

Novi triazolni derivati hidroksipiran-4-ona: priprava i biološka aktivnost

Žepić, Ines

Master's thesis / Diplomski rad

2019

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Science / Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:217:118129>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-09-01**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb](#)





Sveučilište u Zagrebu
PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET
Kemijски odsjek

Ines Žepić

**NOVI TRIAZOLNI DERIVATI
HIDROKSIPIRAN-4-ONA:
PRIPRAVA I BIOLOŠKA AKTIVNOST**

Diplomski rad

predložen Kemijском odsjeku

Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu

radi stjecanja akademskog zvanja

magistre kemije

Zagreb, 2019.

Ovaj diplomski rad izrađen je u Zavodu za organsku kemiju Kemijskog odsjeka Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pod mentorstvom izv. prof. dr. sc. Vesne Petrović Peroković i neposrednim voditeljstvom dr. sc. Željke Car

Diplomski rad izrađen je u okviru projekta *HRZZ – 7899: Sinteza, strukturna analiza i biološka evaluacija peptidomimetika i glikokonjugata* (prof. dr. sc. Srđanka Tomić-Pisarović)

Zahvale

Srdačno se zahvaljujem izv. prof. dr. sc. Vesni Petrović Peroković na ukazanom povjerenju, mentorstvu, te brojnim korisnim savjetima i idejama koje su dovele do izrade ovog diplomskog rada. Također, od srca se zahvaljujem na strpljenju, pristupačnosti, motivaciji i vrlo ugodnoj radnoj atmosferi. Zbog toga svega bez obzira kamo će me život odvesti, uvijek ću se s osmijehom prisjećati laboratorija 306.

Velika hvala i neposrednoj voditeljici, dr. Željki Car na uloženom vremenu i trudu te nesebičnoj pomoći tijekom izrade i pisanja ovog rada. Hvala na razumijevanju, strpljenju te brojnim korisnim savjetima i prijedlozima.

Zahvaljujem se mentorici i neposrednoj voditeljici na svemu, posebno na cijelom iskustvu iz kojeg sam naučila mnogo toga.

Isto tako, zahvaljujem se dr. sc. Martini Bosnar (Fidelta d.o.o.) na provedenim antitumorskim ispitivanjima.

Također, željela bih se zahvaliti i Zlatanu, Danijeli i Andrei, kao i tehničarkama na organskom zavodu na pruženoj pomoći, savjetima, ugodnoj radnoj atmosferi i zanimljivim razgovorima koji su oplemenili cijelo ovo iskustvo.

Ozani, Tei, Lenki i Miki na prekrasnom prijateljstvu, razgovorima, druženju savjetima, idejama, kako u privatnom, tako i u akademskom području. Hvala Vam što ste uvijek bile uz mene, uljepšale mi studij i vratile vjeru u dobre ljude.

Također hvala cijeloj „ekipi s brda“ Karli, Darku, Eni, Alojziju, Andrei, Gabici, Mariji-Jeleni, Marinu i Mateju na prijateljstvu i predivnim uspomnama koje ću pamtiti cijeli život. Hvala i „ekipi sa šanka“, učinili ste moje „brđanske dane“ zabavnima i nepredvidivima. I svim drugim, meni dragim ljudima, koje sam susrela na ovom putovanju. Zaista sam sretna i zahvalna što sam vas imala prilike upoznati i provesti vrijeme s vama.

Mojoj Luce i Jacqueline, najboljim prijateljicama na cijelom svijetu, hvala na prekrasnom prijateljstvu i neizmjerne podršci, ne samo tijekom studija, već tijekom cijelog života. Hvala vam što ste vjerovala u mene i motivirale me, čak i u najtežim životnim trenucima pružile mi potrebnu snagu i oslonac. Volim vas puno!

Tomislavu, mom najboljem prijatelju, na potpori, divnom prijateljstvu, razgovorima i savjetima. Hvala ti na svim lijepim stvarima što si učinio za mene.

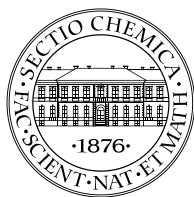
Na kraju, željela bih se zahvaliti svojoj obitelji, roditeljima i sestri na bezuvjetnoj ljubavi i podršci koju mi pružaju cijeli život. Hvala vam što ste bili moja snaga i moj oslonac i što ste me učinili osobom kakva sam danas. Hvala što ste vjerovali u mene i motivirali me da ustrajem u ostvarenju svojih snova, ništa od ovoga ne bi bilo moguće bez vas.

