



УНИВЕРЗИТЕТ У КРАГУЈЕВЦУ
ПРИРОДНО-МАТЕМАТИЧКИ ФАКУЛТЕТ

Ненад Вуковић

**ХЕМИЈСКА СИНТЕЗА И БИОХЕМИЈСКА АКТИВНОСТ НОВИХ
ДЕРИВАТА 4-ХИДРОКСИ КУМАРИНА**

Докторска дисертација

Крагујевац, 2010.

ИНДЕТИФИКАЦИОНА СТРАНИЦА ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ

I. Аутор

Име и презиме: Ненад Вуковић

Датум и место рођења: 30. 05. 1976. године, Пријепоље

Садашње запослење: Природно-математички факултет у Крагујевцу

II. Докторска дисертација

Наслов: Хемијска синтеза и биохемијска активност нових деривата
4-хидрокси кумарина

Број страница: 143

Број слика: 52; број табела 40

Број библиографских података: 86

Установа и место где је рад израђен: ПМФ Крагујевац

Научна област (УДК): Хемија

Ментор: др Слободан Сукдолак

III. Оцена и одбрана

Датум пријаве теме: 22. 04. 2009. године (одлука бр. 270/V-1)

Број одлуке и датум прихватања докторске дисертације:

Комисија за оцену подобности теме и кандидата:

1. Др Слободан Сукдолак, в. професор
Природно-математички факултет, Крагујевац
Научна област: Биохемија
2. Др Славица Солујић, в. професор
Природно-математички факултет, Крагујевац
Научна-област: Биохемија
3. Др Влатка Вајс, научни саветник
Центар за хемију, Институт за хемију, технологију и металургију, Београд
Научна област: Хемија природних производа, Биохемија

Комисија за оцену подобности теме и кандидата:

Комисија за оцену докторске дисертације:

1. Др Слободан Сукдолак, в. професор
Природно-математички факултет, Крагујевац
Научна област: Биохемија
2. Др Славица Солујић, в. професор
Природно-математички факултет, Крагујевац
Научна-област: Биохемија
3. Др Влатка Вајс, научни саветник
Центар за хемију, Институт за хемију, технологију и металургију, Београд
Научна област: Хемија природних производа, Биохемија

Комисија за одбрану докторске дисертације:

1. Др Слободан Сукдолак, в. професор
Природно-математички факултет, Крагујевац
Научна област: Биохемија
2. Др Славица Солујић, в. професор
Природно-математички факултет, Крагујевац
Научна-област: Биохемија
3. Др Влатка Вајс, научни саветник
Центар за хемију, Институт за хемију, технологију и металургију, Београд
Научна област: Хемија природних производа, Биохемија

Датум одбране дисертације:

ИЗВОД

Садржај докторске дисертације обухвата две научне целине: први део обухвата хемијске синтезе деривата 4-хидроксикумарина, идентификацију хемијске структуре и хемијске модификације уведених фармакофора. Друга научна целина иза за циљ да одговори како промена функционалних група на основном молекулу 4-хидроксикумарина утиче на неке облике биохемијске активности као што су антиоксидативна активност, антимикуробна активност и антикоагулативна активност.

У том смислу, у првом делу докторске дисертације приказани су поступци хемијске синтезе, односно, функционализације положаја С-3 у полазном молекулу 4-хидроксикумарина, у сврху добијања једанаест 2-аминотиазолинских деривата, осам имино и осам аминоксидних деривата 4-хидроксикумарина.

Увођење тиазолинске фармакофоре у молекул 4-хидроксикумарина изведено је Hantzsch-овом реакцијом еквимоларних количина одговарајућег тиоуреа деривата и 3-(2-бромацетил)-4-хидроксикумарина, у кључалом етанолу. Тиазолонски деривати 4-хидроксикумарина добивени су у високом приносу.

Увођење имино фармакофоре у молекул 4-хидроксикумарина изведено је на два начина:

а) конвенционалном методом кондензације еквимоларних количина одговарајућег амина и 3-ацетил-4-хидроксикумарина,

б) методом под дејством микроталасног зрачења. Ова метода је потврдила битне експерименталне предности које се огледају у мањем времену потребном за одвијање реакције као и повећању приноса једињења која се синтетишу.

Имино деривати 4-хидроксикумарина су, као полазни супстрати, употребљени за реакцију редукције у циљу добијања одговарајућих аминоксидних деривата 4-хидроксикумарина.

Хемијска структура свих 27 синтетисаних деривата 4-хидроксикумарина је идентификована и потврђена на основу резултата спектралних анализа (^1H NMR, ^{13}C NMR, MS) и елементарне анализе.

Хемијским путем синтетисани и структурно окарактерисани деривати 4-хидроксикумарина (укупно 27 деривата) даље су укључени у испитивање биохемијске активности и то: антиоксидативне активности, антимикуробне активности и антикоагулативне активности.

У том смислу, одређивана је антиоксидативна активност једињења применом пет различитих метода, у циљу дефинисања видова антиоксидативне активности (укупна антиоксидативна активност, антирадикалска активност методом са DPPH, редуктивна активност, инхибиција липидне пероксидације у присуству линолеинске киселине и ОН антирадикалска активност).

Констатовано је да су аминоксидни деривати 4-хидроксикумарина (61c-68c) јачи антиоксиданси од полазних имино деривата 4-хидроксикумарина (61b-68b), при томе, дериват 65c, са *p*-нитрофениламино групом је најјачи антиоксиданс. Исти тренд испитивана једињења показују и према DPPH реагенсу.

Наведени резултати су у потпуној сагласности са обимом редуктивне активности испитиваних једињења за коју су имино деривати 4-хидроксикумарина бољи супстрати од аминоксидних деривата 4-хидроксикумарина. При томе, једињење 67c, са бензиламино фармакофором је најјачи редуктант.

Обим липидне пероксидације испитиваних деривата кумарина је приметно већи у поређењу са аскорбинском киселином, тј. ови деривати кумарина су јачи антиоксиданси. Највећа активност у односу на стандардни антиоксиданс ВНТ је измерена код деривата кумарина са *p*-толилимино фармакофором (62b) при концентрацији од 1000 μ M.

Сви тестирани кумарини су се показали као јачи инхибитори формирања хидроксил радикала од аскорбинске киселине, при чему је као и према DPPH реагенсу, већа активност забележена код супстрата са аминок групом (61c-68c), док је једињење са *p*-нитрофенил фармакофором (65c) најјачи антиоксиданс.

Антимикробна активности испитиваних деривата кумарина је одређивана код бактерија и гљива применом две методе: макродилуционе и микродилуционе методе. Добијени резултати су показали зависност антимикробне активности од природе фармакофоре везане на положај 3 молекуле 4-хидроксикумарина.

У серији кумарина са тиазолинском фармакофором једино супстрат са *m*-нитрофенил фармакофором (58c) према бактерији *S. aureus* показује активност комплементарну стрептомицину, док је антифунгална активност једнака кетоканазолу уочена само код једињења са метил (50c), *m*-толил (54c) и *m*-нитрофенил (58c) фармакофорама према гљиви *M. mucedo*.

Амино деривати 4-хидроксикумарина су се показали као јачи антибактеријски супстрати од полазних имино деривата, при чему једињења са фенил, толил и *p*-нитрофенил фармакофорама (61c-65c) показују четири пута већу активност према *E. coli* у односу на примењени стандард. У серији имино највећу антибактеријску активност су показала једињења са бензил (67b) и $-(\text{CH}_2)_4\text{COOH}$ (68b) фармакофором. Једињења 61b-68b поседују већу антифунгалну активност у односу на једињења 61c-68c, при чему ни један од тестираних кумарина нема активност једнаку кетоканазолу.

Антикоагулантна активност испитиваних деривата кумарина је одређена модификованом методом по Квику, а добијени резултати су показали да највећу активност има имино дериват са фармакофором типа $-(\text{CH}_2)_4\text{COOH}$ (68b) и у поређењу са варфарином и аценокумаролом је ефикаснији антикоагулант.

SUMMARY

This dissertation includes two scientific wholes. The first whole includes chemical syntheses of 4-hydroxy coumarin derivatives, identification of the chemical structure and chemical modifications of the introduced pharmacophores. The second scientific whole aims to explain how replacement of functional groups on a 4-hydroxy coumarin starting compound affects some of the biochemical activities, such as antioxidative, antimicrobial and anticoagulative activities.

Accordingly, the first part of this dissertation shows procedures of chemical syntheses, i.e. functionalization of C-3 in 4-hydroxy coumarin starting compound in order to obtain eleven 2-aminothiazoline derivatives, eight imino derivatives of 4-hydroxy coumarin and eight amino derivatives of 4-hydroxy coumarin.

Introduction of thiazoline pharmacophore into 4-hydroxy coumarin compound was performed using Hantzsch reaction of equimolar amounts of the appropriate thiourea derivative and 3-(2-bromoacetyl)-4-hydroxy coumarin in boiling ethanol. Thiazoline derivatives of 4-hydroxy coumarin were obtained in high yield.

Introduction of imino pharmacophores into 4-hydroxy coumarin compound was performed in two ways:

- a) conventional method of condensation of equimolar amounts of the appropriate amine and 3-acetyl-4-hydroxy coumarin and
- b) microwave assisted method. This method confirmed significant experimental advantages in terms of decreased time of reaction and increased yields of the synthesized compounds.

Imino derivatives of 4-hydroxy coumarins were used as starting substrates in reduction reaction to obtain the corresponding amino derivatives of 4-hydroxy coumarins.

Chemical structures of all twenty-seven synthesized 4-hydroxy coumarin derivatives were identified and confirmed by spectral analyses data (IC, ^1H NMR, ^{13}C NMR, MS) and elemental analysis.

Chemically synthesized and structurally characterized 4-hydroxy coumarin derivatives (twenty-seven derivatives in total) were then involved in examination of their biochemical activity, i.e. antioxidative activity, antimicrobial activity and anticoagulative activity.

Accordingly, antioxidative activity of the compounds was determined using five different methods, in order to define specific kinds of antioxidative activity (total antioxidative activity, antiradical activity by DPPH method, reductive activity, inhibition of lipid peroxidation in linoleic acid and OH antiradical activity).

It was determined that amino derivatives of 4-hydroxy coumarins (*61c-68c*) were stronger antioxidants than the starting imino derivatives of 4-hydroxy coumarins (*61b-68b*), derivative *65c* with *p*-nitrophenylamino group being the strongest antioxidant. Examined compounds show the same trend with DPPH reagent.

These results are completely in accordance with the range of the examined compounds reductive activity for which imino derivatives of 4-hydroxy coumarin are better substrates than amino derivatives of 4-hydroxy coumarin. In addition, compound *67c*, containing benzylamino pharmacophore, is the strongest reducing agent.

The range of lipid peroxidation of the examined coumarin derivatives is markedly bigger than the range of ascorbic acid, i.e. these coumarin derivatives are stronger antioxidants. The strongest activity, in comparison to a standard antioxidant BHT, was

measured at the coumarine derivative with p-tolylimino pharmacophore (62b), at a concentration of 1000 μ M.

All examined coumarins proved to be stronger inhibitors of hydroxyl radicals forming than the ascorbic acid, where, similarly as with DPPH reagent, substrates with amino group (61c-68c) show stronger activity, and the compound with p-nitrophenyl pharmacophore (65c) is the strongest antioxidant.

Antimicrobial activity of the examined coumarine derivatives was being determined against the fungi and the bacteria, using two methods- macrodilution and microdilution methods. Obtained results show that antimicrobial activity depends on the kind of the pharmacophore bonded at the 3-position of a 4-hydroxy coumarin compound.

In the series of coumarins with thiazoline pharmacophore, only a substrate with m-nitrophenyl pharmacophore (58c) showed the activity against bacteria *S. aureus* complementary to that of streptomycin, while the antifungal activity equal to that of ketoconazole could be seen only with compounds with methyl (50c), m-tolyl (54c) and m-nitrophenyl (58c) pharmacophores against fungi *M. mucedo*.

Amino derivatives of 4-hydroxy coumarine proved to be stronger antibacterial substrates than the starting imino derivatives, where the compounds with phenyl, tolyl and p-nitrophenyl pharmacophores (61c-65c) showed the activity against *E. coli* four times stronger than the activity of the applied standard. In the series of imines, compounds with benzyl (67b) and $-(\text{CH}_2)_4\text{COOH}$ (68b) pharmacophores showed the strongest antibacterial activity. Compounds 61b-68b showed stronger antifungal activity than compounds 61c-68c, where none of the examined coumarins showed activity equal to that of ketoconazole.

Anticoagulative activity of the examined coumarin derivatives was determined using a modified Quick's method, and the obtained results show that the imino derivative with $-(\text{CH}_2)_4\text{COOH}$ pharmacophore (68b) possesses the strongest activity and is a more efficient anticoagulant than warfarin and acenocoumarol.

1.				1
1.1.				2
1.2.				6
1.2.1.				7
1.2.2.				9
1.2.3.				16
1.2.4.				20
1.2.4.1.				20
1.2.4.2.				20
1.2.4.3.				21
1.2.4.4.				21
1.2.4.5.				22
1.2.4.6.				23
1.2.4.7.				24
1.2.4.8.			- HIV	25
1.2.4.9.				25
1.2.4.10.				26
2.				28
2.1.			4-	29
2.1.1.				29
2.1.2.		2-		29
	4-			
2.1.3.			4-	31
2.1.3.1.				31
2.1.3.2.				31
2.1.4.			4-	31
2.2.				34
2.2.1.				34
2.2.2.	2-		4-	35
2.2.3.		4-		39
2.2.4.		4-		43
2.3.				48
2.3.1.				48
2.3.2.			DPPH	51
2.3.3.				57
2.3.4.				61

2.3.5.				66
2.4.				70
2.4.1.				70
2.4.2.			4-	74
	<i>in vitro</i>			
2.4.2.1.			2-	74
	4-			
2.4.2.2.				4- 77
2.5.				<i>in vitro</i> 83
3.				85
3.1.			4-	87
3.1.1.		4-	(64c-74c)	87
3.1.2.		4-	(77b-84b, 77c-84c)	91
3.2.			-4- (77b-84b)	96
	-4-		(77c-84c)	
3.2.1.			-4-	96
	(77c- 84c)	(77b-84b)	-4-	
3.2.2.			-4-	98
	(77b-84b)	4-	(77c-84c)	
	DPPH			
3.2.3.			-4- (77b-84b)	106
	-4-		(77c-84c)	
3.2.4.				112
3.2.5.		OH		116
3.3.			4-	121
3.3.1.		2-		121
	4-	(64c-74c)	<i>in vitro</i>	
3.3.2.		2-		124
	4-	(64c-74c)	<i>in vitro</i>	
3.3.3.			-4-	127
	-4-		(77b-84b, 77c-84c)	<i>in vitro</i>
3.3.4.			-4-	131
	-4-		(77b-84b, 77c-84c)	<i>in vitro</i>
3.4. <i>In vitro</i>			-4-	135
	-4-		(77b-84b, 77c-84c)	
4.				139

Табеле

Табела 1. Потребна концентрација за 50 % инхибицију раста различитих фунгалних врста	13
Табела 2. Инхибиција <i>protein kinase</i> при концентрацији кумаринских деривата од 200 μM	27
Табела 3. Синтетисани тиоуреа деривати и 2-аминотиазолински деривати 4-хидроксикумарина	30
Табела 4. Синтетисани имино и аминоксид деривати 4-хидроксикумарина	33
Табела 5. Апсорбанце раствора имино и аминоксид деривата 4-хидроксикумарина	50
Табела 6. Укупни антиоксидативни капацитет имино и аминоксид деривата 4-хидроксикумарина	50
Табела 7. Апсорбанце и проценат инхибиције DPPH радикала серије разблажења имино и аминоксид деривата 4-хидроксикумарина по истеку 30 минута	54
Табела 8. Апсорбанце и проценат инхибиције DPPH радикала серије разблажења имино и аминоксид деривата 4-хидроксикумарина по истеку 60 минута	55
Табела 9. DPPH антирадикалска активност имино и аминоксид деривата 4-хидроксикумарина	56
Табела 10. Редуктивна способност RP серије разблажења имино и аминоксид деривата 4-хидроксикумарина	59
Табела 11. Редуктивна активност имино и аминоксид деривата 4-хидроксикумарина представљена као RP ₅₀ вредност	59
Табела 12. Апсорбанце контролног узорка и серије разблажења имино и аминоксид деривата у функцији концентрације и времена	63
Табела 13. Проценти инхибиције процеса липидне пероксидације у емулзионом систему линолеинске киселине раствора имино деривата 4-хидроксикумарина	64
Табела 14. Проценти инхибиције процеса липидне пероксидације у емулзионом систему линолеинске киселине раствора аминоксид деривата 4-хидроксикумарина	65
Табела 15. Проценти инхибиције хидроксил радикала насталих у Фентоновој реакцији у функцији концентрације имино и аминоксид деривата 4-хидроксикумарина	68
Табела 16. Концентрације у $\mu\text{g/mL}$ имино и аминоксид деривата 4-хидроксикумарина потребне за инхибицију 50 % хидроксил радикала насталих у Фентоновој реакцији	68
Табела 17. Оптичка густина у функцији густине инокулума	73
Табела 18. Антибактеријска активност 2-аминотиазолинских деривата 4-хидроксикумарина	76
Табела 19. Антифунгална активност 2-аминотиазолинских деривата 4-хидроксикумарина	76

Табела 20. Антибактеријска активност имино и аминоксидних деривата 4-хидроксикумарина	81
Табела 21. Антифунгална активност имино и аминоксидних деривата 4-хидроксикумарина	82
Табела 22. <i>In vitro</i> антикоагулантна активност имино и аминоксидних деривата 4-хидроксикумарина	84
Табела 23. Тачке топљења и карактеристични спектрални подаци тиоуреа деривата (66b, 68b, 70b-72b)	89
Табела 24. Тачке топљења и карактеристични спектрални подаци 2-аминотиазолинских деривата (64c-74c)	89
Табела 25. Приноси и време реакције добијања имино деривата (77b-84b)	92
Табела 26. Тачке топљења и карактеристични спектрални подаци имино деривата (77b-84b)	93
Табела 27. Тачке топљења и карактеристични спектрални подаци аминоксидних деривата (77c-84c)	93
Табела 28. Укупна антиоксидативна активност деривата имино-4-хидроксикумарина (77b-84b) и деривата аминоксидних деривата (77c-84c)	96
Табела 29. Антирадикалска активност (μM) деривата имино-4-хидроксикумарина и деривата аминоксидних деривата методом са DPPH у току 30 и 60 минута	99
Табела 30. Резултати линеарне регресионе анализе за DPPH методу	101
Табела 31. Редуктивна активност имино и аминоксидних деривата 4-хидроксикумарина	107
Табела 32. Резултати линеарне регресионе анализе за методу одређивања редуктивне активности	109
Табела 33. Инхибиција липидне пероксидације под утицајем деривата имино-4-хидроксикумарина и деривата аминоксидних деривата	113
Табела 34. Инхибиција формирања хидрокси радикала у присуству деривата имино-4-хидроксикумарина и деривата аминоксидних деривата	117
Табела 35. Резултати линеарне регресионе анализе за ОН антирадикалску методу	118
Табела 36. Антибактеријска активност 2-аминотиазолинских деривата 4-хидроксикумарина	122
Табела 37. Антифунгална активност 2-аминотиазолинских деривата 4-хидроксикумарина	125
Табела 38. Антибактеријска активност деривата имино-4-хидроксикумарина и деривата аминоксидних деривата	128
Табела 39. Антифунгална активност деривата имино-4-хидроксикумарина и деривата аминоксидних деривата	132
Табела 40. <i>In vitro</i> антикоагулантна активност деривата имино-4-хидроксикумарина и деривата аминоксидних деривата	136

Слике

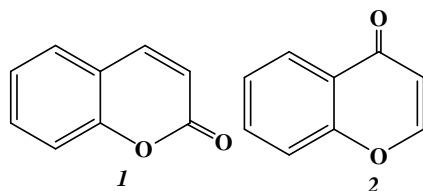
Слика 1. Кумарин и хромон	2
Слика 2. Део резонанционих структура бензопиранског језгра	2
Слика 3. Приказ електронакцепторског дејства карбонилне групе	3
Слика 4. Приказ реакција напада електрофилног агенса на кумарински прстен: а) блажи реакциони услови; б) енергичнији реакциони услови	3
Слика 5. Реакција кумарина са натријум бисулфитом	4
Слика 6. Реакције кумарина са јаким нуклеофилним реагенсима	4
Слика 7. Реакције хидрирања кумарина	5
Слика 8. 7-хидроксикумарин	6
Слика 9. Биотрансформација кумарина до сулфата и глукуронида	6
Слика 10. 7,8-Дихидрокси-4-метилкумарин и 4-метилкумарин	8
Слика 11. 4-хидрокси супституисани кумарини	8
Слика 12. Ангуларни и линеарни тетрахидро супституисани кумарин 4-карбоксилати	9
Слика 13. Бергаптен	9
Слика 14. Новобиоцин	10
Слика 15. 4-Хидрокси кумарински деривати као антибактеријски агенси	10
Слика 16. Аморезинол и острутин	10
Слика 17. Антифунгални ефекат лиофилизованог екстракта <i>Ruta graveolens</i>	11
Слика 18. Ефекат 8-МОР (А) и 5-МОР (В) (четири различите концентрације) на степен раста <i>F. solani</i> , <i>P. lycopersici</i> и <i>T. viride</i>	12
Слика 19. 5-Метоксипсорален и 8-метоксипсорален	13
Слика 20. Новобиоцин: $R_1=Me$, $R_2=NH_2$ 16; хлоробиоцин: $R_1=Cl$, $R_2=2\text{-metilpirol}$ 23	14
Слика 21. Приказ утицаја 5',5'-диметил групе новиозе на активност кумаринских антибиотика	14
Слика 22. Интеракција између 24 kDa N-терминалног протеинског фрагмента <i>giraze</i> В из <i>E. coli</i> са хлоробиоцином и новобиоцином	16
Слика 23. Дикумарол	16
Слика 24. Приказ структурне аналогије витамина К и 4-хидроксикумаринског система	17
Слика 25. Приказ ензимске γ -карбоксилације остатка глутаминске киселине уз редукцију дихидровитамина К до витамин К 2,3-епоксида	17
Слика 26. Механистички модел редукције витамин К 2,3-епоксида и инхибиције са варфарином	18
Слика 27. Циклокумарол	18
Слика 28. Аценокумарол и 4-метил-3-фенил-пирано[3,2-с]-хромен-2,5-дион	19
Слика 29. Маркумар и варфарин	19
Слика 30. Скополетин и умбелиферон	20

Слика 31. 4-(Арилоксиметил)кумарински деривати као антиинфламаторни супстрати	21
Слика 32. Карбохромен	21
Слика 33. Виснадин и самидин	22
Слика 34. Естрадиол и кумарински деривати са естрогеним дејством	22
Слика 35. 7-Хидрокси-4-метил-8-пиперидин-1-илметил-хромен-2-он	23
Слика 36. Есупрон и LU53439	24
Слика 37. Афлатоксини М ₁ и М ₂	24
Слика 38. (+)-Каланолид А и (-)-каланолид В	25
Слика 39. Калепин	26
Слика 40. Антиканцерогени агенс на Sarcom W ₂₅₆	26
Слика 41. Дафнетин	27
Слика 42. Графички приказ функционалне зависности различитих концентрација раствора аскорбинске киселине у односу на апсорбанце раствора са параметрима једначине линеарне регресионе анализе	49
Слика 43. Графичка зависност % инхибиције DPPH радикала након 30 минута у односу на концентрацију супстрата 65c са параметрима линеарне регресионе анализе (прве четири тачке су изузете)	53
Слика 44. Графичка зависност % инхибиције DPPH радикала након 60 минута у односу на концентрацију супстрата 65c са параметрима линеарне регресионе анализе (прве четири тачке су изузете)	53
Слика 45. Графички приказ зависности редуктивне способности у односу на концентрацију супстрата 67c са параметрима линеарне регресионе анализе	60
Слика 46. Графички приказ зависности редуктивне способности у односу на концентрацију супстрата 61b са параметрима линеарне регресионе анализе (без задње четири тачке)	60
Слика 47. Графички приказ зависности ОН антирадикалске активности у односу на концентрацију супстрата 61c са параметрима линеарне регресионе анализе	69
Слика 48. Графички приказ зависности ОН антирадикалске активности у односу на концентрацију супстрата 65c са параметрима линеарне регресионе анализе	69
Слика 49. Приказ промене боје као последица редукције ресорфина од стране микроорганизама	78
Слика 50. Приказ микродилуционе плоче са различито обојеним растоврима у јамицама	79
Слика 51. Структуре нових 2-аминотиазолинских деривата (49c-59c)	90
Слика 52. Структуре нових деривата имино-4-хидроксикумарина (61b-68b) и деривата аминоксидо-4-хидроксикумарина (61c-68c)	95

1. ОПШТИ ДЕО

1.1. Хемија кумарина

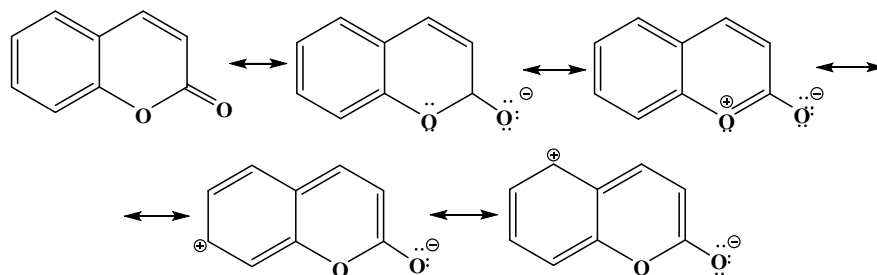
Молекули α - и γ - пирона кондензовани са бензенским прстеном називају се кумарини (1) и хромони (2) (Слика 1).



Слика 1. Кумарин и хромон

Кумарини и хромони, као и њихови различити деривати, су веома распрострањени у природи, нарочито у биљном свету. Деривати кумарина су нађени у производима метаболизма микроорганизама и животиња¹⁻³.

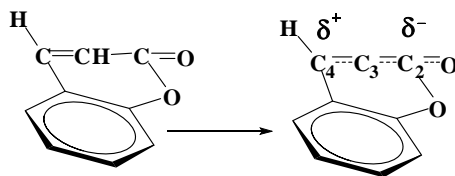
Производи кумарина поседују хемијске особине условљене присуством лактонске структуре, двоструке везе α -пирона и ароматичног прстена. Кумарини се у неким случајевима понашају као ароматска једињења, ступајући при том у реакције електрофилне супституције (нитровање, сулфовање, диазотовање) одупирући се дејству оксиданата, при чему се електрофилни агенси везују за бензенски прстен а не на лактонски део молекула. Тако, при нитровању кумарина долази до образовања 6-нитрокумарина у високом приносу. Објашњавање ових реакција се изводи помоћу резонанционих структура из којих се јасно може видети да се електрофилна супституција успешно може изводити у положајима 6 и 8 бензенског прстена (Слика 2)⁴.



Слика 2. Део резонанционих структура бензопиранског језгра

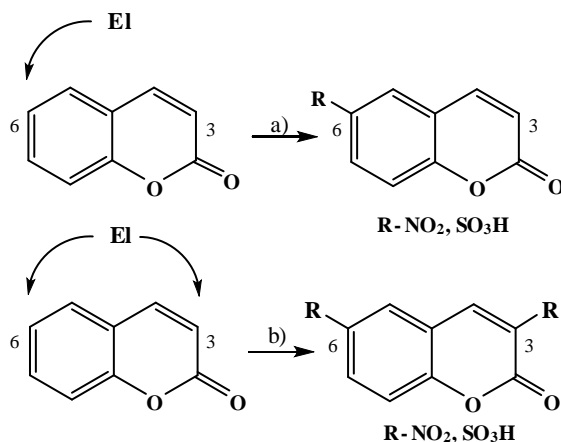
Двострука веза 3-4 пиронског прстена коњугована са карбонилном групом, чини јединствени систем. Електронакцепторски карактер карбонилне групе доприноси

смањењу електронске густине на C_4 угљениковом атому и њеном померању у смеру карбонилне групе (Слика 3) ⁴.



Слика 3. Приказ електронакцепторског дејства карбонилне групе

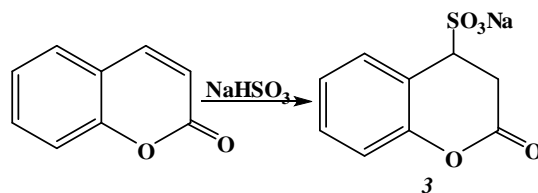
Очито је да угљеник C_4 постаје електрофилни центар пиронског прстена док је C_3 угљеник нуклеофилни центар. Из тог разлога се нитровањем кумарина при загревању добија мала количина 3,6-динитро-кумарина.



Слика 4. Приказ реакција напада електрофилног агенса на кумарински прстен: а) блажи реакциони услови; б) енергичнији реакциони услови

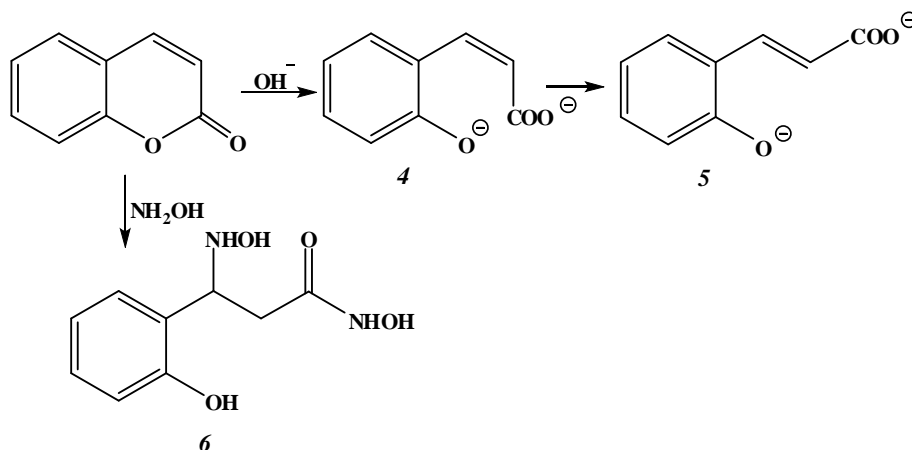
Као што се може видети, у реакцијама електрофилне супституције (нитровање или сулфонување) напад електрофилног агенса се дешава на C_6 угљеников атом, односно на ароматски део молекуле кумарина. При енергичнијим условима и C_3 угљеник постаје нуклеофилни центар, тако да реакција при загревању иде уз формирање 3,6-дисупституисаног производа (Слика 4) ⁴.

Кумарини учествују и у нуклеофилним реакцијама. У општем случају слабији нуклеофили, нпр. бисулфит се везују за положај 4 (3). Аналогно ће тећи реакције са CN^- и MeO^- (Слика 5) ⁴.



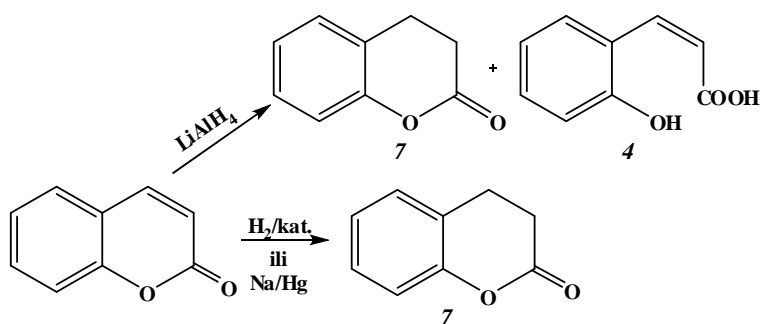
Слика 5. Реакција кумарина са натријум бисулфитом

Јачи нуклеофили ће нападати положај 2. Пример овога је базна хидролиза. Након везивања нуклеофила за положај 2 долази до отварања хетероцикличног прстена на лактонском делу, уз образовање дианјона 3-(2-хидрокси-фенил)-акрилне киселине (4, 5). Формирана двострука веза има *cis* конфигурацију (овај продукт се назива кумаринска киселина) (4). Треба нагласити да је *trans* изомер (5) стабилнији, а добија се загревањем кумарина у присуству натријум етоксида. Хидроксиламин се, везујући за положаје 2 и 4, преводи у једињење *N*-хидрокси-3-хидроксиамино-3-(2-хидрокси-фенил)-пропионамид (6) (Слика 6) ⁴.



Слика 6. Реакције кумарина са јаким нуклеофилним реагенсима

Реакција хидрирања са LiAlH_4 не налази употребну вредност из разлога не селективности, тј. формирања смеше производа. Реакција хидрирања са водоником уз присуство катализатора или пак реакција са амалгамисаним натријумом се дешава лагано и води добијању 3,4-дихидро производа (7) (Слика 7) ⁴.



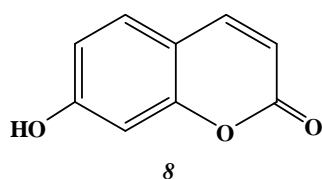
Слика 7. Реакције хидрирања кумарина

4-Хидроксикумарин се разликује по хемијским особинама како од самог кумарина, тако и од других хидроксикумарина. Разлог томе је присуство високо енолизованог β -кетоестарског система који знатно стабилизује кумарински прстен повећавајући му ароматичност. Бензенски прстен 4-хидроксикумарина мање је реактиван од обичног бензенског прстена или деривата бензена, док α -пиронски прстен под врло благим условима ступа у реакције супституције при чему настају 3-супституисани деривати 4-хидроксикумарина.

4-Хидроксикумарин реагује, како са електрофилним, тако и са нуклеофилним реагенсима. У реакцији са електрофилним реагенсима најреактивнији је положај 3. Ацетиловањем, нитровањем и брмовањем се добијају одговарајући 3-супституисани деривати 4-хидроксикумарина ⁴. У реакцијама нуклеофилних супституција најреактивнији је положај 4, што и потврђују експериментални подаци ⁵.

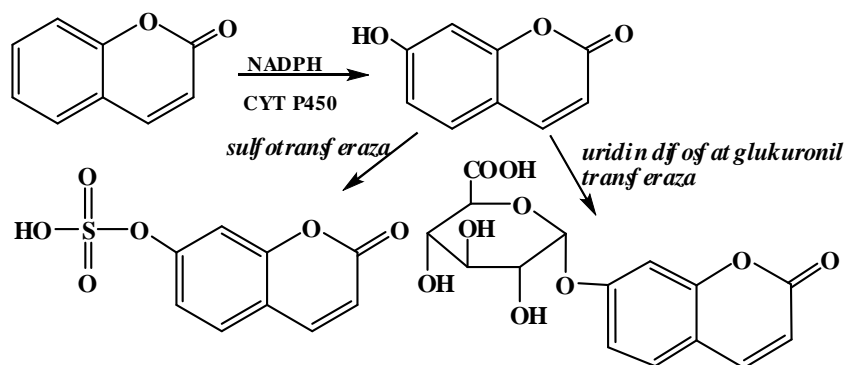
1.2. Биохемија кумарина

Деривати кумарина, односно 2*H*-1-бензопиран-2-она, су широко распрострањени у природи, а нарочито у биљном свету ⁶. До сада је изоловано око 1300 различитих кумаринских деривата, и то углавном из породица биљака *Rutaceae*, *Apiaceae*, *Fabaceae* и *Asteraceae* ⁷. Најчешће је за карбоциклични фрагмент молекуле кумарина везан кисеоник, и то у положају 7, а ређе у положајима 5, 6 и 8. Типични примери су 7-хидроксикумарин (8) (Слика 8) и његов β-гликозид скимин ⁴.



Слика 8. 7-хидроксикумарин

Катаболизам кумарина се врши под утицајем ензима *kumarin-7-hidroksilaze*, при чему се кумарини специфично хидроксилију до 7-хидрокси деривата, који се потом у форми сулфата или глукуронида (насталих уз учешће ензима *sulfotransferaze* и *uridin difosfat glukuronil transferaze*) излучују преко урина (Слика 9) ^{8,4}.



Слика 9. Биотрансформација кумарина до сулфата и глукуронида

За многе кумаринске деривате као секундарне метаболите, утврђено је да поседују интересантна биолошка својства ⁴. Па ипак узимајући у обзир чињеницу да је њихов садржај у биљкама веома мали, као и да изоловање захтева софистицирану опрему и велики утрошак времена, развијен је велики број синтетичких путева њиховог добијања. Увођењем нових фармакофора на бензофурански прстен

синтетисан је велики број кумаринских деривата, од којих значајан број има и клиничку примену.

Супституција на једном и/или свих шест доступних места на основном молекулу кумарина води ка супстратима који се, осим по значајној разлици у структури, разликују и по биолошкој активности коју испољавају. Управо ова структурна разноликост кумаринским дериватима омогућује различите биолошке особине, чинећи их интересантном основом за развој нових супстрата који ће благотворно деловати у различитим патофизиолошким стањима организма или пак умањивати ризик од различитих обољења⁹.

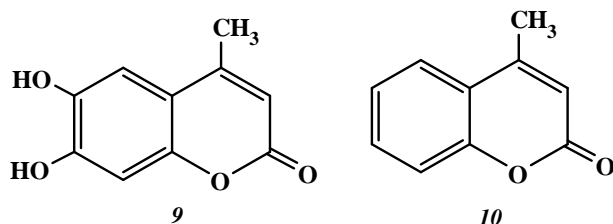
1.2.1. Деривати кумарина са антиоксидативним дејством

За велики број кумаринских деривата је утврђено да инхибирају формирање и подстичу хватање реактивних кисеоничних и реактивних азотних врста⁴. Литературни подаци показују да је за антиоксидативну активност одговорна структурна аналогија са флавонодима и бензофенонима уз констатацију да тачан молекулски механизам дејства, на заштиту ткива и ћелија од штетног дејства оксидативног стреса, још није разјашњен⁹⁻¹². Важност истраживања њиховог антиоксидативног дејства лежи и у чињеници да су многи кумарински деривати присутни у намирницама (у форми адитива за храну или природних компоненти), вину и другим алкохолним пићима, дуванским производима, цитрусном воћу, зеленом поврћу, пекарским производима и житарицама^{13,14}.

По утврђивању корелације између реактивних кисеоничних врста и њиховог учешћа у патогенези разних обољења, као и тога да се са екстерном администрацијом са антиоксидантима може утицати на успоравање развоја болести, кумаринским супстратима се придаје велика важност у борби против оксидативног стреса.

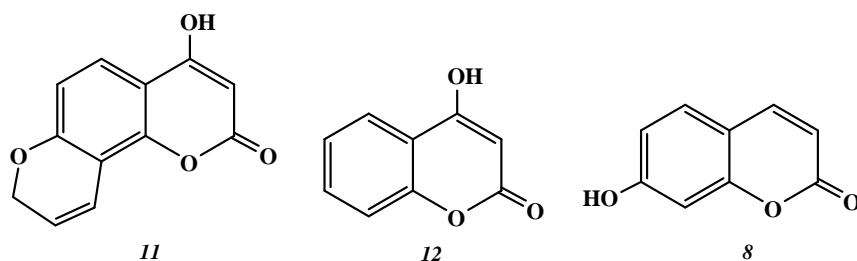
Одређивање антиоксидативне активности употребом стабилног DPPH радикала представља једну од најчешће коришћених метода. Добијени резултати показују на способност тестираног супстрата да хватају слободне радикале, односно да донирају водонични радикал. Будући да се DPPH радикали сматрају као слаби акцептори

водоника, резултати се могу разматрати и са нивоа способности тестираних супстрата да хватају пероксил (RCOO) радикале ⁹. Велики број тестираних кумарина показује добру DPPH антирадикалску активност. Пример су супституисани 4-метилкумарини ⁹, који у зависности од типа супституције и природе супституената показују активност у опсегу IC₅₀ вредности од 1,21 x 10⁻⁵ mol/L за 7,8-дихидрокси супституисани дериват (9) до 9,72 x 10⁻² mol/L за 4-метилкумарин (10) (Слика 10).



Слика 10. 7,8-Дихидрокси-4-метилкумарин и 4-метилкумарин

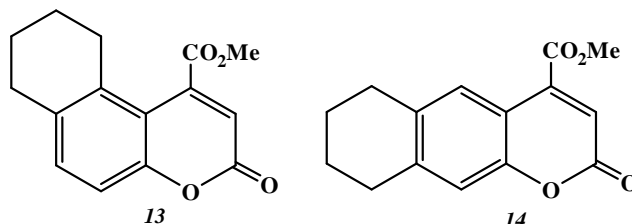
Јасно се може констатовати да је значајно већа антирадикалска активност 7,8-дихидрокси деривата последица присуства хидроксилних група на бензеноидном делу молекуле. Утврђено је да значајну DPPH антирадикалску активност поседују кумарински супстрати који на положају 4 имају хидроксилну групу. При IC₅₀ вредности ~150 μM 7,8-спиро супституисани 4-хидроксикумарин (11) показује комплементарну активност 4-хидроксикумарину (IC₅₀ 124 μM) и неупоредиво бољу активност у односу на 7-хидрокси супституисани кумарин (IC₅₀ >400 μM) (Слика 11) ¹⁵.



Слика 11. 4-хидрокси супституисани кумарини

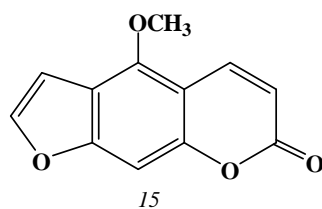
Из групе реактивних кисеоничних врста, а због своје високе реактивности, хидроксил радикали (OH) се сматрају једном од најтоксичнијих радикалских честица, значајно доприносећи оштећењу ћелијских макромолекула протеина, липида и DNA ¹⁶. Кумарин 4-карбоксилатни деривати супституисани са 6,7,8,9-тетрахидро (13) и

7,8,9,10- тетрахидро (*14*) групама при концентрацији од 0,1 mM при вредностима од 77 % и 53 % елиминису хидроксил радикале настале у систему Fe^{3+} /аскорбинска киселина/EDTA, што је приближно активности идентичне концентracије стандардног једињења тролокса (Слика 12) ¹⁷.



Слика 12. Ангуларни и линеарни тетрахидро супституисани кумарин 4-карбоксилати

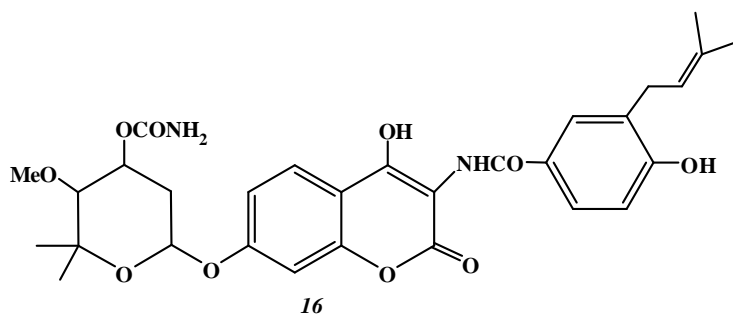
Праћењем инхибиције насталих пероксил радикала у емулзионом систему β -каротен-линолеинска киселина, кумарински дериват бергаптен (*15*) при концентracији од 10 μM показује антиоксидативну активност (на нивоу ћелијске мембране) у вредности од 9 %, што је комплементарно инхибиторној активности флавоноида апигенина (Слика 13) ¹⁸.



