредностима  $K_i=90,06 \mu\text{M}$  и  $\text{MIC}=3 \mu\text{g/mL}$ , формирало је са р24 фрагментом молекулске мете једну водоничну везу и то између кисеоника из *p*-*N*-ацетил остатка и Thr165, дужине  $2,169 \text{ \AA}$ . Наредно једињење по активности, **1d**, са вредностима  $K_i=7,87 \mu\text{M}$  и  $\text{MIC}=10 \mu\text{g/mL}$ , наградило је две водоничне везе са ензимом. Прва је формирана између карбонилног остатка и Arg136, дужине  $2,185 \text{ \AA}$ , док је друга остварена између хидроксилне групе на положају С-7 и карбоксилног дела Asp73. Велика јачина ове везе, дужине  $1,653 \text{ \AA}$ , оправдава увођење додатне хидроксилне групе. Повећан број водоничних веза које са ензимом гради **2d**, једна 7-ОН $\cdots$ Asp73 ( $d=2,072 \text{ \AA}$ ) и две интеракције између Asp136 и оба кисеоника лактонске структуре ( $d=1,779; 2,249 \text{ \AA}$ ), повећавају предвиђену



активност овог агенса ( $K_i=23,06 \mu\text{M}$ ;  $\text{MIC}=15 \mu\text{g/mL}$ ). Надаље, формирање водоничних веза преко уведене 7–хидроксилне групе једињења **5d** ( $K =96 \mu\text{M}$ ;  $\text{MIC}=25 \mu\text{g}/\mu\text{M}$ ) и **6d** ( $K_i=128 \mu\text{M}$ ;  $\text{MIC}=18 \mu\text{g/mL}$ ,  $d=1,788\text{\AA}$ ) са Asp73, као и електростатичке интеракције прстена оксазола и Arg136 забележене код **6d**, повећале су антимикуробну активност ових дизајнираних једињења. Кумарин **10d** поседује изузетно велики антимикуробну активност, али малу константу инхибиције, па се његова активност не би могла објаснити формирањем 7-OH $\cdots$ Arg136 везе.

### 3.4. Антиоксидативна активност деривата 4-хидроксикумарина испитивана у *in vitro* условима

Антиоксидативна активност деривата **1-10c** је за потребе израде ове дисертације први пут испитивана, низом примењених метода. У Прилогу 2 приказане су Табеле 17-24 са експерименталним вредностима апсорбанци и процентима инхибиције раствора тестираних деривата, док су у Табелама 9 и 10 представљене вредности антиоксидативног потенцијала као  $\text{EC}_{50}$  вредности.

#### 3.4.1. Укупан антиоксидативни потенцијал

Резултати антиоксидативне активности приказани су као вредности еквивалената аскорбинске киселине, односно у облику  $\text{EC}_{50}$  (за потребе развоја QSAR студија, Табела 8). У Прилогу 2, Табела 17, приказане су бројне вредности измерених апсорбанци при одређивању тоталне антиоксидативне активности на основу којих су израчунати еквиваленти аскорбата (једначина 10) и проценти инхибиције и  $\text{TAC}_{50}$  вредности на основу једначина (12) и (13).

Резултати укупне антиоксидативне активности се уобичајено приказују као еквиваленти аскорбинске киселине, стога је израчуната линеарна функционална зависност (на основу једначине 10) концентрације аскорбинске киселине у односу на апсорбанце стандардних раствора аскорбата припремљених двоструким разблажењем. Из једначине:

$$Y_i = 371,52917X_i + 3,86214$$

израчунавају се  $\mu\text{gE}_{\text{Asc}}/\text{mL}$  за сва тестирана једињења. Заменом вредности апсорбанце  $X_i$  раствора тестираних кумарина добија се активност кумарина изражена као  $\mu\text{gE}_{\text{Asc}}/\text{mL}$ , а резултати су приказани у Табели 9.

Ниво активности кумаринских деривата био је у опсегу  $\text{TAC}=26,76\text{-}742,67 \mu\text{gE}_{\text{Asc}}/\text{mL}$ . Једињење **1** показало је умерену способност редукције молибдена са вредношћу тоталне антиоксидативне активности од  $121,46 \mu\text{gE}_{\text{Asc}}/\text{mL}$ .

Најактивније једињење из прве групе тестираних деривата било је **7b**, у *cis* положају супституисано цијано групом, са вредношћу тоталног антиоксидативног капацитета од  $\text{TAC}=324,01 \mu\text{gE}_{\text{Asc}}/\text{mL}$ . Супституцијом цијано групе са карбоксиетил (**2b**;  $278,24 \mu\text{gE}_{\text{Asc}}/\text{mL}$ ) и ацетил групом (**6b**;  $212,12 \mu\text{gE}_{\text{Asc}}/\text{mL}$ ), активност је значајно смањена. Тотална антиоксидативна активност прве групе једињења може се представити у опадајућем низу: **7b**>**2b**>**6b**>**4b**>**1**>**8b**>**3b**.

Најактивнији представник друге групе, *N*-тиазол деривата **2-10c**, јесте *p*-сулфо дериват **4c**, са истовремено измереном највишом активношћу у обе групе од  $742,67 \mu\text{gE}_{\text{Asc}}/\text{mL}$ . Антиоксидативни потенцијал овог деривата пратили су дериват *o*-хидроксибензојеве киселине **2c**, толил деривати **5c** и **8c**, те *N,N*-диетил дериват **7c** са опсегом активности од  $198,84\text{-}514,24 \mu\text{gE}_{\text{Asc}}/\text{mL}$ . Генерално, активност друге групе деривата може се представити на следећи начин: **4c**>**2c**>**7c**>**8c**>**6c**>**3c**>**9c**>**10c**.

### 3.4.2. Одређивање способности неутрализације DPPH радикала

Присуство једног неспареног електрона узрок је интензивно љубичастог обојења DPPH радикала са максимумом апсорбције на 517 nm. Антиоксиданти реагују са стабилним DPPH<sup>•</sup> радикалом и трансформишу га у 1,1-дифенил-2-(2,4,6-тринитрофенил)-хидразин који је светло-жуте боје (Схема 21). Ниво обезбојавања раствора DPPH<sup>•</sup> радикала указује на обим способности везивања радикала, односно антиоксидативни потенцијал једињења [150].

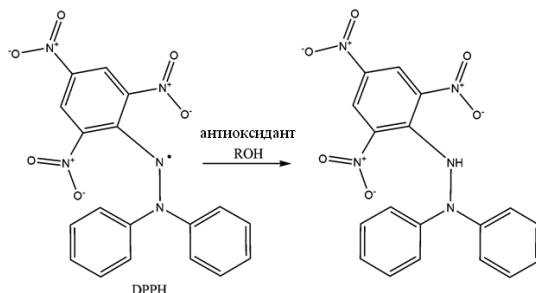


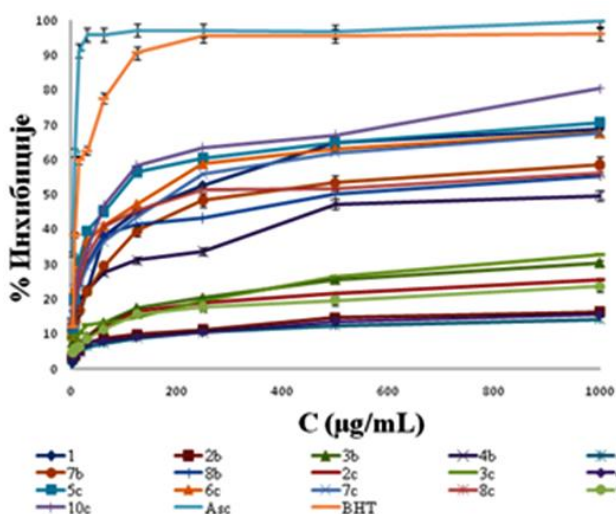
Схема 21. Механизам неутрализације DPPH<sup>•</sup> радикала антиоксидантом

Проценти инхибиције израчунати су на основу вредности измерених апсорбанци (Прилог 2, Табеле 18 и 19) при неутрализацији DPPH радикала након 30 и 60 минута, користећи једначину (11), док су IC<sub>50</sub> вредности (Табела 9) израчунате помоћу једначине (13). Што је IC<sub>50</sub> вредност мања, активност антиоксиданта је израженија. Вредност активности аскорбинске киселине после 30 минута и 60 минута била је IC<sub>50</sub>=24,17 и IC<sub>50</sub>=15,61 µg/mL, док су вредности активности ВНТ-а биле 8.62 и 6,05 µg/mL.

Способност неутрализације DPPH радикала деривата **1-8b** после 30 минута приказана је низом **6b>2b>8b>4b>3b>1>7b**. Највећу способност неутрализације радикала показало је једињење **6b** са измереном активношћу од IC<sub>50</sub>=5,14 µg/mL а чији је потенцијал предаје протона са хидроксилне групе у положају 4 увећан присуством две ацетил групе које супституишу С-3 проп-1-ен фрагмент. Антиоксидативни потенцијал кумарина **2b** благо је умањен у односу на **6b** увођењем две карбоксиетил функционалне групе у структуру С-3 остатка те је нотирана активност износила IC<sub>50</sub>=6,2 µg/mL. Значајно умањење активности измерено је код **3b**, **4b** и **8b**, деривата чији су *cis* положаји супституисани карбоксиметил или карбокси групама, док су у *trans* положају били различито дериватизовани. Антиоксидативни потенцијал ових деривата изражен је са IC<sub>50</sub> вредношћу мањом од 50 µg/mL. Замена самог проп-1-ен остатка ацетил групом код полазног кумарина **1**. још више је умањила активност. Најслабија способност неутрализације DPPH радикала уочена је код **7b** што се може објаснити присуством *cis*-цијано групе која својим негативним резонанционим ефектом драстично умањује лакоћу одпуштања протона ка радикалу. У наведеном временском интервалу, присуство симетричних фармакофора у структури С-3 остатка (**6b**, **2b**) изузетно је допринело високој антиоксидативној активности. Са продужетком времена интеракције кумарина са DPPH,

**6b** је задржало висок ниво инхибиције радикала док је антиоксидативна моћ деривата **3b**, **4b** и **8b** вишеструко увећана и измерена је у интервалу  $IC_{50}=8,8-11,28 \mu\text{g/mL}$ . Присуство *cis* ацетил фармакофоре (**3b**) у односу на *cis* атом водоника (**4b**) допринело је већој активности.

Антиоксидативна активност једињења **2-10c** била је условљена супституцијом тиазол-*N*-фенил групе и приказана је следећим поређењем: **4c**>**2c**>**9c**>**3c**>**5c**. Преостали деривати приказали су неупоредиво мању активност. Тако, присуство *p*-SO<sub>3</sub>H групе условило је најлакши трансфер протона са 4-ОН групе **4c** на DPPH, те је **4c** у оба временска интервала показало изузетан ниво активности са вредностима  $IC_{50}=4,72 \mu\text{g/mL}$  (30 мин)  $IC_{50}=3,54 \mu\text{g/mL}$  (60 мин). Висок ниво неутрализације радикала једињењем **2c** последица је интеракције радикала са две слободне хидроксилне групе (4-ОН и *o*-ОН) и, због повећаног броја хидроксилних група, привидно фенолне структуре деривата. Услед наведених структурних погодности, измерене вредности **2c** биле су  $IC_{50}=4,9 \mu\text{g/mL}$  и  $6,97 \mu\text{g/mL}$ . Међутим, упркос повољој структури, једини пад у активности након 60 мин забележен је управо код **2c**. Једињење **9c**, *m*-NO<sub>2</sub> дериват, свој пуни антиоксидативни потенцијал показао је након 60 мин са вредностима  $IC_{50}=4.79 \mu\text{g/mL}$ , те је по завршетку теста окарактерисано као јачи антиоксидант од **2c**. Антиоксидативну активност нису приказали *N*-толил (**5c** and **8c**) и *N,N*-диетил (**7c**) деривати.



Слика 29. График зависности инхибиције DPPH радикала у односу на концентрацију деривата **1-10c** након 60 минута

На Слици 29 приказана је зависност процената инхибиције у односу на концентрацију после 60 минута, јер је у том интервалу уочена већа антиоксидативна активност.

Способност неутрализације DPPH радикала може се сумарно изразити следећим релацијама (Табела 9): након 30 минута антиоксидативна активност опадала је у низу **4c>2c>6b>2b>ВНТ>9c>Asc**, а продужено реакционо време даје активност у редоследу: **6b>4c>2b>9c>ВНТ>2c>3c>Asc**.

Ради прегледности, резултати тоталне антиоксидативне активности представљени су као IC<sub>50</sub> вредности (µg/mL аскорбинске киселине) и TAC<sub>50</sub> (способност неутрализације DPPH радикала) представљени су у Табели 9.

**Табела 9.** Тотална антиоксидативна активност деривата **1-10c** и способност неутрализације DPPH радикала

Једињење	<sup>a</sup> TAC (µg/mL)	<sup>b</sup> TAC <sub>50</sub> (µg/mL)	<sup>b</sup> IC <sub>50</sub> (µg/mL)	
			30 min	60 min
<b>1</b>	121,46±0,28 <sup>f</sup>	97,45±0,31	133,70±0,24	87,47±0,24
<b>2b</b>	278,24±0,36	47,65±0,24	6,2±0,11	4,6±0,26
<b>3b</b>	54,08±0,76	197,62±0,21	44,93±0,16	8,80±0,14
<b>4b</b>	138,32±0,87	84,57±0,65	41,64±0,14	9,93±0,22
<b>6b</b>	212,12±0,26	50,59±0,12	5,14±0,06	2,45±0,17
<b>7b</b>	324,01±0,28	35,69±0,17	246,63±0,31	135,01±0,31
<b>8b</b>	106,64±0,15	99,71±0,28	37,76±0,21	11,28±0,19
<b>2c</b>	514,24±0,64	33,35±0,24	4,94±0,08	6,97±0,25
<b>3c</b>	86,14±0,95	132,66±0,16	29,07±0,04	9,22±0,17
<b>4c</b>	742,67±0,28	17,25±0,15	4,72±0,03	3,54±0,32
<b>5c</b>	198,84±0,24	53,16±0,09	68,56±0,07	66,54±0,26
<b>6c</b>	164,61±0,32	72,35±0,15	115,42±0,15	94,30±0,24
<b>7c</b>	224,26±0,31	46,67±0,11	161,73±0,46	93,58±0,17
<b>8c</b>	219,94±0,56	47,18±0,28	140,48±0,26	60,31±0,06
<b>9c</b>	82,22±0,96	136,94±0,53	13,72±0,25	4,79±0,03
<b>10c</b>	26,76±0,48	219,43±0,89	78,25±0,11	76,41±0,05
<b>Asc</b>	/	/	24,17±0,07	15,61±0,04
<b>ВНТ</b>	/	/	8,62±0,02	6,05±0,01

<sup>a</sup>Тотални антиоксидативни капацитет кумаринских деривата представљен као број µg/mL аскорбинске киселине; <sup>b</sup>Тотални антиоксидативни капацитет, TAC<sub>50</sub>, (концентрација кумарина потребна да редукује 50% полазне концентрације Мо(VI); <sup>c</sup>способност неутрализације DPPH радикала; <sup>f</sup>Резултати су представљени као средња вредност најмање три експеримента.

### 3.4.3. Инхибиција липидне пероксидације у емулзији линолеинске киселине

Метода се заснива на иницирању аутооксидације липида на повишеној температури [151]. У фази иницијације формира се липидни радикал који у фази пропације реагује са кисеоником из ваздуха и гради липидни пероксидни радикал. Липидни пероксидни радикал у фази терминације реагује са преосталом количином масне киселине уз формирање липидног пероксида. Следећи корак је редукција липидног пероксида са  $Fe^{2+}$ . У тој реакцији настају липидни алкокси радикал и хидроксилни анјон, као и  $Fe^{3+}$  који са тиоцијанатом гради интензивно црвени комплекс, са максимумом апсорбције на 500 nm. На примеру линолеинске киселине, приказано је да се након фазе иницијације стварају најмање два производа који даље могу ступати у реакцију (Схема 22).

Инхибиција оваквог процеса антиоксидантом се дешава након иницијације, односно по настанку липидног радикала. Антиоксидант тада предаје свој протон радикалу да би настала масна киселина. Тиме се спречава фаза пропације а самим тим и липидна пероксидација (Схема 22)

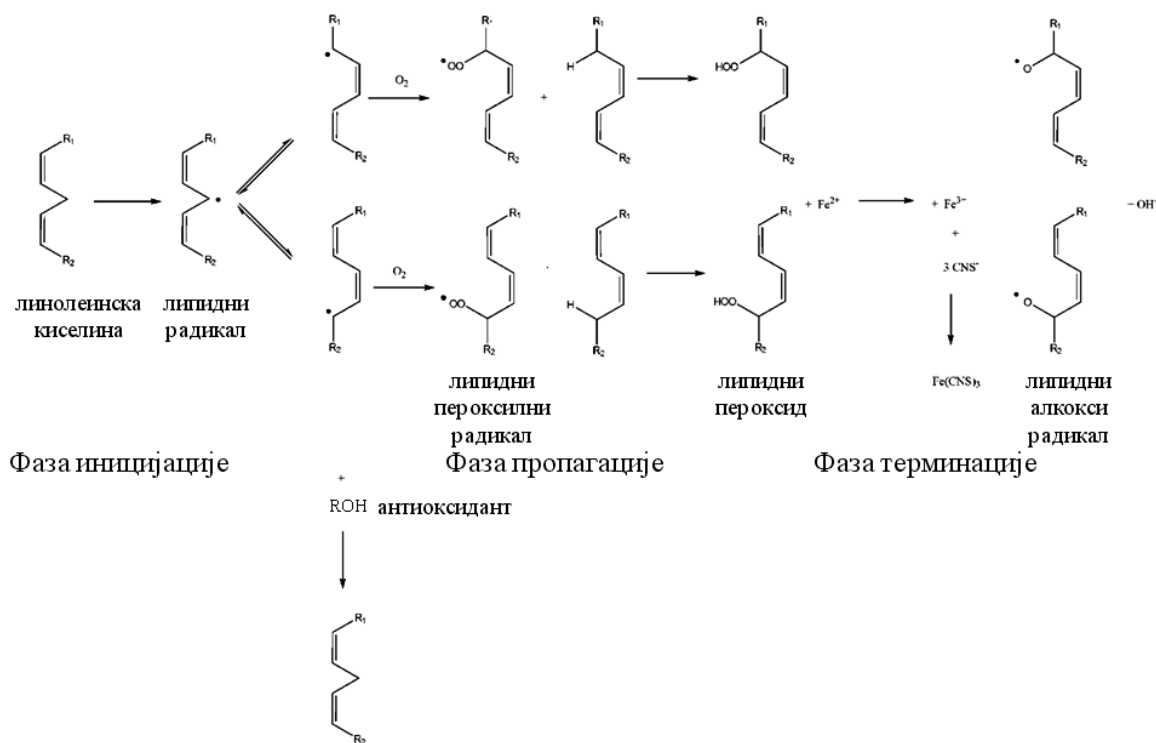


Схема 22. Механизам липидне пероксидације и инхибиторско дејство антиоксиданта

Инхибиција липидне пероксидације кумаринским дериватима испитивана је у тродневном временском интервалу, па су у Прилогу 2 (Табеле 20, 21 и 22) приказане вредности апсорбанци и процената инхибиције на основу којих су израчунате  $I_{50}$  вредности. Након 72 сата долази до распада хидропероксида линолеинске киселине [82] па се каснија мерења не узимају у обзир.

Током евалуације антиоксидативне активности стандарда, бољи резултати приказани су од стране **ВНТ**-а који је у сваком од тестираних временских интервала показао активност мању од 7,81  $\mu\text{g/mL}$ . Разлог високе активности **ВНТ** вероватно лежи у његовој липофилној природи и лакој имплементацији у систем емулзије линолеинске киселине.

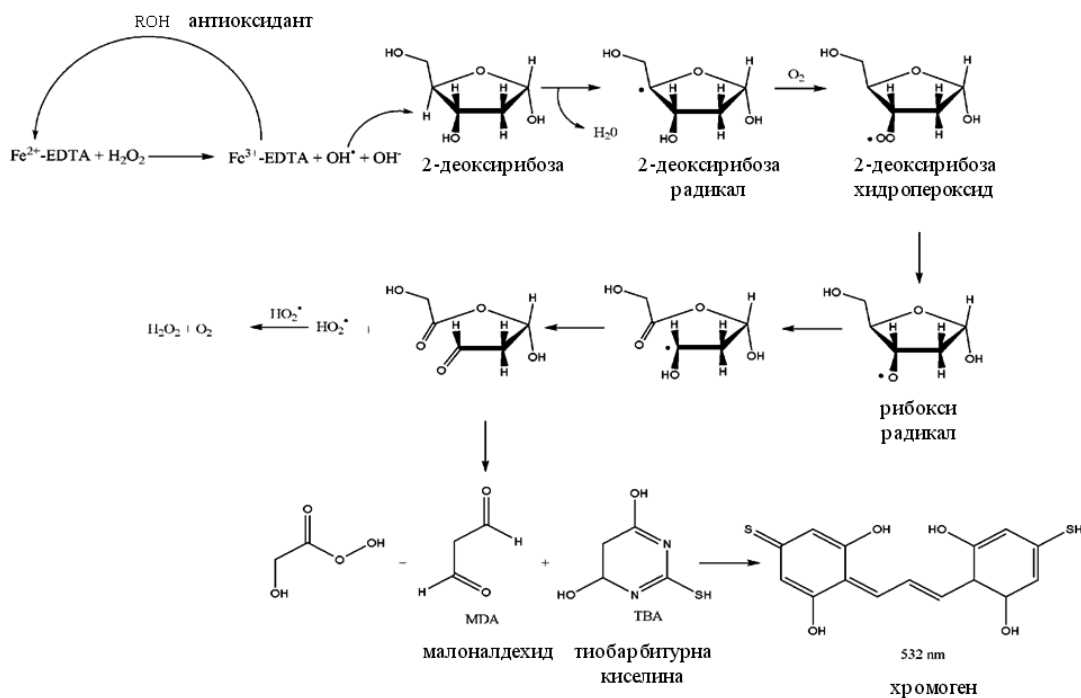
Током тестирања, група од пет тестираних једињења, **2b**, **6b**, **2c**, **4c** и **9c**, показала је значајан ниво инхибиције настанка пероксидног радикала. Резултати су упоредиви са стандардом **ВНТ**-ом. Ако се пажљиво погледају резултати у Табели 10 могу се уочити извесне правилности у активности тестираних супстрата у односу на временски интервал. Тако су једињења **6b**, са вредностима активности од  $I_{50} = <3.90 \mu\text{g/mL}$ ; 10.13  $\mu\text{g/mL}$ ; 10.76  $\mu\text{g/mL}$  након 24, 48 и 72 сата и **9c** ( $I_{50} = 5.88 \mu\text{g/mL}$ ; 10.06  $\mu\text{g/mL}$ ; 12.23  $\mu\text{g/mL}$ ) задржале приближан висок ниво активности након другог и трећег дана. У поређењу са **ВНТ**, **6b** је након првог дана показало 50% већу активност.

За једињења **2c**, **4c** и **2b** је карактеристично да су након 48 сати показала мало опадање у активности, која се ипак повратила након трећег дана тестирања. Ово се најбоље може представити на примеру деривата **4c** са измереном активношћу од  $I_{50} < 3.90 \mu\text{g/mL}$ ; 26.31  $\mu\text{g/mL}$  и 10.09  $\mu\text{g/mL}$  након трећег дана.

Група структурно сличних једињења, **3b**, **4b** и **8b**, показала је знатно мању инхибицију липидне пероксидације у односу на предходно наведене супстрате. Њихов ниво активности кретао се у интервалу  $I_{50}$  вредности од 11,49 до 18,96  $\mu\text{g/mL}$  након 24 часа, 18,07 до 37,89  $\mu\text{g/mL}$  у четрдесет осмом сату и од 10,46 до 80,95  $\mu\text{g/mL}$  у задњем часу тестирања. Структурна промена водоника у *cis* положају (**4b**) са ацетил (**3b**) или карбоксиметил остатком (**8b**) није много допринела активности.

### 3.4.4. Одређивање способности неутрализације хидрокси радикала

Ова једноставна метода заснива се на томе да  $\text{Fe}^{2+}$ -EDTA комплекс редукује водоник пероксид до хидроксил радикала и хидроксилног ањона. Настали хидроксилни радикал везује молекул 2-деоксирибозе уз настајање смеше различитих производа деоксирибозе и малонилалдехида [180] (Схема 23). По предложеном механизму, у фази иницијације се напад хидроксил радикала на 2-деоксирибозу одвија у положају 4. Настали радикал у фази пропације реагује са кисеоником из ваздуха до настанка хидропероксида деоксирибозе. Производ је стабилан извесно време на собној температури, али се на благо повишеној температури и у киселој средини, преводи у рибокси радикал. Фаза терминације започиње отварањем прстена на положају 4, уз настанак хидрокси радикала. Остатак шећера се трансформише у малонилалдеhid. По додатку тиобарбитурне киселине, на ниској температури и у киселој средини, гради се хромоген, адукт тиобарбитурне киселине и малонилалдехида (ТВА-MDA), интензивно розе боје са максимумом апсорбције на 532 nm.



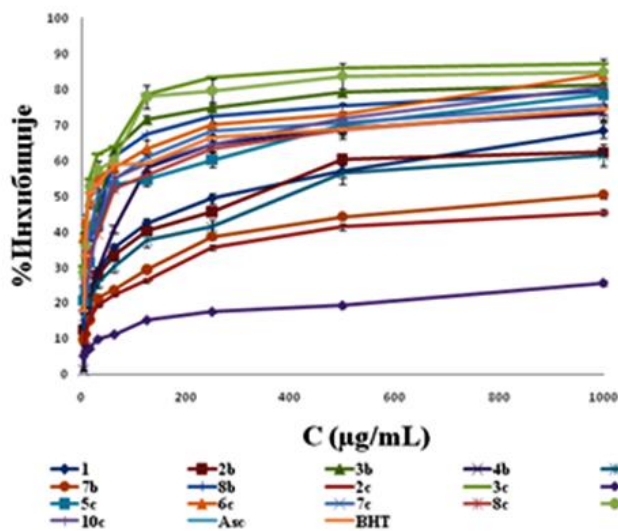
**Схема 23.** Деградација 2-деоксирибозе након абстракције хидроксилног радикала и механизам инхибиције антиоксидантом



Додатком антиоксиданта након оксидације гвожђа до  $\text{Fe}^{3+}$ , редукцијом фери јона спречава се настанак хидроксил радикала (Схема 23). У Прилогу 2 (Табела 23) приказане су вредности апсорбанци и процената инхибиције на основу којих су израчунате  $\text{OH}_{50}$  вредности.

Група од 10 тестираних кумаринских деривата приказала је активност у редоследу: **4c>2c>7b>6b>2b>1>3c>9c>6c>3b**. Способност неутрализације хидроксил радикала ових деривата била је за 1,5–82,5% већа у односу на стандард **ВНТ** чија је измерена вредност била  $\text{OH}_{50}=33,92 \mu\text{g/mL}$  (Табела 10). Сви тестирани синтетички антиоксиданти показали су у овом огледу, већи потенцијал од аскорбинске киселине. Највећу способност неутрализације хидроксил радикала показала су једињења **4c** ( $\text{OH}_{50}=5,94 \mu\text{g/mL}$ ), **2c** ( $\text{OH}_{50}=9,81 \mu\text{g/mL}$ ), **7b** ( $\text{OH}_{50}=9,89 \mu\text{g/mL}$ ) и **6b** ( $\text{OH}_{50}=14,32 \mu\text{g/mL}$ ).

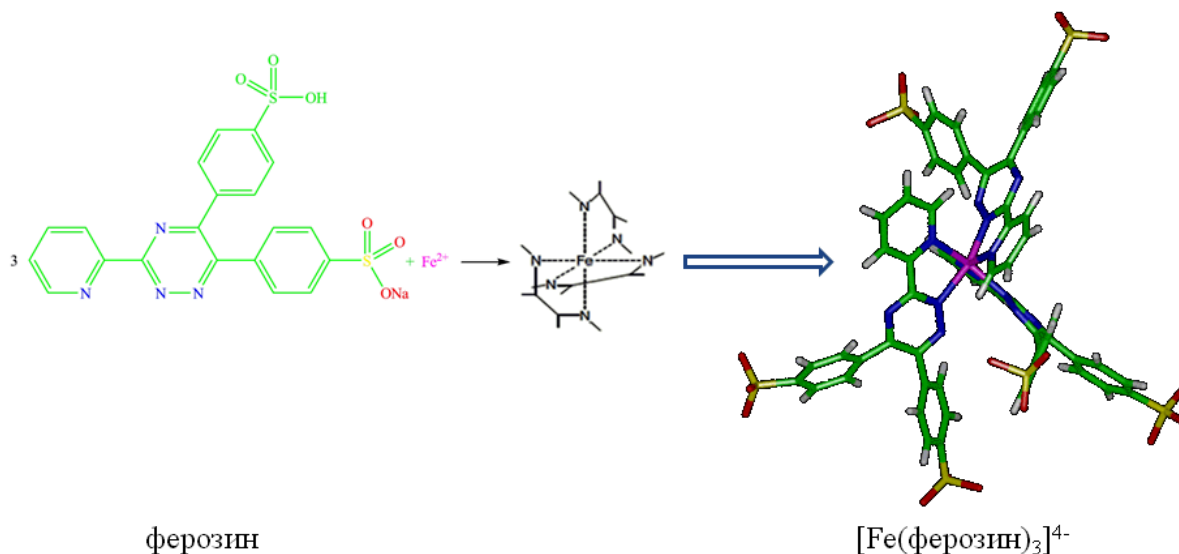
Може се закључити да неутрализацију хидроксил радикала значајно показују деривати са тиазол-*N*-фенил фармакофором. Супротно активности при неутрализацији DPPH радикала, присуство *cis* цијано групе у структури **7b** допринело је изузетном потенцијалну овог деривата. На Слици 30 приказана је зависност процената инхибиције хидроксил радикала у односу на концентрацију тестираних деривата.



Слика 30. График зависности инхибиције хидроксил радикала у односу на концентрацију деривата 1-10c

### 3.4.5. Хелатизациони капацитет

Под хелатизационим капацитетом се подразумева одређивање способности кумаринских деривата да врше инхибицију стварања комплекса  $\text{Fe}^{2+}$ -ферозин (Слика31)



Слика 31. Формирање  $\text{Fe}^{2+}$ -ферозин комплекса

Антиоксидант може везати јоне гвожђа и спречити настанак ферозин комплекса уколико поседује слободне хидроксилне или кето групе (Схема 24).

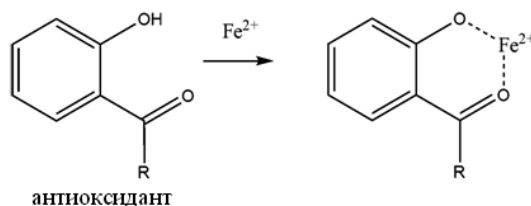


Схема 24. Инхибиција настанка гвожђе-ферозин комплекса антиоксидантом

У Прилогу 2 (Табела 24) приказане су вредности апсорбанци и процената инхибиције на основу којих су израчунате  $\text{CE}_{50}$  вредности.

Почев од **3с**, *N*-тиазол *p*- $\text{NO}_2$  деривата са измереном биохемијском активношћу од  $\text{CE}_{50}=5,5 \mu\text{g/mL}$ , сва тестирана једињења изузев **1** показала су већи хелатизациони капацитет од оба стандарда, **Asc** ( $\text{CE}_{50}=76,31 \mu\text{g/mL}$ ) и **ВНТ** ( $\text{CE}_{50}=85,48 \mu\text{g/mL}$ ) (Табела

10). Висока активност **3c** праћена је хелатизационим капацитетом његовог *m*-структурног изомера **9c** ( $CE_{50}=7,76 \mu\text{g/mL}$ ), те је изведен закључак да је присуство нитро групе од изузетног значаја при хелатизацији феро јона. Хелатизациони капацитет прве групе кумарина опадао је у низу **6b>2b>8b>3b>7b>4b>1**, што је објашњено чињеницом да смањење броја кисеоникових атома у функционалним групама *cis*-оријентације значајно смањује могућност координације између јона гвожђа и молекула антиоксиданта. Интересантно је и то да су две ацетил групе у структури **6b** биле довољне да дериват покаже већи хелатизациони потенцијал од једињења која поседују дериватизоване карбоксилне групе.

Обједињене  $EC_{50}$  вредности инхибиције настанка липидног пероксида, неутрализације хидрокси радикала и хелатизационог капацитета кумаринских деривата приказане су у Табели 10.

**Табела 10.** Резултати инхибиције липидне пероксидације, неутрализације хидрокси радикала и хелатизационог капацитета деривата **1-10c**

Јед.	<sup>a</sup> $I_{50}$ ( $\mu\text{g/mL}$ )			<sup>6</sup> $OH_{50}$ ( $\mu\text{g/mL}$ )	<sup>b</sup> $CE_{50}$ ( $\mu\text{g/mL}$ )
	24 h	48 h	72 h		
<b>1</b>	26,31±0,31	55,23±0,22	55,23±0,32	17,77±0,15	475,24±0,21
<b>2b</b>	7,77±0,12	16,85±0,15	13,01±0,14	17,19±0,06	45,0±0,54
<b>3b</b>	12,08±0,12	28,07±0,41	10,46±0,28	32,21±0,41	57,35±0,34
<b>4b</b>	18,96±0,04	37,89±0,28	80,95±0,24	84,04±0,02	62,5±0,11
<b>6b</b>	< 3,901	10,13±0,16	10,76±0,16	14,32±0,15	28,64±0,28
<b>7b</b>	76,17±0,25	216,85±0,22	167,66±0,46	9,89±0,03	60,74±0,41
<b>8b</b>	11,49±0,24	18,07±0,31	16,02±0,24	37,82±0,08	55,18±0,13
<b>2c</b>	6,72±0,37	17,89±0,34	7,07±0,34	9,81±0,03	34,64±0,11
<b>3c</b>	24,94±0,34	12,02±0,09	51,53±0,13	19,83±0,24	5,5±0,08
<b>4c</b>	<3,901	26,31±0,16	10,09±0,27	5,94±0,04	43,19±0,02
<b>5c</b>	24,49±0,37	100,94±0,17	51,33±0,27	70,51±0,63	52,04±0,45
<b>6c</b>	33,46±0,48	28,66±0,17	83,29±0,19	30,32±0,34	62,25±0,27
<b>7c</b>	53,13±0,19	40,28±0,36	119,34±0,24	36,88±0,72	54,77±0,16
<b>8c</b>	33,01±0,16	731,60±0,28	80,98±0,31	69,76±0,28	52,81±0,25
<b>9c</b>	5,88±0,34	10,06±0,34	12,23±0,17	24,32±0,11	7,76±0,05
<b>10c</b>	28,20±0,26	62,34±0,19	57,06±0,29	54,82±0,03	51,64±0,26
<b>Asc</b>	246,14±0,3	514,36±0,16	>1000	160,55±0,19	76,31±0,25
<b>ВНТ</b>	<7,81	<7,81	<7,81	33,92±0,34	85,48±0,17

<sup>a</sup>Инхибиција липидне пероксидације у систему линолеинске киселине; <sup>6</sup>Способност неутрализације хидрокси радикала; <sup>b</sup>Хелатизациони капацитет кумаринских деривата.

### 3.5. QSAR студије антиоксидативне активности

QSAR студије антиоксидативне активности извршене су регресионом анализом узмеђу нотираних биолошке активности и електронских и стерних дескриптора, односно вредности партиционог коефицијента при дескрипцији понашања кумаринских деривата у систему линолеинске киселине. Вредности молекулских дескриптора приказане су у Табели 11.

**Табела 11.** Енталпије дисоцијације 4-ОН везе и вредности молекулских дескриптора деривата **1-10c** коришћених у QSAR студијама антиоксидативне активности

Јед.	E1	Д1	Д2	Д3	Д4	Д5	Д6	Д7	Д8	Д9
<b>1</b>	120,80	-9,99	-1,49	-8,50	0,99	-0,62	0	0	124,41	-0,529
<b>2b</b>	206,38	-10,01	-1,56	-8,45	0,99	-0,66	0	0	203,33	-1,561
<b>3b</b>	234,62	-9,96	-1,54	-8,42	1,03	-0,63	0	0	165,18	-1,318
<b>4b</b>	228,24	-9,98	-1,45	-8,53	1,0	-0,61	0	0	192,32	-0,035
<b>6b</b>	213,31	-10,04	-1,65	-8,39	1,01	-0,67	0	0	171,66	-1,679
<b>7b</b>	215,85	-10,04	-1,69	-8,35	1,07	-0,69	0	0	173,41	-1,765
<b>8b</b>	232,34	-9,04	-1,45	-7,59	0,95	-0,66	0	0	246,34	-1,709
<b>2c</b>	251,62	-9,00	-1,95	-7,05	1,56	-0,61	-0,59	0,25	233,72	1,216
<b>3c</b>	262,38	-8,99	-1,62	-7,37	1,52	-0,46	-0,62	0,27	249,55	3,129
<b>4c</b>	246,37	-8,90	-1,13	-7,77	1,62	-0,65	-0,31	0,29	225,94	0,702
<b>5c</b>	249,89	-8,92	-0,94	-7,78	1,35	-0,70	-0,66	0,47	230,13	2,904
<b>6c</b>	251,62	-8,89	-0,95	-7,94	1,59	-0,67	-0,68	0,27	208,37	1,921
<b>7c</b>	276,45	-8,91	-1,07	-7,84	1,67	-0,63	-0,69	0,26	225,74	1,856
<b>8c</b>	255,63	-8,97	-1,76	-7,21	1,60	-0,68	-0,62	0,24	237,20	3,380
<b>9c</b>	287,65	-8,87	-1,23	-7,64	0,99	-0,65	-0,64	0,25	248,00	3,129
<b>10c</b>	278,65	-8,79	-1,16	-7,63	0,99	-0,65	-0,65	0,26	222,34	3,603

<sup>a</sup> Е-енергија: E1 *BDEs* (kcal/mol), <sup>b</sup> Д-дескриптор: Д1 *HOMO* (eV), Д2 *LUMO* (eV), Д3  $\Delta E$  *HOMO-LUMO* (eV), Д4 *4-OH bond length* (Å), Д5  $Q_{OH}$ , Д6  $Q_N$ , Д7  $Q_S$ , Д8 *CSEV* (Å<sup>2</sup>), Д9  $\log P$

QSAR студија тоталног антиоксидативног капацитета:

$$pTAC_{50} = - 8,46(\pm 0,32) + 7,32(\pm 0,99) \text{HOMO} - 2,69(\pm 0,47) \text{LUMO} - 9,46(\pm 1,48) Q_{OH} + 0,6(\pm 0,1) Q_N - 2,9(\pm 0,4) Q_S \quad (32)$$

$$n=15 \quad r=0,992 \quad s=0,032 \quad F=37,426 \quad Q^2=0,993 \quad s\text{-PRESS}= 0,004$$

QSAR студија тоталног антиоксидативног капацитета (једначина 32) потврђује да активност тестираних деривата у великој мери зависи од вредности енергија *HOMO*

орбитала. На Слици 34д представљена је НОМО орбитала најактивнијег једињења **4c** (добијена након НВО анализе) која се налази на карбонилној групи кумаринског система, наглашавајући на тај начин да и кумаринско језгро има допринос у антиоксидативној активности. Такође, парцијално атомско наелектрисање азота из тиазолинског прстена позитивно утиче на активност. Поред НОМО орбитала, једначина описује и тиазолински систем као богат делокализованим електронима, те као такав делимично учествује у редукцији Мо(VI). Наелектрисања хидроксилне групе у положају 4 и сумпора негативно утичу на активност.

Обзиром на чињеницу да овакав вид тоталне антиоксидативне активности описује могућност тестираног једињења да редукује Мо(VI) до Мо(V), разматрање разлике у енергији између НОМО и LUMO (енг. НОМО-LUMO gap;  $\Delta E$  НОМО-LUMO) орбитала био је добар приступ у сагледавању оксидационе моћи једињења. Што је вредност разлике у енергијама мања, молекул се лакше ексцитује [141]. Вредности  $\Delta E$  НОМО-LUMO (Табела 11, Д3) биле су у опсегу -8,53 eV (**4b**) до -7,05 eV (**2c**), указујући на потенцијално добру активност. Висок ниво тоталне антиоксидативне активности измерен је код једињења **7b** ( $\Delta E$  НОМО-LUMO=-8,35 eV), **2c** (-7,05 eV) и **4c** (-7,77 eV), чиме је успостављена добра корелација између биолошке активности и физичко-хемијске карактеризације тестираних једињења.

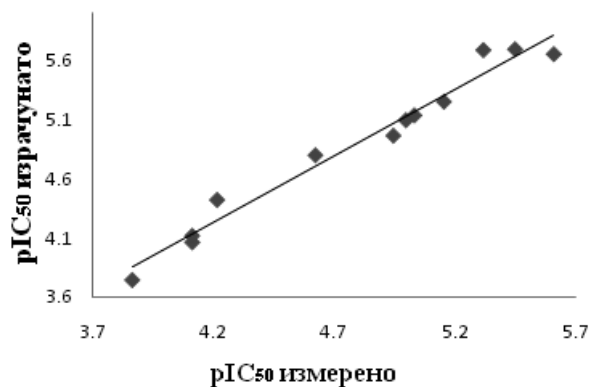
*QSAR студија способности неутрализације DPPH радикала после 60 минута:*

$$pIC_{50} = + 6,72(\pm 0,48) - 1,23(\pm 0,57) Q_{OH} + 4,42(\pm 0,35) \text{ дужина } 4\text{-OH везе} + 3,4(\pm 0,94) Q_N - 7,6(\pm 0,26) Q_S \quad (33)$$

$$n=15 \quad r=0,995 \quad s=0,084 \quad F=97,236 \quad Q^2=0,995 \quad s\text{-PRESS}=0,03$$

Једначина (33) која описује активност кумаринских деривата при неутрализацији DPPH радикала јесте врло специфична за тај вид активности услед позитивног предзнака испред 6,72. На основу једначине, закључак је да на активност значајно утиче дужина О-Н везе у хидроксилној групи на положају 4 (Слика 34а). Са аспекта механизма неутрализације DPPH радикала то значи да што је већа дужина везе то је веза слабија, односно кумарин лакше отпушта овај атом водоника ка радикалу. Интересантно је да само наелектрисање кисеоника из хидроксилне групе негативно утиче на активност. Атоми из

супституената различито утичу на активност. Тако, велика базност азота из тиазолинског прстена позитивно утиче на активност, док је допринос сумпора супротан. На Слици 32 је приказан однос између експерименталних и израчунатих вредности  $pI_{50}$  приказаних у Табели 12. У Табели 11 приказане су вредности дужине 4-ОН везе за свако од тестираних једињења, добијене након DFT прорачуна.



Слика 32. Корелација експерименталних и израчунатих вредности способности неутрализације DPPH радикала дериватима **1-10c**

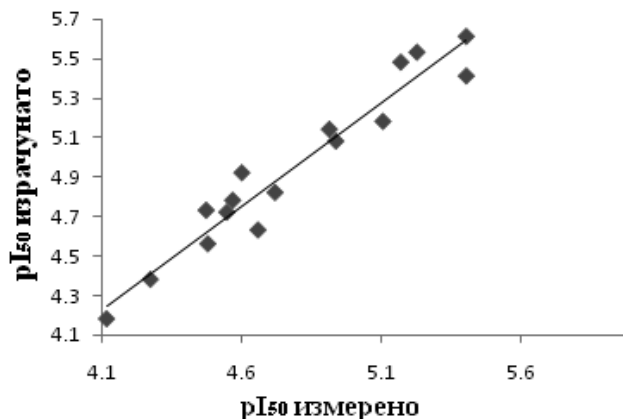
QSAR студија инхибиције липидне пероксидације после 24 часа:

$$pI_{50} = + 8,46(\pm 0,47) + 2,46(\pm 0,28) \log P - 4,92(\pm 0,36) \text{HOMO} + 1,96(\pm 0,46) \text{ дужина 4-ОН везе} - 6,49(\pm 0,76) Q_s \quad (34)$$

$$n=15 \quad r=0,993 \quad s=0,046 \quad F=103,981 \quad Q^2=0,991 \quad s\text{-PRESS}=0,007$$

Као и при неутрализацији DPPH радикала, фактор дужине 4-ОН везе у једначини (34) је јако значајан у смислу лакоће отпуштања водониковог атома слободном радикалу. Модел је јако специфичан за инхибицију липидне пероксидације. Оно што фаворизује овај QSAR модел јесте то да објашњава активност тестираних деривата преко њихове растворљивости изражене преко партиционог коефицијента. Међутим, фактор растворљивости није пресудан на шта указују вредности партиционог коефицијента за два најактивнија једињења, **6b** и **4c**. Дериват **6b** јесте изузетно хидрофилан (Табела 11, Д9) и јако слабо растворан у емулзији линолеинске киселине, док је **4c** нешто хидрофобнији,

мада не довољно, да би се потпуно растворио у емулзији. Презентована чињеница наводи на закључак да је инхибиција липидне пероксидације условљена структуром ових деривата, те ће структурни аспекти бити размотрени у даљем тексту. На Слици 33 приказана је корелација експерименталних и израчунатих вредности инхибиције липидне пероксидације.

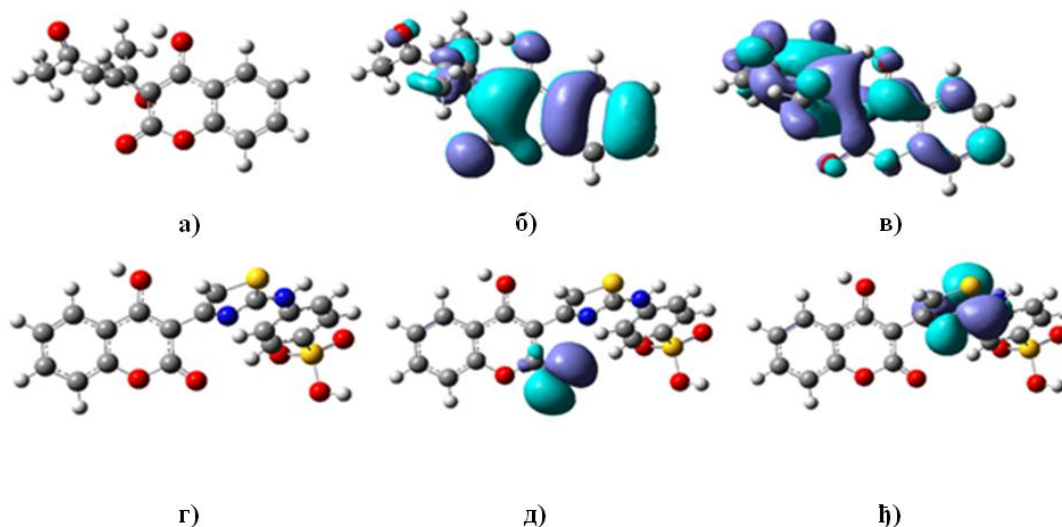


Слика 33. Корелација експерименталних и израчунатих вредности способности неутрализације пероксидног радикала дериватима **1-10c**

Постоји неколико структурних карактеристика уочљивих код доброг антиоксиданта. Антиоксидативна активност органског једињења, било да је природног или синтетичког порекла, огледа се у његовој способности да лако отпушта водоников атома са хидроксилне групе, односно да подлеже кето-енолној таутомерији [181]. Сходно томе, енталпија хомолитичког раскидања хидроксилне групе на којој се одвија антиоксидативна активност треба да буде релативно мала, односно реда величине 80-120 kJ/mol за кумарине [182]. Такође, дужине веза унутар антиоксиданта треба да су између просте и двогубе везе [181]. Све наведене чињенице искоришћене су у дискусији резултата неутрализације DPPH и перокси радикала, обзиром да је заједничко за оба механизма неутрализације да апстракују протон са хидроксилне групе антиоксиданта.

Из урађених DFT студија у метанолу као растварачу, добијене су информације помоћу којих је објашњена висока активност тестираних деривата. Наиме, у метанолском раствору је хидроксилна група на положају 4 деривата **2b** и **4c** високо енолизована,

трансформише се у псеудо-хинонски облик и готово да не постоји у смилу праве хемијске ковалентне везе (Слика 34а и 34г).



Слика 34. Енолизована хидроксилна група на положају 4 једињења а) **6b** и г) **4c**; НОМО орбитале једињења б) **6b** и д) **4c**; LUMO орбитале једињења в) **6b** и њ) **4c**

У таквој конзистенцији, атоми кисеоника и водоника су међусобно повезани слабир електростатичким интеракцијама које условљавају велику расположивост атома водоника према слободном радикалу.

У прилог великој активности хидроксилне групе иде и релативно висока киселост атома водоника дефинисана преко хибридизације 4-ОН групе. Иако је на основу NBO анализе утврђено да је атом кисеоника  $sp^2$  хибридизован на основу једначина  $0,7814(sp^{1,67})_O + 0,3926(s^{100})_H$  (**6b**) и  $0,8947(sp^{1,62})_O + 0,4837(s^{100})_H$  (**4c**), хибридизација је ипак блиска  $sp$  уколико се посматра да је  $(sp^{1,50})$  прелаз са  $sp$  на  $sp^2$  хибридизацију. Због тога, водоников атом хидроксилне групе и јесте кисео, у довољној мери да напусти хидроксилну групу кад се слободни радикал приближи молекулу кумарина.

Анализа дужина веза показала је да већина веза у молекулима кумарина је дужине између просте и двогубе везе, што је довело то закључка да унутар молекула постоји продужена коњугација двоструких веза што је један од предуслова антиоксидативне активности [182]. Дужине везе у 4-ОН групи код **6b** ( $d=1,03 \text{ \AA}$ ) и **4c** ( $d=1,63 \text{ \AA}$ ) јесу



најдуже у хомологој серији (Табела 11, Д4), што доводи до ниске енталпије дисоцијације О-Н везе (Табела 11, Е1) [181,182] и олакшава препуштање водоника молекулу слободног радикала. Утицај дужине везе такође је описан и у QSAR једначинама (33) и (34).

Израчунате енергије дисоције 4-ОН везе приказане су у Табели 11, Е1. Израчунате BDE вредности за **6b** (205,84 kcal/mol) и **4c** (239,26 kcal/mol) јесу повећане у односу на неке просте кумарине [181] али нису превисоке и могу се окарактерисати као довољне за лаку дисоцијацију везе у присуству радикала. Виши износи енергија дисоцијација везе могу се објаснити присуством волуминозних С-3 остатака који у многоме одређују енергетски биланс тестираних деривата. Ипак, најзначајнији фактор који одређује високу антиоксидативну активност према липидном пероксиду и DPPH радикалу јесте сама фаворизирана хинонска структура кумаринских деривата **6b** и **4c** у метанолском раствору и велика расположивост протона ка слободном радикалу (Слика 34а и 34г).