Ines

Sadržaj

SAŽETAK.....	X
ABSTRACT	XII
§ 1. UVOD.....	1
1.1. <i>Cilj i svrha rada.....</i>	<i>2</i>
§ 2. LITERATURNI PREGLED	4
2.1. <i>Obilježja klik-kemije</i>	<i>4</i>
2.1.1. <i>Primjeri klik-reakcija.....</i>	<i>4</i>
2.1.2. <i>Bakrom katalizirana alkin-azidna cikloadicija</i>	<i>6</i>
2.1.2.1. <i>Mehanizam Cu(I) katalizirane alkin-azidne cikloadicije</i>	<i>7</i>
2.1.2.2. <i>Supstrati, katalizatori i reakcijski uvjeti.....</i>	<i>8</i>
2.2. <i>Primjena klik-kemije</i>	<i>10</i>
2.3. <i>Hidroksipiran-4-oni – strukturne karakteristike i svojstva.....</i>	<i>14</i>
2.3.1. <i>Sintetske strategije u kemiji hidroksipiran-4-ona.....</i>	<i>15</i>
§ 3. EKSPERIMENTALNI DIO	18
3.1. <i>Materijali i metode.....</i>	<i>18</i>
3.2. <i>Priprava propargiliranih hidroksipiran-4-ona.....</i>	<i>19</i>
3.2.1. <i>Općeniti postupak propargiliranja</i>	<i>19</i>
3.2.1.1. <i>2-metil-3-(prop-2-in-1-iloksi)piran-4-on (1).....</i>	<i>19</i>
3.2.1.2. <i>2-(hidroksimetil)-5-(prop-2-in-1-iloksi)piran-4-on (2).....</i>	<i>20</i>
3.3. <i>Priprava azida.....</i>	<i>21</i>
3.3.1. <i>Priprava 3-(trifluormetil)fenilazida (3)</i>	<i>21</i>
3.3.3 <i>Priprava fenilazida (4)</i>	<i>22</i>
3.4. <i>Priprava derivata triazola klik-reakcijama</i>	<i>23</i>
3.4.1. <i>2-metil-3-((1-(3-(trifluormetil)fenil)-1,2,3-triazol-4-il)-metoksi)-piran-4-on 5</i>	<i>23</i>
3.4.2. <i>2-(hidroksimetil)-5-((1-(3-(trifluormetil)fenil)-1,2,3,-triazol-4-il)metoksi)-piran-4-on 6.....</i>	<i>24</i>
3.4.3. <i>2-metil-3-((1-fenil-1,2,3-triazol-4-il)-metoksi)-piran-4-on 7</i>	<i>24</i>
3.4.4. <i>2-(hidroksimetil)-5-((1-fenil-1,2,3-triazol-4-il)metoksi)-piran-4-on 8.....</i>	<i>25</i>
3.4.5. <i>3-((1-adamantil)-1,2,3-triazol-4-il)metoksi)-2-metil-piran-4-on 9</i>	<i>26</i>
3.4.6. <i>5-((adamant-1-il)-1,2,3-triazol-4-il)metoksi)-2-(hidroksimetil)-piran-4-on 10.....</i>	<i>27</i>
§ 4. REZULTATI I RASPRAVA	28
4.1. <i>Uvod.....</i>	<i>28</i>
4.2. <i>Priprava propargiliranih prekursora 1 i 2</i>	<i>30</i>

4.3. Priprava aromatskih azida 3 i 4.....	31
4.4. Priprava 1,2,3-triazola klik-reakcijama	33
4.5. Biološka testiranja pripremljenih triazolnih derivata.....	34
§ 5. ZAKLJUČAK	36
§ 6. POPIS OZNAKA, KRATICA I SIMBOLA (PREMA POTREBI)	37
§ 7. LITERATURNI IZVORI.....	39
§ 8. DODATAK.....	XV
§ 9. ŽIVOTOPIS	XXV



Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Kemijski odsjek

Diplomski rad

SAŽETAK

NOVI TRIAZOLNI DERIVATI HIDROKSIPIRAN-4-ONA: PRIPRAVA I BIOLOŠKA AKTIVNOST

Ines Žepić

U okviru ovog diplomskog rada pripravljeno je šest novih 1,2,3-triazolnih derivata odabranih hidroksipiran-4-ona, maltola i kojične kiseline. Triazolni prsten uveden je poznatom klik-reakcijom između terminalnog alkina i azida, bakrom kataliziranom alkin-azidnom cikloadicijom, gdje je kao katalizator korišten kompleksni spoj bakra(II), tetrakis- μ -(acetato)diakvadibakar(II). Terminalni alkini (**1** i **2**) za klik-reakciju priređeni su propargiliranjem maltola i kojične kiseline, a aromatski azidi **3** i **4** dobiveni su iz *meta*-trifluoranilina i anilina. Kao treći azidni prekursor korišten je prethodno pripremljen 1-azidoadamantan. Klik-reakcijama iz navedenih azidnih i alkinskih prekursora regioselektivno su dobiveni 1,4-disupstituirani 1,2,3-triazoli **5-10**. Spojevima **6**, **7** i **9** ispitana je antitumorska aktivnost *in vitro*, na pet tumorskih staničnih linija (HTC116, MCF-7, NCI-H460, PANC-1, THP-1).