Слика 13. Бергаптен

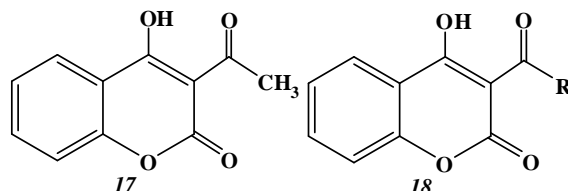
1.2.2. Деривати кумарина са антимикуробним дејством

Новобиоцин (*16*) (Слика 14) показује антибиотску активност према грам негативним бактеријама ^{4, 6, 19}. То откриће је уједно и било и разлог испитивања антибиотског ефекта и других кумаринских деривата.



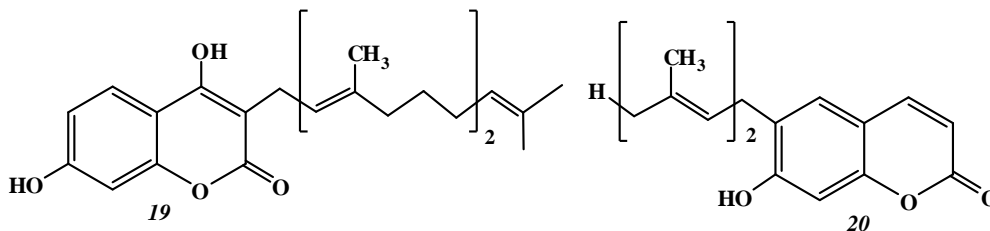
Слика 14. Новобиоцин

Констатовано је да 3-ацетил-4-хидроксикумарин (17) показује антибактеријску активност на неколико врста бактерија, нпр. *Staphylococcus aureus* и *Mycobacterium tuberculosis*²⁰. Утврђено је да антибактеријску активност показују и једињења сличне структуре (18) (Слика 15).



Слика 15. 4-Хидрокси кумарински деривати као антибактеријски агенси

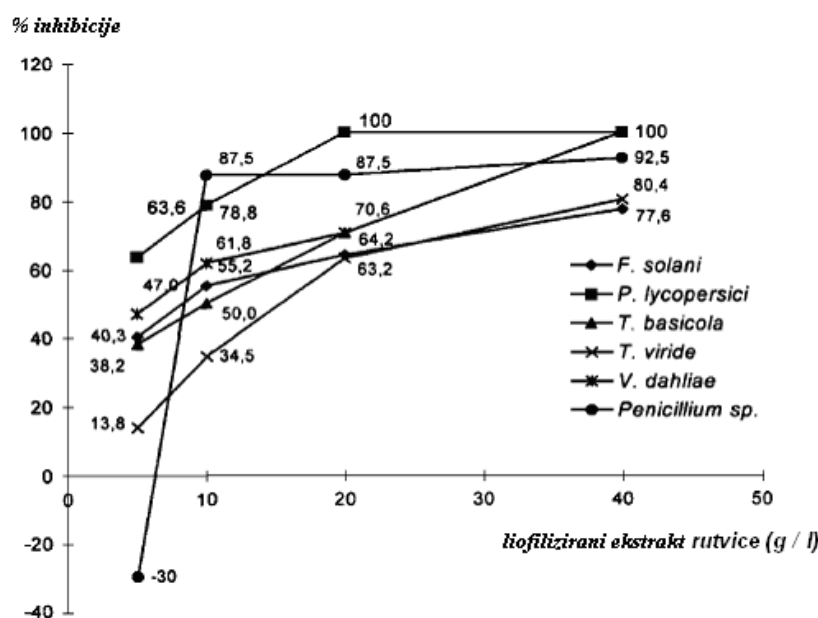
Аморезинол (19) и острутин (20) (Слика 16) делују на широки спектар бактерија: *Staphylococcus aureus*, *Micrococcus lutena*, *Micrococcus lisodeicticus* и *Bacillus megathermum*²¹.



Слика 16. Аморезинол и острутин

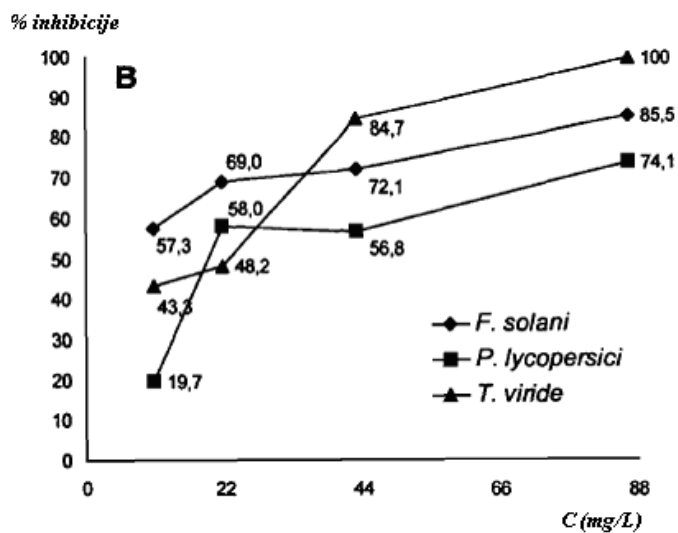
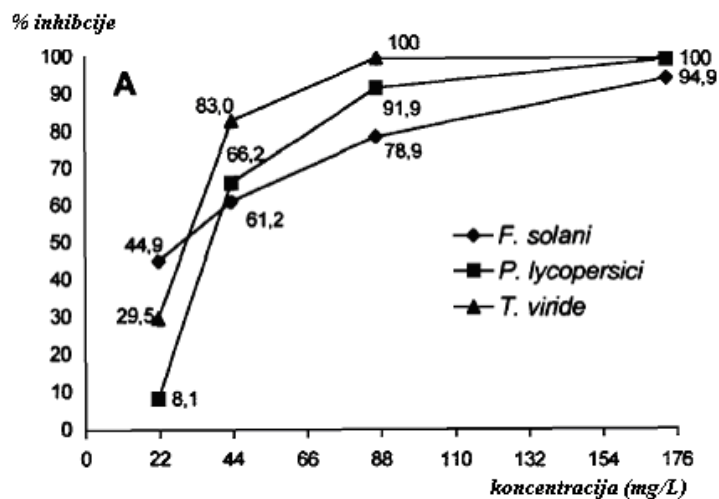
Иако екстензивна употреба хербицидних и фунгицидних средстава обезбеђује значајне приносе у пољопривреди, треба напоменути и њихову штетност у погледу загађења животне средине и опасности по људско здравље. Ове чињенице дају подстицаја истраживачима у проучавању агенаса изолованих из неких виших биљака, чија ће ефикасност не само бити већа, већ и неће дејствовати штетно на

животну средину и људско здравље. Једно истраживање је било посвећено праћењу антифунгалне активности екстракта *Ruta graveolens*, као и алелохемикалија 8-метоксипсоралена (8-MOP) (21), 5-метоксипсоралена (5-MOP) (22) и 4-хидроксикумарина изолованих из ове биљке²². На слици 17 је дата антифунгална активност различитих концентрација лиофилизованог екстракта рутвице према неким патогеним гљивама. Највећу активност екстракт показује према *P. lycopersici* (за концентрације од 20 g/L и 40 g/L). При концентрацији од 5 g/L екстракт подстиче раст *Penicillium sp.*.



Слика 17. Антифунгални ефекат лиофилизованог екстракта *Ruta graveolens*

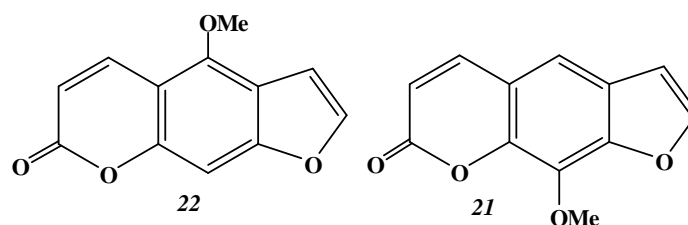
Што се тиче изолованих алелохемикалија, констатовано је да антифунгалну активност 4-хидроксикумарин не поседује, док са друге стране, 8-MOP и 5-MOP показују значајну активност (Слика 18 и 19) (Табела 1). У опсегу концентрација од 27,6 mg/L до 39,9 mg/L (за 8-MOP), односно 6,33 mg/L до 27,0 mg/L (за 5-MOP) хидроксисоралени показују антифунгалну активност.



Слика 18. Ефекат 8-МОР (А) и 5-МОР (В) (четири различите концентрације) на степен раста *F. solani*, *P. lycopersici* и *T. viride*

Табела 1. Потребна концентрација за 50 % инхибицију раста различитих фунгалних врста

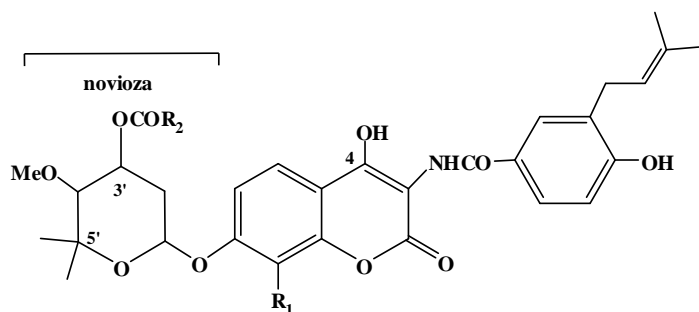
гљива	лиофилизирани екстракт (g/L)	IC ₅₀	
		8-MOP (mg/L)	5-MOP (mg/L)
<i>F. solani</i>	8,25 ± 1,45	27,7 ± 3,5	6,77 ± 0,5
<i>P. lycopersici</i>	4,16 ± 0,07	39,9 ± 2,3	27,0 ± 0,3
<i>T. basicola</i>	8,43 ± 0,07		
<i>T. viride</i>	15,17 ± 0,04	27,6 ± 1,3	6,33 ± 0,1
<i>T. dahliae</i>	6,50 ± 0,10		
<i>Penicillium sp.</i>	9,04 ± 0,03		



Слика 19. 5-Метоксипсорален и 8-метоксипсорален

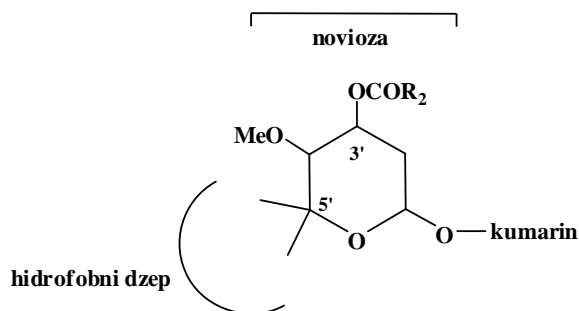
DNA giraza (ензим из класе *topoizomeraza*) је бактеријски ензим одговоран за процес превођења DNA у нативну форму²³⁻²⁵. Ради се о ензиму који је виталан за бактерије и нема директног представника у сисарима, те је самим тим изузетно атрактивна антибактеријска мета. Структурна одређивања су показала да се ради о ензиму који садржи две субјединице (А и В). Констатовано је да функционише као А₂В₂ тетрамер у којој је А субјединица одговорна за везивање и раскидање веза, као и рекомбинацију DNA. С друге стране, В субјединица је одговорна за енергију путем контролисања хидролизе АТФ. Две класе органских једињења су познате до сада као клинички ефективни антибиотици *DNA giraze*. То су хинолони и кумарини. Дејство хинолона се заснива на њиховом везивању за А субјединицу уз формирање стабилног тернарног комплекса који узрокује смрт ћелије. Што се тиче кумарина, њихово дејство се огледа у везивању за В субјединицу (нпр. новобиоцин) и инхибирању дејства *АТФ-aze*. Један од кумаринских деривата, новобиоцин, има успешну клиничку употребу (углавном се то односи на грам-позитивне бактерије) али треба имати у виду његову токсичност као и брзо развијање резистенције. Што се тиче кумеромицина А₁ и хлоробиоцина, треба нагласити њихове недостатке који се односе на њихове физичко-хемијске карактеристике (Слика 20).

Чињеница да *giraza B* као субјединица бактеријске *DNA giraze* лако може постати резистентна дала је подстицаја истраживачима у погледу структурног модификовања досадашњих кумаринских деривата који дејствују као антибиотици. Истраживања су показала значајан утицај 5',5'-диметил групе новиозе на антибактеријско дејство кумаринских антибиотика²⁴.



Слика 20. Новобиоцин: $R_1=Me$, $R_2=NH_2$ 16; хлоробиоцин: $R_1=Cl$, $R_2=2\text{-metilpirol}$ 23

Поређењем аминокиселинских секвенци из дванаест грам позитивних врста констатовано је да активност ентерококалне и стрептококалне *giraze B* у приличној мери је под утицајем новиозе, у поређењу са *girazom B* изолованом из *E. coli* (Слика 21), пошто њихови хидрофобни џепови садрже *Val-94* и *Phe-95*, и у извесној мери су већи у односу са *girazom B* изоловане из *E. coli*²⁴.



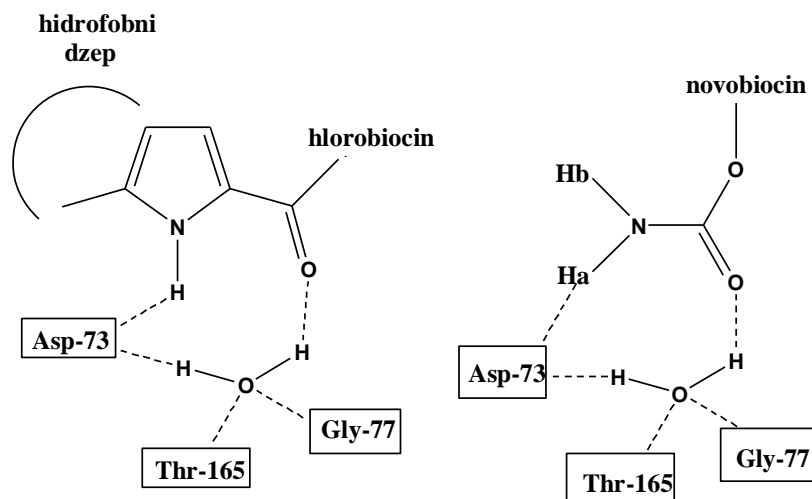
Слика 21. Приказ утицаја 5',5'-диметил групе новиозе на активност кумаринских антибиотика

У покушају синтезе ефикаснијих антибактеријских агенаса који у свом саставу садрже кумарински прстен (кумарин карбонских киселина које су по структури сличне новобиоцину) констатовано је да везивањем L-рамнозил остатка као шећерне компоненте, тј. заменом новиозе са рамнозом у значајној мери се може повећати инхибиторна активност²⁴. Такође је утврђено да се увођењем алкил остатка на C_5 угљеников атом кумаринског језгра повећава антибактеријско својство кумаринских

деривата у *in vitro* условима. Заменом 5'-оксијалне метил групе у молекулу новиозе са водоником у рамнози резултоваће у петоструком умањењу инхибиторног дејства ензима *DNA giraze*. Ово није изненађујуће узимајући у обзир чињеницу да је 5',5'-диметил група новиозе у комплексу са *girazom B* окружена хидрофобним аминокиселинама као и да супституција метил групе са водоником резултује у парцијалном губитку ових хидрофобних интеракција. И поред тога кумарински супстрат који као шећерну компоненту садржи рамнозу задржава сличну инхибиторску активност према *DNA girazi* као и новобиоцин.

Чланови групе кумеромицин антибиотика ²⁴ продукованих од стране врста *Streptomyces* се међусобно разликују по присуству 5-метилпирол-2-карбоксилатног или пирол-2-карбоксилатног дела у молекулу. Упоредне студије антибактеријске активности ове групе кумаринских деривата показују да је за изражени антибактеријски профил кумеромицина А₁ одговорна 5-метил група из 5-метилпирол-2-карбоксилатног дела. Хлоробиоцин показује два пута већу антибактеријску активност у односу на новобиоцин, док кумеромицин показује десетоструко већу инхибиторску активност према ензиму *DNA girazi* у односу на новобиоцин. Оваква потенција кумеромицина се може приписати већој хидрофобности 5-метилпирол-2-карбоксилатног дела, а самим тим, и већој пермеабилности мембране.

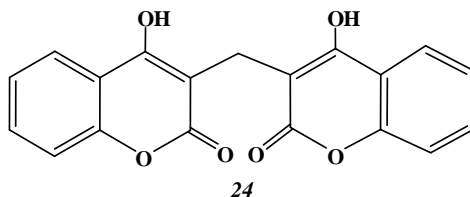
Констатовано је да пиролни део хлоробиоцина у комплексу са *girazom B* је окружен хидрофобним аминокиселинским остацима *Val-43*, *Val-71*, *Val-120*, *Val-167* и *Ile-78* (хидрофобни џеп) (Слика 22). Осим хидрофобних контаката утврђено је да стабилности комплекса доприносе и интеракције путем водоничне везе формиране између NH-групе пирола и дела ензима, тј. аминокиселинског остатка *Aps-73*, односно водоничних веза које настају између карбонилне групе пирол-2-естра и воде са аминокиселинским остацима *Thr-165* и *Gly-77* ²⁴.



Слика 22. Интеракција између 24 kDa *N*-терминалног протеинског фрагмента *giraze* B из *E. coli* са хлоробиоцином и новобиоцином

1.2.3. Деривати кумарина са антикоагулантним дејством

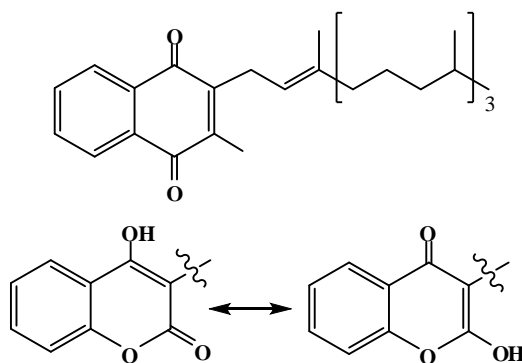
Након открића да употреба буђавог сена слатке детелине у исхрани крупне стоке инхибира синтезу витамина K_1 у јетри и стварање протромбина (доказано је присуство дикумарола (24) (Слика 23))^{26, 27}, започела су интензивна истраживања на синтези једињења дикумаролског типа који имају ефекат антикоагуланата.



Слика 23. Дикумарол

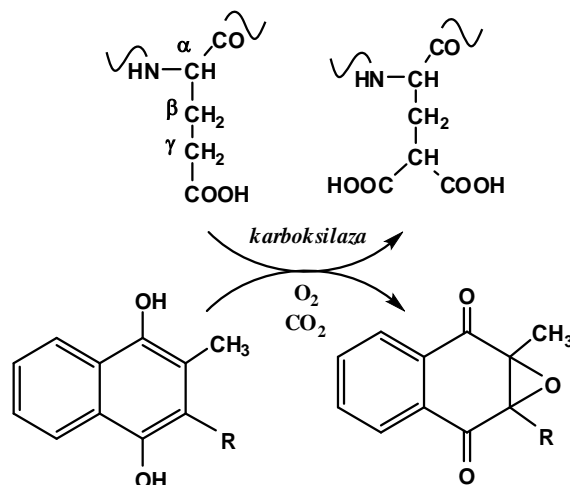
Антикоагулантно дејство 4-хидроксикумаринских деривата се заснива на структурној аналогiji са витамином К (коагулациони витамин) као нафтахинонским дериватом који у положају 2 поседује изопреноидни остатак, а у положају 3 метил групу²⁷ (Слика 24). Витамин К је кофактор посттранслационе карбоксилације остатка глутаминске киселине до γ -карбоксиглутамата на *N*-терминалном делу витамин К-зависних протеина^{28, 29}. Да би фактори коагулације (фактор II - протромбин и фактори коагулације VII, IX и X) поседовали биолошку активност

неопходна је γ -карбоксилација и везивање Ca^{2+} јона преко две карбоксилне групе у γ -карбоксиглутамат остатку²⁸.



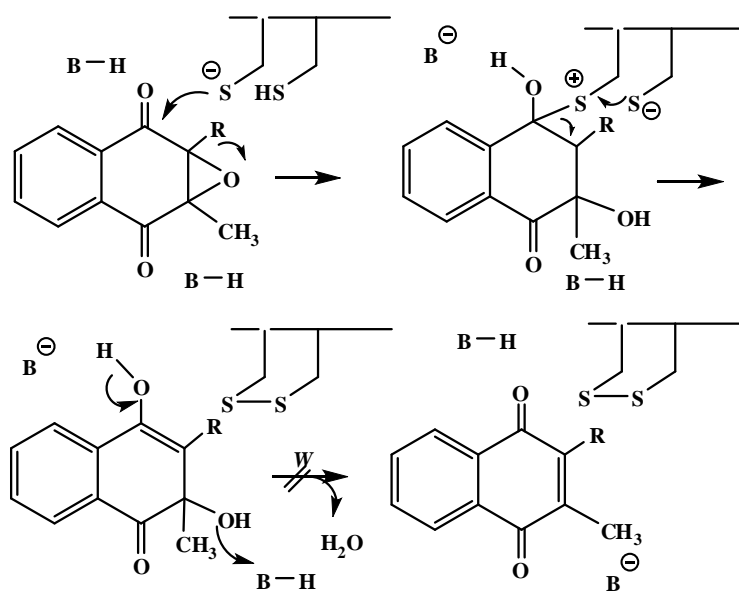
Слика 24. Приказ структурне аналогије витамина К и 4-хидроксикумаринског система

Карбоксилација витамин К-зависних коагулационих фактора је катализована дејством *karboksilaze*, уз присуство редуковане форме витамина К (дихидровитамин К или KH_2) као коензима, молекулског кисеоника и угљен диоксида. Током овог процеса коензим *karboksilaze*, дихидровитамин К (KH_2) се оксидује до витамин К 2,3-епоксида. Надаље, регенерација дихидровитамина К се изводи дејством ензима *vitamin К 2,3-epoksid reduktaze* на витамин К-2,3-епоксид^{30, 31}. Управо 4-хидроксикумрински деривати као антагонисти витамина К своју антикоагулантну активност показују преко инхибиције ензима *vitamin К 2,3-epoksid reduktaze*, спречавајући превођење инактивне у активну форму витамина К, а тиме и ограничавајући процес γ -карбоксилације коагулационих протеина (Слика 25)³⁰.



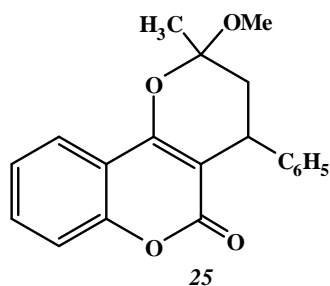
Слика 25. Приказ ензимске γ -карбоксилације остатка глутаминске киселине уз редукцију дихидровитамина К до витамин К 2,3-епоксида

У сагласности са механизмом представљеним од стране Fasco-а ³², депротоновани 4-хидроксикумарински супстрат се везује за оксидовану дисулфидну форму *vitamin K 2,3-epoksid reduktaze*. На тај начин кореспондира процесу елиминације воде из 2-хидроксивитамина К, под дејством дисулфидне форме ензима *vitamin K 2,3-epoksid reduktaze*. Односно, то значи да се 4-хидроксикумарински молекули везује за активни центар на сличан начин као и 1,4-нафтахинонски молекули витамина К, при чему супституент у положају 3 опонаша изопреноидни остатак у положају 2 2-хидроксивитамина К (Слика 26).



Слика 26. Механистички модел редукције витамин К 2,3-епоксида и инхибиције са варфарином

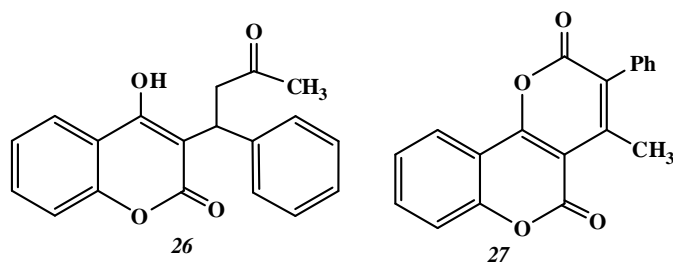
Приликом тестирања више од сто синтетисаних деривата кумарина као потенцијалних антикоагуланата констатовано је да је циклокумарол (25) (Слика 27) најактивнији и показује 60 % активности природног производа дикумарола ³³.



Слика 27. Циклокумарол

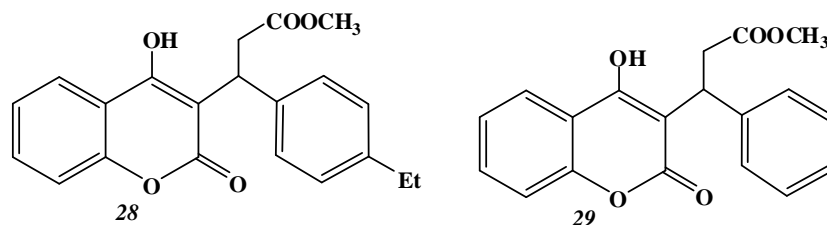
Примена циклокумарола у минималним дозама код здравих људи, зечева и паса изазива продужену и интензивну хипопротромбинемију.

Значајну антикоагулантну активност показује и аценокумарол (26), као и једињење 4-метил-3-фенил-пирано[3,2-*c*]-хромен-2,5-дион (27) (Слика 28) ³⁴.



Слика 28. Аценокумарол и 4-метил-3-фенил-пирано[3,2-*c*]-хромен-2,5-дион

J. Chmielewska и сарадници ³⁵ закључују да дикумаролска структура није неопходан предуслов за антикоагулантно деловање, што се може видети из структуре маркумара (28) и варфарина (29) (Слика 29) ³⁶.



Слика 29. Маркумар и варфарин

Увођењем халогена у ароматични прстен 4-хидроксикумарина повећава се антикоагулационо дејство, док замена кисеониковог атома у прстену са сумпором утиче на смањење активности ³⁷.

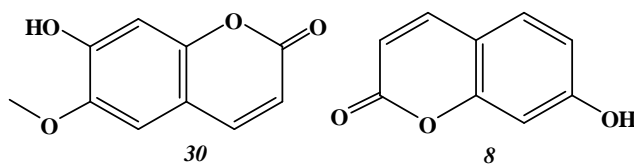
Варфарин се скоро увек дозира орално, премда се дозира и парентерално. Клиничка испитивања су забележила брзу ресорпцију варфарина. Као доказ тога даје се чињеница да се након 90 минута од узимања јавља максималан ниво у крви. Транспорт путем крви се врши стабилним везивањем за серумски протеин албумин. Екскреција преко хидроксиловане инактивне форме путем урина започиње акумулирањем и метаболисањем у јетри и излучивањем преко жучи у танко црево

(ентерохепатични пут). Варфарин се као рацемска смеша два енантиомера (S-изомер и R-изомер) у ћелијама хепатоцита катаболише путем *citohrom P450* изоензима.

1.2.4. Остали видови биохемијског дејства кумаринских деривата

1.2.4.1. Кумарински деривати са фитоалексинским дејством

Биљке су у стању да се одбране од неких патогених микроорганизама индуковањем одбрамбеног одговора³⁸. Гљивично обољење изазвано нападом *Ceratocystis fimbriata F. platani* је значајан предмет проучавања истраживача из разлога високе опасности по опстанак дрвећа. Ове патогене гљиве улазе у биљку кроз оштећене делове корена, стабла и лишћа изазивајући сушење лишћа. Чак и већа и отпорнија стабла могу бити уништена за око 4-7 година, иако је забележена значајна акумулација два хидроксикумарин фитоалексина скополетина (30) и умбелиферона (8) (Слика 30). Треба нагласити да је констатовани одбрамбени одговор биљке недовољан за заштиту.

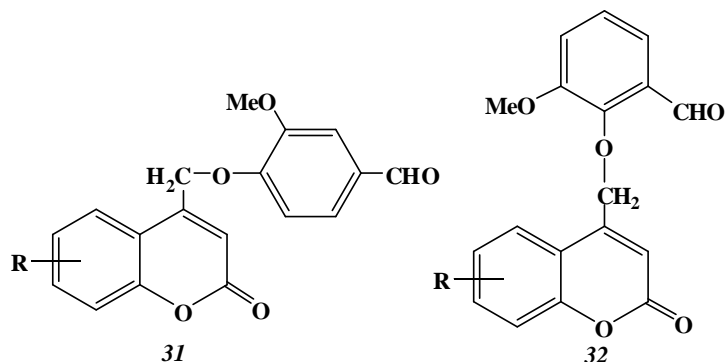


Слика 30. Скополетин и умбелиферон

1.2.4.2. Кумарински деривати са антиинфламаторним дејством

Испитивања на експерименталним животињама су показала да супстрати са арилоксиметиленском групом на положају 4 кумаринског језгра поседују антиинфламаторно дејство^{39, 40}, и да је оно последица формирања (функционалне трансформације) карбоксилне групе у биолошким системима⁴⁰. Премда поуздан молекулски механизам дејства није разјашњен, 4-(арилоксиметил)кумарини (31) и

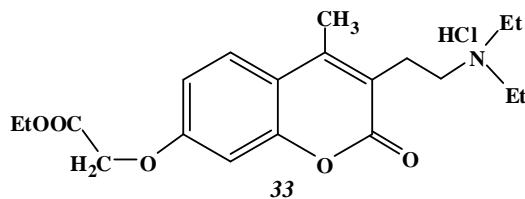
кумарини са ванилинским остатком (32) поседују значајну антиинфламаторну активност (Слика 31).



Слика 31. 4-(Арилоксиметил)кумарински деривати као антиинфламаторни супстрати

1.2.4.3. Кумарински деривати са антиартеросклеротичним дејством

4-Метилкумарински дериват са диетиламино-етил групом у положају 3 и оксиацетатном групом у положају 7 се годинама у клиничкој пракси под називом интенсаин, хромонар или карбохромен (33) употребљава за профилаксу напада ангине пекторис, односно као антиартеросклеротични агенс (Слика 32) ⁴¹.

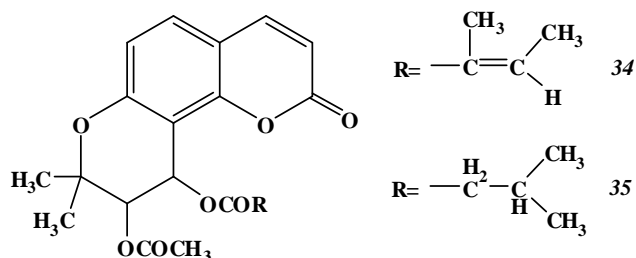


Слика 32. Карбохромен

1.2.4.4. Кумарински деривати са вазодилаторским дејством

Из породице биљака *Ariaceae* изоловани су различити кумарини са вазодилаторским деловањем. Међу њима треба истаћи виснадин (34) и самидин (35) као супстрате биогенетски изведене из умбелиферона (8) који се међусобно

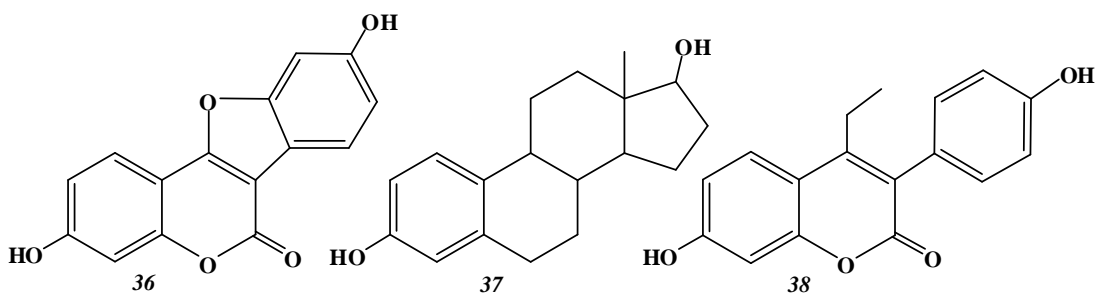
структурно разликују по присуству 2,3-метилбутеноатне, односно метилбутаноатне групе везане за положај 4 тетрахидро-пиранског дела молекуле (Слика 33)^{42, 43}.



Слика 33. Виснадин и самидин

1.2.4.5. Кумарински деривати са естрогеним дејством

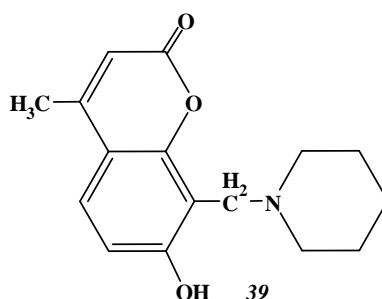
Куместрол (36)^{44, 45} изолован из детелине *Alfaalfa* и других махуна је потенцијални естроген. Естрогена активност куместрола је последица структурне аналогије са природним хормоном естрадиолом (37)⁴⁶. Такође 3-супституисани кумарински дериват 4-етил-7-хидрокси-3-(4-хидрокси-фенил)-хромен-2-он (38) поседује естрогену активност (Слика 34).



Слика 34. Естрадиол и кумарински деривати са естрогеним дејством

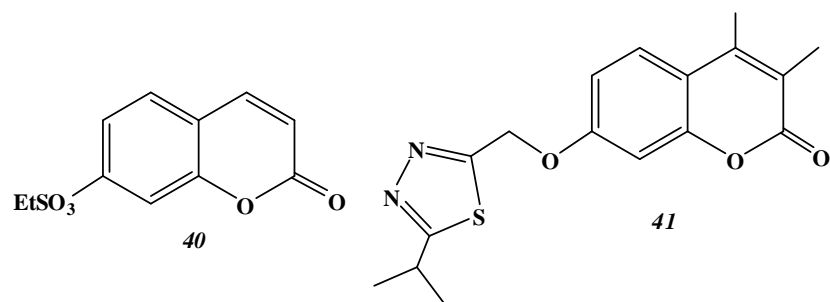
1.2.4.6. Кумарински деривати као стимулатори активности централног нервног система

За неке од кумаринских деривата је утврђено да делују на централни нервни систем, као стимулатори његове активности. Међу њима 4-метил-7-хидрокси супстрат са пиперидинским делом везаним преко метиленске групе у положају 8 поседује највећу активност (39) (Слика 35) ⁴⁷.



Слика 35. 7-Хидрокси-4-метил-8-пиперидин-1-илметил-хромен-2-он

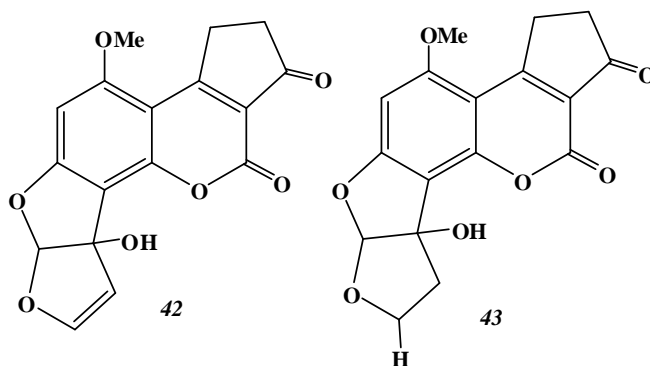
Monoaminooxidaze (MAO, EC 1. 4. 3. 4) су FAD зависни ензими. Катализују оксидативну деаминацију моноамина из ендогених и егзогених извора утичући на тај начин на концентрацију неуротрансмитерских моноамина (биогени амини) ^{48, 49}. Извесни синтетички кумарински деривати ^{47, 49} показали су се као MAO инхибитори, те на тај начин представљају могуће терапеутске агенсе, примера ради у сврху третмана Паркинсонове болести (констатовано је да је MAO одговоран за биотрансформацију 1-метил-4-фенил-1,2,3,6-тетрахидропиридина у 1-метил-4-фенилпиридин, тј. продукт Паркинсонове болести неуротоксин ^{50, 51}). Утврђено је да су есупрон (40) и LU53439 (41) реверзibilни MAO инхибитори (Слика 36) ⁴⁹.



Слика 36. Есупрон и LU53439

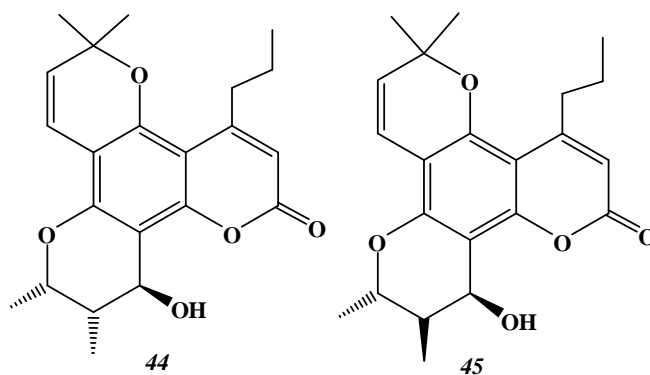
1.2.4.7. Афлатоксини

Испитивањем хране која је била узрочник помора животиња, констатовано је да је у њој била извесна количина афлатоксина као продуката метаболизма буђи сена слатке детелине⁵²⁻⁵⁴. За афлатоксине је утврђено да су узрочници канцера јетре и да своје токсично дејство испољавају и у врло малим количинама. Из млека животиња третираних са афлатоксинима изоловани су афлатоксини M_1 и M_2 (42, 43) (Слика 37) за које је доказано да су производи метаболизма *Aspergillus flavus*⁵⁴.

Слика 37. Афлатоксини M_1 и M_2

1.2.4.8. Кумарински деривати са анти- HIV активошћу

Извесни кумарински деривати су се показали као потенцијални анти-HIV агенси⁵⁵. Ради се о кумаринима (+)-каланолиду А (44) и (-)-каланолиду В (костатолид) (45) (Слика 38) изолованим из биљака *Calophyllum cerasiferum* Vesque и *Calophyllum inophyllum* Linn из породице *Clusiaceae*. Механизам дејства ових кумаринских деривата се заснива на инхибицији ензима *HIV reverzne transkriptaze* односно *RNA*-зависне *DNA-polimeraze*, чиме се спречава реверзна транскрипција вирусне *RNA* и њена интеграција у геном ћелије. На овај начин је онемогућено да *RNA-polimeraze* хуманих ћелија учествују у синтези за овај ретро-вирус специфичних *mRNA* (кодирају специфичне протеине вируса), чиме се зауставља њихова даља репликација⁵⁶.

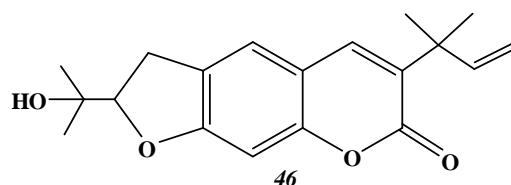


Слика 38. (+)-Каланолид А и (-)-каланолид В

1.2.4.9. Кумарински деривати са антипаразитским дејством

Кумарински дериват калепин (46) (Слика 39) изолован из биљака рода *Rutaceae* делотворно делује против *Changa's*-ове болести (прилично је заступљена у централној и јужној Америци, премда има доста забележених случајева и у Северној Америци)⁵⁷. Утврђено је да је узрочник ове болести паразит *Trypanosoma cruzi*. Антипаразитско дејство калепина се испољава инхибирањем ензима *gliceraldehyd 3-fosfat dehidrogenaze (GAPDH)* присутног у гликозомима овог паразита, заустављајући

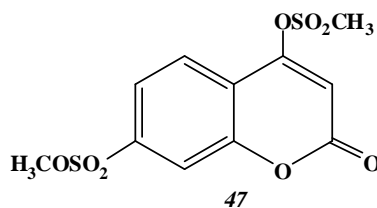
процес гликолизе на нивоу формирања 3-фосфоглицерол-1-фосфата. Како интрацелуларне амастиготе паразита енергију добијају процесом гликолизе произилази да би инхибирање ензима *GAPDH* са супстратима типа калепина условило уништење овог паразита^{56,57}.



Слика 39. Калепин

1.2.4.10. Кумарински деривати са антиканцерогеним дејством

Деривати кумарина показују и антиканцерогено дејство. Недавно је објављено истраживање да и сам кумарин поседује цитостатичко дејство⁵⁸. Констатовано је и да маркумар, кумарински дериват са антикоагулативном активношћу, инхибира спонтано метастазирање тумора, док кумарински дериват са метилсулфонил групама у положајима 4 и 7 (47) дејствује антиканцерогено на *Sarcom W₂₅₆* (Слика 40)⁵⁹⁻⁶¹.



Слика 40. Антиканцерогени агенс на *Sarcom W₂₅₆*

Protein kinaze играју веома важну улогу у контроли размножавања ћелија, диференцијације и метаболизма⁶². Рецептор фактора раста, *tirozin kinaza*, се активира путем везивања његових специфичних лиганата. Прекомерна израженост рецептора неких фактора раста је утврђена у случају људског канцера, као што је рак дојке и јетре⁶³⁻⁶⁵. Инхибитори *protein kinaze* могу представљати потенцијално важну класу

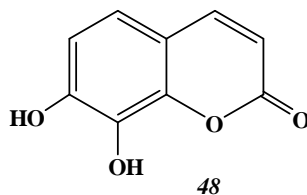
терапеутских агенаса за неке врсте канцера насталих као последица прекомерне активности *protein kinase* (ензими *protein kinaza* и *protein fosfataza* одговорни су за битне процесе фосфорилације и дефосфорилације који регулишу функцију ћелије).

Неки кумарински деривати, дафнетин, ескулин, 3-хидроксикумарин, 4-хидроксикумарин и 7-хидроксикумарин били су предмет истраживања као потенцијални инхибитори ензима *protein kinase*⁶⁶. Одређен је ефекат дејства на активност EGF рецептора *tirozin kinaze*, *PKA* (*cAMP zavisna protein kinaza*) и *PKC* (*protein kinaza C*). *PKA* су *Ser/Thr specifične protein kinaze* које су значајне са аспекта регулације ћелијског метаболизма, развоја и диференцијације.

Табела 2. Инхибиција *protein kinase* при концентрацији кумаринских деривата од 200 μM

супстрат	% инхибиције		
	EGFR-PTK ^a	PKC	PKA
кумарин	-	-	35,28
дафнетин	99,65	99,19	98,67
ескулин	-	-	30,35
3-ОН-кумарин	-	-	26,72
4-ОН-кумарин	-	12,37	29,47
7-ОН-кумарин	-	10,54	40,71

^aEGFR-PTK фактор епидермалног раста рецептора *protein tirozin kinaze*



Слика 41. Дафнетин

На основу приказане табеле 2, дафнетин (48) (Слика 41) као 7,8-дихидрокси супституисани кумарин ефикасно инхибира активност *protein Tyr-kinaze* (катализује фосфорилацију егзогених супстрата), *PKA* и *PKC*.