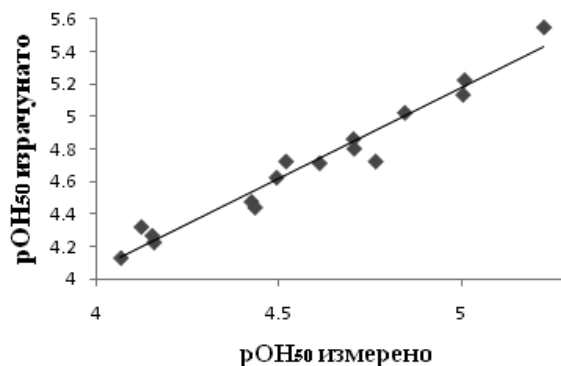
#### QSAR студија неутрализације хидроксил радикала

$$pOH_{50} = + 11.46(0.94) - 4.94(0.32) \text{HOMO} + 7.46(0.24) \text{LUMO} + 5.96(0.32) Q_{OH} \quad (35)$$
$$n=16 \quad r=0.997 \quad s=0.028 \quad F=174.273 \quad Q^2=0.994 \quad s\text{-PRESS}=0.013$$

Деловање кумарина као редукционих средстава потврђено је мерењем укупне антиоксидативне активности те се може применити и у разумевању инхибиције настанка хидроксил радикала редукцијом фери јона у првој фази реакције (Схема 23). Међутим, QSAR једначина (35) описује способност неутрализације евентуално насталих хидроксил радикала и са аспекта структуре кумарина где је нотиран изузетно висок ниво удела LUMO орбитала у активности. Обзиром на чињеницу да се LUMO орбитале формирају на системима двогубих веза, који почиње 4-хидрокси-енол-3,4-пиронским системом и наставља се преко ароматичног прстена и С-3 остатака, посредно је закључено да се апстракција хидроксилног радикала управо одвија на систему коњугованих двоструких веза код оба кумаринска система (Слика 34в и 34ђ). Овакав предложени механизам није у корелацији са предложеним механизмом неутрализације од стране деоксирибозе, али се може прихватити обзиром на то да се као статистички значајан дескриптор у QSAR једначини не појављује дужина 4-ОН везе а самим тим се и не одвија неутрализација радикала трансфером протона са хидроксилне групе. Апстракција радикала на молекулу

**6b** може се одвијати на целој површини молекула обзиром да се LUMO орбитала простире кроз цео молекул (Слика 34в) док се на **4c** одвија у LUMO орбитали која се формира на N=C вези тиазолинског прстена (Слика 34ђ).

На Слици 35 приказана је корелација експерименталних и израчунатих вредности неутрализације хидроксил радикала



Слика 35. Корелација експерименталних и израчунатих вредности способности неутрализације хидроксил радикала дериватима **1-10c**

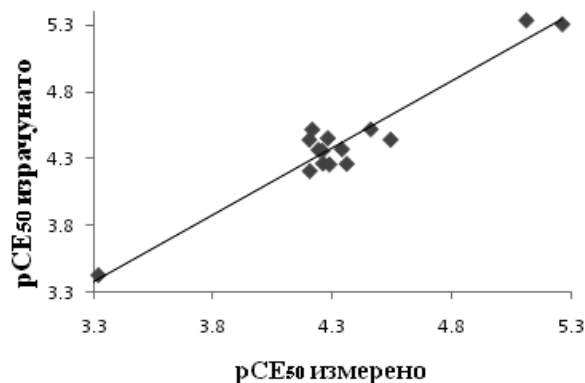
QSAR студија способности хелатизације феро јона

$$pCE_{50} = + 1,29(0,52) + 9,01(0,003) CSEV + 0,95(0,33) Q_N \quad (36)$$

$$n=16 \quad r=0,993 \quad s=0,054 \quad F=43,383 \quad Q^2=0,894 \quad s\text{-PRESS}=0,034$$

У структури кумаринских антиоксиданата волуминозност С-3 остатака значајно утиче на стереохемију једињења у метанолском раствору при хелатизацији феро јона, што је и потврђено великим утицајем стерног дескриптора на активност (једначина 36). Једначина не специфицира функционалне групе којима се врши хелатизација, мада је закључак да се хелатизација одвија координовањем гвожђа за бројне атоме кисеоника у **6b**, **2b** и **8b** као најактивнијим из своје групе, односно за нитро групу код **3c** и **9c**. Потенцијално место координације гвожђа јесте и лактонска структура кумарина, међутим QSAR студијом нису добијене никакве индикације да се таква координација и одвија.

На Слици 36 приказана је корелација експерименталних и израчунатих вредности хелатизације феро јона.



**Слика 36.** Корелација експерименталних и израчунатих вредности способности хелатизације феро-јона дериватима **1-10c**

Са графика 33., 34., 35. и 36. може се уочити да је добијена одлична корелација експерименталних и израчунатих вредности, те је тиме извршена потврда QSAR модела. У Табели 12 приказана је корелациона матрица између вредности молекулских дескриптора и антиоксидативне активности.

**Табела 12.** Корелациона матрица вредности молекулских дескриптора деривата **1-10c** и антиоксидативне активности

	<sup>a</sup> Д1	Д2	Д3	Д4	Д5	Д6	Д7	Д8	Д9	<sup>b</sup> А1	А2	А3	А4	А5
Д1	1,00													
Д2	0,48	1,00												
Д3	0,96	0,91	1,00											
Д4	0,48	0,51	0,37	1,00										
Д5	0,36	0,29	0,91	0,96	1,00									
Д6	0,23	0,79	0,61	0,29	0,51	1,00								
Д7	0,22	0,24	0,41	0,34	0,55	0,84	1,00							
Д8	0,11	0,13	0,24	0,09	0,38	0,31	0,41	1,00						
Д9	0,26	0,42	0,35	0,14	0,18	0,31	0,29	0,19	1,00					
А1	0,97	0,74	0,00	0,00	0,87	0,64	0,79	0,00	0,12	1,00				
А2	0,00	0,00	0,00	0,98	0,00	0,78	0,98	0,00	0,26	0,00	1,00			
А3	0,64	0,00	0,00	0,93	0,00	0,00	0,68	0,00	0,94	0,00	0,68	1,00		
А4	0,76	0,95	0,00	0,00	0,98	0,00	0,00	0,00	0,09	0,00	0,34	0,17	1,00	
А5	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,91	0,00	0,98	0,14	0,00	0,00	0,00	0,00	1,00

<sup>a</sup>Д-дескриптор: Д1 *HOMO*, Д2 *LUMO*, Д3  $\Delta E$  *HOMO-LUMO*, Д4 дужина 4-*OH* везе, Д5  $Q_{OH}$ , Д6  $Q_N$ , Д7  $Q_S$ , Д8 *CSEV*; <sup>b</sup>А-активност:  $pTAC_{50}$ ,  $pIC_{50}$ ,  $pI_{50}$ ,  $pOH_{50}$ ,  $pCE_{50}$

Однос измерених и израчунатих вредности биолошких активности након QSAR студија приказан је у Табели 13. QSAR једначине су стога искоришћене за дизај нових антиоксиданата који ће бити описан у даљем тексту.

**Табела 13.** Однос измерених и израчунатих вредности антиоксидативне активности деривата **1-10c** након QSAR студија

Једињ.	ТАС <sub>50</sub>		IC <sub>50</sub>		I <sub>50</sub>		OH <sub>50</sub>		CE <sub>50</sub>	
	Експ.	Изр.	Експ.	Изр.	Експ.	Изр.	Експ.	Изр.	Експ.	Изр.
<b>1</b>	97,45	128,82	87,47	54,95	26,31	23,99	17,77	15,84	475,24	380,19
	4,01	3,89	4,06	4,26	4,57	4,62	4,71	4,80	3,32	3,42
<b>2b</b>	47,65	19,50	4,60	3,71	7,77	5,49	17,19	19,05	45,0	42,66
	4,32	4,71	5,34	5,43	5,12	5,26	4,76	4,72	4,34	4,37
<b>3b</b>	197,62	204,17	8,80	7,76	12,08	7,76	32,21	23,98	57,35	43,65
	3,70	3,69	5,06	5,11	4,92	5,11	4,49	4,62	4,24	4,36
<b>4b</b>	84,57	13,82	9,93	8,13	18,96	18,19	84,04	74,13	62,5	36,31
	4,07	4,88	5,00	5,09	4,72	4,74	4,06	4,13	4,20	4,44
<b>6b</b>	50,59	52,48	2,45	2,24	3,901	2,75	14,32	9,55	28,64	36,31
	4,29	4,28	5,61	5,65	5,41	5,56	4,84	5,02	4,54	4,44
<b>7b</b>	35,59	17,38	135,01	177,82	76,17	60,25	9,89	7,41	60,74	30,19
	4,45	4,76	3,87	3,75	4,12	4,22	5,00	5,13	4,22	4,52
<b>8b</b>	99,71	128,82	11,28	10,96	11,49	5,49	37,82	33,88	55,18	43,65
	4,00	3,89	4,95	4,96	4,94	5,26	4,42	4,47	4,26	4,36
<b>2c</b>	33,35	12,30	6,97	5,62	6,72	1,22	9,81	5,88	34,64	30,19
	4,47	4,91	5,16	5,25	5,17	5,95	5,00	5,23	4,46	4,52
<b>3c</b>	133,66	120,22	9,22	7,41	24,94	17,38	19,83	13,80	5,5	4,89
	3,88	3,92	5,03	5,13	4,60	4,76	4,70	4,86	5,26	5,31
<b>4c</b>	17,25	9,77	3,54	2,04	3,901	2,45	5,94	2,82	43,19	54,95
	4,76	5,01	5,45	5,69	5,41	5,61	5,23	5,55	4,36	4,26
<b>5c</b>	53,16	72,44	66,54	87,09	24,49	13,49	70,51	54,95	52,04	457,08
	4,27	4,14	4,12	4,06	4,66	4,87	4,15	4,26	3,28	3,34
<b>6c</b>	72,35	83,17	94,30	15,85	33,46	18,62	30,32	19,05	62,25	61,65
	4,14	4,08	4,63	4,80	4,47	4,73	4,52	4,72	4,21	4,21
<b>7c</b>	46,67	43,65	93,58	38,02	53,13	36,30	36,88	36,88	54,77	54,95
	4,33	4,36	4,22	4,42	4,27	4,44	4,43	4,44	4,26	4,26
<b>8c</b>	47,18	35,48	60,31	2,09	33,01	19,95	69,76	6,03	52,81	35,48
	4,32	4,45	5,32	5,68	4,48	4,70	4,16	4,22	4,28	4,45
<b>9c</b>	136,94	707,91	4,79	4,79	5,88	4,67	24,32	19,49	7,76	4,57
	3,86	3,15	4,12	4,12	5,23	5,33	4,61	4,71	5,11	5,34
<b>10c</b>	219,43	323,59	76,41	54,95	28,20	15,85	54,82	47,86	51,64	54,95
	3,66	3,49	4,06	4,26	4,55	4,80	4,12	4,32	4,29	4,26

Дизајн нових антиоксиданата био је усмерен ка модификацији С-3 остатка и кумаринског молекула у циљу додатног продужења коњугације и повећања броја могућих таутомерних форми чији је број дефинисан ChemSketch 12 софтвером [183] (Схема 25). Нова структурна форма изграђена је кондензацијом катехола са 1,4-пиронским системом чиме је активиран ароматични део кумарина увођењем хидроксилне групе. Даљом С-3 модификацијом добијен је велики број таутомера који се кретао од 3 код **14d** и **18d**, до чак 10 код **27d** и чиме је предвиђена изузетно висока антиоксидативна активност за нова једињења.

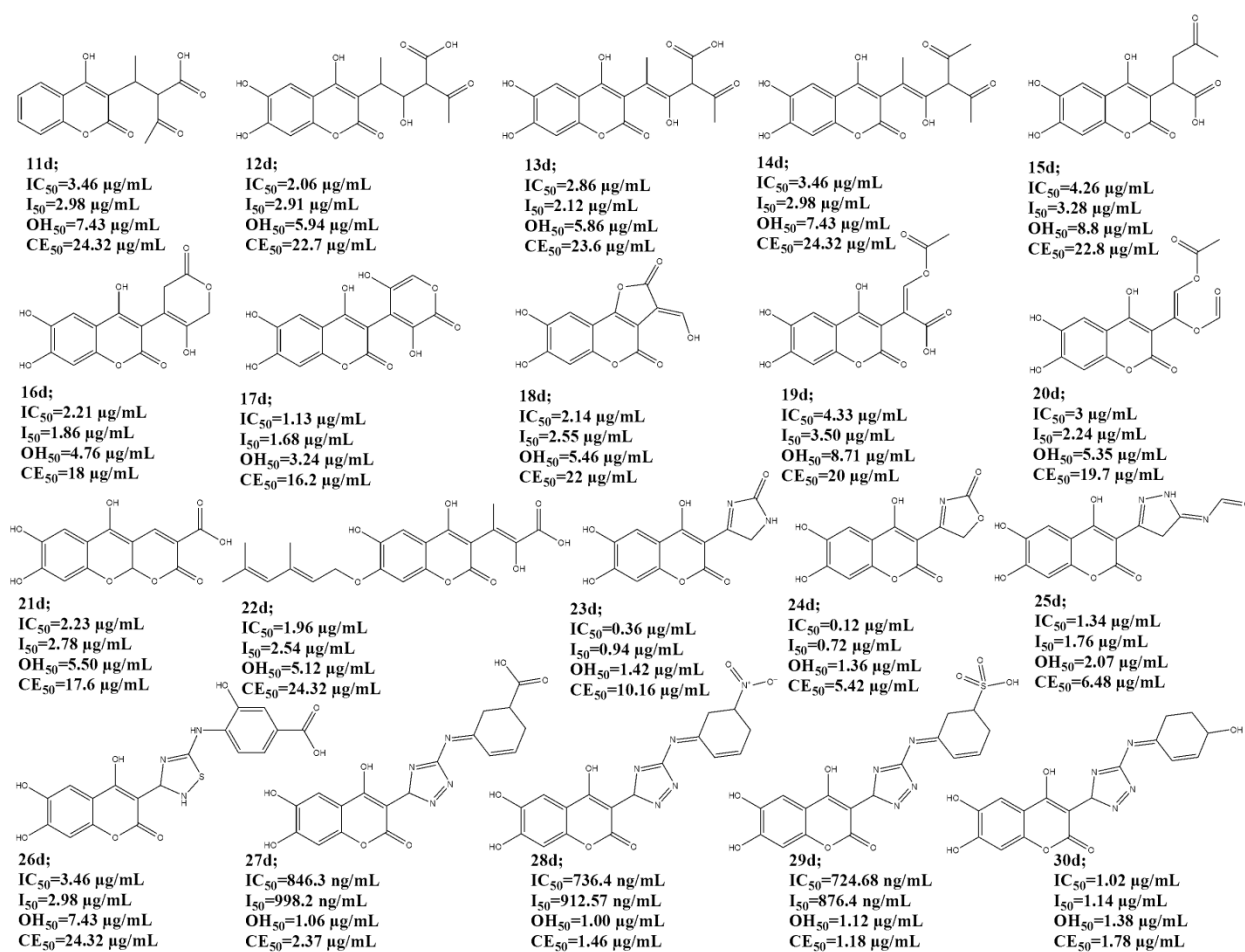


Схема 25. Дизајнирани деривати 4-хидроксикумарина са предвиђеном антиоксидативном активношћу *in vitro*

Фрагмент проп-1-ен, који сем стереохемијског доприноса није имао великог удела у механизмима антиоксидативне активности модификован је елиминације двоструке везе (**11d**, **15d**), адицијом хидроксилне групе (**22d**) које је праћено продуженим С-низом (**13d**, **14d**) или заменом са лактонским структурама насталим кондензацијом карбонилних/карбоксилних остатака (**16-21d**). Највећа активност оваквом модификацијом С-3 остатка предвиђена је увођењем 3,5-дихидрокси-2*H*-пиран-2-он фрагмента (**17d**). Обзиром да QSAR једначинама антиоксидативне активности није нотиран значајан допринос атома сумпора из тиазолинског прстена, извршена је структурна модификација прстена увођењем атома азота и кисеоника, односно конструкцијом прстена оксазола, пиразола, имидазола и триазола (**13-20d**). Прстен триазола је потом супституисан Schiff-овом базом и –COOH, –SO<sub>3</sub>H и –NO<sub>2</sub> супституентима прстена (**27d**, **28d** и **29d**), што је представљало најповољнију структурну модификацију. Предвиђена активност оваквих структура изражена је у IC<sub>50</sub> и I<sub>50</sub> вредностима испод 1 µg/mL и у OH<sub>50</sub> и CE<sub>50</sub> вредностима које се крећу око 1 µg/mL. Као најозбиљнији кандидат за будућу синтезу представљен је **29d** са предвиђеном активношћу при неутрализацији DPPH радикала од IC<sub>50</sub>=724,68 ng/mL.

Све дизајниране структуре су подвргнуте истоветним поступцима молекуског моделовања као и тестирани деривати. Вредности предвиђене биолошке активности добијене су коришћењем постојећих QSAR једначина.

### 3.6. Антикоагулативна активност кумаринских деривата

Антикоагулативна моћ кумарина на унутрашњем путу коагулације описује се повећањем протромбинског времена.

#### 3.6.1. *In vitro* антикоагулативна активност

Вредностима коагулационог и протромбинског времена хумане плазме од СТ=105 и РТ=11,0-14,5 сек (Табела 13) потврђен је квалитет хуманог узорка плазме. Измерено протромбинско време стандарда варфарина износило је РТ=18,5 сек. Присуство различито супституисаних С-3 остатака у структурама **2-8b** и **2-10c** узроковало је значајну активност у *in vitro* условима.

Највеће продужење коагулационог времена измерено је након апликације **2b**, *cis/trans*-карбоксиетил деривата (РТ=23,0 сек). Незнатно смањење у активности

констатовано је код једињења **7b** које у С-3 остатку садржи *cis* цијано и *trans* карбокси групе, са измереним протромбинским временом од 21,0 сек. Ниво антикоагулативне активности упоредив са **7b** констатован је апликацијом **8b**, једињења код кога је *cis* цијано група супституисана са карбоксиметил групом. Даље опадање у антикоагулативној активности забележено је након апликације **4b** и **3b**, што се може објаснити одсуством цијано или карбоксилних група у *cis* положају.

Промена проп-1-ен остатака са различитим тиазол-*N*-фенил групама код **2-10c** повећала је антикоагулативну активност у *in vitro* условима. Раст активности изражен је следећом релацијом: **9c<3c,5c<4c<10c**. Промена оријентације нитро групе из *m*- (**9c**) у *p*- (**3c**) довела је до повећања протромбинског времена. Измерена антикоагулативна активност **3c** тако је изједначена са активношћу **5c** (*m*-CH<sub>3</sub> дериват) и износила је РТ=25,0 секунди. Највећа измерена активност била је код деривата **4c** (*p*-сулфо) и *N*-нафтил (**10c**, РТ=27,5 сек).

Сумарно, *in vitro* антикоагулативна активност изражена је релацијама: **знатно мања активност<W<7b<2c<2b<9c<3c,5c<4c<10c**. Преостали деривати показали су активност нижу од варфарина и у нивоу контролне пробе.

### 3.6.2. *In vivo* антикоагулативна активност

Једнодневна апликација 0,1 mg кумарина по килограму телесне масе на одраслим пацовима из Wistar соја није узроковала *in vivo* антикоагулативну активност упоредиву са варфарином (Табела 14). Активност стандарда била је ниска и њена вредност износила је 10,3 секунди. Благо повећање у активности варфарина забележено је након једнодневне апликације 0,5 mg/kg (РТ=12,2 сек), док су такав тренд пратила и четири кумаринска деривата. Тако је продужење коагулационог времена у односу на контролу у *in vivo* условима примећено код животиња које су третиране са **2b** (РТ=10,5 сек), **4c** (РТ=10,4 сек), **5c** (РТ=9,7 сек) и **9c** (РТ=14,4 сек).

Кумарински антикоагуланти свој пуни потенцијал *in vivo* достижу након континуалне апликације у дози која показује ефекат, те су животиње поново третиране најактивнији дериватима у концентрацији од 0,5 mg/kg у интервалу од 5 дана на сваких 24 сата. Након апликације свих деривата измерено је значајно повећање протромбинског времена тест животиња: **2b** (РТ=30,0 сек), **4c**, **5c** и **9c** (РТ=28,1-28,6 сек).



Апликацијом **2b**, **4c**, **5c** и **9c** успостављења је сјајна *in vitro-in vivo* корелација јер су поменути једињења издвојена као најактивнији антикоагуланти у оба случаја.

**Табела 14.** Антикоагулативна активност кумаринских деривата **1-10c** *in vitro* и *in vivo* (након 24 h и петодневног третмана).

Једињ.	PT <i>in vitro</i> <sup>a</sup>	INR <sup>b</sup>	PT <i>in vivo</i> <sup>b</sup>	INR	PT <i>in vivo</i> <sup>c</sup>	INR	Фибриноген	TB <i>in vivo</i> <sup>d</sup>
<b>1</b>	14,0±0,2 <sup>b</sup>	1,25	9,1±0,2	0,9	9,5±0,2	0,9	2,5±0,2	44,9±0,7
<b>2b</b>	23,0±0,1	1,99	10,3±0,3	0,13	10,5±0,1	0,13	5,1±0,1	51,3±0,5
					30,0±0,2 <sup>e</sup>	0,13	1,6±0,1	
<b>3b</b>	19,0±0,2	1,80	9,3±0,1	0,92	9,8±0,2	0,94	1,6±0,2	40,7±0,4
<b>4b</b>	20,0±0,3	1,90	8,0±0,2	0,64	9,0±0,3	0,67	1,8±0,4	35,2±0,3
<b>6b</b>	17,0±0,2	1,55	8,6±0,2	0,69	9,6±0,2	0,72	2,45±0,2	24,6±0,4
<b>7b</b>	21,0±0,1	2,25	8,2±0,2	0,66	9,2±0,1	0,69	0,5±0,1	196,8±0,6
<b>8b</b>	20,0±0,1	1,90	5,7±0,4	0,37	8,7±0,1	0,48	3,2±0,5	19,4±0,5
<b>2c</b>	22,0±0,3	2,15	8,8±0,2	0,67	9,1±0,3	0,86	4,2±0,2	55,7±0,5
<b>3c</b>	25,0±0,4	2,44	8,1±0,1	0,65	9,1±0,4	0,68	1,8±0,3	33,7±0,4
<b>4c</b>	26,5±0,2	2,60	10,4±0,1	0,82	12,4±0,2	0,84	/	>500
					28,6±0,1 <sup>ж</sup>	1,38	0,9±0,1	
<b>5c</b>	25,0±0,2	2,44	9,6±0,2	1,16	9,7±0,2	1,16	2,0±0,1	27,6±0,6
					28,1±0,2 <sup>ж</sup>	1,34	1,2±0,1	
<b>6c</b>	22,0±0,3	2,10	8,0±0,2	0,64	10,0±0,3	0,67	2,5±0,2	23,9±0,4
<b>7c</b>	18,5±0,1	1,75	8,0±0,3	0,64	10,0±0,1	0,67	1,4±0,3	44,9±0,5
<b>8c</b>	18,1±0,2	1,70	8,1±0,4	0,68	8,1±0,2	0,68	2,1±0,2	28,7±0,4
<b>9c</b>	24,4±0,6	2,30	9,6±0,2	0,94	14,4±0,6	1,14	0,6±0,2	>500
					28,1±0,1 <sup>ж</sup>	1,34	1,74±0,2	
<b>10c</b>	27,5±0,1	2,70	9,2±0,2	0,94	9,7±0,1	0,94	1,9±0,2	33,2±0,4
<b>C</b>	13,2±0,1	1,15	9,2±0,4	0,91	9,7±0,2	0,91	1,8±0,3	111,9±0,3
					12,1±0,2 <sup>ж</sup>	0,86	1,9±0,3	
<b>W<sup>ж</sup></b>	18,5±0,1	1,73	10,3±0,2	0,83	12,2±0,4	0,83	1,9±0,3	33,4±0,5

ЛД<sup>3</sup>

<sup>a</sup>Протромбинско време хумане плазме у секундама; <sup>b</sup>Интернационални нормализовани однос; <sup>b</sup>Протромбинско време измерено након администрације 0,1 mg/kg кумарина у секундама; <sup>c</sup>Протромбинско време измерено након администрације 0,5 mg/kg кумарина у секундама; <sup>d</sup>Тромбинско време у секундама; <sup>e</sup>Резултати су представљени као стандардна девијација, након три мерења; <sup>e</sup>Протромбинско време измерено након петодневне администрације 0,5 mg/kg кумарина у секундама; <sup>ж</sup>варфарин; <sup>3</sup>летална доза.

Петог дана администрације третирања животиње варфарином, код исте је примећена крвава столица, након чека је животиња убрзо и угинула. Услед дуготрајне апликације антикоагулантом дошло је до обилатог унутрашњег крварења што је и често



нежељено дејство у терапији варфарином. Животиње третиране осталим кумаринским дериватима нормално су поднеле терапију.

### 3.6.3. Одређивање метаболичких путева најактивнијих кумаринских деривата

Метаболичке трансформације најактивнијих кумаринских деривата дефинисане су анализом сакупљених узорака урина гасно-масеном хроматографијом. Доминантни метаболички пут кумаринског језгра у првој фази јесте хидроксилација у положају 7 под дејством CYP2A5 ензима из CYP450 групе [110]. Стога је GC/MS анализа била усмерена ка детекцији 7-хидрокси форми аплицираних једињења. Вредности молекулских јонова аплицираних кумарина јесу  $M^+ - 1$   $m/z$  345, 415, 349 и 380 за **2b**, **4c**, **5c** и **9c**, респективно. Након прве фазе метаболизма очекиване  $M^+$  вредности 7-хидрокси форми ових деривата биле су  $m/z$  362, 432, 366 и 397 те је детекцијом управо ових маса у спектрима урина констатовано да се прва фаза метаболизма одвија на идентичан начин као на обичном кумаринском језгру (Схема 26). Даља потврда оваквог метаболичког пута тражена је у пиковима који потичу од 7-хидроксикумарина у спектрима снимљених урина, односно у присуству јона масе  $m/z$  162 који је детектован као  $M^+$  умбелиферона [163]. Фрагментацијом свих аплицираних деривата добијен је јон са масом  $m/z$  165 за који је утврђено да припада 7-хидроксикумарину поређењем интензитета са молекулским јоном умбелиферона. Разлика у маси за три јединице потиче од интрамолекулског премештања атома водоника након фрагментације C-3 остатака. Коначна потврда да је метаболичком трансформацијом награђен 7-хидроксикумарин добијена је детекцијом јонова са масом  $m/z$  146 или 147, који кореспондирају са масом молекулског јона основног кумаринског језгра [163]. Хидроксилација се у првој фази метаболизма може одвијати и на положајима C-5, C-6, C-7 и C-8, мада овакве метаболичке трансформације нису погодне за формирање растворног производа у другој фази. Друга фаза метаболизма кумарина је катализована везивањем молекула глукозе под дејством *UDP-глукуронилтрансферазе* па се гради растворни 7-хидроксикумарин-глукуронид који се екскретује урином. Предложени начин елиминације деривата **2b**, **4c**, **5c** и **9c** у форми глукуронида јесте био и једини обзиром да GC/MS анализом није констатовано присуство других метаболита.

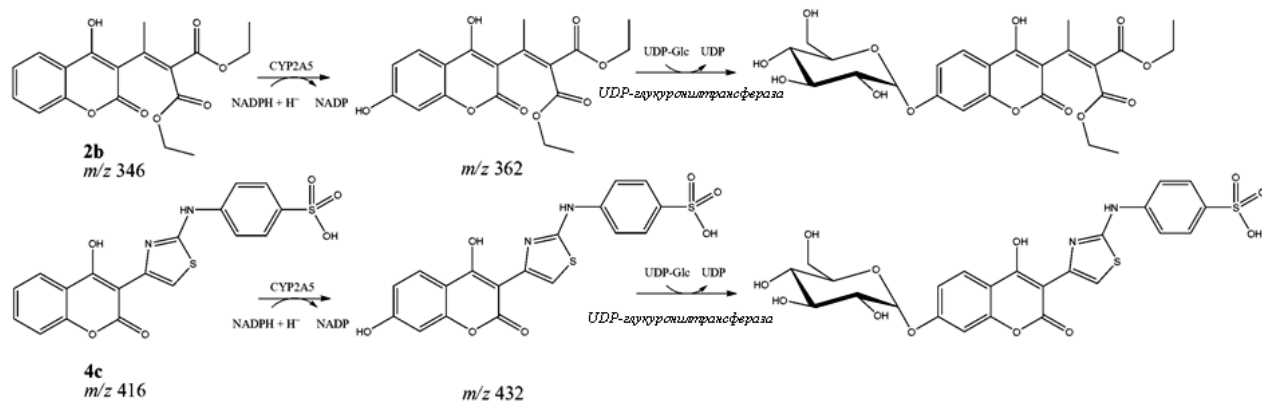
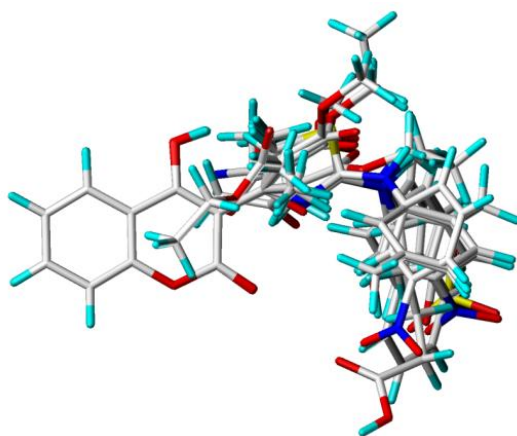


Схема 26. Предложени метаболички путеви **2b** и **4c**.

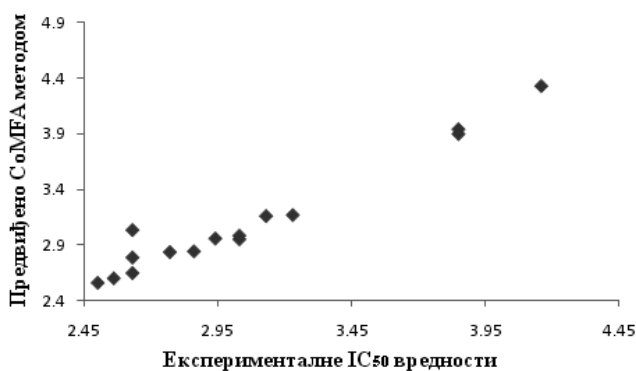
### 3.7. QSAR студије антикоагулативне активности

Након почетног релативног поравњања индивидуалних активних конформација у односу на структуру најактивнијег једињења, правилно поравњани молекули имају упоредиве конформације и сличну оријентацију у простору. Из поравњаних конформација се утврђује заједничка тродимензионална фармакофора која се смешта у просторну мрежу. Њена позиција у мрежи се одржава константном као референти положај при позиционирању свих конформација у мрежи. На Слици 37 приказано је поравњање конформација свих молекула у просторној мрежи са растојањем између тачака од 2,0 Å које је искоришћено за формирање CoMFA и CoMSIA модела.



Слика 37. Атом-по-атом преклапање конформација **1-10c**

Најбољи CoMFA модел који је описивао антикоагулативну активност преко стерних и електростатичких поља (CoMFA-SE) састојао се од  $N=6$  компоненти и имао је  $q^2=0,738$  и  $r^2=0,931$  вредности са стандардном грешком  $SEE=0,224$ . По моделу, оба поља поседују слични допринос активности: електростатичко 49,1%, стерно 51,9%. Модел је поседовао ниску вредност стандардне девијације ( $s=0.216$ ) односно високу Fisher вредност ( $F=108,96$ ), те се сматра статистички значајним. Предиктивна моћ модела приказана је на Слици 14. Са дисперзијом од  $r^2=0,724$  и стандардном девијацијом предикције тест-тета ( $s_{\text{тест}}=0,901$ ), CoMFA-SE је искоришћен у предвиђању активности тест сета што је приказано у Табели 15.



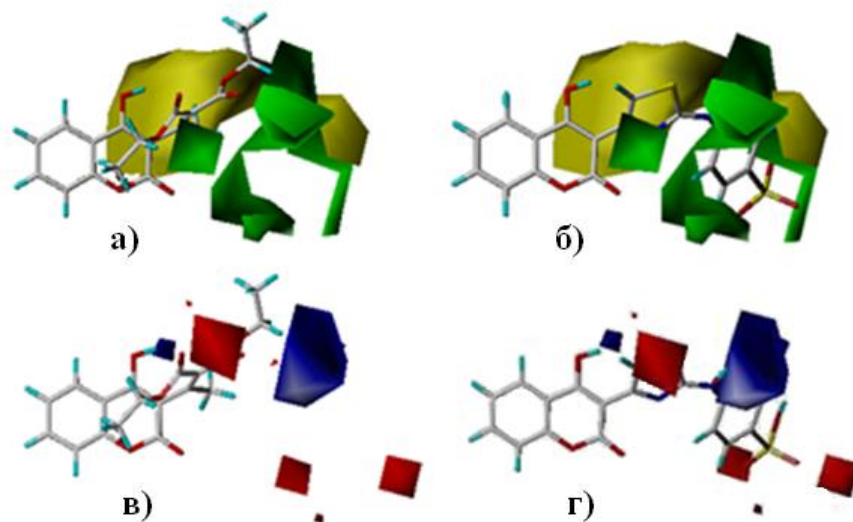
Слика 38. Корелација експерименталних и предвиђених  $pIC_{50}$  вредности тренинг сета (квадрати) и тест сета (кругови) CoMFA методом

Дијаграми контура CoMFA стерних и електростатичких поља око **2b** и **4c** приказани су на Слици 39.

Зелени графички прикази индицирају стерне регионе где утицај волуминозних група појачава активност док жути региони показују које функционалне групе смањују исту. Фармакофоре које доприносе антикоагулативној активности јесу диетилмалонатни остатак **2b** и тиазол-*N*-Ph-SO<sub>3</sub>H остатак **4c** (Слика 39а и 39б). Као делови молекула који не доприносе активности или је смањују нотирани су проп-1-ен остатак **2b** и атом сумпора из тиазола код **4c**.

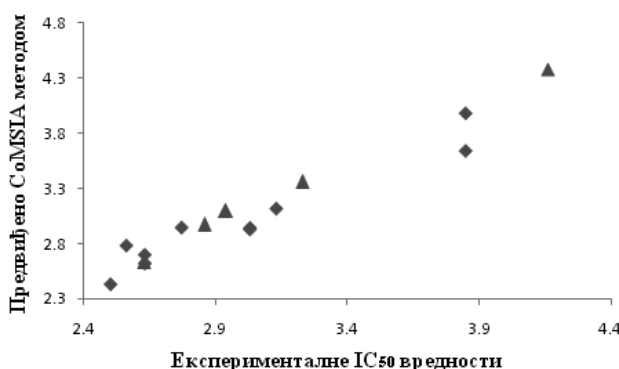
На Слици 39в и 39г, представљени су плави дијаграми контура електростатичког поља изнад фармакофора где позитивно наелектрисање и електрон-донорски капацитет функционалних група појачавају активност, док црвено обојење поља указује на

функционалне групе чије негативно наелектрисање и електрон-акцепторски потенцијал смањују активност. Плаво обојене електростатичких мапа око 4-ОН група **2b** и **4c** указује да позитивно наелектрисани атом водоника има значајну улогу у антикоагулационом механизму. Активност је повећана електрон-донорским утицајем етил групе у С-3 остатку **2b** односно фенил групе **4c**. Наелектрисања атома кисеоника из једне од карбонилних група **2b** и сумпора из тиазолинског прстена **4c** повећавају биолошку активност електрон-акцепторским деловањем.



Слика 39. CoMFA контуре а) стерних и в) електростатичких мапа **2b**; б) стерних и г) електростатичких мапа **4c**

Статистички квалитетнији модел добијен је CoMSIA методом. Најбољи CoMSIA модел који је описивао антикоагулативну активност преко стерних, електростатичких и поља акцептора водоничне везе (CoMSIA-SEA) састојао се од  $N=3$  компоненти и имао је  $q^2=0,763$  и  $r^2=0,916$  вредности са стандардном грешком  $SEE=0,224$ . По моделу, поља поседују следећи допринос активности: стерно 11,2%, електростатичко 42,6%, акцепторско 46,2%. Модел је поседовао ниску вредност стандардне девијације ( $s=0,716$ ) односно високу Fisher вредност ( $F=78,96$ ), те се сматра статистички значајним. Предиктивна моћ модела приказана је на Слици 40. Са дисперзијом од  $r^2=0,817$  и стандардном девијацијом предикције тест-тета ( $s_{\text{тест}}=0,766$ ) CoMFA-SE је искоришћен у предвиђању активности тест сета што је приказано у Табели 15.



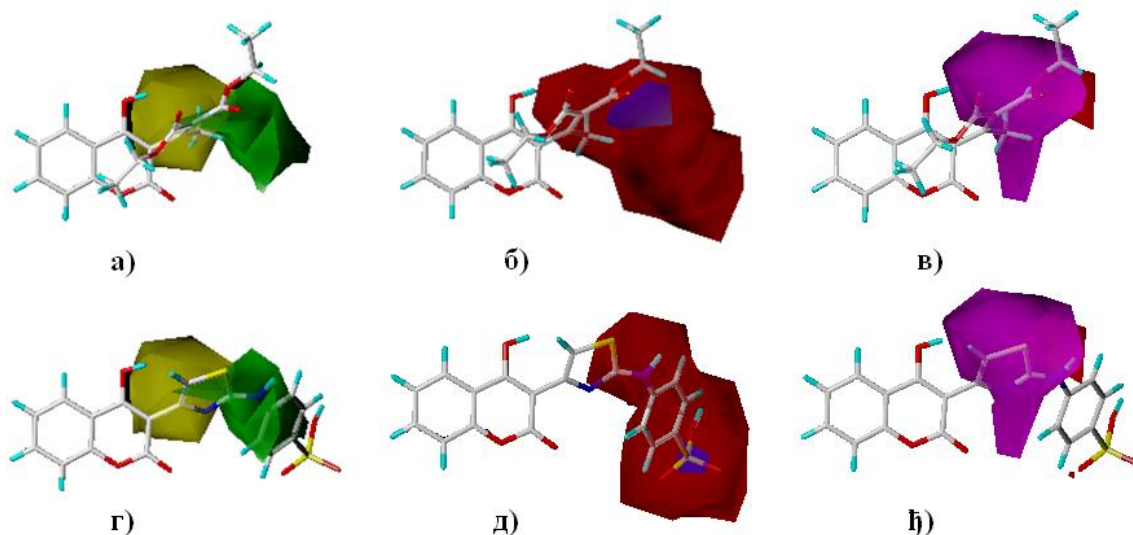
Слика 40. Корелација експерименталних и предвиђених  $pIC_{50}$  вредности тренинг сета (квадрати) и тест сета (троуглови) CoMSIA методом

Дијаграми контура CoMSIA стерних, електростатичких и поља акцептора водоничних веза приказани су на Слици 41 за једињења **2b** и **4c** као најактивнија.

Зелени графички прикази (Слика 41а (**2b**), Слика 41г (**4c**)) индицирају стерне регионе где утицај волуминозних група појачава активност док жути региони показују које је функционалне групе смањују. Повољне стерне интеракције остварује карбонилна група C-3 остатка **2b** те је на тај начин сужен регион фармакофорног деловања диетилмалонатног остака који је предочен као активан CoMFA методом. Повољна страна стерног поља окружује структуру **4c** у региону атома азота из тиазолинског прстена и амино групе која је мост са фенол групом C-3 остатка, што је у високој корелацији са CoMFA анализом.

На Слици 41б и 41д, представљени су плави дијаграми контура електростатичког поља које окружује фармакофоре једињења **2b** и **4c** чије позитивно наелектрисање и електрон-донорска способност повећава активност, док црвено обојење поља указује на функционалне групе чије негативно наелектрисање и електрон-акцепторски утицај повећава антикоагулативни потенцијал. CoMSIA анализом добијени су различити доприноси наелектрисања једињења **2b** у односу на CoMFA методу јер је функционална група која доприноси активности карбонилна група из C-3 остатка. Позитивни електростатички регион код **4c** налази се на атому сумпора из SO<sub>3</sub>H групе. Функционалне групе чије негативно наелектрисање повећава антикоагулативну активност јесу хидрофобне, и то етил група **2b** и фенол група **4c**.

Подручја у молекулима **2b** и **4c** у којима се налазе фармакофоре које су акцептори водоничне везе квантификована су љубичастим контурама и то су обе карбонилне групе C-3 остатка код **2b** (Слика 41в) и N-тиазол систем код **4c** (Слика 41ђ).

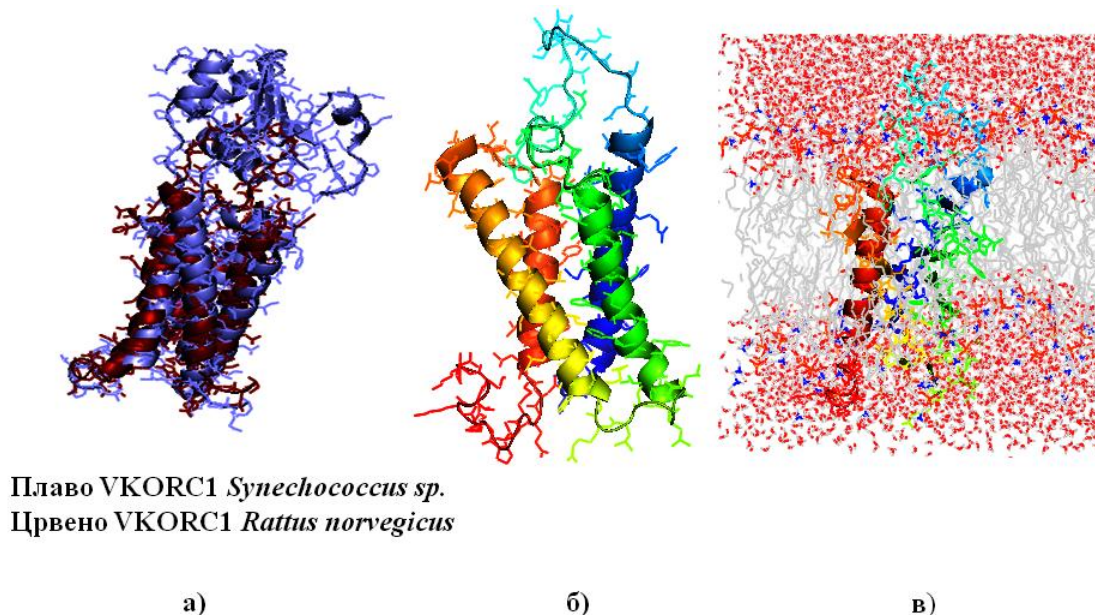


Слика 41. CoMSIA а) стерна, б) електростатичка и в) поља акцептора водоничних веза **2b**; г) стерна, д) електростатичка и ђ) поља акцептора водоничних веза **4c**

На ензимском нивоу, кумарини остварују антикоагулативну активност интеракцијом са трансмембранским протеином *витамин К епоксид-редуктазом*, субјединицом 1. Хомологим моделовањем секвенце која је садржала 161. аминокиселину формирана су 4 трансмембранска  $\alpha$ -хеликса чију секвенцу чине аминокиселине са редним бројем 11-31; 81-97; 101-123; 127-149. Најниже енергетско стање протеина потврђено је стандардном девијацијом кретања атома унутар протеина од 0,24 nm на 720 ps. На Слици 42а приказан је висок степен хомологије између конформације темплата (структура је обојена плаво) и ново формираног ензима пацова (структура је обојена црвено). Врло слаба хомологија постигнута је у структури насумице увијања из разлога што се број и редослед аминокиселина у секвенцама бактеријског и VKORC1 пацова у тим регионима драстично разликују (Слика 41а). Комплетна тродимензионална структура формираног протеина VKORC1 пацова представљена је на Слици 18б, при чему је сваки од формираних хеликса различито обојен. Хеликс на коме се налазе активни (Cys132-Cys135) и каталитички центри (Tyr138, Thr139 и Ala140) представљен је наранџастом бојом.



Трансмембрански систем представљен је на Слици 41 **в**, где су црвеном бојом обележени молекули воде а сивом липидни двослој.

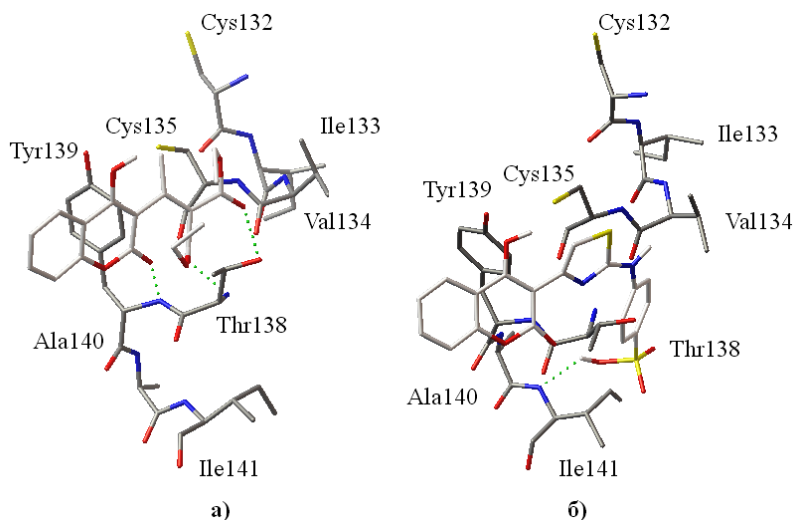


**Слика 42.** а) Поравњавање структура бактеријског и VKORC1 пацова; б) секундарна структура VKORC1 пацова; в) трансмембранска структура VKORC1 пацова

Структура VKORC1 пацова коришћена је као молекулска мета приликом молекулског доковања најактивних антикоагуланата *in vivo* (Слика 43), при чему је откривена значајна улога С-3 остатака у процесу инхибиције коагулације.

Енергетски најповољнија конформација **2b** унутар активног центра VKORC1 пацова стабилизована је формирањем три водоничне везе (Слика 42а). Тако је карбонилна група лактонског дела молекула оријентисана према формирању јаке водоничне везе са аминок групом пептидне везе Tyr139 чија је дужина  $d=1,896 \text{ \AA}$ . Даље, обе карбонилне групе из диетилмалоната као акцептори формирају водоничне везе са аминок групом пептидне везе Thr138 ( $d=2,115 \text{ \AA}$ ) односно хидроксилном групом Thr138 ( $d=2,626 \text{ \AA}$ ). Оваква партиципација С-3 фармакофора у интеракцији са ензимом савршено кореспондира са презентацијом CoMFA и CoMSIA стерних односно CoMSIA електростатичких и поља акцептора водоничне везе, која је представила карбонилне групе **2b** као нарочито значајне за високу активност. Оријентација 4-ОН групе **2b** према Cys135 ( $d=2,210 \text{ \AA}$ ) одредила је ову аминокиселину као ону која врши каталитичку интеракцију

између ензима и кумарина. Конформација је стабилизована додатном електростатичком интеракцијом коју остварује хидроксилна група Tyr139 и 4-ОН кумарина. Ова интеракција је предвиђена CoMFA анализом. Предвиђена константа инхибиције **2b** износила је  $K_i=68,9 \mu\text{M}$ .



Слика 43. Конформације једињења а) **2b** и б) **4c** унутар активног центра VKORC1 пацова

Волуминозност **4c** (Слика 42б) условила је партиципацију додатне аминокиселине Ile141, која се литературно не наводи као конституент активног центра варфарина. Управо је аминокиселинска група пептидне везе Ala140-Ile141 доносила до формирања једне јаке водоничне везе са S=O конституентом *p*-сулфо групе **4c**, дужине ( $d=1,324 \text{ \AA}$ ). Интеракција је предвиђена CoMFA стерним и CoMSIA електростатичким пољима. Како је оријентација **4c** слична оријентацији **2b**, положај 4-ОН групе према Cys135 стабилизован је електростатичким интеракцијама са хидроксилном групом Tyr139. Стабилизација 4-ОН групе предвиђена је CoMFA електростатичким пољем. Молекул **4c** стабилизован је и додатном хидрофобном интеракцијом између фенилне групе C-3 остатка и Tyr139. Предвиђена константа инхибиције **4c** износила је  $K_i=44,8 \mu\text{M}$ .

Сличне оријентације ноћене су и код једињења **5c** и **9c** са предвиђеним вредностима  $K_i$  од 74,2 и 79,6  $\mu\text{M}$ .

Везивање конформације са најнижом енергијом варфарина у активној центру ензима сумирано је формирањем водоничних веза између карбонилне групе лактонског



система и пептидне везе Tyr139 односно карбонилне групе из С-3 остатка и пептидне везе Thr138. Оријентација 4-ОН групе према Cys135 дефинисана је интеракцијама кумарина са Tyr139. Предвиђена константа инхибиције варфарина износила је 5.37 mM.

Начин на који функционалне групе са положаја С-3 учествују у антикоагулативној активности описан је на више нивоа. Стога је на бази 3D-QSAR и студија молекулског доковања дизајно шеснаест нових деривата **31-46d** (Схема 27) чија је предвиђена активност представљена у Табели 15. Циљ дизајна био је имплементација фармакофора које доприносе активности (карбоксиетил, *p*-SO<sub>3</sub>H, *m*-CH<sub>3</sub> и *m*-NO<sub>2</sub>) у нове кумаринске структуре чија геометрија одговара геометрији варфарина. Фармакофоре су додате на варфаринско језгро (**31d**, **37d**, **38d**, **43d**, **44d**, **45d** и **46d**), 3-амино-4-хидроксикумаринско језгро (**35d** и **36d**), пирано[3,2-*c*]хромен-2,5-дионско језгро (**39d**, **40d**, **41d**), пирано[3,2-*c*]хромен-5(4H)-он језгро (**42d**) и језгро 4-хидроксикумарина (**32d**, **33d**, **34d**). Нове структуре су подвгнуте идентичним методама молекулске оптимизације и 3D-QSAR анализе.

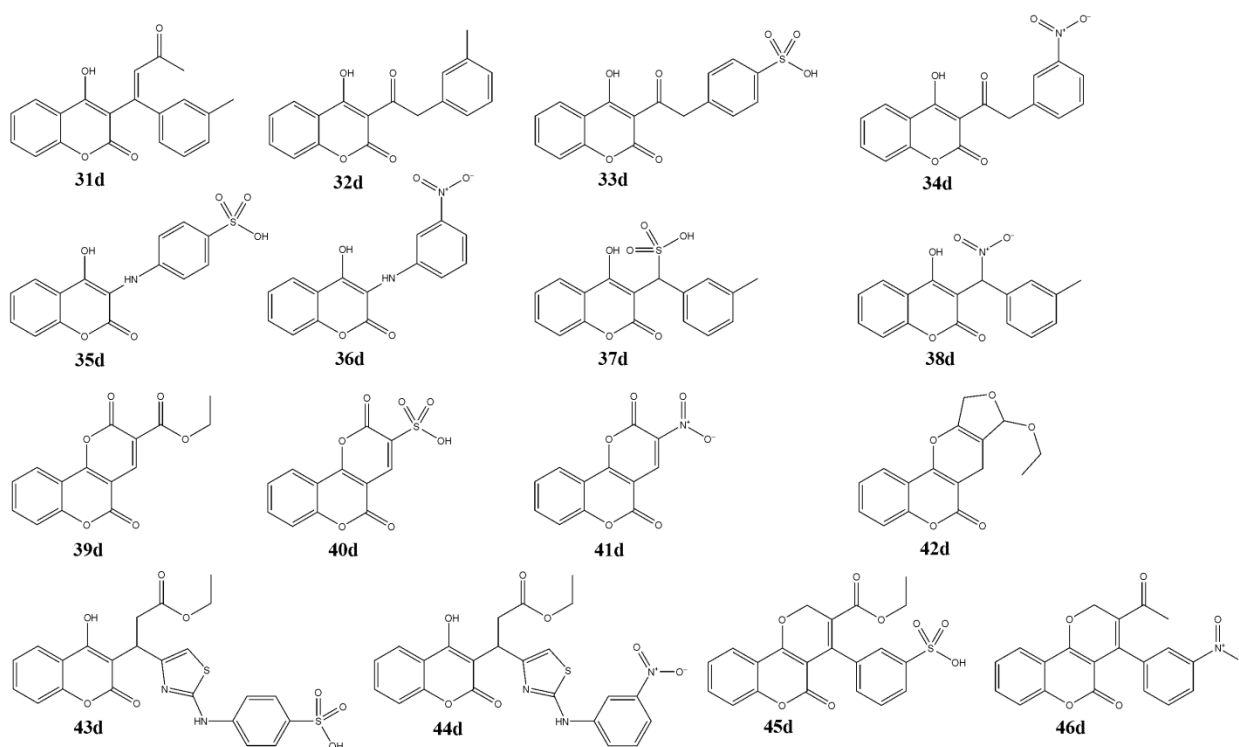


Схема 27. Структуре новодизајнираних кумаринских антикоагуланата

Пет структура **39d**, **37d**, **40d**, **45d** и **46d**, издвојене су као најбољи кандидати за хемијску синтезу и *in vivo* апликацију. Предвиђене вредности активности представљене су у Табели 15, где су сумиране CoMFA и CoMSIA анализа за једињења **1-10c** и **31-46d**.