(41 + XXV stranica, 29 slika, 1 tablica, 42 literaturna navoda, jezik izvornika: hrvatski)

Rad je pohranjen u Središnjoj kemijskoj knjižnici Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, Horvatovac 102a, Zagreb i Repozitoriju Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.

Ključne riječi: antitumorska aktivnost, azidi, 1,4-disupstituirani 1,2,3-triazoli, propargilirani hidroksipiran-4-oni, klik-reakcije

Mentor: izv. prof. dr. sc. Vesna Petrović Peroković
Neposredni voditelj: dr. sc. Željka Car

Ocjenitelji:

1. izv. prof. dr. sc. Vesna Petrović Peroković
 2. prof. dr. sc. Željka Soldin
 3. prof. dr. sc. Iva Juranović Cindrić
- Zamjena: doc. dr. sc. Ivana Biljan

Datum diplomskog ispita: 20.12.2019.



University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Chemistry

Diploma Thesis

ABSTRACT

NOVEL TRIAZOLE HYDROXYPYRAN-4-ONE DERIVATIVES: PREPARATION AND BIOLOGICAL ACTIVITY

Ines Žepić

In this Master thesis six novel 1,2,3-triazole derivatives of selected hydroxypyran-4-ones, maltol and kojic acid, were prepared. Triazole ring was introduced by famous click-reaction, copper catalyzed alkyne-azide cycloaddition, where a coordination copper(II) compound, tetra- μ -acetatodiaquacopper(II), was used as a catalyst. Terminal alkynes **1** and **2** used for click-reactions were synthesized by propargylation of maltol and kojic acid, whereas aromatic azides **3** and **4** were prepared from 3-(trifluoromethyl)aniline and aniline, respectively. Third azide precursor for click-reactions was previously synthesized 1-azidoadamantane. Click-reactions of compounds **1-2** and **3-4** as well as 1-azidoadamantane regioselectively gave 1,4-disubstituted triazole products **5-10**. Compounds **6**, **7** and **9** were tested for their antitumor activity *in vitro* on five tumour cell lines, namely, HTC116, MCF-7, NCI-H460, PANC-1 and THP-1.

(41 + XXV pages, 29 figures, 1 table, 42 references, original in Croatian)

Thesis deposited in Central Chemical Library, Faculty of Science, University of Zagreb, Horvatovac 102a, Zagreb, Croatia and in Repository of the Faculty of Science, University of Zagreb.

Keywords: antitumor activity, azides, 1,4-disubstituted 1,2,3-triazoles, propargylated hydroxypyran-4-ones, click-reactions

Mentor: Dr. Vesna Petrović Peroković, Associate Professor

Assistant mentor: Dr. Željka Car, Research Associate

Reviewers:

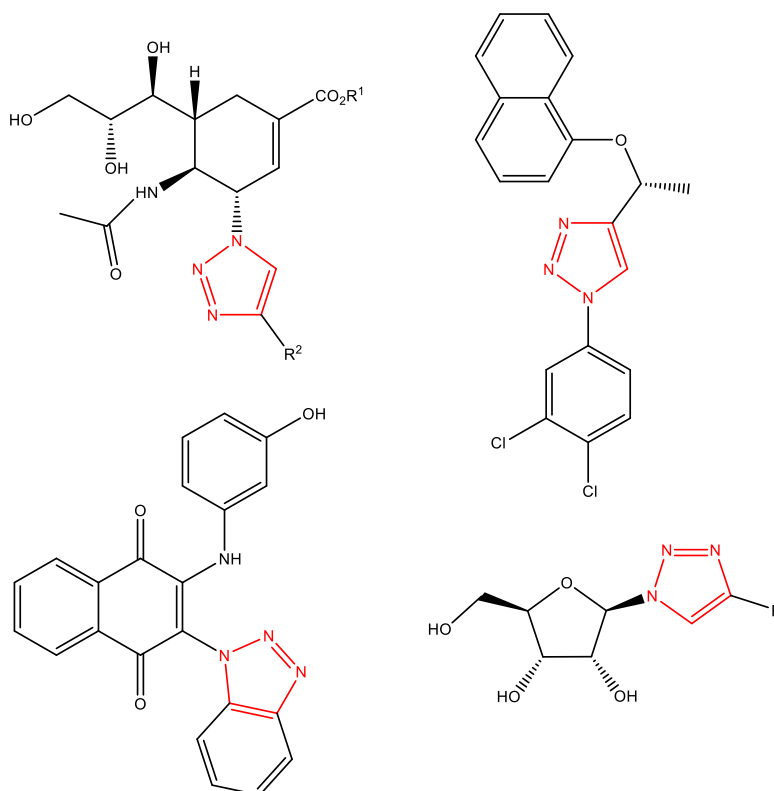
1. Dr. Vesna Petrović Peroković, Associate Professor
2. Dr. Željka Soldin, Full Professor
3. Dr. Iva Juranović Cindrić, Full Professor