2. ЕКСПЕРИМЕНТАЛНИ ДЕО

2.1. Поступци за добијање нових деривата 4-хидроксикумарина

2.1.1. Општа процедура добијања тиоуреа деривата

У 40 mL воде се раствори амонијум тиоцијанат (0,012 mol, 1 g). По додатку 1 mL 36 % хлороводоничне киселине и 0,012 molova одговарајућег амина (49a, 50a, 51a-53a) смеша се загрева на температури од 80-90 °C у периоду од 3-4 сата. Ток реакције се прати хроматографијом на танком слоју (TLC Kieselgel G nach Stahl; елуент бензен:ацетон=8:2; средство за изазивање мрља-паре јода). На крају реакције, вода се упари на ротационом упаривачу а добијени талог третира са етил ацетатом. Настали амонијум хлорид у реакцији, као нерастворан у етил ацетату, се одвоји цеђењем под сниженим притиском. Преостали раствор се концентрује на ротационом упаривачу, при чему се добијају одговарајући тиоуреа деривати. Изузев 5-тиоуреидо-пентанске киселине (51b) и 1,1-диетил-тиоуреа (52b), који се добијају као уљане супстанце, сви остали тиоуреа деривати се добијају као кристалне супстанце које кристалишу из метанола. Пречишћавање свих тиоуреа деривата се врши применом хроматографије на колони силика гела (силика гел 230-400 mesh ASTM; смеша за елуирање бензен:метанол=9:1).

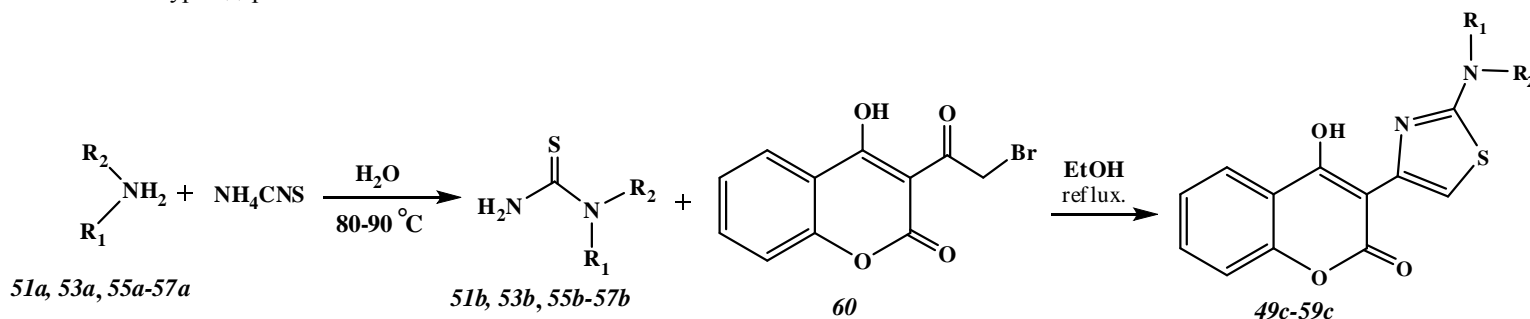
2.1.2. Општа процедура добијања 2-аминотиазолинских деривата 4-хидроксикумарина

У 60 mL апсолутног етанола раствори се 3-(2-бромацетил)-4-хидрокси-хромен-2-она (60) (3,5 mmol, 1 g) и еквимоларна количина одговарајућег тиоуреа деривата (49b-59b). Смеша се загрева и рефлуктује у току 30-45 минута. По хлађењу реакционе смеше добијени талог одговарајућег 2-аминотиазолинског деривата (49c-59c) одвоји се од раствора цеђењем под сниженим притиском и рекристалише из 96 % етанола.

Табела 3. Синтетисани тиоуреа деривати и 2-аминотиазолински деривати 4-хидроксикумарина

R₁	R₂	Тиоуреа деривати	
H	-NH ₂	тиоуреа	49b*
H	-NHCH ₃	1-метилтиоуреа	50b*
H	C ₆ H ₃ (OH)COOH	2-хидрокси-4-тиоуреидо-бензојева киселина	51b
H	<i>p</i> -NO ₂ -C ₆ H ₄ -	(4-нитро-фенил)-тиоуреа	52b*
H	<i>p</i> -C ₆ H ₄ SO ₃ H	4-тиоуреидо-бензенсулфонска киселина	53b
H	<i>m</i> -CH ₃ -C ₆ H ₄ -	<i>m</i> -толил-тиоуреа	54b*
H	-CH ₂ (CH ₂) ₃ COOH	5-тиоуреидо-пентанска киселина	55b
Et	Et	1,1-диетил-тиоуреа	56b
H	<i>o</i> -CH ₃ -C ₆ H ₄ -	<i>o</i> -толил-тиоуреа	57b
H	<i>m</i> -NO ₂ -C ₆ H ₄ -	(3-нитро-фенил)-тиоуреа	58b*
H	C ₁₀ H ₈	1-(нафтален-1-ил)тиоуреа	59b*
R₁	R₂	2-Амино тиазолински деривати	
H	-NH ₂	3-(2-амино-тиазол-4-ил)-4-хидрокси-хромен-2-он	49c
H	-NHCH ₃	4-хидрокси-3-(2-метиламинотиазол-4-ил)хромен-2-он	50c
H	C ₆ H ₃ (OH)COOH	2-хидрокси-4-[4-(4-хидрокси-2-оксо-2 <i>H</i> -хромен-3-ил)-тиазол-2-иламино]-бензојева киселина	51c
H	<i>p</i> -NO ₂ -C ₆ H ₄ -	4-хидрокси-3-[2-(4-нитро-фениламино)-тиазол-4-ил]-хромен-2-он	52c
H	<i>p</i> -C ₆ H ₄ SO ₃ H	4-[4-(4-хидрокси-2-оксо-2 <i>H</i> -хромен-3-ил)-тиазол-2-иламино]-бензенсулфонска киселина	53c
H	<i>m</i> -CH ₃ -C ₆ H ₄ -	4-хидрокси-3-(2- <i>m</i> -толиламино-тиазол-4-ил)-хромен-2-он	54c
H	-CH ₂ (CH ₂) ₃ COOH	5-[4-(4-хидрокси-2-оксо-2 <i>H</i> -хромен-3-ил)-тиазол-2-иламино]-пентанска киселина	55c
Et	Et	3-(2-диетиламино-тиазол-4-ил)-4-хидрокси-хромен-2-он	56c
H	<i>o</i> -CH ₃ -C ₆ H ₄ -	4-хидрокси-3-(2- <i>o</i> -толиламино-тиазол-4-ил)-хромен-2-он	57c
H	<i>m</i> -NO ₂ -C ₆ H ₄ -	4-хидрокси-3-[2-(3-нитро-фениламино)-тиазол-4-ил]-хромен-2-он	58c
H	C ₁₀ H ₈ -	4-хидрокси-3-(2-(нафтален-1-иламино)тиазол-4-ил)-2 <i>H</i> -хромен-2-он	59c

*Претходно синтетисани тиоуреа деривати



2.1.3. Општа процедура добијања имино деривата 4-хидроксикумарина

2.1.3.1. Конвенционална метода

У 50 mL анхидрованог толуена раствори се 3-ацетил-4-хидроксикумарин (17) (0,01 mol) и еквимоларна количина одговарајућег амина (61a-68a). По додатку каталитичке количине *p*-толуен сулфонске киселине врши се загревање, уз азеотропно уклањање воде применом Dean-Stark-овог наставка, у току 10-12 сати. Ток реакције се прати хроматографијом на танком слоју (TLC Kieselgel G nach Stahl; елуент толуен:ацетон=7:3; средство за изазивање мрља-паре јода). По завршетку реакције растварач се упари до четвртине запремине, а након хлађења, остатак раствора одвоји од талога цеђењем под сниженим притиском. Пречишћавање имиона (61b-68b) се врши хроматографијом на колони силика гела (силика гел 230-400 mesh ASTM; смеша за елуирање бензен:ацетон=8:2).

2.1.3.2. Метода под дејством микроталасног зрачења

Смеша 3-ацетил-4-хидроксикумарина (17) (0,01 mol), одговарајућег амина (61a-68a) (0,01 mol) и каталитичке количине *p*-толуен сулфонске киселине у 50 mL анхидрованог толуена се подвргава микроталасном зрачењу снаге 500 W у току 3 минута. По хлађењу, растварач се упари на ротационом упаривачу, а добијени одговарајући имиони (61b-68b) рекристалишу из метанола.

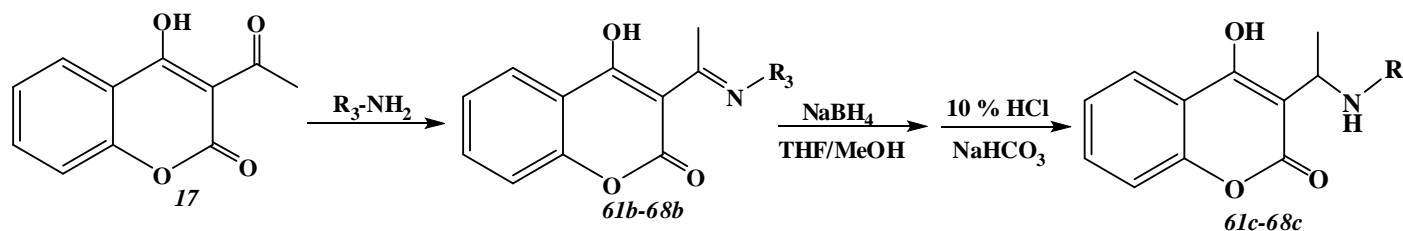
2.1.4. Општа процедура добијања амина деривата 4-хидроксикумарина

Раствору 0,0034 мола одговарајућег имиона (61b-68b) у 50 mL смеше метанол:тетрахидрофуран=8:2, полако и у порцијама, уз стално мешање, додаје се натријум борхидрид (0,0034 mol, 0,129 g). Након додатка целокупне количине натријум борхидрида наставља се интензивно мешање реакционе смеше на собној температури и у току 4 сата. Ток реакције прати се хроматографијом на танком слоју (TLC Kieselgel G nach Stahl; елуент толуен:ацетон=7:3; средство за изазивање мрља-паре јода). По завршетку реакције, реакциона смеша се пажљиво упари при

сниженом притиску, а сирови производ закисели са раствором хлороводоничне киселине (10 %) и меша на собној температури у току 30-60 минута. Затим се изврши неутрализација киселине са засићеним воденим раствором натријум бикарбоната, а добијени одговарајући амин екстрахује са метилен хлоридом (3 x 50 mL). Метилен хлоридни екстракти се помешају и суше преко анхидрованог натријум сулфата. По одвајању натријум сулфата цеђењем при сниженом притиску, и упаравања метилен хлорида добија се талог одговарајућег амина (61c-68c) који се пречишћава хроматографијом на колони силика гела (230-400 mesh ASTM; смеша за елуирање бензен:ацетон=8:2).

Табела 4. Синтетисани имино и аминоксидеривати 4-хидроксикумарина

R_3	Имино деривати	
C_6H_5-	4-хидрокси-3-(1-(фенилимино)етил)-2 <i>H</i> -хромен-2-он	61 <i>b</i>
<i>p</i> - $CH_3-C_6H_4-$	4-хидрокси-3-(1-(<i>p</i> -толилимино)етил)-2 <i>H</i> -хромен-2-он	62 <i>b</i>
<i>m</i> - $CH_3-C_6H_4-$	4-хидрокси-3-(1-(<i>m</i> -толилимино)етил)-2 <i>H</i> -хромен-2-он	63 <i>b</i>
<i>o</i> - $CH_3-C_6H_4-$	4-хидрокси-3-(1-(<i>o</i> -толилимино)етил)-2 <i>H</i> -хромен-2-он	64 <i>b</i>
<i>p</i> - $NO_2-C_6H_4-$	4-хидрокси-3-(1-(4-нитрофенилимино)етил)-2 <i>H</i> -хромен-2-он	65 <i>b</i>
<i>m</i> - $NO_2-C_6H_4-$	4-хидрокси-3-(1-(3-нитрофенилимино)етил)-2 <i>H</i> -хромен-2-он	66 <i>b</i>
$C_6H_5CH_2-$	3-(1-(бензилимино)етил)-4-хидрокси-2 <i>H</i> -хромен-2-он	67 <i>b</i>
$-CH_2(CH_2)_3COOH$	5-(1-(4-хидрокси-2-оксо-2 <i>H</i> -хромен-3-ил)етилиденамино)пентанска киселина	68 <i>b</i>
R_3	Амино деривати	
C_6H_5-	4-хидрокси-3-(1-(фениламино)етил)-2 <i>H</i> -хромен-2-он	61 <i>c</i>
<i>p</i> - $CH_3-C_6H_4-$	4-хидрокси-3-(1-(<i>p</i> -толиламино)етил)-2 <i>H</i> -хромен-2-он	62 <i>c</i>
<i>m</i> - $CH_3-C_6H_4-$	4-хидрокси-3-(1-(<i>m</i> -толиламино)етил)-2 <i>H</i> -хромен-2-он	63 <i>c</i>
<i>o</i> - $CH_3-C_6H_4-$	4-хидрокси-3-(1-(<i>o</i> -толиламино)етил)-2 <i>H</i> -хромен-2-он	64 <i>c</i>
<i>p</i> - $NO_2-C_6H_4-$	4-хидрокси-3-(1-(4-нитрофениламино)етил)-2 <i>H</i> -хромен-2-он	65 <i>c</i>
<i>m</i> - $NO_2-C_6H_4-$	4-хидрокси-3-(1-(3-нитрофениламино)етил)-2 <i>H</i> -хромен-2-он	66 <i>c</i>
$C_6H_5CH_2-$	3-(1-(бензиламино)етил)-4-хидрокси-2 <i>H</i> -хромен-2-он	67 <i>c</i>
$-CH_2(CH_2)_3COOH$	5-(1-(4-хидрокси-2-оксо-2 <i>H</i> -хромен-3-ил)етиламино)пентанска киселина	68 <i>c</i>



2.2. Физички и спектроскопски подаци синтетизованих кумаринских деривата

2.2.1. Тиоуреа деривати

2-Хидрокси-4-тиоуреидо-бензојева киселина (51b)

IR (KBr); ν_{\max} (cm^{-1}): 3360, 3295, 3184, 3028, 1637, 1599, 1525, 1506, 1468, 1390, 1304, 1259, 1228, 1179, 1152, 1141, 1073, 905, 775.

^1H NMR (200 MHz, DMSO- d_6); δ (ppm), J (Hz): 6,08 (d, 1H, $J_{5,6}=8,5$ Hz, 5-H), 6,14 (s, 1H, 3-H), 7,62 (d, 1H, $J_{5,6}=8,5$ Hz, 6-H), 9,5 (s, 2H, NH_2), 10,1 (широк синглет, 1H, OH), 11,9 (широк синглет, 1H, NH), 12,5 (широк синглет, 1H, OH из COOH).

Бруто формула једињења: $\text{C}_8\text{H}_8\text{N}_2\text{O}_3\text{S}$; (Mw 212,23); Израчунато %: C, 45,28; H, 3,80; N, 13,20; Нађено %: C, 45,30; H, 3,67; N, 13,62; Т.т. 76-78 °C; Принос 56 %

4-Тиоуреидо-бензенсулфонска киселина (53b)

IR (KBr); ν_{\max} (cm^{-1}): 3461, 3220, 3063, 2912, 1631, 1600, 1548, 1493, 1280, 1171, 1124, 819.

^1H NMR (200 MHz, DMSO- d_6); δ (ppm), J (Hz): 7,19 (d, 2H, 3-H, 5-H, $J_{3,2}=J_{5,6}=9$ Hz), 8,03 (d, 2H, 2-H, 6-H, $J_{2,3}=J_{6,5}=9$ Hz), 9,4 (широк синглет, 2H, NH_2), 11,82 (широк синглет, 1H, NH).

Бруто формула једињења: $\text{C}_7\text{H}_8\text{N}_2\text{O}_3\text{S}$; (Mw 232,28); Израчунато %: C, 36,20; H, 3,47; N, 12,06; Нађено %: C, 35,97; H, 3,61; N, 11,92; Т.т. 84-87 °C; Принос 53 %.

5-Тиоуреидо-пентанска киселина (55b)

IR (KBr); ν_{\max} (cm^{-1}): 3138, 2926, 1754, 1420, 1400, 1100.

^1H NMR (200 MHz, DMSO- d_6); δ (ppm), J (Hz): 1,55-1,6 (m, 4H, 3-H, 4-H), 2,2 (t, 2H, 2-H, $J_{2,3}=7$ Hz), 2,65 (t, 2H, 5-H, $J_{5,4}=7,1$ Hz), 9,0 (широк синглет, 1H, NH), 9,56 (широк синглет, 2H, NH_2), 11,8 (широк синглет, 1H, OH из COOH).

Бруто формула једињења: $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{N}_2\text{O}_2\text{S}$; (Mw 176,24); Израчунато %: C, 40,89; H, 6,86; N, 15,90; Нађено %: C, 40,84; H, 6,82; N, 15,93; Уље; Принос 39 %.

1,1-Диетил-тиоуреа (56b)

IR (KBr); ν_{\max} (cm^{-1}): 3399, 2994, 2981, 1611, 1140, 823

^1H NMR (200 MHz, DMSO- d_6); δ (ppm), J (Hz): 1,0 (t, 6H, CH_3 , $J=8,5$ Hz), 2,65 (q, 4H, CH_2 , $J=8,5$ Hz), 9,53 (широк синглет, 2H, NH_2).

Бруто формула једињења: $C_5H_{12}N_2S$; (Mw 132,23); Израчунато %: C, 45,42; H, 9,15; N, 21,19. Нађено %: C, 45,39; H, 9,18; N, 21,13; Уље; Принос 61 %.

***o*-Толил-тиоуреа (57b)**

IR (KBr); ν_{max} (cm^{-1}): 3447, 3284, 3169, 2986, 1611, 1552, 1533, 1289, 1067, 795, 741.

1H NMR (200 MHz, DMSO- d_6); δ (ppm), J (Hz): 6,5-6,7 (m, 2H, 4-H, 5-H), 6,8 (d, 1H, $J_{6,5}=7,5$ Hz, 6-H), 9,5 (широк синглет, 2H, NH_2), 12,4 (широк синглет, 1H, NH).

Бруто формула једињења: $C_8H_{10}N_2S$; (Mw 166,24); Израчунато %: C, 57,80; H, 6,06; N, 16,85; Нађено %: C, 56,73; H, 6,01; N, 16,91; Т.т. 44-46 °C; Принос 44 %.

2.2.2. 2-Амино тиазолински деривати 4-хидроксикумарина

3-(2-Амино-тиазол-4-ил)-4-хидрокси-хромен-2-он (49c)

IR (KBr); ν_{max} (cm^{-1}): 3433, 3381, 3241, 3122, 1698, 1609, 1524, 1405, 1328, 1294, 1165, 1072, 950.

1H NMR (200 MHz, DMSO- d_6); δ (ppm), J (Hz): 7,29-7,37 (m, 2H, 6-H, 8-H, $J_{6,8}=1,16$ Hz, $J_{6,5}=7,90$ Hz, $J_{6,7}=7,35$ Hz, $J_{8,7}=8,35$ Hz), 7,21 (s, 1H, 5'-H), 7,44 (ddd, 1H, 7-H, $J_{6,7}=7,35$ Hz, $J_{7,5}=1,63$ Hz, $J_{8,7}=8,35$ Hz), 8,58 (широк синглет, 1H, NH_2 , спора измена са D_2O), 15,87 (s, 1H, 4-OH, брза измена са D_2O).

^{13}C NMR (50 MHz, DMSO- d_6); δ (ppm), J (Hz): 165,452 (C-2'), 140,67 (C-4'), 108,56 (C-5'), 154,28 (C-2), 93,86 (C-3), 163,09 (C-4), 123,76 (C-5), 124,06 (C-6), 132,11 (C-7), 116,34 (C-8), 120,23 (C-9), 152,05 (C-10).

Бруто формула једињења: $C_{12}H_8N_2O_3S$; (Mw 260,27); Израчунато %: C, 55,37; H, 3,10; N, 10,76; Нађено %: C, 55,12; H, 2,98; N, 10,38; Т.т. 255-257 °C; Принос 60 %.

4-Хидрокси-3-(2-метиламинотиазол-4-ил)хромен-2-он (50c)

IR (KBr); ν_{max} (cm^{-1}): 3433, 3381, 3155, 3116, 1698, 1630, 1513, 1409, 1340, 1299, 1185, 1092, 960.

1H NMR (200 MHz, DMSO- d_6); δ (ppm), J (Hz): 2,98 (s, 3H, CH_3), 7,29-7,82 (m, 4H, 6-H, 7-H, 5-H, 8-H, $J_{7,5}=1,63$ Hz, $J_{6,8}=1,18$ Hz, $J_{6,5}=7,89$ Hz, $J_{6,7}=7,37$ Hz), 7,36 (s, 1H, 5-H), 11,01 (широк синглет, 1H, NH), 16,36 (широк синглет, 1H, 4-OH, брза измена са D_2O).

^{13}C NMR (50 MHz, DMSO- d_6); δ (ppm), J (Hz): 159,42 (C-2'), 109,46 (C-5'), 141,67 (C-4'), 156,32 (C-2), 168,39 (C-4), 32,34 (CH₃).

Бруто формула једињења: C₁₃H₁₀N₂O₃S; (Mw 274,30); Израчунато %: C, 56,92; H, 3,67; N, 10,26; Нађено %: C, 56,62; H, 23,98; N, 10,28; Т.т. 218-220 °C; Принос 67 %.

2-Хидрокси-4-[4-(4-хидрокси-2-оксо-2*H*-хромен-3-ил)-тиазол-2-иламино]-бензојева киселина (51c)

IR (KBr); ν_{max} (cm⁻¹): 3413,3295, 3184, 3028, 1637, 1599, 1525, 1506, 1468, 1450, 1390, 1304, 1259, 1228, 1179, 1152, 1141, 1073, 905, 775.

^1H NMR (200 MHz, DMSO- d_6); δ (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 D₂O).

Бруто формула једињења: C₁₉H₁₂N₂O₆S; (Mw 396,37); Израчунато %: C, 57,57; H, 3,05; N, 7,07; Нађено %: C, 56,90; H, 3,01; N, 7,14; Т.т. 282-284 °C; Принос 79 %.

4-Хидрокси-3-[2-(4-нитро-фениламино)-тиазол-4-ил]-хромен-2-он (52c)

IR (KBr); ν_{max} (cm⁻¹): 3414, 3134, 1682, 1636, 1608, 1519, 1465, 1425, 1369, 1261, 1213, 1098, 783, 764.

^1H NMR (200 MHz, DMSO- d_6); δ (ppm), J (Hz): 7,3 (m, 1H, 6-H), 7,35 (d, 2H, $J_{3'',2''}=J_{5,6}=8,2$ Hz, 3''-H, 5''-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), 8,03 (d, 2H, $J_{2'',3''}=J_{6'',5''}=8,2$ 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 D₂O).

Бруто формула једињења: C₁₈H₁₁N₃O₅S; (Mw 381,36); Израчунато %: C, 56,69; H, 2,91; N, 11,02; Нађено %: C, 57,05; H, 2,93; N, 10,95; Т.т. 227-230 °C; Принос 82 %.

4-[4-(4-Хидрокси-2-оксо-2*H*-хромен-3-ил)-тиазол-2-иламино]-бензенсулфонска киселина (53c)

IR (KBr); ν_{max} (cm⁻¹): 3436, 3180, 3061, 2910, 1694, 1611, 1551, 1493, 1216, 1188, 1164, 1127, 1099, 1037, 1012, 820, 751.

^1H NMR (200 MHz, DMSO- d_6); δ (ppm), J (Hz): 7,0 (d, 2H, 3''-H, 5''-H, $J_{3'',2''}=J_{5'',6''}=9$ 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), 7,78 (s, 1H, 5'-H), 8,03 (d, 2H, $J_{2'',3''}=J_{6'',5''}=9$ 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_2O).

Бруто формула једињења: $\text{C}_{18}\text{H}_{12}\text{N}_2\text{O}_6\text{S}_2$; (Mw 416,43); Израчунато %: C, 51,92; H, 2,90; N, 6,73; Нађено %: C, 51,90; H, 2,87; N, 6,75; Т.т. 247-249 °C; Принос 72 %.

4-Хидрокси-3-(2-*m*-толиламино-тиазол-4-ил)-хромен-2-он (54c)

IR (KBr); ν_{max} (cm^{-1}): 3412, 3067, 2974, 2938, 1681, 1607, 1585, 1518, 1465, 1369, 1261, 1098, 967, 791, 755.

^1H NMR (200 MHz, DMSO- d_6); δ (ppm), J (Hz): 2,20 (s, 3H, CH_3), 6,6 (d, 1H, $J_{6'',5''}=7,5$ 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_2O).

Бруто формула једињења: $\text{C}_{19}\text{H}_{14}\text{N}_2\text{O}_3\text{S}$; (Mw 350,39); Израчунато %: C, 65,13; H, 4,03; N, 7,99; Нађено %: C, 65,10; H, 3,99; N, 8,03; Т.т. 270-273 °C; Принос 84 %.

5-[4-(4-Хидрокси-2-оксо-2*H*-хромен-3-ил)-тиазол-2-иламино]-пентанска киселина (55c)

IR (KBr); ν_{max} (cm^{-1}): 3416, 3114, 3084, 2926, 2853, 1690, 1614, 1549, 1496, 1270, 1200, 1106, 1033, 1000, 890, 759.

^1H NMR (200 MHz, DMSO- d_6); δ (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).

Бруто формула једињења: $\text{C}_{17}\text{H}_{16}\text{N}_2\text{O}_5\text{S}$; (Mw 360,38); Израчунато %: C, 56,66; H, 4,47; N, 7,77; Нађено %: C, 57,01; H, 4,23; N, 7,58; Т.т. 224-225 °C; Принос 71 %.

3-(2-Диетиламино-тиазол-4-ил)-4-хидрокси-хромен-2-он (56c)

IR (KBr); ν_{max} (cm^{-1}): 3413, 3067, 3054, 1693, 1621, 1578, 1544, 1413, 1348, 1274, 791, 754.

^1H NMR (200 MHz, DMSO- d_6); δ (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_2O).

Бруто формула једињења: $\text{C}_{16}\text{H}_{16}\text{N}_2\text{O}_3\text{S}$; (Mw 316,37); Израчунато %: C, 60,74; H, 5,10; N, 8,85; Нађено %: C, 60,70; H, 5,15; N, 8,82; Т.т. 245-247 °C; Принос 63 %.

4-Хидрокси-3-(2-*o*-толиламино-тиазол-4-ил)-хромен-2-он (57c)

IR (KBr); ν_{max} (cm^{-1}): 3414, 3301, 3040, 2982, 1690, 1605, 1577, 1521, 1412, 1293, 1270, 1182, 1111, 1035, 949, 753, 738.

^1H NMR (200 MHz, DMSO- d_6); δ (ppm), J (Hz): 2,10 (s, 3H, CH_3), 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_2O).

Бруто формула једињења: $\text{C}_{19}\text{H}_{14}\text{N}_2\text{O}_3\text{S}$; (Mw 350,39); Израчунато %: C, 65,13; H, 4,03; N, 7,99; Нађено %: C, 65,09; H, 3,97; N, 8,05; Т.т. 236-238 °C; Принос 54 %.

4-Хидрокси-3-[2-(3-нитро-фениламино)-тиазол-4-ил]-хромен-2-он (58c)

IR (KBr); ν_{max} (cm^{-1}): 3415, 3279, 3083, 1675, 1615, 1552, 1527, 1492, 1413, 1353, 1269, 1157, 1118, 760.

^1H NMR (200 MHz, DMSO- d_6); δ (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_2O).

Бруто формула једињења: $\text{C}_{18}\text{H}_{11}\text{N}_3\text{O}_5\text{S}$; (Mw 381,36); Израчунато %: C, 56,69; H, 2,91; N, 11,02; Нађено %: C, 57,07; H, 2,85; N, 10,98; Т.т. >300 °C; Принос 67 %.

4-Хидрокси-3-(2-(нафтален-1-иламино)тиазол-4-ил)-2H-хромен-2-он (59c)

IR (KBr); ν_{max} (cm^{-1}): 3413, 3287, 3054, 1693, 1621, 1578, 1544, 1413, 1348, 1274, 791, 754.

^1H NMR (200 MHz, DMSO- d_6); δ (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_2O).

Бруто формула једињења: $\text{C}_{22}\text{H}_{14}\text{N}_2\text{O}_3\text{S}$; (Mw 386,42); Израчунато %: C, 68,38; H, 3,65; N, 7,25; Нађено %: C, 68,29; H, 3,72; N, 7,29; Т.т. 278-280 °C; Принос 82 %.

2.2.3. Имнио деривати 4-хидроксикумарина

4-Хидрокси-3-(1-(фенилимино)етил)-2H-хромен-2-он (61b)

IR (KBr); ν_{max} (cm^{-1}): 3415, 3073, 3037, 2929, 2853, 1704, 1609, 1592, 1561, 1480.

^1H NMR (200 MHz, CDCl_3); δ (ppm), J (Hz): 2,72 (s, 3H, $\text{CH}_3\text{-C=N}$), 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), 6,9-7,21 (m, 5H, фенил), 16,15 (широк синглет, 1H, 4-OH, брза измена са D_2O).

^{13}C NMR (50 MHz, CDCl_3); δ (ppm): 20,9 ($\text{CH}_3\text{-C=N}$), 97,4 (C_3), 116,2 (C_{10}), 116,8 (C_8), 119,1 (C_5), 119,8 ($\text{C}_{2''}$, $\text{C}_{6''}$), 125,9 (C_6), 126,9 ($\text{C}_{4''}$), 129,4 (C_7), 131,5 ($\text{C}_{3''}$, $\text{C}_{5''}$), 138,1 ($\text{C}_{1''}$), 152,4 (C_9), 163,4 (C_2), 180,3 ($\text{C}_{1'}$), 180,5 (C_4).

MS: m/z (%)=279 (M^+ , 64), 278 (100), 264 (17), 262 (10), 188 (19), 187 (28), 158 (12), 144 (4), 131 (9), 130 (14), 121 (19), 118 (10).

Бруто формула једињења: $\text{C}_{17}\text{H}_{13}\text{NO}_3$ (Mw 279,29); Израчунато %: C, 73,11; H, 4,69; N, 5,02; Нађено %: C, 73,09; H, 4,71; N, 4,97; Т.т. 169-171 °C; Принос 95 %.

4-Хидрокси-3-(1-(*p*-толилимино)етил)-2H-хромен-2-он (62b)

IR (KBr); ν_{max} (cm^{-1}): 3421, 3073, 2985, 2922, 2852, 1709, 1611, 1597, 1569, 1513, 1483.

^1H NMR (200 MHz, CDCl_3); δ (ppm), J (Hz): 2,41 (s, 3H, $\text{CH}_3\text{-C}_{4''}$), 2,69 (s, 3H, $\text{CH}_3\text{-C=N}$), 7,09-7,65 (ABq, 4H, 2'',3'',5'',6''-H, $J=8,43$ 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), 16,07 (широк синглет, 1H, $\text{C}_4\text{-OH}$, брза измена са D_2O).

^{13}C NMR (50 MHz, CDCl_3); δ (ppm): 20,6 ($\text{CH}_3\text{-C}_4''$), 20,8 ($\text{CH}_3\text{-C=N}$), 97,3 (C_3), 116,6 (C_{10}), 116,8 (C_8), 119,3 (C_5), 119,9 (C_2'' , C_6''), 125,9 (C_6), 129,3 (C_7), 129,9 (C_4''), 131,7 (C_3'' , C_5''), 138,4 (C_1''), 163,5 (C_2), 152,4 (C_9), 180,4 (C_4), 180,5 (C_1').

MS: m/z (%)=293 (M^+ , 91), 292 (100), 278 (32), 276 (20), 188 (21), 187 (12), 172 (9), 144 (12), 132 (10), 121 (23), 107 (12), 106 (11), 91 (23).

Бруто формула једињења: $\text{C}_{18}\text{H}_{15}\text{NO}_3$ (Mw 293,32); Израчунато %: C, 73,71; H, 5,15; N, 4,78; Нађено %: C, 73,72; H, 5,12; N, 4,79; Т.т. 147-149 °C; Принос 97 %.

4-Хидрокси-3-(1-(*m*-толилимино)етил)-2*H*-хромен-2-он (63*b*)

IR (KBr); ν_{max} (cm^{-1}): 3417, 3067, 2982, 2929, 2853, 1697, 1606, 1600, 1566, 1484.

^1H NMR (200 MHz, CDCl_3); δ (ppm), J (Hz): δ 2,42 (s, 3H, $\text{CH}_3\text{-C}_3''$), 2,70 (s, 3H, $\text{CH}_3\text{-C=N}$), 7,01 (dd, 1H, 4''-H, $J_{4'',5''}=7,58$ Hz, $J_{4'',6''}=1,14$ Hz), 7,04 (dd, 1H, 6''-H, $J_{6'',5''}=8,12$ Hz, $J_{6'',4''}=1,14$ Hz), 7,12 (s, 1H, 2''-H), 7,25 (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), 7,6 (dd, 1H, 5-H, $J_{5,6}=7,8$ Hz, $J_{5,7}=1,7$ Hz), 7,7 (m, 1H, 7-H), 15,9 (широк синглет, 1H, 4-OH, брза измена са D_2O).

^{13}C NMR (50 MHz, CDCl_3); δ (ppm): 20,9 ($\text{CH}_3\text{-C=N}$), 21,0 ($\text{CH}_3\text{-C}_3''$), 97,2 (C_3), 116,7 (C_8), 116,9 (C_{10}), 118,9 (C_6''), 119,3 (C_5), 121,9 (C_2''), 124,0 (C_4''), 125,9 (C_6), 129,3 (C_7), 130,7 (C_5''), 139,1 (C_1''), 139,1 (C_3''), 163,6 (C_2), 152,1 (C_9), 180,3 (C_1'), 180,6 (C_4).

MS: m/z (%)=293 (M^+ , 81), 292 (100), 278 (30), 276 (12), 188 (14), 187 (27), 172 (11), 158 (7), 145 (13), 144 (12), 132 (10), 121 (19), 107 (12), 91 (20).

Бруто формула једињења: $\text{C}_{18}\text{H}_{15}\text{NO}_3$ (Mw 293,32); Израчунато %: C, 73,71; H, 5,15; N, 4,78; Нађено %: C, 73,72; H, 5,14; N, 4,79; Т.т. 109-110 °C; Принос 94 %.

4-Хидрокси-3-(1-(*o*-толилимино)етил)-2*H*-хромен-2-он (64*b*)

IR (KBr); ν_{max} (cm^{-1}): 3467, 3072, 2935, 2856, 1712, 1611, 1594, 1563, 1486.

^1H NMR (200 MHz, CDCl_3); δ (ppm), J (Hz): δ 2,30 (s, 3H, $\text{CH}_3\text{-C}_1''$), 2,81 (s, 3H, $\text{CH}_3\text{-C=N}$), 7,13 (m, 1H, 4''-H), 7,23 (dd, 1H, 6''-H, $J_{6'',5''}=8,01$ Hz, $J_{6'',4''}=1,12$ Hz), 7,28 (dd, 1H, 3''-H, $J_{3'',4''}=7,62$ Hz, $J_{3'',5''}=1,11$ 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), 7,37 (m, 1H, 5''-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), 15,8 (широк синглет, 1H, 4-OH, брза измена са D_2O).

^{13}C NMR (50 MHz, CDCl_3); δ (ppm): 20,2 ($\text{CH}_3\text{-C=N}$), 20,9 ($\text{CH}_3\text{-C}_2''$), 97,8 (C_3), 116,1 (C_{10}), 116,8 (C_8), 118,9 (C_6''), 119,3 (C_5), 122,7 (C_2''), 124,1 (C_4''), 125,8 (C_6), 129,1 (C_7), 129,8 (C_5''), 138,9 (C_1''), 139,1 (C_3''), 163,5 (C_2), 152,5 (C_9), 179,6 (C_1'), 180,4 (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).

Бруто формула једињења: $\text{C}_{18}\text{H}_{15}\text{NO}_3$ (Mw 293,32); Израчунато %: C, 73,71; H, 5,15; N, 4,78; Нађено %: C, 73,75; H, 5,21; N, 4,73; Т.т. 138-139 °C; Принос 94 %.

4-Хидрокси-3-(1-(4-нитрофенилимино)етил)-2H-хромен-2-он (65b)

IR (KBr); ν_{max} (cm^{-1}): 3414, 3081, 3046, 2992, 2947, 2849, 1707, 1608, 1580, 1519, 1483, 1557, 1340.

^1H NMR (200 MHz, CDCl_3); δ (ppm), J (Hz): δ 2,76 (s, 3H, $\text{CH}_3\text{-C=N}$), 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 (d, 2H, 3'',5''-H, $J_{3'',5''}=8,9$ 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), 8,39 (d, 2H, 2'',6''-H, $J_{2'',3''}, 6'',5''=8,9$ Hz), 15,95 (широк синглет, 1H, 4-OH, брза измена са D_2O).

^{13}C NMR (50 MHz, CDCl_3); δ (ppm): 20,8 ($\text{CH}_3\text{-C=N}$), 97,9 (C_3), 116,4 (C_8), 116,9 (C_{10}), 119,6 (C_5), 123,2 (C_2'' , C_6''), 125,3 (C_6), 129,1 (C_7), 133,2 (C_3'' , C_5''), 136,1 (C_1''), 145,3 (C_4''), 152,4 (C_9), 163,1 (C_2), 177,5 (C_1'), 180,7 (C_4).

MS: m/z (%)=324 (M^+ , 60), 323 (100), 309 (8), 307 (10), 294 (14), 277 (18), 263 (8), 188 (26), 187 (47), 121 (48), 117 (12), 108 (7).

Бруто формула једињења: $\text{C}_{17}\text{H}_{12}\text{N}_2\text{O}_5$ (Mw 324,29); Израчунато %: C, 62,96; H, 3,73; N, 8,64; Нађено %: C, 62,97; H, 3,77; N, 8,69; Т.т. 212-215 °C; Принос 92 %.

4-Хидрокси-3-(1-(3-нитрофенилимино)етил)-2H-хромен-2-он (66b)

IR (KBr); ν_{max} (cm^{-1}): 3416, 3089, 3062, 2980, 2936, 2853, 1705, 1609, 1590, 1538, 1491, 1562, 1353.

^1H NMR (200 MHz, CDCl_3); δ (ppm), J (Hz): δ 2,61 (s, 3H, $\text{CH}_3\text{-C=N}$), 7,26 (dd, 1H, 6''-H, $J=8,02$ Hz, $J=1,12$ Hz), 7,3 (m, 1H, 6-H), 7,34 (s, 1H, 2''-H), 7,4 (dd, 1H, 8-H, $J_{8,7}=8,3$ Hz, $J_{8,6}=1,1$ Hz), 7,54 (m, 1H, 5''-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), 8,09 (dd, 1H, 4''-H, $J_{4'',5''}=8,5$ Hz, $J_{4'',6''}=1,12$ Hz), 16,02 (широк синглет, 1H, 4-OH, брза измена са D_2O).

^{13}C NMR (50 MHz, CDCl_3); δ (ppm): 19,2 ($\text{CH}_3\text{-C=N}$), 97,9 (C_3), 116,4 (C_8), 116,5 (C_{10}), 117,8 ($\text{C}_{2''}$), 119,4 (C_5), 121,4 ($\text{C}_{4''}$), 125,5 (C_6), 127,3 ($\text{C}_{6''}$), 129,3 (C_7), 131,5 ($\text{C}_{5''}$), 141,9 ($\text{C}_{1''}$), 163,5 (C_2), 148,2 ($\text{C}_{3''}$), 152,1 (C_9), 177,4 ($\text{C}_{1'}$), 180,1 (C_4).

MS: m/z (%)=324 (M^+ 69), 323 (83), 307 (100), 294 (14), 263 (61), 188 (26), 187 (67), 163 (15), 157 (12), 121 (78), 117 (19), 103 (9).

Бруто формула једињења: $\text{C}_{17}\text{H}_{12}\text{N}_2\text{O}_5$ (Mw 324,29); Израчунато %: C, 62,96; H, 3,73; N, 8,64; Нађено %: C, 62,96; H, 3,73; N, 8,64; Т.т. 209-210 °C; Принос 97 %.

3-(1-(Бензилимино)етил)-4-хидрокси-2H-хромен-2-он (67b)

IR (KBr); ν_{max} (cm^{-1}): 3406, 3032, 3012, 2930, 1698, 1612, 1586, 1572, 1485.

^1H NMR (200 MHz, CDCl_3); δ (ppm), J (Hz): δ 2,64 (s, 3H, $\text{CH}_3\text{-C=N}$), 3,25 (s, 2H, $\text{CH}_2\text{-N=C}$), 7,29 (m, 2H, 3'',5''-H), 7,26 (m, 1H, 4''-H), 7,39 (dd, 2H, 2'',6''-H, $J_{2'',3''}, 6'',5''=7,7$ Hz, $J_{2'',4''}, 6'',4''=1,1$ 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), 16,01 (широк синглет, 1H, 4-OH, брза измена са D_2O).

^{13}C NMR (50 MHz, CDCl_3); δ (ppm): 17,9 ($\text{CH}_3\text{-C=N}$), 57,4 (C=N-CH_2), 97,7 (C_3), 116,7 (C_{10}), 116,8 (C_8), 119,3 (C_5), 125,9 (C_6), 126,7 ($\text{C}_{4''}$), 127,0 ($\text{C}_{2''}$, $\text{C}_{6''}$), 128,3 ($\text{C}_{3''}$, $\text{C}_{5''}$), 129,3 (C_7), 138,7 ($\text{C}_{1''}$), 163,5 (C_2), 167,1 ($\text{C}_{1'}$), 152,5 (C_9), 180,3 (C_4).

MS: m/z (%)=293 (M^+ , 100), 292 (14), 276 (15), 202 (66), 173 (10), 156 (19), 144 (14), 121 (16), 107 (12), 106 (6).

Бруто формула једињења: $\text{C}_{18}\text{H}_{15}\text{NO}_3$ (Mw 293,32); Израчунато %: C, 73,71; H, 5,15; N, 4,78; Нађено %: C, 73,73; H, 5,13; N, 4,73; Т.т. 151-152 °C; Принос 97 %.

5-(1-(4-Хидрокси-2-оксо-2H-хромен-3-ил)етилиденамино)пентанска киселина (68b)

IR (KBr); ν_{max} (cm^{-1}): 3418, 3602-2811, 2947, 2930, 2875, 1721, 1703, 1614, 1600, 1560, 1487.

^1H NMR (200 MHz, CDCl_3); δ (ppm), J (Hz): 1,82 (m, 4H, 2'',3''-H), 2,46 (t, 2H, 4''-H, $J_{4'',3''}=7,07$ Hz), 2,70 (s, 3H, $\text{CH}_3\text{-C=N}$), 3,60 (t, 2H, 1''-H, $J_{1'',2''}=7,1$ 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), 11,3 (широк синглет, 1H, OH из COOH), 16,11 (широк синглет, 1H, 4-OH, брза измена са D_2O).