**Табела 15.** Резултати CoMFA и CoMSIA регресионе анализе и предвиђене IC<sub>50</sub> и pIC<sub>50</sub> ново дизајнираних једињења

Јед.	IC <sub>50</sub> pIC <sub>50</sub> Експ.	CoMFA		CoMSIA		Дизајнирана једињења	CoMFA		CoMSIA	
		Изр.	Ост.	Изр.	Ост.		Изр.	Ост.	Изр.	Ост.
<b>1</b>	0,36	0,35		0,33		<b>31d</b>	0,25		0,25	
	2,77	2,83	0,06	2,95	0,05		3,97	0,05	3,92	0,07
<b>2b</b>	0,26	0,25		0,29		<b>32d</b>	0,25		0,26	
	3,85	3,94	0,30	3,38	0,37		3,95	0,09	3,87	0,44
<b>3b</b>	0,34	0,34		0,32		<b>33d</b>	0,25		0,25	
	2,94	2,96	0,28	3,10	0,26		4,04	0,35	3,99	0,15
<b>4b</b>	0,39	0,38		0,39		<b>34d</b>	0,25		0,26	
	2,56	2,60	0,14	2,58	0,22		3,98	0,12	3,81	0,09
<b>6b</b>	0,35	0,35		0,34		<b>35d</b>	0,24		0,25	
	2,86	2,84	0,41	2,97	0,40		4,14	0,41	4,06	0,25
<b>7b</b>	0,38	0,37		0,33		<b>36d</b>	0,24		0,25	
	2,63	2,65	0,02	2,70	0,03		4,10	0,08	4,03	0,35
<b>8b</b>	0,40	0,39		0,41		<b>37d</b>	0,23		0,24	
	2,50	2,56	0,06	2,43	0,06		4,21	0,24	4,12	0,14
<b>2c</b>	0,38	0,35		0,38		<b>38d</b>	0,24		0,24	
	2,63	2,79	0,46	2,63	0,27		4,14	0,56	4,08	0,04
<b>3c</b>	0,38	0,33		0,38		<b>39d</b>	0,24		0,24	
	2,63	3,04	0,40	2,62	0,38		4,22	0,58	4,07	0,02
<b>4c</b>	0,26	0,26		0,26		<b>40d</b>	0,24		0,24	
	3,85	3,90	0,14	3,84	0,12		4,18	0,13	4,11	0,19
<b>5c</b>	0,24	0,23		0,22		<b>41d</b>	0,24		0,25	
	4,16	4,33	0,83	4,38	0,63		4,13	0,25	3,98	0,41
<b>6c</b>	0,33	0,33		0,34		<b>42d</b>	0,26		0,29	
	3,03	2,95	0,08	2,95	0,07		3,87	0,34	3,44	0,52
<b>7c</b>	0,33	0,33		0,34		<b>43d</b>	0,24		0,25	
	3,03	2,98	0,04	2,93	0,08		4,07	0,27	4,06	0,38
<b>8c</b>	0,44	0,44		0,44		<b>44d</b>	0,24		0,24	
	2,27	2,25	0,98	2,26	0,42		4,09	0,41	4,11	0,72
<b>9c</b>	0,32	0,32		0,32		<b>45d</b>	0,24		0,24	
	3,13	3,16	0,04	3,12	0,05		4,15	0,03	4,10	0,65
<b>10c</b>	0,31	0,31		0,30		<b>46d</b>	0,24		0,24	
	3,23	3,17	0,05	3,36	0,18		4,12	0,15	4,07	0,28

### 3.8. Компјутационе студије механизма антикоагулативне активности у *in vivo* условима

Предложени механизам антикоагулативне активности кумаринских деривата постављен је тако да је да уважи сва Oldenburg-ова и Deerfield-ова разматрања понашања варфарина и витамина К током процеса коагулације [90,102].

Да би кумарин испољио своју антикоагулативну активност, молекул на почетну процеса мора да поприми облик сличан хинонској форми витамина К. Клинички антикоагулант варфарин у воденој средини, у зависности од рН раствора, може постојати у неколико таутомерних форми (Слика 17), од којих депротонване форме: депротонвана отворена форма (**ДОФ**), депротонвана отворена таутомерна форма (**ДОТФ**) и депротонвана отворена хроменска форма (**ДОХФ**) јесу сличне хинонском облику витамина К и као такве могу остварити интеракцију са активним центром VKORC1 и самим тим инхибирати редукцију епоксидне форме витамина К [101,103]. Оно што је проблем у разумевању механизма антикоагулативне активности варфарина јесте чињеница да литературно није нотирано формирање варфарин-2,3-епоксида као компетитивног инхибитора витамина К, те се стога механизам инхибиције одвија на други, за сада још увек непознат начин.

У овим механистичким студијама DFT методом, презентовано је неколико начина формирања депротонваних форми најактивних кумаринских антикоагуланата, **2b**, **4c**, **5c** и **9c**, као и њихова интеракција на нивоу активног центра VKORC1. Сви облици кумарина коју учествују у презентованим реакционим путевима јесу у строгој аналогiji са понашањем варфарина у воденом раствору. У сагласности са Oldenburg-овим виђењем механизма, антикоагулативна активност кумаринских деривата почиње везивањем отворене форме (**ОФ**), у којој 4-ОН група није депротонвана, за активни центар ензима (Схема 28). Каталитичка аминокиселина Cys135 SH остаје у непромењеном облику у првом кораку.

Након формирања кумарин-VKORC1 комплекса (Слика 43), први реакциони пут може бити трансформација отворене форме до отворене таутомерне форме (Схема 28, **ОТФ**) која је могући компетитивни инхибитор хинонске структуре витамина К. Друга реакција којој може подлећи **ОФ** јесте напад хидроксилног анјона из цитоплазме на протон са хидроксилне групе у положају 4 и последично формирање депротонване

отворене форме (Схема 28, **ДОФ**). Поставља се питање зашто се трансфер протона са хидроксилне групе не одвија помоћу коензима оксидоредукције типа  $\text{NAD}^{+}$ ? Одговор лежи у чињеници да **VKORC1** није „класичан” ензим из групе оксидоредуктаза и за своју каталитичку активност не захтева присуство коензима као носиоца еквивалентна редукције, већ се комплетна трансформација активне форме супстрата одвија на нивоу самог ензима. **ДОФ** се резонанцијоно стабилизује интрамолекулском делокализацијом до настанка фенолног аниона (Схема 28, **ФА**), форме која је могући компетитивни инхибитор хинонске структуре витамина К. Трансформација **ФА** може се даље наставити делокализацијом електрона до лактонског карбонила, чиме настаје депротонована отворена хроменска форма (Схема 28, **ДОХФ**) и која је такође један од могућих компетитивних инхибитора хинонске форме витамина К.

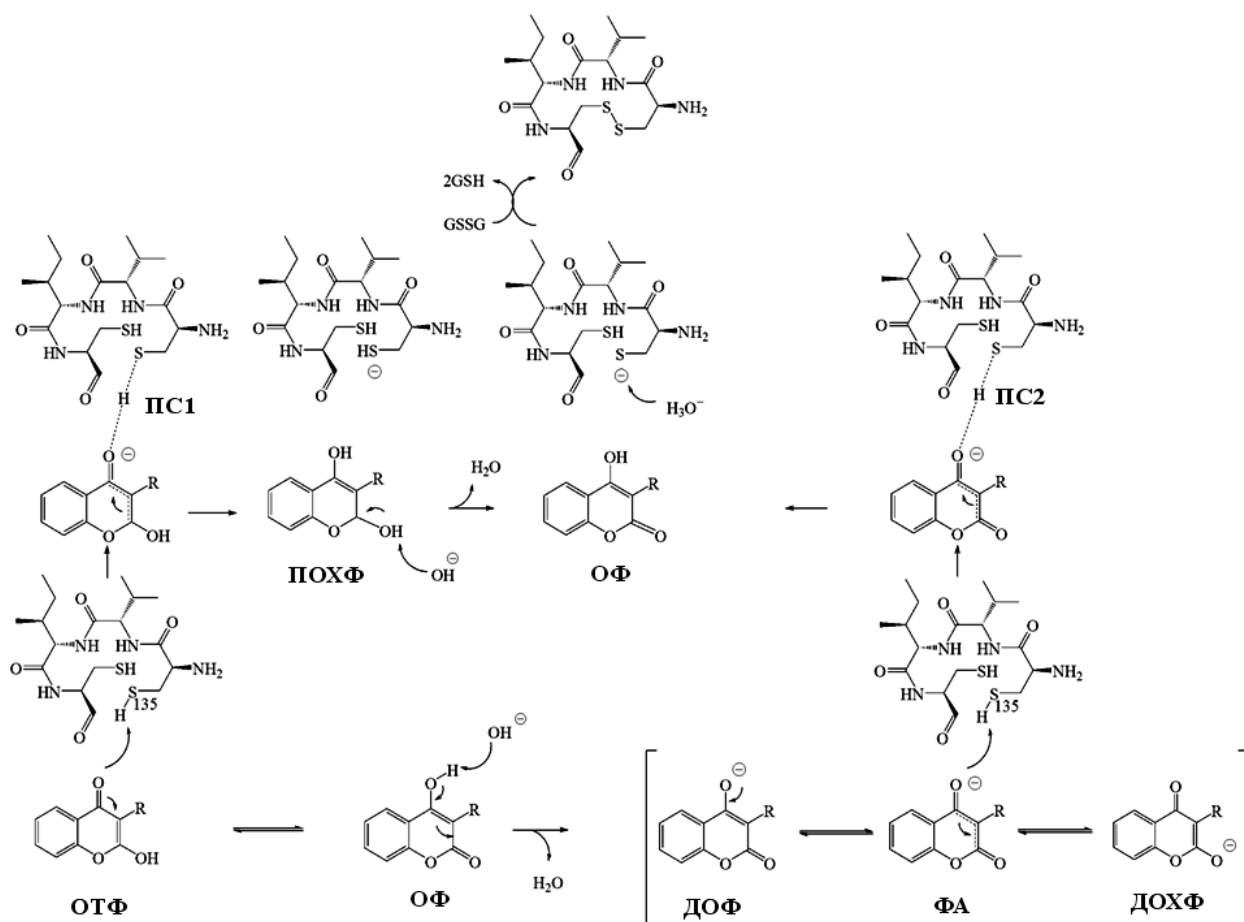


Схема 28. Предложени механизам антикоагулативне активности кумарина

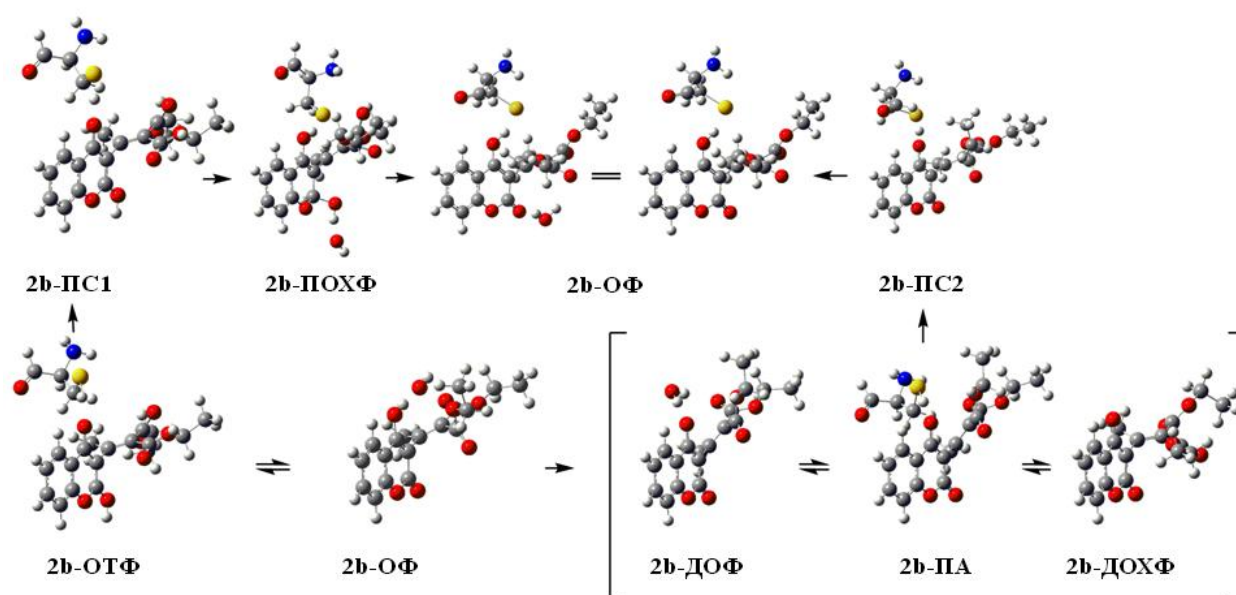
Наведени облици молекула кумарина су оријентисани према Cys135 из каталитичког центра VKORC1 (Слика 43). Како Oldenburg наводи да након извршене инхибиције варфарин из реакције излази у отвореној форми, дакле са хидроксилном групом у положају 4, иницијална форма антикоагуланта може се достићи након трансфера протона са каталитичке аминокиселине. Тако, протон из SH групе Cys135 може бити нуклеофилно нападнут од стране кисеоника из хидроксилне групе са положаја 4, из **ОТФ**, **ФА**, па чак и **ДОХФ** облика (Схема 28). Након трансфера протона, каталитичка аминокиселина поприма форму анјона. Завршна реакција у предложеном механизму јесте формирање дисулфидне везе. Редукција SH група каталитичког центра може се одвијати након апстракције протона са целуларног протонијум јона и поновног формирања Cys135 SH везе. Партиципација неутралне аминокиселине у редукцији се поклапа са Oldenburg-овим виђењем процеса. Како је VKORC1 трансмембрански протеин ендоплазматичног ретикулума, SH(Cys132) SH(Cys135) форма се редукује до дисулфидне везе преко оксидованог глутатиона GSSG. Скорашње студије показују да аминокиселина и као анјон може ући у процес редукције на овај начин [184].

Сваки корак предложеног механизма оптимизован је DFT методом. Почетне геометрије активних једињења у механизму, добијене након молекулског доковања, оптимизоване су у води као растварачу те су нотиране следеће енергије конформација: 203,36 kJ/mol, 207,98 kJ/mol, 214,56 kJ/mol, 208,89 kJ/mol и 197, 64 kJ/mol за **2b-ОФ** (Слика 44), **4c-ОФ** (Слика 45), **5c-ОФ**, **9c-ОФ** и варфарин, респективно.

Током механистичких студија тражена су прелазна стања преко којих се одвијају сви кораци у механизму. Међутим, пронађена су само она прелазна стања преко којих се одвија трансфер протона са каталитичке аминокиселине на депротоновану форму фенолног анјона и отворене таутомерне форме (Слике 44 и 45).

Енергетски профил реакција између таутомерне форме и Cys135 је прво испитиван. Енергија конформације **2b-ОТФ** износила је 203,42 kJ/mol, те је због мале разлике у енергији између **2b-ОТФ** и **2b-ОФ** закључено је се таутомеризација одвија спонтано (Слика 44). Трансфер протона са Cys135 на **2b-ОТФ** одвија се преко прелазног стања (**ПС1**). Почетне геометрије за оптимизацију прелазног стања постављене су поштујући растојања између молекула кумарина и аминокиселине која су добијена након молекулског доковања. Енергија активације потребна за поновни настанак отворене

форме **2b** преко **ПС1** износила је 4,97 kJ/mol. Унутар геометрије овог прелазног стања растојања  $C_{ys}135 \cdots H$  и  $H \cdots 2b$  била су 1,4794 and 1,4122 Å, респективно. Предложени реакциони пут предвиђа и формирање протоноване отворене хроменске форме (Слика 44, **2b-ПОХФ**) у којој су оба карбонилна кисеоникова атома у молекулу кумарина супституисана протоном. Равнотежна енергија овакве форме је ипак за 8,27 kJ/mol виша од енергије **2b-ОФ**, те се та разлика у енергији усмерава ка спонтаном депротонувању лактонске хидроксилне групе и настанку **2b-ОФ**, након напада целуларног хидроксилног јона. Стабилизациона енергија ове реакције износила је 196,58 kJ/mol.



Слика 44. DFT механистичке студије механизма антикоагулативног деловања **2b**

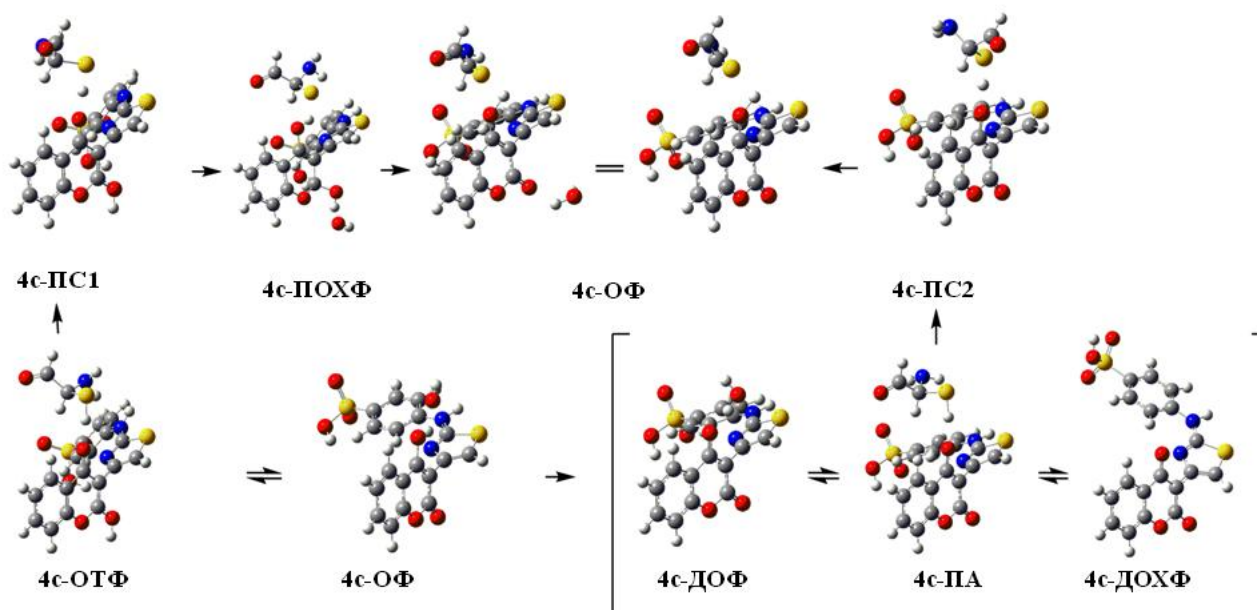
Реакција настанка депротоноване отворене форме **2b** (Слика 44, **2b-ДОФ**), нападом хидроксилног анјона на **2b-ОФ**, такође се одвија без активационе баријере, односно спонтано. Стабилизација **2b-ДОФ** одвија се интрамолекулском делокализацијом и настанком фенолног анјона (Слика 44, **2b-ФА**) што доводи до ослобађања енергије од 194,19 kJ/mol. Нижа енергетска вредност **2b-ФА** у односу на **2b-ОФ** указује на то да је настанак фенолног анјона фаворизован и вероватнији од настанка отворене таутометне форме. Механизам се даље одвија уз формацију анјона каталитичке аминокиселине, апстракцијом протона од стране **2b-ФА** преко прелазног стања (**ПС2**), чија је активациона баријера 4,91 kJ/mol. Нижа вредност активационе баријере **ПС2** у односу на **ПС1**, односно



енергетско фаворизовање реакције која се одвија на депротонованој форми, у сагласности је управо са литературном чињеницом да депротонована форма варфарина учествује у антикоагулационом механизму. Унутар геометрије прелазног стања **ПС2** растојања Cys135⋯Н и Н⋯**2b** била су 1,4818 и 1,4126 Å, респективно.

Формирање депротоноване отворене хроменске форме, (Слика 44, **2b-ДОХФ**) јесте енергетски врло неповољан процес, обзиром да је енергија **2b-ДОХФ** 26,42 kJ/mol већа у односу **2b-ОФ**. Резултат велике енергетске разлике је тренутна интрамолекулска стабилизација форме до фенолног анјона и одвијање реакције на већ описан начин.

Антикоагулативна активност **4c** (Слика 45), **5c**, **9c** и варфарина одвија се на истоветан начин. Израчунате енергије прелазних стања **ПС1** и **ПС2** јесу 8,86 и 8,02 kJ/mol, 11,26 и 10,14 kJ/mol, 11,36 и 10,88 kJ/mol, 17,24 и 16,35 kJ/mol, за **4c**, **5c**, **9c** и варфарин, респективно.



Слика 45. DFT механистичке студије механизма антикоагулативног деловања **4c**

Сумарно, најнижа вредност активационе енергије реакције између депротоноване форме фенолног анјона **2b** и каталитичке аминокиселине указује да се реакција одвија веома лако, што је у сагласности са високом *in vivo* активношћу овог деривата. Активационе енергије осталих аплицираних деривата фино кореспондирају презентованој антикоагулативној активности *in vivo*.

### 3.9. Биохемијски параметри серума и плазме лабораторијских животиња након апликације *in vivo* деривата кумарина

Биохемијски параметри серума, плазме и јетре након *in vivo* администрације приказани су у Табели 16. Сви биохемијски параметри одређени су са циљем да утврде да ли аплицирани кумарински деривати показују токсични ефекат на виталне органе експерименталних животиња.

Акцент приликом сагледавања статуса јетре након апликације, стављен је да активност серумских *трансаминаза* чија се каталитичка активност значајно повећава код готово свих оштећења хепатоцита [185]. Пораст активности *трансаминаза* један је од најважнијих показатеља оних оштећења која доводе до поремећаја пермеабилности ћелијске мембране. *Аспартат трансаминаза* (AST) и *аланин трансаминаза* ALT јесу ензими присутни у многим ткивима, али се убрајају у ензиме „специфичне” за јетру пошто су хепатоцити знатно богатији овим ензимима него ћелије осталих органа. Због своје ендоплазматске локације, концентрација ових ензима се повећава у екстрацелуларној течности чак и при малим оштећењима хепатоцита, услед нарушавања функционалног интегритета ћелијске мембране.

Оштећења јетре и жучних канала праћена су порастом каталитичке активности алкане фосфатазе (ALP) [185]. Код свих патолошких процеса који доводе до сметњи у протоку жучи, долази до изражаја солубулирајуће дејство жучних соли који изазивају ослобађање ALP са спољашње стране ћелијске мембране.

Пораст активности  $\gamma$ -глутамил *трансферазе* у серуму је скоро искључиво повезано са оштећењима јетре и жучних канала, те је вредновање каталитичке активности  $\gamma$ -GT драгоцено у констатацији оштећења хепатобилијарног система [185].

Повишена концентрација билирубина у серуму такође је један од клиничких показатеља оштећења жучи [185].

Статус јетре такође се може пратити преко концентрације серумског гвожђа и протеина [185].



Табела 16. Хепатотоксична активност кумаринских деривата **1-10с** и статус јетре након 24 h и петодневне апликације у концентрацији 0,5 mg/kg телесне масе

Јед.	Билирубин ( $\mu\text{mol/L}$ )	AST (U/L)	ALT (U/L)	ALP (U/L)	$\gamma$ -GT (U/L)	Fe ( $\mu\text{mol/L}$ )	Протеини (g/L)	Албумин (g/L)
<b>1</b>	1,7 $\pm$ 0,1	160,5 $\pm$ 0,4	34,8 $\pm$ 0,2	200 $\pm$ 0,4	3,8 $\pm$ 0,1	26,1 $\pm$ 0,1	63,8 $\pm$ 0,6	31,9 $\pm$ 0,6
<b>2b</b>	2,0 $\pm$ 0,2	238,3 $\pm$ 0,2 209,9 $\pm$ 0,2a	71,8 $\pm$ 0,3 55,5 $\pm$ 0,3b	513 $\pm$ 0,7	3,1 $\pm$ 0,2 2,3 $\pm$ 0,2в	28,4 $\pm$ 0,3 17,7 $\pm$ 0,3г	67,2 $\pm$ 0,5	35,2 $\pm$ 0,5
<b>3b</b>	1,7 $\pm$ 0,3	236,9 $\pm$ 0,3	65,5 $\pm$ 0,2	285 $\pm$ 0,3	2,8 $\pm$ 0,1	23,9 $\pm$ 0,4	66,4 $\pm$ 0,3	38,9 $\pm$ 0,4
<b>4b</b>	1,4 $\pm$ 0,2	154,3 $\pm$ 0,2	57,2 $\pm$ 0,2	333 $\pm$ 0,9	3,0 $\pm$ 0,3	54,2 $\pm$ 0,5	65,2 $\pm$ 0,4	39,0 $\pm$ 0,1
<b>6b</b>	1,5 $\pm$ 0,4	201,4 $\pm$ 0,4	56,4 $\pm$ 0,4	223 $\pm$ 0,5	4,4 $\pm$ 0,1	32,4 $\pm$ 0,3	66,5 $\pm$ 0,2	40,6 $\pm$ 0,6
<b>7b</b>	/	/	/	/	/	/	68,9 $\pm$ 0,6	38,6 $\pm$ 0,3
<b>8b</b>	1,8 $\pm$ 0,2	218,4 $\pm$ 0,3	51,8 $\pm$ 0,6	215 $\pm$ 0,6	4,4 $\pm$ 0,1	19,4 $\pm$ 0,2	62,8 $\pm$ 0,3	35,8 $\pm$ 0,5
<b>2c</b>	1,9 $\pm$ 0,2	232,5 $\pm$ 0,2	44,3 $\pm$ 0,3	213 $\pm$ 0,4	3,6 $\pm$ 0,2	22,6 $\pm$ 0,4	65,8 $\pm$ 0,4	37,4 $\pm$ 0,3
<b>3c</b>	1,7 $\pm$ 0,5	264,4 $\pm$ 0,2	68,7 $\pm$ 0,4	204 $\pm$ 0,8	3,8 $\pm$ 0,3	14,8 $\pm$ 0,3	63,0 $\pm$ 0,4	37,2 $\pm$ 0,4
<b>4c</b>	1,6 $\pm$ 0,1	269,7 $\pm$ 0,2 207,5 $\pm$ 0,2a	58,4 $\pm$ 0,3 63,0 $\pm$ 0,3b	164 $\pm$ 0,6	2,4 $\pm$ 0,2 2,2 $\pm$ 0,2в	19,3 $\pm$ 0,2 19 $\pm$ 0,2d	64,9 $\pm$ 0,2	40,8 $\pm$ 0,4
<b>5c</b>	1,8 $\pm$ 0,2	284,6 $\pm$ 0,2 175,5 $\pm$ 0,2a	67,3 $\pm$ 0,3 62,4 $\pm$ 0,3b	172 $\pm$ 0,2	2,2 $\pm$ 0,2 3,0 $\pm$ 0,2в	28,4 $\pm$ 0,4 17,3 $\pm$ 0,4г	66,2 $\pm$ 0,7	41,9 $\pm$ 0,1
<b>6c</b>	1,2 $\pm$ 0,1	231,5 $\pm$ 0,2	52,6 $\pm$ 0,2	246 $\pm$ 0,4	3,5 $\pm$ 0,2	27,4 $\pm$ 0,6	71,5 $\pm$ 0,1	35,4 $\pm$ 0,2
<b>7c</b>	2,0 $\pm$ 0,3	254,8 $\pm$ 0,1	64,7 $\pm$ 0,1	192 $\pm$ 0,7	4,4 $\pm$ 0,2	25,0 $\pm$ 0,2	63,2 $\pm$ 0,6	36,7 $\pm$ 0,5
<b>8c</b>	1,8 $\pm$ 0,1	263,4 $\pm$ 0,2	59,5 $\pm$ 0,3	318 $\pm$ 0,4	3,6 $\pm$ 0,1	29,2 $\pm$ 0,4	69,2 $\pm$ 0,3	36,3 $\pm$ 0,1
<b>9c</b>	2,2 $\pm$ 0,2	294,6 $\pm$ 0,3 210,7 $\pm$ 0,3a	52,4 $\pm$ 0,1 65,1 $\pm$ 0,1b	225 $\pm$ 0,4	2,8 $\pm$ 0,2 2,6 $\pm$ 0,2в	29,7 $\pm$ 0,1 17,3 $\pm$ 0,1г	64,2 $\pm$ 0,4	39,7 $\pm$ 0,2
<b>10c</b>	2,0 $\pm$ 0,2	345,3 $\pm$ 0,2	85,0 $\pm$ 0,2	210 $\pm$ 0,3	4,3 $\pm$ 0,1	24,6 $\pm$ 0,2	72,8 $\pm$ 0,2	41,3 $\pm$ 0,2
<b>K</b>	2,4 $\pm$ 0,5	169,0 $\pm$ 0,2 223,9 $\pm$ 0,2a	76,8 $\pm$ 0,4 40,7 $\pm$ 0,4b	516 $\pm$ 0,2	4,0 $\pm$ 0,2 4,5 $\pm$ 0,2в	44,2 $\pm$ 0,2 21,1 $\pm$ 0,2г	71,8 $\pm$ 0,5	39,3 $\pm$ 0,4
<b>W</b>	1,3 $\pm$ 0,2	277,3 $\pm$ 0,1	51,5 $\pm$ 0,4	170 $\pm$ 0,6	3,4 $\pm$ 0,1	22,3 $\pm$ 0,4	59,4 $\pm$ 0,4	34,5 $\pm$ 0,2

<sup>a</sup>Каталитичка активност AST након друге апликације у концентрацији 0,5 mg/kg;

<sup>b</sup>Каталитичка активност ALT након друге апликације у концентрацији 0,5 mg/kg;

<sup>в</sup>Каталитичка активност  $\gamma$ -GT након друге апликације у концентрацији 0,5 mg/kg;

<sup>г</sup>Концентрација Fe након друге апликације у концентрацији 0,5 mg/kg.

Након прве администрације у концентрацији 0,5 mg/kg, већина тестираних деривата условило је благу инфламацију јетре обзиром на мало повећање AST и концентрације гвожђа у серуму [185]. Ипак, измерене повишене вредности AST у серуму након апликације **2b**, **4c**, **5c** и **9c**, у односу на контролу, указале су да су наведени кумарини потенцијални инфламаторни агенси. Администрација **2b** и **4c** индуковала је мањи инфламаторни ефекат од варфарина, док је **9c** изроковало највећу упалу јетре. Међутим, током дуготрајне апликације у концентрацији 0,5 mg/kg инфламаторни ефекат

најактивнијих једињења потпуно је анулиран, те су измерене вредности AST биле мање и у односу на контролу. Разлог овоме вероватно лежи у лакој и брзој елиминацији аплицираних деривата путем урина.

Ниска каталитичка активност ALT и ALP током оба тест периода апликације 0,5 mg/kg кумарина, показала је да деривати не изазивају хемијско оштећење јетре [185] што је потврђено и са константном вредношћу протеина [185] и визуелно. Смањење концентрације билирубина у односу на контролу и нормална каталитичка активност  $\gamma$ -GT доказ је да су деривати без утицаја на жуч [185].

## ***4. ЗАКЉУЧАК***

---

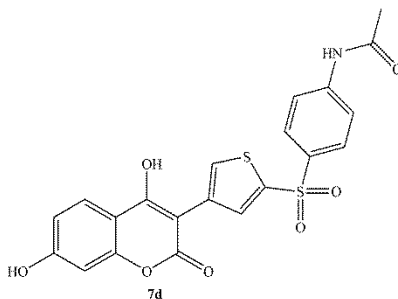


У светлу резултата биолошких активности синтетисаних деривата 4-хидроксикумарина, презентованих у Поглављу 3, *Резултати и дискусија*, могу се извести следећи закључци:

**Антимикробна активност деривата 1-10с може се сумирати на следећи начин:**

- Кумарински деривати **1-10с** показали су умерену до слабу антибактеријску активност са МИС вредностима у интервалу од 31,25-500  $\mu\text{g}/\text{mL}$  за чисте културе, односно 940  $\mu\text{g}/\text{mL}$  за изолат *S. aureus*.
- Висок ниво активности на бактерије и гљиву полазало је једињење **3b**, *cis*-карбонил/*trans*-карбоксиметил дериват са МИС=130-500  $\mu\text{g}/\text{mL}$ .
- Најактивније једињење **9с**, *m*-NO<sub>2</sub> *N*-тиазолински дериват, са МИС у интервалу од 31,25-62,5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ .
- Антимикробна активност дефинисана је са три статистички значајна 1D-QSAR модела
- Статистички значајним QSAR моделом за активност на *S. aureus* ( $F=104,2987$ ,  $r=0,997$ ) установљено је да је за инхибицију раста G+ бактерија значајна нуклеофилност кумаринских деривата и наелектрисање азота из тиазолинског прстена.
- Статистички значајним QSAR моделом за активност на *E. coli* ( $F=28,8394$ ,  $r=0,995$ ) установљено је да је за инхибицију раста G- бактерија значајна растворљивост кумарина у мембрани, њихова електрофилност и наелектрисања атома кисеоника и азота у 4-ОН и тиазолинском прстену, респективно.
- Статистички значајним QSAR моделом за активност на *C. albicans* ( $F=42,6548$ ,  $r=0,991$ ) установљено је да је за инхибицију раста гљиве растворљивост кумарина у мембрани, стерна оријентација C-3 остатака и наелектрисање атома сумпора из тиазолинског прстена.
- Студијом молекулског доковања дефинисана је интеракција најактивнијих деривата са ДНК-гиразом при чему је константа инхибиције **9с** износила  $K_i=947,82$   $\mu\text{M}$ .
- Резултати QSAR студија потврђени су студијама молекулског доковања.

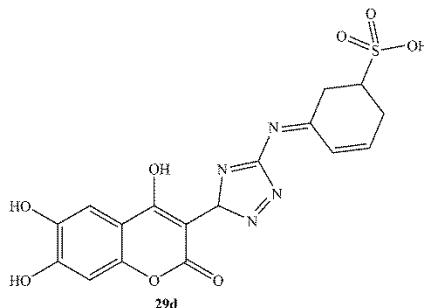
- QSAR и студије молекуског доковања искоришћене су у дизајну 10 нових деривата са антимикуробном активношћу.
- Најозбиљнији кандидат за будућу синтезу јесте дериват **7d** са изачунатим вредностима MIC=3 µg/mL и Ki=90,06 µM.



**Антиоксидативна активност деривата 1-10c може се сумирати на следећи начин:**

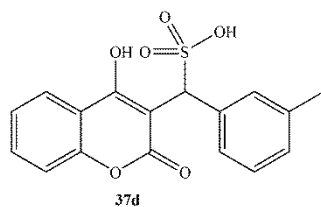
- Највишу вредност тоталног антиоксидативног капацитета показало је једињење **4c**, *p*-сулфо дериват, са измереном вредношћу TAC=742,67 µgE<sub>Asc</sub>/mL.
- Након 30 минута, највећу способност неутрализаје DPPH радикала приказало је једињење **4c**, IC<sub>50</sub>=4,72 µg/mL, док је након 60 минута највећу способност неутрализације DPPH радикала приказало једињење **6b**, *cis/trans*-ацетил дериват са измереном активношћу IC<sub>50</sub>=2,45 µg/mL.
- Највећу способност инхибиције липидне пероксидације показало је једињење **6b** са измереним вредностима I<sub>50</sub> =<3,90 µg/mL; 10,13 µg/mL; 10,76 µg/mL за 24 , 48 и 72 сати.
- Највећу способност неутрализације хидроксил радикала показало је једињење **4c** са измереном активношћу OH<sub>50</sub>=5,94 µg/mL.
- Висок хелатизациони капацитет исказан је код једињења **3c**, *p*-нитро деривата, са нотираном активношћу CE<sub>50</sub>=5,5 µg/mL.
- Антиоксидативна активност дефинисана је са пет статистички значајних 1D-QSAR модела.

- Статистички значајним моделом за дескрипцију тоталног антиоксидативног капацитета ( $F=37,426$ ,  $r=0,992$ ) показано је да при редукцији Mo(VI) значајан утицај имају електрони из НОМО орбитала кумаринских деривата.
- Статистички значајним моделом за дескрипцију неутрализације DPPH радикала ( $F=97,236$ ,  $r=0,995$ ) показано је да активност кумарина значајно зависи од дужине 4-ОН везе и лакоће препуштања протона радикалу.
- Статистички значајним моделом за дескрипцију инхибиције липидне пероксидације ( $F=103,981$ ,  $r=0,993$ ), установљено је да кативност у многеме зависи од растворљивости кумаринских деривата у мицеларном систему мемембране и од дужине 4-ОН везе и лакоће препуштања протона радикалу.
- Статистички значајним моделом за дескрипцију неутрализације хидроксил радикала ( $F=174,273$ ,  $r=0,997$ ) приказане су LUMO орбитале као акцептори хидрокси радикала.
- Статистички значајним моделом за дескрипцију хелатизационог капацитета ( $F=43,383$ ,  $r=0,993$ ) нотиран је стерни утицај функционалних група са положаја C-3 приликом хелатизације фери-јона.
- Антиоксидативна активност најактивних деривата значајно зависи од енталпије раскидања везе у хидроксилној групи на положају 4, од дужине те везе и од конформације једињења у растварачу.
- QSAR и компјутационе студије искоришћене су у дизајну двадесет нових једињења.
- Најозбилнији кандидат за будућу синтезу јесте дериват **29d** са изачунатим вредностима  $IC_{50}=724,68$  ng/mL,  $I_{50}=876,4$  ng/mL,  $OH_{50}=1,12$   $\mu$ g/mL и  $CE_{50}=1,18$   $\mu$ g/mL.



Антикоагулативна активност деривата **1-10c** може се сумирати на следећи начин:

- Највећу активност *in vivo* показује једињење **2b**, *cis/trans*-диетилмалонатни дериват, са измереном активношћу  $PT=30$  сек након петодневне апликације у концентрацији  $0,5 \text{ mg/kg}$  по килограму телесне масе.
- Антикоагулативна активност *in vivo* дефинисана је са два статистички значајна 3D-QSAR модела
- CoMFA моделом карактерисан је допринос стерних (51,9%) и електронских параметара (49,1%) на активност и њиме су дефинисане функционалне групе које обезбеђују високу активност у интеракцији са хомологим моделом VKORC1 пацова.
- Статистички значајним CoMFA-SE моделом ( $q^2=0,738$ ,  $r^2=0,931$ ) потврђен је висок утицај диетилмалонатног (**2b**) и тиазол-*N*-Ph-SO<sub>3</sub>H (**4c**) остатака на активност.
- CoMSIA моделом карактерисан је допринос стерни (11,2%), електронских (42,6%) и поља акцептора водоничних веза (46,2%) на активност.
- Статистички значајним CoMSIA-SEA моделом ( $q^2=0,763$  и  $r^2=0,916$ ) потврђен је висок утицај диетилмалонатног (**2b**) и тиазол-*N*-Ph-SO<sub>3</sub>H (**4c**) остатака на активност.
- Резултати антикоагулативне активности дефинисани су студијом молекуларног доковања, при чему је предвиђена константа инхибиције **2b** износила  $Ki=68,9 \text{ } \mu\text{M}$ .
- 3D-QSAR студије коришћене су у дизајну шеснает нових деривата
- Најозбиљнији кандидат за будућу синтезу јесте дериват **37d** са изачунатим вредностима  $pIC_{50}=4,21$  ( $PT=42$  сек) CoMFA-SE методом, односно  $pIC_{50}=4,12$  ( $PT=38,6$  сек) CoMSIA-SEA методом.





- Механизам антикоагулатине активности одвија се интеракцијом форме фенолног анјона кумарина са каталитичком аминокиселином Cys135, преко прелазног стања чија је активациона баријера 4,91 kJ/mol.

**Фармаколошки профил деривата 1-10c може се сумирати на следећи начин:**

- Након једнодневне апликације једињења **2b**, **4c**, **5c** и **9c** у концентрацији 0,5 mg/kg, сви аплицирани деривати показали су благи инфламаторни ефекат, констатован повећањем концентрација серумских AST и ALT.
- Највећу инфламацију хепатоцита узроковало је једињење **9c**, р-нитро дериват.
- Након континуалне петодневне администрације у концентрацији 0,5 mg/kg инфламаторни ефекат аплицираних кумаринских деривата потпуно је анулиран.
- Деривати не показују токсични ефекат на јетру и жуч.
- Деривати **1-10c** се екскретују урином у форми 7-глукуронида.
- Брзом елиминацијом аплицираних деривата може се објаснити смањење инфламационог утицаја најактивнијих једињења.



## ***5. ЛИТЕРАТУРА***

---



1. С. Сукдолак, С. Солујић, Н. Вуковић, *Хемија и биохемија кумарина*, ПМФ, Крагујевац, **2007**.
2. Х. А. Кузнецова, *Природније Кумарини и Фуурокумарини*, Наука, Ленинград, **1967**.
3. G. A. Denisova, *Rastit. Resursi*, **1965**, 3, 425-428.
4. T. W. Goodwin, E. I. Mercer, *Introduction to Plant bichemistry*, 2nd ed., Pergamon Press, New York, USA, **1983**.
5. B. Liu, T. Raeth, T. Beuerle, L. Beerhues, *Plant Mol. Biol.*, **2010**, 72, 17-25.
6. J. R. Johnson, *Org. React.*, **1942**, 1, 210-214.
7. S. Sethna, R. Phadke, *Org. React.*, **1953**, 7, 1-9.
8. S. Wawzonek, *Heterocyclic Compounds*, ed. R. C. Elderfield, Wiley, New York, **1951**.
9. O. Dann, G. Illing, *Annalen*, **1957**, 605, 158-167.
10. E. Fisher, O. Nouri, *Ber.*, **1917**, 50, 693-701.
11. A. Chatterjea, *Indian. J. Chem.*, **1977**, 15B, 214-218.
12. V. K. Ahliwalta, D. Kumar, *Indian. J. Chem.*, **1977**, 15B, 514-518.
13. R. Anschutz, *Ber. Deutsch. Chem Gez.*, **1903**, 36, 465-451.
14. K. Pauly, K. Lockermann *Ber. Deutsch. Chem Gez.*, **1915**, 48, 28-32.
15. J. Boyd, A. Robertson, *J. Chem. Soc.*, **1948**, 0, 174-176.
16. E. Zeigler, H. Junek, *Mh. Chem.*, **1955**, 88, 29-38.
17. A. Kasabe, V. Mohite, J. Ghodake, J. Vidhate, *E-J. Chem.*, **2010**, 7, 377-382.
18. P. Zhao, L. Wang, X. Zhu, X. Huang, C. Zhan, J. Wu, G. Yang, *JACS*, **2010**, 132, 185-194.
19. W. Gao, W. Hou, M. Zhang, L. Thang, *Synth. Commun.*, **2010**, 40, 732-738.
20. C. Mentzer, P. Vercier, *Mh. Chem.*, **1955**, 88, 264-268.
21. I. Kostova, *Curr. Med. Chem.*, **2005**, 5, 29-46.
22. S. Stanchev, G. Momekov, F. Jensen, I. Manolov, *Eur. J. Med. Chem.*, **2008**, 43, 694-706.
23. H. Liu, H. Liu, J. Chen, Y. Yang, B. Song, L. Bai, J. Liu, H. Zhu, X. Qi, *Bioorg. Med Chem. Lett.*, **2010**, 20, 5705-5708.
24. N. S. Reddy, M. R. Mallireddigari, S. Cosenza, K. Gumireddy, S. C. Bell, E. P. Reddy, M. V. R. Reddy, *Bioorg. Med Chem. Lett.*, **2004**, 14, 4093-4097.
25. L. Pisani, G. Muncipinto, T. F. Miscioscia, O. Nicolotti, F. Leonetti, M. Catto, C. Cassia, P. Salvati, R. Soto-Otero, E. Mendez-Alvarez, C. Passeleu, A. Carotti, *J. Med. Chem.*, **2009**, 52, 6685-6706.

26. A. Carotti, A. Carrieri, S. Chimichi, M. Boccalini, B. Cosimelli, C. Gnerre, A. Carotti, P. Carrupt, B. Testa, *Bioorg. Med Chem. Lett.*, **2002**, 12, 3551-3555.
27. M. C. Isoldi, A. C. Scarparo, R. I. Schumacher, A. M. Castrucci, *Pigment Cell. Res.*, **1999**, 12, 367-375.
28. L. D. Kong, R. X. Tan, A. Y. Woo, C. H. Cheng, *Pharmacol. Toxicol.*, **2001**, 88, 75-80.
29. K. Oda, Y. Yamaguchi, T. Yoshimura, K. Wada, N. Nishizono, *Chem. Pharm. Bull.*, **2007**, 55, 1419—1421.
30. A. Shafiee, R. Motamedi, O. Firuzi, S. Meili, A. R. Mehdipour, R. Muri, *Med. Chem. Res.*, **2011**, 20, 466-474.
31. C. Spino, M. Dodier, S. Sotheeswaran, *Bioorg. Med Chem. Lett.*, **1998**, 8, 3475-3478.
32. J. Duarte, I. Vallejo, F. P. Vizcaino, R. Jimenez, A. Zarzuelo, J. Tamargo, *Planta Med.*, **1997**, 63, 233-236.
33. M. C. Toimil, F. Orralo, L. Santana, E. Uriarte, *Bioorg. Med Chem. Lett.*, **2002**, 12, 783-786.
34. M. Ghate, D. Manohar, V. Kulharni, R. Shobha, S. Y. Kattimani, *Eur. J. Med. Chem.*, **2003**, 38, 297-302.
35. Grupa autora, redactor M. Švabić-Vlahović, *Medicinska bakteriologija*, Savremena administracija, Beograd, **2005**.
36. M. Gladwin, B. Trattler, *Clinical Microbiology made ridiculously simple*, 3rd ed., Miami, MedMaster Inc, **2004**.
37. H. Chen, C. T. Walsh, *Chem. Biol.*, **2001**, 8, 301-312.
38. D. Voet, J. G. Voet, *Biochemistry*, 5th ed., John Willey and Sons, New York, USA, **2010**.
39. J. Koolman, R. H. Roehm, *Color Atlas of Biochemistry*, 2nd ed., Thieme, Stuttgart, Germany, **2005**.
40. S. A. Salmon, J. T. Watts, F. M. Aarestrup, J. W. Pankey, R. J. Yancey Jr., *J. Dairy Sci.*, **1998**, 81, 570-578.
41. M. S. Sanchez, J. L. Watts, *J. Dairy Sci.*, **1999**, 82, 495-499.
42. B. Musicki, A. Periers, P. Laurin, D. Ferroud, Y. Benedetti, S. Lachaud, F. Chatreaux, J. Haesslein, A. Iltis, C. Pierre, J. Khider, N. Tessot, M. Airault, J. Demasse, C. Dupuis-Hamelin, P. Lassaigne, A. Bonnefoy, P. Vicat, M. Klich, *Bioorg. Med Chem. Lett.*, **2000**, 10, 1695-1699.

43. U. Galm, S. Heller, S. Shapiro, M. Page, S. Li, L. Heide, *Antimicrob. Agents Chemother.*, **2004**, *48*, 1307-1312.
44. F. Cottiglia, G. Loy, D. Garau, C. Floris, M. Casu, R. Pompei, L. Bonsignore *Phytomedicine.*, **2001**, *8*, 302–305.
45. A. C. Stein, S. Álvarez, C. Avancini, S. Zacchino, G. von Poser, *J. Ethnopharmacol.*, **2006**, *107*, 95–98.
46. A. Oliva, K. M. Meepagala, D. E. Wedge, D. Harries, A. L. Hale, G. Aliotta, S. O. Duke, *J. Agric. Food Chem.*, **2003**, *51*, 890-896.
47. G. Appendino, E. Mercalli, N. Fuzzati, L. Arnoldi, M. Stavri, S. Gibbons, M. Ballero, A. Maxia, *J. Nat. Prod.*, **2004**, *67*, 2108-2110.
48. T. Smyth, V. N. Ramachandran, W. F. Smyth, *Int. J. Antimicrob. Agents.*, **2009**, *33*, 421–426.
49. Ž. Debeljak, A. Škrbo, I. Jasprica, A. Mornar, V. Plečko, M. Banjanac, M. Medić-Šarić, *J. Chem. Inf. Model.*, **2007**, *47*, 918-926.
50. Z. N. Siddiqui, M. Musthafa T. N., A. Ahmad, A. U. Khan, *Arch. Pharm. Chem. Life Sci.*, **2011**, *000*, 1–8.
51. D. Završnik, S. Špirtović-Halilović, Dž. Softić, *Periodicum biologorum.*, **2011**, *113*, 93-97.
52. G. Cravotto, S. Tagliapietra, R. Cappello, G. Palmisano, M. Curini, M. Boccalini, *Arch. Pharm. Chem. Life Sci.*, **2006**, *339*, 129 – 132.
53. Y. Shi, C. Zhou, *Bioorg. Med Chem. Lett.*, **2011**, *21*, 956-960.
54. P. B. Kaswala, K. H. Chikhaliya, N. K. Shah, D. P. Patel, D. H. Patel, G. V. Mudaliar *ARKIVOC.*, **2009**, *11*, 326-335.
55. M. Traykova, I. Kostova, *Int. J. Pharmacol.*, **2005**, *1*, 29-32.
56. B. Halliwell, J. M. C. Gutteridge, *Free Radicals in Biology and Medicine*, Clarendon, 3rd ed., Press, Oxford, **1999**.
57. I. N. Acworth, *The Handbook of Redox Biochemistry*, Eds. ESA, Inc., Chelmsford, USA, **2003**.
58. W. Droge, *Physiol. Rev.*, **2002**, *82*, 47-95.
59. J. L. Marx, *Science.*, **1985**, *235*, 529-531.
60. B. Halliwell, *Free Rad. Res.*, **1990**, *9*, 1-32.
61. L. Juliano, A. R. Colavita, R. Leo, D. Pratico, F. Violi, *Free Rad. Biol. Med.*, **1997**, *22*, 999-1006.