Substitute: Dr. Ivana Biljan, Assistant Professor

Date of exam: 20th December 2019.

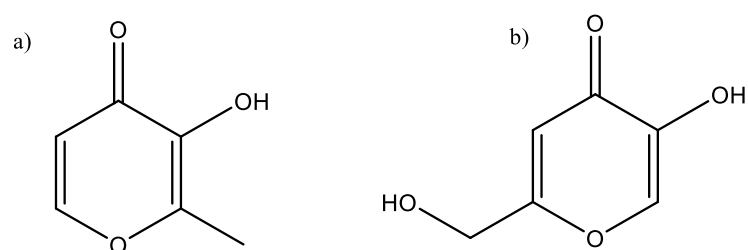
§ 1. UVOD

Dizajn molekula koje pokazuju određenu biološku aktivnost od velikog je interesa kako za istraživače, tako i za farmaceutsku industriju zbog pronalaženja i razvitka potencijalnih lijekova. Biološka aktivnost može biti posljedica različitih fizikalnih i kemijskih svojstava molekula, a posebno strukture molekule. Drugim riječima, prisutnost različitih funkcijskih skupina u strukturi molekule otvara prostor moduliranju stereoelektronskih svojstava molekula, koja posljedično imaju utjecaj i na biološku aktivnost. Postoje različite metode kojima se korelira struktura i aktivnost molekula, a jedna od najpoznatijih je i QSAR metoda (eng. *Quantitative structure to activity relationship*) koja omogućuje predviđanje biološke aktivnosti različitih molekula na temelju odgovarajućih kemijskih parametara. Jedan od načina za izgradnju QSAR modela i pronalaska molekula sa što boljom biološkom aktivnošću je modifikacija već postojećih biološki aktivnih molekula.¹ Mnoga istraživanja pokazala su da 1,2,3-triazoli i njihovi derivati pokazuju širok spektar bioloških aktivnosti među kojima se ističu antitumorska, antibakterijska, antivirusna, protuupalna, i dr.²⁻³



Slika 1: Strukturne formule biološki aktivnih derivata 1,2,3-triazola.

U ovome radu provedene su i opisane reakcije Huisgenove 1,3-dipolarne cikloadicije koje su vrlo popularne u organskoj sintezi i kemiji općenito, tzv. klik-kemiji. Konkretno, riječ je o bakrom kataliziranoj alkin-azidnoj cikloadiciji kojom nastaju odgovarajući 1,4 disupstituirani 1,2,3-triazolni derivati. Alkinski supstrati korišteni u ovome radu dobiveni su modifikacijom odabranih spojeva iz skupine hidroksipiranona, preciznije maltola i kojične kiseline. Maltol i kojična kiselina heterocikličke su nezasićene molekule s kisikovim atomom unutar šesteročlanog prstena, karbonilnom skupinom te hidroksilnom skupinom u *ortho* položaju u odnosu na karbonilnu skupinu (slika 2). Takvi spojevi, kao i njihovi derivati pokazuju niz različitih vrsta bioloških aktivnosti kao što su primjerice antibakterijsko, antifungalno, protuupalno i druge⁴. Jedno od vrlo poželjnih svojstava prethodno navedenih spojeva je i izrazito niska toksičnost te biodostupnost zbog čega su izvrsne polazne molekule za sintezu različitih vrsta spojeva koji mogu izazvati biološki odgovor. Također, zbog sposobnosti da se koordiniraju na različite ione metala⁴, postaju neizbježni prekursori prilikom osmišljavanja struktura različitih molekula s primjenom u dijagnostici, liječenju i prevenciji raznih bolesti (poglavlje 2.3.). Svoju primjenu najviše nalaze u farmaceutskoj, kozmetičkoj ali i prehrambenoj industriji gdje se koriste kao aditivi.⁴⁻⁵

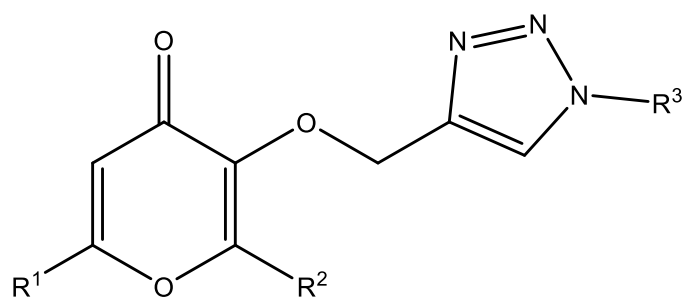


Slika 2: Strukturne formule molekula a) maltola i b) kojične kiseline.