^{13}C NMR (50 MHz, CDCl_3); δ (ppm): 18,9 ($\text{CH}_3\text{-C=N}$), 22,9 ($\text{C}_{3''}$), 30,4 ($\text{C}_{2''}$), 33,5 ($\text{C}_{4''}$), 53,9 ($\text{C}_{1''}$), 98,1 (C_3), 116,5 (C_8), 116,7 (C_{10}), 119,3 (C_5), 125,4 (C_6), 129,2 (C_7), 152,5 (C_9), 163,4 (C_2), 169,0 (C_1), 178,5 ($\text{C}_{5''}$), 180,4 (C_4).

MS: m/z (%)=303 (M^+).

Бруто формула једињења: $\text{C}_{16}\text{H}_{17}\text{NO}_5$ (Mw 303,11); Израчунато %: C, 63,36; H, 5,65; N, 4,62; Нађено %: C, 63,27; H, 5,68; N, 4,63; Т.т. 169-171 °C; Принос 87 %.

2.2.4. Амнио деривати 4-хидроксикумарина

4-Хидрокси-3-(1-(фениламино)етил)-2H-хромен-2-он (61c)

IR (KBr); ν_{max} (cm^{-1}): 3429, 3183, 3072, 2970, 2933, 1669, 1614, 1602, 1567, 1497.

^1H NMR (200 MHz, CDCl_3); δ (ppm), J (Hz): 1,34 (d, 3H, $\text{C}_{1'}$ - CH_3 , $J_{2',1'}=6,68$ Hz), 3,91 (q, 1H, $\text{C}_{2'}$ -CH, $J_{1',2'}=6,68$ Hz), 3,96 (шири синглет, 1H, NH), 7,3 (m, 1H, 6-H), 6,87-7,23 (m, 5H, фенил), 7,29 (m, 1H, 7-H), 7,64 (dd, 1H, 8-H, $J_{8,7}=8,4$ Hz, $J_{8,6}=1,1$ Hz), 7,84 (dd, 1H, 5-H, $J_{5,6}=7,8$ Hz, $J_{5,7}=1,67$ Hz), 17,05 (широк синглет, 1H, C_4 -OH, брза измена са D_2O).

^{13}C NMR (50 MHz, CDCl_3); δ (ppm): 20,3 ($\text{C}_{2'}$), 45,4 ($\text{C}_{1'}$), 91,8 (C_3), 117,3 (C_8), 117,4 (C_{10}), 117,6 ($\text{C}_{2''}$, $\text{C}_{6''}$), 121,8 ($\text{C}_{4''}$), 123,7 (C_5), 124,1 (C_6), 129,4 ($\text{C}_{3''}$, $\text{C}_{5''}$), 131,4 (C_7), 145,6 ($\text{C}_{1''}$), 152,8 (C_9), 161,3 (C_2), 163,8 (C_4).

MS: m/z (%)=281 (M^+ , 4), 280 (15), 266 (11), 204 (100), 190 (91), 175 (74), 162 (12), 147 (34), 121 (89), 120 (61), 92 (44).

Бруто формула једињења: $\text{C}_{17}\text{H}_{15}\text{NO}_3$ (Mw 281,31); Израчунато %: C, 72,58; H, 5,37; N, 4,98; Нађено %: C, 72,64; H, 5,51; N, 5,03; Т.т. 189-190 °C; Принос 89 %.

4-Хидрокси-3-(1-(*p*-толиламино)етил)-2H-хромен-2-он (62c)

IR (KBr); ν_{max} (cm^{-1}): 3466, 3191, 3071, 2989, 2966, 1671, 1612, 1601, 1566, 1499.

^1H NMR (200 MHz, CDCl_3); δ (ppm), J (Hz): 1,33 (d, 3H, $\text{C}_{1'}$ - CH_3 , $J_{2',1'}=6,69$ Hz), 2,26 (s, 3H, $\text{C}_{4''}$ - CH_3), 3,93 (q, 1H, $\text{C}_{2'}$ -CH, $J_{1',2'}=6,69$ Hz), 4,09 (шири синглет, 1H, NH), 6,73-7,11 (ABq, 4H, 2'',3'',5'',6''-H, $J=8,43$ Hz), 7,29 (m, 1H, 6-H), 7,63 (dd, 1H, 8-H, $J_{8,7}=8,3$ Hz, $J_{8,6}=1,11$ Hz), 7,29 (m, 1H, 7-H), 7,84 (dd, 1H, 5-H, $J_{5,6}=7,81$ Hz, $J_{5,7}=1,69$ Hz), 17,09 (широк синглет, 1H, 4-OH, брза измена са D_2O).

^{13}C NMR (50 MHz, CDCl_3); δ (ppm): 20,8 (C_2'), 21,2 ($\text{CH}_3\text{-C}_4''$), 45,3 (C_1'), 91,9 (C_3), 113,6 (C_2'' , C_6''), 117,3 (C_{10}), 117,4 (C_8), 123,7 (C_5), 124,1 (C_6), 129,4 (C_4''), 129,8 (C_3'' , C_5''), 131,3 (C_7), 145,2 (C_1''), 152,9 (C_9), 161,4 (C_2), 163,8 (C_4).

MS: m/z (%)=295 (M^+ , 6), 294 (11), 280 (32), 256 (9), 204 (100), 190 (74), 175 (87), 121 (91), 92 (42).

Бруто формула једињења: $\text{C}_{18}\text{H}_{17}\text{NO}_3$ (Mw 295,33); Израчунато %: C, 73,20; H, 5,80; N, 4,74; Нађено %: C, 73,12; H, 5,67; N, 4,77; Т.т. 167-169 °C; Принос 86 %.

4-Хидрокси-3-(1-(*m*-толиламино)етил)-2H-хромен-2-он (63c)

IR (KBr); ν_{max} (cm^{-1}): 3455, 3179, 3069, 2970, 2932, 2870, 1670, 1615, 1601, 1567, 1497.

^1H NMR (200 MHz, CDCl_3); δ (ppm), J (Hz): 1,33 (d, 3H, $\text{C}_1'\text{-CH}_3$, $J_{2',1'}=6,69$ Hz), 2,21 (s, 3H, $\text{C}_3''\text{-CH}_3$), 3,87 (q, 1H, $\text{C}_2'\text{-CH}$, $J_{1',2'}=6,69$ Hz), 3,94 (шири синглет, 1H, NH), 6,77 (dd, 1H, 6"-H, $J_{6'',5''}=7,99$ Hz, $J_{6'',4''}=1,12$ Hz), 6,71 (s, 1H, 2"-H), 7,01 (dd, 1H, 4"-H, $J_{4'',5''}=7,58$ Hz, $J_{4'',6''}=1,12$ Hz), 7,19 (m, 1H, 5"-H), 7,3 (m, 1H, 6-H), 7,28 (m, 1H, 7-H), 7,63 (dd, 1H, 8-H, $J_{8,7}=8,3$ Hz, $J_{8,6}=1,11$ Hz), 7,86 (dd, 1H, 5-H, $J_{5,6}=7,8$ Hz, $J_{5,7}=1,7$ Hz), 17,09 (широк синглет, 1H, 4-OH, брза измена са D_2O).

^{13}C NMR (50 MHz, CDCl_3); δ (ppm): 20,8 (C_2'), 21,1 ($\text{CH}_3\text{-C}_3''$), 45,2 (C_1'), 91,4 (C_3), 110,4 (C_6''), 113,9 (C_2''), 117,2 (C_{10}), 117,3 (C_8), 118,4 (C_4''), 123,6 (C_5), 124,3 (C_6), 129,1 (C_5''), 131,2 (C_7), 138,7 (C_3''), 146,2 (C_1''), 152,7 (C_9), 161,5 (C_2), 163,7 (C_4).

MS: m/z (%)=295 (M^+ , 9), 294 (14), 280 (6), 256 (7), 227 (15), 204 (100), 199 (23), 190 (64), 175 (72), 162 (16), 147 (18), 121 (93), 120 (49), 92 (44).

Бруто формула једињења: $\text{C}_{18}\text{H}_{17}\text{NO}_3$ (Mw 295,33); Израчунато %: C, 73,20; H, 5,80; N, 4,74; Нађено %: C, 73,18; H, 5,66; N, 4,78; Т.т. 119-121 °C; Принос 91 %.

4-Хидрокси-3-(1-(*o*-толиламино)етил)-2H-хромен-2-он (64c)

IR (KBr); ν_{max} (cm^{-1}): 3433, 3193, 3066, 2985, 2970, 2932, 1670, 1615, 1602, 1568, 1499.

^1H NMR (200 MHz, CDCl_3); δ (ppm), J (Hz): 1,31 (d, 3H, $\text{C}_1'\text{-CH}_3$, $J_{2',1'}=6,67$ Hz), 2,19 (s, 3H, $\text{C}_3''\text{-CH}_3$), 3,82 (q, 1H, $\text{C}_2'\text{-CH}$, $J_{1',2'}=6,67$ Hz), 3,87 (шири синглет, 1H, NH), 6,91 (dd, 1H, 6"-H, $J_{6'',5''}=8$ Hz, $J_{6'',4''}=1,11$ Hz), 6,99 (m, 1H, 4"-H), 7,11 (m, 1H, 5"-H), 7,21 (dd, 1H, 3"-H, $J_{3'',4''}=7,62$ Hz, $J_{3'',5''}=1,11$ Hz), 7,27 (m, 1H, 7-H), 7,29 (m, 1H, 6-H), 7,65 (dd, 1H, 8-H, $J_{8,7}=8,29$ Hz, $J_{8,6}=1,1$ Hz), 7,86 (dd, 1H, 5-H, $J_{5,6}=7,8$ Hz, $J_{5,7}=1,7$ Hz), 17,08 (широк синглет, 1H, 4-OH, брза измена са D_2O).

^{13}C NMR (50 MHz, CDCl_3); δ (ppm): 17,7 ($\text{CH}_3\text{-C}_{2''}$), 19,5 ($\text{C}_{2'}$), 44,1 ($\text{C}_{1'}$), 91,9 (C_3), 111,3 ($\text{C}_{6''}$), 117,4 (C_8), 117,5 (C_{10}), 121,1 ($\text{C}_{4''}$), 122,5 ($\text{C}_{2''}$), 123,3 (C_5), 124,2 (C_6), 126,1 ($\text{C}_{5''}$), 128,6 ($\text{C}_{3''}$), 131,4 (C_7), 144,5 ($\text{C}_{1''}$), 152,7 (C_9), 161,2 (C_2), 163,9 (C_4).

MS: m/z (%)=295 (M^+ , 3), 294 (18), 280 (42), 256 (19), 204 (100), 190 (87), 175 (93), 121 (91), 92 (25).

Бруто формула једињења: $\text{C}_{18}\text{H}_{17}\text{NO}_3$ (M_w 295,33); Израчунато %: C, 73,20; H, 5,80; N, 4,74; Нађено %: C, 73,28; H, 5,76; N, 4,79; Т.т. 147-149 °C; Принос 82 %.

4-Хидрокси-3-(1-(4-нитрофениламино)етил)-2H-хромен-2-он (65c)

IR (KBr); ν_{max} (cm^{-1}): 3433, 3184, 3076, 2971, 2931, 1673, 1613, 1601, 1567, 1497, 1528, 1344.

^1H NMR (200 MHz, CDCl_3); δ (ppm), J (Hz): δ 1,33 (d, 3H, $\text{C}_{1'}$ - CH_3 , $J_{2',1'}=6,68$ Hz), 3,78 (q, 1H, $\text{C}_{2'}$ -CH, $J_{1',2'}=6,68$ Hz), 4,14 (шири синглет, 1H, NH), 7,3 (m, 1H, 6-H), 7,4 (dd, 1H, 8-H, $J_{8,7}=8,3$ Hz, $J_{8,6}=1,1$ Hz), 6,81-8,13 (ABq, 4H, 2'',3'',5'',6''-H, $J=8,9$ Hz), 7,6 (dd, 1H, 5-H, $J_{5,6}=7,79$ Hz, $J_{5,7}=1,71$ Hz), 7,7 (m, 1H, 7-H), 17,1 (широк синглет, 1H, C_4 -OH, брза измена са D_2O).

^{13}C NMR (50 MHz, CDCl_3); δ (ppm): 20,1 ($\text{C}_{2'}$), 43,5 ($\text{C}_{1'}$), 91,5 (C_3), 113,4 ($\text{C}_{2''}$, $\text{C}_{6''}$), 117,1 (C_8), 117,6 (C_{10}), 123,8 (C_5), 124,1 (C_6), 127,2 ($\text{C}_{3''}$, $\text{C}_{5''}$), 131,3 (C_7), 136,3 ($\text{C}_{4''}$), 151,1 ($\text{C}_{1''}$), 152,3 (C_9), 161,4 (C_2), 163,9 (C_4).

MS: m/z (%)=326 (M^+ , 1), 325 (14), 311 (8), 307 (10), 204 (100), 189 (48), 162 (25), 121 (44), 120 (47), 92 (12).

Бруто формула једињења: $\text{C}_{17}\text{H}_{14}\text{N}_2\text{O}_5$ (M_w 326,30); Израчунато %: C, 62,57; H, 4,32; N, 8,59; Нађено %: C, 62,67; H, 3,97; N, 8,61; Т.т. 222-223 °C; Принос 74 %.

4-Хидрокси-3-(1-(3-нитрофениламино)етил)-2H-хромен-2-он (66c)

IR (KBr); ν_{max} (cm^{-1}): 3431, 3181, 3069, 2970, 2931, 1671, 1615, 1601, 1569, 1524, 1499, 1357.

^1H NMR (200 MHz, CDCl_3); δ (ppm), J (Hz): 1,35 (d, 3H, $\text{C}_{1'}$ - CH_3 , $J_{2',1'}=6,67$ Hz), 3,75 (q, 1H, $\text{C}_{2'}$ -CH, $J_{1',2'}=6,67$ Hz), 3,91 (шири синглет, 1H, NH), 7,16 (dd, 1H, 6''-H, $J_{6'',5''}=8$ Hz, $J_{6'',4''}=1,1$ Hz), 7,27 (m, 1H, 7-H), 7,44 (m, 1H, 5''-H), 7,5 (m, 1H, 6-H), 7,49 (s, 1H, 2''-H), 7,61 (dd, 1H, 4''-H, $J_{4'',5''}=8,45$ Hz, $J_{4'',6''}=1,1$ Hz), 7,65 (dd, 1H, 8-H, $J_{8,7}=8,3$ Hz,

$J_{8,6}=1,1$ Hz), 7,86 (dd, 1H, 5-H, $J_{5,6}=7,8$ Hz, $J_{5,7}=1,7$ Hz), 17,07 (широк синглет, 1H, 4-OH, брза измена са D_2O).

^{13}C NMR (50 MHz, $CDCl_3$); δ (ppm): 19,8 ($C_{2'}$), 44,9 ($C_{1'}$), 91,5 (C_3), 108,4 ($C_{2''}$), 113,3 ($C_{4''}$), 117,3 (C_8), 117,6 (C_{10}), 118,3 ($C_{6''}$), 123,4 (C_5), 124,3 (C_6), 130,1 ($C_{5''}$), 131,5 (C_7), 146,7 ($C_{3''}$), 148,7 ($C_{1''}$), 152,5 (C_9), 161,1 (C_2), 163,4 (C_4).

MS: m/z (%)=326 (M^+ , 1), 325 (11), 311 (9), 307 (19), 204 (100), 189 (38), 162 (41), 121 (34), 120 (49), 92 (15).

Бруто формула једињења: $C_{17}H_{14}N_2O_5$ (Mw 326,30); Израчунато %: C, 62,57; H, 4,32; N, 8,59; Нађено %: C, 62,62; H, 3,99; N, 8,60; Т.т. 215-217 °C; Принос 76 %.

3-(1-(Бензиламино)етил)-4-хидрокси-2H-хромен-2-он (67c)

IR (KBr); ν_{max} (cm^{-1}): 3445, 3190, 3069, 2978, 2966, 1679, 1664, 1621, 1603, 1567, 1496.

1H NMR (200 MHz, $CDCl_3$); δ (ppm), J (Hz): 1,29 (d, 3H, $C_{1'}$ -CH₃, $J_{2',1'}=6,7$ Hz), 3,45 (q, 1H, $C_{2'}$ -CH, $J_{1',2'}=6,7$ Hz), 3,67-3,81 (ABq, 2H, N-CH₂-фенил, J=12 Hz), 3,96 (шири синглет, 1H, NH), 7,22 (m, 2H, 3'',5''-H), 7,24 (m, 1H, 4''-H), 7,26 (dd, 2H, 2'',6''-H, $J_{2'',3''}$, $6'',5''=7,75$ Hz, J=1,12 Hz), 7,28 (m, 1H, 7-H), 7,53 (m, 1H, 6-H), 7,64 (dd, 1H, 8-H, $J_{8,7}=8,3$ Hz, $J_{8,6}=1,1$ Hz), 7,85 (dd, 1H, 5-H, $J_{5,6}=7,8$ Hz, $J_{5,7}=1,7$ Hz), 16,55 (широк синглет, 1H, 4-OH, брза измена са D_2O).

^{13}C NMR (50 MHz, $CDCl_3$); δ (ppm): 20,2 ($C_{2'}$), 42,4 ($C_{1'}$), 52,2 (C-N-CH₂), 91,8 (C_3), 117,3 (C_{10}), 117,5 (C_8), 123,8 (C_5), 124,2 (C_6), 126,6 ($C_{4''}$), 128,1 ($C_{2''}$, $C_{6''}$), 128,4 ($C_{3''}$, $C_{5''}$), 131,4 (C_7), 140,1 ($C_{1''}$), 152,5 (C_9), 161,6 (C_2), 163,7 (C_4).

MS: m/z (%)=295 (M^+ , 16), 294 (8), 280 (22), 256 (7), 204 (100), 190 (76), 175 (67), 162 (11), 147 (26), 121 (90), 120 (75), 92 (29).

Бруто формула једињења: $C_{18}H_{17}NO_3$ (Mw 295,33); Израчунато %: C, 73,20; H, 5,80; N, 4,74; Нађено %: C, 73,21; H, 5,76; N, 4,73; Т.т. 171-173 °C; Принос 91 %.

5-(1-(4-Хидрокси-2-оксо-2H-хромен-3-ил)етиламино)пентанска киселина (68c)

IR (KBr); ν_{max} (cm^{-1}): 3611-2590, 3433, 3189, 3067, 2993, 2987, 2974, 1710, 1672, 1615, 1600, 1497.

1H NMR (200 MHz, $CDCl_3$); δ (ppm), J (Hz): 1,25 (d, 3H, $C_{1'}$ -CH₃, $J_{2',1'}=6,65$ Hz), 1,82 (m, 4H, 2'',3''-H), 2,46 (t, 2H, 4''-H, $J_{4'',3''}=7,08$ Hz), 3,44 (q, 1H, $C_{2'}$ -CH, $J_{1',2'}=6,65$ Hz), 3,60 (t, 2H, 1''-H, $J_{1'',2''}=7,05$ Hz), 4,02 (шири синглет, 1H, NH), 7,27 (m, 1H, 7-H), 7,54

(m, 1H, 6-H), 7,56 (dd, 1H, 5-H, $J_{5,6}=7,8$ Hz, $J_{5,7}=1,7$ Hz), 7,64 (dd, 1H, 8-H, $J_{8,7}=8,3$ Hz, $J_{8,6}=1,1$ Hz), 11,8 (широк синглет, 1H, OH из COOH), 17,19 (широк синглет, 1H, 4-OH, брза измена са D₂O).

¹³C NMR (50 MHz, CDCl₃); δ (ppm): 20,1 (C_{2'}), 21,9 (C_{3''}), 29,9 (C_{2''}), 34,7 (C_{4''}), 42,3 (C_{1'}), 54,5 (C_{1''}), 91,8 (C₃), 117,1 (C₈), 117,4 (C₁₀), 124,0 (C₆), 123,8 (C₅), 131,4 (C₇), 152,3 (C₉), 161,4 (C₂), 163,9 (C₄), 178,1 (C_{5''}).

MS: m/z (%)=303 (M⁺).

Бруто формула једињења: C₁₆H₁₇NO₅ (Mw 305,33); Израчунато %: C, 62,94; H, 6,27; N, 4,59; Нађено %: C, 63,01; H, 6,26; N, 4,61; Т.т. 231-233 °C; Принос 68 %.

Инструментација:

Тачке топљења су урађене на инструменту Kofler-hot stage.

Елементарна анализа је урађена на инструменту Carlo Erba 1106.

Инфрацрвени (IR) спектри су снимљени на инструментима Perkin-Elmer Grating спектроскопима, модели 137 и 337.

¹H NMR (200 MHz) и ¹³C NMR (50 MHz) спектри су снимљени на Varian Gemini 200 спектроскопу уз коришћење растварача DMSO-*d*₆ и CDCl₃.

Гасно хроматографска/масено спектрометријска анализа (GC/MS) је урађена на Agilent 6890N/5975B гасном хроматографу/масеном спектрометру.

2.3. Поступци за одређивање антиоксидативне активности

2.3.1. Одређивање укупног антиоксидативног капацитета фосфомолибденском методом ⁶⁷

Потребна опрема:

Вага тачности 0,0001 g

Нормални суд од 50 mL

Нормални судови од 25 mL

Пипете градуисане на 1 mL

Микропипета са полистиренским наставцма

Епрувете запремине 10 mL

Метални сталци за епрувете

Термометар

UV/VIS спектрофотометар подешен на 695 nm

Сет полистиренских кивета оптичке дужине 1 cm

Штоперица

Полазни раствори аскорбинске киселине и тестираних имино и аминокиселинских деривата 4-хидроксикумарина (*61b-68b*, *61c-68c*) концентрације 500 $\mu\text{g/mL}$ се припремају растварањем 25 mg супстрата у 50 mL етанола.

У пет епрувета се одмерава по 1 mL етанола, а потом у прву епрувету дода 1 mL полазног раствора тестираног супстрата, односно аскорбинске киселине, претходно наведене концентрације. Потом се употребом пипете узима 1 mL раствора из прве епрувете и преноси у другу. Надаље, сукцесивним разблаживањем до последње епрувете, односно двоструким разблаживањем се добија серија раствора тестираних једињења, односно аскорбинске киселине, концентрација 250, 125, 62,5, 31,25 и 15,63 $\mu\text{g/mL}$.

Раствори тестираних кумаринских деривата (100 μL), односно аскорбинске киселине, различитих концентрација, одмере се у епрувете, и комбинују са 1 mL раствора реагенса који садржи 0,6 M сумпорну киселину, 28 mM натријум фосфата и 4 mM амонијум молибдата. Потом се раствори инкубирају на температури од 95 °C у

току 90 минута. Исти поступак је коришћен за бланко раствор, који уместо 100 μL раствора тестираног једињења садржи 100 μL етанола. По извршеној инкубацији и хлађењу раствора, се мери апсорбанца на 695 nm.

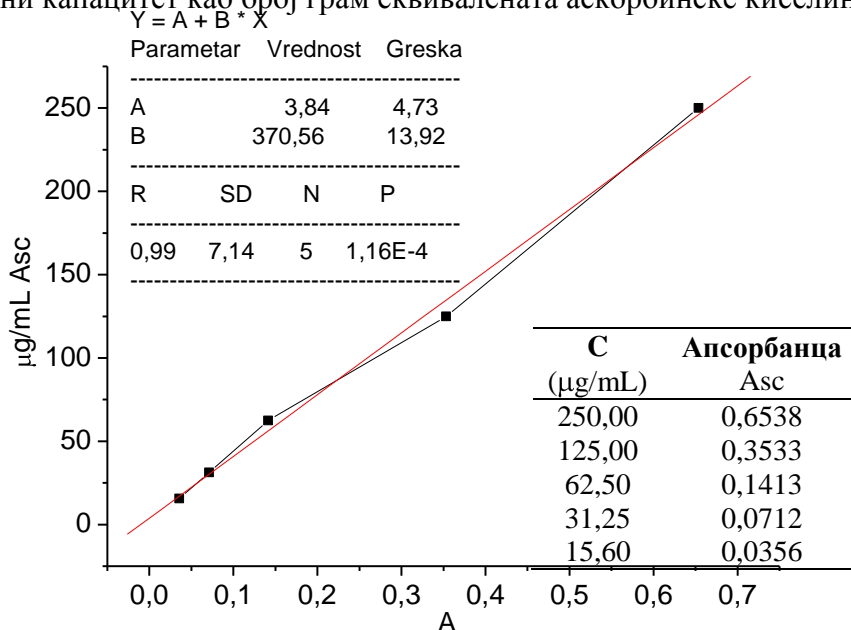
Резултати укупног антиоксидативног капацитета се изражавају као број еквивалената аскорбинске киселине.

Користећи статистички софтвер OriginPro 6.1 графички је представљена функционална зависност концентрације аскорбинске киселине у односу на апсорбанцу инкубираних раствора. Применом линеарне регресионе анализе дата је једначина која дефинише праву функционалне зависности концентрације аскорбинске киселине у односу на апсорбанцу инкубираних раствора.

$$Y_i = A + BX_i$$

Y -концентрација раствора аскорбинске киселине; A - тачка пресека праве на Y оси; B - нагиб праве; X -апсорбанце инкубираних раствора аскорбинске киселине

Уносом измерених вредности апсорбанци инкубираних раствора тестираних супстрата у једначину линеарне регресионе анализе, израчунава се укупни антиоксидантни капацитет као број грам еквивалената аскорбинске киселине.



Слика 42. Графички приказ функционалне зависности различитих концентрација раствора аскорбинске киселине у односу на апсорбанце раствора са параметрима једначине линеарне регресионе анализе

Табела 5. Апсорбанце раствора имино и аминоксидних деривата 4-хидроксикумарина

C (µg/mL)	Апсорбанца							
	61b	62b	63b	64b	65b	66b	67b	68b
250	0,0221	0,0212	0,0215	0,0212	0,0236	0,0229	0,0223	0,0225
125	0,0129	0,0146	0,0152	0,0149	0,0135	0,0134	0,0144	0,0145
62,5	0,0039	0,0062	0,0058	0,0036	0,0025	0,0023	0,0056	0,0064
31,25	-0,0018	-0,0019	-0,0011	-0,0025	-0,0018	-0,0016	0,0007	-0,0003
15,6	-0,0042	-0,0025	-0,0045	-0,0052	-0,0031	-0,0057	-0,0051	-0,0019
C (µg/mL)	61c	62c	63c	64c	65c	66c	67c	68c
	250	0,1124	0,1164	0,1167	0,1179	0,1369	0,1135	0,1223
125	0,0444	0,0521	0,046	0,0453	0,0632	0,0551	0,0532	0,0404
62,5	0,0111	0,0241	0,0197	0,0114	0,0216	0,0201	0,0209	0,0192
31,25	0,0011	0,0025	0,0019	-0,0009	0,0102	0,0138	0,0038	0,0021
15,6	-0,0089	-0,0056	-0,0078	-0,0081	0,0022	0,0042	-0,0009	-0,0004

Из једначине:

$$Y_i = 3,84409 + 370,56208X_i$$

за X_i као вредности апсорбанци инкубираних раствора различитих концентрација имино и аминоксидних деривата 4-хидроксикумарина добијају се вредности Y_i као вредности грам еквивалената аскорбинске киселине.

Табела 6. Укупни антиоксидативни капацитет имино и аминоксидних деривата 4-хидроксикумарина

C (µg/mL)	Укупни антиоксидативни капацитет*							
	61b	62b	63b	64b	65b	66b	67b	68b
250	12,03	11,7	11,83	11,71	12,58	12,33	12,11	12,18
125	8,64	9,25	9,47	9,37	8,84	8,82	9,18	9,22
62,5	5,29	6,14	5,99	5,18	4,77	4,68	5,92	6,22
31,25	3,18	3,96	3,44	2,92	3,18	3,25	4,1	3,73
15,6	2,29	2,92	2,18	1,92	2,7	1,73	1,95	3,14
C (µg/mL)	61c	62c	63c	64c	65c	66c	67c	68c
	250	45,5	46,98	47,09	47,53	54,57	45,9	49,16
125	20,3	23,15	20,89	20,63	27,26	24,26	23,56	18,81
62,5	7,96	12,77	11,14	8,07	11,83	11,29	11,59	10,94
31,25	4,25	4,77	4,55	3,51	7,63	8,96	5,25	4,62

* вредности су изражене као грам еквиваленти аскорбинске киселине-µg/mL аскорбинске киселине

2.3.2. Одређивање антиоксидативне активности DPPH методом

Поступак којим је извршено испитивање могућности хватања стабилног DPPH радикала је модификована метода Такао-а, Watanabe-а, Yagi-а и Sakata ⁶⁸.

Потребна опрема:

Вага тачности 0,0001 g

Нормални суд од 100 mL

Нормални суд од 50 mL

Нормални судови од 25 mL

Пипете градуисане на 1 mL

Епрувете запремине 10 mL

Метални сталци за епрувете

UV/VIS спектрофотометар подешен на 517 nm

Сет полистиренских кивета оптичке дужине 1 cm

Штопераца

Полазни раствори имино и аминоксидних деривата 4-хидроксикумарина (*61b-68b*, *61c-68c*), односно стандардних једињења бутил хидроксил толуена и аскорбинске киселине, концентрације 500 µg/mL се припремају растварањем 25 mg супстрата у 50 mL метанола.

Пре извођења експеримента (користи се свеж раствор) припреми се раствор 1,1-дифенил-2-пикрил-хидразида (DPPH) концентрације 80 µg/mL, растварањем 8 mg реагенса у 100 mL метанола. Потом се нормални суд обложи са алуминијумском фолијом и остави у фрижидер до тренутка коришћења раствора.

У десет епрувета се одмерава по 2 mL метанола, а потом у прву епрувету дода 2 mL полазног раствора тестираног супстрата, односно стандардног једињења претходно наведене концентрације. Потом се употребом пипете узима 2 mL раствора из прве епрувете и преноси у другу. Надаље, сукцесивним разблаживањем до последње епрувете, односно двоструким разблаживањем се добија серија раствора тестираних, односно стандардних једињења концентрација 250, 125, 62,5, 31,25, 15,63, 7,8, 3,9, 1,95, 0,98 и 0,49 µg/mL.

Затим, у сваки од разблажених раствора запремина 2 mL додати по 2 mL раствора DPPH, и након 30 минута и 60 минута мерити умањење апсорбанце на таласној дужини од 517 nm у односу на бланко растварач метанол.

Вредности апсорбанци серије раствора тестираних супстрата и стандардних једињења након 30 минута и 60 минута унети табеларно у Microsoft Office Excel 2007 програм, и помоћу њега а на основу доње формулације израчунати проценат хватања DPPH радикала након 30 минута и 60 минута.

$$\% = (A_{\text{контрола}} - A_{\text{узорак}}) / A_{\text{контрола}} \times 100$$

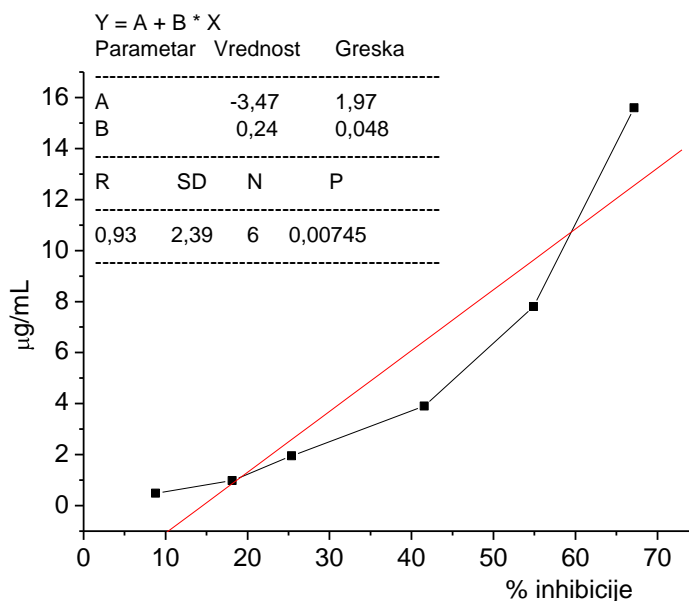
Вредности IC₅₀ у µg/mL, односно µmol/mL се израчунавају применом линеарне регресионе анализе уз коришћење статистичког софтвера OriginPro 6.1. Као независна варијабла се узимају вредности процената хватања стабилног DPPH радикала (X_i вредности), а као зависна варијабла су концентрације супстрата за дати проценат инхибиције (Y_i вредности). Из једначине:

$$Y_i = A + BX_i$$

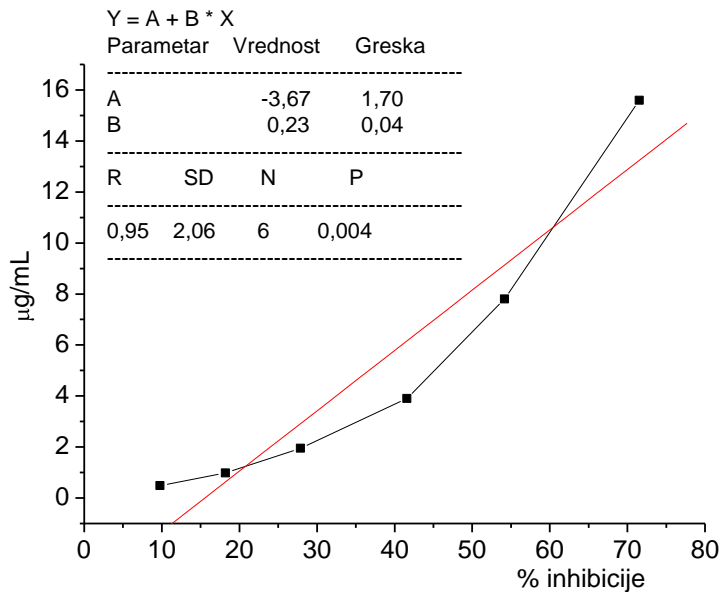
а на основу статистички израчунатих вредности A (тачка пресека праве на Y оси) и B (нагиб праве) за проценат инхибиције од 50 % (вредност X) се израчунавају вредности IC₅₀ (вредност Y ; као концентрације које условљавају умањење инхибиције за 50 %). Да би линеарна регресиона анализа дала што прецизније резултате вредност R као корелациони коефицијент линеарне регресије треба да буде већа, односно приближнија вредности 1, и у том смислу тачке које значајно одступају од праве треба елиминисати.

Због репродуктивности резултата експеримент се изводи три пута, а добијене вредности представљају средњу вредност три мерења.

Због могуће реакције примеса из метанола са DPPH радикалом неопходно је користити свеже предестиловани метанол, а метанолски раствор DPPH одмах након спремања треба употребити за експеримент.



Слика 43. Графичка зависност % инхибиције DPPH радикала након 30 минута у односу на концентрацију супстрата *65c* са параметрима линеарне регресионе анализе (прве четири тачке су изузете)



Слика 44. Графичка зависност % инхибиције DPPH радикала након 60 минута у односу на концентрацију супстрата *65c* са параметрима линеарне регресионе анализе (прве четири тачке су изузете)

Табела 7. Апсорбанце и проценат инхибиције DPPH радикала серије разблажења имино и аминоксидних деривата 4-хидроксикумарина по истеку 30 минута

C ($\mu\text{g/mL}$)	Метанол	61b		62b		63b		64b		65b		66b		67b		68b	
	$A_{\text{контрола}}$	$A_{\text{узорак}}$	% ИНХБ	$A_{\text{узорак}}$	% ИНХБ	$A_{\text{узорак}}$	% ИНХБ	$A_{\text{узорак}}$	% ИНХБ	$A_{\text{узорак}}$	% ИНХБ	$A_{\text{узорак}}$	% ИНХБ	$A_{\text{узорак}}$	% ИНХБ	$A_{\text{узорак}}$	% ИНХБ
250	1,615	0,5941	63,21	0,61	62,23	0,5553	65,62	0,603	62,66	0,6889	57,34	0,6764	58,12	0,6112	62,15	0,5869	63,66
125	1,615	0,7314	54,71	0,8216	49,13	0,8326	48,45	0,7111	55,97	0,7566	53,15	0,845	47,68	0,7287	54,88	0,7216	55,32
62,5	1,615	0,9351	42,1	1,107	31,46	1,068	33,87	0,887	45,08	0,836	48,24	1,058	34,49	0,831	48,54	0,899	44,33
31,25	1,615	1,044	35,36	1,305	19,2	1,227	24,02	1,024	36,59	1,003	37,89	1,189	26,38	1,1157	30,92	1,009	37,52
15,6	1,615	1,145	29,1	1,375	14,86	1,26	21,98	1,121	30,59	1,13	30,03	1,26	21,98	1,212	24,95	1,117	30,84
7,8	1,615	1,201	25,63	1,401	13,25	1,29	20,12	1,215	24,77	1,227	24,02	1,363	15,6	1,283	20,56	1,2173	24,63
3,9	1,615	1,295	19,81	1,443	10,65	1,381	14,49	1,311	18,82	1,341	16,97	1,401	13,25	1,331	17,59	1,311	18,82
1,95	1,615	1,327	17,83	1,45	10,22	1,401	13,25	1,398	13,44	1,375	14,86	1,421	12,01	1,375	14,86	1,363	15,6
0,98	1,615	1,357	15,98	1,464	9,35	1,445	10,53	1,411	12,63	1,47	8,98	1,435	11,15	1,488	7,86	1,401	13,25
0,49	1,615	1,551	3,96	1,465	9,29	1,463	9,41	1,515	6,19	1,56	3,41	1,5112	6,43	1,556	3,65	1,562	3,28
C ($\mu\text{g/mL}$)	Метанол	61c		62c		63c		64c		65c		66c		67c		68c	
	$A_{\text{контрола}}$	$A_{\text{узорак}}$	% ИНХБ	$A_{\text{узорак}}$	% ИНХБ	$A_{\text{узорак}}$	% ИНХБ	$A_{\text{узорак}}$	% ИНХБ	$A_{\text{узорак}}$	% ИНХБ	$A_{\text{узорак}}$	% ИНХБ	$A_{\text{узорак}}$	% ИНХБ	$A_{\text{узорак}}$	% ИНХБ
250		0,2044	87,34	0,1077	93,33	0,2143	86,73	0,178	88,98	0,1276	92,1	0,1308	91,9	0,2393	85,18	0,2112	86,92
125	1,615	0,2293	85,8	0,2191	86,43	0,3095	80,84	0,2828	82,49	0,1931	88,04	0,1424	91,18	0,2571	84,08	0,2225	86,22
62,5	1,615	0,3312	79,49	0,3884	75,95	0,3895	75,88	0,2957	81,69	0,2428	84,97	0,1623	89,95	0,3415	78,85	0,3642	77,45
31,25	1,615	0,4576	71,67	0,6359	60,63	0,5322	67,05	0,4014	75,15	0,3462	78,56	0,3329	79,39	0,4925	69,5	0,51	68,42
15,6	1,615	0,6429	60,19	0,8321	48,48	0,8899	44,9	0,6484	59,85	0,5304	67,16	0,5972	63,02	0,8077	49,99	0,8321	48,48
7,8	1,615	0,841	47,93	0,9942	38,44	1,107	31,46	0,8679	46,26	0,7287	54,88	0,8679	46,26	1,131	29,97	1,121	30,59
3,9	1,615	1,021	36,78	1,333	17,46	1,197	25,88	1,2145	24,8	0,9437	41,57	1,149	28,85	1,236	23,47	1,32	18,27
1,95	1,615	1,135	29,72	1,359	15,85	1,223	24,27	1,3139	18,64	1,205	25,39	1,159	28,24	1,301	19,44	1,35	16,41
0,98	1,615	1,466	9,23	1,47	8,98	1,354	16,16	1,341	16,97	1,322	18,14	1,264	21,73	1,411	12,63	1,451	10,15
0,49	1,615	1,515	6,19	1,512	6,38	1,515	6,19	1,523	5,7	1,473	8,79	1,473	8,79	1,55	4,02	1,503	6,93

Табела 8. Апсорбанце и проценат инхибиције DPPH радикала серије разблажења имино и аминоксидних деривата 4-хидроксикумарина по истеку 60 минута

C ($\mu\text{g/mL}$)	61b		62b		63b		64b		65b		66b		67b		68b	
	$A_{\text{узорак}}$	% инхб	$A_{\text{узорак}}$	% инхб	$A_{\text{узорак}}$	% инхб	$A_{\text{узорак}}$	% инхб	$A_{\text{узорак}}$	% инхб	$A_{\text{узорак}}$	% инхб	$A_{\text{узорак}}$	% инхб	$A_{\text{узорак}}$	% инхб
250	0,49	69,66	0,5385	66,66	0,4958	69,3	0,6564	59,36	0,6072	62,4	0,6079	62,36	0,4546	71,85	0,4853	69,95
125	0,6323	60,85	0,731	54,74	0,63	60,99	0,6979	56,79	0,7419	54,06	0,815	49,54	0,7159	55,67	0,7144	55,76
62,5	0,9501	41,17	0,845	47,68	0,794	50,84	0,847	47,55	0,7754	51,99	1,001	38,02	0,8291	48,66	0,891	44,83
31,25	1,018	36,97	1,0113	37,38	0,9891	38,76	0,957	40,74	0,956	40,8	1,11	31,27	1,1124	31,12	0,987	38,89
15,6	1,113	31,08	1,1397	29,43	1,1236	30,43	1,0192	36,89	1,1281	30,15	1,15	28,79	1,176	27,18	1,1141	31,02
7,8	1,205	25,39	1,249	22,66	1,255	22,29	1,114	31,02	1,223	24,27	1,325	17,96	1,275	21,05	1,198	25,82
3,9	1,269	21,42	1,325	17,96	1,343	16,84	1,232	23,72	1,289	20,19	1,394	13,68	1,325	17,96	1,2813	20,66
1,95	1,305	19,2	1,387	14,12	1,395	13,62	1,325	17,96	1,36	15,79	1,398	13,44	1,3651	15,47	1,301	19,44
0,98	1,416	12,32	1,45	10,22	1,455	9,91	1,405	13	1,4045	13,03	1,423	11,89	1,389	13,99	1,35	16,41
0,49	1,5023	6,98	1,557	3,59	1,551	3,96	1,491	7,68	1,4879	7,87	1,47	8,98	1,451	10,15	1,49	7,74

C ($\mu\text{g/mL}$)	61c		62c		63c		64c		65c		66c		67c		68c	
	$A_{\text{узорак}}$	% инхб	$A_{\text{узорак}}$	% инхб	$A_{\text{узорак}}$	% инхб	$A_{\text{узорак}}$	% инхб	$A_{\text{узорак}}$	% инхб	$A_{\text{узорак}}$	% инхб	$A_{\text{узорак}}$	% инхб	$A_{\text{узорак}}$	% инхб
250	0,1435	91,11	0,0862	94,66	0,1472	90,89	0,1398	91,34	0,1251	92,25	0,1233	92,37	0,2082	87,11	0,1423	91,19
125	0,1457	90,98	0,1662	89,71	0,2293	85,8	0,213	86,81	0,1439	91,09	0,1344	91,68	0,2091	87,05	0,21	87
62,5	0,2591	83,96	0,3854	76,14	0,3015	81,33	0,2147	86,71	0,1997	87,63	0,14	91,33	0,2698	83,29	0,3254	79,85
31,25	0,3594	77,75	0,5765	64,3	0,4128	74,44	0,3211	80,12	0,3026	81,26	0,2803	82,64	0,4177	74,14	0,45	72,14
15,6	0,6196	61,63	0,698	56,78	0,806	50,09	0,5716	64,61	0,4599	71,52	0,5179	67,93	0,7187	55,5	0,7847	51,41
7,8	0,8224	49,08	0,945	41,49	1,062	34,24	0,8469	47,56	0,7401	54,17	0,7927	50,92	1,1	31,89	1,11	31,27
3,9	0,9942	38,44	1,316	18,51	1,146	29,04	1,117	30,84	0,9431	41,6	1,131	29,97	1,232	23,72	1,24	23,22
1,95	1,127	30,22	1,34	17,03	1,189	26,38	1,229	23,9	1,165	27,86	1,143	29,23	1,279	20,8	1,29	20,12
0,98	1,455	9,91	1,453	10,03	1,267	21,55	1,345	16,72	1,321	18,2	1,263	21,8	1,373	14,98	1,385	14,24
0,49	1,49	7,74	1,468	9,1	1,438	10,96	1,457	9,78	1,457	9,78	1,466	9,23	1,446	10,46	1,443	10,65

Табела 9. DPPH антирадикалска активност имино и аминоксидних деривата
4-хидроксикумарина

Време мерања	DPPH антирадикалска активност IC ₅₀ (µg/mL)									
	Имино деривати									Стандарди
	61b	62b	63b	64b	65b	66b	67b	68b	ВНТ	Asc
30 мин	124,81	138,08	152,04	120,67	120,49	161,72	124,64	119,48	5,60	7,48
60 мин	78,61	78,19	49,89	69,74	49,34	143,17	118,16	114,40	2,82	4,79
	Амино деривати									
	61c	62c	63c	64c	65c	66c	67c	68c		
30 мин	9,61	27,73	38,93	21,35	8,46	13,34	18,49	19,34		
60 мин	9,31	17,36	16,54	13,28	8,15	12,14	16,81	17,83		

2.3.3. Одређивање редуктивне способности

Редуктивна способност структурно модификованих супстрата 4-хидроксикумарина се одређује по методи Оуаизу-а⁶⁹.