62. B. Lassegue, K. K. Griending, *Am. J. Hyper.*, **2004**, *17*, 852-860.
63. L. J. McIntosh, M. A. Trush, J. C. Tronsoco, *Free Rad. Biol. Med.*, **1997**, *23*, 183-190.
64. G. Festa, T. Aglitti, G. Duranti, R. Ricordi, P. Perticone, R. Cozzi, *Anticancer Res.*, **2001**, *21*, 3903-3908.
65. L. Benov, I. Fridovich, *J. Biol. Chem.*, **1998**, *273*, 8217-8224.
66. A. N. Polidoros, J. G. Scandalios, *Physiol. Plant.*, **1999**, *106*, 112-120.
67. A. Todd, A. Kennedy, D. C. Liebler, *J. Biolog. Chem.*, **1992**, *267*, 4658-4663.
68. H. Sies, N. I. Krinsky, *Am. J. Clin. Nutr.*, **1995**, *62*, 1229-1300.
69. A. K. Bansal, D. Bhatnagar, G. L. Son, *Toxicol. In Vitro.*, **1996**, *10*, 649-653.
70. Hoult, J; Paya, M. *Gen. Pharmacol.*, **1996**, *27*, 713-722.
71. R. Singh, B. Singh, S. Singh, N. Kumar, S. Kumar, S. Arora, *Food Chem.*, **2010**, *120*, 825-830.
72. C. Wua, M. Huang, Y. Lin, H. Ju, H. Ching, *Food Chem.*, **2007**, *104*, 1464-1471.
73. P. T. Thuong, T. M. Hung, T. M. Ngoc, D. T. Ha, B. S. Min, S. J. Kwack, T. S. Kang, J. S. Choi, K. H. Bae, *Phytother. Res.*, **2009**, *24*, 101-106.
74. R. Torres, F. Faini, B. Modak, F. Urbina, C. Labbé, J. Guerrero, *Phytochem.*, **2006**, *67*, 984-987.
75. M. Ismail, M. Ibrar, Z. Iqbal, J. Hussain, H. Hussain, M. Ahmed, A. Ejaz, M. I. Choudhary, *Rec. Nat. Prod.*, **2009**, *3*, 193-197.
76. X. L. Piao, I. H. Park, S. H. Baek, H. Y. Kim, M. K. Park, J. H. Park, *J. Ethnopharmacol.*, **2004**, *93*, 243-246.
77. A. Basile, S. Sorbo, V. Spadaro, M. Bruno, A. Maggio, N. Faraone, S. Rosselli, *Molecules.*, **2009**, *14*, 939-952.
78. S. Y. Kang, Y. C. Kim, *Arch. Pharm. Res.*, **2007**, *30*, 1368-1373.
79. M. Foti, M. Piattelli, M. Tiziana Baratta, G. Ruberto, *J. Agric. Food Chem.*, **1996**, *44*, 497-501.
80. T. Kaneko, N. Baba, M. Matsuo, *Chemico-Biological Interact.*, **2003**, *142*, 239-254.
81. S. Ćavar, F. Kovač, M. Maksimović, *Food Chem.*, **2009**, *117*, 135-142.
82. N. Vuković, S. Sukdolak, S. Solujić, N. Nićiforović, *Food. Chem.*, **2010**, *120*, 1011-1018.
83. N. Hamdi, F. Bouabdallah, A. Romerosa, R. Benhassen, *C. R. Chimie.*, **2010**, *13*, 1261-1268.



84. G. Melagraki, A. Afantitis, O. Igglessi-Markopoulou, A. Detsi, M. Koufaki, C. Kontogiorgis, D. J. Hadjipavlou-Litina, *Eur. J. Med. Chem.*, **2009**, *44*, 3020–3026.
85. A.C Kontogiorgis, J. D. Hadjipavlou-Litina, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2004**, *14*, 611-614.
86. S. Stanchev, V. Hadjimitova, T. Traykov, T. Boyanov, I. Manolov, *Eur. J. Med. Chem.*, **2009**, *44*, 3077–3082.
87. R. K. Murray, D. K. Graner, P. A. Mayes, V. W. Rodwell, *Harper's Illustrated Biochemistry*, 26<sup>th</sup> ed., The McGraw-Hill Companies, **2003**.
88. D. Koračević, G. Bjelaković, V. B. Đorđević, J. Nikolić, D. D. Pavlović, G. Kocić *Biohemija*, 4. izdanje, Savremena administracija, Beograd, **2006**.
89. J. Oldenburg, M. Watzka, S. Rost, C. R. Muller. *J. Thromb. Haemost.* **2007**, *5* (Supl. 1), 1-6.
90. J. Oldenburg. Project: Genotype-phenotype association studies in clinically well-characterized patients with inherited bleeding disorders. *Cardiovascular diseases*.
91. L. Goldstad, C. P. Pouting. *TRENDS in Biochem. Sci.*, **2004**, *29*, 289-292.
92. E. Koch, A. Biber. *Phytomedicine.*, **2007**, *14*, 40-41.
93. I. Petipas, A. A. Bhattacharya, S. Twine, M. Twine, M. East, S. Curry. *J. Biol. Chem.*, **2001**, *276*, 22804-22809.
94. M. Wada, K. Kumagai, M. Murata, Y. Yamashuta, H. Shindo. *J. Orthop. Sci.*, **2004**, *9*, 589-590.
95. R. D. H. Murray, *Nat. Prod. Rep.*, **1989**, *8*, 591-624.
96. T. P. Baglin, D. M. Keeling, H. G. Watson. *Br. J. Haematol.*, **2006**, *132*, 277-285.
97. P. M. Ridker, S. Z. Goldhaber, E. Danielson, Y. Rosenberg, C. S. Eby, S. R. Deitcher, M. Cushman, S. Moll, C. M. Kessler, C. G. Elliott, R. Paulson, T. Wong, K. A. Bauer, B. A. Schwartz, J. P. Miletich, H. Bounameaux, R. J. Glynn, *N. Engl. J. Med.*, **2003**, *348*, 1425-1434.
98. J. Barnes, Working Group on Complementary Medicine (September **2002**). "Herb-medicine interactions: St John's Wort (*Hypericum perforatum*) Useful information for pharmacist" *Retrieved 14 January 2009*.
99. A. D. Martin, L. C. Streed, J. E. Gill, L. W. Hunson, *Lab. Animals.*, **1979**, *13*, 209-214.
100. B. C. G. Karlsson, A. M. Rosengren, P. O. Andersson, I. A. Nicholls, *J. Phys. Chem. B.*, **2007**, *111*, 10520-10528.

101. M. J. Fasco, L. M. Principe, *J. Biol. Chem.*, **1982**, *10*, 4849-4901.
102. D. Deerfield, C. H. Davis, T. Wymore, D. W. Stafford, L. G. Pedersen. *Int. J. Quantum Chem.*, **2006**, *106*, 2944-2952.
103. H. Henchel, B. C. G. Karlsson, A. M. Rosengren, I. A. Nicholls, *J. Mol. Struct. THEOCHEM.*, **2010**, *958*, 7-9
104. O. T. Macina, J. L. Schardein, *Warfarin. Human Developmental Toxicants*. Boca Raton, CRC Taylor & Francis. **2007**.
105. C. M. Loftus, *Neurosurgical Aspects of Pregnancy*. Park Ridge, Ill: American Association of Neurological Surgeons. **1995**
106. J. D. Horthon, B. M. Bushwick. *Am. Far. Physician.*, **1999**, *59*, 635-646.
107. O. M. Abdelhafez, K. M. Amin, R. Z. Batran, T. J. Maher, S. A. Nada, S. Sethumadhavan *Bioorg. Med. Chem.*, **2010**, *18*, 3371-3378.
108. I. Manolov, C. Maichle-Moessmer, N. Danchev, *Eur. J. Med. Chem.*, **2006**, *41*, 882-890
109. I. Manolov, N. Danchev, *Arch. Pharm. Pharm. Med. Chem.*, **2003**, *2*, 83-94.
110. O. Pelkonen, H. Rannio, A. Rantio, J. Maenpaa, M.A. Lang, *J. Irch. Coll. Phys. Surg.*, **1993**, *22*, 24.
111. G. Eisenbrand, M. Otteneder, W. Tang. *Toxicol.*, **2003**, *190*, 249, 258.
112. J. Hirsch, V. Fuster, J. Aussel, J. L. Halpelin, *J. Am. Coll. Cardion.*, **2003**, *41*, 1633-1652.
113. L. S. Kaminsky, Z. Y. Zhang, *Pharmacol. Theor.*, **1997**, *73*, 66-74.
114. G. L. Patric, *An Introduction to Medicinal Chemistry*, 4th ed., Oxford University Press, **2009**.
115. J. D. McKinney, A. Richard, C. Waller, M. C. Newman, F. Gerberic, *Toxicol. Sci.*, **2006**, *56*, 8-17.
116. R. Todeschini, V. Consonni, R. Mannhold, H. Kubinyi, H. Timmerman, *Handbook of Molecular descriptors*, 1st ed., Wiley-VCH, **2002**.
117. C. Nantasenamat, C. Isarankura-Na-Ayudhya, T. Naenna, V. Prachayasittikul, *Excli-J.*, **2009**, *8*, 74-88
118. M. Mladenović, N. Vuković, N. Nićiforović, S. Sukdolak, S. Solujić, *Molecules*, **2009**, *14* 1495-1512.
119. N. Vuković, S. Sukdolak, S. R. Solujić, T. Milošević, *Arch. Der. Pharm.*, **2008**, *341*, 491-496.

120. NCCLS. *Performance standards for antimicrobial susceptibility testing 14<sup>th</sup> Int. Supplement M100-S14*. Wayne, PA, USA, **2003**.
121. M. M. Vrvic, G. Cvijovic-Gojgic, *Praktikum za mikrobiološku hemiju*, Hemijski fakultet, Beograd, **2003**.
122. Grupa autora, T. Jovanovic (urednik), *Praktikum iz mikrobiologije i imunologije*, Savremena administracija, Beograd, **2000**.
123. Grupa autora, M. Švabić-Vlahović (urednik), *Medicinska bakteriologija*, Savremena administracija, Beograd, **2005**.
124. Software Spartan 2006 for Windows. Wavefunction, Inc., USA, **2006**.
125. F. Mohamadi, N. Richards, W. Guida, R. Liskamp, M. Lipton, C. Caulfield, G. Chang, T. Hendrikson, W. Still, *J. Comput. Chem.*, **1990**, *11*, 440-467.
126. W. L. Jorgensen, J. Tirado-Rivers, *J. Am. Chem. Soc.*, **1988**, *110*, 1657-1666.
127. D. March, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **1998**, *14*, 7777-7782
128. M. P. Allen, D. J. Tildesley, *Computer Simulation of Liquids*, Oxford Univeristy Press, **1987**.
129. S. Stanchev, G. Momekov, F. Jensen, I. Manolov, I. *Eur. J. Med. Chem.*, **2008**, *43*, 694-706.
130. MOPAC 2009, Stewart, J.J.P., Stewart Computational Chemistry, Colorado, Springs, CO, USA, <http://www.openMOPAC.net>
131. A. Pedretti, A. Villa, G. Vistoli, *J. Mol. Graph. Model.*, **2002**, *21*, 47-49.
132. A. Camilo, R. P. B. dos Santos, V. R. Coluci, D. S. Galvao, *Molecul. Sim.*, **2011**, *1*, 1-7.
133. J. Baker, *J. Comp. Chem.*, **1986**, 385, 7.
134. Gaussian 03 C02, M.J. Frisch, G.W. Trucks, H.B. Schlegel, G.E. Scuseria, M.A. Robb, J.R. Cheeseman, G. Scalmani, V. Barone, B. Mennucci, G.A. Petersson, H. Nakatsuji, M. Caricato, X. Li, H.P. Hratchian, A.F. Izmaylov, J. Bloino, G. Zheng, J.L. Sonnenberg, M. Hada, M. Ehara, K. Toyota, R. Fukuda, J. Hasegawa, M. Ishida, T. Nakajima, Y. Honda, O. Kitao, H. Nakai, T. Vreven, J.A. Montgomery, Jr.J.E. Peralta, F. Ogliaro, M. Bearpark, J.J. Heyd, E. Brothers, K.N. Kudin, V.N. Staroverov, R. Kobayashi, J. Normand, K. Raghavachari, A. Rendell, J.C. Burant, S.S. Iyengar, J. Tomasi, M. Cossi, N. Rega, J. M. Millam, M. Klene, J.E. Knox, J.B. Cross, V. Bakken, C. Adamo, J. Jaramillo, R. Gomperts, R.E. Stratmann, O. Yazyev, A.J. Austin, R. Cammi, C. Pomelli, J.W. Ochterski, R.L. Martin, K. Morokuma, V.G. Zakrzewski, G.A. Voth, P. Salvador, J.J. Dannenberg, S.

- Dapprich, A.D. Daniels, Ö. Farkas, J. B. Foresman, J.V. Ortiz, J. Cioslowski, and D.J. Fox, Gaussian, Inc., Wallingford CT, **2004**.
135. T. Van Mourik, J. R. Gdanitz, *J. Chem. Phys.*, **2002**, *116*, 9620-9623.
136. J. B. Foresman, E. Frish, *Exploring Chemistry with Electronic Methods*, 2nd ed., Gaussian Inc. Pittsburg, PA, USA, **1993**.
137. A. D. Becke, *J. Chem. Phys.*, **1993**, *98*, 1372-1377.
138. W. J. Hehre, *A Guide to Molecular Mechanics and Quantum Chemical Calculations*, Wavefunction, Inc., USA, **2003**.
139. Burger's Medicinal Chemistry, Edited by D. J. Abraham, Vol. 1, John Wiley and Sons, Inc., Publication, **2006**.
140. R. Todeschini, V. Consonni, *Molecular Descriptors for Chemoinformatic: Volume I: Alphabetical Listing*, WILEY-WCH, Weinheim, Germany, **2009**.
141. GA Tech Chemistry, Frontier Orbitals.
142. K. M. Nicolic, *J. Mol. Graph. Model.*, **2006**, *26*, 868-873.
143. L. M. Connolly, *Science*, **1983**, *221*, 709-713.
144. Origin Pro 8. OriginLab Corporation, One Roundhouse Plaza, Northampton, MA 01060, USA, **2008**.
145. M. G. Morris, S. D. Goodsell, R. Huey, J. A. Olson, *J. Comp. Aid. Mol. Des.*, **1996**, *10*, 293-304.
146. D. Lafitte, V. Lamour, P. O. Tsvetkov, A. A. Makarov, M. Klich, P. Deprez, D. Moras, C. Briand, R. Gilli, *Biochemistry.*, **2002**, *41*, pp. 7217-7223.
147. E. F. Pettersen, T. D. Goddard, C. C. Huang, G. S. Couch, D. M. Greenblatt, E. C. Meng, T. E. Ferrin, *J. Comput. Chem.*, **2004**, *25*, 1605-12.
148. J. Fuhrman, A. Rurainski, H. Lenhof, D. Neumann, *J. Comput. Chem.*, **2010**, *31*, 1911-1918.
149. P. Prieto, M. Pineda, M. Aguilar, *Anal. Biochem.*, **1999**, *269*, 337-341.
150. T. Takao, N. Watanabe, I. Yagi, K. Sakata, *Biosci. Biotech. Biochem.*, **1994**, *58*, 1780-1783.
151. T. Masude, D. Isibe, A. Jitoe, N. Naramati, *Phytochem.*, **1992**, *33*, 3645-3647.
152. R. G. Zepp, B. C. Faust, J. Hoigne, *Environ. Sci. Technol.*, **1992**, *26*, 313-319.
153. B. Halliwell, J. M. C Gutteridge, O. Aruoma, *Anal. Biochem.*, **1987**, *165*, 215-219.
154. P. Carter, *Anal. Biochem.*, **1971**, *40*, 450-458.
155. AMMP software, [www.cs.gsu.edu/~cscrwh/ammp/ammp.html](http://www.cs.gsu.edu/~cscrwh/ammp/ammp.html)

156. A. Klamt, G. Schuurman. *J. Chem. Soc. Per. Trans.*, **1993**, 2, 799-805.
157. Y. H. Zhang, Y. M. Sun, L. X. Wang, *Chemistry - A Eur. J.*, **2003**, 9, 502-508.
158. A. J. Quick, M. Stanley-Brown, F. W. Bancroft, *Am. J. Med. Sci.*, **1953**, 190, 501-511.
159. W. H. Howell, *Physiol. Rev.*, **1935**, 15, 435-470.
160. M. E. Anderson, D. Delmarre, D. Gao, M. A. El-khateeb, C. S. Certeno, S. H. Pathak, PCT/US2006/023438, **2006**.
161. M. Kataranovski, J. Živanović, J. Vranković, I. Mirkov, D. Kataranovski, *Arch. Biol. Sci.*, **2007**, 59, 53-54.
162. M. Ufer, B. Kammerer, J. Kirchheiner, A. Rane, J. Swensson, *J. Chromat. B.*, **2004**, 809, 217-226.
163. H. H. Maurer. J. W. Arlt, *J. Chromat. B.*, **1998**, 714, 181-195.
164. Sybyl version X1.1, St. Tripos Associates Inc, Louis (MO), **2010**.
165. M. S. Bhatia, K. B. Ingale, P. B. Choudhari, N. M. Bhatia, R. L. Sawant, *Bioorg. Med. Chem.*, **2009**, 17, 1654-1662.
166. C. Chothia, L. M. Lesk, *EMBO J.*, **1986**, 5, 823-826.
167. B. Boeckmann, A. Bairoch, R. Apweiler, M. C. Blatter, A. Estreicher, E. Gasteiger, M. J. Martin, K. Michoud, C. O'Donovan, I. Phan, S. Pilbout, M. Schneider, *Nucleic Acids Res.*, **2003**, 31, 365-370
168. W. Li, S. Schulman, R. J. Dutton, D. Boyd, J. Beckwith, T. A. Rapoport, *Nature*, **2010**, 463, 507-512
169. J. D. Thompson, D. G. Higgins, T. J. Gibson, *Nucleic Acids Res.*, **1994**, 22, 4673-4680.
170. J. Kopp, T. Schwede, *Nucleic Acids Res.*, **2004**, 32, 230-234.
171. R. A. Laskowski, M.W. MacArthur, D. S. Moss, J.M. Thornton, *J. Appl. Cryst.*, **1993**, 26, 283-291.
172. Y. Zhang, Y. Y. Sham. R. Rajamani, J. Gao, P. Portoghese, *ChemBioChem.*, **2005**, 6, 853-859.
173. H. U. Bergmeyer, G. N. Bowers, M. Hørder, D. W. Moss, *Clin. Chim. Acta.*, **1976**, 70, 19-42.
174. H. U. Bergmeyer, *Clin. Chim. Acta.*, **1980**, 105, 147-172.
175. M. I. Walters, H. W. Gerarde, *Microchem. J.*, **1970**, 15, 231-243.
176. L. Jendrassik, P Gróf, *Biochem. Zeitschrift.*, **1938**, 297, 82-89.

177. F. Ceriotti, G. Ceriotti, *Clin. Chem.*, **1980**, 26, 327-331.
178. A. G. Gornall, C. J. Bardawill, M. M. David, *J. Biol. Chem.*, **1949**, 177, 751-766.
179. P. H. Lolekha, W. Charoenpol, *Clin. Chem.*, **1974**, 20, 617-619.
180. K. H. Cheeseman, A. Beavis, H. Esterbauer, *Biochem. J.*, **1988**, 252, 649-653.
181. S. Z. Marković, N. T. Manojlović, *Monats. Chem.*, **2009**, 140, 1311-1318.
182. Y. H. Zhang, F. L. Wang, *J. Mol. Struc. (TEOCHEM)*, **2004**, 673, 199-202.
183. O. G. Spessard, *J. Chem. Inform. Comp. Sci.*, **1998**, 38, 1250-1253.
184. C. S. Sevier, C. A. Kaiser, *Nature Rev. Mol. Cell. Biol.*, **2002**, 3, 836-847.
185. D. Koraćević, G. Bjelaković, V. B. Đorđević, J. Nikolić, D. D. Pavlović, G. Kocić, *Biohemija*, 4. izdanje, Savremena administracija, a.d., Beograd, **2006**.

## ***6. ПРИЛОЗИ***

---





## Прилог 1. Врсте, састав и поступак припреме хранљивих подлога

Хранљиве подлоге се у раду са микроорганизмима користе у више фаза. Користе се да би се испунили нутритивни захтеви микроорганизама у виду довољне количине воде, извора угљеника, азота, сумпора, фосфора и минерала ( $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{K}^{2+}$ ,  $\text{Na}^{+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{+2}$ ). Хранљиви агар у праху се користи за засејавање бактерија док се кромпир-глукозни агар користи за засејавање гљива. У фази испитивања потенцијалног антибиотика, као течне подлоге у дилуционој техници се користе Милер-Хинтон-ова (Müller-Hinton) подлога за бактерије и сабора (Sabogaud) течна подлога за гљиве (Институт за имунологију и вирусологију Торлак, Београд).

**Припрема хранљивог агара.** Суспендује се 43,1 г праха састава: пептон-1 „Торлак”, 15 г; месни екстракт „Торлак”, 3 г; натријум-хлорид, 5 г; калијум-фосфат, 0,3 г; агар, 18 г; рН=7,3, раствори у 1000 mL хладне воде и остави да стоји 15 минута. Највећи број микроорганизама се добро размножава у области оптималног рН између 6,5–7,5. Потом се раствор пажљиво загрева до кључања, уз стално мешање стакленим штапићем, да би се прах у потпуности растворио. Уз интензивно мешање током кључања, боја раствора треба да постане светло жута и бистра, што се постиже у току 5-15 минута. Раствор се потом пребацује у ерленмајер, затвара и стерилише 20 минута на 120°C. Након хлађења се припремљени агар разлива у епрувете и формира коси агар, епрувете се затворе и оставе да се охладе. Пресејавање се врши након 24 часа.

**Припрема Милер-Хинтон-овог бујона (П29)–течна подлога.** Одмери се одговарајућа количина следећих супстанци: 17,5 г казеин-хидролизата, 3 г месног екстракта и 1,5 г скроба (подлога Института за имунологију и вирусологију Торлак, Београд) и раствори у 1000 mL дестиловане хладне воде. Након растварања се подлога загрева до кључања, уз стално мешање, до појаве бистре боје раствора а потом пребаци у ерленмајер и стерилише 20 минута на 120°C.

**Припрема кромпир-глукозног агара.** Очишћени кромпир исече се на ситне комадиће и 250 г сипа у 1 L воде. Кромпир се кува док не омекша, затим се процеди, а вода од цеђења се допуни свежеом количином воде, до запремине од 1 L. По додатку воде, додаје се 17 г агара (15–20%), а када се агар отопи и 20 г глукозе. Након корекције рН до 6,5 подлога се стерилише 20 минута на 120°C и разлива у епрувете формирајући коси агар.

**Припрема сабора (Sabouraud) течне подлоге.** Раствори се 30 g праха Sabouraud течне подлоге (Торлак, Београд) састава 10 g пептона, 20 g декстрозе, у 1000 mL дестиловане воде и пажљиво загрева до кључања и потпуног растварања. По пребацивању у одговарајући суд, врши се стерилизација у аутоклаву 20 минута на 120°C.

Прилог 2. Апсорбанце раствора и израчунати проценти инхибиције при одређивању антиоксидативне активности

Табела 17. Тотална антиоксидативна активност деривата 1-8b

Конц. µg/mL	Апсорбанца							Asc		
	1	2b	3b	4b	6b	7b	8b			
500	0,134	0,135	0,187	0,167	0,126	0,113	0,153	0,028		
250	0,138	0,091	0,129	0,103	0,075	0,089	0,104	0,035		
125	0,157	0,098	0,145	0,128	0,099	0,097	0,121	0,074		
62,5	0,165	0,116	0,162	0,133	0,119	0,106	0,145	0,142		
31,25	0,168	0,154	0,197	0,184	0,144	0,153	0,171	0,349		
15,625	0,194	0,175	0,214	0,222	0,163	0,167	0,184	0,663		
7,8125	0,218	0,195	0,232	0,252	0,178	0,185	0,199	0,781		
3,901	0,248	0,226	0,245	0,265	0,197	0,201	0,222	0,879		
Бланко	0,978									
	% Инхибиције									
500	53,41	64,91	49,58	55,23	65,66	66,11	57,79	94,56		
250	45,34	58,27	43,74	53,65	58,63	63,05	49,69	87,25		
125	42,62	51,62	34,83	41,79	56,05	60,51	46,80	76,58		
62,5	41,41	44,79	31,31	35,80	50,00	46,62	40,43	55,58		
31,25	32,39	37,28	25,43	22,65	43,35	41,86	35,91	34,28		
15,625	24,29	30,06	19,38	7,93	31,31	35,77	30,62	21,28		
7,8125	13,81	21,50	14,89	1,35	38,20	30,27	22,72	14,59		
	Апсорбанца									
µg/mL	2c	3c	4c	5c	6c	7c	8c	9c	10c	
500	0,097	0,124	0,077	0,102	0,104	0,099	0,097	0,097	0,124	0,028
250	0,106	0,133	0,086	0,112	0,110	0,109	0,106	0,121	0,144	0,035
125	0,115	0,151	0,092	0,133	0,124	0,116	0,119	0,145	0,167	0,074
62,5	0,129	0,175	0,100	0,148	0,148	0,138	0,134	0,165	0,205	0,142
31,25	0,133	0,197	0,113	0,162	0,169	0,147	0,155	0,184	0,224	0,349
15,625	0,155	0,203	0,147	0,185	0,178	0,162	0,194	0,199	0,234	0,663
7,8125	0,172	0,232	0,164	0,223	0,185	0,180	0,214	0,202	0,252	0,781
3,901	0,189	0,248	0,178	0,251	0,201	0,194	0,232	0,220	0,261	0,879
Бланко	0,264									
	% Инхибиције									
500	28,34	6,02	32,56	4,88	23,78	28,34	12,37	16,84	1,16	94,56
250	35,11	12,26	37,84	15,59	30,12	35,11	18,92	23,50	4,77	87,25
125	41,51	23,16	44,31	30,15	32,81	41,51	26,48	24,55	11,43	76,58
62,5	49,79	25,31	57,43	38,59	35,91	49,79	41,50	30,31	15,32	55,58
31,25	51,04	33,94	62,09	44,15	43,93	51,04	49,26	37,65	22,55	34,28
15,625	56,60	42,79	65,04	49,83	52,93	56,60	55,09	45,21	36,66	21,28
7,8125	60,04	49,83	67,31	57,47	58,30	60,04	60,01	54,26	45,67	14,59
3,901	63,15	53,23	70,83	61,33	60,80	63,15	63,26	63,15	53,12	8,97

Табела 18. Измерене апсорбанце раствора приликом неутрализације DPPH радикала дериватима **1-8b** након 30 и 60 мин

Конц. µg/mL	Апсорбанца 30 мин								
	<b>1</b>	<b>2b</b>	<b>3b</b>	<b>4b</b>	<b>6b</b>	<b>7b</b>	<b>8b</b>	<b>Asc</b>	<b>ВНТ</b>
<b>500</b>	0,357	0,372	0,462	0,490	0,356	0,472	0,399	0,026	0,031
<b>250</b>	0,481	0,399	0,498	0,493	0,375	0,524	0,476	0,034	0,038
<b>125</b>	0,557	0,442	0,552	0,554	0,429	0,613	0,543	0,046	0,051
<b>62,5</b>	0,628	0,496	0,623	0,601	0,485	0,714	0,559	0,078	0,076
<b>31,25</b>	0,784	0,592	0,722	0,685	0,512	0,789	0,654	0,112	0,099
<b>15,625</b>	0,853	0,694	0,783	0,759	0,587	0,843	0,710	0,268	0,156
<b>7,8125</b>	0,967	0,741	0,820	0,816	0,624	0,876	0,765	0,469	0,446
<b>3,901</b>	0,997	0,783	0,845	0,892	0,666	0,921	0,833	0,782	0,698
<b>Бланко</b>	1,014								
	<b>% Инхибиције</b>								
<b>500</b>	64,80	63,29	54,45	51,73	64,92	53,42	60,63	97,23	95,61
<b>250</b>	52,61	60,61	50,86	51,36	63,07	48,36	53,07	97,11	95,43
<b>125</b>	45,05	56,40	45,55	45,34	57,70	39,51	46,47	96,88	90,72
<b>62,5</b>	38,11	51,07	38,52	40,72	52,14	29,55	44,85	95,94	77,62
<b>31,25</b>	22,64	41,59	28,77	32,49	49,55	22,18	35,47	95,77	62,63
<b>15,625</b>	15,89	31,55	22,83	25,14	42,08	16,84	29,98	91,38	60,02
<b>7,8125</b>	4,63	26,89	19,17	19,53	38,46	13,59	24,59	62,07	38,51
<b>3,901</b>	1,65	22,82	16,65	11,99	34,31	9,14	17,88	32,85	12,08
	<b>Апсорбанца 60 мин</b>								
µg/mL	<b>1</b>	<b>2b</b>	<b>3b</b>	<b>4b</b>	<b>6b</b>	<b>7b</b>	<b>8b</b>	<b>Asc</b>	<b>ВНТ</b>
<b>500</b>	0,475	0,351	0,432	0,481	0,269	0,432	0,361	0,024	0,029
<b>250</b>	0,481	0,398	0,441	0,493	0,297	0,433	0,389	0,032	0,035
<b>125</b>	0,481	0,438	0,494	0,490	0,345	0,537	0,423	0,046	0,049
<b>62,5</b>	0,541	0,455	0,506	0,560	0,384	0,653	0,490	0,077	0,074
<b>31,25</b>	0,744	0,556	0,579	0,679	0,485	0,704	0,576	0,110	0,091
<b>15,625</b>	0,759	0,659	0,694	0,680	0,495	0,760	0,678	0,265	0,156
<b>7,8125</b>	0,884	0,772	0,754	0,681	0,590	0,871	0,782	0,469	0,446
<b>3,901</b>	0,992	0,795	0,759	0,741	0,599	0,881	0,793	0,782	0,698
<b>Бланко</b>	0,999								
	<b>% Инхибиције</b>								
<b>500</b>	53,14	65,36	57,36	52,61	73,49	57,36	64,36	98,43	96,81
<b>250</b>	52,61	60,74	56,48	51,64	70,67	57,30	61,62	97,91	95,93
<b>125</b>	52,54	56,80	51,30	51,40	66,02	47,06	58,28	97,88	92,78
<b>62,5</b>	46,63	55,13	50,06	44,81	62,15	35,63	51,67	96,54	81,69
<b>31,25</b>	26,68	45,21	42,92	33,08	52,22	30,59	43,23	95,77	62,63
<b>15,625</b>	25,12	35,04	31,52	32,92	51,15	25,09	33,10	91,38	60,02
<b>7,8125</b>	12,84	23,91	25,66	32,84	41,84	14,07	22,88	62,07	38,51
<b>3,901</b>	2,21	21,63	25,15	26,88	40,97	13,08	21,82	32,85	12,08

Табела 19. Измерене апсорбанце раствора приликом неутрализације DPPH  
радикала дериватима 2-10с након 30 и 60 мин

Конц. µg/mL	Апсорбанца 30 мин										
	2с	3с	4с	5с	6с	7с	8с	9с	10с	Asc	ВНТ
500	0,300	0,382	0,266	0,356	0,373	0,386	0,490	0,432	0,335	0,026	0,031
250	0,383	0,392	0,342	0,401	0,417	0,447	0,493	0,433	0,372	0,034	0,038
125	0,413	0,439	0,392	0,442	0,535	0,572	0,554	0,537	0,422	0,046	0,051
62,5	0,495	0,516	0,478	0,557	0,597	0,644	0,601	0,653	0,539	0,078	0,076
31,25	0,516	0,669	0,497	0,613	0,641	0,716	0,685	0,704	0,664	0,112	0,099
15,625	0,699	0,736	0,547	0,701	0,723	0,771	0,759	0,760	0,725	0,268	0,156
7,8125	0,793	0,792	0,669	0,813	0,782	0,829	0,816	0,871	0,772	0,469	0,446
3,901	0,816	0,895	0,748	0,896	0,876	0,875	0,892	0,881	0,896	0,782	0,698
Бланко	1,014										
	% Инхибиције										
500	70,38	62,38	73,74	64,89	63,22	61,95	51,73	57,36	66,98	97,23	95,61
250	62,27	61,38	66,27	60,42	58,89	55,89	51,36	57,30	63,35	97,11	95,43
125	59,25	56,70	61,38	56,45	47,27	43,63	45,34	47,06	58,39	96,88	90,72
62,5	51,16	49,08	52,85	45,08	41,08	36,54	40,72	35,63	46,83	95,94	77,62
31,25	49,08	34,01	50,98	39,60	36,76	29,36	32,49	30,59	34,51	95,77	62,63
15,625	31,05	27,41	46,05	30,83	28,69	23,93	25,14	25,09	28,54	91,38	60,02
7,8125	21,83	21,93	34,01	19,81	22,93	18,21	19,53	14,07	23,91	62,07	38,51
3,901	19,49	11,78	26,27	11,62	13,57	13,72	11,99	13,08	11,60	32,85	12,08
	Апсорбанца 60 мин										
µg/mL	2с	3с	4с	5с	6с	7с	8с	9с	10с	Asc	ВНТ
500	0,285	0,352	0,256	0,356	0,363	0,366	0,344	0,313	0,325	0,024	0,029
250	0,375	0,370	0,333	0,391	0,395	0,374	0,380	0,332	0,398	0,032	0,035
125	0,423	0,432	0,369	0,424	0,442	0,457	0,413	0,443	0,473	0,046	0,049
62,5	0,476	0,463	0,413	0,504	0,575	0,592	0,493	0,473	0,517	0,077	0,074
31,25	0,502	0,517	0,464	0,596	0,672	0,652	0,592	0,501	0,613	0,110	0,091
15,625	0,614	0,623	0,503	0,689	0,692	0,723	0,691	0,635	0,701	0,265	0,156
7,8125	0,722	0,731	0,613	0,725	0,732	0,785	0,736	0,712	0,746	0,469	0,446
3,901	0,745	0,769	0,706	0,780	0,782	0,802	0,769	0,773	0,825	0,782	0,698
Бланко	0,999										
	% Инхибиције										
500	71,93	65,27	74,72	64,89	64,22	63,93	66,07	69,15	67,98	98,43	96,81
250	63,01	63,56	67,20	61,42	61,02	63,09	62,50	67,31	60,72	97,91	95,93
125	58,32	57,39	63,66	58,22	56,37	54,91	59,32	56,33	53,39	97,88	92,78
62,5	53,03	54,35	59,27	50,32	43,34	41,59	51,43	53,39	49,02	96,54	81,69
31,25	50,48	49,03	54,29	41,20	33,72	35,66	41,59	50,56	39,53	95,77	62,63
15,625	39,43	38,55	50,41	32,04	31,80	28,69	31,81	37,42	30,91	91,38	60,02
7,8125	28,84	27,87	39,55	28,54	27,77	22,56	27,40	29,75	26,41	62,07	38,51
3,901	26,50	24,21	30,41	23,12	22,85	20,90	24,14	23,81	18,63	32,85	12,08

Табела 20. Инхибиција липидне пероксидације дериватима 1-10с након 24 сата

Конц. µg/mL	Апсорбанца 24 h										
	1	2b	3b	5b	6b	7b	8b	Asc	ВНТ		
500	0,089	0,093	0,115	0,122	0,089	0,118	0,089	0,241	0,024		
250	0,120	0,100	0,125	0,123	0,094	0,131	0,120	0,286	0,035		
125	0,139	0,111	0,138	0,139	0,107	0,153	0,139	0,341	0,072		
62,5	0,143	0,124	0,148	0,150	0,121	0,179	0,143	0,386	0,145		
31,25	0,158	0,148	0,163	0,171	0,128	0,197	0,158	0,428	0,355		
15,625	0,178	0,174	0,196	0,190	0,147	0,211	0,178	0,456	0,698		
7,8125	0,242	0,185	0,205	0,204	0,156	0,219	0,242	0,489	0,791		
3,901	0,249	0,196	0,211	0,223	0,167	0,230	0,249	0,501	0,893		
Бланко	0,346										
	% Инхибиције										
500	74,22	73,11	66,64	64,64	74,31	65,88	71,16	45,97	94,78		
250	65,29	71,15	64,01	64,37	72,95	62,18	65,62	38,96	92,15		
125	59,75	68,07	60,12	59,96	69,02	55,69	60,79	29,70	89,38		
62,5	58,74	64,16	57,35	56,58	64,95	48,40	59,61	23,00	82,26		
31,25	54,38	57,22	52,96	50,55	63,05	43,00	52,74	17,82	71,56		
15,625	48,54	49,86	43,48	45,17	57,58	39,09	48,71	9,33	68,28		
7,8125	30,14	46,45	40,80	41,06	54,93	36,71	44,76	9,33	55,41		
3,901	27,96	43,47	38,95	35,54	51,89	33,45	39,85	6,78	52,48		
	Апсорбанца 24 h										
µg/mL	2c	3c	4c	5c	6c	7c	8c	9c	10c	Asc	ВНТ
500	0,075	0,095	0,067	0,089	0,093	0,096	0,122	0,108	0,084	0,241	0,024
250	0,096	0,098	0,086	0,100	0,104	0,112	0,123	0,108	0,093	0,286	0,035
125	0,103	0,110	0,098	0,110	0,134	0,143	0,139	0,112	0,105	0,341	0,072
62,5	0,124	0,129	0,120	0,139	0,149	0,161	0,150	0,135	0,135	0,386	0,145
31,25	0,129	0,167	0,124	0,153	0,160	0,179	0,171	0,143	0,166	0,428	0,355
15,625	0,175	0,184	0,137	0,175	0,181	0,193	0,190	0,167	0,181	0,456	0,698
7,8125	0,198	0,198	0,167	0,203	0,195	0,207	0,204	0,176	0,193	0,489	0,791
3,901	0,204	0,224	0,187	0,224	0,219	0,219	0,223	0,220	0,224	0,501	0,893
Бланко	0,346										
	% Инхибиције										
500	78,31	72,44	84,38	74,28	73,06	72,13	64,64	68,77	75,82	45,97	94,78
250	72,36	71,71	80,76	71,01	69,89	67,69	64,37	68,72	73,16	38,96	92,15
125	70,15	68,28	75,30	68,10	61,38	58,71	59,96	67,55	69,52	29,70	89,38
62,5	64,23	62,71	71,71	59,77	56,85	53,52	56,58	61,14	61,06	23,00	82,26
31,25	62,71	51,67	65,47	55,76	53,68	48,26	50,55	58,77	52,03	17,82	71,56
15,625	49,49	46,83	64,09	49,34	47,77	44,28	45,17	51,72	47,66	9,33	68,28
7,8125	42,75	42,82	60,48	41,27	43,55	40,09	41,06	49,06	44,26	9,33	55,41
3,901	41,03	35,38	51,67	35,26	36,69	36,80	35,54	36,33	35,25	6,78	52,48

Табела 21. Инхибиција липидне пероксидације дериватима 1-10с након 48 сати

Конц. µg/mL	Апсорбанца 48 h										
	1	2b	3b	4b	6b	7b	8b	Asc	ВНТ		
500	0,119	0,186	0,154	0,163	0,119	0,157	0,133	0,241	0,024		
250	0,160	0,200	0,166	0,164	0,125	0,175	0,159	0,286	0,035		
125	0,186	0,221	0,184	0,185	0,143	0,204	0,181	0,341	0,072		
62,5	0,209	0,248	0,208	0,200	0,162	0,238	0,186	0,386	0,145		
31,25	0,261	0,264	0,241	0,228	0,171	0,263	0,327	0,428	0,355		
15,625	0,284	0,267	0,261	0,253	0,196	0,281	0,237	0,456	0,698		
7,8125	0,322	0,284	0,273	0,272	0,208	0,292	0,255	0,489	0,791		
3,901	0,332	0,293	0,282	0,297	0,222	0,307	0,278	0,501	0,893		
Бланко	0,406										
	% Инхибиције										
500	70,71	54,19	62,10	59,83	70,81	61,24	67,24	45,97	94,78		
250	60,57	50,84	59,11	59,53	69,27	57,03	60,95	38,96	92,15		
125	54,28	45,58	54,69	54,51	64,80	49,66	55,46	29,70	89,38		
62,5	48,50	38,92	48,84	50,67	60,18	41,38	54,11	23,00	82,26		
31,25	35,63	34,93	40,73	43,82	58,02	35,25	41,74	17,82	71,56		
15,625	30,01	34,24	35,79	37,71	51,81	30,81	37,25	9,33	68,28		
7,8125	20,64	30,01	32,74	33,04	48,79	28,10	31,67	9,33	55,41		
3,901	18,16	27,77	30,64	26,77	45,34	24,40	19,46	6,78	52,48		
	Апсорбанца 48 h										
µg/mL	2с	3с	4с	5с	6с	7с	8с	9с	10с	Asc	ВНТ
500	0,100	0,127	0,089	0,119	0,124	0,129	0,109	0,144	0,112	0,241	0,024
250	0,128	0,131	0,114	0,134	0,139	0,149	0,115	0,144	0,124	0,286	0,035
125	0,138	0,146	0,131	0,147	0,178	0,191	0,195	0,179	0,141	0,341	0,072
62,5	0,165	0,172	0,159	0,186	0,199	0,215	0,215	0,218	0,180	0,386	0,145
31,25	0,172	0,223	0,166	0,204	0,214	0,239	0,223	0,235	0,221	0,428	0,355
15,625	0,233	0,245	0,182	0,234	0,241	0,257	0,251	0,253	0,242	0,456	0,698
7,8125	0,264	0,264	0,223	0,271	0,261	0,276	0,282	0,290	0,257	0,489	0,791
3,901	0,272	0,298	0,249	0,299	0,292	0,292	0,301	0,294	0,299	0,501	0,893
Бланко	0,406										
	% Инхибиције										
500	75,36	68,69	78,15	70,79	69,40	68,34	74,17	64,52	72,53	45,97	94,78
250	68,60	67,86	71,94	67,07	65,79	63,29	63,21	64,47	69,51	38,96	92,15
125	66,09	63,97	67,86	63,76	56,12	53,09	51,90	55,95	65,38	29,70	89,38
62,5	59,36	57,63	60,77	54,30	50,98	47,19	47,14	46,44	55,76	23,00	82,26
31,25	57,63	45,09	59,21	49,74	47,37	41,22	45,08	42,25	45,50	17,82	71,56
15,625	42,62	39,59	55,10	42,44	40,66	36,70	37,24	37,67	40,54	9,33	68,28
7,8125	34,96	35,04	45,09	33,28	35,87	31,94	30,67	28,50	36,68	9,33	55,41
3,901	33,01	26,59	38,65	26,46	28,08	28,20	25,80	27,67	26,44	6,78	52,48

Табела 22. Инхибиција липидне пероксидације дериватима 1-10с након 72 сата

Конц. µg/mL	Апсорбанца 72 h								Asc	ВНТ	
	1	2b	3b	4b	6b	7b	8b				
500	0,178	0,186	0,231	0,245	0,178	0,236	0,200	0,241	0,241	0,024	
250	0,240	0,200	0,249	0,247	0,187	0,262	0,238	0,286	0,286	0,035	
125	0,279	0,221	0,276	0,277	0,214	0,307	0,271	0,341	0,341	0,072	
62,5	0,314	0,248	0,312	0,301	0,243	0,357	0,280	0,386	0,386	0,145	
31,25	0,392	0,296	0,361	0,342	0,256	0,395	0,327	0,428	0,428	0,355	
15,625	0,426	0,347	0,391	0,380	0,294	0,422	0,355	0,456	0,456	0,698	
7,8125	0,484	0,371	0,410	0,408	0,312	0,438	0,382	0,489	0,489	0,791	
3,901	0,499	0,391	0,423	0,446	0,333	0,461	0,416	0,501	0,501	0,893	
Бланко	0,562										
	<b>% Инхибиције</b>										
500	70,38	62,38	73,74	64,89	63,22	61,95	51,73	45,97	45,97	94,78	
250	62,27	61,38	66,27	60,42	58,89	55,89	51,36	38,96	38,96	92,15	
125	59,25	56,70	61,38	56,45	47,27	43,63	45,34	29,70	29,70	89,38	
62,5	51,16	49,08	52,85	45,08	41,08	36,54	40,72	23,00	23,00	82,26	
31,25	49,08	34,01	50,98	39,60	36,76	29,36	32,49	17,82	17,82	71,56	
15,625	31,05	27,41	46,05	30,83	28,69	23,93	25,14	9,33	9,33	68,28	
7,8125	21,83	21,93	34,01	19,81	22,93	18,21	19,53	9,33	9,33	55,41	
3,901	19,49	11,78	26,27	11,62	13,57	13,72	11,99	6,78	6,78	52,48	
	<b>Апсорбанца 72 h</b>										
µg/mL	2с	3с	4с	5с	6с	7с	8с	9с	10с	Asc	ВНТ
500	0,150	0,191	0,133	0,178	0,186	0,193	0,245	0,207	0,167	0,241	0,024
250	0,191	0,196	0,171	0,201	0,208	0,224	0,247	0,217	0,186	0,286	0,035
125	0,207	0,220	0,196	0,221	0,267	0,286	0,277	0,294	0,211	0,341	0,072
62,5	0,248	0,258	0,239	0,278	0,299	0,322	0,301	0,307	0,261	0,386	0,145
31,25	0,258	0,335	0,249	0,306	0,321	0,358	0,342	0,352	0,332	0,428	0,355
15,625	0,350	0,368	0,274	0,351	0,362	0,386	0,380	0,387	0,362	0,456	0,698
7,8125	0,396	0,396	0,335	0,407	0,391	0,415	0,408	0,432	0,386	0,489	0,791
3,901	0,408	0,447	0,374	0,448	0,438	0,437	0,446	0,447	0,448	0,501	0,893
Бланко	0,562										
	<b>% Инхибиције</b>										
500	73,30	66,08	76,32	68,35	66,85	65,70	56,48	63,18	70,23	45,97	94,78
250	65,99	65,18	69,59	64,32	62,94	60,23	56,15	61,42	66,96	38,96	92,15
125	63,26	60,96	65,18	60,74	52,46	49,18	50,72	47,65	62,49	29,70	89,38
62,5	55,97	54,10	57,49	50,49	46,89	42,79	46,56	45,44	53,52	23,00	82,26
31,25	54,10	40,51	55,81	45,55	42,99	36,32	39,14	37,43	40,96	17,82	71,56
15,625	37,84	34,56	51,36	37,64	35,71	31,42	32,51	31,16	35,58	9,33	68,28
7,8125	29,53	29,62	40,51	27,71	30,52	26,26	27,45	23,26	31,40	9,33	55,41
3,901	27,42	20,47	33,53	20,32	22,08	22,22	20,66	20,57	20,31	6,78	52,48



Табела 23. Измерене апсорбанце и израчунати проценти инхибиције хидроксил радикала за деривате 1-10с

Конц. µg/mL	Апсорбанца										
	1	2b	3b	5b	6b	7b	8b	Asc	ВНТ		
500	0,054	0,035	0,066	0,098	0,037	0,039	0,078	0,086	0,089		
250	0,055	0,059	0,079	0,112	0,038	0,045	0,087	0,089	0,085		
125	0,064	0,061	0,090	0,133	0,050	0,068	0,103	0,101	0,103		
62,5	0,072	0,070	0,118	0,187	0,071	0,083	0,122	0,101	0,104		
31,25	0,129	0,118	0,167	0,224	0,105	0,097	0,178	0,117	0,119		
15,625	0,159	0,165	0,186	0,262	0,146	0,116	0,197	0,122	0,125		
7,8125	0,197	0,179	0,216	0,291	0,175	0,150	0,202	0,164	0,169		
3,901	0,291	0,252	0,279	0,313	0,288	0,226	0,275	0,209	0,208		
Бланко	0,316										
<b>% Инхибиције</b>											
500	82,86	88,93	79,13	69,13	88,14	87,67	75,27	63,78	66,47		
250	82,76	81,34	74,89	64,48	88,17	85,77	72,36	58,32	64,97		
125	79,76	80,71	71,54	57,97	84,28	78,46	67,30	43,31	59,22		
62,5	77,36	77,96	62,84	40,77	77,58	73,88	61,32	37,85	58,98		
31,25	59,08	62,71	47,09	29,19	66,73	69,20	43,58	29,50	53,15		
15,625	49,59	47,85	41,08	17,17	53,73	63,22	37,57	28,85	50,83		
7,8125	37,60	43,26	31,56	7,84	44,78	52,66	36,05	17,65	33,14		
3,901	7,87	20,43	11,73	1,08	9,04	28,49	13,19	11,43	17,93		
<b>Апсорбанца</b>											
µg/mL	2c	3c	4c	5c	6c	7c	8c	9c	10c	Asc	ВНТ
500	0,024	0,046	0,020	0,098	0,087	0,095	0,102	0,053	0,092	0,086	0,085
250	0,032	0,054	0,025	0,129	0,097	0,103	0,119	0,066	0,115	0,089	0,085
125	0,046	0,069	0,032	0,147	0,119	0,126	0,143	0,072	0,133	0,101	0,101
62,5	0,072	0,117	0,067	0,152	0,136	0,147	0,156	0,130	0,146	0,101	0,104
31,25	0,104	0,124	0,091	0,189	0,145	0,163	0,197	0,138	0,185	0,117	0,119
15,625	0,138	0,147	0,114	0,223	0,167	0,197	0,214	0,153	0,233	0,122	0,125
7,8125	0,159	0,197	0,147	0,247	0,185	0,238	0,252	0,207	0,262	0,164	0,169
3,901	0,198	0,226	0,187	0,257	0,200	0,272	0,241	0,232	0,267	0,209	0,208
Бланко	0,326										
<b>% Инхибиције</b>											
500	92,58	85,92	93,93	69,93	73,07	70,79	68,64	83,73	71,72	63,78	66,47
250	90,26	83,27	92,27	60,14	69,99	68,21	63,25	79,61	64,48	58,32	64,97
125	85,89	78,71	90,02	54,62	63,28	61,06	56,04	77,97	59,12	43,31	59,22
62,5	77,88	63,83	79,39	53,20	58,04	54,62	51,97	60,07	55,02	37,85	58,98
31,25	67,99	61,71	71,87	41,74	55,36	49,94	39,25	57,39	42,95	29,50	53,15
15,625	57,46	54,74	64,97	31,27	48,43	39,19	34,17	52,80	28,10	2885	50,83
7,8125	50,89	39,19	54,62	23,88	43,13	26,56	22,49	36,11	19,41	17,65	33,14
3,901	39,13	30,25	42,27	20,73	38,29	16,08	25,63	28,62	17,68	11,43	17,93



**Прилог 3.** Публиковане референце у којима су објављени резултати докторске дисертације



Article

## Synthesis and Molecular Descriptor Characterization of Novel 4-Hydroxy-chromene-2-one Derivatives as Antimicrobial Agents

Milan Mladenović \*, Nenad Vuković, Neda Nićiforović, Slobodan Sukdolak and Slavica Solujić

Department of Chemistry, Faculty of Science, University of Kragujevac, P.O. Box 60, Serbia;  
E-mails: nvukovic@kg.ac.rs (N.V.), nneda@kg.ac.rs (N.N.), duda@kg.ac.rs (S.S.),  
ssolujic@kg.ac.rs (S.S.)

\* Author to whom correspondence should be addressed; E-mail: mmladenovic@kg.ac.rs.

Received: 25 February 2009; in revised form: 26 March 2009 / Accepted: 7 April 2009 /

Published: 14 April 2009

---

**Abstract:** Several novel 4-hydroxy-chromene-2-one derivatives **2b-16b** were easily prepared through condensation reactions with microwave heating and characterized by elemental analysis, IR, <sup>1</sup>H-NMR and mass spectrometry. Geometry optimization of these compounds was executed by PM3, PM5 and Minimize Energy methods to describe them via molecular descriptors. The antimicrobial activity of the synthesized compounds was evaluated against different microbial strains using two different methods: the diffusion method and the micro-dilution method. All data indicated that the products possess antimicrobial activity which depends on the nature of substituent attached to the benzopyran moiety. In general, after 24 h the MIC values of most tested coumarins was 0.13 mg/mL, but compounds **1** and **6b** displayed the strongest antimicrobial activity on the tested cultures of bacteria after 48 h. Compound **13b** has the strongest growth inhibitory potential on fungus *C. albicans*, tested by diffusion method, with an inhibition zone of 30-37 mm at a concentration of 150 µg/mL. The conclusion of this experiment is that the synthesized compounds have varied and different influence on different classes of bacteria and the fungus *C. albicans*.