1.1. Cilj i svrha rada

Cilj ovog diplomskog rada bio je prirediti nove 1,2,3-triazolne derivate iz odabranih propargiliranih hidroksipiran-4-ona, maltola i kojične kiseline, i dvaju aromatskih azida, fenilazida i *meta*-trifluorfenilazida, te adamantan-1-ilazida (slika 3) u svrhu ispitivanja njihovog biološkog učinka (primarno antitumorski) *in vitro*. Svi dobiveni rezultati bit će doprinos izgradnji QSAR modela te će se na temelju tog modela u budućnosti sinteza usmjeriti ka onim molekulama za koje je računalno predviđeno da pokazuju optimalnu aktivnost. Novija

istraživanja pokazala su da prisutnost i položaj adamantilne skupine vezane na maltol ili kojičnu kiselinu značajno poboljšava antiproliferativnu aktivnost tih spojeva u odnosu na osnovne piranonske molekule koje ne pokazuju nikakav učinak. Isto je pokazano i za *N*-aril supstituirane piridin-4-one sintetizirane iz maltola i kojične kiseline.⁶ Nadalje, mnogi literaturni izvori⁶⁻⁷ opisuju pozitivan učinak adamantilne skupine na povećanje biološke aktivnosti. Osim ispitivanja biološke aktivnosti priređenih triazolnih derivata, u cilju je istražiti i koji strukturni motiv ima najveći utjecaj na aktivnost tih spojeva.



spoj	R ¹	R ²	R ³
5	-H	-CH ₃	3-(trifluormetil)fenil
6	-CH ₂ OH	-H	3-(trifluormetil)fenil
7	-H	-CH ₃	fenil
8	-CH ₂ OH	-H	fenil
9	-H	-CH ₃	adamantan-1-il
10	-CH ₂ OH	-H	adamantan-1-il

Slika 3: Strukturne formule ciljnih molekula **5-10**.

§ 2. LITERATURNI PREGLED

2.1. Obilježja klik-kemije

Od 2001. godine kada su Sharpless i suradnici⁸ po prvi put uveli pojam „klik-kemija“, ovo područje do danas ostaje jedno od najpopularnijih u suvremenoj organskoj sintezi. Njime se obuhvaća skup reakcija koje su modularne, široko primjenjive te daju stabilne produkte (osobito u fiziološkim uvjetima) u vrlo viskom iskorištenju, uz jednostavnu izolaciju filtracijom i kristalizacijom. Prednosti ovakvih reakcija još su i lako dostupni polazni materijali, jednostavni reakcijski uvjeti, neškodljivi i lako uklonjivi sporedni produkti (najčešće nekromatografskim metodama) kao i otapala (ako su potrebna). Također, ove reakcije odlikuju se stereospecifičnošću, ali ne nužno i enantioselektivnošću.⁸⁻⁹