Потребна опрема:

Вага тачности 0,0001 g

Нормални суд од 100 mL

Нормални суд од 50 mL

Нормални судови од 25 mL

Пипете градуисане на 1 mL

Микропипета са полистиренским наставцима

Епрувете запремине 10 mL

Метални сталци за епрувете

Термометар

UV/VIS спектрофотометар подешен на 700 nm

Сет полистиренских кивета оптичке дужине 1 cm

Штоперица

Полазни раствори имино и аминоксидних деривата 4-хидроксикумарина (*61b-68b*, *61c-68c*), односно стандардних једињења бутил хидроксил толуена и аскорбинске киселине, концентрације 500 µg/mL се припремају растварањем 25 mg супстрата у 50 mL метанола.

У десет епрувета се одмерава по 1 mL метанола, а потом се у прву епрувету дода 1 mL полазног раствора тестираног супстрата, односно стандардног једињења, претходно наведене концентрације. Пипетом се узима 1 mL раствора из прве епрувете и преноси у другу. Надаље, сукцесивним разблаживањем до последње епрувете, односно двоструким разблаживањем, добија се серија раствора тестираних, односно стандардних једињења концентрација 250, 125, 62,5, 31,25, 15,63, 7,8, 3,9, 1,95, 0,98 и 0,49 µg/mL.

У епруветама запремине 10 mL помешати 300 µL сваког од раствора испитиваних супстрата са 300 µL фосфатног пуфера концентрације 0,2 M и pH=6,6 и

300 μL 1 % раствора калијум ферицијанида. Потом се меша инкубира у току 20 минута, на температури од 50 $^{\circ}\text{C}$. По хлађењу, у сваку епрувету додати по 300 μL 10 % раствора трихлорсирћетне киселине и затим извршити центрифугирање на 3000 rpm , у току 10 минута. Потом се из сваке епрувете узима 0,6 mL горњег слоја раствора и меша са 0,6 mL дестиловане воде и 120 mL 0,1 % раствора фери хлорида и мери апсорбанца раствора на 700 nm .

Бланко узорак се припрема тако што се помеша 300 μL дестиловане воде, 300 μL фосфатног пуфера, 300 μL 1 % раствора калијум ферицијанида и 300 μL 10 % трихлорсирћетне киселине.

Редуктивна способност се израчунава по формули:

$$RP = A_{\text{бланко}} - A_{\text{узорак}}$$

Редуктивна способност изражена у % се рачуна по следећој формули:

$$RP \% = (A_{\text{бланко}} - A_{\text{узорак}}) \times 100$$

Вредности RP_{50} у $\mu\text{g/mL}$, односно $\mu\text{mol/mL}$ се израчунавају применом линеарне регресионе анализе уз коришћење статистичког софтвера OriginPro 6.1. Као независна варијабла се узимају вредности редуктивне способности (X_i вредности), а као зависна варијабла су концентрације супстрата за дату вредност RP (Y_i вредности).

Из једначине:

$$Y_i = A + BX_i$$

а на основу статистички израчунатих вредности A (тачка пресека праве на Y оси) и B (нагиб праве) за проценат редуктивне активности од 50 % (вредност X) се израчунавају вредности RP_{50} (вредност Y ; као концентрације које условљавају умањење редуктивне способности за 50 %). Да би линеарна регресиона анализа дала што прецизније резултате вредност R као корелациони коефицијент линеарне регресије треба да буде што је могуће већа, односно приближнија вредности 1, и у том смислу тачке које значајно одступају од праве, треба елиминисати.

Да би добијени резултати били репродуктивни експеримент се изводи три пута, а резултати се представљају као средња вредност три мерења.

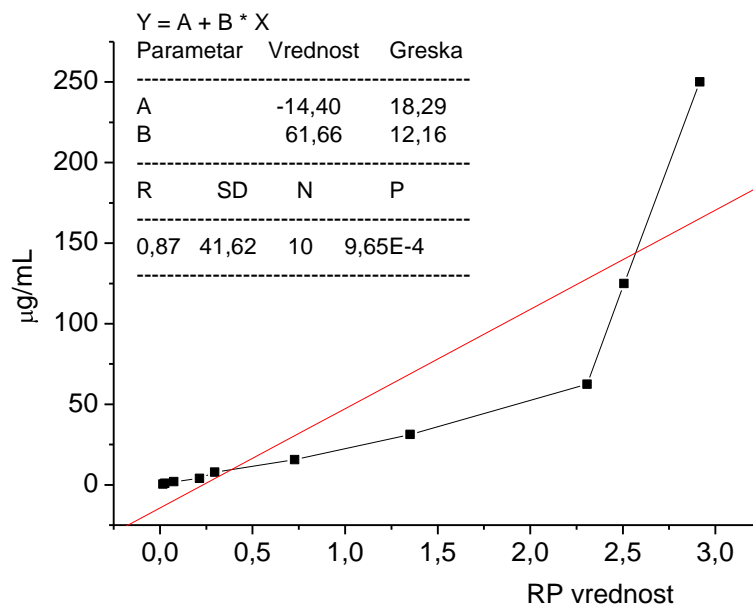
Табела 10. Редуктивна способност RP серије разблажења имино и аминоксидеривата 4-хидроксикумарина

C ($\mu\text{g/mL}$)	Редуктивна способност RP									
	61b	62b	63b	64b	65b	66b	67b	68b	BHT	Asc
	$A_{\text{бланко}} - A_{\text{узорак}}$									
250	0,713	0,7643	1,143	0,7225	0,711	0,7999	1,15	1,014	3,22	3,22
125	0,6907	0,5623	1,107	0,4419	0,5523	0,7011	1,012	0,9989	3,22	3,22
62,5	0,2958	0,2816	0,8437	0,2777	0,2771	0,2871	0,4732	0,5641	2,618	3,22
31,25	0,2806	0,2089	0,3067	0,0957	0,1999	0,207	0,2274	0,2374	1,203	3,22
15,6	0,1532	0,1026	0,0739	0,0986	0,1011	0,1231	0,1154	0,1264	0,8155	2,375
7,8	0,052	0,0801	0,0324	0,0932	0,074	0,043	0,0896	0,0901	0,4524	1,414
3,9	0,0346	0,0229	0,0249	0,0892	0,021	0,031	0,0794	0,0786	0,2734	0,7193
1,95	0,0336	0,0213	0,0235	0,0605	0,019	0,024	0,0548	0,0603	0,1536	0,3764
0,98	0,0268	0,0124	0,006	0,0405	0,0104	0,0171	0,0458	0,0422	0,0779	0,2177
0,49	0,0222	0,0026	0,0051	0,0301	0,0031	0,0076	0,0429	0,0329	0,0391	0,1231

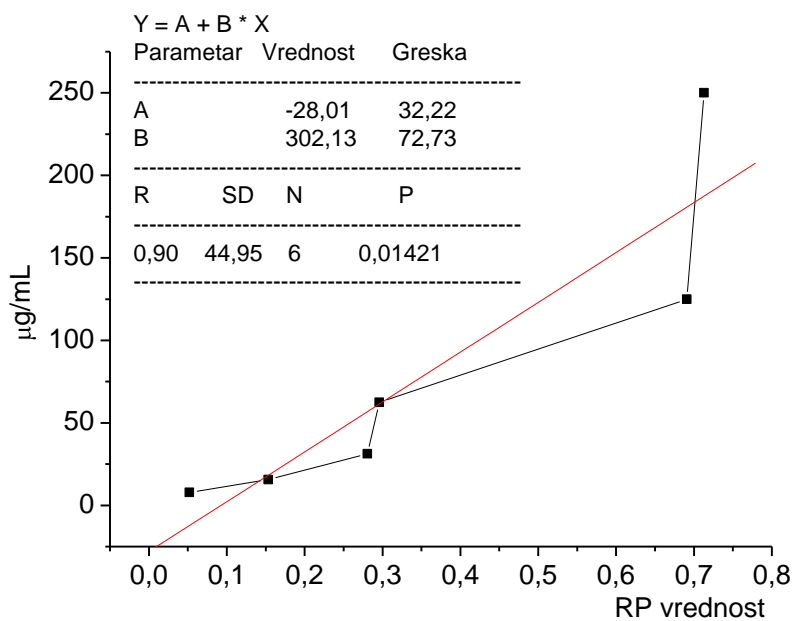
C ($\mu\text{g/mL}$)	Редуктивна способност RP									
	61c	62c	63c	64c	65c	66c	67c	68c		
	$A_{\text{бланко}} - A_{\text{узорак}}$									
250	0,713	0,7643	1,143	0,7225	0,711	0,7999	1,15	1,014		
125	0,6907	0,5623	1,107	0,4419	0,5523	0,7011	1,012	0,9989		
62,5	0,2958	0,2816	0,8437	0,2777	0,2771	0,2871	0,4732	0,5641		
31,25	0,2806	0,2089	0,3067	0,0957	0,1999	0,207	0,2274	0,2374		
15,6	0,1532	0,1026	0,0739	0,0986	0,1011	0,1231	0,1154	0,1264		
7,8	0,052	0,0801	0,0324	0,0932	0,074	0,043	0,0896	0,0901		
3,9	0,0346	0,0229	0,0249	0,0892	0,021	0,031	0,0794	0,0786		
1,95	0,0336	0,0213	0,0235	0,0605	0,019	0,024	0,0548	0,0603		
0,98	0,0268	0,0124	0,006	0,0405	0,0104	0,0171	0,0458	0,0422		
0,49	0,0222	0,0026	0,0051	0,0301	0,0031	0,0076	0,0429	0,0329		

Табела 11. Редуктивна активност имино и аминоксидеривата 4-хидроксикумарина представљена као RP_{50} вредност

Редуктивна способност RP_{50} ($\mu\text{g/mL}$)									
Имино деривати								Стандарди	
61b	62b	63b	64b	65b	66b	67b	68b	BHT	Asc
79,69	102,76	82,06	108,88	99,65	96,00	95,15	84,50	98,51	25,06
Амино деривати									
61c	62c	63c	64c	65c	66c	67c	68c		
122,56	107,84	126,44	86,64	110,34	101,30	75,50	85,33		



Слика 45. Графички приказ зависности редуктивне способности у односу на концентрацију супстрата *67c* са параметрима линеарне регресионе анализе



Слика 46. Графички приказ зависности редуктивне способности у односу на концентрацију супстрата *61b* са параметрима линеарне регресионе анализе (без задње четири тачке)

2.3.4. Одређивање инхибиције липидне пероксидације амонијум тиоцијанатном методом⁷⁰

Потребна опрема:

Вага тачности 0,0001 g

Нормални суд од 50 mL

Нормални судови од 25 mL

Пипете градуисане на 1 mL

Микропипета са полистиренским наставцима

Епрувете запремине 10 mL

Метални сталци за епрувете

Сушница адаптирана за инкубацију у мраку на температури од 37 °C

UV/VIS спектрофотометар подешен на 500 nm

Сет полистиренских кивета оптичке дужине 1 cm

Штопераца

Полазни раствори имино и аминокиселина деривата 4-хидрокси кумарина (*61b-68b*, *61c-68c*), односно стандардних једињења бутил хидроксил толуена, аскорбинске киселине и α -токоферола, концентрације 2000 μM се припремају растварањем одговарајуће масе супстрата у 25 mL етанола.

Емулзија линолеинске киселине се припрема мешањем 0,2804 g линолеинске киселине, 0,2804 g Tween 20 и 50 mL фосфатног пуфера концентрације 0,2 M и pH=7. Хомогенизација се изводи интензивним мућкањем смеше. Нормални суд са припремљеном емулзијом линолеинске киселине обложи се алуминијумском фолијом и до коришћења остави у фрижидеру на 4 °C.

У четири епрувете одмерава се по 1 mL етанола, а потом у прву епрувету дода 1 mL полазног раствора тестираног супстрата, односно стандардног једињења претходно наведене концентрације. Пипетом се узима 1 mL раствора из прве епрувете и преноси у другу. Надаље, сукцесивним разблаживањем до последње епрувете, односно двоструким разблаживањем, добија се серија раствора тестираних, односно стандардних једињења концентрација 1000, 500, 250 и 125 $\mu\text{g/mL}$.

Одмеравају запремине од 0,5 mL етанолског раствора различитих концентрација тестираних супстрата, односно аскорбинске киселине и α -токоферола као стандардних једињења, и мешају са емулзијом линолеинске киселине (2,5 mL, 0,02 M, pH=7) и фосфатним пуфером (2 mL, 0,2 M, pH=7), а затим врши инкубирање на температури од 37 °C у мраку да би се убрзао процес пероксидације.

Током процеса инкубације у различитим временским периодима (24, 48, 72 и 96 сати) се узимају аликвоти од 100 μ L и степен оксидације одређује додавањем 4,7 mL 75 % раствора етанола, 100 μ L 30 % раствора амонијум тиоцијаната и 100 μ L 0,02 M раствора фери хлорида у 3,5 % раствору хлороводоничне киселине. Након 3 минута, мерењем апсорбанце раствора на 500 nm одређује се степен инхибиције процеса пероксидације линолеинске киселине. Апсорбанца контролног узорка се одређује по истом поступку, осим што раствори не садрже тестирана једињења, односно стандардне супстанце.

По формули:

$$\% = (A_{\text{контрола}} - A_{\text{узорак}}) / A_{\text{контрола}} \times 100$$

се одређује проценат инхибиције липидне пероксидације и изражава у односу на стандардне супстанце, у функцији времена инкубирања.

Због репродуктивности, експеримент се понавља три пута, а резултати приказују као средња вредност три мерења.

Табела 12. Апсорбанце контролног узорка и серије разблажења имино и аминокиселинских деривата у функцији концентрације и времена

C (μ M)	A _{контрола}				A _{узорак}						
	61b	62b	63b	64b	65b	66b	67b	68b	BHT	Asc	
Време инкубирања 24 сата											
1000	1,709	0,7859	0,677	0,9361	1,035	1,01	1,12	0,9874	1,32	0,5878	1,3227
500	1,709	1,156	0,8374	1,04	1,187	1,12	1,24	1,29	1,56	0,6648	1,4047
250	1,709	1,55	1,171	1,45	1,54	1,36	1,37	1,35	1,65	0,6887	1,5108
125	1,709	1,7	1,347	1,65	1,56	1,45	1,64	1,701	1,702	0,7502	1,5842
Време инкубирања 48 сати											
1000	2,176	0,7009	0,5079	0,507	0,5376	0,4687	0,5562	0,8235	0,8562	0,3548	1,261
500	2,176	1,188	0,6348	0,6865	0,8149	0,6215	0,7451	1,114	1,2544	0,4246	1,425
250	2,176	1,786	1,075	1,447	1,649	1,074	1,3541	1,485	1,5014	0,4278	1,738
125	2,176	2,104	1,331	1,837	2,041	1,32	1,9854	1,712	2,065	0,4517	1,999
Време инкубирања 72 сата											
1000	2,626	0,79	0,3239	0,4722	0,6305	0,5121	0,6455	0,98	1,012	0,2474	1,846
500	2,626	1,389	0,6305	0,6789	0,9802	0,7213	0,7321	1,298	1,354	0,2586	1,999
250	2,626	1,684	1,131	1,48	1,8031	1,24	1,384	1,65	1,699	0,2649	2,022
125	2,626	1,736	1,255	1,912	2,012	1,54	2,012	1,864	2,298	0,2735	2,381
Време инкубирања 96 сати											
1000	2,735	1,337	0,4968	0,834	0,9897	0,7812	0,99	1,21	1,54	0,4349	2,0731
500	2,735	1,559	0,95	1,599	1,278	0,98	1,56	1,957	1,689	0,4513	2,1907
250	2,735	1,668	1,957	1,798	2,011	1,59	1,98	2,12	2,045	0,5142	2,2236
125	2,735	2,309	1,981	2,258	2,434	2,23	2,458	2,513	2,601	0,5470	2,4861
Време инкубирања 24 сата											
		61c	62c	63c	64c	65c	66c	67c	68c	α-Toc	
1000	1,709	1,35	1,31	1,25	1,03	1,12	1,16	1,11	1,34	1,0391	
500	1,709	1,48	1,39	1,27	1,21	1,21	1,35	1,25	1,39	1,116	
250	1,709	1,602	1,49	1,48	1,56	1,59	1,47	1,36	1,65	1,1416	
125	1,709	1,65	1,56	1,66	1,63	1,65	1,66	1,69	1,6642	1,2322	
Време инкубирања 48 сати											
1000	2,176	1,1625	1,1892	1,1951	1,172	0,9892	1,16	1,12	1,15	0,8442	
500	2,176	1,6541	1,875	1,9958	1,712	1,5625	1,64	1,32	1,41	0,9073	
250	2,176	1,8741	1,962	2,012	1,9561	1,7196	1,85	1,939	2,01	0,9879	
125	2,176	2,0951	2,1111	2,1561	2,157	2,13	2,14	2,168	2,1591	1,0205	
Време инкубирања 72 сата											
1000	2,626	1,254	1,312	1,21	1,213	0,9892	1,25	1,21	1,32	0,8088	
500	2,626	1,787	1,687	1,99	1,84	1,4561	1,87	1,41	1,59	0,8587	
250	2,626	1,98	1,875	2,12	1,99	1,89	1,96	1,99	2,11	0,9558	
125	2,626	2,21	2,121	2,25	2,32	2,2314	2,33	2,25	2,23	1,0451	
Време инкубирања 96 сати											
1000	2,735	1,49	1,598	1,56	1,56	1,34	1,56	1,49	1,98	1,1678	
500	2,735	2,011	1,989	2,21	2,12	1,89	2,21	1,98	2,012	1,2444	
250	2,735	2,32	2,12	2,45	2,45	2,32	2,356	2,34	2,36	1,3292	
125	2,735	2,689	2,465	2,64	2,67	2,59	2,67	2,59	2,59	1,3729	

Табела 13. Проценти инхибиције процеса липидне пероксидације у емулзионом систему линолеинске киселине раствора имино деривата 4-хидроксикумарина

C (μM)	$\% = (A_{\text{контрола}} - A_{\text{узорак}}) / A_{\text{контрола}} \times 100$										
	61b	62b	63b	64b	65b	66b	67b	68b	ВНТ	Asc	α -Тос
Време инкубирања 24 сата											
1000	54,0	60,4	45,2	39,4	40,9	34,5	42,2	22,8	65,6	22,6	39,2
500	32,4	51,0	39,2	30,5	34,5	27,4	24,5	8,7	61,1	17,8	34,7
250	9,3	31,5	15,2	9,9	20,4	19,8	21,0	3,5	59,7	11,6	33,2
125	0,5	21,2	3,5	8,7	15,2	4,0	0,5	0,4	56,1	7,3	27,9
Време инкубирања 48 сати											
1000	67,8	76,7	76,7	75,3	78,5	74,4	62,2	60,7	83,7	42,1	61,2
500	45,4	70,8	68,5	62,6	71,4	65,8	48,8	42,4	80,5	34,5	58,3
250	17,9	50,6	33,5	24,2	50,6	37,8	31,8	31,0	80,3	20,1	54,6
125	3,3	38,8	15,6	6,2	39,3	8,8	21,3	5,1	79,2	8,1	53,1
Време инкубирања 72 сата											
1000	74,5	94,4	88,6	78,5	81,3	76,4	63,2	62,6	90,6	29,7	69,2
500	50,5	77,4	75,4	66,5	73,4	72,8	52,9	51,8	90,2	23,9	67,3
250	38,5	60,4	46,2	35,9	55,8	49,2	39,3	39,0	89,9	23,0	63,6
125	36,6	53,9	29,9	25,4	43,6	31,8	30,8	15,8	89,6	9,3	60,2
Време инкубирања 96 сати											
1000	51,1	81,8	69,5	63,8	71,4	63,8	55,8	43,7	84,1	24,2	57,3
500	43,0	65,3	41,5	53,3	64,2	43,0	28,5	38,2	83,5	19,9	54,5
250	39,0	28,5	34,3	26,5	41,9	27,6	22,5	25,2	81,2	18,7	51,4
125	15,6	27,6	17,4	11,0	18,5	10,1	8,1	4,9	80,0	9,1	49,8

Табела 14. Проценти инхибиције процеса липидне пероксидације у емулзионом систему линолеинске киселине раствора аминокиселина деривата 4-хидроксикумарина

C (μM)	$\% = (A_{\text{контрола}} - A_{\text{узорак}}) / A_{\text{контрола}} \times 100$							
	61c	62c	63c	64c	65c	66c	67c	68c
Време инкубирања 24 сата								
1000	21,0	23,4	26,9	39,7	34,5	32,1	35,1	21,6
500	13,4	18,7	25,7	29,2	29,2	21,0	26,9	18,7
250	6,3	12,8	13,4	8,6	6,5	14,0	20,4	3,5
125	3,5	8,7	2,9	4,6	3,2	2,4	1,0	2,6
Време инкубирања 48 сати								
1000	46,6	45,4	45,1	46,1	54,5	46,7	48,5	47,2
500	24,0	13,8	8,3	21,3	28,2	24,6	39,3	35,2
250	13,9	9,8	7,5	10,1	21,0	15,0	10,9	7,6
125	3,7	3,0	0,9	0,9	2,1	1,7	0,4	0,8
Време инкубирања 72 сата								
1000	57,6	57,7	59,4	58,9	67,8	58,3	60,3	52,9
500	34,9	37,6	31,5	35,6	47,5	37,8	48,7	41,7
250	25,6	29,5	21,5	27,6	29,7	27,6	27,2	22,8
125	17,9	22,4	15,9	15,0	20,9	15,6	18,1	16,8
Време инкубирања 96 сати								
1000	45,5	41,6	43,0	43,0	51,0	43,0	45,5	27,6
500	26,5	27,3	19,2	22,5	30,9	19,2	27,6	26,4
250	15,2	22,5	10,4	10,4	15,2	13,9	14,4	13,7
125	1,7	9,9	3,5	2,4	5,3	2,4	5,3	5,3

2.3.5. Одређивање способности хватања хидроксил радикала

Потребна опрема:

Вага тачности 0,0001 g

Нормални суд од 100 mL

Нормални суд од 50 mL

Нормални судови од 10 mL

Пипете градуисане на 1 mL

Епрувете запремине 10 mL

Метални сталци за епрувете

Термометар

UV/VIS спектрофотометар подешен на 532 nm

Сет полистиренских кивета оптичке дужине 1 cm

Штоперица

По методи Halliwell-а, Gutteridge-а и Auroma-а је одређена способност кумаринских деривата као супстрата погодних за хватање хидроксил радикала насталих у Фентоновој реакцији ⁷¹.

Полазни раствори имино и аминоксидних деривата 4-хидроксикумарина (*61b-68b*, *61c-68c*), односно стандардних једињења бутил хидроксил толуена и аскорбинске киселине, концентрације 1000 µg/mL припремају се растварањем 50 mg супстрата у 50 mL метанола.

У осам епрувета се одмерава по 1 mL метанола, а потом у прву епрувету дода 1 mL полазног раствора тестираног супстрата, односно стандардног једињења претходно наведене концентрације. Пипетом се узима 1 mL раствора из прве епрувете и преноси у другу. Сукцесивним разблаживањем до последње епрувете, односно двоструким разблаживањем се добија серија раствора тестираних, односно стандардних једињења концентрација 500, 250, 125, 62,5, 31,25, 15,63, 7,8 и 3,9 µg/mL.

Реакција се изводи у 10 mM фосфатном пуферу при рН=7,4, 2,8 mM раствору дезоксирибозе, 2,8 mM водоник пероксиду, 12,5 M раствору фери хлорида, 100 mM раствору EDTA уз присуство тестираног једињења, односно стандардног једињења.

Реакција започиње додатком аскорбинске киселине до концентрације 200 mM. Потом се реакциона смеша инкубира у периоду од 60 минута на температури од 37 °C.

По хлађењу раствора додаје се 1 mL 1 % раствора тиобарбитурне киселине у 0,05 M натријум хидроксиду, а затим и 1 mL 2,8 % раствора трихлорсирћетне киселине. Затим се сви раствори у епруветама инкубирају у периоду од 20 минута на температури од 100 °C.

По хлађењу реакционих смеша, проценат деградације дезоксирибозе се одређује мерењем апсорбанце на 532 nm у односу на бланко раствор (садржи све претходно наведене компоненте осим тестираних једињења, односно стандардног једињења) по формули:

$$\% = (A_{\text{бланко}} - A_{\text{узорак}}) / A_{\text{бланко}} \times 100$$

а резултати се представљају и као IC₅₀ вредности, у односу на резултате активности стандардног једињења према хидроксил радикалима.

Вредности апсорбанци серије раствора тестираних супстрата и стандардних једињења након завршеног процеса инкубирања унети табеларно у Microsoft Office Excel 2007 програм, и помоћу њега, а према наведеној формули, израчунава се проценат деградације дезоксирибозе.

Вредности IC₅₀ у µg/mL, односно µmol/mL се израчунавају применом линеарне регресионе анализе уз коришћење статистичког софтвера OriginPro 6.1. Као независна варијабла се узимају вредности процената деградације дезоксирибозе (X_i вредности), а као зависна варијабла су концентрације супстрата за дати проценат инхибиције (Y_i вредности). Из једначине:

$$Y_i = A + BX_i$$

а на основу статистички израчунатих вредности A (тачка пресека праве на Y оси) и B (нагиб праве) за проценат инхибиције од 50 % (вредност X) се израчунавају вредности IC₅₀ (вредност Y; као концентрације које условљавају умањење инхибиције

за 50 %). Да би линеарна регресиона анализа дала што прецизније резултате вредност R као корелациони коефицијент линеарне регресије треба да буде већа, односно приближнија вредности 1, и у том смислу тачке које значајно одступају од праве треба елиминисати.

Због репродуктивности резултата експеримент се изводи три пута, а добијене вредности представљају средњу вредност три мерења.

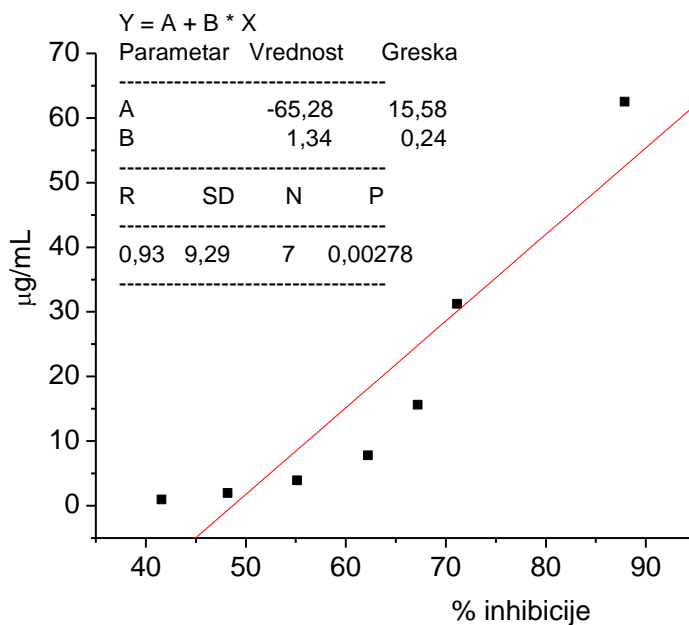
Табела 15. Проенти инхибиције хидроксил радикала насталих у Фентоновој реакцији у функцији концентрације имино и аминоксидеривата 4-хидроксикумарина

C ($\mu\text{g/mL}$)	% = $(A_{\text{бланко}} - A_{\text{узорок}}) / A_{\text{бланко}} \times 100$							
	61b	62b	63b	64b	65b	66b	67b	68b
62,5	80,23	84,23	81,25	83,21	85,12	84,11	79,11	79,56
31,25	66,36	67,59	67,23	67,11	68,23	67,89	65,55	64,56
15,6	62,44	63,98	63,55	63,87	62,55	63,02	62,11	63,11
7,8	58,91	59,11	59,01	59,03	58,87	58,98	58,29	56,23
3,9	54,88	55,06	54,98	54,99	55,64	55,01	54,48	54,01
1,95	47,87	47,98	47,95	47,91	47,86	47,99	47,12	47,02
0,98	39,47	39,44	39,65	39,33	39,45	39,58	39,46	39,21

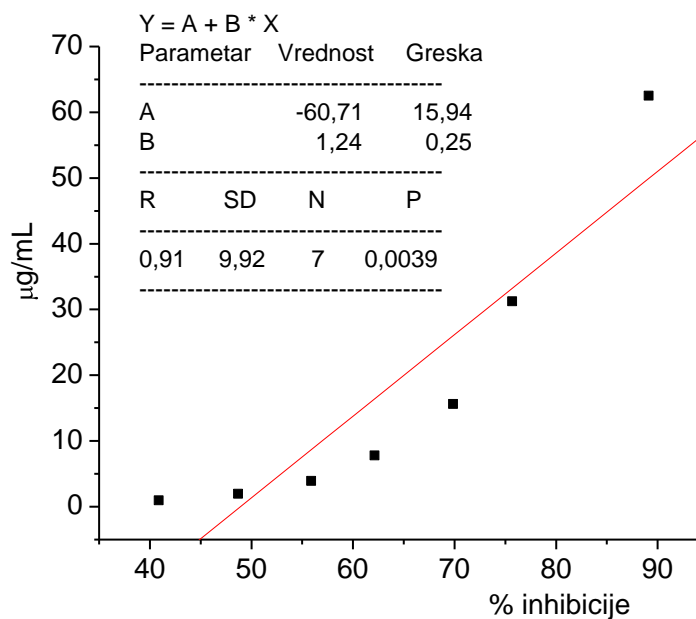
C ($\mu\text{g/mL}$)	C							
	61c	62c	63c	64c	65c	66c	67c	68c
62,5	87,89	84,12	81,26	82,56	89,12	87,59	86,58	84,15
31,25	71,12	70,45	72,15	73,15	75,69	75,11	73,26	71,25
15,6	67,18	67,6	67,98	67,12	69,86	68,16	68,02	66,59
7,8	62,23	60,11	61,28	61,11	62,12	63,05	63,12	65,12
3,9	55,12	54,26	54,22	55,01	55,89	55,15	53,99	57,45
1,95	48,18	48,11	48,35	48,34	48,69	48,51	48,02	49,01
0,98	41,59	41,57	40,23	40,34	40,89	40,33	41,66	38,87

Табела 16. Концентрације у $\mu\text{g/mL}$ имино и аминоксидеривата 4-хидроксикумарина потребне за инхибицију 50 % хидроксил радикала насталих у Фентоновој реакцији

ОН антирадикалска активност IC_{50} ($\mu\text{g/mL}$)									
Имино деривати								Стандард	
61b	62b	63b	64b	65b	66b	67b	61b	Asc	
4,44	3,95	4,02	4,14	3,98	3,96	5,08	5,72	4,02	
Амино деривати									
61c	62c	63c	64c	65c	66c	67c	68c		
1,75	2,30	2,86	2,52	1,35	1,87	1,77	2,39	4,02	



Слика 47. Графички приказ зависности ОН антирадикалске активности у односу на концентрацију супстрата *61c* са параметрима линеарне регресионе анализе



Слика 48. Графички приказ зависности ОН антирадикалске активности у односу на концентрацију супстрата *65c* са параметрима линеарне регресионе анализе

2.4. Поступци за одређивање антимикробне активности

2.4.1. Приpremни поступци за одређивање антимикробне активности

Стерилизација потребног лабораторијског посуђа. Стерилизација је процес при којем се убијају сви живи организми и све споре без обзира на врсту.

Судови се најпре потопе у Ешку смешу (метанолски раствор натријумовог и калијумовог карбоната), исперу са водом, потом исперу са дејонизованом водом. Ако су у судовима гајени патогени микроорганизми, најпре се изврши дезинфекција са алкохолом, а потом приступа прању. Након прања, судови се осуше, исперу са мало метанола и приступи се процесу стерилизације у сушници (стерилизатору).

Постоје разне физичке методе које се користе за стерилизацију (влажна топлота, пара под притиском, стерилизација UV зрацима). Овде је коришћена метода стерилизације сувом топлотом, тако што се судови ставе у сушницу у периоду од 1 h на температури од 100 °C. Ови услови омогућавају уништење свих микроорганизама након чега се посуђе може употребити ⁷².

Хранљиве подлоге. Као подлоге у овом истраживању коришћени су: хранљиви агар у праху (за бактерије) и кромпир-глюкозни агар (за гљиве)- за засејавање; Милер-Хинтеов бујон (за бактерије) и сабора течна подлога (за гљиве) (Института за имунологију и вирусологију, Торлак, Београд)- за макродилуциону и макродилуциону методу.

Приpreма хранљивог агара. Суспендује се 41,3 g праха (састав: пептон-1 "Торлак" - 15,0 g; месни екстракт "Торлак" - 3 g; натријум хлорид - 5 g; калијум фосфат - 0,3 g; агар - 18,0 g; рН=7,3) у 1000 mL хладне воде и остави да одстоји 15 мин. Потом се раствор пажљиво загрева до кључања уз стално мешање стакленим штапићем да би се прах у потпуности растворио. Оставити да раствор кључа 15 минута, уз интензивно мешање. Овако приpreмљен агар се разлије у епрувете и стерилише у аутоклаву у периоду од 15 минута на 121 °C. Након стерилизације подлога у епруветама се охлади у укошеном положају.

Потребна опрема:

Вага тачности 0,0001 g
Мензура од 500 mL
Чаша од 1 L
Стаклени штапић за мешање
Грејно тело (решо)
Епрувете запремине 10 mL
Метални сталци за епрувете
Аутоклав за стерилизацију

Припрема Милер-Хинтоновог бујона (П29)-течна подлога. Измери се одговарајућа количина супстанци (казеин хидролизат - 17,5 g; месни екстракт - 3 g; скроб -1,5 g) и раствори у 1000 mL дестиловане воде. Да би се компоненте потпуно раствориле, подлога се загрева до кључања, уз мешање а затим пребаци у одговарајући суд и стерилише 15-20 минута на температури од 120 °C⁷³.

Користи се Торлакова подлога следећег састава, g/L

Потребна опрема:

Вага тачности 0,0001 g
Мензура од 500 mL
Чаша од 600 mL
Стаклени штапић за мешање
Грејно тело (решо)
Ерленмајери запремине 250 mL
Стерилизатор

Припрема кромпир-глукозног агара. Исече се 250 g очишћеног кромпира и дода 1 L воде. Затим се кромпир кува, процеди се и дода воде до 1 L (односно она количина која је у међувремену испарила током кључања). Затим се додаје 17 g агара (15-20 %), и када се агар отопи, дода се 20 g глукозе. Кориговати рН до 6,5. Потом се врши стерилизација у трајању од 15-20 минута на температури од 120 °C и притиску од 1,5 бара. После тога се врши разливање подлоге у одговарајуће судове.

Потребна опрема:

Вага тачности 0,0001 g

Нож

Чаша од 1 L

Мензура од 500 mL

Газа за цеђење

Епрувете запремине 10 mL

Метални сталци за епрувете

Стерилизатор

Припрема Сабора (Sabouraud) течне подлоге. 30 g праха (Sabouraud течна подлога, Торлак, Београд; састав: пептон - 10,0 g; декстроза - 20,0 g) се дода у 1000 mL дестиловане воде и пажљиво загрева до кључања, да се потпуно раствори. По пребацивању у одговарајући суд врши се стерилизација у аутоклаву 15 минута на 121 °C.

Потребна опрема:

Вага тачности 0,0001 g

Мензура од 500 mL

Чаша од 600 mL

Стаклени шташић за мешање

Грејно тело (решо)

Ерленмајери запремине 250 mL

Стерилизатор

Засејавање подлога. Од припремљене подлоге (хранљиви агар за бактерије и кромпир глукозни агар за гљиве) формира се коси агар у епруветама и на њему се врши засејавање одговарајуће културе. Код течних подлога помоћу стерилисане пипете се унесе суспензија спора културе у одређену запремину претходно стерилисане подлоге. Засејавање значи преношење микроорганизама из њихове природне средине на хранљиву подлогу, или из једне хранљиве подлоге на другу. Основни предуслов је потпуна стерилност, што се постиже у стерилној комори или у другим експерименталним условима који обезбеђују потребну стерилност.

Потребна опрема:

Стерилна комора са UV лампом за стерилизацију

Бутан боца са Бунзеновим пламеником

Езе за засејавање

Суд са апсолутним етанолом

Стерилизатор

Припремање суспензије (инокулума) спора одређене концетрације. Густина инокулума је један од важнијих параметара. Препоручено је да она износи 1×10^4 – 1×10^6 CFU/mL за бактерије и 1×10^3 – 1×10^4 CFU/mL за гљиве (CFU- енг. Colony forming unit). Већом густином се скраћује лаг фаза, односно фаза развића, док превише брз раст знатно смањује зоне инхибиције⁷³.

Један од путева за одређивање густине тест супспензије је коришћење нефелометрије или спектрофотометрије.

У епрувету у којој се налази култура одређене старости (24 h за бактерије и 72 h за гљиве), додаје се стерилисана, дестилована вода. 1 mL концентроване суспензије се одпипетира у чисту епрувету и дода се 5 mL стерилисане воде. Спектрофотометријски се мери оптичка густина на 550 nm, при чему се врши додавање стерилисане воде или микроорганизама у циљу добијања $A_{550 \text{ nm}} = 0,045$ за бактерије и $A_{550 \text{ nm}} = 0.03$ за гљиве (Табела 17).

Табела 17. Оптичка густина у функцији густине инокулума

Стандард	Густина инокулума CFU/mL	$\times 10^6$	Оптичка густина на 550 nm (E)
0.5	150		0,125
1	300		0,250
2	600		0,500
3	900		0,750
4	1200		1,000
5	1500		1,250

2.4.2. Одређивање антимикробне активности супстрата 4-хидроксикумарина у *in vitro* условима

2.4.2.1. Одређивање антимикробне активности 2-аминотиазолинских деривата 4-хидроксикумарина применом макродилуционе методе^{74, 75}

Потребна опрема:

Стерилизатор

Нормални судови запремине 25 mL за полазне растворе тестираних супстрата

Вага тачности 0,0001 g

Епрувете запремине 10 mL

Сталци за епрувете

Пипете градуисане на 1 mL

Пипете градуисане на 0,1 mL

Стерилна комора

У експеримент су укључене следеће културе:

Бактерије:

Грам позитивне: *Bacillus mycoides* (FAB B1), *Bacillus subtilis* (FAB B2), *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) и

Грам негативне: *Agrobacterium tumefaciens* (FAB 231), *Enterobacter cloacae* (FAB 22), *Erwinia carotovora* (FAB 73), *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Klebsiella pneumoniae* (FAB 26), *Pseudomonas fluorescens* (FAB 097) и *Pseudomonas glycinea* (FAB 111).

Гљиве:

Ampelomyces quisqualis (DBFS 90), *Aspergillus flavus* (ATCC 9170), *Aspergillus fumigatus* (DBFS 310), *Botrytis cinerea* (DBFS 133), *Candida albicans* (ATCC 10259), *Fusarium oxysporum* (DBFS 292), *Fusarium solani* (DBFS 112), *Mucor mucedo* (ATCC 52568), *Paecilomyces variotii* (ATCC 22319), *Penicillium perpureum* (DBFS 418), *Penicillium verrucosum* (DBFS 262) и *Trichoderma harzianum* (DBFS 379).

Најпре се направе полазни раствори тестираних тиазолинских деривата 4-хидроксикумарина (49c-59c) у концентрацији од 1000 µg/mL употребом 5 % раствора

диметил сулфооксида (DMSO). У десет епрувета се одмерава по 1 mL течне подлоге, а затим у прву епрувету дода 1 mL раствора тестираног супстрата, односно стандардног једињења одређене концентracије. Употребом стерилне пипете узима се 1 mL добијеног раствора из прве епрувете и преноси у другу епрувету. Сукцесивним разблаживањем до последње епрувете, односно двоструким разблаживањем полазног раствора, добија се серија раствора тестираног једињења, односно стандардних једињења од 500, 250, 125, 62,5, 31,25, 15,6, 7,8, 3,9, 1,95 и 0,98 $\mu\text{g/mL}$. Затим се у све епрувете додаје по 0,1 mL суспензије спора чија је густина инокулума дефинисана 0.5 Mc Farland стандардом (10^6 CFU/mL за бактерије и 10^4 CFU/mL за гљиве). По истеку 24 сата за бактерије, и 48 сати за гљиве, вредности минималних инхибиторних концентracија се одређују визуелно (на основу замућености) као најниже концентracије које инхибирају раст микроорганизама.

Стандардна једињења, односно стандардни лекови коришћени у експерименту су стрептомицин за бактерије и кетоконазол за гљиве.

При извођењу експеримента су потребне три контроле:

Контрола 1-медијум

Контрола 2-медијум + 0,1 mL стандардизоване суспензије микроорганизама

Контрола 3-медијум + 0,1 mL стандардизоване суспензије микроорганизама + 5 % DMSO.