**Keywords:** Coumarins; Microwave synthesis; Molecular descriptors; Antimicrobial activity.

---

## 1. Introduction

Coumarins are benzopyran derivatives. Naturally occurring coumarins have been isolated from over 800 species of plants and microorganisms [1], and many of these natural products exhibit useful drug-like activity [2,3]. Moreover, coumarins are a group of compounds that play important roles as food constituents, antioxidants, stabilizers and immunomodulatory substances, as fluorescent markers for use in analyses, in stains, and in clinical use [4,5]. Coumarins possess anti-inflammatory, antiallergic, hepatoprotective, spasmolytic, antiviral, anticarcinogenic and anticoagulant activities [6]. They also constitute an important group of organic compounds that are used as additives to cosmetics, as optical brightening agents, and dispersed fluorescent and laser dyes [7-9]. Coumarins also have important effects in plant biochemistry and physiology, acting as enzyme inhibitors and precursors of toxic substances. In addition, these compounds are involved in the actions of plant growth hormones and growth regulators, the control of respiration, photosynthesis, as well as defense against infection [10]. These natural aromatic compounds exhibit enormous structural variability, due to the various types of substitutions in their basic structure possible, which in turn can influence their biological activity.

The first reports of the application of commercial microwave ovens to the synthesis of small organic molecules appeared in 1986. [11,12]. Microwave irradiation has since been proven to be extremely useful for promoting and simplifying many condensation reactions which can be carried out both in solvents and under solvent-free conditions [13-17]. Microwave technology is particularly suitable for the rapid and automated production of libraries of compounds, as it enables organic chemists to reduce the time of synthesis from days and hours to minutes and even seconds [18-20]. In addition, suppressed formation of side-products and improved yields under microwave heating conditions has frequently been observed. Finally, the proper choice of microwave processing techniques (solvent-free, solid- or polymer-supported conditions) can simplify the workup and avoid laborious and time-consuming purification of target compounds.

The essence of this work was synthesis of coumarin derivatives using microwave irradiation, in comparison with conventional methods. Coumarin derivatives have previously been studied in our laboratory [21-26]. We have now extended these studies to investigate their structural modification through Knoevenagel condensations carried out under microwave irradiation and leading to several 4-hydroxychromene-2-one derivatives. We also report a conventional and convenient microwave-promoted solution synthesis of eight imino derivatives of 4-hydroxychromene-2-one. All the reactions performed were monitored by TLC and GC/MS and yields were determined using the latter technique.

The use of solvent-free conditions for the fast synthesis of novel coumarin derivatives by the Knoevenagel condensation under microwave irradiation offers several advantages [27]: solvents are often expensive, toxic environmental polluting agents, and in the case of aprotic dipolar solvents with high boiling points, difficult to remove. Moreover, liquid-liquid extraction for the isolation of reaction products can be avoided, and the absence of solvent also avoids the risk of hazardous explosions when the reactions take place in a microwave oven. The workup procedure is reduced to the simple recrystallization of products from an appropriate solvent. The classical organic synthesis of imine derivatives commonly faces the problems of low yields, reaction byproducts, removal of solvents from reaction mixtures or liquid extraction, especially in the case of aprotic dipolar solvents with high boiling points, or product isolation through liquid-liquid extraction. In contrast to the classical method

microwave irradiation often leads to a remarkable decrease in the reaction times and increased yields (in our case up to 98%). The products could be purified simply by recrystallization from an appropriate solvent or mixture of solvents. The synthesized coumarin derivatives were tested as antimicrobial agents by the disc-diffusion and MIC methods on some Gram positive and Gram negative bacteria and the fungus *C. albicans*.

## 2. Results and Discussion

### 2.1. Synthesis

Preparations of coumarin derivatives **2b-8b** by the conventional condensation method were characterized by lower yields of the desired compounds (no more than 32%), followed by time consuming purifications by column chromatography. Thus, we report herein substantial improvements to the synthesis of these compounds using a solvent free microwave promoted reaction. The obtained results indicated significant yield increases (up to 87%), decreases in reaction times and, as far as purification of products is concerned, requiring only recrystallization from appropriate solvents.

Also, in a case of synthesis of imino derivatives of 4-hydroxychromene-2-one (**1**) microwave heating provided several advantages compared to the conventional method of preparation by azeotropic water removal. Due to homogenous heating achievable under microwaves side reactions were almost eliminated, which resulted in increased yields of the desired compounds **9b-16b** (up to 90%). Additionally purifications were limited to only recrystallization from methanol, without requiring time and solvent consuming column chromatography.

Both elemental and spectral (IR,  $^1\text{H-NMR}$ , mass spectra) analysis data of all compounds were in full agreement with the suggested molecular structures. The IR spectra of pure products **2b-8b** indicated the presence of a broadened OH band in the 3437-3422  $\text{cm}^{-1}$  region, corresponding to the hydroxyl fragment of the coumarin moiety. A strong coumarin moiety lactone C=O band at 1706-1699  $\text{cm}^{-1}$  was also observed. Synthesized compounds **2b**, **3b**, **4b** and **5b** possess additional strong C=O bands from ester COOMe or COOEt groups at 1731-1729  $\text{cm}^{-1}$ . Additional acetyl group C=O bands were observed at 1700-1686  $\text{cm}^{-1}$  for compounds **3b**, **6b** and **8b**. The IR spectra of compounds **7b** and **8b** showed broadened OH bands at 3111 and 3100  $\text{cm}^{-1}$  and C=O bands at 1699-1689  $\text{cm}^{-1}$  from COOH groups. Strong absorptions in the 2231-2229  $\text{cm}^{-1}$  region indicated the presence of C $\equiv$ N groups in the prepared compounds **5b** and **7b**. The  $^1\text{H-NMR}$  spectra of compounds **2b-8b** showed the characteristic coumarin aromatic proton signals in the 7.83-7.29 ppm range (m, 4H, C-5-H, C-6-H, C-7-H and C-8-H). All these spectra also contain resonances from methyl fragments (C=C-CH $_3$ , singlet at 2.26-2.21 ppm) and hydroxyl groups (OH-4, broad singlet at 17.17-16.73 ppm). The protons of the methyl group from the COOMe fragment of compounds **3b**, **4b** and **5b** were observed as singlets at 3.86-3.81 ppm, while the compound **2b** showed ethyl proton resonances at 4.21 ppm (q, 4H, CH $_2$ ) and 1.23 ppm (m, 6H, CH $_3$ ). In the vinyl proton region compound **4b** showed an absorption at 5.76 ppm (s, C=C-H). Since the compounds **7b** and **8b** were prepared from acetic acid derivatives, broadened OH proton peaks were observed at low field (12.37 and 12.65 ppm, respectively). The methyl protons from the acetyl fragment of compounds **3b**, **6b** and **8b** were identified in the range of 2.29-2.26 ppm.

Formation of imine derivatives **9b-15b** was evidenced by appearance of  $^1\text{H-NMR}$  signals in the aromatic protons region at 8.39-6.9 ppm and a strong C=N group IR band at 1610-1606  $\text{cm}^{-1}$ . Also, all

synthesized compounds showed  $\text{CH}_3\text{-C}=\text{N}$  proton resonances in the range of 2.81-2.61 ppm (s,  $\text{CH}_3$ , 3H). In the  $^1\text{H-NMR}$  spectrum of compound **16b** a multiplet at 1.82 ppm for a  $-\text{CH}_2\text{-CH}_2-$  group, two triplets at 2.46 ppm and 3.60 ppm for a methylene protons from  $\text{C}'\text{-4}$  and  $\text{C}'\text{-1}$ , respectively, and a broadened singlet from the hydroxyl group of  $\text{COOH}$  fragment at 11.3 ppm were observed.

In Table 1 reaction conditions, substituents and yields of obtained compounds are presented. In Tables 2 and 3 molecular descriptors and side chain dihedral angles of the compounds that had been obtained by Mopac, CAChe and Spartan [28-30] software, are presented.

Compound **1**, as a base for synthetic research, with compounds **6b** and **13b**, were subjected to geometry examination since molecule planarity and voluminous side chain groups play important roles in the bioactivity of the compounds [31,32]. Geometries are presented in Figures 1-4. The presented compounds were selected based on results that confirm influence of planarity and substituent nature when coumarins penetrate bacterial cells [31,32].

**Table 1.** Reaction conditions, substituents and yields of obtained compounds **2b-8b**.

No	$\text{R}_1$	$\text{R}_2$	Pw (W)	Tm(S)	$\text{T}^a$ ( $^\circ\text{C}$ )	Yield (%)	
						A	B
<b>2b</b>	COOEt	COOEt	500	7	123	27	96
<b>3b</b>	COMe	COOMe	500	7	129	36	97
<b>4b</b>	H	COOMe	500	9	121	18	96
<b>5b</b>	$\text{C}\equiv\text{N}$	COOMe	500	7	121	33	94
<b>6b</b>	COMe	COMe	500	10	134	41	94
<b>7b</b>	$\text{C}\equiv\text{N}$	COOH	500	6	120	42	84
<b>8b</b>	COMe	COOH	500	5	126	35	87

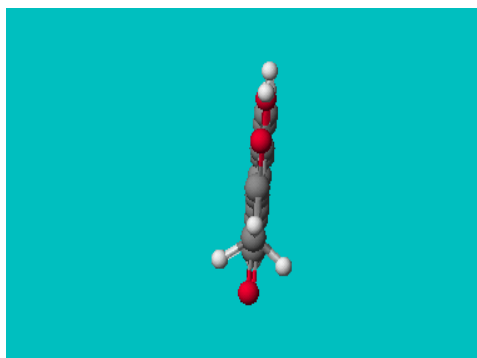
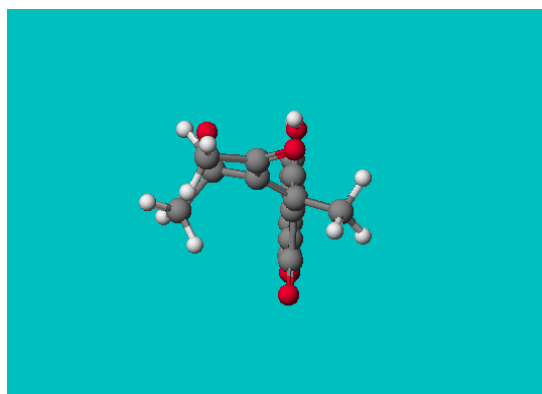
  

No	$\text{R}_3$	Pw (W)	Tm(min)	T ( $^\circ\text{C}$ )	Yield (%)	
					A	B
<b>9b</b>	Ph	500	3	109	75	95
<b>10b</b>	p-tolyl	500	3	109	73	97
<b>11b</b>	m-tolyl	500	3	109	84	94
<b>12b</b>	o-tolyl	500	3	109	73	94
<b>13b</b>	p- $\text{NO}_2$ -phenyl	500	3	109	51	92
<b>14b</b>	m- $\text{NO}_2$ -phenyl	500	3	109	62	97
<b>15b</b>	benzyl	500	3	109	75	97
<b>16b</b>	$\text{C}_4\text{H}_9\text{COOH}$	500	3	109	42	87

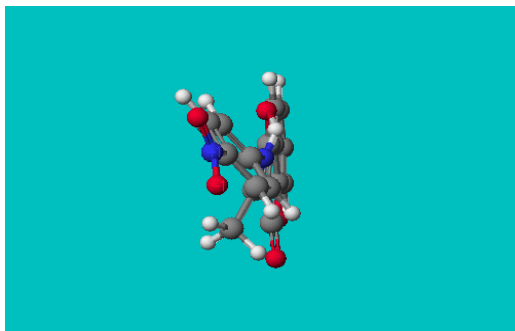


**Table 2.** Molecular descriptors of observed compounds.

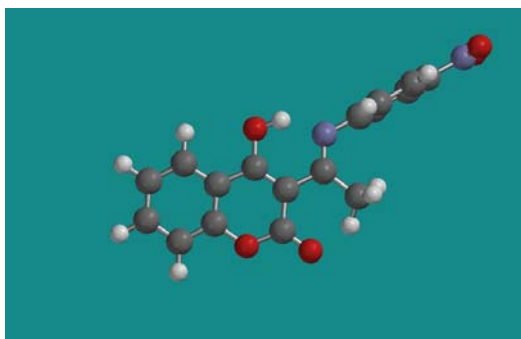
Parameters	Method	Compounds						
		1	3b	4b	6b	7b	8b	13b
Heat of Formation (kcal/mol)	PM3	-120.57	-184.38	-149.91	-140.02	-119.39	-193.17	-20.97
	PM5	-135.31	-207.47	-166.62	-168.25	-139.00	-214.49	-64.73
	SPARTAN(e.u)	26.97	57.58	57.26	70.91	40.23	41.66	72.38
Electronic Energy (eV)	PM3	-14412.18	-26955.66	-21039.91	-25237.76	-22271.14	-25448.75	-27320.32
Core-core Repulsion (EV)	PM3	11811.55	23083.21	17482.15	21395.99	18547.35	21441.45	23332.61
Gradient Norm	PM3	414.37	430.48	447.56	383.06	115.66	69.75	320.41
Dipole (debye)	PM3	7.32	4.99	7.25	6.11	6.54	4.96	9.94
	SPARTAN	3.89	3.85	5.10	5.76	5.73	2.79	8.24
Symetry	PM3	C1	C1	C1	C1	C1	C1	C1
	SPATRAN	C1	C1	C1	C1	C1	C1	C1
No. of Fields Level	PM3	38	57	49	54	50	54	60
Ionization Potencial (eV)	PM3	9.70	9.41	9.34	9.34	9.67	9.50	9.59
	PM3	-9.70	-9.41	-9.34	-9.34	-9.67	-9.50	-9.60
Homo Lumo Energies (eV)	PM3	-1.26	-1.30	-1.37	-1.30	-1.59	-1.31	-1.45
		-9.39	-9.59	-9.54	-9.66	-9.75	-9.57	-9.81
	SPARTAN	1.26	-1.29	-1.26	-1.26	-1.50	-1.32	-1.55
Molecular Weight	PM3	204.18	302.28	260.25	286.28	271.23	288.26	342.29
Scf Calculations	PM3	10	14	102	84	71	202	10

**Figure 1.** PM5 geometry of *3-acetyl-4-hydroxy-chromene-2-one (1)*.**Figure 2.** PM5 geometry of *3-(1-(4-hydroxy-2-oxo-2H-chromen-3-yl)-ethylidene)-pentane-2, 4-dione (6b)*.

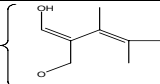
**Figure 3.** PM5 geometry of 4-hydroxy-3-(1-(4-nitrophenylimino)ethyl)-2H-chromen-2-one (13b).



**Figure 4.** Spartan geometry of 4-hydroxy-3-(1-(4-nitrophenylimino)ethyl)-2H-chromen-2-one (13b).



**Table 3.** Side chain atom angles of observed compounds.

	Side chain atoms	Angle (°)	Dihedral atoms	Dihedral (°)
1	-C=C-CO	120,67	C (enol from ring)-C=C-CO	0,21
	-C=C-CO	122,43	-C=C-C-O	-61,94
3b	-C=C-COO	30,95	-C=C-C-O (carbonyl)	-3,69
			-C=C-C-C (ester)	-5,48
4b	-C=C(from ring)-C(Me)	115,93	C=C(ring)-C (side chain)-C(Me)	-127,19
	-C=C-CO	126,44	-C=C-C-O (carbonyl)	-134,44
6b		121,79	-C=C-C-C(ester)	47,62
	C=C-C(carbonyl)	122,84	C=C-C-O	88,86
7b	C=C-CN	123,06	C=C-C-C (cyano)	15,34
	C=C-C(carboxyl acid)	122,92	-C=C-C-O (carbonyl)	-119,99
8b			-C=C-C-O (ester)	61,05
	-C=C-CO	119,79	-C=C-C-O (carbonyl)	-54,78
13b	C=C-C(carboxyl acid)	124,68	-C=C-C-O (carbonyl)	154,01
			-C=C-C-O(ester)	-30,51
	=C(from ring)-C=N-	122,79	=C (from ring)-C=N-C (aromatic)	180

## 2.2. Minimal Inhibitory Concentration

All the reported compounds exhibited moderate *in vitro* activity against the tested bacterial strains (Tables 4 and 5) and the yeast *C. albicans*. Solutions of compound **1** for testing against *S. aureus* (isolate) were prepared in following concentrations: 0.94, 1.90, 3.80, 7.50, 15.00 and 30.00 mg/mL. For other cultures tested the concentrations of compound **1** were 0.09, 0.19, 0.38, 0.75, 1.50 and 3.00 mg/mL. For the rest of the compounds, the concentrations were: 0.125, 0.25, 0.50, 1.00, 2.00 and 4.00 mg/mL. Tests were run in triplicate. Standards were tetracycline and ketoconazole (both at 0.500 µg/mL).

MIC values for all tested microorganism were in the range from 0.185 mg/mL to 2 mg/mL, and results were read after 24 h and 48 h respectively. After 24 h, with MICs of 0.09 (compound **1**) and 0.13 mg/mL (compounds **3b-13b**), no bacterial growth was visible in test tubes containing *S. aureus*, indicates that all seven compounds are good growth inhibitors of this species. Some compounds were less effective on the same culture isolated from tissue and towards *M. lysodiecticus*, and they stopped the growth at a concentration of 0.50 mg/mL. After 48 hours, none of applied compounds stopped growth of *S. aureus* (isolate) or *M. lysodiecticus*, and a change of the indicator's color was visible. Tested bacteria were most sensitive to the compound **1**, one with no substituent, and **6b**, which contains two acetyl groups. Carboxyl, ester and cyano derivatives demonstrated slightly lower activity.

**Table 4.** MIC values (mg/mL) of the synthesized coumarin derivatives.

Comp.	Cultures									
	<i>S. aureus</i>		<i>S. aureus</i> (isolate)		<i>M.</i> <i>lysodiecticus</i>		<i>E. coli</i>		<i>C. albicans</i>	
	24 h	48 h	24 h	48 h	24 h	48 h	24 h	48 h	24 h	48 h
<b>1</b>	0.09	0.19	0.94	1.90	0.19	0.38	0.19	0.38	0.09	0.09
<b>3b</b>	0.13	0.50	0.50	1.00	0.13	0.50	0.13	0.50	0.13	0.50
<b>4b</b>	0.13	0.50	0.50	1.00	0.13	0.50	0.13	0.50	0.25	0.50
<b>6b</b>	0.13	0.25	0.13	0.50	0.50	0.50	0.25	1.00	0.13	0.25
<b>7b</b>	0.13	1.00	0.50	0.50	0.13	0.50	0.50	1.00	0.50	1.00
<b>8b</b>	0.13	0.50	0.50	1.00	0.13	0.50	0.13	0.50	0.13	0.13
<b>13b</b>	0.13	0.50	0.13	0.50	0.50	0.50	0.13	0.50	0.13	0.13

The lowest sensitivity, only for *S. aureus*, was displayed by the derivative **7b** with a cyano group (MIC 1 mg/mL). Different compounds permitted growth of *M. lysodeikticus* and *S. aureus* (isolate), with MIC values ranging from 0.38 to 0.50 mg/mL. Schiff-base' inhibitory potential was very similar to compounds **3b**, **4b** and **8b**, for all of bacteria, regardless of differences in structure. It is interesting, regarding the *S. aureus* results after 48 h, that with an increase of the HOMO values of the synthesized compounds from most negative (- 9.67) to less (- 9.37), the MIC values decreased. It was concluded that coumarin derivatives acting as electrophilic agents have a positive effect and inhibited bacterial growth [35,36]. Similar MICs were obtained for *M. lysodiecticus*. A LUMO decrease resulted in a MIC increase, with the exception of compound **6b**, as result of the better coumarin derivative penetration in bacterial cells in the absence of coumarin molecule nucleophilic action [35,36].

*E. coli* was also tested as an example of Gram negative bacteria, and only compounds **6b** and **7b** permitted growth after 24 h. For the rest of the applied compounds the MIC was 0.13 mg/mL. Results showed that after 48 h the best drug for Gram positive bacteria (**6b**) was the worst one for Gram negative. After 48 h, the minimum inhibitory concentration of compound **6b** was two to four times higher within Gram negative than Gram positive bacteria. Also, the earlier mentioned relationship between HOMO, LUMO and MIC was the opposite for *E. coli*, but that was expected due to differences in the chemical constitution of Gram positive and negative bacteria cell walls and the different mechanisms of coumarin penetration in bacteria cells [35,36].

Analysis further showed that only compounds **4b** and **7b** allowed growth of *C. albicans* after 24 h. While compounds **1**, **8b** and **13b** still prevented the growth of fungus at a concentration of 0.13 mg/mL, after 48 hours, the rest of the tested drugs showed a lack of inhibitory action, which is very interesting due to similarity of their structure. That was conformation that, in general, derivatives with carboxyl, ester or cyano group, presented slightly lower drug potential than acetyl-substituted ones.

Finally, the *p*-nitrophenylimino derivative of coumarin is a completely different pharmacophore, containing with two planar systems (Figure 4), and *p*-nitro group attached on imino ring. For all tested cultures of bacteria the final MIC was the same: 0.5 mg/mL. That indicates that mechanism of interaction with bacteria is very similar. Also, compound **13b** is very powerful growth inhibitor of fungus.

### 2.3. Cylinder plate diffusion method

The results of diffusion antimicrobial activity results are presented in Table 5.

**Table 5.** Cylinder plate diffusion method ( $\mu\text{g/mL}$ ) of synthesized derivatives.

		Cultures <sup>a</sup>													
		I		II		III		IV		V		VI		VII	
Time (h)		24	48	24	48	24	48	24	48	24	48	24	48	24	48
Comp.	Conc. ( $\mu\text{g/mL}$ )	Zones of inhibition (mm) <sup>b,c,d</sup>													
<b>1</b>	75	15	16	10	10	8	8	6	7	17	17	10	12	26	30
<b>10b</b>	75	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/
	150	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/
<b>13b</b>	75	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	22	23
	150	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	30	37
<b>16b</b>	75	12	13	15	16	/	/	7	8	16	16	8	10	20	25
<b>Antibioti</b>	10	26	24	20	19	24	25	52	53	24	23	21	21	26	23

<sup>a</sup> I *S. aureus*; II *S. aureus* (isolate); III *M. lysodieticus*; IV *K. pneumonia*; V *B. subtilis*, VI *E. coli*; VII *C. albicans*; <sup>b</sup> (/) means absence of an inhibition zone; the results are from experiments run in triplicate, SD= $\pm 3$  mm; <sup>c</sup> ethanol solvent controls were negative; <sup>d</sup> Standards were tetracycline (10 mg/mL) and ketoconazole (10 mg/mL).

Disc diffusion values for all tested microorganism were in the range 75-150  $\mu\text{g/mL}$ . Only compound **1** and selected Schiff bases have been tested as possible drugs by this method. The main

result of the experiment is that compound **13b** at a concentration of 150 µg/mL presented better inhibitory potential than applied antibiotic for *C. albicans* (30-37 mm). This molecule, with two planar systems [31-34] and a *p*-nitro group (Figure 5) has a great effect on fungus cell wall [37] and, therefore, totally lack of fungus resistance. It is very interesting that compound **10b** with very similar structure but without a *p*-nitro group, showed complete lack of inhibitory activity for all tested cultures.

According to our test results, only compound **1** demonstrated inhibitory potential for all tested cultures within 24 hours of testing. When testing was performed on *C. albicans*, the inhibition zone of compound **1** was similar to that of **13b**. All examined microorganisms were sensitive to the presence of compound **16b**, except *M. lysodieticus*. Measured zones of inhibition, both for Gram positive and Gram negative bacteria, showed that compounds **1** and **16b** are less effective than applied antibiotics. These compounds have no substitution or an *n*-pentanoic acid moiety as substituent.

The tested cultures of bacteria showed notable resistance to the other compounds at the applied concentrations. It appears that only those compounds with free carbonyl or carboxyl groups present some growth inhibitory potential in 6-20 mm range within 24 and 48 hours. In general, the less sensitive culture was *K. pneumoniae* (Gram negative); and the most sensitive one was *B. subtilis* (Gram positive). Results for the fungus were very different. The behavior of compounds **1** and **16b** was similar and they both stopped the growth of *C. albicans*, but the measured inhibition zones were larger than with tested bacteria, and conclusion is that the fungus was more sensitive to these compounds.

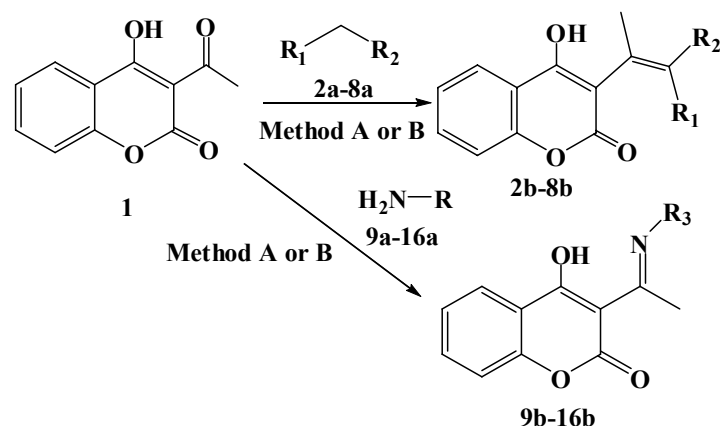
The general antimicrobial activity of natural coumarins has been documented in woodruff (*Galium odoratum*) extract [33]; the MIC values of some natural coumarins against Gram positive bacteria were 62.5 g/mL-125 g/mL, suggesting that phenyl chain of position 8 and hydroxyl group at position 7 of the benzene ring are required for activity against *E. coli* and *S. aureus*. The antifungal potential of coumarins can be related to the presence of an alkyl group at the C-8 position and the MIC for these compounds for *C. albicans* was about 250 g/mL [34]. Planarity of the coumarin ring makes penetration in Gram positive bacteria easier, but other factors such as shape have to be considered as well [31-34]. Coumarins proved to be slightly less active against Gram negative bacteria, due possibility to particular physical properties [31] (and in agreement with the results seen here).

### 3. Experimental

#### 3.1. Chemistry

The sequence of the reactions used for the synthesis of the novel 4-hydroxychromene-2-one derivatives is outlined in Scheme 1. Compounds **2b-8b** had been synthesized by Knoevenagel condensation using both conventional and fast microwave procedures. Different carbonyl, ester and cyano derivatives were used in the condensations with 4-hydroxychromene-2-one to achieve structural variety in the produced coumarins. Synthesis of compounds **9b-15b** presents easy preparation of coumarin Schiff-base derivatives, also by two methods of preparation. The goal of synthesis was preparation of both aromatic and aliphatic 4-hydroxy-chromene-2-one derivatives and their characterization as potential antimicrobial agents. Both methods are simple with short reaction times and high yields.

**Scheme 1.** Reaction of Condensation of 3-acetyl-4-hydroxy-chromene-2-one (**1**) with carbonyl compounds **2a-8a** and amines **9a-16a** (A. Conventional method; B. Microwave method).



### 3.2. Molecular Descriptors

Geometries of the compounds were refined by three different semi-empirical methods: PM3 from Mopac 2000 [28], version 11 (Chem 3D v9, 2006) with gradient norm 0.100; PM5 method from CAChe WorkSystem Pro 6.01 software, and Minimize Energy method from Spartan 2002 for Windows. List of the descriptors is presented in Table 2. Also, in Table 3 we present side chain atom angles and dihedral angles for the compounds, calculated and optimized with Spartan 2002 tools. Figures with PM5 geometries of selected compounds were taken by CAChe software.

### 3.3. Microbiology

#### 3.3.1. Culture of Microorganisms

Test bacteria used in this experiment were: *Staphylococcus aureus* (ATCC 25925), *Staphylococcus aureus* (clinical isolate, IHP), *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Micrococcus lysodeikticus* (ATCC 4698) and *Candida albicans* (ATCC 10259), *Bacillus subtilis* (clinical isolate, IHP), *Klebsiella pneumoniae* (clinical isolate, IHP). All tested bacteria and fungi *C. albicans* were obtained from Laboratory for Microbiology, Faculty of Chemistry, University of Beograd, Serbia, and the Laboratory for Microbiology, from Institute for Health Protection (IHP) in Kragujevac.

#### 3.3.2. Minimal Inhibitory Concentration

The antimicrobial activity of synthesized coumarins was measured using the microdilution method in Mueller-Hinton broth [38, 39]. The microdilution method was performed using a 24 h old culture of bacteria (and 48 h old culture of *C. albicans*) which was reseeded on the nutrient broth at a temperature of 37 °C. The inoculums were made and concentrations were adjusted with sterile water to  $5.6 \times 10^6$  CFU/mL for bacteria and  $3 \times 10^4$  CFU/mL for fungus. A series of two-fold dilutions of the coumarins, ranging from 4 mg/mL to 0.125 mg/mL, was prepared in Mueller-Hinton broth with the addition of 0.1 mL of bacterial (yeast) suspensions. A set of tubes containing only inoculated broth was kept as a control. Tetracycline and ketoconazole were used as the control drugs. MICs were

determined as the lowest concentration of the compounds that inhibited visible growth, and by the changing color of Resazurin solution (0.02 mL of 0.05% concentration) from blue to pink [40].

### 3.3.3. Disc diffusion Cylinder Plate Method

Muller Hinton Agar (for bacteria) and Sabouraud dextrose agar (for yeast) were prepared with the addition of 1 mL of microbial suspension ( $6.5 \times 10^6$  CFU/mL for bacteria and  $3 \times 10^4$  CFU/mL for yeast) and the plates incubated at 37°C for approximately 20 min. Then sterile vertical cylinders were placed on the Petri dishes and samples of compounds (75 µg/mL and 150 µg/mL in ethanol) were aseptically poured into the vertical cylinder using micropipettes [41-44]. The plates were subsequently incubated for 24 hours at 37°C for bacteria and 48 hours at 28°C for yeast. The diameter of zones of inhibition was measured in mm. The standard antibiotics were tetracycline for bacteria and ketoconazole for *C. albicans*.

### 3.4. Instruments and apparatus

All reagents, solvents and catalyst were of analytical grade and used directly. All the melting points were recorded on a Kofler-hot stage apparatus (C. Reichert, Vienna, Austria) and uncorrected. The purity of compounds was checked routinely by TLC using a Merck Kieselgel 60 PF<sub>254+366</sub> and a Merck Kieselgel G. and spots were visualized by exposing the dry plates in iodine vapors. Also, the purity was checked by gas-chromatography/mass spectrometry. The IR spectra were run on a Perkin-Elmer Grating Spectrophotometers Model 137 and Model 337 in  $\text{cm}^{-1}$  (Perkin Elmer, Beaconsfield, UK). The NMR spectra were recorded on a Varian Gemini 200 spectrometer ( $^1\text{H}$  at 200 MHz; Varian Inc., Palo Alto, CA, USA), in  $\text{CDCl}_3$  as solvent, using TMS ( $\text{SiMe}_4$ ) as the internal standard. Chemical shifts are given in ppm, abbreviations: s-singlet, d-doublet, t-triplet, q-quartet, ABq-AB quartet, m-multiplet. Microanalysis of carbon, hydrogen, and nitrogen was carried out with a Carlo Erba 1106 microanalyser (Carlo Erba, Milan, Italy). GC/MS were carried out in Agilent 6890N/5975B gas chromatograph. The microwave assisted reactions were carried out in a MICROSYNTH Microwave Synthesis System (serial number: 130486, terminal: T640, serial number: 0804000100), manufactured by Milestone Inc. 25 Controls Dr. Shelton, CT 06484, USA [the microwaves are generated by a magnetron (serial number: 133462/13346), at the frequency of 2450 MHz having an output energy range of 100-500 watts]. This apparatus is well suited for stringent reaction conditions, namely, anhydrous atmosphere, controlled temperature (using a fiber optic as an individual sensor for temperature control) and attachment of reflux condenser with constant stirring.

### 3.5. Preparation of 3-acetyl-4-hydroxy-chromene-2-one derivatives (general procedure)

#### 3.5.1. Knoevenagel condensation of 3-acetyl-4-hydroxy-chromene-2-one (**1**) with carbonyl compounds **2a-8a**

##### 3.5.1.1. Method A - Conventional procedure

A solution of 3-acetyl-4-hydroxychromene-2-one (**1**, 2.5 mmol) and toluene (50 mL) containing a catalytic amount of ammonium acetate was taken and carbonyl compound **2a-8a** was added. The

reaction mixture was stirred for a period of 8 h at the boiling point of the solvent with azeotropic removal of water formed. The excess solvent was distilled off and solid product was filtered, dried, purified via column chromatography (benzene-acetone=8:2) to give products **2b-8b**.

### 3.5.1.2. Method B - Microwave method

A well ground mixture of a 3-acetyl-4-hydroxychromene-2-one (**1**, 2.5 mmol), carbonyl compound **2a-8a** (2.8 mmol) and ammonium acetate (catalytic amount) was irradiated and heated in the microwave reactor at the power setting and for the time indicated in Table 1. At the end of exposure to microwaves, the reaction mixture was cooled to room temperature, and the crude product was recrystallized from methanol to afford the coumarin derivatives **2b-8b** (Scheme 1, Table 1).

### 3.5.2. Condensation of 3-acetyl-4-hydroxy-chromene-2-one (**1**) with amines **9a-16a**

#### 3.5.2.1. Method A - Conventional method

A mixture of 3-acetyl-4-hydroxychromene-2-one (**1**, 0.01 mol), amine **9a-16a** (0.01 mol) and a catalytic amount of *p*-toluenesulfonic acid in toluene (50 mL) was heated with azeotropic removal of water for a period of 10-12 h. Progress of reaction was monitored by TLC (toluene-acetone = 7:3). At the end of the reaction, the solvent was removed under reduced pressure. The solid products were filtered, dried and recrystallized from methanol to give compounds **9b-16b**.

#### 3.5.2.2. Method B - Microwave method

A catalytic amount of *p*-toluenesulfonic acid was added to a toluene solution (50 mL) of equimolar amounts (0.01 mol) of 3-acetyl-4-hydroxychromene-2-one (**1**) and amine **9a-16a**. The mixture was heated under microwaves for 3 minutes. After cooling, the solvent was removed, and the obtained solid was filtered and recrystallized from methanol (Table 1, Scheme 1).

### 3.6. Spectral data of synthesized coumarin derivatives

*Diethyl 2-(1-(4-hydroxy-2-oxo-2H-chromen-3-yl)ethylidene)malonate (2b)*: Yield: 96%; m.p. 224-226 °C; IR (KBr, cm<sup>-1</sup>):  $\nu_{\text{OH}}$  3434,  $\nu_{\text{CH}_3 \text{ and CH}_2}$  2949 and 2841,  $\nu_{\text{C=O}}$  1731 (lactone and ester),  $\nu_{\text{C=C}_{\text{ar}}}$  1611, 1546 and 1496,  $\nu_{\text{C-O-C}}$  1368 and 1032; <sup>1</sup>H-NMR ( $\delta$  ppm): 1.23 (m, 6H, CH<sub>3</sub>, mixture of *Z* and *E* isomers), 4.21 (q, 4H, 4CH<sub>2</sub>), 7.31-7.83 (m, 4H, H-5, H-6, H-7, H-8), 16.73 (bs, 1H, OH-4); MS: m/z (%): 346 (M<sup>+</sup>); Anal. for C<sub>18</sub>H<sub>18</sub>O<sub>7</sub> (346.33) (%): C: 62.42, H: 5.24; found C: 62.44, H: 5.23.

*Methyl 2-acetyl-3-(4-hydroxy-2-oxo-2H-chromen-3-yl)but-2-enoate (3b)*: Yield: 97%; m.p. 237-239 °C; IR (KBr, cm<sup>-1</sup>):  $\nu_{\text{OH}}$  3433,  $\nu_{\text{CH}_3}$  2948, 2930, 2856,  $\nu_{\text{C=O}}$  1730 (lactone and ester),  $\nu_{\text{C=O}}$  1700,  $\nu_{\text{C=C}_{\text{ar}}}$  1610, 1545, 1495, 1369,  $\nu_{\text{C-O-C}}$  1032 and 1024; <sup>1</sup>H-NMR ( $\delta$  ppm): 2.20 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 2.26 (s, 3H, CO-CH<sub>3</sub>), 3.81 (s, 3H, COO-CH<sub>3</sub>), 7.29-7.83 (m, 4H, H-5, H-6, H-7, H-8), 17.01 (bs, 1H, OH-4); MS: m/z (%): 302 (M<sup>+</sup>); Anal. for C<sub>16</sub>H<sub>14</sub>O<sub>6</sub> (302.28) (%): C: 63.57, H: 4.67; found C: 63.55, H: 4.71.



*Methyl 3-(4-hydroxy-2-oxo-2H-chromen-3-yl)but-2-enoate (4b)*: Yield: 96%; m.p. 202-203 °C, m.p. 222-223 °C; IR (KBr, cm<sup>-1</sup>):  $\nu_{(\text{OH})}$  3422,  $\nu_{(\text{CH}_3)}$  2949, 2930,  $\nu_{(\text{C}=\text{O})}$  2841, 1729 (lactone and ester),  $\nu_{(\text{C}=\text{C})_{\text{ar}}}$  1609, 1542, 1491,  $\nu_{(\text{C}-\text{O}-\text{C})}$  1364, 1033, 1023; <sup>1</sup>H-NMR ( $\delta$  ppm): 2.22 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 3.86 (s, 3H, COO-CH<sub>3</sub>), 5.76 (s, 1H, C=C-H), 7.29-7.82 (m, 4H, H-5, H-6, H-7, H-8), 17.11 (bs, 1H, OH-4); MS: m/z (%): 260 (M<sup>+</sup>); Anal. for C<sub>14</sub>H<sub>12</sub>O<sub>5</sub> (260.24) (%): C: 64.61, H: 4.65; found C: 64.63, H: 4.69.

*Methyl 2-cyano-3-(4-hydroxy-2-oxo-2H-chromen-3-yl)but-2-enoate (5b)*: Yield: 94%; m.p. 247-249 °C; IR (KBr, cm<sup>-1</sup>):  $\nu_{(\text{OH})}$  3434,  $\nu_{(\text{CH}_3)}$  2949, 2929, 2854,  $\nu_{(\text{C}\equiv\text{N})}$  2231,  $\nu_{(\text{C}=\text{O})}$  1731 (lactone and ester),  $\nu_{(\text{C}=\text{C})_{\text{ar}}}$  1611, 1546, 1497,  $\nu_{(\text{C}-\text{O}-\text{C})}$  1368, 1032, 1025; <sup>1</sup>H-NMR ( $\delta$  ppm): 2.23 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 3.80 (s, 3H, COO-CH<sub>3</sub>), 7.29-7.83 (m, 4H, H-5, H-6, H-7, H-8), 17.06 (bs, 1H, OH-4); MS: m/z (%): 285 (M<sup>+</sup>); Anal. for C<sub>15</sub>H<sub>11</sub>NO<sub>5</sub> (285.06) (%): C: 63.16, H: 3.89, N: 4.91; found C: 63.18, H: 3.84, N: 4.95.

*3-(1-(4-Hydroxy-2-oxo-2H-chromen-3-yl)-ethylidene)-pentane-2,4-dione (6b)*: Yield: 94%; m.p. 241-243 °C; IR (KBr, cm<sup>-1</sup>):  $\nu_{(\text{OH})}$  3434,  $\nu_{(\text{CH}_3)}$  2949, 2929,  $\nu_{(\text{C}=\text{O})}$  1731 (lactone),  $\nu_{(\text{C}=\text{O})}$  1697, 1686,  $\nu_{(\text{C}=\text{C})_{\text{ar}}}$  1610, 1544, 1496,  $\nu_{(\text{C}-\text{O}-\text{C})}$  1371, 1032; <sup>1</sup>H-NMR ( $\delta$  ppm): 2.23 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 2.29 (s, 3H, CO-CH<sub>3</sub>), 7.31-7.83 (m, 4H, H-5, H-6, H-7, H-8), 17.01 (bs, 1H, OH-4); MS: m/z (%): 286 (M<sup>+</sup>); Anal. for C<sub>16</sub>H<sub>14</sub>O<sub>5</sub> (286.28) (%): C: 67.13, H: 4.93; found C: 67.15, H: 4.87.

*2-Cyano-3-(4-hydroxy-2-oxo-2H-chromen-3-yl)but-2-enoic acid (7b)*: Yield: 84%; m.p. 256-257 °C; IR (KBr, cm<sup>-1</sup>):  $\nu_{(\text{OH})}$  3433 (coumarin),  $\nu_{(\text{OH})}$  3100 (COOH),  $\nu_{(\text{CH}_3)}$  2947, 2927,  $\nu_{(\text{C}=\text{O})}$  1731,  $\nu_{(\text{C}=\text{O})}$  1699 (COOH),  $\nu_{(\text{C}=\text{C})_{\text{ar}}}$  1611, 1543, 1495,  $\nu_{(\text{C}-\text{O}-\text{C})}$  1371, 1032; <sup>1</sup>H NMR ( $\delta$  ppm): 2.24 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 7.31-7.83 (m, 4H, H-5, H-6, H-7, H-8), 12.37 (bs, 1H, COOH), 17.13 (bs, 1H, OH-4); MS: m/z (%): 271 (M<sup>+</sup>); Anal. for C<sub>14</sub>H<sub>9</sub>NO<sub>5</sub> (271.22) (%): C: 62.00, H: 3.34, N: 5.16; found C: 62.05, H: 5.11, N: 5.21.

*2-Acetyl-3-(4-hydroxy-2-oxo-2H-chromen-3-yl)but-2-enoic acid (8b)*: Yield: 87%; m.p. 229-231 °C; IR (KBr, cm<sup>-1</sup>):  $\nu_{(\text{OH})}$  3437 (coumarin),  $\nu_{(\text{OH})}$  3111 (COOH),  $\nu_{(\text{CH}_3)}$  2991,  $\nu_{(\text{C}=\text{O})}$  1727 (lactone),  $\nu_{(\text{C}=\text{O})}$  1699, 1689 (COOH and keto group),  $\nu_{(\text{C}=\text{C})_{\text{ar}}}$  1601, 1541, 1491,  $\nu_{(\text{C}-\text{O}-\text{C})}$  1369, 1031; <sup>1</sup>H-NMR ( $\delta$  ppm): 2.21 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 2.28 (s, 3H, CO-CH<sub>3</sub>), 7.31-7.83 (m, 4H, H-5, H-6, H-7, H-8), 12.65 (bs, 1H, COOH), 17.17 (bs, 1H, OH-4); MS: m/z (%): 288 (M<sup>+</sup>); Anal. for C<sub>15</sub>H<sub>12</sub>O<sub>6</sub> (271.22) (%): C: 62.50, H: 4.20; found C: 62.55, H: 4.21.

*4-Hydroxy-3-(1-(phenylimino)ethyl)-2H-chromen-2-one (9b)*: Yield: 95%; m.p. 169-171 °C; IR (KBr, cm<sup>-1</sup>):  $\nu_{(\text{OH})}$  3415,  $\nu_{(\text{C}=\text{H}_{\text{ar}})}$  3073, 3037,  $\nu_{(\text{CH}_3)}$  2929, 2853,  $\nu_{(\text{C}=\text{O})}$  1704 (lactone),  $\nu_{(\text{C}=\text{N})}$  1609 (imino),  $\nu_{(\text{C}=\text{C})_{\text{ar}}}$  1592, 1561, 1480; <sup>1</sup>H-NMR ( $\delta$  ppm): 2.72 (s, 3H, CH<sub>3</sub>-C=N), 7.3 (m, 1H, C-6-H), 7.4 (dd, 1H, C-8-H, <sup>3</sup>J<sub>8,7</sub>=8.3 Hz, <sup>4</sup>J<sub>8,6</sub>=1.1 Hz), 7.6 (dd, 1H, C-5-H, <sup>3</sup>J<sub>5,6</sub>=7.8 Hz, <sup>4</sup>J<sub>5,7</sub>=1.7 Hz), 7.7 (m, 1H, C-7-H), 6.9-7.21 (m, 5H, phenyl), 16.15 (bs, 1H, OH-C-4); MS: m/z (%): 279 (M<sup>+</sup>, 64), 278 (100), 264 (17), 262 (10), 250 (5), 236 (2), 234 (3), 222 (2), 188 (19), 187 (28), 158 (12), 144 (4), 131 (9), 130 (14), 121 (19), 118 (10), 93 (12), 92 (6), 77 (25), 65 (6), 51 (8); Anal. for C<sub>17</sub>H<sub>13</sub>NO<sub>3</sub> (279.29) (%): C: 73.11, H: 4.69, N: 5.02; found C: 73.09, H: 4.71, N: 4.97.

*4-Hydroxy-3-(1-(p-tolylimino)ethyl)-2H-chromen-2-one (10b)*: Yield: 97%; m.p. 147-149 °C. IR (KBr, cm<sup>-1</sup>):  $\nu_{(\text{OH})}$  3421,  $\nu_{(\text{C}=\text{H}_{\text{ar}})}$  3073,  $\nu_{(\text{CH}_3)}$  2985, 2922, 2852,  $\nu_{(\text{C}=\text{O})}$  1709 (lactone),  $\nu_{(\text{C}=\text{N})}$  1611 (imino),

$\nu_{(C=C)ar}$  1597, 1569, 1513, 1483;  $^1H$ -NMR ( $\delta$  ppm): 2.41 (s, 3H,  $CH_3-C'-3$ ), 2.69 (s, 3H,  $CH_3-C=N$ ), 7.09-7.65 (AB<sub>q</sub>, 4H, phenyl,  $^3J_{8,7}=8.43$  Hz, 7.3 (m, 1H, C-6-H), 7.4 (dd, 1H, C-8-H,  $J_{8,7}=8.3$  Hz,  $J_{8,6}=1.1$  Hz), 7.6 (dd, 1H, C-5-H,  $J_{5,6}=7.8$  Hz,  $J_{5,7}=1.7$  Hz), 7.7 (m, 1H, C-7-H), 16.07 (bs, 1H, OH-C-4); MS: m/z (%): 293 ( $M^+$ , 91), 292 (100), 278 (32), 276 (20), 264 (5), 236 (2), 188 (21), 187 (12), 172 (9), 158 (5), 145 (5), 144 (12), 132 (10), 121 (23), 107 (12), 106 (11), 91 (23), 77 (8), 65 (16), 51 (3); Anal. for  $C_{18}H_{15}NO_3$  (293.32) (%): C: 73.71, H: 5.15, N: 4.78; found C: 73.72, H: 5.12, N: 4.79.

*4-Hydroxy-3-(1-(m-tolylimino)ethyl)-2H-chromen-2-one (11b)*: Yield 94%; m.p. 109-110 °C. IR (KBr,  $cm^{-1}$ ):  $\nu_{(OH)}$  3417,  $\nu_{(=CH)ar}$  3067,  $\nu_{(CH_3)}$  2982, 2929, 2853,  $\nu_{(C=O)}$  1697 (lactone),  $\nu_{(C=N)}$  1606 (imino),  $\nu_{(C=C)ar}$  1600, 1566, 1484;  $^1H$ -NMR ( $\delta$  ppm): 2.42 (s, 3H,  $CH_3-C'-3$ ), 2.70 (s, 3H,  $CH_3-C=N$ ), 7.01 (dd, 1H, C-4'-H,  $^3J_{4',5'}=7.58$  Hz,  $^4J_{4',6'}=1.14$  Hz), 7.04 (dd, 1H, C-6'-H,  $^3J_{6',5'}=8.12$  Hz,  $^4J_{6',4'}=1.14$  Hz), 7.12 (s, 1H, C-2'-H), 7.25 (dd, 1H,  $^3J_{5',4'}=7.58$  Hz, C-5'-H,  $^3J_{5',6'}=8.12$  Hz), 7.3 (m, 1H, C-6-H), 7.4 (dd, 1H, C-8-H,  $^3J_{8,7}=8.3$  Hz,  $^4J_{8,6}=1.1$  Hz), 7.6 (dd, 1H, C-5-H,  $^3J_{5,6}=7.8$  Hz,  $^4J_{5,7}=1.7$  Hz), 7.7 (m, 1H, C-7-H), 15.9 (bs, 1H, OH-C-4); MS: m/z (%): 293 ( $M^+$ , 81), 292 (100), 278 (30), 276 (12), 264 (3), 236 (3), 188 (14), 187 (27), 172 (11), 158 (7), 145 (13), 144 (12), 132 (10), 121 (19), 107 (12), 106 (6), 91 (20), 77 (9), 65 (15), 51 (4); Anal. for  $C_{18}H_{15}NO_3$  (293.32) (%): C: 73.71, H: 5.15, N: 4.78; found C: 73.72, H: 5.14, N: 4.79.

*4-Hydroxy-3-(1-(o-tolylimino)ethyl)-2H-chromen-2-one (12b)*: Yield 94%; m.p. 138-139 °C. IR (KBr,  $cm^{-1}$ ):  $\nu_{(OH)}$  3466.94,  $\nu_{(=CH)ar}$  3072.51,  $\nu_{(CH_3)}$  2935.08, 2856.34,  $\nu_{(C=O)}$  1711.85 (lactone),  $\nu_{(C=N)}$  1610.82 (imino),  $\nu_{(C=C)ar}$  1594.26, 1562.86, 1486.38;  $^1H$ -NMR ( $\delta$  ppm): 2.30 (s, 3H,  $CH_3-C-1'$ ), 2.81 ( $CH_3-C=N$ ), 7.23 (dd, 1H, C-6'-H,  $^3J_{6',5'}=8.01$  Hz,  $^4J_{6',4'}=1.12$  Hz), 7.28 (dd, 1H, C-3'-H,  $^3J_{3',4'}=7.62$  Hz,  $^4J_{3',5'}=1.11$  Hz), 7.3 (m, 1H, C-6-H), 7.4 (dd, 1H, C-8-H,  $^3J_{8,7}=8.3$  Hz,  $^4J_{8,6}=1.1$  Hz), 7.37 (m, 1H, C-5'-H), 7.6 (dd, 1H, C-5-H,  $^3J_{5,6}=7.8$  Hz,  $^4J_{5,7}=1.7$  Hz), 7.7 (m, 1H, C-7-H), 15.8 (bs, 1H, OH-C-4); MS: m/z (%): 293 ( $M^+$ , 42), 292 (34), 278 (100), 188 (7), 187 (11), 172 (8), 158 (15), 145 (4), 144 (9), 132 (9), 121 (16), 107 (2), 106 (3), 91 (17), 77 (6), 65 (13), 51 (6); Anal. for  $C_{18}H_{15}NO_3$  (293.32) (%): C: 73.71, H: 5.15, N: 4.78; found C: 73.75, H: 5.21, N: 4.73.

*4-Hydroxy-3-(1-(4-nitrophenylimino)ethyl)-2H-chromen-2-one (13b)*: Yield 92%; m.p. 212-215 °C. IR (KBr,  $cm^{-1}$ ):  $\nu_{(OH)}$  3414,  $\nu_{(=CH)ar}$  3081, 3046,  $\nu_{(CH_3)}$  2992, 2947, 2849,  $\nu_{(C=O)}$  1707 (lactone),  $\nu_{(C=N)}$  1608 (imino),  $\nu_{(C=C)ar}$  1580, 1519, 1483,  $\nu_{ar(NO_2)}$  1557, 1340;  $^1H$ -NMR ( $\delta$  ppm): 2.76 (s, 3H,  $CH_3-C=N$ ), 7.3 (m, 1H, C-6-H), 7.4 (dd, 1H, 8-H,  $J_{8,7}=8.3$  Hz,  $J_{8,6}=1.1$  Hz), 7.43 (d, 2H,  $^3J_{3',2'}=^3J_{5',6'}=8.9$  Hz, 3'-H, C-5'-H), 7.6 (dd, 1H, C-5-H,  $^3J_{5,6}=7.8$  Hz,  $^4J_{5,7}=1.7$  Hz), 7.7 (m, 1H, C-7-H), 8.39 (d, 2H,  $^3J_{2',3'}=J_{6'',5''}=8.9$  Hz, C-2'-H, C-6'-H), 15.95 (bs, 1H, OH-C-4); MS: m/z (%): 324 ( $M^+$ , 60), 323 (100), 309 (8), 307 (10), 294 (14), 277 (18), 263 (8), 221 (1), 207 (7), 203 (6), 188 (26), 187 (47), 176 (6), 163 (9), 157 (9), 121 (48), 117 (12), 108 (7), 92 (14), 77 (9), 76 (13), 67 (14), 65 (12); Anal. for  $C_{17}H_{12}N_2O_5$  (324.29) (%): C: 62.96, H: 3.73, N: 8.64; found; C: 62.97, H: 3.77, N: 8.69.