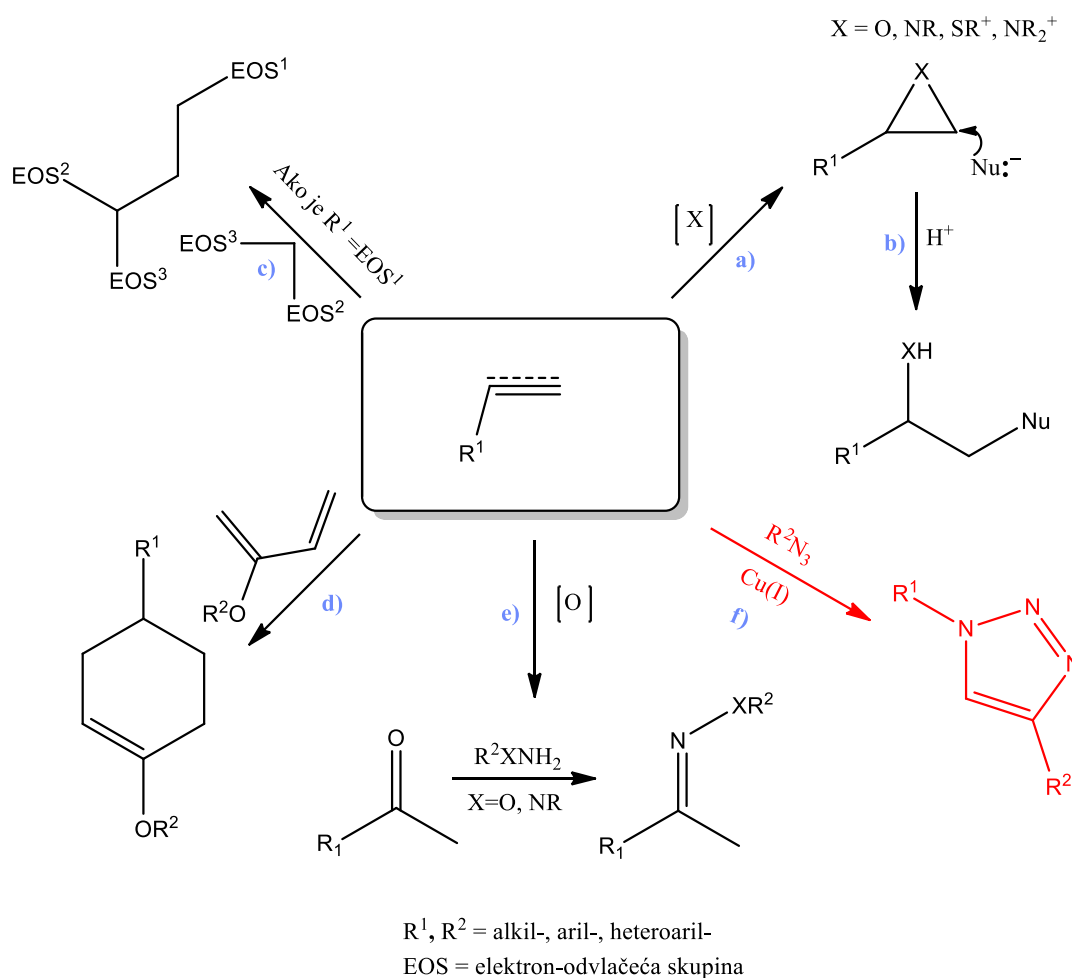
Među reakcijama koje zadovoljavaju navedene uvjete ističu se Diels-Alderove reakcije te cikloadicijske reakcije u koje ubrajamo i Huisgenovu 1,3-dipolarnu cikloadicijsku reakciju te njezinu bakrom kataliziranu inačicu koja je i srž ovog Diplomskog rada. Najvažnije značajke ove reakcije bit će detaljnije predstavljene u idućim odlomcima (poglavlja 2.2. i 2.2.1.).

Klik-kemija nedvojbeno je imala utjecaj na sve grane kemije, počevši od organske sinteze do kemije materijala i posljedično na razvoj novih tehnologija. Najveći je trag zasigurno ostavila na biomedicinsko područje, konkretno kod različitih biokondenzacijskih reakcija, otvarajući mogućnost obilježavanja biomolekula *in vivo*. Zbog svoje modularnosti, upotrebljava se u radiokemiji i razvoju radiokemijskih metoda. Također, značajno je unaprijedila sintetske mogućnosti u kemiji polimera i dendrimera i tako utjecala na usavršavanje metoda u kemiji materijala. Blagi reakcijski uvjeti, karakteristični za klik-reakcije, jedan su od razloga njihove sve češće primjene. Isto tako, ovaj je pristup sveo uporabu štetnih kemikalija na minimum, što ga čini izuzetno ekološki prihvatljivim. U novije vrijeme, radi se na razvoju metoda koje će eliminirati uporabu metala u katalizi, čime se klik-kemija sve više usmjerava prema „zelenoj kemiji.“

2.1.1. Primjeri klik-reakcija

Osim već spomenutih cikloadicijskih reakcija te Diels-Alderovih reakcija, postoji i mnogo drugih reakcija koje možemo smatrati klik-reakcijama jer zadovoljavaju prethodno opisane

kriterije. Najčešće su to reakcije nukleofilne supstitucije, preciznije nukleofilnog otvaranja prstena, adicije na nezasićenu ugljik-ugljik vezu (npr. epoksidacija) ili Michaelove adicije i reakcije koje uključuju karbonilnu kemiju nealdolnog tipa⁸ (slika 4). Upravo zbog ove široke palete reakcija kojima nastaje ugljik-heteroatom veza, koncept klik-kemije jednako je zanimljiv i izazovan organskim sintetičarima, ali i biokemičarima. Minimalan broj koraka uz vrlo visoka iskorištenja glavni su adut-klik kemije prilikom sinteze analoga prirodnih spojeva i sve se češće upotrebljava u te svrhe te svakako predstavlja unaprjeđenje u usporedbi s tradicionalnim sintetskim postupcima.