Табела 18. Антибактеријска активност 2-аминотиазолинских деривата 4-хидроксикумарина

Бактерија	МИС вредности тестираних једињења ($\mu\text{g/mL}$)											S*
	49c	50c	51c	52c	53c	54c	55c	56c	57c	58c	59c	
Грам +												
<i>B. mycoides</i>	62,5	62,5	62,5	125	62,5	62,5	62,5	62,5	62,5	31,25	62,5	7,81
<i>B. subtilis</i>	62,5	62,5	62,5	125	62,5	62,5	62,5	62,5	62,5	31,25	62,5	7,81
<i>S. aureus</i>	125	62,5	125	125	62,5	62,5	250	250	250	31,25	125	31,25
Грам -												
<i>A. tumefaciens</i>	62,5	62,5	62,5	125	62,5	62,5	62,5	62,5	250	31,25	62,5	7,81
<i>E. cloacae</i>	125	62,5	62,5	125	62,5	62,5	62,5	62,5	62,5	62,5	62,5	1,95
<i>E. carotovora</i>	62,5	62,5	62,5	125	62,5	62,5	62,5	62,5	250	31,25	62,5	7,81
<i>E. coli</i>	125	125	500	62,5	62,5	125	125	125	250	62,5	125	31,25
<i>K. pneumoniae</i>	62,5	62,5	62,5	125	62,5	62,5	62,5	62,5	62,5	31,25	62,5	1,95
<i>P. fluorescens</i>	62,5	62,5	62,5	125	62,5	31,25	62,5	62,5	31,25	125	62,5	7,81
<i>P. glycinea</i>	62,5	62,5	62,5	62,5	62,5	31,25	62,5	62,5	31,25	62,5	62,5	7,81

*S Стрептомицин

Табела 19. Антифунгална активност 2-аминотиазолинских деривата 4-хидроксикумарина

Гљива	МИС вредности тестираних једињења ($\mu\text{g/mL}$)											K*
	49c	50c	51c	52c	53c	54c	55c	56c	57c	58c	59c	
<i>A. quisquialis</i>	62,5	31,25	125	125	62,5	62,5	125	62,5	125	31,25	62,5	3,9
<i>A. flavus</i>	125	62,5	62,5	62,5	62,5	62,5	125	62,5	62,5	62,5	62,5	3,9
<i>A. fumigatus</i>	125	62,5	62,5	62,5	62,5	62,5	125	62,5	62,5	62,5	62,5	3,9
<i>B. cinerea</i>	62,5	31,25	62,5	62,5	62,5	31,25	62,5	62,5	62,5	62,5	62,5	1,95
<i>C. albicans</i>	62,5	31,25	62,5	62,5	62,5	31,25	62,5	31,25	125	31,25	62,5	1,95
<i>F. oxysporum</i>	62,5	31,25	125	62,5	62,5	62,5	62,5	62,5	62,5	31,25	62,5	3,9
<i>F. solani</i>	62,5	62,5	125	125	62,5	62,5	62,5	62,5	62,5	62,5	62,5	3,9
<i>M.ucedo</i>	62,5	31,25	125	125	62,5	31,25	125	62,5	62,5	31,25	62,5	31,25
<i>P. variotii</i>	62,5	31,25	62,5	125	62,5	62,5	62,5	31,25	62,5	31,25	62,5	1,95
<i>P.purpurescens</i>	62,5	31,25	125	62,5	62,5	62,5	125	62,5	62,5	31,25	62,5	3,9
<i>P. verrucosum</i>	62,5	31,25	62,5	62,5	62,5	62,5	62,5	62,5	62,5	31,25	62,5	3,9
<i>T. harsianum</i>	62,5	31,25	62,5	125	62,5	62,5	125	62,5	62,5	31,25	62,5	7,8

*K Кетоконазол

2.4.2.2. Одређивање антимикробне активности имино и аминокиселинских деривата 4-хидроксикумарина применом микродилуционе методе⁷⁶

Дозирање течне подлоге, раствора тестираних супстрата, ресазурин индикаторског раствора као и суспензије спора тест микроорганизама врши се, применом микропипете са стерилним наставцима, у јамице (200 μL) на стерилним полистиренским микродилуционим плочама.

Потребна опрема:

Стерилизатор

Нормални судови запремине 25 mL за полазне растворе тестираних супстрата

Нормални суд од 5 mL за ресазурин индикаторски раствор

Вага тачности 0,0001 g

Микропипета

Стерилни полистиренски наставци за микропипету

Стерилне полистиренске микродилуционе плоче са јамицама (U или V дно) запремине 200 μL

Стерилна комора

У експеримент су укључене следеће културе микроорганизама:

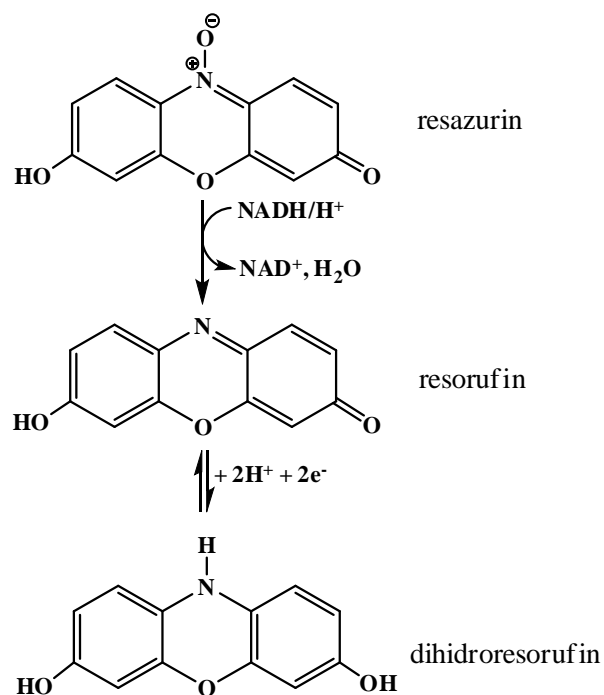
Грам позитивне бактерије: *Bacillus mycoides* (FSB 1), *Bacillus subtilis* (FSB 2), *Micrococcus lysodeikticus* (ATCC 4698), *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) и *Staphylococcus aureus* (FSB 30).

Грам негативне бактерије: *Azotobacter chroococcum* (FSB 14), *Enterobacter cloacae* (FSB 22), *Erwinia carotovora* (FSB 31), *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Klebsiella pneumoniae* (FSB 26), *Pseudomonas fluorescens* (FSB 28), *Pseudomonas glycinea* (FSB 40) и *Pseudomonas phaseolicola* (FSB 29).

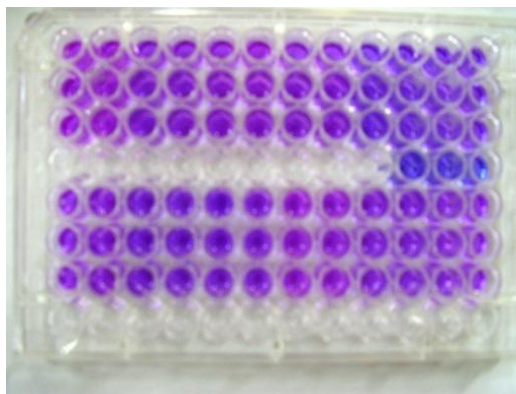
Гљиве: *Aspergillus glaucus* (FSB 32), *Aspergillus niger* (FSB 31), *Candida albicans* (ATCC 10259), *Fusarium oxysporum* (FSB 91), *Penicillium verrucosum* (FSB 21), *Trichoderma longibrachiatum* (FSB 13), *Trichoderma harzianum* (FSB 12) и *Trichoderma viride* (FSB 11).

Суспензије спора се припремају по поступку који је идентичан макродилуционој методи одређивања минималне инхибиторне концентрације.

Ресазурин, односно 7-хидрокси-3*H*-феноксазин-3-он 10-оксид је плави пигмент које се углавном користи као оксидо-редукциони индикатор у ресазурин тесту за бактерије (Слика 49 и 50). Открио га је Weselsky, а Pesch и Simmert су га 1929. године први пут искористили за квантификацију бактеријског садржаја у млеку, након чега се екстензивно употребљава у Великој Британији у бројним тестовима хигјенске исправности млека. Осим што се користи за регистровање и квантификацију бактеријских култура, широку примену је нашао и у експериментима на културама хуманих ћелија а у циљу њиховог бојења. У присуству живих ћелија дешава се редукција у две фазе: ресазурин (плаво обојен) се преводи иреверзибилно у ресорурфин (љубичасто обојен), при чему даља редукција иде реверзибилно до дихидроресорурфина. Реоксидација дихидроресорурфина праћена појавом љубичасте боје је нашала примену у анаеробној микробиологији, а у циљу констатовања контаминације са кисеоником.



Слика 49. Приказ промене боје као последица редукције ресорурфина од стране микроорганизама



Слика 50. Приказ микродилуционе плоче са различито обојеним растровима у јамицама

Поступак за одређивање антибактеријске активности. Направе се полазни раствори тестираних имино и аминокиселина деривата 4-хидроксикумарина (*61b-68b*, *61c-68c*), односно стандардног лека стрептомицина у концентрацији од 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ у апсолутном етанолу. Ресазурин индикаторски раствор се припрема непосредно пре самог експеримента, растварањем 270 mg ресазурина у 40 mL претходно стерилисане дестиловане воде. Најпре се у сваку од 96 јамица на микродилуционој плочи микропипетом сипа 50 μL течне подлоге, па се у сваку од дванаест првих јамица у линији дода по 50 μL почетног раствора имино или аминокиселина деривата 4-хидроксикумарина, односно стандардног лека стрептомицина. Двоструко разблажење у свакој од линија се изводи тако што се микропипетом изима 50 μL добијеног раствора из прве јамице и пренесе у другу, а потом се идентичан поступак изводи до крајње, односно осме јамице у линији. На овај начин се постиже опсег тестираних концентрација од 500 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ до 0,244 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$. Потом се у сваку од јамица сипа 10 μL раствора ресазурина, 30 μL течне подлоге и на крају по 10 μL суспензије спора бактерија. Како је додата суспензија спора бактерија дефинисана концентрацијом од 10^6 CFU/ μL , коначна концентрација спора у свакој од јамица је 10^6 CFU/ μL . Пажљиво се затвори микродилуциона плоча и остави у инкубатор на 37 °C. Након 24 h се одређује минимална инхибиторна концентрација супстрата праћењем промене боје раствора из плаве до љубичасте, односно црвене. За вредност

минималне инхибиторне концентрације се узима најнижа концентрација супстрата (у једној линији јамица) при којој не долази до промене боје.

При извођењу експеримента за сваку употребљену микродилуциону плочу су потребне три контроле:

Контрола 1 - медијум + ресазурин; Контрола 2 - медијум + ресазурин + 0,1 mL стандардизоване суспензије бактерија; Контрола 3 - медијум + ресазурин + 0,1 mL стандардизоване суспензије бактерија + етанол

Поступак за одређивање антифунгалне активности. Направе се полазни раствори тестираних имино и аминоксидних деривата 4-хидроксикумарина (61b-68b, 61c-68c), односно стандардног лека кетоконазола у концентрацији од 1000 $\mu\text{g/mL}$ у апсолутном етанолу. У сваку од 96 јамица на микродилуционој плочи микропипетом се сипа 50 μL течне подлоге, па се у сваку од дванаест првих јамица у линији дода по 50 μL почетног раствора имино или аминоксидних деривата 4-хидроксикумарина, односно стандардног лека кетоконазола. Двоструко разблажење у свакој од линија се изводи тако што се микропипетом извуче 50 μL добијеног раствора из прве јамице и пренесе у другу, а потом се идентичан поступак изводи до крајње, односно осме јамице у линији. На овај начин се постиже опсег тестираних концентрација од 500 $\mu\text{g/mL}$ до 0,244 $\mu\text{g/mL}$. Потом се у сваку јамицу сипа 40 μL течне подлоге и на крају по 10 μL суспензије спора гљива. Како је додата суспензија спора гљива дефинисана концентрацијом од 10^4 CFU/ μL , коначна концентрација спора у свакој од јамица је 10^3 CFU/ μL . Пажљиво се затвори микродилуциона плоча и остави у инкубатор на 37 °C. Након 48 h се одређује минимална инхибиторна концентрација супстрата праћењем појаве замућења у свакој од дванаест линија. Као минимална инхибиторна концентрација се узима најнижа концентрација супстрата (у једној линији јамица) при којој не долази до појаве замућења.

При извођењу експеримента за сваку употребљену микродилуциону плочу су потребне три контроле:

Контрола 1- медијум; Контрола 2- медијум + 0,1 mL стандардизоване суспензије гљива; Контрола 3 - медијум + 0,1 mL стандардизоване суспензије гљива + етанол

Табела 20. Антибактеријска активност имино и аминоксидних деривата 4-хидроксикумарина

	МИС вредности тестираних једињења ($\mu\text{g/mL}$)												
	бактерија												
	Грам +					Грам -							
	<i>B.m.</i>	<i>B.s.</i>	<i>M.l.</i>	<i>S.a.</i>	<i>S.a.(i)</i>	<i>A.c.</i>	<i>En.cl.</i>	<i>Er.ca.</i>	<i>Es.co.</i>	<i>K.p.</i>	<i>P.fl.</i>	<i>P.gl.</i>	<i>P.ph.</i>
61b	31,25	62,5	62,5	62,5	62,5	125	62,5	125	62,5	15,6	62,5	62,5	62,5
62b	125	125	125	125	62,5	62,5	62,5	125	62,5	31,25	62,5	31,25	62,5
63b	31,25	62,5	62,5	62,5	31,25	62,5	62,5	62,5	62,5	31,25	62,5	62,5	62,5
64b	62,5	31,25	62,5	62,5	125	62,5	125	62,5	62,5	15,6	62,5	31,25	62,5
65b	62,5	15,6	125	62,5	31,25	31,25	62,5	31,25	125	15,6	62,5	31,25	125
66b	62,5	62,5	62,5	125	62,5	62,5	62,5	62,5	125	7,8	125	31,25	125
67b	62,5	31,25	62,5	125	31,25	125	125	31,25	31,25	15,6	62,5	15,6	31,25
68b	31,25	31,25	31,25	125	62,5	31,25	125	62,5	31,25	31,25	62,5	62,5	31,25
61c	15,6	7,8	3,9	3,9	7,8	3,9	3,9	7,8	7,8	7,8	3,9	7,8	62,5
62c	7,8	7,8	3,9	3,9	7,8	3,9	3,9	7,8	7,8	7,8	3,9	7,8	31,25
63c	15,6	15,6	3,9	7,8	7,8	7,8	3,9	3,9	7,8	7,8	3,9	7,8	31,25
64c	62,5	62,5	3,9	15,6	7,8	7,8	3,9	3,9	7,8	15,6	3,9	7,8	62,5
65c	15,6	31,25	3,9	15,6	15,6	3,9	7,8	7,8	7,8	7,8	3,9	7,8	15,6
66c	15,6	7,8	3,9	31,25	15,6	3,9	7,8	7,8	15,6	15,6	7,8	15,6	7,8
67c	15,6	31,25	3,9	3,9	3,9	7,8	7,8	7,8	31,25	7,8	3,9	7,8	15,6
68c	7,8	7,8	7,8	3,9	3,9	7,8	7,8	7,8	15,6	7,8	3,9	7,8	7,8
S*	7,8	7,8	1,95	15,6	7,8	7,8	1,95	7,8	31,25	1,95	7,8	7,8	3,9

*S Стрептомицин; *B.m.*-*Bacillus mycoides* (FSB 1); *B.s.*-*Bacillus subtilis* (FSB 2); *M.l.*-*Micrococcus lysodeikticus* (ATCC 4698); *S.a.*-*Staphylococcus aureus* (ATCC 25923); *S.a.(i)*-*Staphylococcus aureus* (FSB 30); *A.c.*-*Azotobacter chroococcum* (FSB 14); *En.cl.*-*Enterobacter cloacae* (FSB 22); *Er.ca.*-*Erwinia carotovora* (FSB 31); *Es.co.*-*Escherichia coli* (ATCC 25922); *K.p.*-*Klebsiella pneumoniae* (FSB 26); *P.fl.*-*Pseudomonas fluorescens* (FSB 28); *P.gl.*-*Pseudomonas glycinea* (FSB 40); *P.ph.*-*Pseudomonas phaseolicola* (FSB 29).

Табела 21. Антифунгална активност имино и аминоксидних деривата 4-хидроксикумарина

	МИС вредности тестираних једињења ($\mu\text{g/mL}$)							
	гљива							
	<i>A.gl.</i>	<i>A.n.</i>	<i>C.a.</i>	<i>F.o.</i>	<i>P.ve.</i>	<i>T.l.</i>	<i>T.h.</i>	<i>T.v.</i>
61b	62,5	125	31,25	31,25	62,5	31,25	31,25	31,25
62b	62,5	125	31,25	62,5	62,5	31,25	125	125
63b	62,5	125	31,25	62,5	62,5	31,25	62,5	31,25
64b	125	31,25	31,25	125	31,25	31,25	31,25	31,25
65b	31,25	31,25	125	125	62,5	62,5	62,5	62,5
66b	62,5	31,25	125	125	31,25	62,5	62,5	31,25
67b	31,25	125	31,25	62,5	62,5	31,25	62,5	31,25
68b	31,25	62,5	31,25	62,5	62,5	31,25	125	125
61c	62,5	125	125	125	125	62,5	62,5	125
62c	125	125	125	62,5	125	62,5	62,5	125
63c	62,5	125	125	62,5	125	62,5	62,5	62,5
64c	125	250	250	125	125	62,5	62,5	62,5
65c	62,5	62,5	62,5	62,5	62,5	125	125	62,5
66c	62,5	125	62,5	125	125	125	125	125
67c	62,5	250	62,5	125	62,5	250	125	62,5
68c	62,5	250	125	250	125	250	125	62,5
K*	7,8	7,8	1,95	3,9	3,9	7,8	7,8	7,8

K* Кетоконазол; *A.gl.*-*Aspergillus glaucus* (FSB 32); *A.n.*-*Aspergillus niger* (FSB 31); *C.a.*-*Candida albicans* (ATCC 10259); *F.o.*-*Fusarium oxysporum* (FSB 91); *P.ve.*-*Penicillium verrucosum* (FSB 21); *T.l.*-*Trichoderma longibrachiatum* (FSB 13); *Trichoderma harzianum* (FSB 12); *T.v.*-*Trichoderma viride* (FSB 11).

2.5. Прелиминарно одређивање антикоагулантне активности у *in vitro* условима

Један од начина да се утврди да ли нови имино и аминоксидеривати 4-хидроксикумарина поседују антикоагулантну активност јесте одређивање протромбинског времена по додатку ензима *trombokinaze*, односно ткивног тромбoplastина и јона калцијума у плазму. Одређивањем времена коагулације се одређује активност протромбина и фактора коагулације крви V, VII, X, и фибриноген). Протромбинско време плазме здравих људи се креће у интервалу од 11-15 секунди.

Поступак одређивања протромбинског времена РТ модификованом методом по Квику⁷⁷

Потребна опрема:

Вага тачности 0,0001 g

Нормални судови од 10 mL

Епрувете запремине 10 mL

Микропипета са полистиренским наставцима

Полистиренски штапићи са O петљом

Водено купатило

Термометар

Штопераца

Потребни раствори:

20 % етанол

1 % NaCl w/v

60 % глицерол

10 % $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$

Потребни биолошки супстрати:

Хумана плазма

Thromborel® S реагенс (тромбoplastин са јонима калцијума; *trombokinaza*)

Thromborel® S реагенс (Dade Behring) је по саставу хумани плацентални тромбопластин са калцијум хлоридом са ISI вредности од 1,0 до 1,1. Показује добру осетљивост ка редукцији фактора II, V, VII и X.

Направе се раствори имино и аминоксидних деривата 4-хидроксикумарина (61b-68b, 61c-68c), односно стандардних једињења варфарина и аценокумарола, концентрације 10 mg/mL, растварањем 10 mg супстрата у 10 mL смеше (20 % етанол:1 % NaCl w/v:10 % NaH₂PO₄/Na₂HPO₄=1:1:1).

Потом се врши активирање ензима *trombokinaze* тако што се у бочицу Thromborel® S реагенса одмери 2 mL дестиловане воде, пренесе се на водено купатило и остави на температури од 37 °C у периоду од 30 минута.

У епрувете запремина 10 mL одмери се микорпипетом 100 µL хумане плазме и 100 µL раствора имино, односно аминоксидних деривата 4-хидроксикумарина предходно наведене концентрације. По додатку 200 µL раствора активiranог ензима *trombokinaze* штоперницом се одређује време појаве коагулације. Као крајња тачка времена узима се оно време при коме на О петљи полистиренског штапића настаје стабилна опна.

Табела 22. *In vitro* антикоагулантна активност имино и аминоксидних деривата 4-хидроксикумарина

Протромбинско време (РТ) имино деривата 4-хидроксикумарина у секундама *										
61b	62b	63b	64b	65b	66b	67b	68b	W	Ac	C
20±0,3	21±0,2	22±0,3	18±0,4	22±0,3	18±0,1	16±0,1	27±0,3	18±0,3	26±0,1	12±0,2
Протромбинско време (РТ) аминоксидних деривата 4-хидроксикумарина у секундама *										
61c	62c	63c	64c	65c	66c	67c	68c	W	Ac	C
21±0,4	20±0,2	22±0,2	23±0,2	23±0,3	20±0,1	23±0,2	20±0,1	18±0,4	26±0,1	12±0,2

* резултати су средња вредност три експеримента

W-варфарин

Ac-аценокумарол

C-без стандардног једињења односно кумаринског супстрата

3. РЕЗУЛТАТИ И ДИСКУСИЈА

Прегледом обимних литературних извора^{9, 15, 18, 19, 20, 26, 27, 38, 40- 43, 46} констатовали смо да супстрати кумаринске структуре показују различите видове биохемијске активности која је у функцији хемијске структуре испитиваног деривата кумарина.

На катедри за биохемију Природно-математичког факултета Универзитета у Крагујевцу, дуги низ година ради истраживачка група која се бави добијањем биолошки активних деривата кумарина, процесима тоталне и парцијалне хемијске синтезе.

Два горе наведена разлога била су основни, и довољан повод, за планирање и реализацију ове докторске дисертације чији задатак је подразумевао модификацију хемијске структуре полазног 4-хидроксикумарина увођењем различитих фармакофора на положај С-3 кумаринског молекула. На тај начин синтетисана је и структурно окарактерисана серија 2-аминотиазолин-4-хидроксикумарина, серија имино-4-хидроксикумарина и серија amino-4-хидроксикумарина што чини садржај првог дела експерименталног рада.

У другом делу рада приказани су резултати испитивања биохемијске активности деривата 4-хидроксикумарина као потенцијалних антиоксидативних једињења, као антимицробних једињења и као антикоагулантних једињења.

3.1. Синтеза и структурна карактеризација добијених 4-хидроксикумаринских деривата

3.1.1. Аминотиазолински деривати 4-хидрокси кумарина (64c-74c)

Нови тиоуреа деривати (51b, 53b, 55b-57b) су добијени реакцијама полазних амина (51a, 53a, 55a-57a) (0,012 mol) у облику хидрохлорида и воденог раствора амонијум тиоцијаната (0,012 mol) загревањем у току 3-4 сата, на температури од 80-, а због промене у приносу реакције максимална температура реакционе смесе је до 90 °C. Реакција се прати TLC хроматографијом а на крају реакције, након концентровања реакционе смеше, заостали сирови тиоуреа дериват се третира етил ацетатом и пречишћава хроматографијом на колони силика гела. Осим 5-тиоуреидо-пентанске киселине (55a) и 1,1-диетил-тиоуреа (56a), који се добијају као уљане супстанце, сви остали тиоуреа деривати се добијају као кристална једињења.

Hantzsch-ова реакција добијања тиазолинског прстена ⁷⁸ се изводи у кључалом апсолутном етанолу, између еквимоларних количина 3-(2-бромацетил)-4-хидрокси-хромен-2-она (60) и одговарајућег тиоуреа деривата (49b-59b) у току 30-45 минута. Настали 2-аминотиазолински деривати 4-хидроксикумарина (49c-59c) су слабо растворни у етанолу и већини других растварача (осим у диметил сулфоксиду), тако да се по завршетку реакције и хлађења реакционе смеше добијени талог одвоји цеђењем. Добијени производи пречишћавају се кристализацијом из 96 % етанола, а сви 2-аминотиазолински деривати су кристална једињења нерастворна у метанолу, етанолу, толуену, бензену, а растворна у диметил сулфоксиду.

Идентификација хемијске структуре синтетисаних тиоуреа и 2-аминотиазолинских деривата извршена је на основу одређивања тачке топљења, и анализом резултата ИС и ¹H NMR спектра. Сумарни преглед спектралних података синтетисаних деривата приказан је у табелама 23 и 24.

На основу табеле 23 се може видети да су тиоуреа деривати 5-тиоуреидо-пентанска киселина (55a) и 1,1-диетил-тиоуреа (56a) вискозне супстанце. Увођење тиоуреидо групе је потврђено присуством карактеристичних апсорпционих трака од -

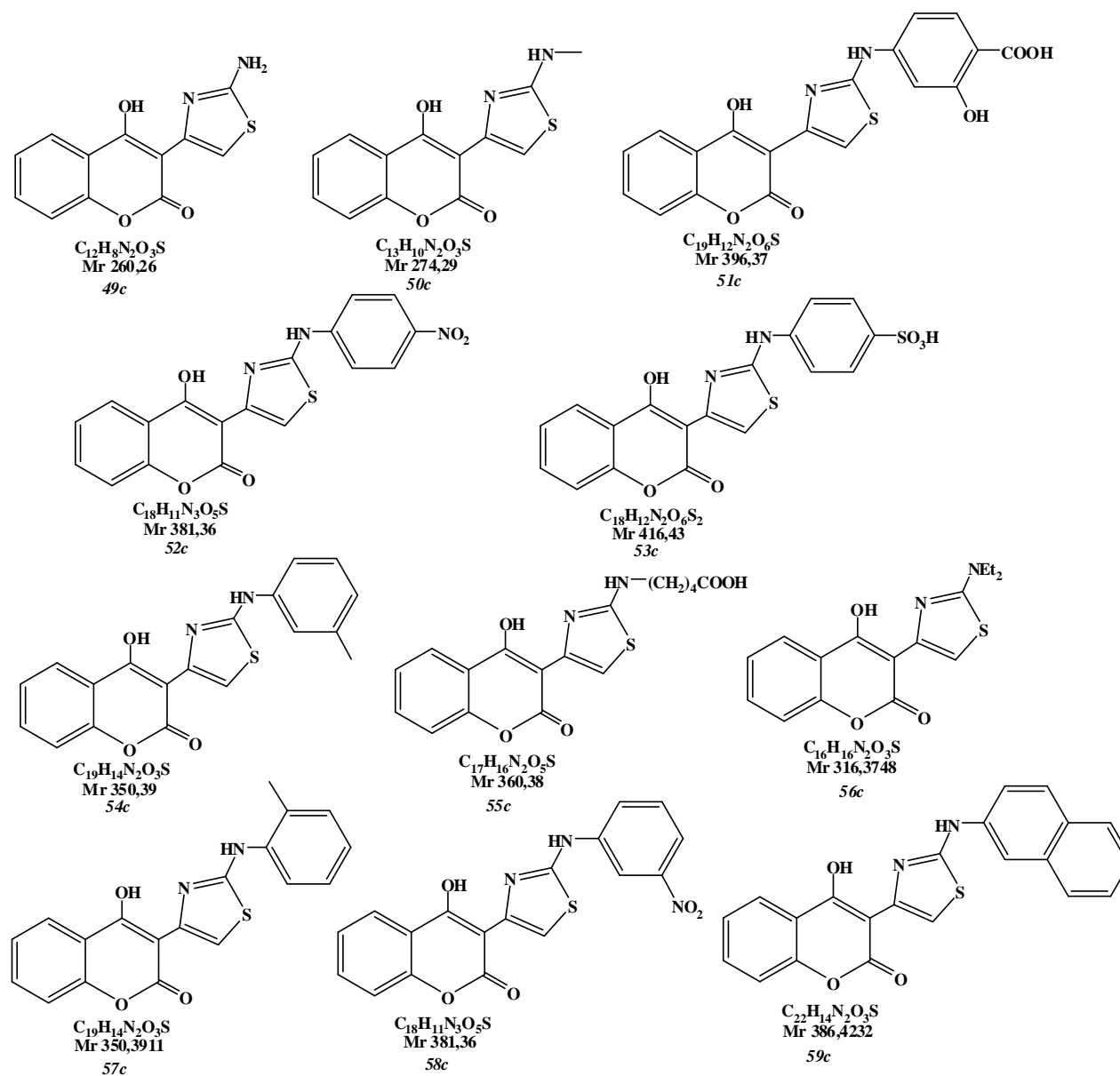
NH и -NH₂ група у инфрацрвеном спектру и широких синглета -NH и -NH₂ група у ¹H NMR спектру. Увођење аминотиазолинске групе констатовано је карактеристичном апсорпционом траком -NH групе и сигнаlima у виду синглета који потичу од протона са C-5' угљеника тиазолинског прстена и протона са амино групе (Табела 24).

Табела 23. Тачке топљења и карактеристични спектрални подаци тиоуреа деривата (51b, 53b, 55b-57b)

Тиоуреа деривати		Карактеристичне апсорпције у ИС и ¹ Н NMR спектру			т.т. °C
		ν(NH) cm ⁻¹		δ (ppm)	
		од NH и NH ₂ групе	од NH ₂ групе	од NH групе	
51b	2-хидрокси-4-тиоуреидо-бензојева киселина	3360, 3295 и 3184	9,5	11,9	76-78
53b	4-тиоуреидо-бензенсулфонска киселина	3461 и 3220	9,4	11,82	84-87
55b	5-тиоуреидо-пентанска киселина	3138	9,56	9,0	уље
56b	1,1-диетил-тиоуреа	3399	9,53	-	уље
57b	<i>o</i> -толил-тиоуреа	3447, 3284 и 3169	9,5	12,4	44

Табела 24. Тачке топљења и карактеристични спектрални подаци 2-аминотиазолинских деривата (49c-59c)

2-Амино тиазолински деривати		Карактеристичне апсорпције у ИС и ¹ Н NMR спектру			т.т. °C
		ν(NH) cm ⁻¹		δ (ppm)	
		од NH групе	2'-NH	H-C-5'	
49c	3-(2-амино-тиазол-4-ил)-4-хидрокси-хромен-2-он	3433 и 3241	8,58	7,21	255-257
50c	4-хидрокси-3-(2-метиламинотиазол-4-ил)хромен-2-он	3433	11,01	7,36	216-218
51c	2-хидрокси-4-[4-(4-хидрокси-2-оксо-2 <i>H</i> -хромен-3-ил)-тиазол-2-иламино]-бензојева киселина	3413	12,11	7,83	282-284
52c	4-хидрокси-3-[2-(4-нитро-фениламино)-тиазол-4-ил]-хромен-2-он	3414	10,22	8,10	227-230
53c	4-[4-(4-хидрокси-2-оксо-2 <i>H</i> -хромен-3-ил)-тиазол-2-иламино]-бензенсулфонска киселина	3436	10,94	7,78	247-249
54c	4-хидрокси-3-(2- <i>m</i> -толиламино-тиазол-4-ил)-хромен-2-он	3412	9,60	8,08	270-273
55c	5-[4-(4-хидрокси-2-оксо-2 <i>H</i> -хромен-3-ил)-тиазол-2-иламино]-пентанска киселина	3416	8,87	7,9	224-225
56c	3-(2-диетиламино-тиазол-4-ил)-4-хидрокси-хромен-2-он	-	-	7,64	245-247
57c	4-хидрокси-3-(2- <i>o</i> -толиламино-тиазол-4-ил)-хромен-2-он	3414	9,20	7,85	236-238
58c	4-хидрокси-3-[2-(3-нитро-фениламино)-тиазол-4-ил]-хромен-2-он	3415	8,74	7,91	>300
59c	4-хидрокси-3-(2-(нафтален-1-иламино)тиазол-4-ил)-2 <i>H</i> -хромен-2-он	3413	8,57	7,87	278-280



Слика 51. Структуре нових 2-аминотиазолинских деривата (49c-59c)

3.1.2. Имино и аминоксидеривати 4-хидроксикумарина (61b-68b, 61c-68c)

Имино деривати 4-хидроксикумарина (61b-68b) су синтетисани кондензацијом уз азеотропно издвајање воде ⁷⁹ и процесом загревања реакционе смеше дејством микроталасног зрачења.

Конвенционална метода добијања имино деривата 4-хидроксикумарина. Синтеза имино деривата 4-хидроксикумарина (61b-68b) остварена је модификованим процесом по Layer-у ⁷⁹.

Еквимоларне количине полазних једињења 3-ацетил-4-хидроксикумарина (17) и амина (61a-68a) у анхидрованом толуену као растварачу, се по додатку каталитичке количине *p*-толуен сулфонске киселине загревају, уз азеотропно издвајање воде, у току 10-12 сати. Крај реакције се одређује TLC хроматографијом, реакциона смеша се хлади и концентрује до четвртине запремине. Сирови производи реакције се пречишћавају хроматографијом на колони силика гела. Чисти имино деривати (61b-68b) су кристалне супстанце слабо растворне у метанолу и толуену, а добро растворни у етанолу и тетрахидрофурану.

Метода под дејством микроталасног зрачења. Извођење реакција под дејством микроталасног зрачења данас добија све више на значају. Разлог томе је скраћивање времена реакције и њихово извођење под много блажим реакционим условима ⁸⁰. Врло је важно истаћи да се под оваквим реакционим условима скоро у потпуности елиминише настајање нуспродуката, односно да су приноси жељених једињења високи, тако да се њихово пречишћавање изводи само рекристализацијом из погодног растварача, чиме се знатно штеди, не само на времену потребном за пречишћавање хроматографијом, већ и на растварачима потребним за елуирање ⁸⁰.

Еквимоларне количине 3-ацетил-4-хидроксикумарина (17) и амина (61a-68a) у анхидрованом толуену као растварачу, се по додатку каталитичке количине *p*-толуен сулфонске киселине, подвргавају микроталасном зрачењу снаге 500 W у периоду од 3 минута. По хлађењу, реакциона смеша се концентрује а талог добијених иминова се прекристалише из метанола (61b-68b). У табели 25 компаративно су приказани

реакциони услови конвенционалне методе синтезе и микроталасне методе синтезе имино деривата која потврђује предност примене микроталасне методе у смислу краћег реакционог времена, већег приноса реакције и добијања чистијих производа реакције.

Табела 25. Приноси и време реакције добијања имино деривата (61b-68b)

имини	Конвенционална метода		Микроталасна метода	
	Време синтезе (h)	Принос %	Време синтезе (h)	Принос %
61b	9	75	9	95
62b	9,5	73	9,5	97
63b	9	84	9	94
64b	9,5	73	9,5	94
65b	13,5	51	13,5	92
66b	12,5	62	12,5	97
67b	10	75	10	97
68b	10	42	10	87

Деривати аминок-4-хидроксикумарина

Редукција имиона до одговарајућих амина 4-хидроксикумарина (61c-68c) се изводи у смеси растварача метанол:тетрахидрофуран=8:2 са натријум борхидридом. Да би реакција текла једнозначно, на собној температури и уз интензивно мешање раствора имиона, средство за редукцију се додаје поступно, у порцијама. По додатку целокупне количине натријум борхидрида, реакциона смеша наставља да се меша у периоду од 4 сата. Крај реакције се контролише TLC хроматографијом. Реакциона смеша се концентрује а затим третира са 10 % хлороводоничном киселином и интензивно меша на собној температури у периоду од 30-60 минута. Након неутрализације, амини се екстрахују са метилен хлоридом а после сушења и концентровања растварача сирови производи се пречишћавају хроматографијом на колони. Амини су кристална једињења светло жуте боје и добро су растворни у метанолу, етанолу, тетраhydroфурану и метилен хлориду.

Идентификација структуре синтетисаних имино и аминок деривата 4-хидроксикумарина је извршено на основу резултата ИС, ¹H NMR и масених спектра (Табеле 26 и 27) као и тачке топљења.

Табела 26. Тачке топљења и карактеристични спектрални подаци имино деривата (61b-68b)

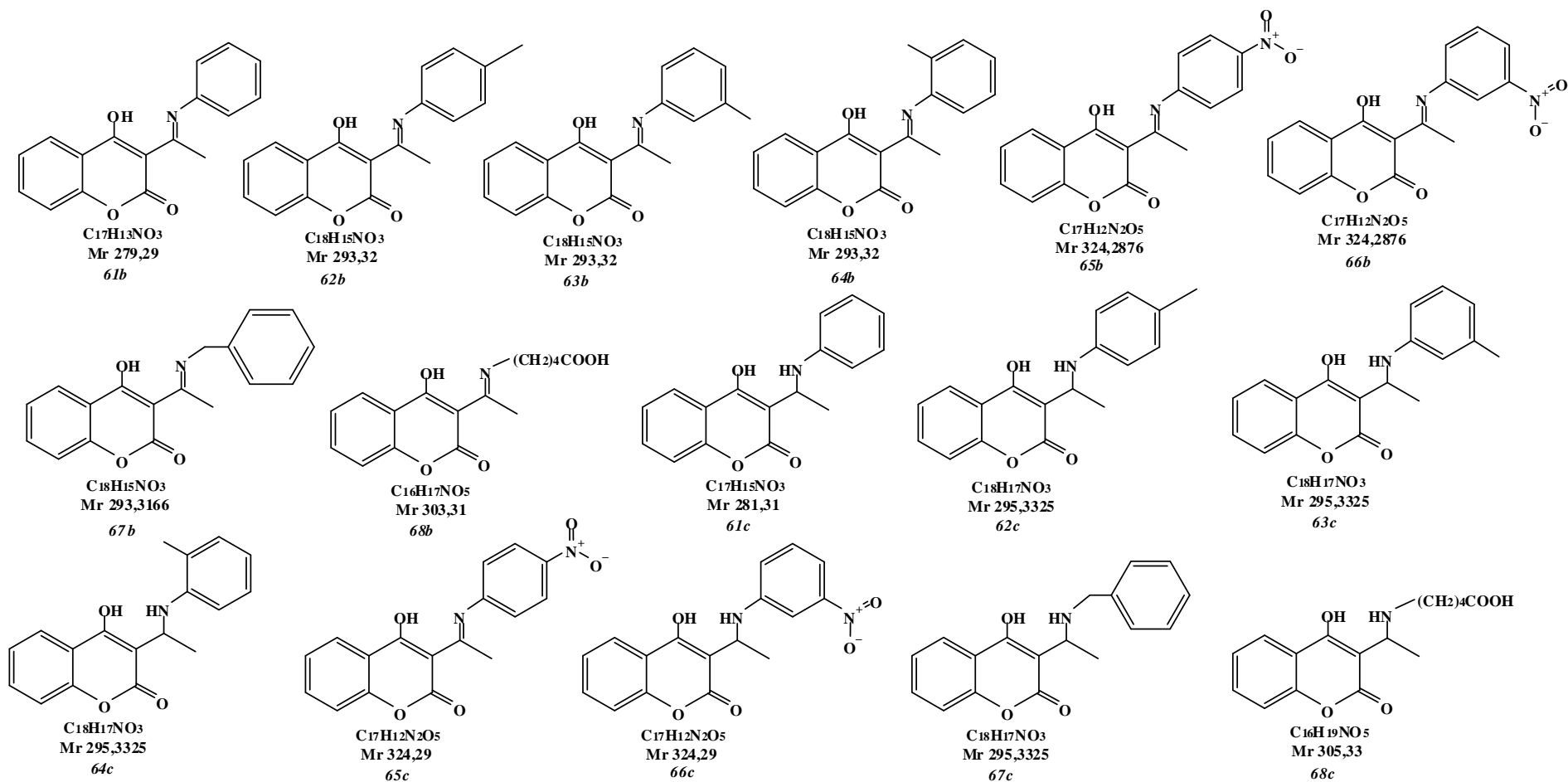
Имино деривати	Карактеристичне апсорпције у ИС и ¹ H NMR спектру					MS m/z (%)	Т.Т. °C
	$\nu(\text{C}=\text{N}) \text{ cm}^{-1}$	δ (ppm)					
	од C=N групе	CH ₃ -C=N	M ⁺	M ⁺ -1	M ⁺ -15		
61b 4-хидрокси-3-(1-(фенилимино)етил)-2H-хромен-2-он	1609	2,72	279 (64)	278 (100)	264 (17)	169-171	
62b 4-хидрокси-3-(1-(p-толилимино)етил)-2H-хромен-2-он	1611	2,69	293 (91)	292 (100)	278 (32)	147-149	
63b 4-хидрокси-3-(1-(m-толилимино)етил)-2H-хромен-2-он	1606	2,70	293 (81)	292 (100)	278 (30)	109-110	
64b 4-хидрокси-3-(1-(o-толилимино)етил)-2H-хромен-2-он	1611	2,81	293 (42)	292 (34)	278 (100)	138-139	
65b 4-хидрокси-3-(1-(4-нитрофенилимино)етил)-2H-хромен-2-он	1608	2,76	324 (60)	323 (100)	309 (9)	212-215	
66b 4-хидрокси-3-(1-(3-нитрофенилимино)етил)-2H-хромен-2-он	1609	2,61	324 (69)	323 (100)	309 (4)	209-210	
67b 3-(1-(бензилимино)етил)-4-хидрокси-2H-хромен-2-он	1612	2,64	293 (100)	292 (100)	278 (5)	151-152	
68b 5-(1-(4-хидрокси-2-оксо-2H-хромен-3-ил)етилиденамино)пентанска киселина	1614	2,70	303 (12)	302 (41)	288 (11)	169-171	

Табела 27. Тачке топљења и карактеристични спектрални подаци аминокиселина (61c-68c)

Амино деривати	Карактеристичне апсорпције у ИС и ¹ H NMR спектру				MS			Т.Т. °C
	$\nu(\text{NH}) \text{ cm}^{-1}$	δ (ppm)			m/z (%)			
	од NH групе	NH	C ₁ -CH ₃	M ⁺	M ⁺ -1	M ⁺ -15		
61c 4-хидрокси-3-(1-(фенилимино)етил)-2H-хромен-2-он	3183	3,96	1,34	281 (4)	280 (15)	266 (11)	189-190	
62c 4-хидрокси-3-(1-(p-толилимино)етил)-2H-хромен-2-он	3191	4,09	1,33	295 (6)	294 (11)	280 (32)	167-169	
63c 4-хидрокси-3-(1-(m-толилимино)етил)-2H-хромен-2-он	3179	3,94	1,33	295 (9)	294 (14)	280 (6)	119-121	
64c 4-хидрокси-3-(1-(o-толилимино)етил)-2H-хромен-2-он	3193	3,87	1,31	295 (3)	294 (18)	280 (42)	147-149	
65c 4-хидрокси-3-(1-(4-нитрофенилимино)етил)-2H-хромен-2-он	3184	4,14	1,33	326 (1)	325 (14)	311 (15)	222-223	
66c 4-хидрокси-3-(1-(3-нитрофенилимино)етил)-2H-хромен-2-он	3181	3,91	1,35	326 (1)	325 (11)	311 (9)	215-217	
67c 3-(1-(бензилимино)етил)-4-хидрокси-2H-хромен-2-он	3190	3,96	1,29	295 (16)	294 (8)	280 (22)	171-173	
68c 5-(1-(4-хидрокси-2-оксо-2H-хромен-3-ил)етилиденамино)пентанска киселина	3189	4,02	1,25	305 (2)	304 (5)	290 (7)	231-233	

Увођење имино групе је потврђено на основу карактеристичне апсорпционе траке од C=N валенционе вибрације, сигнала у облику синглета који потиче од метил групе везане за имино угљеник, као и вредности m/z и интензитета молекулског јона, односно M^+-1 и M^+-15 фрагментационих јона. Редукција имино групе до амино групе се констатује у ИС спектру појавом шире траке од валенционе вибрације -NH групе, док се у ^1H NMR спектру региструје шири синглет -NH групе и дублет протона са C_1 - CH_3 групе.