*4-Hydroxy-3-(1-(3-nitrophenylimino)ethyl)-2H-chromen-2-one (14b)*: Yield: 97%; m.p. 209-210 °C. IR (KBr,  $cm^{-1}$ ):  $\nu_{(OH)}$  3416,  $\nu_{(=CH)ar}$  3089, 3062,  $\nu_{(CH_3)}$  2980, 2936, 2853,  $\nu_{(C=O)}$  1705 (lactone),  $\nu_{(C=N)}$  1609 (imino),  $\nu_{(C=C)ar}$  1590, 1538, 1491,  $\nu_{ar(NO_2)}$  1562, 1353;  $^1H$ -NMR ( $\delta$  ppm): 2.61 (s, 3H,  $CH_3-C=N$ ), 7.26 (dd, 1H, 6'-H,  $J_{6',5'}=8.02$  Hz,  $^4J_{6',4'}=1.12$  Hz), 7.3 (m, 1H, C-6-H), 7.34 (s, 1H, C-2'-H), 7.4 (dd,

1H, C-8-H,  $^3J_{8,7}=8.3$  Hz,  $^4J_{8,6}=1.1$  Hz), 7.54 (m, 1H, C-5'-H), 7.6 (dd, 1H, C-5-H,  $^3J_{5,6}=7.8$  Hz,  $^4J_{5,7}=1.7$  Hz), 7.7 (m, 1H, C-7-H), 8.09 (dd, 1H, C-4'-H,  $^3J_{4',5'}=8.5$  Hz,  $^4J_{4',6'}=1.12$  Hz), 16.02 (bs, 1H, OH-C-4); MS: m/z (%): 324 ( $M^+$  69), 323 (83), 307 (100), 294 (14), 263 (61), 249 (3), 234 (3), 220 (3), 207 (7), 188 (26), 187 (67), 176 (6), 163 (15), 157 (12), 145 (5), 138 (5), 130 (8), 121 (78), 117 (19), 103 (9), 92 (27), 77 (15), 76 (29), 67 (25), 65 (18), 51 (6); Anal. for  $C_{17}H_{12}N_2O_5$  (324.29) (%): C: 62.96, H: 3.73, N: 8.64; found: C: 62.96; H: 3.73; N: 8.64.

*3-(1-(Benzylimino)ethyl)-4-hydroxy-2H-chromen-2-one (15b)*: Yield 97%; m.p. 151-152 °C. IR (KBr,  $cm^{-1}$ ):  $\nu_{(OH)}$  3406,  $\nu_{(CH)ar}$  3032, 3012,  $\nu_{(CH_2)}$  2930,  $\nu_{(C=O)}$  1698 (lactone),  $\nu_{(C=N)}$  1612 (imino),  $\nu_{(C=C)ar}$  1586, 1572, 1485;  $^1H$ -NMR ( $\delta$  ppm): 2.64 (s, 3H,  $CH_3-C=N$ ), 3.95 (t, 2H,  $CH_2-N=C$ ), 7.29 (m, 2H, C'-3-H, C'-5-H), 7.26 (m, 1H, C'-4-H), 7.39 (dd, 2H, C-2'-H, C-6'-H,  $^3J_{2',3'}=^3J_{6',5'}=7.7$  Hz,  $^4J_{2',4'}=^4J_{6',4'}=1.1$  Hz), 7.3 (m, 1H, C-6-H), 7.4 (dd, 1H, C-8-H,  $^3J_{8,7}=8.3$  Hz,  $^4J_{8,6}=1.1$  Hz), 7.6 (dd, 1H, C-5-H,  $^3J_{5,6}=7.8$  Hz,  $^4J_{5,7}=1.7$  Hz), 7.7 (m, 1H, C-7-H), 16.01 (bs, 1H, OH-C-4); MS: m/z (%): 293 ( $M^+$ , 100), 292 (14), 276 (15), 262 (2), 236 (3), 202 (66), 189 (6), 173 (10), 156 (19), 144 (14), 131 (9), 121 (16), 107 (12), 106 (6), 91 (20), 77 (9), 65 (15), 51 (4); Anal. for  $C_{18}H_{15}NO_3$  (293.32) (%): C: 73.71, H: 5.15, N: 4.78; found C: 73.73; H: 5.13; N: 4.73.

*5-(1-(4-Hydroxy-2-oxo-2H-chromen-3-yl)ethylideneamino)pentanoic acid (16b)*: Yield 87%; m.p. 169-171 °C; IR (KBr,  $cm^{-1}$ ):  $\nu_{(OH)}$  3418 (coumarin),  $\nu_{(OH)}$  3602-2811 (COOH),  $\nu_{(CH_3,CH_2)}$  2947, 2930, 2875,  $\nu_{(C=O)}$  1721 (COOH),  $\nu_{(C=O)}$  1703 (lactone),  $\nu_{(C=N)}$  1614 (imino),  $\nu_{(C=C)ar}$  1600, 1560, 1487;  $^1H$ -NMR ( $\delta$  ppm): 1.82 (m, 4H, C-2'-H, C'-3-H), 2.46 (t, 2H, C'-4-H,  $^3J_{4',3'}=7.07$  Hz), 2.70 (s, 3H,  $CH_3-C=N$ ), 3.60 (t, 2H, C'-1-H,  $^3J_{1',2'}=7.1$  Hz), 7.3 (m, 1H, C-6-H), 7.4 (dd, 1H, C-8-H,  $^3J_{8,7}=8.3$  Hz,  $^4J_{8,6}=1.1$  Hz), 7.6 (dd, 1H, C-5-H,  $^3J_{5,6}=7.8$  Hz,  $^4J_{5,7}=1.7$ ); MS: m/z (%)=303 ( $M^+$ ); Anal. for  $C_{16}H_{17}NO_5$  (303.11) (%): C: 63.36; H: 5.65; N: 4.62; found C: 63.27; H: 5.68; N: 4.63.

#### 4. Conclusions

New coumarin derivatives have been synthesized using conventional and microwave heating methodology and characterized. The advantages in the use of microwave methodology are shorter reaction times, higher yields and simplified work up procedures for the point of purification of the prepared compounds. All tested compounds are in principal very good potential microorganism growth inhibitors, but their structural diversity resulted in great differences in inhibitory potential. Finally, a nice result of this experiment is that we have synthesized some compounds that have varied and different influence on different classes of bacteria and the fungus *C. albicans*.

#### Acknowledgements

This study was financially supported by a Grant No 142025 from the Serbian Ministry of Science.

## References

1. Lovell, D.P.; Iersel, M.V.; Walters, D.; Price, R.J.; Lake, B.G. Genetic variation in the metabolism of coumarin in mouse liver. *Pharmacogenetics* **1999**, *9*, 239-250.
2. Gregory, J.F.; Emma, K.; Bernadette, S.C.; Denise, A.E. *In vitro* cytotoxic potential and mechanism of action of selected coumarins, using human renal cell lines. *Cancer Lett.* **2002**, *183*, 61-68.
3. Kirkiacharian, S.; Thuy, T.; Sicsic, S.; Bakhchinian, R.; Kurkjian, R.; Tonnaire, T. Structure-activity relationships of some 3-substituted-4-hydroxycooumarins as HIV-1 protease inhibitors. *Farmaco* **2002**, *57*, 703-708.
4. Lafitte, D.; Lamour, V.; Tsvetkov, P.; Markov, A.A.; Deprez, M.; Klich, P.; Moras, D.; Briand, C.; Gilli, R. DNA gyrase interaction with coumarin-based inhibitors-the role of the hydroxybenzoate isopentenyl moiety and the 5'-methyl group of the noviose. *Biochemistry* **2002**, *41*, 7217-7223.
5. Hurry, R.G.; Cortz, C.; Ananthanaraxan, T.P.; Schmolka, S. A new coumarin synthesis and its utilization for the synthesis of polycyclic coumarin compounds with anticarcinogenic properties. *J. Org. Chem.* **1998**, *53*, 3936-3943.
6. Traykova, M.; Kostova, I. Coumarin Derivatives and Oxidative Stress. *Int. J. Pharm.* **2005**, *1*, 29-32.
7. O'Kennedy, R.; Thornes, R.D.; Richard, O.K.; Douglas, T.R. *Coumarins: Biology, Applications and Mode of Action*, John Wiley and Sons, Chichester, UK, 1977.
8. Zahradnik, M. *The Production and Application of Fluorescent Brightening Agents*; John Wiley and Sons: New York, NY, USA, 1992.
9. Maeda, M. *Laser Dyes*; Academic Press: New York, USA, 1994.
10. Kostova, I. Synthetic and natural coumarins as cytotoxic agents, *Curr. Med. Chem. Anticancer Agents* **2005**, *5*, 29-46.
11. Giguere, R.J.; Bray, T.L.; Duncan, S.M.; Majetich, G. Application of commercial microwave ovens to organic synthesis. *Tetrahedron Lett.* **1986**, *27*, 4945-4948.
12. Gedye, R.; Smith, F.; Westaway, H.; Ali, H.; Baldivera, L.; Laberge, L.; Rousell, The use of microwave ovens for rapid organic synthesis. *Tetrahedron Lett.* **1986**, *27*, 279.
13. Ambramovitch, R. A. Applications of microwave energy in organic chemistry. A review. *Org. Prep. Proc. Int.* **1991**, *23*, 683.
14. Bose, A.K.; Manhas, M.S.; Ghost, M.; Raju, V.S.; Tabei, K.; Urbanczyk-Lipowska, Z. Examination of the Perkin Reaction under Microwave Irradiation, *Heterocycles* **1990**, *30*, 741.
15. Villemin, D.; Ben Alloum, A. Potassium fluoride on alumina: condensation of 3-methyl-2-thiono-4-thiazolidinone with aldehydes. Synthesis of  $\alpha$ -thioacrylic acids phosphonothionothiazolidinones. *Phosph. Sulf. Silic.* **1993**, *79*, 33.
16. Puciová, M.; Ertl, P.; Toma, S. Synthesis of ferrocenyl-substituted heterocycles: the beneficial effect of the microwave irradiation. *Collect. Czech Chem. Commun.* **1994**, *59*, 175.
17. Lácová, M.; Chovancová, J.; Veverková, E.; Toma, Š. Microwaves assisted Gabriel synthesis of phthalides. *Tetrahedron* **1996**, *52*, 14995-15006.

18. Hamelin, J.; Bazureau, J.P.; Texier-Boullet, F.; Loupy, A. *Microwaves in Organic Synthesis*; Wiley-VCH: Weinheim, 2002; p. 253.
19. Besson, T.; Brain, C.T.; Lidström, P.; Tierney, J.P. *Microwave-Assisted Organic Synthesis*; Blackwell Publishing: Oxford, 2004; p. 44.
20. Kappe C.O.; Stadler A. *Microwaves in Organic and Medicinal Chemistry*; Wiley-CH: Weinheim, 2005.
21. Vukovic, N.; Sukdolak, S.; Solujic, S.; Milosevic, T. Synthesis and antimicrobial evaluation of some novel 2-aminothiazole derivatives of 4-hydroxy-chromene-2-one. *Arch. Pharm.* **2008**, *341*, 491-496.
22. Sukdolak, S.; Solujić, S.; Vuković, N.; Manojlović, N.; Krstić, Lj. Synthesis of 3-(thiazol-4-yl)-4-hydroxycoumarins. *J. Serb. Chem. Soc.* **2004**, *69*, 319-326.
23. Sukdolak, S.; Solujić, S.; Manojlović, N.; Vuković, N.; Krstić, Lj. Hantzsch reaction of 3-(2-bromoacetyl)-4-hydroxy-chromen-one. *J. Heterocycl. Chem.* **2004**, *41*, 593-596.
24. Sukdolak, S.; Vuković, N.; Solujić, S.; Milošev, M.; Manojlović, N.; Krstić, Lj. Synthesis of new 3-(2-aminothiazol-4-yl)-4-hydroxy-chromen-2-one derivatives. *J. Serb. Chem. Soc.* **2006**, *71*, 6.
25. Vuković, N.; Sukdolak, S.; Solujić, S.; Manojlović, N.; Krstić, Lj. Synthesis of some 3-(2-aminothiazol-4-yl)-4-hydroxycoumarins. In *Proceedings of the XVIII Congress of Chemists and Technologists of Macedonia, Ohrid, 2004*; OCB-15.
26. Vuković, N.; Sukdolak, S.; Solujić, S.; Manojlović, N.; Krstić, L. Synthesis of 3-(thiazol-4-yl)-4-hydroxy Coumarins. *Book of Abstracts of the 4<sup>th</sup> International Conference of the Chemical Societies of the Sout-East European Countries*. 1 Belgrade, 2004; GT-P 139.
27. Bram, G.; Loupy, A.; Villemin, D. *Solid Supports and Catalysts in Organic Chemistry*. Ellis Harwood: London, UK, 1992.
28. Software Mopac 2000, version 11. ChemOffice Ultra, 2006; Cambridge software, **2006**.
29. Software CACHE WorkSystem Pro 6.01. Textronix WorkSystem, **2003**.
30. Software Spartan 2002 for Windows. Wavefunction, Inc., USA, **2002**.
31. Kayser, O.; Koldrziey, H. Antibacterial activity of simple coumarins structural requirements for biological activity. *Z. Naturforsch.* **1999**, *54c*, 169-174
32. Rauchman, B.S.; Tidwell, M.X.; Johnson, J.V.; Roth, B. 2,4,diamino-5-benzyl-pirimidines and analogues as antibacterial agents. *J. Med, Chem.* **1989**, *32*, 1927-1935
33. Ojala, T.; Remes, S.; Haansuu, P.; Vuorela, H.; Hiltunen, R.; Haahtela, K.; Vuorela, P. Antimicrobial activity of some coumarin containing herbal plants growing in Finland. *J. Ethnopharm.* **2006**, *73*, 299-305.
34. Montagner, C.; de Souza, S.; Groposoa, C. Delle Monache, F.; Smania, E.; Smania, A. Antifungal activity of coumarins. *J. Biosci.* **2008**, *63*, 21-28.
35. Elinos-Báez, C.M.; Leon, F.; Sants, E. Effects of coumarin and 7OH-coumarin on bcl-2 and Bax expression in two human lung cancer cell lines *in vitro*. *Cell Biol. Int.* **2005**, *29*, 703-708.
36. Duncana, S.H.; Flinta, H.J.; Stewarta, C.S. Inhibitory activity of gut bacteria against Escherichia coli O157 mediated by dietary plant metabolites. *FEMS Microbiol. Letters* **2006**, *164*, 283-288.
37. Teles, H.L.; Sordi, R.; Silva, G.H.; Castro-Gamboa, I.; da Silva Bolzani, V.; Pfenning, L.H.; Magalhães de Abreu, L.; Costa-Neto, C.M.; Young, M.C.M.; Araújo, Â.R. Aromatic compounds

- produced by *Periconia atropurpurea*, an endophytic fungus associated with *Xylopiia aromatic*. *Phytochemistry* **2006**, *67*, 2686-2690
38. NCCLS. *Performance standards for antimicrobial susceptibility testing 14<sup>th</sup> Int. Supplement M100-S14*. Wayne, PA, USA, **2003**.
  39. Umesha, S; Richardson, P.A.; Kong, P. Hong, C.X. A novel indicator plant to test the hypersensitivity of phytopathogenic bacteria. *J. Microbiol. Meth.* **2008** , *72*, 95-97.
  40. Carter, C.H.; Gaspar, A.J.; Leise, J.M. *Resazurin staining of bacterial colonies on membranes filters*. Fort Dietrick: Frederick, Maryland, USA, 1955.
  41. Beena, J.; Akhila, R.; Emilia, A. Antimicrobial activity and chemical composition of essential oil from *Hedychium coronarium*. *Phytother. Res.* **2007**, *21*, 439-443.
  42. Massada, Y. *Analysis of essential oil by gas chromatography and spectrometry*. Wiley: New York, USA, 1976.
  43. BSAC. *Disc Diffusion Method for Antimicrobial Susceptibility Testing, Version 4*, January 2005.
  44. CLSI. *Performance Standards for antimicrobial Disc Susceptibility Tests Approved Standard-Tenth Edition, M02-A10*, Wayne, PA, **2009**.

*Sample Availability:* Samples of the compounds **2b-15b** are available from the authors.

© 2009 by the authors; licensee Molecular Diversity Preservation International, Basel, Switzerland. This article is an open-access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution license (<http://creativecommons.org/licenses/by/3.0/>).

Article

## Design of Novel 4-Hydroxy-chromene-2-one Derivatives as Antimicrobial Agents

Milan Mladenović \*, Nenad Vuković, Slobodan Sukdolak and Slavica Solujić

Department of Chemistry, Faculty of Science, University of Kragujevac, P.O. Box 60, Serbia;  
E-Mails: nvukovic@kg.ac.rs (N.V.); duda@kg.ac.rs (S.S.); ssolujic@kg.ac.rs (S.S.)

\* Author to whom correspondence should be addressed; E-Mail: mmladenovic@kg.ac.rs;  
Tel.: +381-34-336-223, Fax: +381-34-336-040.

Received: 23 April 2010; in revised form: 31 May 2010 / Accepted: 7 June 2010 /

Published: 11 June 2010

---

**Abstract:** This paper presents the design of novel 4-hydroxy-chromene-2 one derivatives, based on previously obtained minimal inhibitory concentration values (MICs), against twenty four microorganism cultures, Gram positive and negative bacteria and fungi. Two of our compounds, **3b** (MIC range 130–500 µg/mL) and **9c** (31.25–62.5 µg/mL), presented high potential antimicrobial activity. The compound **9c** had equal activity to the standard ketoconazole (31.25 µg/mL) against *M. mucedo*. Enlarged resistance of *S. aureus*, *E. coli* and *C. albicans* on the effect of potential drugs and known toxicity of coumarin antibiotics, motivated us to establish SAR and QSAR models of activity against these cultures and correlate biological activity, molecular descriptors and partial charges of functional groups to explain activity and use for the design of new compounds. The QSAR study presents essential relation of antimicrobial activity and dominant substituents, 4-hydroxy, 3-acetyl and thiazole functional groups, also confirmed through molecular docking. The result was ten new designed compounds with much improved predicted inhibition constants and average biological activity.

**Keywords:** 4-hydroxy-coumarins; antimicrobial activity; QSAR; molecular docking; design

---

## 1. Introduction

Coumarins are known potential growth inhibitors of bacteria and fungi, where both natural and synthetic coumarins inhibit growth of common microorganisms *Candida albicans*, *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* [1–5]. Some coumarin polyacetylene derivatives have antimycobacterial activity against *Mycobacterium fortituum* [6], while others inhibit IQ induced mutation in *S. typhimurium* TA98 [7]. Plant coumarins present antimicrobial potential too [8,9].

The nature of substituents define coumarin activity, and coumarin substitution in positions 3 and 7 is dominant for antimicrobial activity [10]. Our interest is in 3-acetyl and 3-thiazole 4-hydroxy-coumarin derivatives. Beside the known antimicrobial activity [11] of 3-acetyl coumarin derivatives, the presence of thiazole functional group indicates antihelmintic, antibiotic and immunosuppressant activity of a potential drug [12].

While the exact mechanism of coumarin-based microorganism growth inhibition is not yet certain, the 24 kDa N-terminal domain of DNA gyrase B subunit (p24), an enzyme that unwinds double stranded DNA of microorganisms, causing the supercoiling of the DNA, is recognized as the molecular target of natural occurring coumarins like novobiocin and clorobiocin [13] that inhibit the ATPase activity of the B subunit. These drugs have a 4-hydroxycoumarin core in common, which is substituted at the 7 and 3 positions [13]. In p24/novobiocin complex, coumarin ring forms only two hydrogen bonds, both with Arg136 interacting with carbonyl and lactone oxygen [13], while the main interactions occur between p24 and novobiose residue [13].

As a result of their varied biological activity, qualitative (SAR) and quantitative structural-activity relationship (QSAR) studies of isolated and synthetic coumarin derivatives are widespread nowadays. Computational studies, which are principals of QSAR, had been performed regarding the molecular lipophilicity [14] and cytotoxic activity [15] of different 4-hydroxycoumarin derivatives. The antimicrobial activity against *S. aureus* and *C. albicans* [16] of some 3-acyl-4-hydroxy and 3-nitrocoumarins has been explained by QSAR, using both semi empirical and density functional theory (DFT) based calculations. Some thiazole coumarin derivatives and their activity against *C. albicans*, *E. coli* and *S. aureus* were the subject of QSAR determination, too [12].

Due to the mentioned activity of carbonyl and thiazole functional groups, we used a synthesized series of carbonyl, carboxyl and thiazole coumarin derivatives (Scheme 1) [3,4] and evaluated their activity through calculated molecular properties and partial atomic charges of potential functional groups, in attempt to explain their bioactivity as antimicrobial agents against Gram positive and negative bacteria and fungus.

Our interest in SAR and QSAR studies of synthetic coumarins started with the examination of the antimicrobial activity of our derivatives [3,4] whereby they presented growth inhibition potential on a wide spectrum of cultures. We decided to perform QSAR evaluation of cultures like *Staphylococcus aureus* (ATCC 25925), *Escherichia coli* (ATCC 25922) and *Candida albicans* (ATCC 10259), for the future design of new more power derivatives. Certain compounds, **3b** [3] and **9c** [4] that displayed both enhanced antibacterial and antifungal activities, can be the base for lead optimization and simple but efficient design of new compounds.

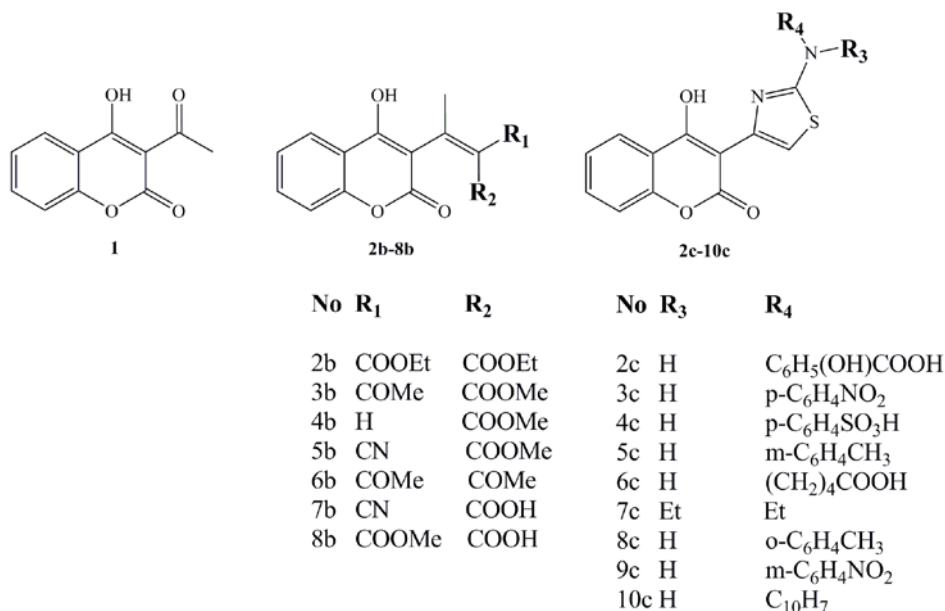


## 2. Results and Discussion

### 2.1. Antimicrobial activity

SAR and QSAR methodology were used to explain the antimicrobial activity of the synthesized coumarin derivatives, **1-10c** (Figure 1), on a wide spectrum of the cultures.

**Figure 1.** Synthesized 4-hydroxy-coumarin derivatives.



**Table 1.** Antimicrobial activity of synthetic coumarin derivatives.

Comp.	<i>S. aureus</i>		<i>E. coli</i>		<i>C. albicans</i>	
	MIC <sup>a</sup> values of tested compounds (10 <sup>-6</sup> g/mL) (-log MIC)					
	Experimental	Calculated	Experimental	Calculated	Experimental	Calculated
<b>1</b>	90 ± 0.35 (4.046)	103 (3.984)	190 ± 0.35 (3.721)	195 (3.708)	90 ± 0.05 (4.046)	92 (4.035)
<b>3b</b>	130 ± 0.22 (3.886)	156 (3.806)	130 ± 0.34 (3.886)	132 (3.878)	130 ± 0.15 (3.886)	130 (3.885)
<b>4b</b>	130 ± 0.50 (3.886)	222 (3.652)	130 ± 0.25 (3.886)	129 (3.888)	250 ± 0.25 (3.602)	132 (3.878)
<b>6b</b>	130 ± 0.45(3.886)	116 (3.932)	250 ± 0.55(3.602)	255 (3.592)	130 ± 0.15 (3.886)	129 (3.889)
<b>7b</b>	130 ± 0.35 (3.886)	112 (3.947)	500 ± 0.35 (3.301)	519 (3.284)	500 ± 0.35 (3.301)	124 (3.908)
<b>8b</b>	130 ± 0.26 (3.886)	136 (3.865)	130 ± 0.35 (3.886)	117 (3.932)	130 ± 0.55 (3.886)	130 (3.886)
<b>2c</b>	125 ± 0.25 (3.904)	62.5 (4.206)	250 ± 0.55 (3.602)	491 (3.309)	62.5 ± 0.55 (4.204)	137 (3.862)
<b>3c</b>	125 ± 0.25 (3.904)	60 (4.217)	62.5 ± 0.25 (4.204)	62.5 (4.204)	62.5 ± 0.55 (4.204)	145 (3.893)
<b>4c</b>	62.5 ± 0.29 (4.204)	62.5 (4.204)	62.5 ± 0.10 (4.204)	62.6 (4.203)	62.5 ± 0.15 (4.204)	63 (4.205)
<b>5c</b>	62.5 ± 0.24 (4.204)	33.5 (4.475)	125 ± 0.50 (3.904)	124 (3.906)	31.25 ± 0.10 (4.505)	63 (4.205)
<b>6c</b>	250 ± 0.35 (3.602)	66 (4.179)	125 ± 0.35 (3.904)	125 (3.902)	62.5 ± 0.15 (4.204)	234 (3.630)
<b>7c</b>	250 ± 0.55 (3.602)	26.2 (4.581)	125 ± 0.45 (3.904)	131 (3.884)	31.25 ± 0.55 (4.505)	245 (3.610)
<b>8c</b>	250 ± 0.36 (3.602)	121 (3.914)	250 ± 0.12 (3.602)	214 (3.670)	125 ± 0.15 (3.904)	262 (3.582)
<b>9c</b>	31.25 ± 0.21 (4.505)	30 (4.526)	62.5 ± 0.09 (4.204)	63.1 (4.200)	31.25 ± 0.25 (4.505)	31 (4.508)
<b>10c</b>	125 ± 0.38 (3.903)	69.5 (4.158)	125 ± 0.25 (3.904)	141 (3.851)	62.5 ± 0.55 (4.204)	118 (3.928)
<b>S</b>	31.25 ± 0.07		31.25 ± 0.35			
<b>K</b>					1.95 ± 0.05	

<sup>a</sup> Results are mean values SD from at least three experiments; <sup>b</sup>S=streptomycin; <sup>c</sup>K=ketoconazole.

Among the tested compounds, initial coumarin **1** and two structurally different groups of derivatives, first **2-8b**, and second **2-10c**, compounds **3b** and **9c** demonstrated enhanced activity, with MICs in the range of 130–500 and 31.25–62.5 µg/mL, respectively, due to influence of the C-3 coumarin scaffold, acetyl, carboxymethyl and thiazole-*m*-nitro substituents. The activities of **3b** and **9c** are explained by SAR, QSAR and molecular docking study on DNA gyrase, suggesting them as promising structures for lead optimization and design of new compounds. The carbonyl, carboxyl derivatives **1-8c**, generally, did not presented the expected activity, but their SAR and QSAR studies emphasize the role of coumarin core in activity.

## 2.2. SAR

As presented by Table 1, compounds **2-10c** (MIC range 31.25–500 µg/mL) [4] presented better antimicrobial activity than the compounds **1-8b** (MIC range 90–940 µg/mL) [3]. The main difference in the biological activity of compounds is caused by the presence of thiazole function in **2-10c** followed up with the great dissimilarity in MIC values. The basic compound **1** presented medium activity, with a MIC value of 90 µg/mL for *S. aureus* and *C. albicans*, and 190 µg/mL for *E. coli*. Regarding the overall activity of the first set of synthesized compounds (MIC 130–500 µg/mL), **3b** is the most active one, presenting the same activity due to attendance of carbonyl and carboxyl functions, but lower than **1** against *S. aureus* and *C. albicans* (130 µg/mL), and better against *E. coli* and *M. lysodeikicus* (130 µg/mL). Compared with the reference antibiotics, the activity of **3b** is still much reduced. The insertion of a 2-aminothiazole pharmacophore in the coumarin moiety overcame the low activity of compounds **1-8b** and increased it several times. The most active compound, **9c**, an *m*-nitro derivative, presented an equal MIC value to the reference antibiotic on *M. mucedo* (31.25 µg/mL).

## 2.3. QSAR

The QSAR analysis was performed correlating the antimicrobial activity against *S. aureus* (ATCC 25925), *E. coli* (ATCC 25922) and *C. albicans* (ATCC 10259) presented in Table 1, with various physico-chemical parameters (Table 2) and partial charges (Table 3), to reveal predictions for the lead optimization in the training set of compounds of newly synthesized coumarins [3,4].

**Table 2.** Relevant calculated physico-chemical parameters of synthesized 4-hydroxy-coumarin derivatives.

Comp.	log <i>P</i>	MR	lipole	HOMO	LUMO	CAA	CMA	CSEV	ovality
<b>1</b>	-0.529	51.062	2.161	-9.989	-1.490	335.170	156.104	124.411	1.368
<b>3b</b>	-1.318	75.494	1.622	-10.015	-1.562	466.977	236.476	203.327	1.590
<b>4b</b>	-0.035	66.062	1.646	-9.958	-1.537	424.305	205.095	165.182	1.495
<b>6b</b>	-1.679	75.277	1.905	-9.977	-1.453	444.049	223.344	192.322	1.561
<b>7b</b>	-1.765	67.538	2.645	-10.040	-1.646	424.466	207.570	171.656	1.482
<b>8b</b>	-1.709	66.570	2.507	-10.037	-1.694	426.269	208.634	173.406	1.512
<b>2c</b>	1.216	96.238	0.557	-9.042	-1.449	566.431	291.664	246.339	1.645
<b>3c</b>	3.129	95.320	2.244	-9.003	-1.954	542.789	279.873	233.719	1.604
<b>4c</b>	0.702	65.468	1.415	-8.999	-1.621	572.035	296.286	249.537	1.654

Table 2. Cont.

<b>5c</b>	2.904	95.722	2.513	-8.900	-1.135	521.823	269.577	225.940	1.608
<b>6c</b>	1.921	88.488	0.281	-8.923	-0.936	552.855	279.213	230.128	1.680
<b>7c</b>	1.856	84.807	1.112	-8.890	-0.950	478.322	244.811	208.372	1.588
<b>8c</b>	3.380	93.722	2.552	-8.913	-1.072	521.339	268.518	225.738	1.604
<b>9c</b>	3.129	95.320	2.101	-8.972	-1.759	538.849	281.111	237.198	1.614
<b>10c</b>	3.603	104.966	3.169	-8.866	-1.231	558.547	292.497	247.999	1.641

Table 3. Partial atomic charges of the compounds **1-8b** and **2-10c**.

Partial atomic charges of the compounds									
Functional groups	<b>1</b>	<b>3b</b>	<b>4b</b>	<b>6b</b>	<b>7b</b>	<b>8b</b>			
4-OH	-0.615	-0.646	-0.637	-0.648	-0.614	-0.625			
O-lactone	-0.523	-0.523	-0.522	-0.522	-0.515	-0.515			
CO-lactone	-0.474	-0.491	-0.493	-0.491	-0.473	-0.464			
CO	-0.456	-0.609	-0.604	-0.613		-0.531			
		0.221	0.235	0.225					
CO-carboxyl		-0.743	-0.747	-0.745	-0.456	-0.488			
OH-carboxyl		-0.507	-0.492		-0.579	-0.586			
CN		-0.452	-0.463		-0.475				
Functional groups	<b>2c</b>	<b>3c</b>	<b>4c</b>	<b>5c</b>	<b>6c</b>	<b>7c</b>	<b>8c</b>	<b>9c</b>	<b>10c</b>
4-OH	-0.638	-0.644	-0.204	-0.617	-0.675	-0.671	-0.646	-0.637	-0.648
O-lactone	-0.522	-0.520	-0.114	-0.599	-0.531	-0.532	-0.523	-0.522	-0.522
CO-lactone	-0.492	-0.490	-0.195	-0.499	-0.515	-0.516	-0.491	-0.493	-0.491
N-thiazole	-0.582	-0.604	-0.261	-0.681	-0.673	-0.659	-0.609	-0.604	-0.613
S-thiazole	0.230	0.244	0.296	0.458	0.261	0.259	0.221	0.235	0.225
N-amine	-0.750	-0.744	-0.262	-0.753	-0.610	-0.419	-0.743	-0.747	-0.745
CO-carboxyl	-0.467				-0.468				
OH-carboxyl	-0.582				-0.563				
OH-phenyl	-0.638								
N-nitro		-0.374						-0.386	
O-nitro		-0.400 <sup>b</sup>						-0.392 <sup>b</sup>	
		-0.401 <sup>6</sup>						-0.386 <sup>b</sup>	
S-SO <sub>3</sub> H			0.758						
O-SO <sub>3</sub> H			-0.282 <sup>c</sup>						
			0.259 <sup>c</sup>						
OH-SO <sub>3</sub>			-0.256						

<sup>a</sup>Two carbonyl groups in compound **6b**; <sup>b</sup>Two O-nitro atoms in compounds **3c** and **10c**; <sup>c</sup>Two O-SO<sub>3</sub>H atoms in compound **4c**.

Although this set is small, it provides QSAR equations that could be statistically significant for the activity against *S. aureus*, *E. coli* and *C. albicans*. The results of regression analysis are shown in Eqns. (1), (2) and (3) and by Figures 2(a) and (b) and 3, where  $n$  is number of molecules,  $r$  is correlation,  $F$  is Fisher's significance factor and  $s$  is standard deviation. Cross-validation resulted with  $Q^2$  as the square of predictive power of coefficient and s-PRESS as predictive residual sum of squares.

The **model 1** defines the *N*-thiazole atom as important in the interaction of coumarin with bacteria. For the activity against *S. aureus*, the solubility factor is irrelevant. Regarding the **model 2**, besides the

*N*-thiazole atom, the antimicrobial activity against *E. coli* depends on interactions with the 4-OH group and *S*-thiazole atom, with solubility and LUMO energy as important factors. The solubility factor is expected referring to Table 2, for it the training set presents wide range in solubility, from the most hydrophilic (-1.765) to the most hydrophobic (3.603) compounds.

The 4-OH and *S* functional groups do not take the same part in antibacterial activity of **9c** in **model 2**, with correlation factors between biological activity and charge  $r_{4\text{-OH}} = 0.603$  and  $r_{\text{S}} = 0.942$ . The LUMO energy factor suggests that charge transfer might be involved in the mechanism of action [17]. As mentioned, the main factor in the activity is the *N*-thiazole atom, with a correlation  $r = 0.674$  of charge and antimicrobial activity of **9c**. Both QSAR equations (1) and (2) for activity against *S. aureus* and *E. coli* are statistically very significant with  $F=104.2987$ ,  $r$  (99.7%) [Figure 1 (a)] and  $F=28.8394$ ,  $r$  (99,5%) [Figure 1 (b)], respectively.

QSAR model for activity against *S. aureus* (**model 1**):

$$-\text{Log MIC} = 18.2669(\pm 2.82) - 0.0701(\pm 0.01) \times \text{MR} - 0.3670(\pm 0.03) + 1.0871(\pm 0.30) \times \text{HOMO} - 0.1682(\pm 0.01) \times \text{CAA} - 0.5095(\pm 0.02) \times \text{CMA} - 7.8116(\pm 0.76) \times \text{O-lactone} + 1.6749(\pm 0.44) \times \text{N-thiazole} - 1.4266(\pm 0.23) \times \text{S} - 0.2159(\pm 0.01) \times \text{CSEV} \quad (1)$$

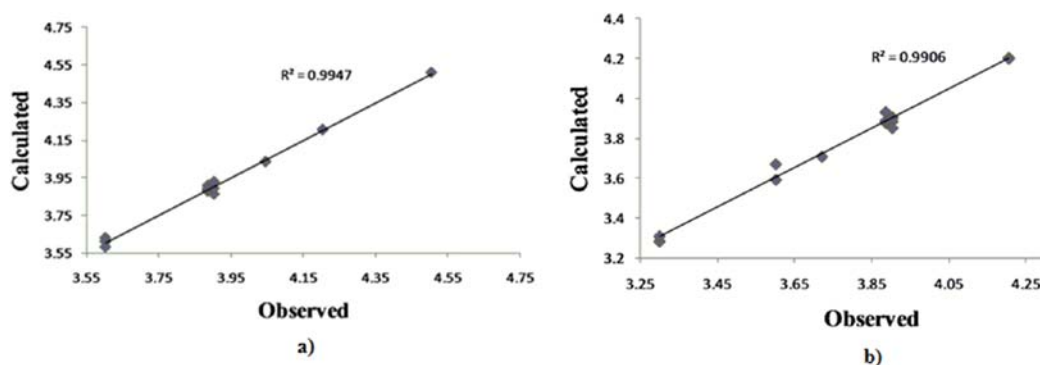
$$n=15 \quad r=0.997 \quad s=0.03 \quad F=104.2987 \quad Q^2=0.995 \quad s\text{-PRESS}=0.005$$

QSAR model for activity against *E. coli* (**model 2**):

$$-\text{Log MIC} = 18.5685(\pm 1.95) + 0.9195(\pm 0.12) \times \log P - 0.1766(\pm 0.04) \times \text{lipole} - 0.8233(\pm 0.15) \times \text{virtual log } P + 1.0722(\pm 0.12) \times \text{LUMO} - 0.0270(\pm 0.01) \times \text{CAA} + 7.0623(\pm 1.39) \times \text{4-OH} - 8.4340(\pm 1.84) \times \text{CO-lactone} - 1.4566(\pm 0.69) \times \text{NH} + 1.7931(\pm 0.81) \times \text{N-thiazole} - 0.6662(\pm 0.47) \times \text{S} - 22.4376(\pm 1.83) \times \text{ovality} \quad (2)$$

$$n=15 \quad r=0.995 \quad s=0.059 \quad F=28.8394 \quad Q^2=0.991 \quad s\text{-PRESS}=0.011$$

**Figure 2.** Plot of observed vs. calculated – log MIC values of the training set compounds obtained from a) Equation (1), b) Equation (2).

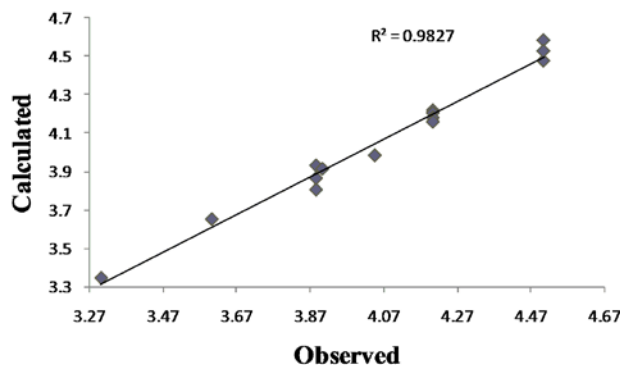


QSAR model for activity against *C.albicans* (**model 3**):

$$-\text{Log MIC} = -3.3032(\pm 1.43) + 0.9667(\pm 0.10) \times \log P - 1.1485(\pm 0.13) - 0.5781(\pm 0.10) \times \text{LUMO} - 0.054(\pm 0.01) \times \text{CAA} + 0.0713(\pm 0.01) \times \text{CMA} - 0.6944(\pm 0.24) \times \text{4-OH} + 1.2423(\pm 0.31) \times \text{S} + 10.2506(\pm 1.41) \times \text{ovality} \quad (3)$$

$$n=15 \quad r=0.991 \quad s=0.068 \quad F=42.6548 \quad Q^2=0.983 \quad s\text{-PRESS}=0.028$$

**Figure 3.** Plot of calculated vs. observed – log MIC values of the training set compounds obtained from Equation (3).



Antifungal activity against *C. albicans*, equation Eqn. (3), can be explained by influence of solubility [18], electronic (LUMO) and steric (CMA) parameters. The positive impact of the *S*-thiazole atom on QSAR **model 3** confirms the thiazole group as the most important one in the coumarin derivatives' activity. The lower (**model 3**) or even no (**model 1**) influence of 4-OH might indicate a different coumarins-fungus mechanism of interaction compared to the coumarin-bacteria one (**model 2**). The goodness-of-fit of equation (3) (Figure 2) is very significant, possessing a high  $r$  (99.1%) and a small  $s$  (0.068) with an overall  $F$  test value of 42.6548 at the significant level of  $p < 0.05$ . The correlation matrix of biological activity with molecular descriptors is presented in Table 4.

**Table 4.** Correlation matrix of biological activity with molecular descriptors.

	<sup>a</sup> D1	D2	D3	D4	D5	D6	D7	D8	D9	D10	D11	D12	D13	D14	<sup>b</sup> C1	C2	C3
<b>D1</b>	1.00																
<b>D2</b>	0.43	1.00															
<b>D3</b>	0.35	0.99	1.00														
<b>D4</b>	0.39	0.35	0.25	1.00													
<b>D5</b>	0.77	0.54	0.46	0.45	1.00												
<b>D6</b>	0.64	0.59	0.43	0.46	0.98	1.00											
<b>D7</b>	0.35	0.43	0.47	0.44	0.96	0.96	1.00										
<b>D8</b>	0.56	0.37	0.11	0.78	0.37	0.19	0.23	1.00									
<b>D9</b>	0.12	0.06	0.66	0.12	0.54	0.43	0.46	0	1.00								
<b>D10</b>	0.28	0.95	0.89	0.23	0.62	0.61	0.22	0	0.94	1.00							
<b>D11</b>	0.11	0.72	0.68	0.27	0.63	0.64	0.58	0	0.36	0.44	1.00						
<b>D12</b>	0.29	0.47	0.34	0.61	0.15	0.15	0.19	0	0.18	0.19	0.36	1.00					
<b>D13</b>	0.36	0.44	0.95	0.25	0.31	0.37	0.31	0	0.62	0.55	0.34	0.95	1.00				
<b>D14</b>	0.13	0.78	0.66	0.14	0.72	0.74	0.64	0.15	0.73	0.78	0.66	0.23	0.47	1.00			
<b>C1</b>	0.45	0.52	0.94	0	0.44	0.53	0.57	0	0	0.84	0.32	0.36	0.96	0.66	1.00		
<b>C2</b>	0.77	0	0	0.88	0.94	0.51	0.53	0.96	0.54	0.26	0.58	0.21	0.19	0.34	0.55	1.00	
<b>C3</b>	0.75	0	0	0.96	0.12	0.35	0.15	0.93	0.24	0	0	0	0	0.1	0.52	0.75	1.00

<sup>a</sup>D1 log  $P$ ; D2 MR; D3 HOMO; D4 LUMO; D5 CAA; D6 CMA; D7 CSEV; D8 ovality; D9 4-OH; D10 O-lactone; D11 CO-lactone; D12 NH; D13 N-thiazole; D14 S; <sup>b</sup>C1 *S. aureus*; C2 *E. coli*; C3 *C. Albicans*.

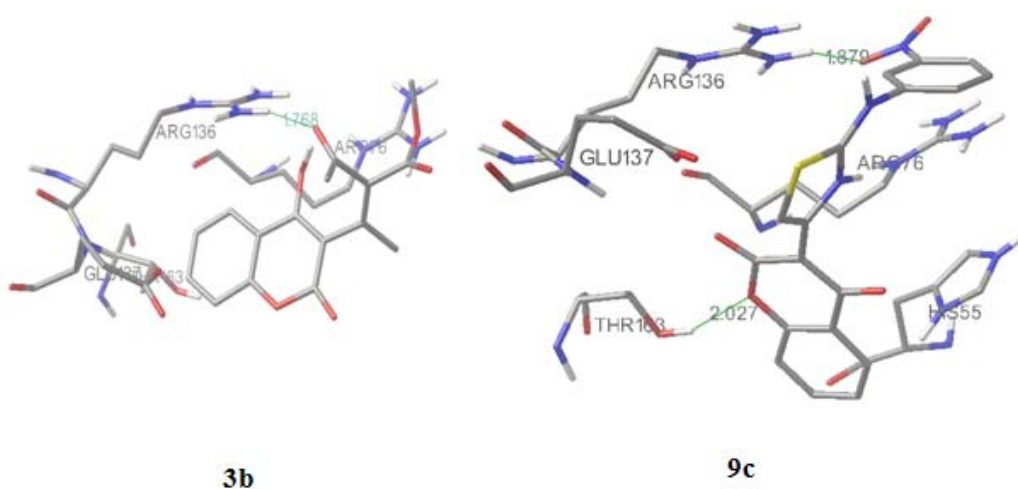
The linear regression analysis of the activity of the most active compound, **9c**, presents the correlation of *m*-nitro group and biological activity with the value of  $r = 0.902$ . This value is the highest correlation coefficient for partial charge found in this study and it overlaps with the microbiology and SAR results. The QSAR results are in high correlation with SAR and they confirmed the SAR statement that the thiazole ring is the key part for antimicrobial activity. The absence of carbonyl and carboxyl functions (compounds **1-8b**) in the QSAR equations verified them as particularly unimportant for antimicrobial activity.

#### 2.4. Molecular docking

Crystallographic data of the binding of novobiocin and chlorobiocin show four hydrogen bonds between novobiocin and p24 (Asn46, Gly50, Asp73), but only two between the enzyme and coumarin ring formed by lactone part and Arg136 [13]. We performed the molecular docking of **1**, **3b** and **9c** to obtain interactions of our derivatives in active site of 24 kDa N-terminal domain of DNA gyrase B subunit and to explain the activity of the compounds, aiming interactions of C-3 scaffolds with Arg136 when grid box was set to cover the crucial amino acids for coumarin binding, *i.e.*, Arg76, Pro79 and Arg136 [13].

Compound **1** forms with Arg136 only one hydrogen bond, between the lactone O atom of the coumarin ring and the NH<sub>2</sub> guanido atom of Arg136. The activity of **3b** (Figure 4) is expressed also with formation of one hydrogen (1.768 Å) bond with Arg136, formed by the carbonyl oxygen of the scaffold. Also, the guanido carbon forms with the C-5 coumarin carbon a pi-cation interaction. Predicted inhibition constant for **3b**,  $K_i = 1.5$  mM *versus* the inhibition constant of **1**,  $K_i = 3.67$  mM, and the role of residue confirm SAR and QSAR interpretations of the higher activity of **3b** related to **1**.

**Figure 4.** Molecular docking of compounds **3b** and **9c**.



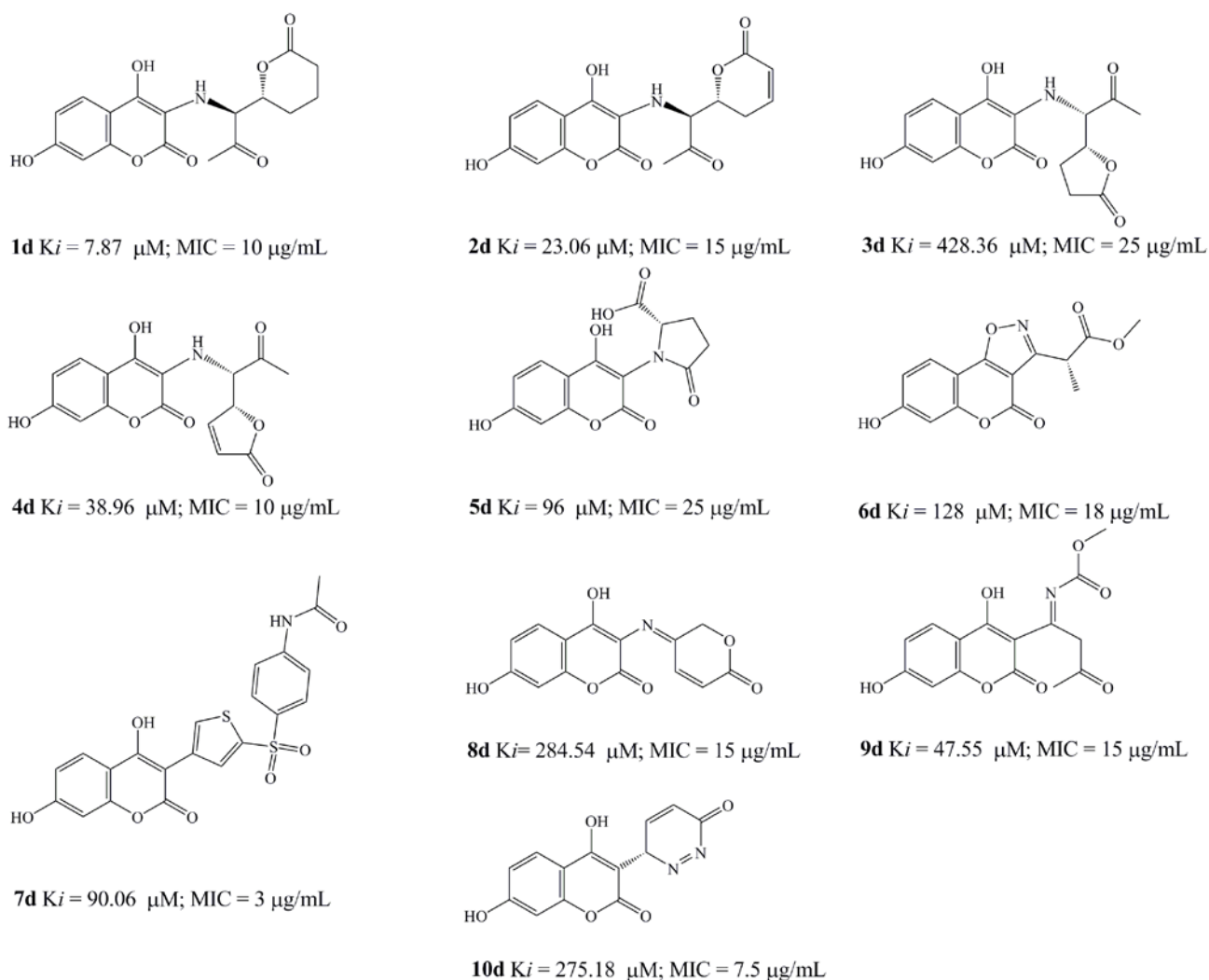
The most active compound, **9c** (Figure 3), forms two hydrogen bonds, making the great difference in overall activity. The first one (2.027 Å) is between the lactone O and an new amino acid, Thr163, opposite to **1** and **3b**. The second one (1.879 Å) is formed by the *m*-NO<sub>2</sub> oxygen atom and Arg136, which is the final conformation of the high influence of thiazole-*m*-nitro system on activity of **9c**, also

presented by SAR and QSAR. The sulfur from the thiazole ring forms ionic interactions with Gly 137. The orientations of Glu50, Arg76 and Pro79 around **1**, **3b** and **9c** are similar to the ones around novobiocin, mostly forming hydrophobic interactions [13].