Slika 4: Shematski prikaz primjera reakcija koje zadovoljavaju kriterije klik-reakcija.

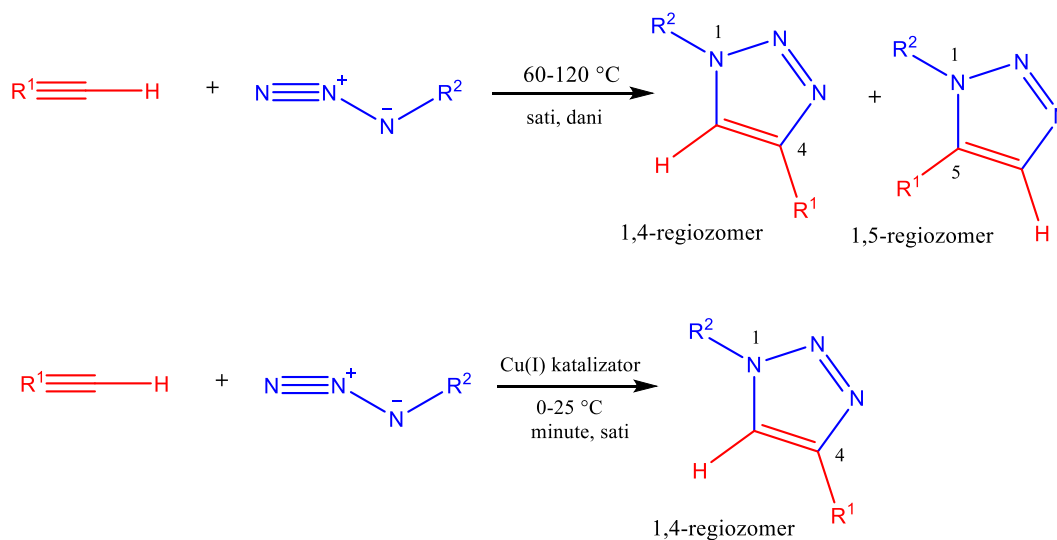
- a) adicija na nezasićenu ugljik-ugljik vezu, b) nukleofilno otvaranje prstena,
 c) Michaelova adicija, d) Diels-Alderova reakcija, e) karbonilna kemija nealdolnog tipa,
 f) bakrom(I) katalizirana Huisgenova 1,3-dipolarna cikloadicija.

(Prilagođeno prema referencama 8 i 9.)

2.1.2. Bakrom katalizirana alkin-azidna cikloadicija

Nekatalizirana verzija ove reakcije (Huisgenova 1,3-dipolarna cikloadicija) između fenil-azida i acetilendikarboksilata poznata je od 1893. godine i predstavlja jednu od prvih sintetskih strategija za dobivanje 1,2,3-triazola.¹⁰ Općenito, za nekatalizirane reakcije ovog tipa izračunate su relativno visoke energije aktivacije (25-26 kcal mol⁻¹), što je bilo u skladu s eksperimentalnim rezultatima¹¹ budući da se odvijaju pri vrlo visokim temperaturama i reakcije su vrlo spore. Osim toga, u takvim slučajevima uvijek nastaje smjesa dvaju regiozomera: 1,4-disupstituiranog i 1,5-disupstituiranog 1,2,3-triazola.

Meldal i Tornøe 2002. godine po prvi puta izvode Huisgenovu 1,3-dipolarnu cikloadiciju uz dodatak bakra(I) kao katalizatora. Ta je reakcija od tada poznata pod nazivom bakrom(I) katalizirana alkin-azidna cikloadicija¹² (engl. *Copper Catalyzed Alkyne-Azide Cycloaddition, CuAAC*). Upotrebom bakra(I) kao katalizatora u ovoj vrsti reakcije postiže se ubrzanje do 10⁷ puta u odnosu na nekataliziranu reakciju te se takve reakcije odvijaju uglavnom pri znatno nižim temperaturama (0-25 °C). Prisutnost katalizatora značajno utječe njenu selektivnost te tada nastaju isključivo 1,4-disupstituirani 1,2,3-triazoli¹¹⁻¹³ (slike 5 i 6; poglavlje 2.1.2.1.). CuAAC klik-reakcije općenito su neosjetljive na sterička i elektronska svojstva supstituenata, mogu se izvoditi u različitim uvjetima korištenjem raznovrsnih otapala i Cu(I) katalizatora te podnose širok temperaturni raspon. 1,2,3-triazoli dobiveni na ovaj način vrlo su stabilni u oksidacijsko-redukcijskim uvjetima i pri vrlo visokim temperaturama, inertni su prema kiselinskoj i baznoj hidrolizi⁹ pa predstavljaju dobar analog amidne veze. Nadalje, zbog svoje jedinstvene strukture mogu ostvarivati brojne interakcije nužne za neometanu funkciju bioloških sustava, poput vodikovih veza i dipol-dipol interakcija. Sve navedene karakteristike ovih spojeva usmjeravaju ih ka primjeni u dizajnu i otkrivanju lijekova, različitim biokemijskim istraživanjima, kemiji polimera te otvaraju mogućnost razvoja novih materijala.