Бензофурански фрагмент свих синтетисаних кумаринских једињења (Слика 51 и 52) спектрално одговара полазним једињењима 3-(2-бромацетил)-4-хидроксикумарину (60) и 3-ацетил-4-хидроксикумарину (17)⁸¹.



Слика 52. Структуре нових деривата имино-4-хидроксикумарина (61b-68b) и деривата аминок-4-хидроксикумарина (61c-68c)

3.2. Антиоксидативна активност имино-4-хидроксикумарина (61b-68b) и деривата аминок-4-хидроксикумарина (61c-68c)

3.2.1. Укупна антиоксидативна активност деривата имино-4-хидроксикумарина (61b-68b) и деривата аминок-4-хидроксикумарина (61c-68c)

Укупна антиоксидативна активност две групе новосинтетисаних деривата имино-4-хидроксикумарина и деривата аминок-4-хидроксикумарина, као и аскорбинске киселине као стандарда, одређена је као њихова способност да редукују Мо(VI) до Мо(V) при чему се формира зелено обојени комплекс Мо(V) са максимумом апсорпције на 695 nm⁶⁷. Сумаран преглед експерименталних вредности укупне антиоксидативне активности испитиваних деривата имино-4-хидроксикумарина и деривата аминок-4-хидроксикумарина приказан је у табели 28.

Табела 28. Укупна антиоксидативна активност деривата имино-4-хидроксикумарина (61b-68b) и деривата аминок-4-хидроксикумарина (61c-68c)

	Еквиваленти аскорбинске киселине (µg/mL)*				
	250 µg/mL	125 µg/mL	62,50 µg/mL	31,25 µg/mL	15,60 µg/mL
61b	12,03±0,25	8,64±0,29	5,29±0,31	3,18±0,27	2,29±0,17
62b	11,70±0,54	9,25±0,32	6,14±0,32	3,96±0,35	2,92±0,19
63b	11,83±0,13	9,47±0,38	5,99±0,58	3,44±0,47	2,18±0,45
64b	11,71±0,24	9,37±0,27	5,18±0,24	2,92±0,44	1,92±0,11
65b	12,58±0,29	8,84±0,41	4,77±0,22	3,18±0,41	2,70±0,26
66b	12,33±0,27	8,82±0,47	4,68±0,35	3,25±0,38	1,73±0,11
67b	12,11±0,57	9,18±0,39	5,92±0,41	4,10±0,33	1,95±0,38
68b	12,18±0,65	9,22±0,36	6,22±0,11	3,73±0,35	3,14±0,24
61c	45,50±0,68	20,30±0,34	7,96±0,14	4,25±0,51	0,55±0,25
62c	46,98±0,29	23,15±0,37	12,77±0,25	4,77±0,23	1,77±0,28
63c	47,09±0,35	20,89±0,38	11,14±0,31	4,55±0,21	0,95±0,21
64c	47,53±0,31	20,63±0,25	8,07±0,24	3,51±0,18	0,84±0,17
65c	54,57±0,13	27,26±0,27	11,83±0,36	7,63±0,25	4,66±0,29
66c	45,90±0,11	24,26±0,28	11,29±0,38	8,96±0,38	5,40±0,33
67c	49,16±0,25	23,56±0,21	11,59±0,13	5,25±0,24	3,51±0,39
68c	49,35±0,12	18,81±0,51	10,94±0,17	4,62±0,35	3,70±0,34

*представљене вредности су средња вредност три експеримента

Основна констатација која следи на основу резултата приказаних у табели 28 је да све испитиване концентрације деривата аминоксидо-4-хидроксикумарина (61c-68c) показују већу антиоксидативну активност у поређењу са активношћу деривата аминоксидо-4-хидроксикумарина (61b-68b).

Концентрације деривата аминоксидо-4-хидроксикумарина од 250 $\mu\text{g/mL}$ и 125 $\mu\text{g/mL}$ показују активност на нивоу од 45,50 $\mu\text{g/mL}$ до 54,57 $\mu\text{g/mL}$ аскорбинске киселине, односно 18,81 $\mu\text{g/mL}$ до 27,26 $\mu\text{g/mL}$ аскорбинске киселине. Исте концентрације деривата аминоксидо-4-хидроксикумарина показују слабију активност која се налази у опсегу од 11,70 $\mu\text{g/mL}$ до 12,58 $\mu\text{g/mL}$ аскорбинске киселине, односно 8,64 $\mu\text{g/mL}$ до 9,47 $\mu\text{g/mL}$ аскорбинске киселине.

Може се закључити да промена аминоксидо групе у аминоксидо групу доводи до повећања обима антиоксидативне активности синтетисаних деривата кумарина.

Концентрација од 250 $\mu\text{g/mL}$ показује високе вредности укупне антиоксидативне активности, (одговара 12,58 $\mu\text{g/mL}$ и 12,33 $\mu\text{g/mL}$ аскорбинске киселине) код деривата аминоксидо-4-хидроксикумарина са *p*-нитрофенил (65b) и *m*-нитрофенил (66b) фармакофорама. Супротно, при истој концентрацији, једињења са толил фармакофорама (62b-64b) показују најслабију активност која се креће у опсегу од 11,70 $\mu\text{g/mL}$ до 11,83 $\mu\text{g/mL}$ аскорбинске киселине.

Дериват аминоксидо-4-хидроксикумарина са *p*-нитрофенил фармакофором (65c) показује висок степен антиоксидативне активности која при тестираној концентрацији од 250 $\mu\text{g/mL}$ износи 54,57 $\mu\text{g/mL}$ аскорбинске киселине. Такође, може се констатовати, да висок степен антиоксидативне активности показују деривати аминоксидо-4-хидроксикумарина са бензил (67c) и $-(\text{CH}_2)_4\text{COOH}$ (68c) фармакофором на аминоксидо азоту. Потпуно супротан ефекат, тј. слабу антиоксидативну активност показују једињења са фенил (61c) и *o*-толил (64c) групама.

Фосфолибденска метода је опште примењена метода за одређивање антиоксидативне активности али овде приказани резултати представљају прве публиковане резултате антиоксидативне активности аминоксидо-4-хидроксикумарина као и аминоксидо-4-хидроксикумарина.

3.2.2. Антирадикалска активност деривата имино-4-хидроксикумарина (*61b-68b*) и деривата аминоксидо-4-хидроксикумарина (*61c-68c*) методом са DPPH

Способност синтетисаних деривата кумарина да се понашају као једињења која везују стабилне DPPH радикале одређује се реакцијом са DPPH реагенсом.

Интезитет љубичасте боје метанолског раствора је у функцији концентрације DPPH радикала, што је основа спектрофотометријског мерења обима антирадикалске активности, променом апсорбанце на 517 nm. Обим антирадикалске активности изражава се као IC₅₀ вредност, односно као концентрација супстрата потребна да се за 50 % умањи почетна концентрација DPPH радикала⁶⁸.

Сумарни приказ експерименталних резултата антиоксидативне активности испитиваних деривата имино-4-хидроксикумарина и аминоксидо-4-хидроксикумарина приказан је у табели 29.

Табела 29. Антирадикалска активност (μM) деривата имино-4-хидроксикумарина и деривата аминок-4-хидроксикумарина методом са DPPH у току 30 и 60 минута

Време мерења	DPPH антирадикалска активност IC_{50} (μM) [*]									
	Имино деривати									Стандарди
	61b	62b	63b	64b	65b	66b	67b	68b	ВНТ	Asc
30 мин	446,9±12,1	352,6±22,2	334,6±21,9	304,1±13,2	371,6±12,7	498,7±13,2	424,9±14,3	394,2±21,8	25,4±22,7	42,4±22,7
60 мин	281,5±9,1	266,6±12,2	170,1±8,7	237,8±18,3	152,1±17,4	441,5±7,6	402,8±11,2	377,4±24,6	12,78±7,6	27,22±14,3
	Амино деривати									
	61c	62c	63c	64c	65c	66c	67c	68c		
30 мин	34,1±13,4	93,9±13,3	131,8±21,6	72,3±13,4	25,9±11,8	40,9±13,9	62,6±14,2	63,4±12,7		
60 мин	33,1±11,3	58,8±11,5	56,0±15,3	45,0±19,8	25,0±14,6	37,2±7,7	56,9±21,2	58,4±14,5		

^{*} IC_{50} су средња вредност три експеримента

ВНТ - бутил хидрокси толуен

Asc - аскорбинска киселина

У светлу резултата приказаних у табели 29 који дају обим антирадикалске активности испитиваних деривата 4-хидроксикумарина као IC_{50} вредности, може се констатовати да деривати амино-4-хидроксикумарина (*61c-68c*) показују значајно већу DPPH антирадикалску активност у поређењу са обимом активности деривата имино-4-хидроксикумарина (*61b-68b*).

Резултати указују да обим антирадикалске активности зависи од хемијске структуре супституента на положају С-3 у молекулу 4-хидроксикумарина као и од дужине одвијања реакције.

Способност антирадикалске активности применом DPPH реагенса код деривата имино-4-хидроксикумарина је у опсегу од 304,1 μM до 498,7 μM после 30 минута реакције, односно 152,1 μM до 441,5 μM после 60 минута реакције.

DPPH антирадикалска активност деривата амино-4-хидроксикумарина је у опсегу од 25,9 μM до 131,8 μM мерена после реакције од 30 минута, односно 25,0 μM до 58,8 μM при мерењу после 60 минута.

Све експерименталне вредности које се односе на обим антирадикалске активности деривата имино-4-хидроксикумарина и амино-4-хидроксикумарина укључене су у линеарну регресиону анализу, а сумарни резултати приказани су у табели 30.

Табела 30. Резултати линеарне регресионе анализе за DPPH методу

једначина	За експеримент мерења апсорбаци по истеку 30 минута							Изузете тачке
	грешка	Коефицијент корелације		Вреоватноћа	Стандардна девијација	Број узетих тачака		
	$Y_i = A + B X_i$	A	B	R	P	SD	N	
61b	$Y_i = -69,04 + 3,89 X_i$	25,36	0,72	0,88	$6,26 \times 10^{-4}$	39,49	10	0
62b	$Y_i = -46,04 + 4,18 X_i$	10,31	0,36	0,97	< 0,0001	19,96	10	0
63b	$Y_i = -62,20 + 4,28 X_i$	11,66	0,37	0,97	< 0,0001	20,35	10	0
64b	$Y_i = -62,30 + 3,66 X_i$	26,09	0,73	0,87	0,00105	42,06	10	0
65b	$Y_i = -51,48 + 3,44 X_i$	30,15	0,87	0,81	0,00427	49,78	10	0
66b	$Y_i = -59,25 + 4,42 X_i$	16,72	0,56	0,94	< 0,0001	29,06	10	0
67b	$Y_i = -49,84 + 3,49 X_i$	23,64	0,69	0,87	$9,54 \times 10^{-4}$	41,56	10	0
68b	$Y_i = -60,89 + 3,61 X_i$	26,03	0,73	0,87	0,0011	42,29	10	0
61c	$Y_i = -2,63 + 0,24 X_i$	2,19	0,06	0,90	0,01445	2,82	6	прве четири
62c	$Y_i = -10,36 + 0,76 X_i$	5,82	0,14	0,91	0,00157	9,55	8	прве две
63c	$Y_i = -26,28 + 1,30 X_i$	14,82	0,30	0,85	0,00363	23,42	9	прва
64c	$Y_i = -11,30 + 0,65 X_i$	7,46	0,15	0,87	0,0051	11,56	8	прве две
65c	$Y_i = -3,47 + 0,24 X_i$	1,97	0,05	0,93	0,00745	2,39	6	прве четири
66c	$Y_i = -7,97 + 0,43 X_i$	3,05	0,07	0,94	0,0014	4,06	7	прве три
67c	$Y_i = -5,44 + 0,48 X_i$	1,96	0,05	0,97	$2,99 \times 10^{-4}$	2,99	7	прве три
68c	$Y_i = -5,01 + 0,49 X_i$	1,53	0,04	0,98	< 0,0001	2,39	7	прве три

наставак табеле 30

За експеримент мерења апсорбаци по истеку 60 минута								
једначина	грешка	Коефицијент		Вреоватноћа	Стандардна	Број узетих	Изузете	
$Y_i = A + B X_i^*$	A	B	корелације	P	девијација	тачака	тачке	
			R		SD	N		
61b	$Y_i = -39,06 + 2,35 X_i$	11,68	0,36	0,93	$3,31 \times 10^{-4}$	16,79	9	прва
62b	$Y_i = -28,83 + 2,14 X_i$	12,91	0,42	0,89	0,00132	20,37	9	прва
63b	$Y_i = -14,47 + 1,29 X_i$	5,34	0,19	0,94	$5,59 \times 10^{-4}$	8,07	8	прве две
64b	$Y_i = -38,53 + 2,17 X_i$	17,19	0,50	0,85	0,00349	23,29	9	прва
65b	$Y_i = -19,63 + 1,38 X_i$	5,44	0,19	0,95	$3,22 \times 10^{-4}$	7,37	8	прве две
66b	$Y_i = -64,85 + 4,16 X_i$	19,41	0,59	0,93	$1,18 \times 10^{-4}$	32,21	10	0
67b	$Y_i = -64,32 + 3,65 X_i$	17,98	0,49	0,94	< 0.0001	30,16	10	0
68b	$Y_i = -75,76 + 3,80 X_i$	22,74	0,60	0,91	$2,27 \times 10^{-4}$	34,89	10	0
61c	$Y_i = -2,89 + 0,24 X_i$	2,22	0,06	0,90	0,01382	2,78	6	прве четири
62c	$Y_i = -5,07 + 0,45 X_i$	3,24	0,09	0,92	0,00346	4,84	7	прве три
63c	$Y_i = -9,51 + 0,52 X_i$	1,99	0,05	0,98	$1,32 \times 10^{-4}$	2,54	7	прве три
64c	$Y_i = -7,00 + 0,41 X_i$	2,94	0,06	0,94	0,00144	4,08	7	прве три
65c	$Y_i = -3,67 + 0,23 X_i$	1,70	0,04	0,95	0,004	2,06	6	прве четири
66c	$Y_i = -7,61 + 0,39 X_i$	3,30	0,07	0,93	0,00217	4,42	7	прве три
67c	$Y_i = -6,68 + 0,47 X_i$	1,73	0,04	0,98	$1,22 \times 10^{-4}$	2,50	7	прве три
68c	$Y_i = -6,93 + 0,49 X_i$	1,46	0,04	0,98	< 0.0001	2,10	7	прве три

У серији деривата имино-4-хидроксикумарина (61b-68b) једињење са *o*-толил фармакофором (64b, IC₅₀ 304,1 μM) показује највећу активност. Најслабију антирадикалску активност показује једињење са *m*-нитрофенил фармакофором (66b, IC₅₀ 498,7 μM).

Јаку DPPH антирадикалску активност показују деривати имино-4-хидроксикумарина са *p*-толил (62b), *m*-толил (63b) и *p*-нитрофенил (65b) фармакофорама (IC₅₀ вредности су: 352,6 μM, 334,6 μM и 371,6 μM).

Једињења са фенил (77b), бензил (83b) и -(CH₂)₄COOH (84b) функционалним групама показују средњи ниво антирадикалске активност са IC₅₀ вредностима од 446,9 μM, 424,9 μM и 394,2 μM.

Уколико се реакција одвија у току 60 минута највећу антирадикалску активност показују једињења са *p*-нитрофенил (65b) и *m*-толил (63b) фармакофорама (IC₅₀ вредности су 152,1 μM и 170,1 μM), на супрот кумаринима са *m*-нитрофенил (66b), бензил (67b) и -(CH₂)₄COOH (68b) групама који показују слабу активност (IC₅₀ вредности су: 441,5 μM, 402,8 μM и 377,4 μM). Остали деривати имино-4-хидроксикумарина показују средњи ниво антирадикалске активности са IC₅₀ вредностима од 237,8 μM до 281,5 μM.

У серији деривата амина-4-хидроксикумарина (61c-68c) највећу антирадикалску активност је показало једињење са *p*-нитрофенил фармакофором (65c) (IC₅₀ вредност 25,9 μM), док је најмања активност измерена код једињења са *m*-толил групом (63c) и износи 131,8 μM. Јаку антиоксидативну активност показују једињења са фениламино (61c) и бензиламино (67c) фармакофорама које имају IC₅₀ вредности од 34,1 μM и 40,9 μM. Остали деривати амина-4-хидроксикумарина показују умерену антирадикалску активност са IC₅₀ вредностима од 62,6 μM до 93,9 μM.

Антирадикалска активност мерена после реакције од 60 минута је била интензивна код једињења са *p*-нитрофениламино фармакофором (65c) што је тренд уочен и код реакције од 30 минута са IC₅₀ вредношћу од 25,0 μM. Умерен ниво активности је констатован код једињења 61c и 66c са IC₅₀ вредностима од 33,1 μM и

37,2 μM , док је минорна антирадикалска активност измерена код преосталих деривата аминоксидо-4-хидроксикумарина.

Деривати аминоксидо-4-хидроксикумарина показују слабију активност у поређењу са активношћу стандардних антиоксиданаса типа бутил хидроксил толуена (ВНТ) и аскорбинске киселине, док у серији деривата аминоксидо-4-хидроксикумарина једињење са *p*-нитрофенил фармакофором (65c) показује активност са IC_{50} вредност 25,9 μM скоро еквивалентну антирадикалској активности ВНТ-а (IC_{50} 25,4 μM). Са друге стране, једињења 61c, 65c и 66c показују већу антирадикалску активност (IC_{50} вредности су 34,1 μM , 25,9 μM и 40,9 μM) у поређењу са активношћу аскорбинске киселине (IC_{50} 42,4 μM).

Антирадикалска активност после 60 минута показује да сви деривати аминоксидо-4-хидроксикумарина имају ниво активности мањи од ВНТ, само једињење 65c показује већу антирадикалску активност (IC_{50} 25 μM) у поређењу са активношћу аскорбинске киселине (IC_{50} 27,22 μM).

У светлу резултата приказаних у табели 29 може се закључити да хемијска структура уведене фармакофоре битно утиче на DPPH антирадикалску активност. Увођењем метил групе на бензенски прстен (толилимино деривати) доприноси повећању у антирадикалске активности. Према врстама фармакофора може се констатовати следећи редослед раста активности: фенил < *p*-толил < *m*-толил < *o*-толил. Увођењем нитро групе на пара положај фенил групе у једињењу 65b (IC_{50} 371,6 μM), значајно увећава активност у односу на активност деривата са фенилимино фармакофором (61b) (IC_{50} 446,9 μM). Нитро група у мета положају бензенског прстена делује супротно, условљавајући да супстрат са *m*-нитрофенил фармакофором (66b) показује слабију активност (IC_{50} 498,7 μM) у поређењу са активношћу свог структурног изомера (65b), као и у односу на активност фенилимино деривата (61b).

У серији фенил супституисаних деривата (61c-64c) редослед активности расте следећим редом: *m*-толил < *p*-толил < *o*-толил < фенил, односно дериват са фениламино фармакофором (61c) показује најбољу антирадикалску активност (IC_{50}

34,1 μM), док дериват са *m*-толиламино фармакофором (66c) показује најслабију активност (IC_{50} 131,8 μM).

Слично правилностима уоченим код имино-4-хидроксикумарина, код нитрофениламино деривата, супстрат са *m*-нитрофенил фармакофором (66c, IC_{50} 40,9 μM) показује слабију активност у односу на *p*-нитрофенил структурни изомер (65c, IC_{50} 25,9 μM). Увођење бензил (67c), односно $-(\text{CH}_2)_4\text{COOH}$ фармакофоре (68c) на amino азот не доприноси повећању антирадикалске активности и таква једињења се одликују малим способностима за везивање радикала што се потврђује IC_{50} вредностима које износе 62,6 μM , односно 63,4 μM .

Представљени експериментални резултати антирадикалске активности синтетисаних деривата имино-4-хидроксикумарина и деривата amino-4-хидроксикумарина потпуно су у сагласности са публикованим литературним резултатима⁹ који се односе на структурно слична једињења из групе флавоноида и бензофенона. Основни структурни услов за антирадикалску активност испитиваних једињења је присуство функционалних група које су донори водоникових атома⁸².

У случају испитиваних деривата кумарина сва једињења имају OH групу на положају C-4 која је предуслов антирадикалске активности. Присуство ароматичног прстена такође има значајан ефекат који се огледа у стабилизацији путем делокализације неспареног електрона⁸². Такође, увођење још једне функционалне групе која је ефикасан донор водоника, као што је amino група, ствара предуслов за повећану антирадикалску активност деривата amino-4-хидроксикумарина која се огледа у реакцији DPPH са супстратом⁸³, односно чињеници да је број доступних водоника за редукцију DPPH радикала два пута већи код амина, у односу на имине.

3.2.3. Редуктивна активност деривата имино-4-хидроксикумарина (61b-68b) и деривата аминоксидо-4-хидроксикумарина (61c-68c)

Способност природних и синтетичких једињења да редукују Fe^{3+} јоне до Fe^{2+} јона представља значајну потврду антиоксидативне природе испитиваних једињења. Током редукције долази до промене боје раствора из жуте до различитих нијанси зелене, односно плаве боје, у зависности од редуктивне способности супстрата. Заправо, присуство редуктанта у раствору условљава редукцију Fe^{3+} /цијанидног једињења до феро облика, а количина насталог Fe^{2+} јона одређује се спектрофотометријски на 700 nm ⁶⁹. Резултати се дају као концентрација супстрата (RP_{50}) која за 50 % умањује полазну концентрацију Fe^{3+} јона. У табели 31 сумарно су приказани резултати RP_{50} вредности испитиваних деривата кумарина.

Табела 31. Редуктивна активност имино и аминокиселинских деривата 4-хидроксикумарина

Редуктивна способност RP_{50} (μM) [*]									
Имино деривати							Стандарди		
61b	62b	63b	64b	65b	66b	67b	68b	ВНТ	Asc
285,3±2,3	350,3±3,3	279,7±2,1	371,2±4,4	307,3±3,5	296,0±4,3	324,4±3,2	278,8±2,6	447,1±4,4	142,3±4,5
Амино деривати									
61c	62c	63c	64c	65c	66c	67c	68c		
435,7±4,7	365,1±2,3	428,1±3,3	293,4±4,3	338,2±4,4	310,5±3,3	255,6±3,3	279,5±2,2		

^{*} RP_{50} су средња вредност три експеримента

ВНТ - бутил хидроксил толуен

Asc - аскорбинска киселина

У светлу резултата приказаних у табели 31 може се констатовати да деривати имино-4-хидроксикумарина поседују већу редуктивну активност у односу на активност деривата амина-4-хидроксикумарина. Може се приметити да овај вид биохемијске активности битно зависи од хемијске структуре супституента на положају С-3 у молекулу 4-хидроксикумарина.

Редуктивна активност деривата имино-4-хидроксикумарина (*61b-68b*) се налази у опсегу од 278,8 μM до 350,3 μM .

Редуктивна активност деривата амина-4-хидроксикумарина (*61c-68c*) се налази у опсегу од 255,6 μM до 435,7 μM .

Једначине линеарне регресионе анализе из којих су изведене бројне вредности редуктивне активности сумарно су приказане у табели 32.

Табела 32. Резултати линеарне регресионе анализе за методу одређивања редуктивне активности

	једначина	грешка		Коефицијент корелације	Вреоватноћа <i>P</i>	Стандардна девијација <i>SD</i>	Број узетих тачака <i>N</i>	Изузете тачке
	$Y_i = A + B X_i$	<i>A</i>	<i>B</i>					
61b	$Y_i = -28,01 + 302,13 X_i$	32,22	72,73	0,90	0,01421	44,95	6	прве четири
62b	$Y_i = -11,76 + 299,67 X_i$	7,87	24,39	0,97	< 0,0001	19,17	10	0
63b	$Y_i = -3,34 + 149,43 X_i$	15,61	26,98	0,89	$5,49 \times 10^{-4}$	38,86	10	0
64b	$Y_i = -19,17 + 354,46 X_i$	5,03	17,39	0,99	< 0,0001	11,75	10	0
65b	$Y_i = -11,75 + 313,34 X_i$	8,94	29,11	0,97	< 0,0001	21,71	10	0
66b	$Y_i = -8,74 + 261,89 X_i$	10,49	29,38	0,95	< 0,0001	25,84	10	0
67b	$Y_i = -10,53 + 183,79 X_i$	10,49	20,34	0,95	< 0,0001	25,52	10	0
68b	$Y_i = -11,49 + 189,34 X_i$	13,88	28,12	0,92	$1,47 \times 10^{-4}$	33,08	10	0
61c	$Y_i = 4,06 + 111,91 X_i$	2,97	3,74	0,99	< 0,0001	8,05	10	0
62c	$Y_i = -10,59 + 73,62 X_i$	5,97	4,55	0,98	< 0,0001	14,71	10	0
63c	$Y_i = 0,41 + 78,86 X_i$	1,93	1,67	0,99	< 0,0001	5,11	10	0
64c	$Y_i = -14,17 + 62,67 X_i$	13,50	8,85	0,93	$1,04 \times 10^{-4}$	31,69	10	0
65c	$Y_i = -7,78 + 75,94 X_i$	5,64	4,51	0,99	< 0,0001	14,16	10	0
66c	$Y_i = -11,53 + 75,23 X_i$	9,05	7,08	0,98	< 0,0001	21,99	10	0
67c	$Y_i = -14,40 + 61,66 X_i$	18,29	12,16	0,87	$9,65 \times 10^{-4}$	41,62	10	0
68c	$Y_i = -14,25 + 69,94 X_i$	13,58	9,93	0,93	$1,08 \times 10^{-4}$	31,84	10	0

У групи деривата имино-4-хидроксикумарина једињење са $-(\text{CH}_2)_4\text{COOH}$ фармакофором (68b) показује најјачу редуктивну активност (RP_{50} 278,8 μM). Такође, једињења са фенил (61b), *m*-толил (63b), *p*-нитрофенил (65b) и *m*-нитрофенил (66b) фармакофорама показују јаку редуктивну активност са RP_{50} вредностима од 285,3 μM , 279,7 μM , 307,3 μM и 296,0 μM . Умерену редуктивну активност са RP_{50} од 324,4 μM има једињење са бензилимино фармакофором (67b), док малу редуктивну активност показују једињења са *p*-толилимино (65b) и *o*-толилимино (64b) фармакофорама чије RP_{50} вредности износе 350,3 μM и 371,2 μM .

Код деривата амина-4-хидроксикумарина најјачу редуктивну активност показује једињење са бензиламино фармакофором (67c, RP_{50} 255,6 μM). Једињења са фениламино (61c) и *m*-толиламино (66c) фармакофорама показују слабу редуктивну способност и RP_{50} вредности од 435,7 μM и 428,1 μM . Остали деривати амина-4-хидроксикумарина показују умерену редуктивну активност са RP_{50} вредностима у опсегу од 279,5 μM до 365,1 μM .

Може се закључити да испитивани деривати кумарина показују мању редуктивну активност у односу на аскорбинску киселину (RP_{50} 142,3 μM), али су активнији у поређењу са нивоом редуктивне активности бутил хидроксил толуена чија RP_{50} је 447,1 μM .

Анализом резултата приказаних у табели 31 може се закључити да редуктивна активност испитиваних кумаринских деривата зависи и од природа супституената који су везани за имино, односно амина азот. У серији фенил и толил супституисаних имиона (61b-64b) активност опада следећим редом: *m*-толил > фенил > *p*-толил > *o*-толил, односно увођење метил супституента на пара и орто положај бензенског прстена води ка слабљењу редуктивне активности. Слично, положај нитро групе на бензенском прстену условљава слабију активност *p*-нитрофенил изомера у односу на активност *m*-нитрофенил структурног изомера.

У серији фениламино и толиламино деривата (61c-64c) уочен је супротан ефекат супституције са метил групом у односу исти ефекат на одговарајуће имине (61b-64b). Редуктивна способност опада следећим редом: *o*-толил > *p*-толил > *m*-толил > фенил.

У случају синтетисаних кумарина са нитрофениламино фармакофором, *m*-нитрофениламино дериват (66c) показује већу активност у поређењу са активношћу *p*-нитрофениламино деривата (65c).

3.2.4. Инхибиција липидне пероксидације у присуству линолеинске киселине

Одређивањем инхибиције липидне пероксидације у емулзионом систему линолеинске киселине дефинише се антиоксидативна активност супстрата на нивоу ћелијске мембране. Пероксил радикали формирану у процесу липидне пероксидације оксидују Fe^{2+} јоне до Fe^{3+} јона, који са тиоцијанатним анјонима формирају комплексно једињење које даје максимумом апсорпције на 500 nm ⁷⁰. Дакле, инхибиција липидне пероксидације мери се непосредно преко количине фери јона у систему. Већа вредност апсорбанце, односно нижа вредност % инхибиције индикатор је високе концентрације пероксида насталих у периоду инкубације емулзије линолеинске киселине.

Вредности апсорбанце на 500 nm у одређеном временском интервалу, како код испитиваних једињења, тако и у случају стандарда, расту до максималне вредности у току 72 сата од почетка инкубације, а да затим до 96 сати вредности апсорбанце опадају (Табела 12). Разлог ових резултата је у чињеници да су настали хидропероксиди линолеинске киселине нестабилни и да временом прелазе у стабилније облике чиме се процес пероксидације прекида. Преглед резултата инхибиције липидне пероксидације испитиваних деривата кумарина сумарно је приказан у табели 33.

Табела 33. Инхибиција липидне пероксидације под утицајем деривата имино-4-хидроксикумарина и деривата аминок-4-хидроксикумарина*

	% Инхибиције липидне пероксидације* после 72 сата			
	1000 μ M	500 μ M	250 μ M	125 μ M
61b	74,5 \pm 1,1	50,5 \pm 1,8	38,5 \pm 2,1	36,6 \pm 2,3
62b	94,4 \pm 1,3	77,4 \pm 1,6	60,4 \pm 2,3	53,9 \pm 2,1
63b	88,6 \pm 2,1	75,4 \pm 1,4	46,2 \pm 2,1	29,9 \pm 2,4
64b	78,5 \pm 1,9	66,5 \pm 1,2	35,9 \pm 2,9	25,4 \pm 2,5
65b	81,3 \pm 1,5	73,4 \pm 1,1	55,8 \pm 3,5	43,6 \pm 2,5
66b	76,4 \pm 1,6	72,8 \pm 1,4	49,2 \pm 1,1	31,8 \pm 2,7
67b	63,2 \pm 1,4	52,9 \pm 1,5	39,3 \pm 1,4	30,8 \pm 3,5
68b	62,6 \pm 2,4	51,8 \pm 1,7	39,0 \pm 1,8	15,8 \pm 3,1
61c	57,6 \pm 2,2	34,9 \pm 1,7	25,6 \pm 2,7	17,9 \pm 1,5
62c	57,7 \pm 2,0	37,6 \pm 1,8	29,5 \pm 2,4	22,4 \pm 2,7
63c	59,4 \pm 2,5	31,5 \pm 1,5	21,5 \pm 2,3	15,9 \pm 2,4
64c	58,9 \pm 1,6	35,6 \pm 1,9	27,6 \pm 2,1	15,0 \pm 2,6
65c	67,8 \pm 1,7	47,5 \pm 2,1	29,7 \pm 1,5	20,9 \pm 1,7
66c	58,3 \pm 1,1	37,8 \pm 2,2	27,6 \pm 1,5	15,6 \pm 1,8
67c	60,3 \pm 1,1	48,7 \pm 2,0	27,2 \pm 1,3	18,1 \pm 2,0
68c	52,9 \pm 1,4	41,7 \pm 2,3	22,8 \pm 1,2	16,8 \pm 1,7
ВНТ	90,5 \pm 1,3	90,1 \pm 2,1	89,7 \pm 1,1	89,6 \pm 1,3
Asc	27,8 \pm 1,4	20,5 \pm 2,5	16,0 \pm 1,7	8,8 \pm 1,5
α-Тос	69,2 \pm 1,9	67,3 \pm 2,9	63,6 \pm 1,8	60,2 \pm 2,1

* средња вредност три експеримента

ВНТ - бутил хидроксил толуен;

Asc - аскорбинска киселина;

α -Тос - α -токоферол

На основу резултата приказаних у табели 33 може се закључити да испитивана једињења кумаринске структуре, у опсегу свих тестираних концентрација, инхибирају формирање пероксил радикала.

Деривати имино-4-хидроксикумарина (*61b-68b*) показују већу инхибиторску активност у односу на активност одговарајућих деривата аминоксидокумарина (*61c-68c*).

У групи деривата имино-4-хидроксикумарина највећу инхибиторску активност показује једињење са *p*-толилимино фармакофором (*62b*) при свим тестираним концентрацијама и за 1000 μM износи 94,4 %. Јаку активност показују и једињења са *m*-толил (*63b*) и *p*-нитрофенил (*65b*) фармакофорама која износи 88,6 %, односно 81,3 % (за 1000 μM). Слабу инхибиторну активност показују једињења са бензил (*83b*) и $-(\text{CH}_2)_4\text{COOH}$ (*68b*) фармакофорама која је 63,2 %, односно 62,6 % (за 1000 μM), док остала испитивана једињења имају степен инхибиције који се може охарактерисати као ниво средње активности.

Код деривата аминоксидокумарина само једињење са *p*-нитрофенил фармакофором (*65c*) при концентрацији од 1000 μM показује значајнију инхибиторску активност формирања пероксил радикала која износи 67,8 %. Остала једињења из ове групе, при тестираним концентрацијама, показују слабу активност.

Сви тестирани деривати имино-4-хидроксикумарина показују већу инхибицију липидне пероксидације у поређењу са активношћу аскорбинске киселине. При концентрацијама од 1000 μM и 500 μM синтетисани кумарински деривати (*62b-66b*) показују већу инхибицију липидне пероксидације у односу на α -токоферол. Преостала два имена, *67b* и *68b* показују слабију инхибиторску активност у односу на α -токоферол. Једињење са *p*-толил фармакофором (*62b*), при концентрацији од 1000 μM , показује већу активност (94,4 %) у поређењу са активношћу бутил хидроксил толуена (90,5 %). У осталим испитиваним узорцима деривата кумарина бутил хидроксил толуен показује већу активност.

У серији деривата аминоксидрокумарина само једињење са *p*-нитрофенил фармакофором (65c) при концентрацији од 1000 μ M показује инхибиторску активност приближно једнаку активности α -токоферола и износи 67,8 %.

Многи аутори повезују обим DPPH антирадикалске активности са предвиђањем обима инхибиције липидне пероксидације код природних и синтетичких једињења различите хемијске структуре^{84, 85}. Наши експериментални резултати нису у сагласности са овом констатацијом јер деривати аминоксидрокумарина показују јачу активност у односу на деривате аминоксидрокумарина. Амино деривати, мада имају два лако доступна водоника за терминацију насталих пероксил радикала су слабији супстрати у елиминацији насталих радикалских врста. Разлог томе је што су радикалске честице настале при липидној пероксидацији значајно реактивније⁸⁵ у односу на DPPH радикале и у том смислу се врши везивање водоника са киселе ОН групе бензопиранског језгра. Такође, како се одређивање инхибиције липидне пероксидације изводи у емулзионом систему линолеинске киселине, насупрот DPPH активности, која се прати у метанолско раствору, сасвим је очекивано да ће и већа липофилност аминоксидрокумарина у односу на аминоксидрокумарин диктирати њихову израженију активност.

3.2.5. Способност везивања ОН радикала

Хидроксил радикали се због своје високе реактивности сматрају једном од најтоксичнијих радикалских честица из групе реактивних кисеоничних врста. Одговорни су за оштећење ћелијских макромолекула као што су протеини, DNA и липиди ¹⁶.

Истраживања су утврдила везу између концентрације хидроксил радикала са количином других реактивних кисеоничних врста, односно констатовано је да настају из њих (примера ради Фентон-ова реакција) уз учешће металних јона као што су Fe^{2+} и Cu^{+} .

Висока реактивност хидроксил радикала условљава врло кратко полувреме живота (свега 10^{-9} s), чиме се њихово дејство ограничава на врло мали простор у односу на место где су настали. Како је формирање ових високо реактивних врста везано за јоне метала, то ће и њихова локација одређивати места слободно радикалског оштећења ћелије.

Принцип методе одређивања антиоксидативне активности према хидроксил радикалима се заснива на конкуренцији дезоксирибозе и тестираног супстрата према хидроксил радикалима насталим у Фентоновој реакцији, односно систему Fe^{3+} /аскорбинска киселина/EDTA. У зависности од концентрације и способности антиоксиданта да елиминише хидроксил радикале, врши се превођење дезоксирибозе на мање фрагменте, који при ниској рН вредности и при загревању на воденом купатилу, реагују са тиобарбитурном киселином, формирајући једињења љубичасте боје са максимумом апсорпције на 532 nm ⁷¹. Експериментални резултати се представљају као проценат инхибиције деградације дезоксирибозе или као IC₅₀ вредности у односу на аскорбинску киселину као стандард. У табели 34 сумарно су приказани резултати који указују на способност тестираних деривата имино-4-хидроксикумарина и деривата аминоксидо-4-хидроксикумарина да везују реактивне хидроксил радикале.

Добивени експериментални резултати укључени су у линеарну регресиону анализу а бројне вредности сумарно су приказане у табели 35.

Табела 34. Инхибиција формирања хидроксил радикала у присуству деривата имино-4-хидроксикумарина и деривата аминоксидо-4-хидроксикумарина

ОН антирадикалска активност IC ₅₀ (μM)*								
Имино деривати								Стандард
61b	62b	63b	64b	65b	66b	67b	68b	Asc
15,9±1,3	13,5±1,5	13,7±1,7	14,1±1,3	12,3±1,6	12,2±2,4	17,3±2,1	18,9±1,8	19,0±2,3
Амино деривати								
61c	62c	63c	64c	65c	66c	67c	68c	
6,2±2,1	7,8±1,3	9,7±1,9	8,5±1,2	4,1±1,9	5,7±2,2	6,0±1,8	7,8±1,5	

*IC₅₀ је средња вредност три мерења
Asc - аскорбинска киселина

Табела 35. Резултати линеарне регресионе анализе за ОН антирадикалску методу

	једначина	грешка		Коефицијент корелације	Вреоватноћа	Стандардна девијација	Број узетих тачака	Изузете тачке
	$Y_i = A + B X_i$	A	B	R	P	SD	N	
61b	$Y_i = -72,80 + 1,54 X_i$	19,21	0,32	0,91	0,00483	10,34	7	0
62b	$Y_i = -67,54 + 1,43 X_i$	16,41	0,27	0,92	0,00313	9,50	7	0
63b	$Y_i = -71,33 + 1,51 X_i$	18,64	0,31	0,91	0,00455	10,22	7	0
64b	$Y_i = -68,43 + 1,45 X_i$	17,21	0,28	0,92	0,00369	9,81	7	0
65b	$Y_i = -67,01 + 1,42 X_i$	15,26	0,25	0,93	0,00233	8,97	7	0
66b	$Y_i = -68,34 + 1,45 X_i$	15,93	0,26	0,93	0,00264	9,19	7	0
67b	$Y_i = -73,71 + 1,57 X_i$	19,57	0,33	0,91	0,00502	10,42	7	0
68b	$Y_i = -72,44 + 1,56 X_i$	18,47	0,31	0,91	0,00415	10,04	7	0
61c	$Y_i = -65,28 + 1,34 X_i$	15,58	0,24	0,93	0,00278	9,29	7	0
62c	$Y_i = -68,48 + 1,42 X_i$	17,44	0,28	0,98	0,0039	9,92	7	0
63c	$Y_i = -66,01 + 1,38 X_i$	20,99	0,34	0,87	0,00952	11,79	7	0
64c	$Y_i = -65,99 + 1,37 X_i$	19,55	0,31	0,89	0,00712	11,15	7	0
65c	$Y_i = -60,71 + 1,24 X_i$	15,94	0,25	0,91	0,0039	9,92	7	0
66c	$Y_i = -61,18 + 1,26 X_i$	16,70	0,26	0,91	0,00465	10,26	7	0
67c	$Y_i = -64,15 + 1,32 X_i$	16,87	0,26	0,91	0,00417	10,05	7	0
68c	$Y_i = -62,64 + 1,30 X_i$	21,38	0,34	0,86	0,01199	12,32	7	0

На основу резултата приказаних у табели 34 констатује се да деривати аминоксидо-4-хидроксикумарина (61c-68c) представљају јаче инхибиторе формирања ОН радикала у односу на деривате иминоксидо-4-хидроксикумарина (61b-68b).

IC₅₀ вредности за серију деривата иминоксидо-4-хидроксикумарина (61b-68b) су у интервалу од 12,2 μМ до 18,9 μМ.

Концентрације деривата аминоксидо-4-хидроксикумарина (61c-68c) потребне за 50 % инхибицију ОН радикала налазе се у интервалу од 4,1 μМ до 9,7 μМ.

У серији деривата иминоксидо-4-хидроксикумарина (61b-68b) највећу активност показује једињење са *m*-нитрофенил (66b) и *p*-нитрофенил (65b) фармакофорама чије IC₅₀ вредности су 12,2 μМ и 12,3 μМ. Јака ОН антирадикалска активност је уочена и код сва три толилимино супстрата (62b-64b) са IC₅₀ вредностима од 13,5 μМ, 13,7 μМ и 14,1 μМ. Једињење са фенилимино фармакофором (61b) при IC₅₀ вредности од 15,9 μМ показује средњу активност, док једињење са бензил (67b) и -(CH₂)₄COOH (68b) фармакофорама показују слабу активност чије IC₅₀ вредности су 17,3 μМ и 18,9 μМ.

У серији деривата аминоксидо-4-хидроксикумарина (61c-68c) једињење са *p*-нитрофенил фармакофором (65c) показује највећу антиоксидантну активност чија IC₅₀ износи 4,1 μМ. Средњи ниво активности је забележен код једињења са фенил (61c), *m*-нитрофенил (66c) и бензил (67c) фармакофорама чије IC₅₀ вредности су: 6,2 μМ, 5,7 μМ и 6,0 μМ. Остала једињења имају IC₅₀ вредности у опсегу од 7,8 μМ до 9,7 μМ што указује на слабу активност.

У компарацији са аскорбинском киселином као стандардом чија IC₅₀ износи 19,0 μМ сви тестирани кумарини поседују већу активност.