### 2.5. Design of novel coumarin derivatives

Based on obtained SAR, QSAR and molecular docking results, we designed ten new compounds with high improved predicted  $K_i$  values and average antimicrobial activity. The design of new compounds, with the aim to remove the novobiocin residue from antimicrobial activity of the coumarins and passing it on the C-3 scaffolds, had been performed respecting simple principles: introduction of hydroxyl group in C-7 position of the coumarin core, replacement of inactive **b** compounds 3-(prop-1-en-2-yl) function by nitrogen or sulfur more active residues, activation if inactive of carbonyl and carboxyl residues and retention or further modification of active pharmacophores learned by SAR and computational studies.

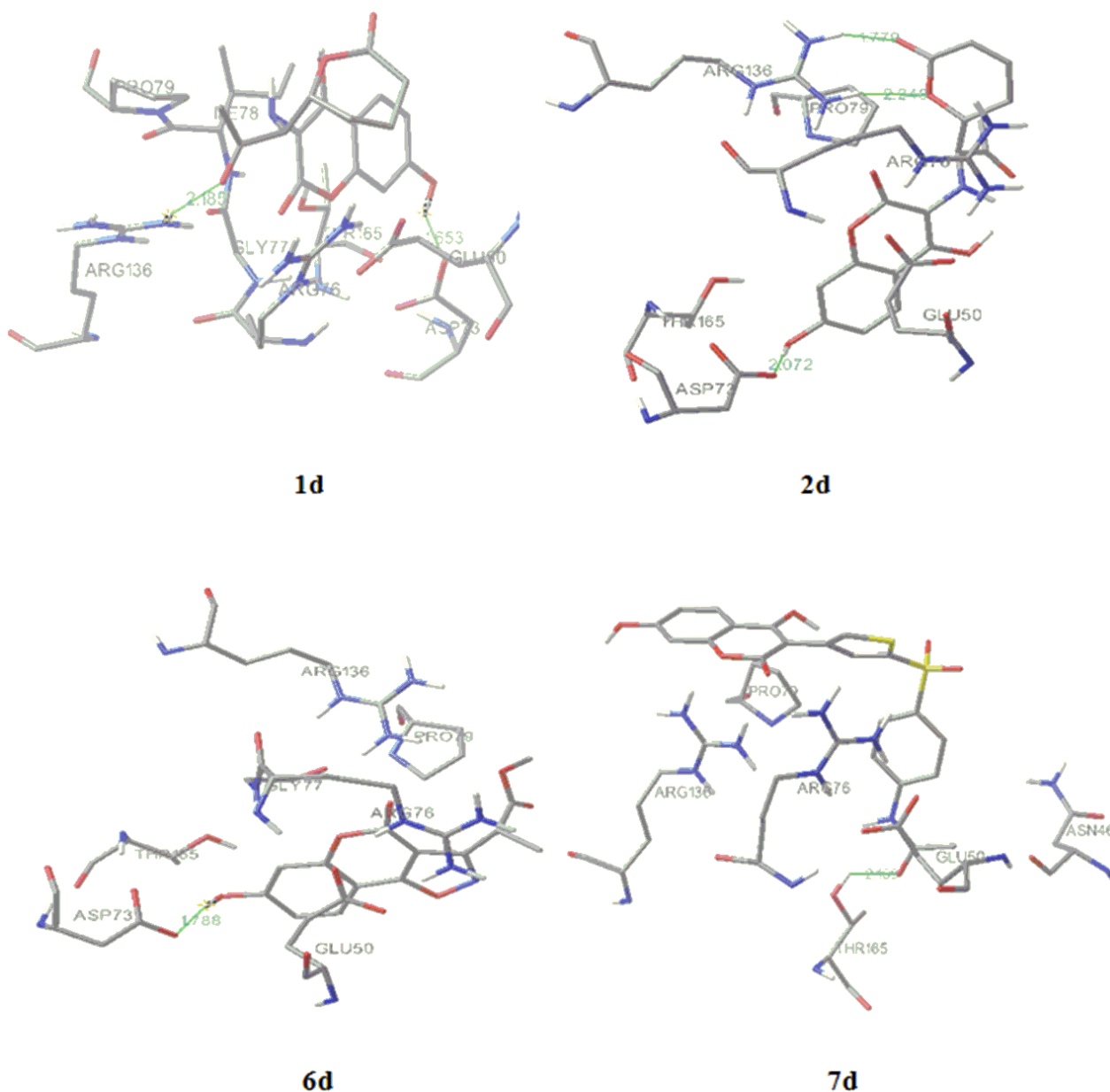
**Figure 5.** Designed 4-hydroxycoumarin derivatives.



All the structures were optimized and docked according to described methods (Figure 6). The range of predicted average MIC was 3–25  $\mu\text{g/mL}$ , far below the activity obtained by experiments. The most

active designed compound (Figure 6), **7d**, with predicted  $K_i = 90.06 \mu\text{M}$  and  $\text{MIC} = 3 \mu\text{g/mL}$  forms with p24 one hydrogen bond (green line on Figure 6) between the *p*-N-acetyl oxygen and Thr165 (2.169 Å). Following compound, **1d**,  $K_i = 7.87 \mu\text{M}$  and  $\text{MIC} = 10 \mu\text{g/mL}$ , forms two hydrogen bonds with enzyme, between the carbonyl residue and Arg136 (2.185 Å) and between 7-OH and Asp73 (1.653 Å). The increased number of hydrogen bonds formed by **2d**, *i.e.*, one 7-OH-Asp73 (2.072 Å) interaction and two interactions between Asp136 and external lactone ring oxygen atoms (1.779; 2.244 Å), could improve drug activity ( $K_i = 23.06 \mu\text{M}$  and  $\text{MIC} = 15 \mu\text{g/mL}$ ). The formation of hydrogen bonds between introduced 7-hydroxyl group (**5d**;  $K_i = 96 \mu\text{M}$  and  $\text{MIC} = 25 \mu\text{g/mL}$  and **6d**;  $K_i = 128 \mu\text{M}$  and  $\text{MIC} = 18 \mu\text{g/mL}$ , 1.788 Å) and Asp73 and electrostatic interaction between the oxazole ring and Arg136 (**6d**) enlarge the antimicrobial potential, while only bonding 7-OH-Arg136 cannot explain high activity at compound **10d**. The activity of **3d** ( $K_i = 428.36 \mu\text{M}$  and  $\text{MIC} = 25 \mu\text{g/mL}$ ) would depend of hydrogen bond ability of coumarin core.

**Figure 6.** Molecular docking of the most active designed compounds **1d**, **2d**, **5d** and **7d**.





### 3. Experimental

#### 3.1. Synthesis

In our previous papers, synthesis and pharmacological evaluation of the group of 16 substituted potential anticoagulant chromene-2*H*-one derivatives **1-10c** were reported (Scheme 1) [3,4], underlining that two different synthetic approaches used, microwave assisted Knoevenagel condensation (compounds **1-8b**) [3] and Hantzsch reaction (compounds **2-10c**) [4]. Both methods are efficient in functionalisation of C-3 position in the coumarin moiety. Compounds were characterized by elemental analyses (C, H, N, O and S) with determination of molecular weights by mass spectroscopy (MS). Structural characterisation was performed by infrared spectroscopy (IR), <sup>1</sup>H-Nuclear Magnetic Resonance (NMR) and MS spectra.

#### 3.2. Assay for *in vitro* antimicrobial activity

The antimicrobial activity of synthesized coumarins was measured using the microdilution two-fold method in Mueller-Hinton broth for bacteria and Saboraud dextrose broth for fungi [19,20] at pH = 7.4. Antimicrobial targets were both Gram positive and negative bacteria and fungi, using wide range of ATCC cultures and clinical isolates [3,4], using Resazurin solution (0.02 mL of 0.05% concentration) [21] for determination of MICs (Table 1).

#### 3.3. Molecular modeling

A data set of 15 compounds has been taken from published articles [3,4]. Preliminary molecular descriptor characterisation of compounds **1-8b** has been performed [3] by the PM3 semiempirical method, but those values were not used in this paper. The initial structures were built in Spartan 2002 for Windows [22] then imported in MacroModel [23] to adjust and minimize atom and bond types with the OPLS 2005 force field parameters. The generalized Born/surface area (GB/SA) continuum non solvent model was used to simulate vacuum environment, consequently due to insolubility of the tested compounds in water, but to provide proper optimization according to experiment conditions [3,4]. An extended non-bonded cutoff (van der Waals 8 Å; electrostatic 20 Å) was used. Systematic conformational search on each molecule was performed by 500 step Monte Carlo conformational analysis, 100 steps per rotatable bond, with the energy cutoff generally set to  $\Delta E = 10$  kJ/mol above the lowest energy conformation.

Further, the geometry optimization was performed by MOPAC PM6 [24] Hamiltonian semi empirical method imported in Vega ZZ [25], by fixing gradient norm as 0.01, with  $\epsilon = 24.3$  and  $\epsilon = 48.0$ , in order to include solubility of compounds **1-8b** in ethanol [3], and **2-10c** in DMSO [4]. The most stable structures, with determined final heat of formation, were selected as representative conformations in calculation of molecular descriptors in this study.

The CS Gaussian 03 program [26] by density functional theory (DFT) using the B3LYP hybrid functional including 6-31G (d) basis with Mulliken population analysis was applied for partial atomic charge computations of the optimized models.

The virtual log *P*, Broto log *P*, lipole, molar refractivity, dipole and ovality of all single molecules were evaluated by VegaZZ software. Steric descriptor values like Connolly Accessible Area (CAA), Connolly Molecular Area (CMA) and Connolly Solvent-Excluded Volume (CSEV) [12,27], were calculated with Chem3D Ultra 10.0/ ChemOffice 2006 software package [28].

Single and multivariable linear regression fits were estimated between –Log MIC values and molecular descriptors and calculated partial charges. Good correlation between biological activity and partial charge indicates functional group as the active one [29]. Origin Pro 8 software [30] used to generate QSAR models by MRA. Cross validation was performed using leave-one-out method.

### 3.4. Molecular docking

The crystal structure of *E.coli* 24 kDa N-terminal domain of DNA gyrase B subunit in complex with clorobiocin from the Brookhaven Protein Data Bank (PDB ID code: 1KZN) was used in docking experiments [31]. Crystallographic waters and inhibitor which were not hydrogen-bonded to the enzyme were removed with Chimera software [32]. Initially, compounds **1**, **3b** and **9b** were used as the ligands for docking; following by docking of the newly designed and optimized structures **1-10d**. The docking was performed with version 4.0 of AutoDock [33], which combines a rapid energy evaluation through precalculated grids of affinity potentials with a variety of search algorithms to find suitable binding positions for a ligand on given protein. The dimensions of the grids were thus 34 Å x 34 Å x 34 Å, with a spacing of 0.375 Å between the grid points and center grid box coordinates  $x = 17.507$ ,  $y = 32.5$ ,  $z = 38.164$ . Lamarckian Genetic Algorithm was use for docking, with number of GA runs set to 100 and RMS Cluster Tolerance of 0.5 Å.

## 4. Conclusions

Based on previously obtained antimicrobial activity of fifteen 4-hydroxycoumarin derivatives, we performed the SAR, QSAR studies on their activity against *S. aureus*, *E. coli* and *C. albicans*, and molecular docking studies on the antimicrobial activity molecular target. The studies emphasize the important roles of the C-3 carbonyl and thiazole residues in activity, which led to the design of ten new potentially active coumarin antimicrobial agents. The designed compounds have improved predicted *Ki* values and antimicrobial activity, which will be confirmed through further synthesis and determination of real antimicrobial activity.

## Acknowledgements

This study was financially supported by a Grant No 142025 from the Serbian Ministry of Science.

## References and Notes

1. Stein, A.C.; Álvarez, S.; Avancini, C.; Zacchinos, S.; von Poser, G. Antifungal activity of some coumarins obtained from species of *Pterocaulon* (Asteraceae). *J. Ethnopharmacol.* **2006**, *107*, 95-98.
2. Ojala, T.; Remes, S.; Haansuu, P.; Vuorela, H.; Hiltunen, R.; Haahtela, K.; Vuorela, P. Antimicrobial activity of some coumarin containing herbal plants growing in Finland. *J. Ethnopharmacol.* **2000**, *73*, 299-305.

3. Mladenović, M.; Vuković, N.; Niciforović, N.; Sukdolak, S.; Solujić, S. Synthesis and molecular descriptor characterization of novel 4-hydroxy-chromene-2-one derivatives as antimicrobial agents. *Molecules* **2009**, *14*, 1495-1512.
4. Vuković, N.; Sukdolak, S.; Solujić, S.; Milošević, T. Synthesis and antimicrobial evaluation of some novel 2-aminothiazole derivatives of 4-hydroxy-chromene-2-one. *Arch. Pharm. Chem. Life Sci.* **2008**, *341*, 491-496.
5. Kayser, O.; Koldrzyey, H. Antibacterial activity of simple coumarins structural requirements for biological activity. *Z. Naturforsch.* **1999**, *54c*, 169-174.
6. Zloh, M.; Bucar, F.; Gibbons, S. Quantum chemical studies on structure activity relationship of natural product polyacetylenes. *Theor. Chem. Acc.* **2007**, *117*, 247-252.
7. Okamoto, A.K.; Gaudio, A.C.; dos Santos Marques, A.; Takahata, Y. QSAR study of inhibition by coumarins of IQ induced mutation in *S. typhimurium* TA98. *J. Mol. Struct. Theochem.* **2005**, *725*, 231-238.
8. Basile, A.; Sorbo, S.; Spadaro, V.; Bruno, M.; Maggio, A.; Faraone, N.; Rosselli, S. Antimicrobial and antioxidant activities of coumarins from the roots of *Ferulago campestris* (Apiaceae). *Molecules* **2009**, *14*, 939-952.
9. Widelski, J.; Popova, M.; Graikou, K.; Glowniak, K.; Chinou, I. Coumarins from *Angelica lucida* L.-Antibacterial activities. *Molecules* **2009**, *14*, 2729-2734.
10. Debeljak, Ž.; Škrbo, A.; Jasprica, I.; Mornar, A.; Plečko, V.; Banjanac, M.; Medić-Šarić, M. QSAR Study of antimicrobial activity of some 3-nitrocoumarins and related compounds. *J. Chem. Inf. Model.* **2007**, *47*, 918-926.
11. Hishmit, O. H.; Miky, A.A.J.; Farrag, A.A.; Fadel-Allah, E. M. Synthesis of some coumarin derivatives and their antimicrobial activity. *Arch. Pharm. Res.* **1989**, *12*, 181-185.
12. Sharma, M.C.; Sahu, N.K.; Kohali, D.V.; Chaturvedi, S.C.; Sharma, S. QSAR, synthesis and biological activity studies of some thiazolidines derivatives. *DJNB* **2009**, *4*, 223-232.
13. Lewis, J.R.; Singh, M.P.O.; Smith, V.C.; Skarzynski, T.; Maxwell, A.; Wonacott, J.A.; Wigley, B.D. The nature of inhibition of DNA gyrase by the coumarins and the cyclothialidines by X-ray crystallography. *EMBO J.* **1996**, *15*, 1412-1240.
14. Šarić-Medić, M.; Mornar, A.; Črnjević-Badovinac, T.; Josprica, I. Optimization of chromatographic conditions in thin layer chromatography of flavonoids and phenolic acids. *Croat. Chem. Acta* **2004**, *77*, 367-370.
15. Stanchev, S.; Momekov, G.; Jensen, F.; Manolov, I. Synthesis, computational study and cytotoxic activity of new 4-hydroxycoumarin derivatives. *Eur. J. Med. Chem.* **2008**, *43*, 694-706.
16. Cravotto, G.; Tagliapietra, S.; Cappelo, R.; Palmisano, G.; Curini, M.; Boccalini, M. Long-chain 3-acyl-4-hydroxycoumarins: Structure and antibacterial activity. *Arch. Pharm. Chem. Life Sci.* **2006**, *339*, 129-132.
17. Campos, J.; del Carmen Nunez, M.; Rodriguez, V.; Entrena, A.; Hernandez-Alcoceba, R.; Fernandez, F.; Lacal, I.J.; Gallo, M.A.; Espinoza, A. LUMO energy of model compounds of bispyridinium compounds as an index for the inhibition of choline kinase. *Eur. J. Med. Chem.* **2001**, *36*, 215-225.

18. Kubinyi, H. The Quantitative Analysis of Structure-Activity Relationships. In *Burger's Medicinal Chemistry and Drug Discovery, Principles and Practice*, 5th ed.; Wolff, M.E., Ed.; John Wiley & Sons: New York, NY, USA, 1995; Volume 3, pp. 497-571.
19. NCCLS. *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing 14<sup>th</sup> Int. Supplement M100-S14*. Wayne, PA, USA, 2003.
20. Umesha, S.; Richardson, P.A.; Kong, P. Hong, C.X. A novel indicator plant to test the hypersensitivity of phytopathogenic bacteria. *J. Microbiol. Meth.* **2008**, *72*, 95-97.
21. Carter, C.H.; Gaspar, A.J.; Leise, J.M. *Resazurin staining of bacterial colonies on membranes filters*; Fort Dietrick: Frederick, MD, USA, 1955.
22. Software Spartan 2002 for Windows. Wavefunction, Inc., 18401 Von Karman Ave. Ste. 370, Irvine, CA 92612-8542, USA, 2002.
23. Mohamadi, F.; Richards, N.; Guida, W.; Liskamp, R.; Lipton, M.; Caulfield, C.; Chang, G.; Hendrikson, T.; Still, W. Macromodel an integrated software system for modeling organic and bioorganic molecules using molecular mechanics. *J. Comput. Chem.* **1990**, *11*, 440-467.
24. Stewart, J.J.P. *MOPAC 2009*. Stewart Computational Chemistry: Colorado Springs, CO, USA, <http://www.openMOPAC.net>.
25. Pedretti, A.; Villa, A.; Vistoli, G. VEGA: A versatile program to convert, handle and virtualize molecular structure on Windows-based PCs. *J. Mol. Graph.* **2002**, *21*, 47-49.
26. Frisch, M.J.; Trucks, G.W.; Schlegel, H.B.; Scuseria, G.E.; Robb, M.A.; Cheeseman, J.R.; Montgomery, J.A., Jr.; Vreven, T.; Kudin, K.N.; Burant, J.C.; Millam, J.M.; Iyengar, S.S.; Tomasi, J.; Barone, V.; Mennucci, B.; Cossi, M.; Scalmani, G.; Rega, N.; Petersson, G.A.; Nakatsuji, H.; Hada, M.; Ehara, M.; Toyota, K.; Fukuda, R.; Hasegawa, J.; Ishida, M.; Nakajima, T.; Honda, Y.; Kitao, O.; Nakai, H.; Klene, M.; Li, X.; Knox, J.E.; Hratchian, H.P.; Cross, J.B.; Bakken, V.; Adamo, C.; Jaramillo, J.; Gomperts, R.; Stratmann, R.E.; Yazyev, O.; Austin, A.J.; Cammi, R.; Pomelli, C.; Ochterski, J.W.; Ayala, P.Y.; Morokuma, K.; Voth, G.A.; Salvador, P.; Dannenberg, J.J.; Zakrzewski, V.G.; Dapprich, S.; Daniels, A.D.; Strain, M.C.; Farkas, O.; Malick, D.K.; Rabuck, A.D.; Raghavachari, K.; Foresman, J.B.; Ortiz, J.V.; Cui, Q.; Baboul, A.G.; Clifford, S.; Cioslowski, J.; Stefanov, B.B.; Liu, G.; Liashenko, A.; Piskorz, P.; Komaromi, I.; Martin, R.L.; Fox, D.J.; Keith, T.; Al-Laham, M.A.; Peng, C.Y.; Nanayakkara, A.; Challacombe, M.; Gill, P.M.W.; Johnson, B.; Chen, W.; Wong, M.W.; Gonzalez, C.; Pople, J.A.; *Gaussian 03, Revision C.02*. Gaussian, Inc.: Wallingford, CT, USA.
27. Sharma, P.; Kumar, A.; Upadhyay, S.; Sahu, V.; Singh, J. Synthesis and QSAR modeling of 2-acetyl-2-ethoxycarbonyl-1-[4(4'-aryloxy)-phenyl]-N,N-dimethylaminophenyl aziridines as potential antibacterial agents. *Eur. J. Med. Chem.* **2009**, *44*, 251-259.
28. *Chem3D Ultra 10.0, ChemOffice Ultra, 2006*; Cambridge Scientific Software: CambridgeSoft Corporate Headquarters, 100 Cambridge Park Drive Cambridge, MA 02140, USA, 2006.
29. Nikolic, K.M.; Design and QSAR study of analogs of a-tocopherol with enhanced antiproliferative activity against human breast adenocarcinoma cells. *J. Mol. Graph. Model.* **2008**, *26*, 868-873.
30. *Origin Pro 8*. OriginLab Corporation: Northampton, MA, USA, 2009.
31. Lafitte, D.; Lamour, V.; Tsvetkov, P.O.; Makarov, A.A.; Klich, M.; Deprez, P.; Moras, D.; Briand, C.; Gilli, R. DNA gyrase interaction with coumarin-based inhibitors: the role of the

- hydroxybenzoate isopentenyl moiety and the 5'-methyl group of the noviose. *Biochemistry* **2002**, *41*, 7217-7223.
32. Pettersen, E.F.; Goddard, T.D.; Huang, C.C.; Couch, G.S.; Greenblatt, D.M.; Meng, E.C.; Ferrin, T.E. UCSF Chimera--a visualization system for exploratory research and analysis.. *J Comput Chem.* **2004**, *25*, 1605-1612.
33. Morris, M.G.; Goodsell, S.D.; Huey, R.; Olson, J.A. Distributed automated docking of flexible ligands to proteins: Parallel applications of AutoDock 2.4. *J. Comp. Aid. Mol. Des.* **1996**, *10*, 293-304.

*Sample Availability:* Samples of the compounds **1-10c** are available from the authors.

© 2010 by the authors; licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an Open Access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution license (<http://creativecommons.org/licenses/by/3.0/>).



Article

## ***In Vitro* Antioxidant Activity of Selected 4-Hydroxy-Chromene-2-One Derivatives—SAR, QSAR and DFT Studies**

Milan Mladenović<sup>1,\*</sup>, Mirjana Mihailović<sup>2</sup>, Desanka Bogojević<sup>2</sup>, Sanja Matić<sup>3</sup>, Neda Nićiforović<sup>1</sup>, Vladimir Mihailović<sup>1</sup>, Nenad Vuković<sup>1</sup>, Slobodan Sukdolak<sup>1</sup> and Slavica Solujić<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Department of Chemistry, Faculty of Science, P.O. Box 60, University of Kragujevac, Radoja Domanovića 12, 34000 Kragujevac, Serbia; E-Mails: nneda@kg.ac.rs (N.N.); vladam@kg.ac.rs (V.M.); nvukovic@kg.ac.rs (N.V.); duda@kg.ac.rs (S.S.); ssolujic@kg.ac.rs (S.S.)

<sup>2</sup> Department of Molecular Biology, Institute for Biological Research, University of Belgrade, Bulevar Despota Stefana 142, 11000 Beograd, Serbia; E-Mails: mista@ibiss.bg.ac.rs (M.M.); dekana@ibiss.kg.ac.rs (D.B.)

<sup>3</sup> Department of Biology and Ecology, Faculty of Science, P.O. Box 60, University of Kragujevac, Radoja Domanovića 12, 34000 Kragujevac, Serbia; E-Mail: msmaticsanja@yahoo.com

\* Author to whom correspondence should be addressed; E-Mail: mmladenovic@kg.ac.rs; Tel.: +381-34-336-223; Fax: +381-34-335-040.

Received: 3 February 2011; in revised form: 15 March 2011 / Accepted: 13 April 2011 /

Published: 29 April 2011

---

**Abstract:** The series of fifteen synthesized 4-hydroxycoumarin derivatives was subjected to antioxidant activity evaluation *in vitro*, through total antioxidant capacity, 1,1-diphenyl-2-picryl-hydrazyl (DPPH), hydroxyl radical, lipid peroxide scavenging and chelating activity. The highest activity was detected during the radicals scavenging, with **2b**, **6b**, **2c**, and **4c** noticed as the most active. The antioxidant activity was further quantified by the quantitative structure-activity relationships (QSAR) studies. For this purpose, the structures were optimized using Parametric Method 6 (PM6) semi-empirical and Density Functional Theory (DFT) B3LYP methods. Bond dissociation enthalpies of coumarin 4-OH, Natural Bond Orbital (NBO) gained hybridization of the oxygen, acidity of the hydrogen atom and various molecular descriptors obtained, were correlated with biological activity, after which we designed 20 new antioxidant structures, using the most favorable structural motifs, with much improved predicted activity *in vitro*.

**Keywords:** 4-hydroxycoumarins; antioxidant activity *in vitro*; DFT; BDEs; QSAR; design

**Abbreviations:** NBO: Natural Bond Orbital; OPLS: Optimized Potentials for Liquid Simulations; AMMP: Another Molecular Mechanics Program; PM6: Parametric Method 6; B3LYP: Becke, three-parameter, Lee-Yang-Parr.

---

## 1. Introduction

Overall cell health depends on the balance between formation and elimination of free radicals [1]. Free radicals, which originate both in normal or pathological metabolic transformations, host-defense against undesirable invasion (chemical or biological), or host-response to a disturbance of the tissues' integrity (due to trauma, cellular damage, *etc.*), may begin chain reactions initiated mostly by reactive oxygen species (ROS) [1]. They are, normally, continuously generated in the living cell, in low amounts by the transfer of one electron to an oxygen molecule during respiration chain and cellular immunization reactions [2] and are therefore needed for the normal redox-signaling and self-defense of the host [1]. Still, superoxide anion ( $O_2^-$ ) and hydroxyl radical (OH), in increased concentrations, can induce oxidative stress and cellular damage by altering the biological activities of lipids, proteins, DNA and carbohydrates [3], even to cellular death [1]. ROS are associated with incidence of heart diseases, thrombosis [4], hypertension [5], Alzheimer's and Parkinson's diseases [6] and cancer over the radical induced DNA double-strain breaks [7].

Some substances, like hydroxyl-coumarins [8], directly recombine free radicals and interrupt the initiation and/or propagation of the induced chain reactions. Due to the typical phenolic behavior [1] they act as potent metal chelators and free radical scavengers, resulting in a powerful antioxidant effect. Their antioxidant behavior could be applied in fat and oily foods to prevent oxidative deterioration, to replace known synthetic antioxidants. Deterioration of food quality occurs during processing and storage, and is related to presence of oxygen and oxidative processes [9]. To show antioxidant activity, a coumarin derivative has to possess at least one hydroxyl group [10].

Due to their great importance, the structural aspects of both natural and synthetic coumarins as antioxidant compounds have been evaluated using the structure-activity relationships (SAR) and quantitative structure-activity relationships (QSAR) methodology.

Thus, the evaluation of coumarin isolates from *Cortex Fraxini* [11], *Geranium wallichianum* [12] and Korean medicinal plants [13] highlights the presence of catechol moiety and oxygen containing scaffold in C-6 and C-7 positions of the coumarin core for antioxidant activity. Also, the  $\alpha$ -pyrone coumarin ring increases free radical scavenging activity, antilipid peroxidation ability and has a suppressive effect on enzymes [13]. Synthetic compounds, 4-methylcoumarins [14], substituted 7- or 8-hydroxybenzo[f]-coumarins, 6-hydroxybenzo[h]-coumarins and 7-azomethinecoumarins were tested for their antioxidant ability *in vitro* [15] and for their ability to interact with 1,1-diphenyl-2-picryl-hydrazyl (DPPH) stable free radical, scavenging of the superoxide anion and inhibition of lipid peroxidation, too [16].

Thereafter, this paper presents the antioxidant potential *in vitro* of various C-3 carbonyl/carboxyl (**2–8b**) [17] and *N*-thiazole (**2–10c**) [18] 4-hydroxy-2*H*-chromen-2-one derivatives introducing the 4-hydroxy group as highly potent in reducing chain reaction processes and coumarin C-3 scaffolds as



good hydroxyl radical scavengers and metal chelators. The structure potential of our derivatives was confirmed by SAR, QSAR and Density Functional Theory (DFT) studies, which were used for the successful design of 20 novel improved coumarin antioxidant structures.

## 2. Results and Discussion

### 2.1. Determination of Total Antioxidant Capacity

Results of the total antioxidant capacity are expressed as  $\mu\text{g}$  equivalents of ascorbic acid per milliliter (Table 1), demonstrating level of coumarin activity as  $\text{TAC} = 26.76 - 742.67 \mu\text{g/mL}$ . The derivation of the compound **1** at C-3 position resulted in the increase of the total antioxidant potential within both tested groups.

**Table 1.** Total antioxidant capacity and DPPH radical scavenging activity of synthesized coumarin derivatives *in vitro*.

Comp.	<sup>a</sup> TAC ( $\mu\text{g/mL}$ )	<sup>b</sup> TAC <sub>50</sub> ( $\mu\text{g/mL}$ )	<sup>c</sup> IC <sub>50</sub> ( $\mu\text{g/mL}$ )	
			30 min	60 min
<b>1</b>	121.46 $\pm$ 0.28 <sup>b</sup>	97.45 $\pm$ 0.31 <sup>d</sup>	133.70 $\pm$ 0.24	87.47 $\pm$ 0.24
<b>2b</b>	278.24 $\pm$ 0.36	47.65 $\pm$ 0.24	6.2 $\pm$ 0.11	4.6 $\pm$ 0.26
<b>3b</b>	54.08 $\pm$ 0.76	197.62 $\pm$ 0.21	44.93 $\pm$ 0.16	8.80 $\pm$ 0.14
<b>4b</b>	138.32 $\pm$ 0.87	84.57 $\pm$ 0.65	41.64 $\pm$ 0.14	9.93 $\pm$ 0.22
<b>6b</b>	212.12 $\pm$ 0.26	50.59 $\pm$ 0.12	5.14 $\pm$ 0.06	2.45 $\pm$ 0.17
<b>7b</b>	324.01 $\pm$ 0.28	35.69 $\pm$ 0.17	246.63 $\pm$ 0.31	135.01 $\pm$ 0.31
<b>8b</b>	106.64 $\pm$ 0.15	99.71 $\pm$ 0.28	37.76 $\pm$ 0.21	11.28 $\pm$ 0.19
<b>2c</b>	514.24 $\pm$ 0.64	33.35 $\pm$ 0.24	4.94 $\pm$ 0.08	6.97 $\pm$ 0.25
<b>3c</b>	86.14 $\pm$ 0.95	132.66 $\pm$ 0.16	29.07 $\pm$ 0.04	9.22 $\pm$ 0.17
<b>4c</b>	742.67 $\pm$ 0.28	17.25 $\pm$ 0.15	4.72 $\pm$ 0.03	3.54 $\pm$ 0.32
<b>5c</b>	198.84 $\pm$ 0.24	53.16 $\pm$ 0.09	68.56 $\pm$ 0.07	66.54 $\pm$ 0.26
<b>6c</b>	164.61 $\pm$ 0.32	72.35 $\pm$ 0.15	115.42 $\pm$ 0.15	94.30 $\pm$ 0.24
<b>7c</b>	224.26 $\pm$ 0.31	46.67 $\pm$ 0.11	161.73 $\pm$ 0.46	93.58 $\pm$ 0.17
<b>8c</b>	219.94 $\pm$ 0.56	47.18 $\pm$ 0.28	140.48 $\pm$ 0.26	60.31 $\pm$ 0.06
<b>9c</b>	82.22 $\pm$ 0.96	136.94 $\pm$ 0.53	13.72 $\pm$ 0.25	4.79 $\pm$ 0.03
<b>10c</b>	26.76 $\pm$ 0.48	219.43 $\pm$ 0.89	78.25 $\pm$ 0.11	76.41 $\pm$ 0.05
Asc	/	/	24.17 $\pm$ 0.07	15.61 $\pm$ 0.04
BHT	/	/	8.62 $\pm$ 0.02	6.05 $\pm$ 0.01

<sup>a</sup> Total antioxidant capacity of the coumarin derivatives expressed as  $\mu\text{g}$  equivalents of ascorbic acid per milliliter; <sup>b</sup> Total antioxidant capacity of the coumarin derivatives; TAC<sub>50</sub>, the concentration of coumarin required to inhibit 50% of Mo(VI) reduction; <sup>c</sup> DPPH radical scavenging activity; <sup>d</sup> Results are mean values  $\pm$  SD from at least three experiments.

The examined compounds **2–8b** contain carboxyl or ester group *trans*-oriented towards the methyl group of the prop-1-en scaffold. The most active compound was **7b**, a (*E*)-2-cyano-3-but-2-enoic acid derivative ( $\text{TAC} = 324.01 \mu\text{g/mL}$ ). After the substitution of cyano group in **7b** by carboxyethyl (**2b**;  $278.24 \mu\text{g/mL}$ ) and two acetyl (**6b**;  $212.12 \mu\text{g/mL}$ ) groups, activity was diminished. The decreasing order in the activity was **7b** > **2b** > **6b** > **4b** > **1** > **8b** > **3b**. Among the *N*-thiazole derivatives **2–10c**,

with the **4c** > **2c** > **7c** > **8c** > **6c** > **3c** > **9c** > **10c** decreasing activity, the *N*-thiazole *p*-sulfonic acid derivative, **4c**, was pointed out as a very promising one, with the highest TAC value of 742.67 µg/mL. The *O*-hydroxybenzoic acid (**2c**), tolyl (**5c**, **8c**) and *N,N*-diethyl (**7c**) derivatives also presented notable potential, in the range of 198.84 µg/mL to 514.24 µg/mL.

In accordance with the results presented for the other activities (Sections 2.2–2.5), the total antioxidant capacity is also presented as TAC<sub>50</sub> values (Table 1) which are used in the QSAR study.

Since the total antioxidant capacity assay describes the possibility of the tested compound to reduce Mo(VI) to Mo(V), we considered HOMO-LUMO gap as a way to explain coumarin oxidation ability. The smaller the gap is, the more easily molecules will be excited [19], *i.e.*, the test compound have higher potential to reduce Mo(VI). The range of  $\Delta E$  HOMO-LUMO (Please see section 2.3.) was  $-8.53$  eV (**4b**) to  $-7.05$  eV (**2c**), suggesting potentially good activity. The high total antioxidant capacity had been obtained by compounds **7b** ( $\Delta E$  HOMO-LUMO =  $-8.35$  eV), **2c** ( $-7.05$  eV) and **4c** ( $-7.77$  eV), presenting fine correlation between the activity and the physico-chemical characterization (Equation 3) of the compounds.

## 2.2. DPPH Radical Scavenging Activity

The *in vitro* activity of five coumarin derivatives **2b**, **6b**, **2c**, **4c** and **9c** (Table 1) was comparable with the standard values of ascorbic acid (**Asc**) and butylated hydroxytoluene (**BHT**) (30 minutes: ascorbic acid IC<sub>50</sub> = 24.17 µg/mL, **BHT** IC<sub>50</sub> = 8.62 µg/mL; 60 minutes: ascorbic acid IC<sub>50</sub> = 15.61 µg/mL, **BHT** IC<sub>50</sub> = 6.05 µg/mL).

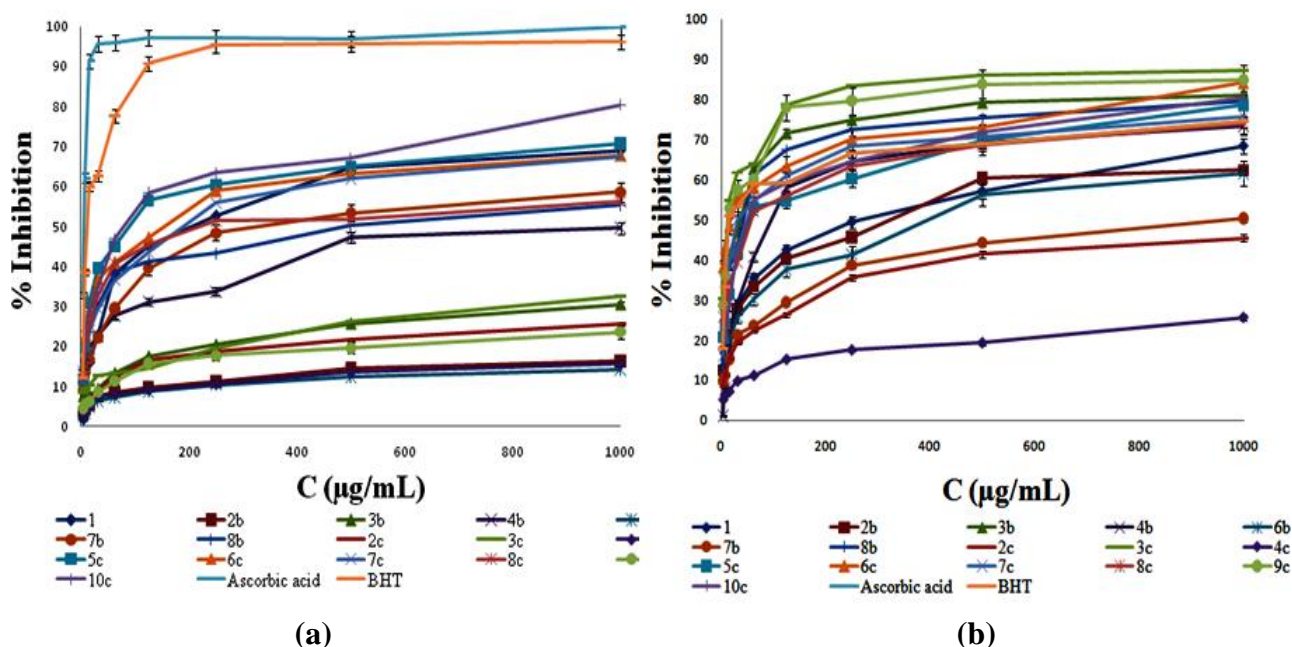
After the 30 min period, compounds **2–8b** exhibited the following antioxidant potential: **6b** > **2b** > **8b** > **4b** > **3b** > **1** > **7b**, outlining acetyl groups of the prop-1-en moiety in **6b** (IC<sub>50</sub> equal to 5.14 µg/mL) as the most structurally favorable residues. The double carboxyethyl substitution of the prop-1-en moiety (**2b**) decreased the scavenging potential in a small manner (IC<sub>50</sub> = 6.2 µg/mL). Still notable, but significantly lower activity (<50 µg/mL) was noticed for **3b**, **4b** and **8b** containing carboxymethyl or carboxyl *trans*-substituents, with various *cis*-oriented scaffolds. It is worth mentioning that **4b** was the only compound with *cis*-hydrogen. The presence of acetyl group (**1**) instead of prop-1-en scaffold has significantly reduced the activity. The lowest activity of the **7b** can be attributed to the influence of *cis*-cyano group. The prolongation of the test time has magnified the potential of **2–8b**, particularly within the triad **3b**, **4b** and **8b**, which presented excellent activity (IC<sub>50</sub> = 8.8 – 11.28 µg/mL). The higher scavenging potential of **3b** with respect to **4b** was caused by *cis*-acetyl **3b** pharmacophore. Once again, **6b** was the most potent scavenger.

Within the second test participants, **2–10c**, the strong hydrogen donor ability has distinguished the **4c** as the most powerful DPPH radical scavenger, regarding both test periods (IC<sub>50</sub> values of 4.72 µg/mL and 3.54 µg/mL). The activity decreased in the row **4c** > **2c** > **9c** > **3c** > **5c** (Figure 1, a). The *N*-thiazole motif linked with favorable *p*-SO<sub>3</sub>H group (**4c**) as well as the presence of the additional OH group (**2c**, IC<sub>50</sub> equal to 4.9 µg/mL and 6.97 µg/mL) increased the antiradical activity. The high 30 min activity of the **2c** was not a surprise due to more look-a-like phenolic structure of the compound, related to increased number of the hydroxyl groups. The *m*-NO<sub>2</sub> *N*-thiazole derivative (**9c**), reached full scavenging potential after 60 minutes test (IC<sub>50</sub> = 4.79 µg/mL) thus overpowering the decreasing activity of **2c** in the same period. Despite the favorable structure, **2c** was the only compound that

presented weaker potential after 60 min testing. The thiazole derivatives containing only *N*-tolyl (**5c** and **8c**), *N,N*-diethyl (**7c**) and *N*-naphtyl residues, presented a total lack of activity.

The scavenging potential of our compounds was: **4c** > **2c** > **6b** > **2b** > **BHT** > **9c** > **Asc** after 30 min, while the prolonged reaction time changed the activity in the following manner: **6b** > **4c** > **2b** > **9c** > **BHT** > **2c** > **3c** > **Asc**.

**Figure 1.** (a) DPPH radical scavenging activity in the 60th minute; and (b) determination of hydroxyl radical scavenging activity, *in vitro*.



### 2.3. Inhibition of Lipid Peroxidation in Linoleic Acid Emulsion

During the four days long inhibition of lipid peroxidation by coumarin derivatives, the absorbance of the control sample at 500 nm has been increasing up to the maximal value in 72nd hour, and then, on the 96th hour the absorbance decreased due to the decomposition of linoleic acid hydroperoxides generated during the peroxidation [20]. Consequently, we present the results of coumarin induced inhibition of lipid peroxidation until the 72nd hour (Table 2). **BHT** was excellent standard for this measurement with the  $I_{50} = 7.81 \mu\text{g/mL}$ .

During the observed 24–72 h time interval, a group of five tested compounds, **2b**, **6b**, **2c**, **4c** and **9c**, has presented significant lipid peroxide scavenging capacity, compared to **1** and **BHT**. Regarding the results, some patterns in the activity among derivatives could be obtained. Thus, the compounds **6b** ( $I_{50} = < 3.90 \mu\text{g/mL}$ ;  $10.13 \mu\text{g/mL}$ ;  $10.76 \mu\text{g/mL}$  for 24 h, 48 h and 72 h, respectively) and **9c** ( $I_{50} = 5.88 \mu\text{g/mL}$ ;  $10.06 \mu\text{g/mL}$ ;  $12.23 \mu\text{g/mL}$ ) retained the level of activity after the second and third day. Compared to **BHT**, **6b** expressed 50% higher potential in the first 24 hours. Within the following group, **2c**, **4c** and **2b**, a small decrease in the activity on the 48th hour has been noticed, accompanied with amelioration on the third day of the test. The most active compound within the triad was **4c** ( $I_{50} < 3.90 \mu\text{g/mL}$ ;  $26.31 \mu\text{g/mL}$ ;  $10.09 \mu\text{g/mL}$ ). Furthermore, a group of structurally similar compounds, **3b**, **4b** and **8b**, showed slightly lower radical scavenging intention than previously mentioned derivatives with  $I_{50}$  from 11.49 to  $18.96 \mu\text{g/mL}$  on the 24th hour, 18.07 to  $37.89 \mu\text{g/mL}$  on

the 48th hour and from 10.46  $\mu\text{g/mL}$  to 80.95  $\mu\text{g/mL}$  on the final hour. The structural change of *cis*-hydrogen atom (**4b**) with acetyl (**3b**) or carboxymethyl (**8b**) group did not contribute to the activity.

**Table 2.** Lipid peroxide, hydroxyl radical scavenging and chelating effect of coumarin derivatives *in vitro*.

Comp.	<sup>a</sup> I <sub>50</sub> ( $\mu\text{g/mL}$ )			<sup>b</sup> OH <sub>50</sub> ( $\mu\text{g/mL}$ )	<sup>c</sup> CE <sub>50</sub> ( $\mu\text{g/mL}$ )
	24 h	48 h	72 h		
<b>1</b>	26.31 $\pm$ 0.31	55.23 $\pm$ 0.22	55.23 $\pm$ 0.32	17.77 $\pm$ 0.15	475.24 $\pm$ 0.21
<b>2b</b>	7.77 $\pm$ 0.12	16.85 $\pm$ 0.15	13.01 $\pm$ 0.14	17.19 $\pm$ 0.06	45.0 $\pm$ 0.54
<b>3b</b>	12.08 $\pm$ 0.12	28.07 $\pm$ 0.41	10.46 $\pm$ 0.28	32.21 $\pm$ 0.41	57.35 $\pm$ 0.34
<b>4b</b>	18.96 $\pm$ 0.04	37.89 $\pm$ 0.28	80.95 $\pm$ 0.24	84.04 $\pm$ 0.02	62.5 $\pm$ 0.11
<b>6b</b>	<3.901	10.13 $\pm$ 0.16	10.76 $\pm$ 0.16	14.32 $\pm$ 0.15	28.64 $\pm$ 0.28
<b>7b</b>	76.17 $\pm$ 0.25	216.85 $\pm$ 0.22	167.66 $\pm$ 0.46	9.89 $\pm$ 0.03	60.74 $\pm$ 0.41
<b>8b</b>	11.49 $\pm$ 0.24	18.07 $\pm$ 0.31	16.02 $\pm$ 0.24	37.82 $\pm$ 0.08	55.18 $\pm$ 0.13
<b>2c</b>	6.72 $\pm$ 0.37	17.89 $\pm$ 0.34	7.07 $\pm$ 0.34	9.81 $\pm$ 0.03	34.64 $\pm$ 0.11
<b>3c</b>	24.94 $\pm$ 0.34	12.02 $\pm$ 0.09	51.53 $\pm$ 0.13	19.83 $\pm$ 0.24	5.5 $\pm$ 0.08
<b>4c</b>	<3.901	26.31 $\pm$ 0.16	10.09 $\pm$ 0.27	5.94 $\pm$ 0.04	43.19 $\pm$ 0.02
<b>5c</b>	24.49 $\pm$ 0.37	100.94 $\pm$ 0.17	51.33 $\pm$ 0.27	70.51 $\pm$ 0.63	52.04 $\pm$ 0.45
<b>6c</b>	33.46 $\pm$ 0.48	28.66 $\pm$ 0.17	83.29 $\pm$ 0.19	30.32 $\pm$ 0.34	62.25 $\pm$ 0.27
<b>7c</b>	53.13 $\pm$ 0.19	40.28 $\pm$ 0.36	119.34 $\pm$ 0.24	36.88 $\pm$ 0.72	54.77 $\pm$ 0.16
<b>8c</b>	33.01 $\pm$ 0.16	731.60 $\pm$ 0.28	80.98 $\pm$ 0.31	69.76 $\pm$ 0.28	52.81 $\pm$ 0.25
<b>9c</b>	5.88 $\pm$ 0.34	10.06 $\pm$ 0.34	12.23 $\pm$ 0.17	24.32 $\pm$ 0.11	7.76 $\pm$ 0.05
<b>10c</b>	28.20 $\pm$ 0.26	62.34 $\pm$ 0.19	57.06 $\pm$ 0.29	54.82 $\pm$ 0.03	51.64 $\pm$ 0.26
<b>Asc</b>	246.14 $\pm$ 0.3	514.36 $\pm$ 0.16	>1000	160.55 $\pm$ 0.19	76.31 $\pm$ 0.25
<b>BHT</b>	<7.81	<7.81	<7.81	33.92 $\pm$ 0.34	85.48 $\pm$ 0.17

<sup>a</sup> Lipid peroxidation scavenging capacity of coumarin derivatives; <sup>b</sup> Hydroxy radical scavenging capacity of coumarin derivatives; <sup>c</sup> Chelating capacity of coumarin derivatives.

The antioxidant capacity of an organic compound, whether natural or synthetic, is expressed as the ability of the compound to release hydrogen atom, *i.e.*, to undergo keto-enol tautomerisation [21]. The molecular bonds with a length between a single and double bonds, also increases the radical scavenging potential. Furthermore, low Bond Dissociation Enthalpies (BDE) values are often attributed to the high antioxidant potential [21,22].

The proton transfer from the antioxidant towards radical is common for both DPPH and lipid peroxide scavenging. Therefore, we present the DFT study on the coumarin 4-OH group which is responsible for antioxidant activity. As has been obtained by the single-point DFT calculations and presented in Figure 2a and d, the 4-hydroxyl group of the tested derivatives is highly enolized and the hydrogen atom is almost released towards available free radical. In the methanol solution, the coumarin structure is transformed into hinon-like (Figure 2a and d) and the 4-OH hydrogen atom is attached to oxygen by weak electrostatic interactions. Therefore, the hydrogen is suitable for abstraction by the free radical. Moreover, by NBO analysis, we concluded that the acidity of the 4-OH hydrogen is very significant for the activity. Although the hybridization of the oxygen atom in the bond is  $sp^2$  by equations  $0.7814(sp^{1.67})_O + 0.3926(s^{100})_H$  (**6b**) and  $0.8947(sp^{1.62})_O + 0.4837(s^{100})_H$  (**4c**), it is still close to the  $sp$  one, regarding the  $(sp^{1.50})$  as the top border for  $sp$  hybridization, providing the

relatively high acidity to the hydrogen atom. Furthermore, bond lengths of all our compounds show that the majority of the bonds are longer than double bonds and shorter than single bonds, indicating an extended conjugation with antioxidant properties [21]. The lengths of 4-OH bond in **6b** ( $d = 1.03 \text{ \AA}$ ) and **4c** ( $d = 1.63 \text{ \AA}$ ) are the longest ones (Table 3, D4), causing the low O-H bond dissociation enthalpy (Table 3, E1) [21,22], consequently facilitating the release of the proton towards radical. This influence of the bond length is also described by Equations (2) and (3). Beside the fact that the BDEs of **6b** (205.84 kcal/mol) and **4c** (239.26 kcal/mol) are higher compared to coumarin standards [22], the most decisive factor for the strong antioxidant activity is the hinon-like structure of coumarin compounds in the methanol solution and the great availability of the hydrogen. In agreement with these facts, the compounds **6b** and **4c** have shown excellent DPPH scavenging and lipid peroxidation activity. Compound **2c** also presented notable potential due to long the 4-OH bond length ( $d = 1.55 \text{ \AA}$ ) and considerable acidity of the hydrogen atom:  $0.6826(\text{sp}^{1.73})_{\text{O}} + 0.3726(\text{s}^{100})_{\text{H}}$ . Still, this is the only compound possessing more than one OH group which possibly contributes to the activity.