Увођење метил групе на бензенски прстен води повећању активности, с тим што антиоксидативна активност зависи и од типа супституције и природе супституента на бензенском прстену. У групи фенил и толилимино деривата (61b-64b) активност опада следећим редом: *p* > *m* > *o* > фенил. У групи фенил и толиламино деривата (61c-64c) увођење метил супституента на бензенски прстен условљава слабљење активности и она опада следећим редом: фенил > *o* > *p* > *m*. Везивање нитро групе на

бензенски прстен за резултат има повећање активности и за имино и за аминоксиде.

Презентовани резултати показују да промена имино групе у аминоксиде доприноси добијању супстрата са већом ОН антирадикалском активношћу, што је у сагласности са чињеницом да се добијају једињења која имају један водоников атом више расположив за реакцију са хидроксил радикалом.

Такође, хидроксил радикали су значајно реактивнији (брзина реакције је ограничена процесом дифузије) у односу на DPPH радикале, односно хидропероксил радикале настале при процесу липидне пероксидације, те је очекивано да су концентрације потребне за елиминацију 50 % хидроксил радикала насталих у Фентоновој реакцији ниже и не могу се компарирати са резултатима ова два експеримента.

3.3. Антимикробна активност нових деривата 4-хидроксикумарина

3.3.1. Антибактеријска активност 2-аминотиазолинских деривата 4-хидроксикумарина (49c-59c) у *in vitro* условима

Антибактеријска активност (МИС у $\mu\text{g/mL}$) синтетисаних 2-аминотиазолинских деривата 4-хидроксикумарина је одређена макродилуционом методом уз визуелну детекцију бактеријских спора на основу замућења. У експерименту је испитивана антибактеријска активност на десет бактерија (грам позитивне: *Bacillus mycoides* (FAB B1), *Bacillus subtilis* (FAB B2) и *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923); грам негативне: *Agrobacterium tumefaciens* (FAB 231), *Enterobacter cloacae* (FAB 22), *Erwinia carotovora* (FAB 73), *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Klebsiella pneumoniae* (FAB 26), *Pseudomonas fluorescens* (FAB 097) и *Pseudomonas glycinea* (FAB 111)).

Резултати антибактеријске активности испитиваних деривата кумарина у односу на стандард стрептомицин приказани су у табели 36 и показују да испитивана једињења показују мањи ниво активности у односу на стандард. Антибактеријска активност тестираних кумаринских супстрата је у опсегу МИС вредности од 31,25 $\mu\text{g/mL}$ до 500 $\mu\text{g/mL}$.

Табела 36. Антибактеријска активност 2-аминотиазолинских деривата 4-хидроксикумарина

Бактерија	МИС вредности тестираних једињења ($\mu\text{g/mL}$)											S*
	49c	50c	51c	52c	53c	54c	55c	56c	57c	58c	59c	
Грам +												
<i>B. mycoides</i>	62,5	62,5	62,5	125	62,5	62,5	62,5	62,5	62,5	31,25	62,5	7,81
<i>B. subtilis</i>	62,5	62,5	62,5	125	62,5	62,5	62,5	62,5	62,5	31,25	62,5	7,81
<i>S. aureus</i>	125	62,5	125	125	62,5	62,5	250	250	250	31,25	125	31,25
Грам -												
<i>A. tumefaciens</i>	62,5	62,5	62,5	125	62,5	62,5	62,5	62,5	250	31,25	62,5	7,81
<i>E. cloacae</i>	125	62,5	62,5	125	62,5	62,5	62,5	62,5	62,5	62,5	62,5	1,95
<i>E. carotovora</i>	62,5	62,5	62,5	125	62,5	62,5	62,5	62,5	250	31,25	62,5	7,81
<i>E. coli</i>	125	125	500	62,5	62,5	125	125	125	250	62,5	125	31,25
<i>K. pneumoniae</i>	62,5	62,5	62,5	125	62,5	62,5	62,5	62,5	62,5	31,25	62,5	1,95
<i>P. fluorescens</i>	62,5	62,5	62,5	125	62,5	31,25	62,5	62,5	31,25	125	62,5	7,81
<i>P. glycinea</i>	62,5	62,5	62,5	62,5	62,5	31,25	62,5	62,5	31,25	62,5	62,5	7,81

*S Стрептомицин

Највећа активност је констатована код једињења са *m*-нитрофенил фармакофором (58c) при концентрацији од 31,25 µg/mL према бактерији *S. aureus*, која је на нивоу активности стрептомицина исте концентрације. Једињења са метил (50c), -C₆H₄SO₃H (53c) и *m*-толил (54c) фармакофорама су активна на *S. aureus* у присуству дупло веће концентрације. Јака активност је уочена и код једињења са -C₆H₄SO₃H (53c) и *m*-нитрофенил (58c) фармакофорама (МИС 62,5 µg/mL) према бактерији *E. coli*, показујући за 50 % слабију активност у поређењу са активношћу стрептомицина. Према осталим дериватима кумарина испитиване бактерије су резистентне.

У светлу резултата датих у табели 36 констатује се да антибактеријска активност синтетисаних кумарина зависи од природе супституента везаног за аминотиазолински део молекула.

Највећа активност се постиже увођењем *m*-нитрофенил фармакофоре. При концентрацији од 31,25 µg/mL једињење 73c инхибира раст бактерија *B. mycoides*, *B. subtilis*, *S. aureus*, *A. tumefaciens*, *E. carotovora* и *K. pneumoniae*. При истој МИС вредности супстрати са *m*-толил (69c) и *o*-толил (72c) фармакофорама инхибирају раст бактерија *P. fluorescens* и *P. glycinea*.

Најслабија активност (МИС 500 µg/mL) је забележена у случају деривата 4-хидрокси бензојеве киселине (51c) према бактерији *E. coli*. Такође, једињења 55c, 56c и 57c као деривати *n*-пентанске киселине, *o*-толил амина и диетил амина показују слабу активност према бактерији *S. aureus* (МИС вредности су 250 µg/mL). При истој концентрацији, једињење са *o*-толил фармакофором (57c) инхибира раст бактерија *S. aureus*, *A. tumefaciens*, *E. carotovora* и *E. coli*.

Вредности МИС од 62,5 µg/mL су доминантне за преостала испитивана једињења са различитим функционалним групама. Нема литературних података који би указивали на молекулски ниво антибактеријске активности синтетисаних 2-аминотиазолинских деривата 4-хидроксикумарина.

3.3.2. Антифунгална активност 2-аминотиазолинских деривата

4-хидроксикумарина (49c-59c) у *in vitro* условима

Антифунгална активност синтетисаних 2-аминотиазолинских деривата 4-хидроксикумарина је одређена применом макродилуционе методе уз визуелно праћење појаве замућења (након 72 часа) као констатације присуства фунгалних спора. Антифунгална активност је одређена на једанаест врста гљива (*Ampelomyces quisqualis* (DBFS 90), *Aspergillus flavus* (ATCC 9170), *Aspergillus fumigatus* (DBFS 310), *Botrytis cinerea* (DBFS 133), *Candida albicans* (ATCC 10259), *Fusarium oxysporum* (DBFS 292), *Fusarium solani* (DBFS 112), *Mucor mucedo* (ATCC 52568), *Paecilomyces variotii* (ATCC 22319), *Penicillium perpureum* (DBFS 418), *Penicillium verrucosum* (DBFS 262) и *Trichoderma harzianum* (DBFS 379)), а резултати су представљени у табели 37.

Табела 37. Антифунгална активност 2-аминотиазолинских деривата 4-хидроксикумарина

Гљива	МИС вредности тестираних једињења ($\mu\text{g/mL}$)											
	49c	50c	51c	52c	53c	54c	55c	56c	57c	58c	59c	К*
<i>A. quisquialis</i>	62,5	31,25	125	125	62,5	62,5	125	62,5	125	31,25	62,5	3,9
<i>A. flavus</i>	125	62,5	62,5	62,5	62,5	62,5	125	62,5	62,5	62,5	62,5	3,9
<i>A. fumigatus</i>	125	62,5	62,5	62,5	62,5	62,5	125	62,5	62,5	62,5	62,5	3,9
<i>B. cinerea</i>	62,5	31,25	62,5	62,5	62,5	31,25	62,5	62,5	62,5	62,5	62,5	1,95
<i>C. albicans</i>	62,5	31,25	62,5	62,5	62,5	31,25	62,5	31,25	125	31,25	62,5	1,95
<i>F. oxysporum</i>	62,5	31,25	125	62,5	62,5	62,5	62,5	62,5	62,5	31,25	62,5	3,9
<i>F. solani</i>	62,5	62,5	125	125	62,5	62,5	62,5	62,5	62,5	62,5	62,5	3,9
<i>M.ucedo</i>	62,5	31,25	125	125	62,5	31,25	125	62,5	62,5	31,25	62,5	31,25
<i>P. variotii</i>	62,5	31,25	62,5	125	62,5	62,5	62,5	31,25	62,5	31,25	62,5	1,95
<i>P.purpurescens</i>	62,5	31,25	125	62,5	62,5	62,5	125	62,5	62,5	31,25	62,5	3,9
<i>P. verrucosum</i>	62,5	31,25	62,5	62,5	62,5	62,5	62,5	62,5	62,5	31,25	62,5	3,9
<i>T. harsianum</i>	62,5	31,25	62,5	125	62,5	62,5	125	62,5	62,5	31,25	62,5	7,8

*К Кетоконазол

Антифунгална активност испитиваних деривата кумарина је у опсегу концетрација од 31,25 µg/mL до 125 µg/mL. Као и у случају антибактеријске активности, и антифунгална активност 2-аминотиазолинских деривата је нижа у односу на стандард кетоконазол.

Висок ниво антифунгалне активности, еквивалентан стандарду, измерен је код једињења са метил (50c), *m*-толил (54c) и *m*-нитрофенил (58c) фармакофорама према гљиви *M. mucedo* и МИС вредности су 31,25 µg/mL, док су све испитиване гљиве резистентне према осталим дериватима кумарина као потенцијалним антифунгалним једињењима.

Сагласно наведеним резултатима (Табела 37) може се констатовати да хемијска структура функционалне групе на аминотиазолинском делу молекула је одговорна за ниво антифунгалне активности тестираних деривата кумарина.

Увођењем метил, односно *m*-нитрофенил фармакофоре добијају се супстрати 50c и 58c који показују висок ниво активности. При концетрацији од 31,25 µg/mL једињење 50c инхибира раст гљива: *A. quisqualis*, *C. albicans*, *F. oxysporum*, *M. mucedo*, *P. variotii*, *P. purpurescens*, *P. verrucosum* и *T. harsianum*. При истој МИС вредности једињење 58c инхибира раст гљива *B. cinerea*, *C. albicans*, *F. oxysporum*, *M. mucedo*, *P. variotii*, *P. purpurescens*, *P. verrucosum* и *T. harsianum*. Једињење са *m*-толил фармакофором (54c) при концетрацији од 31,25 µg/mL инхибира раст гљива: *B. cinerea*, *C. albicans* и *M. mucedo*.

Низак ниво активности констатован је у случају једињења са *p*-нитрофенил фармакофором (52c) које при МИС вредности од 125 µg/mL инхибира раст гљива *A. quisqualis*, *F. solani*, *M. mucedo*, *P. variotii* и *T. harsianum*.

Вредности МИС од 62,5 µg/mL су доминантне за преостала испитивана једињења са различитим функционалним групама. Нема литературних података који би указивали на молекулски ниво антифунгалне активности синтетисаних 2-аминотиазолинских деривата 4-хидроксикумарина.

3.3.3. Антибактеријска активност деривата имино-4-хидроксикумарина и деривата аминок-4-хидроксикумарина (61b-68b, 61c-68c) у *in vitro* условима

Антибактеријска активност (MIC у $\mu\text{g/mL}$) имино-4-хидроксикумарина и деривата аминок-4-хидроксикумарина је одређена применом микродилуционе методе, уз визуелну детекцију бактеријских спора употребом ресазурина као индикатора и промене боје из плаве у љубичасту, односно црвену. У експеримент је укључено 13 врста бактерија, од којих су пет грам позитивне (*Bacillus mycoides* (FSB 1), *Bacillus subtilis* (FSB 2), *Micrococcus lysodeikticus* (ATCC 4698), *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) и *Staphylococcus aureus* (FSB 30)), а преосталих осам грам негативне (*Azotobacter chroococcum* (FSB 14), *Enterobacter cloacae* (FSB 22), *Erwinia carotovora* (FSB 31), *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Klebsiella pneumoniae* (FSB 26), *Pseudomonas fluorescens* (FSB 28), *Pseudomonas glycinea* (FSB 40) и *Pseudomonas phaseolicola* (FSB 29)).

Резултати антимикуробне активности испитиваних деривата кумарина сумарно су приказани у табели 38 и показују да сва тестирана једињења показују антибактеријску активност.

Табела 38. Антибактеријска активност деривата имино-4-хидроксикумарина и деривата аминок-4-хидроксикумарина

	МИС вредности тестираних једињења ($\mu\text{g/mL}$)												
	бактерија												
	Грам +					Грам -							
	<i>B.m.</i>	<i>B.s.</i>	<i>M.l.</i>	<i>S.a.</i>	<i>S.a.(i)</i>	<i>A.c.</i>	<i>En.cl.</i>	<i>Er.ca.</i>	<i>Es.co.</i>	<i>K.p.</i>	<i>P.fl.</i>	<i>P.gl.</i>	<i>P.ph.</i>
61b	31,25	62,5	62,5	62,5	62,5	125	62,5	125	62,5	15,6	62,5	62,5	62,5
62b	125	125	125	125	62,5	62,5	62,5	125	62,5	31,25	62,5	31,25	62,5
63b	31,25	62,5	62,5	62,5	31,25	62,5	62,5	62,5	62,5	31,25	62,5	62,5	62,5
64b	62,5	31,25	62,5	62,5	125	62,5	125	62,5	62,5	15,6	62,5	31,25	62,5
65b	62,5	15,6	125	62,5	31,25	31,25	62,5	31,25	125	15,6	62,5	31,25	125
66b	62,5	62,5	62,5	125	62,5	62,5	62,5	62,5	125	7,8	125	31,25	125
67b	62,5	31,25	62,5	125	31,25	125	125	31,25	31,25	15,6	62,5	15,6	31,25
68b	31,25	31,25	31,25	125	62,5	31,25	125	62,5	31,25	31,25	62,5	62,5	31,25
61c	15,6	7,8	3,9	3,9	7,8	3,9	3,9	7,8	7,8	7,8	3,9	7,8	62,5
62c	7,8	7,8	3,9	3,9	7,8	3,9	3,9	7,8	7,8	7,8	3,9	7,8	31,25
63c	15,6	15,6	3,9	7,8	7,8	7,8	3,9	3,9	7,8	7,8	3,9	7,8	31,25
64c	62,5	62,5	3,9	15,6	7,8	7,8	3,9	3,9	7,8	15,6	3,9	7,8	62,5
65c	15,6	31,25	3,9	15,6	15,6	3,9	7,8	7,8	7,8	7,8	3,9	7,8	15,6
66c	15,6	7,8	3,9	31,25	15,6	3,9	7,8	7,8	15,6	15,6	7,8	15,6	7,8
67c	15,6	31,25	3,9	3,9	3,9	7,8	7,8	7,8	31,25	7,8	3,9	7,8	15,6
68c	7,8	7,8	7,8	3,9	3,9	7,8	7,8	7,8	15,6	7,8	3,9	7,8	7,8
S*	7,8	7,8	1,95	15,6	7,8	7,8	1,95	7,8	31,25	1,95	7,8	7,8	3,9

*S Стрептомицин; *B.m.*-*Bacillus mycoides* (FSB 1); *B.s.*-*Bacillus subtilis* (FSB 2); *M.l.*-*Micrococcus lysodeikticus* (ATCC 4698); *S.a.*-*Staphylococcus aureus* (ATCC 25923); *S.a.(i)*-*Staphylococcus aureus* (FSB 30); *A.c.*-*Azotobacter chroococcum* (FSB 14); *En.cl.*-*Enterobacter cloacae* (FSB 22); *Er.ca.*-*Erwinia carotovora* (FSB 31); *Es.co.*-*Escherichia coli* (ATCC 25922); *K.p.*-*Klebsiella pneumoniae* (FSB 26); *P.fl.*-*Pseudomonas fluorescens* (FSB 28); *P.gl.*-*Pseudomonas glycinea* (FSB 40); *P.ph.*-*Pseudomonas phaseolicola* (FSB 29).

МИС вредности деривата имино-4-хидроксикумарина (61b-68b) се налазе у опсегу од 7,8 µg/mL до 125 µg/mL.

МИС вредности деривата аминоксидо-4-хидроксикумарина (61c-68c) се налазе у опсегу од 3,9 µg/mL до 62,5 µg/mL.

Деривати аминоксидо-4-хидроксикумарина показују већи ниво антибактеријске активности у поређењу са дериватима имино-4-хидроксикумарина.

У серији имино највећу антибактеријску активност показују једињења са бензил (67b) и $-(\text{CH}_2)_4\text{COOH}$ (68b) фармакофором. При МИС вредности која истовремено одговара стандарду, од 31,25 µg/mL, активна су према *E. coli*. Такође, висок ниво активности (50 % вредности стандарда) према *E. coli* показују и једињења са фенил и толил фармакофорама (61b-64b).

Испитиване бактерије су у доброј мери резистентне на присуство осталих испитиваних деривата имино-4-хидроксикумарина.

Из серије деривата аминоксидо-4-хидроксикумарина највећу активност показује једињење са фенил, толил и *p*-нитрофенил фармакофорама (61c-65c) и са МИС вредности од 7,8 µg/mL је четири пута активнији према *E. coli* у односу на примењени стандард. Такође, при концентracији од 3,9 µg/mL једињења са фенил (61c), *p*-толил (62c), бензил (67c) и $-(\text{CH}_2)_4\text{COOH}$ (68c) фармакофорама делују антибактеријски на *S. aureus* (ATCC 25923), показујући четири пута већу активност у поређењу са активношћу стрептомицина (МИС 15,6 µg/mL).

Једињење са *o*-толил фармакофором (64c) чија МИС износи 62,5 µg/mL показује слабу антибактеријску активност према *B. mycoides*, *B. subtilis*, *K. pneumoniae* и *P. phaseolicola*.

Вредности МИС испитиваних деривата кумарина према тест бактеријама варирају у зависности од природе супституента на имино, односно аминоксид азоту.

Јака инхибицију бактеријског раста показује једињење са бензил фармакофором (67b). При концентracији једињења 67b од 15,6 µg/mL инхибира се раст *K. pneumoniae* и *P. glycinea*, а при МИС од 31,25 µg/mL инхибира се раст *B. subtilis*, *S. aureus* (FSB 30), *E. carotovora*, *E. coli* и *P. phaseolicola*. Такође, јака активност је уочена и код

једињења са $-(\text{CH}_2)_4\text{COOH}$ фармакофором (68b), које при МИС од 31,25 $\mu\text{g/mL}$ делује антибактеријски на *B. mycooides*, *B. subtilis*, *M. lysodeikticus*, *A. chroococcum*, *E. coli*, *K. pneumoniae* и *P. phaseolicola*. Код преосталих испитиваних деривата кумарина са различитим функционалним групама на азоту имино групе констатован је низак ниво активности.

Трансформација имино групе у amino групу за резултат има значајно увећање антибактеријске активности. Изузетак је констатован само у случају једињења са *m*-толил (63c) и *o*-толил (64c) фармакофорама према *B. mycooides*, будући да одговарајући имици имају већу активност.

Једињења са *m*-толил (62c) и $-(\text{CH}_2)_4\text{COOH}$ (68c) фармакофором поседују највећу активност. Изузев према *P. phaseolicola* (за супстрат 62c), односно према *E. coli* (за супстрат 68c), МИС вредност код осталих бактерија је у опсегу од 3,9 $\mu\text{g/mL}$ до 7,8 $\mu\text{g/mL}$.

Најслабија активност је забележена у случају једињења са *o*-толил фармакофором (64c), јер се тек при концентрацији од 62,5 $\mu\text{g/mL}$ инхибира раст бактерија *B. mycooides*, *B. subtilis* и *P. phaseolicola*.

Нема литературних података који би указивали на молекулски ниво антибактеријске активности деривата имино-4-хидроксикумарина и деривата amino-4-хидроксикумарина.

3.3.4. Антифунгална активност деривата имино-4-хидроксикумарина и деривата аминок-4-хидроксикумарина (61b-68b, 61c-68c) у *in vitro* условима

Антифунгална активност (MIC у $\mu\text{g/mL}$) деривата имино-4-хидроксикумарина и деривата аминок-4-хидроксикумарина (61b-68b, 61c-68c) је одређена применом микродилуционе методе уз визуелну детекцију фунгалног раста степеном замућења у линији јамица. У експерименту је праћена антифунгална активност кумаринских једињења на осам врста гљива (*Aspergillus glaucus* (FSB 32), *Aspergillus niger* (FSB 31), *Candida albicans* (ATCC 10259), *Fusarium oxysporum* (FSB 91), *Penicillium verrucosum* (FSB 21), *Trichoderma longibrachiatum* (FSB 13), *Trichoderma harzianum* (FSB 12) и *Trichoderma viride* (FSB 11)).

Резултати антифунгалне активности деривата имино-4-хидроксикумарина и деривата аминок-4-хидроксикумарина сумарно су приказани у табели 39 и показују да сва тестирана једињења показују антифунгалну активност.

Табела 39. Антифунгална активност деривата имино-4-хидроксикумарина и деривата аминок-4-хидроксикумарина

	МИС вредности тестираних једињења ($\mu\text{g/mL}$)							
	ГЉИВА							
	<i>A.gl.</i>	<i>A.n.</i>	<i>C.a.</i>	<i>F.o.</i>	<i>P.ve.</i>	<i>T.l.</i>	<i>T.h.</i>	<i>T.v.</i>
61b	62,5	125	31,25	31,25	62,5	31,25	31,25	31,25
62b	62,5	125	31,25	62,5	62,5	31,25	125	125
63b	62,5	125	31,25	62,5	62,5	31,25	62,5	31,25
64b	125	31,25	31,25	125	31,25	31,25	31,25	31,25
65b	31,25	31,25	125	125	62,5	62,5	62,5	62,5
66b	62,5	31,25	125	125	31,25	62,5	62,5	31,25
67b	31,25	125	31,25	62,5	62,5	31,25	62,5	31,25
68b	31,25	62,5	31,25	62,5	62,5	31,25	125	125
61c	62,5	125	125	125	125	62,5	62,5	125
62c	125	125	125	62,5	125	62,5	62,5	125
63c	62,5	125	125	62,5	125	62,5	62,5	62,5
64c	125	250	250	125	125	62,5	62,5	62,5
65c	62,5	62,5	62,5	62,5	62,5	125	125	62,5
66c	62,5	125	62,5	125	125	125	125	125
67c	62,5	250	62,5	125	62,5	250	125	62,5
68c	62,5	250	125	250	125	250	125	62,5
K*	7,8	7,8	1,95	3,9	3,9	7,8	7,8	7,8

K* Кетоконазол; *A.gl.*-*Aspergillus glaucus* (FSB 32); *A.n.*-*Aspergillus niger* (FSB 31); *C.a.*-*Candida albicans* (ATCC 10259); *F.o.*-*Fusarium oxysporum* (FSB 91); *P.ve.*-*Penicillium verrucosum* (FSB 21); *T.l.*-*Trichoderma longibrachiatum* (FSB 13); *Trichoderma harzianum* (FSB 12); *T.v.*-*Trichoderma viride* (FSB 11).

МИС вредности за деривате имино-4-хидроксикумарина (*61b-68b*) се налазе у опсегу од 31,25 µg/mL до 125 µg/mL.

МИС вредности за деривате аминок-4-хидроксикумарина (*61c-68c*) се налазе у опсегу од 62,5 µg/mL до 250 µg/mL.

Генерално гледано, једињења *61b-68b* показују већу активност у поређењу са активношћу једињења *61c-68c*, уз констатацију да ни један од тестираних кумарина не поседује активност на нивоу активности стандарда за упоређивање.

Према вредностима МИС тестираних једињења укључених у испитивање антифунгалне активности може се констатовати да тај вид активности првенствено зависи од хемијске структуре супституента на имино, односно аминок азоту.

Највећу активност показује једињење са *o*-толил фармакофором (*64b*). При концентрацији од 31,25 µg/mL инхибира раст шест од осам гљива, односно *A. niger*, *C. albicans*, *P. verrucosum*, *T. longibrachiatum*, *T. harzianum* и *T. viride*. Увођењем фенил групе на аминок азот, једињење *61b*, са МИС вредности од 31,25 µg/mL инхибира раст *C. albicans*, *T. longibrachiatum*, *T. harzianum* и *T. viride*. Такође, при истој концентрацији једињење са бензил фармакофором (*67b*) инхибира раст гљива *A. glaucus*, *C. albicans*, *T. longibrachiatum* и *T. viride*.

Најслабију активност показује једињење са *p*-толил фармакофором (*62b*) које инхибира развој гљива *A. niger*, *T. harzianum* и *T. viride* при концентрацији од 125 µg/mL.

Антифунгална активност деривата аминок-4-хидроксикумарина (*61c-68c*) према тест гљивама је прилично слаба и неупоредива са активношћу кетоконазола.

Једињење са *p*-нитрофенил фармакофором (*65c*) показује највећу активност. При концентрацији од 62,5 µg/mL делује антифунгално на шест од осам тест гљива. У поређењу са активношћу кетоконазола (МИС 7,8 µg/mL), једињење *65c* показује осам пута слабију активност (МИС 62,5 µg/mL) према гљивама *A. glaucus*, *A. niger* и *T. viride*, а према *F. oxysporum* и *P. verrucosum* показује шеснаест пута слабију активност (МИС 62,5 µg/mL), у поређењу са активношћу кетоконазола (МИС 3,9 µg/mL).

Најслабију активност и вредност МИС од 250 $\mu\text{g/mL}$ показује једињење са $-(\text{CH}_2)_4\text{COOH}$ фармакофором (68c) према гљивама *A. niger*, *F. oxysporum* и *T. longibrachiatum*.

Нема литературних података који би указивали на молекулски ниво антифунгалне активности синтетисаних деривата имино-4-хидроксикумарина и деривата аминоксидо-4-хидроксикумарина.

3.4. *In vitro* антикоагулантна активност деривата имино-4-хидроксикумарина и деривата аминоксидо-4-хидроксикумарина (61b-68b, 61c-68c)

Протромбинско време тестираних кумаринских једињења је одређено модификованом методом по Квику⁷⁷.

У систем хумана плазма-кумарински дериват одређене концентрације, додају се јони калцијума и претходно активирани ензим *trombokinaza*. За протромбинско време се узима време од момента додатка ензима до тренутка визуелне детекције формирања коагулума.

У табели 40 су приказани резултати коагулације хумане плазме у присуству испитиваних кумаринских деривата, оралних кумаринских антикоагуланата варфарина и аценокумарола као стандарда и хумане плазме без додатка антикоагулатна.

Табела 40. *In vitro* антикоагулантна активност деривата имино-4-хидроксикумарина и деривата аминокс-4-хидроксикумарина

Протромбинско време (РТ) имино деривата 4-хидроксикумарина у секундама *										
61b	62b	63b	64b	65b	66b	67b	68b	W	Ac	C
20±0,3	21±0,2	22±0,3	18±0,4	22±0,3	18±0,1	16±0,1	27±0,3	18±0,3	26±0,1	12±0,2
Протромбинско време (РТ) аминокс деривата 4-хидроксикумарина у секундама *										
61c	62c	63c	64c	65c	66c	67c	68c	W	Ac	C
21±0,4	20±0,2	22±0,2	23±0,2	23±0,3	20±0,1	23±0,2	20±0,1	18±0,4	26±0,1	12±0,2

⁺резултати су средња вредност три експеримента

W-варфарин

Ac-аценокумарол

C-без стандардног једињења односно кумаринског супстрата

Експериментални резултати показују да сва тестирана једињења показују антикоагулантну активност.

На основу табеларно презентованих резултата може се видети да стандардна хумана плазма има време коагулације од 12 секунди, док системи хумане плазме и тестираног кумаринског једињења показују знатно дуже време формирања фибрина, које се налази у интервалу од 16 секунди до 27 секунди за деривате имино-4-хидроксикумарина (61b-68b) и 20 секунди до 23 секунде за деривате аминоксид-4-хидроксикумарина (61c-68c). Време коагулације варфарина је 18 секунди, а аценокумарола 26 секунди.

У серији деривата имино-4-хидроксикумарина (61b-68b) највећу активност показује једињење које има фармакофору типа $-(\text{CH}_2)_4\text{COOH}$ (68b) са протромбинским временом од 27 секунди, и у поређењу са варфарином и аценокумаролом је ефикаснији антикоагулант.

Средњу антикоагулантну активност (РТ вредности су у опсегу од 20 секунди до 22 секунде) су показала једињења са фенил (61b), *p*-толил (62b), *m*-толил (63b) и *p*-нитрофенил (65b) фармакофором у поређењу са активношћу аценокумарола, али знатно јачу активност у односу на варфарин.

Слабу активност у односу на активност аценокумарола показују једињења са бензилимино (67b) (РТ 16 секунди) и *m*-нитрофенилимино (66b) (РТ 18 секунди) фармакофорама. За једињење са *m*-нитрофенилимино фармакофором (66b) уочена је активност еквивалентна активности варфарина.

Деривати аминоксид-4-хидроксикумарина показују слабију антикоагулативну активност у односу на активност аценокумарола.

Највећа активност је констатована код једињења са *o*-толил (64c), *p*-нитрофенил (65c) и бензил (67c) фармакофорама, који при РТ вредности од 23 секунде показују јачу антикоагулантну активност у односу на активност варфарина (РТ 18 секунди). Такође, при РТ вредностима које су у опсегу од 20 секунди до 22 секунде и остали тестирани супстрати показују јачу активност у поређењу са активношћу варфарина.

Антикоагулативна активност деривата 4-хидроксикумарина заснива се на инхибицији ензима *vitamin K 2,3-epoksid reduktaze*⁸⁶ који се налази у мембрани

ендоплазматичног ретикулума. Каталитички центар ензима чине два остатка цистеина на положајима 132 и 135. Примарну структуру активног центра чине остаци аминокиселина 130-140 Ala-Phe-Cys-Ile-Val-Cys-Ile-Thr-Tyr-Ala из α -хеликса, при чему се сматра да хидрофобни остатак Thr(138)-Tyr(139)-Ala(140) представља место везивања 4-хидроксикумаринских супстрата^{30,31}.

Хидрофобне карактеристике $-C=N-(CH_2)_4COOH$ фармакофоре на положају С-3 у молекулу 4-хидроксикумарина омогућавају јаку интеракцију са хидрофобним активним центром (Thr(138)-Tyr(139)-Ala(140)), а самим тим и јаку инхибицију ензима *vitamin K 2,3-epoksid reduktaze* од стране једињења *68b*. Са друге стране, трансформација имино групе у аминокиселину за последицу има добијање фармакофоре ($-C-NH-(CH_2)_4COOH$) чије су хидрофобне карактеристике мање, условљавајући слабију активност једињења *84c*.

Амино деривати са фенил, *o*-толил, *p*-нитрофенил, *m*-нитрофенил и бензил фармакофорама (*61c*, *64c-67c*) показују незнатно јачу антикоагулантну активност у односу на одговарајуће имино деривате, док једињење са *m*-толил групом (*63c*) задржава активност имино деривата из којег је изведен. У овим случајевима умањење хидрофобних карактеристика фармакофоре везане за положај С-3 не условљава слабију активност. Заправо, у иминима не постоји могућност слободне ротације хидрофобне фармакофоре око $C=N$ групе, што за резултат има њен отежан прилаз хидрофобном цепа, а самим тим и слабију интеракцију лиганд-рецептор, што ће се одражавати на њихову слабију активност.

4. ЛИТЕРАТУРА

1. F. M. Dean, *Naturally Occuring Oxigen Ring Compounds*, Butterworth, London, **1963**.
2. T. Asao, G. Buchi, M. M. Abdel-Kader, S. B. Chang, E. L. Wick, G. N. Wogan, *J. Am. Chem. Soc.*, 85, 1706 (**1963**).
3. B. P. Moore, *Nature*, 195, 1101 (**1962**).
4. С. Сукдолак, С. Солујић, Н. Вуковић, *Хемија и биохемија кумарина*, ПМФ Крагујевац, 2007.
5. X. A. Кузнецова, *Природние Кумарини и Фурокумарини*, Наука, Ленинград, **1967**.
6. F. M. Dean, *Naturally Occuring Oxigen Ring Compounds*, Butterworth, London, **1963**.
7. R. D. H. Murray, *Nat. Prod. Rep.*, 8, 591-624 (**1989**).
8. O. Pelkonen, H. Raunio, A. Rautio, J. Mäenpää, M. A. Lang, *J. Irsh. Coll. Phys. Surg.*, 22, 24 (**1993**).
9. S. Cavar, F. Kovac, M. Maksimovic, *Food Chemistry*, 117, 1, 135-142 (**2009**).
10. P. Bermejo, E. Pinero, A. M. Villar, *Food Chemistry*, 110, 436-445 (**2008**).
11. S. Surveswaran, Y. Z. Cai, H. Corke, M. Sun, *Food Chemistry*, 102, 938-953 (**2007**).
12. C. R. Wu, M. Y. Huang, Y. T. Lin, H. Y. Ju, H. Ching, *Food Chemistry*, 104, 1464-1471 (**2007**).
13. B. G. Lake, *Food and Chemical Toxicology*, 37, 423-453 (**1999**).
14. C. Sproll, W. Ruge, C. Andlauer, R. Godelmann, D. W. Lachenmeier, *Food Chemistry*, 109, 462-469 (**2008**).
15. V. Panteleon, I. K. Kostakis, P. Marakos, N. Pouli, I. Andreadou, *Bioorg. & Med. Chem. Lett.*, 18, 5781-5784 (**2008**).
16. S. X. Chen, P. Schopfer, *Eur. J. Biochem.*, 260, 726-735 (**1999**).
17. T. Symeonidis, K. C. Fylaktakidou, D. J. Hadjipavlou-Litina, K. E. Litinas, *Food Chemistry*, 44, 5012-5017 (**2009**).
18. J. Yu et all, *J. Agric. Food Chem.*, 53, 2009-2014 (**2005**).

19. H. C. Lin et all, *Biochem. Pharmacol.*, 75, 1416 (2008).
20. T. Uhita, D. Mizuno, T. Taumra, T. Yamahawa, S. Nojima, *J. Pharm. Soc. Japan*, 71, 234 (1951).
21. M. A. Al-Haiza, M. S. Mostafa, M. Y. El-Kady, *Molecules*, 8, 275-286 (2003).
22. A. Oliva, E. Lahoz, R. Contillo, G. Aliotta, *J. Chem. Ecology*, vol 25, No 3, 519 (1999).
23. D. Ferroud, J. Collard, M. Klich, C. D. Hamelin, P. Mauvais, *Bioorg. & Med. Chem. Lett.*, 9, 2881-2886 (1999).
24. Anne-Marie Periers et all, *Bioorg. & Med. Chem. Lett.*, 10, 161-165 (2000).
25. B. Musicki et all, *Tetrahedron Lett.*, 44, 9259-9262 (2003).
26. C. D. Marple, M. J. McIntyre, *The Am. J. of Nursing*, 56, 7 875-879 (1956).
27. F. W. Deckret, *Souther Medical Journal*, 67, 10 1191-1202 (1974).
28. M. J. Fasco, L. M. Principe, W. A. Walsh, P. A. Friedman, *Biochemistry*, 22, 5655-5660 (1983).
29. I. Mukharji, R. B. Silverman, *Biochemistry*, 82, 2713-2717 (1985).
30. R. Wallin, S. M. Hutson, *Trends in Molecular Medicine*, 10, 7, 299-302 (2004).
31. L. Goodstadt, C. P. Ponting, *Trends in Molecular Medicine*, 29, 6, 289-292 (2004).
32. M. J. Fasco, L. M. Principe, *J. Biol. Chem.*, 10, 4894-4901 (1982).
33. J. M. Neilson, A. W. Mollison, *Brit. Med. J.*, 1214-1217 (1957).
34. R. B. Arora, C. N. Mathur, *Brit. J. Pharmacol.*, 20, 29-35 (1963).
35. I. Chmielewska, J. Cieslak, *Tetrahedron*, 4, 135 (1958).
36. E. J. Valente, E. C. Lingafelter, W. R. Potter, K. F. Trager, *J. Med. Chem.*, 20, 11, 1489 (1977).
37. P. Meunier, C. Mentzer, J. Lajudie, *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 29, 977 (1947).
38. I. Alami, S. Mari, A. Clériver, *Phytochemistry*, 48, 5, 771-776 (1998).
39. S. S. Hanmantgad, V. N. Biradar, S. Nanjappa, *Arch. Pharm.*, 314, 435-439 (1981).
40. M. Ghate, D. Manohar, V. Kulkarni, R. Shobha, S. Y. Kattimani, *Eur. J. Med. Chem.*, 38, 297-302 (2003).
41. M. C. Toimil et all, *Bioorg. & Med. Chem. Lett.*, 12, 783-786 (2002).

42. J. Duarte, I. Vallejo, F. P. Vizcaino, R. Jimenez, A. Zarzuelo, J. Tamargo, *Planta Med.*, 63, 3, 233-236 (1997).
43. E. Smith, N. Hosansky, W. G. Bywater, E. E. van Tamelen, *J. Am. Chem. Soc.*, 79, 13, 3534–3540 (1957).
44. M. Monquin, C. Macre, *Presse Med.*, 68, 257 (1960).
45. E. M. Bickoff, *J. Anim. Sci.*, 19, 4 (1960).
46. R. Bakhchinian, F. Terrier, S. Kirkiacharian, M. R. Rigon, F. Bouchoux, E. Cerede, *Il Farmaco*, 58, 1201-1207 (2003).
47. V. N. Gupta, B. R. Sharima, R. B. Avora, *J. of Sci. & Indust. Res.*, 20B, 300, (1961)
48. J. W. Greenawalt, C. Schnaitman, *J. Cell Biol.*, 46, 173-179 (1970).
49. F. Chimenti, D. Secci, A. Bolasco, P. Chimenti, A. Granese, O. Befani, P. Turini, S. Alcaro, F. Ortuso, *Bioorg. & Med. Chem. Lett.*, 14, 14, 3697-3703 (2002).
50. A. J. Trevor, N. Castagnoli, P. Caldera, R. R. Ramsay, T. P. Singer, *Life Sci.*, 40, 8, 713-719 (1987).
51. A. J. Trevor, N. Castagnoli, T. P. Singer, *Toxicology*, 49, 513-519 (1988).
52. F. A. Hodges, J. R. Zust, H. R. Smith, A. A. Nelson, B. H. Armbrrecht, A. D. Compbell, *Science*, 145, 1439 (1964).
53. R. D. Hartley, B. E. Nesbitt, J. O. Kelly, *Nature*, 198, 1057 (1963).
54. M. S. Masari, R. E. Lundin, Y. R. Page, V. C. Garcia, *Nature*, 215, 753 (1967).
55. C. Spino, M. Dodier, S. Sotheeswaran, *Bioorg. & Med. Chem. Lett.*, 8, 3475-3478 (1998).
56. P. Karlson, *Biokemija*, Školska knjiga, Zagreb, 1993.
57. A. Leitao et all, *Bioorg. & Med. Chem. Lett.*, 14, 2199-2204 (2004).
58. L. W. Wattenberg, L. K. T. Low, A. V. Fladmoe, *Cancer Res.*, 39, 1651 (1979).
59. B. Hagmar, *Pathol. Europ.*, 3, 620 (1968).
60. B. Hagmar, B. Boeryd, *Pathol. Europ.*, 3, 509 (1968).
61. A. B. Smith, P. J. Jerris, *Tetrahedron Lett.*, 21, 711 (1980).
62. M. H. Von Woert, S. H. Palmer, *Cancer Res.*, 29, 1952 (1969).
63. W. G. Cance, E. T. Liu, *Breast Canc. Res. Treat.*, 35, 105-114 (1995).
64. E. B. Yang, D. F. Wang, L. Y. Cheng, P. Mack, *Cancer J.*, 10, 319-324 (1997).

65. Z. M. Nofal, M. I. El-Zahar, S. S. Abd El-Karim, *Molecules*, 5, 99-113 (2000).
66. E. B. Yang, D. F. Wang, *Biochem. and Biophys. Res. Comm.*, 260, 682–685 (1999).
67. P. Prieto, M. Pineda, M. Aguilar, *Analytical Biochemistry*, 269, 337–341 (1999).
68. T. Takao, N. Watanabe, I. Yagi, K. Sakata, *Biosci. Biotech. and Biochem.*, 58, 1780-1783 (1994).
69. M. Oyaizu, *Jap. J. of Nutrit.*, 44, 307-315 (1986).
70. T. Masude, D. Isibe, A. Jitoe, N. Naramati, *Phytochemistry*, 33, 3645–3647 (1992).
71. B. Halliwell, J. M. C. Gutteridge, O. I. Aruoma, *Anal. Biochem.*, 165, 215–219 (1987).
72. С. Солујић, *Практикум из биохемије*, 2003, ПМФ Крагујевац.
73. М. М. Врвић, Г. Цвијовић-Гојгић, *Практикум за микробиолику хемију*, 2003, Хемијски факултет, Београд.
74. Clinical and Laboratory Standards Institute, Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Fifteenth Informational Supplement, CLSI Document M100-S15, Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA, 2005.
75. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts. Approved Standards. NCCLS Document M27-A, National Committee for Clinical Laboratory Standards, Wayne, PA, 1997.
76. S. A. Sarker, L. Nahar, Y. Kumarasamy, *Methods*, 42, 321-324 (2007).
77. A. J. Quick, *J. Biol. Chem.*, 109, 73-74 (1935).
78. C. Y. Qian, Z. T. Jin, B. Z. Yin, *J. Heterocyclic Chem.*, 26, 601-604 (1989).
79. R. W. Layer, *Chem. Rev.*, 63 (5), 489–510 (1963).
80. C. O. Kappe and A. Stadler, *Microwaves in Organic and Medicinal Chemistry*, Wiley-VCH, Weinheim, 2005.
81. S. Sukdolak, N. Vuković, S. Solujić, N. Manojlović, Lj. Krstić, *J. Heterocycl. Chem.* 41, 593-596 (2004).
82. M. Okawa, J. Kinjo, T. Nohara, M. Ono, *Biol. Pharm. Bull.*, 24, 10, 1202-1205 (2001).
83. P. Molyneux, *Songklanakarinn J. Sci. Technol.*, 26, 2, 211-219 (2004).

-
84. O. I. Aruoma, *Free radicals and food additives*, London, Taylor and Francis Ltd., pp.17–35, 1991.
 85. G. Ozkan, H. Kuleaoan, S. Celik, R. S. Gokturk, O. Unal, *Food Control*, 18, 509-512 (2007).
 86. M. Gebauer, *Bioorg. & Med. Chem. Lett.*, 15, 2414-2420 (2007).

30. 05. 1976.

,
,
2003.
.

Agilent 6890N/5975B.

e-mail: nvukovic@kg.ac.rs