**Table 3.** Bond dissociation enthalpies and the relevant molecular descriptors for the QSAR studies.

Comp.	E1	D1	D2	D3	D4	D5	D6	D7	D8	D9
<b>1</b>	114.32	-9.99	-1.49	-8.50	0.99	-0.62	0	0	124.41	-0.529
<b>2b</b>	199.74	-10.01	-1.56	-8.45	0.99	-0.66	0	0	203.33	-1.561
<b>3b</b>	227.25	-9.96	-1.54	-8.42	1.04	-0.63	0	0	165.18	-1.318
<b>4b</b>	224.96	-9.98	-1.45	-8.53	1.02	-0.61	0	0	192.32	-0.035
<b>6b</b>	205.84	-10.04	-1.65	-8.39	1.03	-0.67	0	0	171.66	-1.679
<b>7b</b>	211.94	-10.04	-1.69	-8.35	1.06	-0.69	0	0	173.41	-1.765
<b>8b</b>	216.27	-9.04	-1.45	-7.59	0.96	-0.66	0	0	246.34	-1.709
<b>2c</b>	242.37	-9.00	-1.95	-7.05	1.55	-0.61	-0.59	0.25	233.72	1.216
<b>3c</b>	255.69	-8.99	-1.62	-7.37	1.53	-0.46	-0.62	0.27	249.55	3.129
<b>4c</b>	239.26	-8.90	-1.13	-7.77	1.63	-0.65	-0.31	0.29	225.94	0.702
<b>5c</b>	244.56	-8.92	-0.94	-7.78	1.36	-0.70	-0.66	0.47	230.13	2.904
<b>6c</b>	249.78	-8.89	-0.95	-7.94	1.59	-0.67	-0.68	0.27	208.37	1.921
<b>7c</b>	269.29	-8.91	-1.07	-7.84	1.69	-0.63	-0.69	0.26	225.74	1.856
<b>8c</b>	251.48	-8.97	-1.76	-7.21	1.61	-0.68	-0.62	0.24	237.20	3.380
<b>9c</b>	281.35	-8.87	-1.23	-7.64	0.99	-0.65	-0.64	0.25	248.00	3.129
<b>10c</b>	271.52	-8.79	-1.16	-7.63	0.99	-0.65	-0.65	0.26	222.34	3.603

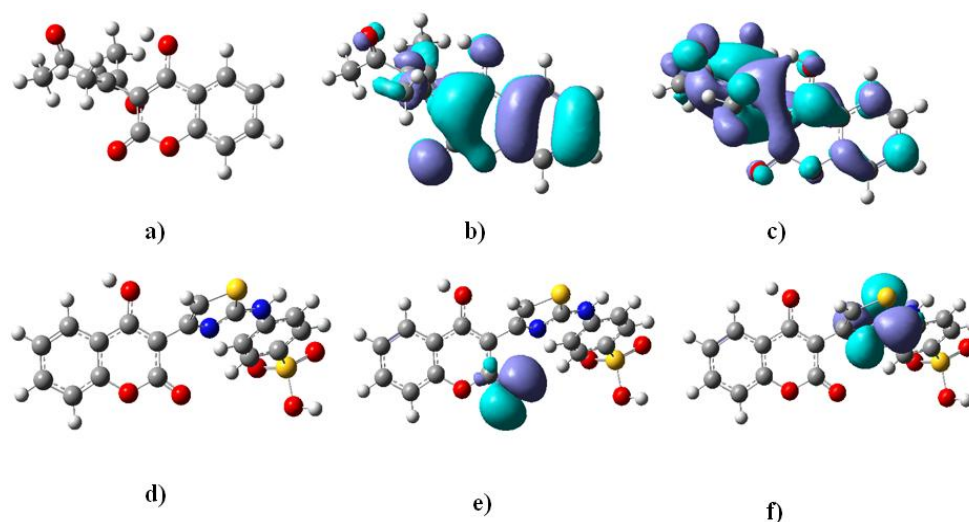
<sup>a</sup> E-energy: E1 BDEs (kcal/mol); <sup>b</sup> D-descriptor: D1: HOMO (eV); D2: LUMO (eV); D3: H-L gap (eV); D4: 4-OH bond length ( $\text{\AA}$ ); D5:  $Q_{\text{OH}}$ ; D6:  $Q_{\text{N}}$ ; D7:  $Q_{\text{S}}$ ; D8: CSEV ( $\text{\AA}^2$ ); D9:  $\log P$ .

#### 2.4. Determination of Hydroxyl Radical Scavenging Activity

The hydroxyl radical scavenging activity of the BHT ( $\text{OH}_{50}$  equal to  $33.92 \mu\text{g/mL}$ ) has been impaired by ten compounds in the following order **4c** > **2c** > **7b** > **6b** > **2b** > **1** > **3c** > **9c** > **6c** > **3b** > BHT, with 1.5–82.5% higher potential (Table 2) (Figure 1b). All of the tested compounds were better hydroxyl radical scavengers than ascorbic acid. The activities of **4c** ( $\text{OH}_{50} = 5.94 \mu\text{g/mL}$ ), **2c** ( $\text{OH}_{50} = 9.81 \mu\text{g/mL}$ ), **7b** ( $\text{OH}_{50} = 9.89 \mu\text{g/mL}$ ) and **6b** ( $\text{OH}_{50} = 14.32 \mu\text{g/mL}$ ) are worthy of note. Generally, the influence of the *N*-thiazole group linked to coumarin core, along with the functional

groups that extended the conjugation (*p*-SO<sub>3</sub>H, *p*-, *m*-NO<sub>2</sub> and Ph-*o*-OH-*p*-COOH), contributed to higher activity of **2–10c** in comparison to **1–8b**. On the other hand, the presence of *cis*-cyano group in **7b** enhanced the hydroxyl radical scavenging activity for 40–89%, compared with **1**, **2b** and **6b**. The hydroxyl radical scavenging was the only test during which **1** showed a certain potential. The OH radical abstraction is favored due to extended conjugation in our compounds (Please see section 3.1.).

**Figure 2.** (a) and (d) 4-OH bonds of **6b** and **4c** with (b) and (f) HOMO; (c) and (f) LUMO orbitals of **6b** and **4c**, respectively.



All presented data are in strong correlation with observed radical scavenging activity.

The abstraction of the OH radical occurs in LUMO orbitals of the coumarin double bond system (Figure 2, **c** and **f**) which is confirmed by Equation (4). The LUMO orbitals of **6b** (widespread trough molecule) and **4c** (thiazole N = C) are presented as the OH radical abstraction centers.

### 2.5. Measurement of Ferrous Ion Chelating Ability

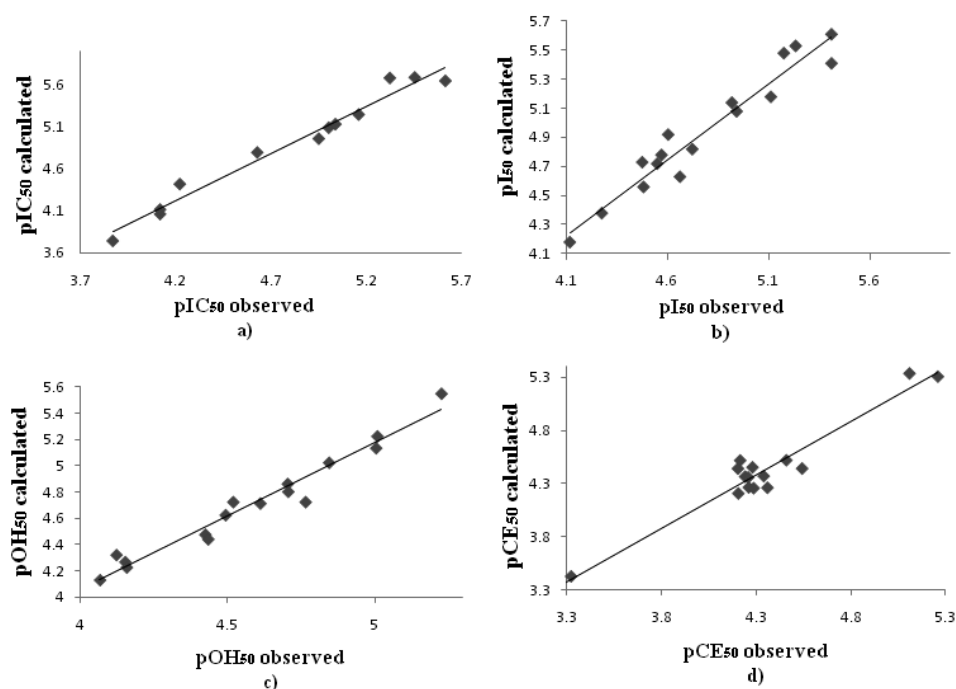
Starting with *N*-thiazole *p*-NO<sub>2</sub> derivative **3c**, (CE<sub>50</sub> = 5.5 µg/mL), followed by *m*-NO<sub>2</sub> derivative **9c** (CE<sub>50</sub> = 7.76 µg/mL), all tested compounds, except **1**, had surpassed ferrous ion chelating ability (Table 2) of ascorbic acid (CE<sub>50</sub> 76.31 µg/mL) and **BHT** (CE<sub>50</sub> 85.48 µg/mL). The chelating effect in the first group of the compounds descended in following order **6b** > **2b** > **8b** > **3b** > **7b** > **4b** > **1**. The decrease in number of oxygen atoms, starting with **3b**, significantly reduced the chelating power. The influence of the carbonyl/carboxyl and *N*-thiazole residues on chelating activity was comparable.

The lactone part of coumarin derivatives can bind the iron atom, but that was not confirmed by Equation (5). Governed by the fact that the oxygen groups are crucial for the chelating ability [23], high activity of **6b**, **2b** and **8b** is assigned to the presence of numerous oxygen atoms), Equation (5). Interestingly, **2b** and **8b**, containing carboxyl groups, had lower activity than **6b** (two acetyl groups). The potential of the **3c** and **9c** depends on the binding of iron with nitro oxygen atoms.

## 2.6. QSAR Studies of the Antioxidant Activity

QSAR studies were administrated to the antioxidant activity as a tool to describe and explain the activity of the tested coumarin derivatives. The results of the *in vitro* testing and the concentrations of the test compounds that reduce 50% of the initial free radical concentration were used for the QSAR study. Logarithmic values of the biological activity were used for the generation of the QSAR equations with relevant molecular descriptors (Figure 3). From the equations, we ascertained the possible mechanisms by which our coumarins occur as antioxidants.

**Figure 3.** Plot of observed vs. calculated biological values of the training set compounds obtained from (a) Equation (2); (b) Equation (3); (c) Equation (4); (d) Equation (5).



### QSAR study on total antioxidant capacity

$$\begin{aligned} \text{pTAC}_{50} = & -8.46(\pm 0.32) + 7.32(\pm 0.99) \text{HOMO} - 2.69(\pm 0.47) \text{LUMO} \\ & -9.46(\pm 1.48) Q_{\text{OH}} + 0.6(\pm 0.1) Q_{\text{N}} - 2.9(\pm 0.4) Q_{\text{S}} \end{aligned} \quad (1)$$

$n = 15; r = 0.992; s = 0.032; F = 37.426; Q^2 = 0.993; s\text{-PRESS} = 0.004$

According to the model that describes total antioxidant capacity, Equation (1), the potential of the compounds is highly dependent of HOMO electron energies and the partial atomic charge of the thiazole ring nitrogen. The equation describes the thiazole center as electrone rich and as participant in the Mo(VI) reduction, as well as the HOMO orbitals of the compounds. The HOMO orbital of **4c** is the orbital of the coumarin lactone carbonyl double bond system (Figure 2), highlighting the importance of the coumarin residue in the mechanism.

### QSAR study on *in vitro* 60 min DPPH scavenging activity

$$\begin{aligned} \text{pIC}_{50} = & +6.72(\pm 0.48) - 1.23(\pm 0.57) Q_{\text{OH}} + 4.42(\pm 0.35) \text{4-OH bond length} + 3.4(\pm 0.94) \\ & Q_{\text{N}} - 7.6(\pm 0.26) Q_{\text{S}} \end{aligned} \quad (2)$$

The high basicity of the thiazole nitrogen atom attenuates the strength of the 4-OH group C-O bond, making the hydrogen atom more acidic and more easily relaxed (Figure 2). Therefore, the basicity of the nitrogen facilitates DPPH radical scavenging, quantified by Equation (2). The positive sign [24] before the 6.72 in the Equation (2) suggests that the model is high specific towards DPPH scavenging.

*QSAR study on inhibition of lipid peroxidation in linoleic acid emulsion (24 h):*

$$\text{pI}_{50} = +8.46(\pm 0.47) + 2.46(\pm 0.28) \log P - 4.92(\pm 0.36) \text{HOMO} + 1.96(\pm 0.46) \text{4-OH bond length} - 6.49(\pm 0.76) Q_s \quad (3)$$

$$n = 15; r = 0.993; s = 0.046; F = 103.981; Q^2 = 0.991; s\text{-PRESS} = 0.007$$

Based on the similar behavior of an antioxidant towards DPPH scavenging activity and lipid peroxidation [25,26], which includes dissociation of the O-H bond and release of the hydrogen towards the radical, Equations (2) and (3) characterize the factor of the bond length as important for easy relieving of the hydrogen atom towards the free radical. As the bond is longer, the hydrogen atom is more easily relaxed due to the bond weakening. Furthermore, the ability of the compounds to inhibit peroxidation chain reaction is highly dependent on the coumarin solubility.

*QSAR study on in vitro hydroxyl radical scavenging activity*

$$\text{pOH}_{50} = +11.46(0.94) - 4.94(0.32) \text{HOMO} + 7.46(0.24) \text{LUMO} + 5.96(0.32) Q_{\text{OH}} \quad (4)$$

$$n = 15; r = 0.997; s = 0.028; F = 174.273; Q^2 = 0.994; s\text{-PRESS} = 0.013$$

Free radicals can be easily scavenged on the double bond system. Continued conjugation through the **1–10c** coumarin system, consisted of benzene, 4-hydroxy-enol and the C-3 scaffold double bonds (Figure 5) provides the ability for possible hydroxyl radical addition on LUMO coumarin orbital level. The strong participation of LUMO energy and the partial atomic 4-hydroxyl group oxygen charge in the highly specific Equation (4) correlates with high activity of our derivatives.

*QSAR study on iron chelating ability*

$$\text{pCE}_{50} = +1.29(0.52) + 9.01(0.003) \text{CSEV} + 0.95(0.33) Q_N \quad (5)$$

$$n = 15; r = 0.993; s = 0.054; F = 43.383; Q^2 = 0.894; s\text{-PRESS} = 0.034$$

In the structure of tested coumarin derivatives there are high voluminous scaffolds which define the compound's stereochemistry during the chelating of the iron atom. Although the model (Equation 5) does not specify the carbonyl/carboxyl pharmacophores influence, it does specify the great importance of the spatial arrangement of the C-3 residues on the activity. This particular stereochemistry is characterized with the steric molecular descriptor CSEV by Equation (5).

The QSAR statistics are outlined in Table 4 and Table 5. Table 4 presents calculated antioxidant activity values, used for the validation of the models. Excellent validation was further used for the calculation of the activity of the designed compounds (Please see Section 2.7).

Used molecular descriptors were cross-correlated with the experimental activity (Table 5), specifying the part of each descriptor in the related activity.



**Table 4.** Observed vs. calculated values of coumarin derivatives antioxidant activity from QSAR studies.

Comp.	pTAC <sub>50</sub>		pIC <sub>50</sub>		pI <sub>50</sub>		pOH <sub>50</sub>		pCE <sub>50</sub>	
	Obs.	Calc.	Obs.	Calc.	Obs.	Calc.	Obs.	Calc.	Obs.	Calc.
<b>1</b>	4.01	3.89	4.06	4.26	4.57	4.78	4.71	4.80	3.32	3.42
<b>2b</b>	4.32	4.71	5.34	5.43	5.12	5.18	4.76	4.72	4.34	4.37
<b>3b</b>	3.70	3.69	5.06	5.11	4.92	5.14	4.49	4.62	4.24	4.36
<b>4b</b>	4.07	4.88	5.00	5.09	4.72	4.82	4.06	4.13	4.20	4.44
<b>6b</b>	4.29	4.28	5.61	5.65	5.41	5.41	4.84	5.02	4.54	4.44
<b>7b</b>	4.45	4.76	3.87	3.75	4.12	4.18	5.00	5.13	4.22	4.52
<b>8b</b>	4.00	3.89	4.95	4.96	4.94	5.08	4.42	4.47	4.26	4.36
<b>2c</b>	4.47	4.91	5.16	5.25	5.17	5.48	5.00	5.23	4.46	4.52
<b>3c</b>	3.88	3.92	5.03	5.13	4.60	4.92	4.70	4.86	5.26	5.31
<b>4c</b>	4.76	5.01	5.45	5.69	5.41	5.61	5.23	5.55	4.36	4.26
<b>5c</b>	4.27	4.14	4.12	4.06	4.66	4.63	4.15	4.26	3.28	3.34
<b>6c</b>	4.14	4.08	4.63	4.80	4.47	4.73	4.52	4.72	4.21	4.21
<b>7c</b>	4.33	4.36	4.22	4.42	4.27	4.38	4.43	4.44	4.26	4.26
<b>8c</b>	4.32	4.445	5.32	5.68	4.48	4.56	4.16	4.22	4.28	4.45
<b>9c</b>	3.86	3.15	4.12	4.12	5.23	5.53	4.61	4.71	5.11	5.34
<b>10c</b>	3.66	3.49	4.06	4.26	4.55	4.72	4.12	4.32	4.29	4.26

**Table 5.** Correlation matrix of molecular descriptors values and antioxidant activity.

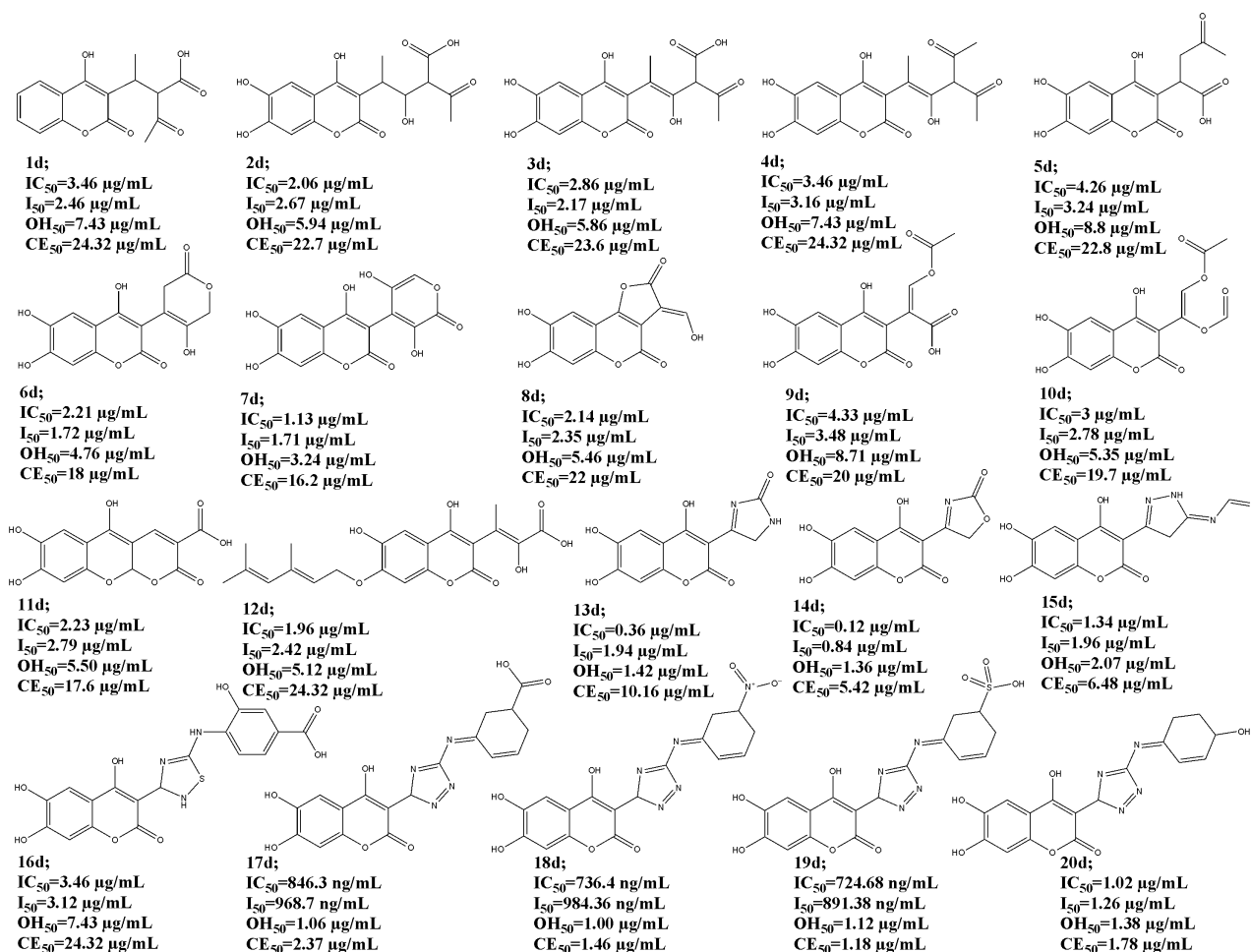
	D1 <sup>a</sup>	D2	D3	D4	D5	D6	D7	D8	D9	A1 <sup>b</sup>	A2	A3	A4	A5
<b>D1</b>	1.00													
<b>D2</b>	0.48	1.00												
<b>D3</b>	0.96	0.91	1.00											
<b>D4</b>	0.48	0.51	0.37	1.00										
<b>D5</b>	0.36	0.29	0.91	0.96	1.00									
<b>D6</b>	0.23	0.79	0.61	0.29	0.51	1.00								
<b>D7</b>	0.22	0.24	0.41	0.34	0.55	0.84	1.00							
<b>D8</b>	0.11	0.13	0.24	0.09	0.38	0.31	0.41	1.00						
<b>D9</b>	0.26	0.42	0.35	0.14	0.18	0.31	0.29	0.19	1.00					
<b>A1</b>	0.97	0.74	0.00	0.00	0.87	0.64	0.79	0.00	0.12	1.00				
<b>A2</b>	0.00	0.00	0.00	0.98	0.00	0.78	0.98	0.00	0.26	0.00	1.00			
<b>A3</b>	0.64	0.00	0.00	0.93	0.00	0.00	0.68	0.00	0.94	0.00	0.68	1.00		
<b>A4</b>	0.76	0.95	0.00	0.00	0.98	0.00	0.00	0.00	0.09	0.00	0.34	0.17	1.00	
<b>A5</b>	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.91	0.00	0.98	0.14	0.00	0.00	0.00	0.00	1.00

<sup>a</sup> D- Please see Table 3; <sup>b</sup> A1: pTAC<sub>50</sub>; A2: pIC<sub>50</sub>; A3: pI<sub>50</sub>; A4: pOH<sub>50</sub>; A5: pCE<sub>50</sub>.

### 2.7. Structure-Based Design of Novel 4-Hydroxy Coumarin Antioxidants

We have learned how carbonyl/carboxyl and substituted *N*-thiazole moieties contribute to our compounds antioxidant activity and, by the use of QSAR, we designed twenty new improved coumarin structures and calculated their values of potential scavenging and chelating activity (Figure 4).

**Figure 4.** Designed 4-hydroxy-chromene-2H-one structures with predicted biological activity *in vitro*.



Therefore, the catechol moiety [11–13] is an important structural part in the design, completing a new backbone with 1,4-pyrone system. The structures were considered in a way that modified C-3 scaffolds, extend the double bond conjugation in many, providing the large number of existing tautomeric forms obtained by the ChemSketch 12 software [27], yet retaining favorable structural properties of the test compounds.

Hence, the number of structural tautomers rises from 3 of compounds **4d** and **8d**, up to even 10 tautomers of **17d**. As the result shows, extended conjugation had improved the overall predicted antioxidant ability. The unfavorable prop-1-ene part of the **b** condensates had been modified by the total removal of the double bond (**1d**, **5d**), addition of one hydrogen group (**12d**) followed by the extension of the carbone chain (**3d**, **4d**), or exploiting carbonyl/carboxyl scaffold which led to various lactone and ether structures (**6–11d**). The sulfur atom in the thiazole ring did not contribute to the scavenging activity (Equations (2), (3)), and so is replaced by the construction of oxazole, pyrazole, imidazole and triazole rings (**13–20d**). All of the designed compounds had been subjected to the same molecular modeling methods as the original ones and the obtained molecular descriptors were used for the prediction of scavenging and chelating activity using existing QSAR equations. The residue of the triazole ring continued by the Schiff base moiety (**17d**, **18d** and **19d**) is presented as the most successful structural modification, which, along with the appropriate  $-\text{COOH}$ ,  $-\text{SO}_3\text{H}$  and  $-\text{NO}_2$  ring

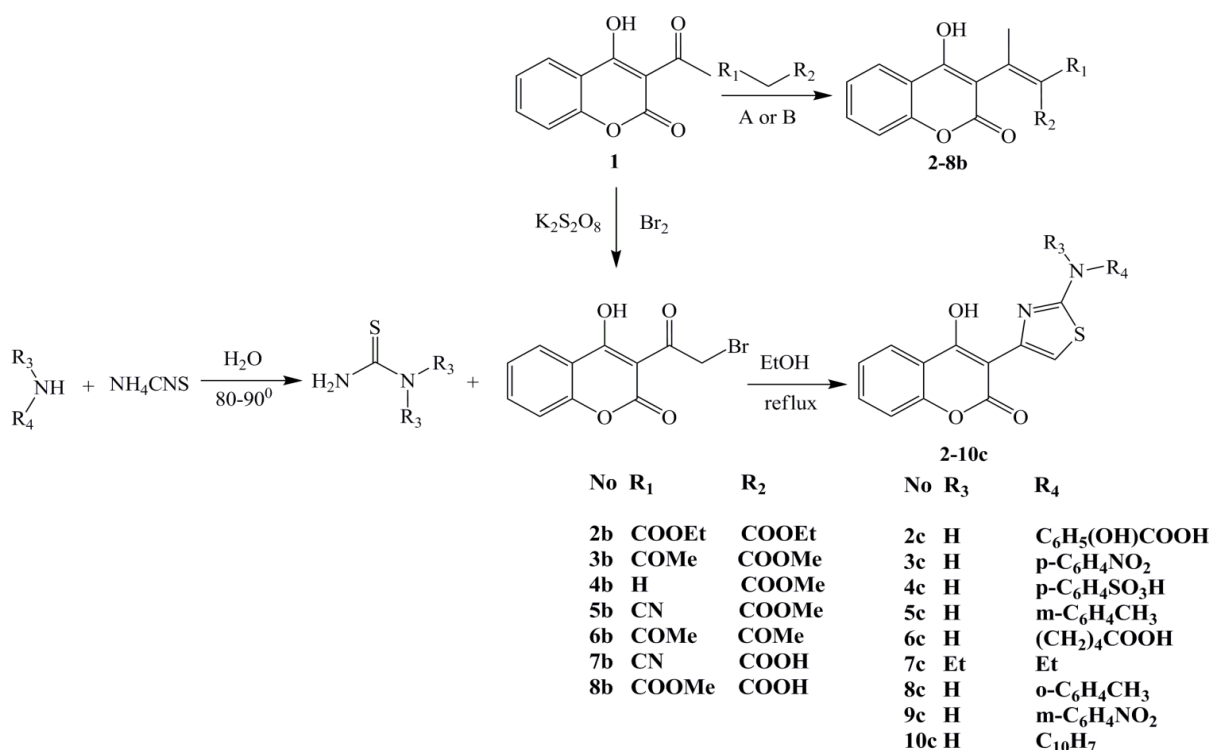
substituents, reduced the values of coumarin active concentrations to below 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  for the  $\text{IC}_{50}$  and  $\text{I}_{50}$ , and about the same value for the  $\text{OH}_{50}$  and  $\text{CE}_{50}$ . The most promising structure is, therefore, **19d** with a predicted DPPH scavenging activity of  $\text{IC}_{50} = 724.68 \text{ ng}/\text{mL}$ . The 3,5-dihydroxy-2H-pyran-2-one C-3 structural part (**7d**) contributed the most to the predicted activity of the compounds that ensued from the carbonyl/carboxyl scaffold modifications. By further synthesis and an antioxidant assessment, the design will be vindicated.

### 3. Experimental Section

#### 3.1. Chemistry

In previous papers we had reported synthesis and characterization of the group of 15 substituted chromene-2H-one derivatives (**1–10c**) (Figure 5) [17,18]. Synthesized compounds were characterized by elemental analysis (C, H, N, O and S) and determination of molecular weights by Mass Spectroscopy (MS). Structural characterization was performed by IR,  $^1\text{H}$  NMR and MS spectra. The purity of synthesized compounds over 98% was confirmed by the HPLC and TLC analysis.

**Figure 5.** Synthesized coumarin derivatives **1–10c**.



#### 3.2. Chemicals

All applied chemicals and reagents were of the highest purity available and purchased from the Sigma-Aldrich Chemical Company (St. Louis, MO, USA), Difco (Sparks, MD, USA) and Merck Laboratory Supplies (Darmstadt, Germany).

### 3.3. The Antioxidant Evaluation in Vitro

#### 3.3.1. Determination of Total Antioxidant Capacity by Phosphomolibdenum Assay

The antioxidant activity of the tested compounds was evaluated by the phosphomolibdenum method according to the procedure of Prieto [28]. The assay is based on the reduction of Mo(VI)–Mo(V) by the test compounds and subsequent formation of the green phosphate/Mo(V) complex at acid pH. An aliquot of 100  $\mu\text{L}$  of the methanol solution of the tested compounds (3.901–1000  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) was combined with 1 mL of reagent solution (0.6 M sulfuric acid, 28 mM sodium phosphate and 4 mM ammonium molybdate). The tubes containing the reaction solutions were incubated at 95  $^{\circ}\text{C}$  for 90 min. Then the absorbance of the solution was measured at 695 nm, using a Perkin-Elmer Lambda 25 UV/Vis spectrophotometer, against blank probe after cooling to room temperature. Methanol (100  $\mu\text{L}$ ) in the place of solution of the tested compound was used as the blank. The total antioxidant capacity of the tested samples was calculated according to the Equation (6):

$$\text{TAC (\%)} = [(A_0 - A_t)/A_0] \times 100 \quad (6)$$

where  $A_t$  is the absorbance value of the tested sample and  $A_0$  is the absorbance of the blank sample, in particular time. Ascorbic acid was used as reference standard. The results (TAC) are presented as the  $\mu\text{g}$  equivalents of the ascorbic acid per milliliter, obtained from the linear regression analysis. All the experiments were performed in triplicate and the average absorbance was noted for each concentration. As the TAC value is higher, the better is the antioxidant activity. Also, the results of all tests are expressed as  $\text{EC}_{50}$  values (*i.e.*,  $\text{TAC}_{50}$ ,  $\text{IC}_{50}$ ,  $\text{I}_{50}$ ,  $\text{OH}_{50}$  or  $\text{CE}_{50}$ ) presenting the concentration of the test compound that reduces 50% of the initial free reactive species concentration, calculated as  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , for various concentrations of coumarin derivatives (3.901–1000  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), with OriginPro 8 statistical software [29] using Nonlinear Curve Fit Growth/Sigmoidal Dose-response function. Percent of inhibition was plotted against concentration, and the equation was the line used to obtain  $\text{TAC}_{50}$  value. A lower  $\text{TAC}_{50}$  value indicates greater antioxidant activity.

#### 3.3.2. DPPH Radical Scavenging Assay

The method used by Takao *et al.* [30] was adopted with suitable modifications. DPPH (8 mg) was dissolved in MeOH (100 mL) to obtain a concentration of 80  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . Serial dilutions (3.901–1000  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) were carried out with the stock solutions of the compounds **1–10c** in methanol. Diluted solutions (2 mL each) were mixed with DPPH (2 mL) and allowed to stand for 30 min and 60 min for any reaction to occur. The absorbance was recorded at 517 nm. Control sample was prepared containing the same volume without test compounds and reference compounds. The radical-scavenging activity of the tested samples, expressed as percentage inhibition of DPPH, was calculated according to the Equation (7).

$$\text{IC (\%)} = [(A_0 - A_t)/A_0] \times 100 \quad (7)$$

Percent of inhibition after 30 min and 60 min was plotted against concentration, and the equation was the line used to obtain  $\text{IC}_{50}$  value. A lower  $\text{IC}_{50}$  value indicates greater antioxidant activity.

### 3.3.3. Inhibition of Lipid Peroxidation in a Linoleic Acid Emulsion Assay

The ability of coumarin derivatives to inhibit lipid chain peroxidation process was tested in a linoleic acid system [31]. Dilutions (3.901–1000  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) of the test compounds were prepared in methanol, to add to the linoleic acid emulsion. The linoleic acid emulsion was prepared by mixing 0.2804 g of linoleic acid, 0.2804 g of Tween 20 as emulsifier and 50 mL of phosphate buffer (0.2 M, pH 7) and the mixture was then homogenized. A 0.5 mL of coumarin methanol solution in different concentrations was mixed then in linoleic acid emulsion (2.5 mL, 0.02 M, pH 7) and phosphate buffer (0.2 M, pH 7). The reaction mixture was incubated at 37 °C in the dark to accelerate the peroxidation. Aliquots of 100  $\mu\text{L}$  were taken at different intervals (24–96 h) during incubation. The degree of oxidation was measured by sequentially adding ethanol (4.7 mL, 75%), ammonium thiocyanate sample solution (100  $\mu\text{L}$ , 30%) and  $\text{FeCl}_2$  (100  $\mu\text{L}$ , 0.02 M in 3.5% HCl). After 3 min, the peroxide values were determined by reading the absorbance at 500 nm. Control was performed with linoleic acid but without the tested compounds. Percent inhibition of lipid peroxide generation was calculated using Equation (8).

$$I (\%) = [(A_0 - A_t)/A_0] \times 100 \quad (8)$$

Percent inhibition was plotted against concentration, and the equation for the line was used to obtain  $I_{50}$ . All determinations were carried out in triplicate. The lower  $I_{50}$  value indicates greater antioxidant activity.

### 3.3.4. Hydroxyl Radical Scavenging Activity Assay

The evaluation of coumarins as inhibitors of hydroxyl radical-mediated oxidation was performed with method described by Halliwell *et al.* [32]. The reaction mixture contained 100  $\mu\text{L}$  of tested compounds (with 3.901–1000  $\mu\text{g}/\text{mL}$  dilutions) dissolved in ethanol, 500  $\mu\text{L}$  of 5.6 mM 2-deoxy-D-ribose in  $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{NaOH}$  buffer (50 mM, PH 7.4), 200  $\mu\text{L}$  of premixed  $\text{FeCl}_3$  (104  $\mu\text{M}$ ) and EDTA (104  $\mu\text{M}$ ) (1:1 v/v) solution, 100  $\mu\text{L}$  of  $\text{H}_2\text{O}_2$  (1.0 mM) and 100  $\mu\text{L}$  of aqueous ascorbic acid (1.0 mM). Tubes were vortexed and heated in water bath at 50 °C for 30 min. Thereafter, 1 mL of 2.8% TCA and 1 mL of 1% TBA were added to each tube with repeat of the 30 min long water heat. The extent of oxidation was estimated from the absorption of solution at 532 nm. The percentage inhibition values were calculated from the Equation (9).

$$\text{OH} (\%) = [(A_0 - A_t)/A_0] \times 100 \quad (9)$$

Percent inhibition was plotted against concentration, and the equation for the line was used to obtain  $\text{OH}_{50}$  value. The lower  $\text{OH}_{50}$  value indicates greater antioxidant activity.

### 3.3.5. Ferrous Ion Chelating Ability Assay

The ferrous ion chelating activity of methanol coumarin solutions was measured by decrease in absorbance at 562 nm of the iron(II)-ferrozine complex [33]. One milliliter of 0.125 mM  $\text{FeSO}_4$  was added to 1.0 mL of sample (with 1000–3.901  $\mu\text{g}/\text{mL}$  dilutions), followed by 1.0 mL of 0.3125 mM ferrozine. The mixture was allowed to equilibrate for 10 min before measuring the absorbance. The

ability of the sample to chelate ferrous ion was calculated relative to the control (consisting of iron and ferrozine only) using the Equation (10).

$$\text{CE (\%)} = [(A_0 - A_t)/A_0] \times 100 \quad (10)$$

Percent inhibition was plotted against concentration, and the equation for the line was used to obtain CE<sub>50</sub> value. The lower CE<sub>50</sub> value indicates greater chelating power ability.

### 3.4. Statistical Analysis

All results were expressed as means  $\pm$  standard deviation (SD). The significance of difference was calculated by one-way ANOVA test and values  $<0.05$  were considered to be significant.

### 3.5. QSAR Study

The QSAR analysis was performed correlating the antioxidant activity presented in Tables 1 and 2, with various molecular descriptors (Table 3) to reveal predictions for the lead optimization in the training set of compounds of synthesized coumarins [17,18]. Although this set is small, it provides QSAR equations that are statistically significant. The results of regression analysis are shown in Equations (1), (2), (3), (4) and (5) and by Figure 3, where  $n$  is number of molecules,  $r$  is correlation,  $F$  is Fisher's significance factor and  $s$  is standard deviation. Cross-validation resulted with  $Q^2$  as the square of predictive power of coefficient and s-PRESS as predictive residual sum of squares. The generation of the QSAR models was taken out with OriginPro 8, by the Multiple Linear Regression (MLR) analysis, using cross validation leave-one-out method. The ratios of observed vs. calculated antioxidant activity values and the correlation between the molecular descriptors and the activity are presented in the Tables 4 and 5, respectively.

#### 3.5.1. Molecular Modeling

The initial structures were built in Spartan 2006 for Windows [34] and imported in VegaZZ 2.3.1 [35] molecular modeling package. The Gasteiger charges are assigned with OPLS 2005 force field. Structures have been optimized firstly with AMMP incorporated in VegaZZ 2.3.1. The minimization was performed with 3000 steps Conjugate gradients optimizer model, 0.01 Toler and 0 steepest steps. Further, a 1000 steps Boltzman jump conformation search method was applied searching the flexible torsions only. Temperature had been set to 375.15 K, covering all of the experiment conditions. Torsion root square difference had been set to 60°. Dielectric constant of 33.6 simulated coumarin solution environment, using long range cutoff of 20 and short range of 6 Å. After the cluster analysis, on the selected lowest energy structure full optimization was performed by MOPAC 2009/PM6 [36] Hamiltonian semi empirical method imported in Vega ZZ, by fixing gradient norm as 0.01, with  $\epsilon = 33.6$  in order to include solubility of compounds **1–10c** in MeOH, according to the experiment conditions. The most stable structures, with determined final heat of formation, were selected as representative conformations in calculation was used for calculation of the electronic descriptors, presented as dominant ones in the antioxidant activity QSAR study of flavonoids, chromones, coumarins and similar plant natural products [21].

Final optimizations were performed by density functional theory (DFT) with the CS Gaussian 03 program [37]. In order to calculate bond dissociation enthalpies of 4-OH groups, optimizations of parent molecules, appropriate radicals and hydrogen radicals were considered. Therefore, parent molecules were optimized by (RO)B3LYP functional and 6-31G(d) basis set, whereas (U)B3LYP/6-31G(d) was applied for radical structures. On the optimized structures full NBO analysis was performed. The geometrical parameters of all stationary points were optimized in methanol solution by CPCM routine. All calculated structures were verified to be local minima (all positive eigenvalues) for ground state structures, by frequency calculation. The zero point vibrational energy and the vibrational contribution to the enthalpy were scaled by a factor of 0.9805 [22]. In order to obtain more reliable relative energy on each stationary point, on the potential energy surface (PES), single-point energy calculations were performed with 6-311G++(2d,2p) diffuse function. The particularly basis set was selected since the optimized molecules are conjugated ones.

### 3.5.2. Molecular Descriptors

Molecular descriptors generated for this study were electronic and steric. Solubility factor was considered for the lipid peroxidation environment. Electronic molecular descriptors obtained after optimization were: HOMO and LUMO energies,  $\Delta E$  HOMO-LUMO calculated as the difference of the energies, dipole, total energy, electronic energy, O–H bond length, with Mulliken population analysis applied for the calculation of the partial atomic charges ( $Q$ ). The molecular descriptors values are presented in the Table 3.

During the DPPH and lipid peroxidation assays, the hydroxyl group proton from the antioxidant is transferred towards the free radical. The process is, taking peroxy radical ( $\text{ROO}^\cdot$ ) as a sample, presented by Equation (11) [22].



Covering the fact that process is governed by the O-H bond dissociation enthalpy (BDE) of the antioxidant, we calculated BDE *via* the formula:  $\text{BDEs} = H_{\text{KOH}} - H_{\text{KO}} - H_{\text{H}}$ , where  $H_{\text{KOH}}$  is the enthalpy for the parent coumarin molecule,  $H_{\text{KO}}$  is the enthalpy for radical generated after H-abstraction and  $H_{\text{H}}$  is the enthalpy for hydrogen radical.

Coumarin antioxidant potential is increased with the extended conjugation, including bond orders [21] and some steric parameters like Connolly Accessible Area (CAA), Connolly Molecular Area (CMA), Connolly Solvent-Excluded Volume (CSEV) and principal moment of inertia, calculated by VEGA ZZ, as useful molecular descriptors.

## 4. Conclusions

Within the series of the examined coumarin derivatives in accordance with the presented experimental results for the total antioxidant capacity and the affinity towards DPPH, lipid peroxide and hydroxyl radicals, it was concluded that compounds **2b**, **6b**, **2c** and **4c** are notable antioxidants. Therefore, these compounds could be practically applied as antioxidant agents and as the starting compounds for future selective modifications of the coumarin molecule according to performed SAR, QSAR and experimental conditions based theoretical studies on their activity.

## Acknowledgements

This work was financially supported by Serbian Ministry of Science, Grants No. III 43004, III 41010 and OI 173020. The authors would like to thank Svetlana Marković, Faculty of Science, Kragujevac, for useful suggestions during Gasussian DFT calculations.

## References

1. Traykova, M.; Kostova, I. Coumarin derivatives and antioxidative stress. *Int. J. Pharmacol.* **2005**, *1*, 29–32.
2. Droge, W. Free radicals in the physiological control of the cell function. *Physiol. Rev.* **2002**, *82*, 47–95.
3. Halliwell, B. How to characterize a biological antioxidant. *Free Rad. Res.* **1990**, *9*, 1–32.
4. Juliano, L.; Colavita, A.R.; Leo, R.; Pratico, D.; Violi, F. Oxygen free radicals and platelet activation. *Free Rad. Biol. Med.* **1997**, *22*, 999–1006.
5. Lassegue, B.; Griendling, K.K. Reactive oxygen species in hypertension. *Am. J. Hyper.* **2004**, *17*, 852–860.
6. McIntosh, L.J.; Trush, M.A.; Tronsoco, J.C. Increased susceptibility of Alzheimer's disease temporal cortex to oxygen-free radical-mediated processes. *Free Rad. Biol. Med.* **1997**, *23*, 183–190.
7. Festa, G.; Aglitti, T.; Duranti, G.; Ricordi, R.; Perticone, P.; Cozzi, R. Strong antioxidant activity of ellagic acid in mammalian cells *in vitro* revealed by comet assay. *Anticancer Res.* **2001**, *21*, 3903–3908.
8. Hoult, J.; Paya, M. Pharmacological and biochemical actions of simple coumarins: Natural products with therapeutic potential. *Gen. Pharmacol.* **1996**, *27*, 713–722.
9. Nićiforović, N.; Mihailović, V.; Mašković, P.; Solujić, S.; Stojković, A.; Pavlović Muratspahić, D. Antioxidant activity of selected plant species; potential new sources. *Food Chem. Toxicol.* **2010**, *48*, 3125–3130.
10. Sinhg, R.; Singh, B.; Singh, S.; Kumar, N.; Kumar, N.; Arora, S. Umbeliferone—An antioxidant isolated from *Acacia nilotica* (L.) Willd. Ex. Del. *Food Chem.* **2010**, *120*, 825–830.
11. Wu, C.; Huang, M.; Lin, Y.; Ju, H.; Ching, H. Antioxidant properties of *Cortex Fraxini* and its simple coumarins. *Food Chem.* **2007**, *104*, 1464–1471.
12. Ismail, M.; Ibrar, M.; Iqbal, Z.; Hussain, J.; Hussain, H.; Ahmed, M.; Ejaz, A.; Choudhary, M.I. Chemical constituents and antioxidant activity of *Geranium wallichianum*. *Rec. Nat. Prod.* **2009**, *3*, 193–197.
13. Thuong, P.T.; Hung, M.T.; Ngoc, T.M.; Ha do, T.; Min, S.B.; Kwack, J.S.; Kang, S.T.; Choi, S.J.; Bae, H.K. Antioxidant activities of coumarins from Korean medicinal plants and their structure-activity relationships. *Phytother. Res.* **2010**, *24*, 101–106.
14. Čavar, S.; Kovač, F.; Maksimović, M. Synthesis and antioxidant activity of selected 4-methylcoumarins. *Food Chem.* **2009**, *117*, 135–142.
15. Kontogiorgis, A.C.; Hadjipavlou-Litina, J.D. Synthesis and biological evaluation of novel coumarin derivatives with a 7-azomethine linkage. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2004**, *14*, 611–614.



17. Mladenović, M.; Vuković, N.; Nićiforović, N.; Sukdolak, S.; Solujić, S. Synthesis and molecular descriptor characterization of novel 4-hydroxy-chromene-2-one derivatives as antimicrobial agents. *Molecules* **2009**, *14*, 1495–1512.
18. Vuković, N.; Sukdolak, S.; Solujić, S.; Milošević, T. Synthesis and antimicrobial evaluation of some novel 2-aminothiazole derivatives of 4-hydroxy-chromene-2-one. *Arch. der Pharm.* **2008**, *341*, 491–496.
19. Pope, M.; Swenberg, E.C. *Electronic Processes in Organic Crystals and Polymers*, 2nd ed.; Oxford Science Publications, Oxford University Press: New York, NY, USA, 1999; pp. 143–197.
20. Vuković, N.; Sukdolak, S.; Solujić, S.; Nićiforović, N. Substituted imino and amino derivatives of 4-hydroxycoumarins as novel antioxidant, antibacterial and antifungal agents: Synthesis and *in vitro* assessments. *Food Chem.* **2010**, *120*, 1011–1018.
21. Marković, S.Z.; Manojlović, T.N. DFT study on the reactivity of OH groups in emodin: Structural and electronic features of emodin radicals. *Monats. Chem.* **2009**, *140*, 1311–1318.
22. Zhang, Y.H.; Wang, F.L. Theoretical elucidation of structure–activity relationship for coumarins to scavenge peroxyl radical. *J. Mol. Struct. (TEOCHEM)* **2004**, *673*, 199–202.
23. Duh, P.D.; Tu, Y.Y.; Yen, G.C. Antioxidant activity of aqueous extract of Harnjyur (*Chrysanthemum morifolium* Ramat). *Lebensmwiss Technol.* **1999**, *32*, 269–277.
24. Selassie, C.D. History of quantitative structure-activity relationships. In *Burger's Medicinal Chemistry & Drug Discovery*, 6th ed.; Abraham, D.J., Ed.; John Wiley and Sons, Inc.: New York, NY, USA, 2003; Volume 1, pp. 1–48.
25. Liu, J.K.; Hu, L.; Dong, Z.J.; Hu, Q. DPPH radical scavenging activity of ten natural *p*-terphenyl derivatives obtained from three edible mushrooms indigenous to China. *Chem. Biodiver.* **2004**, *1*, 601–605.
26. Marx, J.L. Oxygen free radicals linked to many diseases. *Science* **1985**, *235*, 529–531.
27. Spessard, O.G. ACD Labs/LogP dB 3.5 and ChemSketch 3.5. *J. Chem. Inform. Comp. Sci.* **1998**, *38*, 1250–1253.
28. Prieto, P.; Pineda, M.; Aguilar, M. Spectrophotometric quantification of antioxidant capacity through the formation of a phosphomolybdenum complex: Specific application to the determination of vitamin E. *Anal. Biochem.* **1999**, *269*, 337–341.
29. Origin Pro 8. OriginLab Corporation, One Roundhouse Plaza: Northampton, MA, USA, 2009.
30. Takao, T.; Watanabe, N.; Yagi, I.; Sakata, K. A simple screening method for antioxidants and isolation of several antioxidants produced by marine bacteria from fish and shellfish. *Biosci. Biotech. Biochem.* **1994**, *58*, 1780–1783.
31. Masude, T.; Isibe, D.; Jitoe, A.; Naramati, N. Antioxidant curcuminoids from rhizomes of *Curcuma zanthorrhiza*. *Phytochemistry* **1992**, *33*, 3645–3647.
32. Halliwell, B.; Gutteridge, J.M.C.; Aruoma, O. The deoxyribose method: A simple “test-tube” assay for determination of rate constants for reactions of hydroxyl radicals. *Anal. Biochem.* **1987**, *165*, 215–219.
33. Carter, P. Spectrophotometric determination of serum iron at the submicrogram level with a new reagent (ferrozine). *Anal. Biochem.* **1971**, *40*, 450–458.
34. Software Spartan for Windows. Wavefunction, Inc.: Irvine, CA, USA, 2006.

35. Pedretti, A.; Villa, A.; Vistoli, G. VEGA: A versatile program to convert, handle and visualize molecular structure on Windows-based PCs. *J. Mol. Graph. Model.* **2002**, *21*, 47–49.
36. MOPAC 2009. Stewart Computational Chemistry: Colorado Springs, CO, USA, 2009. Available online: <http://www.openMOPAC.net> (accessed on 13 April 2011).
37. Frisch, M.J.; Trucks, G.W.; Schlegel, H.B.; Scuseria, G.E.; Robb, M.A.; Cheeseman, J.R.; Montgomery, J.A., Jr.; Vreven, T.; Kudin, K.N.; Burant, J.C.; Millam, J.M.; Iyengar, S.S.; Tomasi, J.; Barone, V.; Mennucci, B.; Cossi, M.; Scalmani, G.; Rega, N.; Petersson, G.A.; Nakatsuji, H.; Hada, M.; Ehara, M.; Toyota, K.; Fukuda, R.; Hasegawa, J.; Ishida, M.; Nakajima, T.; Honda, Y.; Kitao, O.; Nakai, H.; Klene, M.; Li, X.; Knox, J.E.; Hratchian, H.P.; Cross, J.B.; Bakken, V.; Adamo, C.; Jaramillo, J.; Gomperts, R.; Stratmann, R.E.; Yazyev, O.; Austin, A.J.; Cammi, R.; Pomelli, C.; Ochterski, J.W.; Ayala, P.Y.; Morokuma, K.; Voth, G.A.; Salvador, P.; Dannenberg, J.J.; Zakrzewski, V.G.; Dapprich, S.; Daniels, A.D.; Strain, M.C.; Farkas, O.; Malick, D.K.; Rabuck, A.D.; Raghavachari, K.; Foresman, J.B.; Ortiz, J.V.; Cui, Q.; Baboul, A.G.; Clifford, S.; Cioslowski, J.; Stefanov, B.B.; Liu, G.; Liashenko, A.; Piskorz, P.; Komaromi, I.; Martin, R.L.; Fox, D.J.; Keith, T.; Al-Laham, M.A.; Peng, C.Y.; Nanayakkara, A.; Challacombe, M.; Gill, P.M.W.; Johnson, B.; Chen, W.; Wong, M.W.; Gonzalez, C.; Pople, J.A. *Gaussian 03*, Revision C.02; Gaussian, Inc.: Wallingford, CT, USA, 2003.

© 2011 by the authors; licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution license (<http://creativecommons.org/licenses/by/3.0/>).

## **Биографија са подацима о досадашњем раду**

Милан Младеновић рођен је у Пироту 13.05.1984. године. Основну школу „Вук Караџић” и Гимназију у Пироту завршио је са одличним успехом. Природно-математички факултет у Крагујевцу, смер Хемија, уписао је школске 2003/2004, где је и дипломирао 2008. године са просечном оценом 8,90. Докторске академске студије хемије-смер Биохемија уписао је 2008. године на Природно-математичком факултету у Крагујевцу под менторством проф. др Славице Солујић, редовног професора Природно-математичког факултета у Крагујевцу.

По упису на докторске студије, у периоду од фебруара 2009. до децембра 2010. године Милан Младеновић био је стипендиста Министарства за науку и технолошки развој Републике Србије за област хемија, број уговора **542**. Изабран је у истраживачко звање **истраживач-приправник** за ужу научну област хемија Хемија, у Институту за хемију факултета 11. 03. 2009. године. Од 01.01.2011. године Милан Младеновић засновао је радни однос са Природно-математичком факултетом у Крагујевцу као истраживач-приправник на Пројекту Министарства просвете и науке Република Србије број Ш43004. На седници наставно-научног Већа Факултеа од 16.02.2011. године Милан Младеновић изабран је у научно звање **истраживач-сарадник** за ужу научну област хемија Хемија, у Институту за хемију.

Милан Младеновић ангажован је у настави на предметима **Хемија природних производа**, **Биохемија физиолошки активних једињења** и **Биохемија ћелије** на институту за хемију, односно **Биофармација** на Медицинском факултету у Крагујевцу, одсек Фармација, где успешно води експерименталне вежбе од почетка докторских студија. Коаутор је **Приручника за вежбе из Биофармације** који је у припреми за рецензију и штампу као званични уџбеник Природно-математичког факултета у Крагујевцу.

Милан Младеновић је у току досадашњих студија и рада показао изразити смисао за бављење научно-истраживачким радом у области биохемије и медицинске хемије.