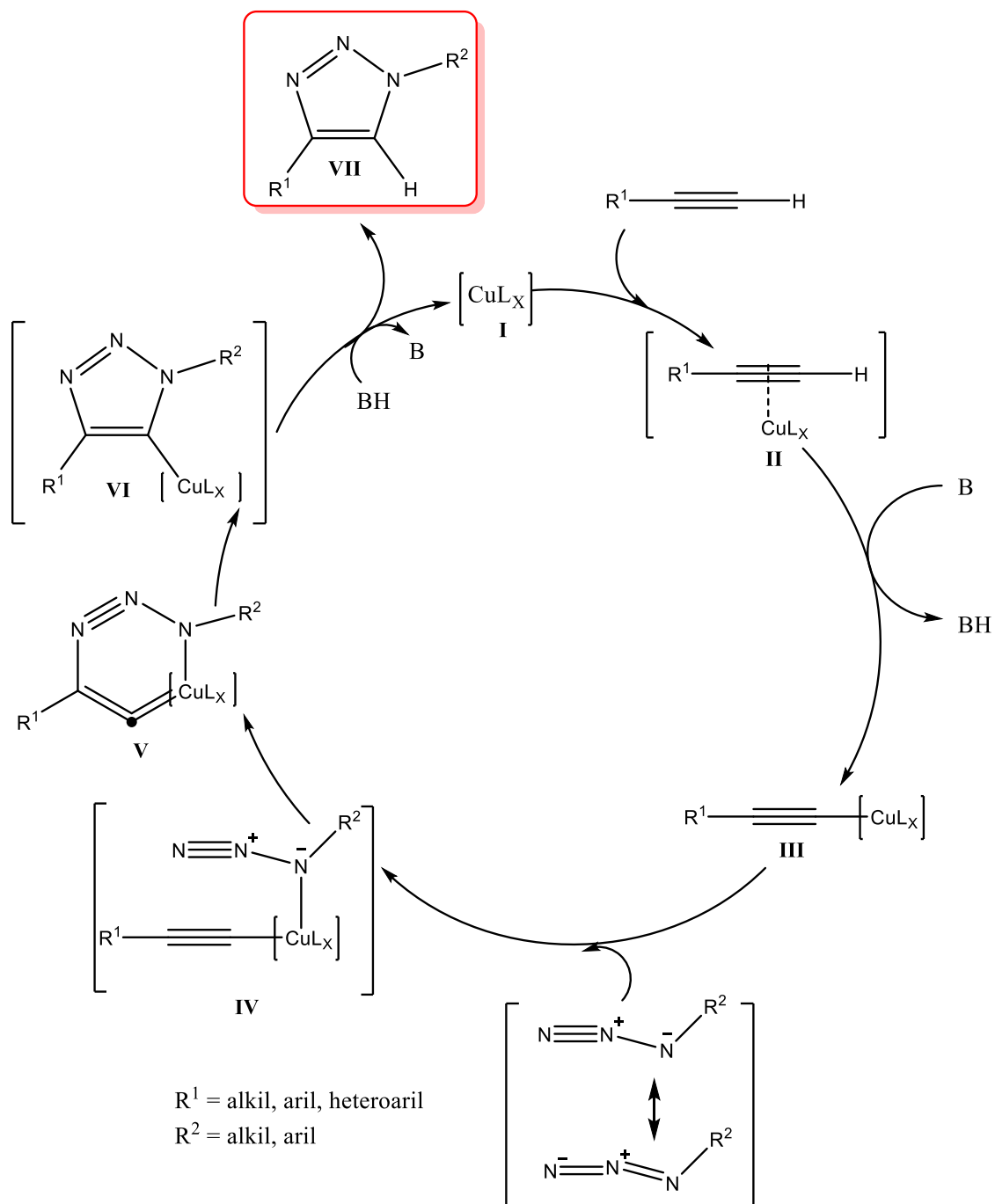


Slika 5: Shematski prikaz 1,3-dipolarne alkin-azidne cikloadicije : a) nekatalizirana reakcija, b) Cu(I) katalizirana reakcija. (Prilagođeno prema referencama 9 i 11.)

2.1.2.1. Mehanizam Cu(I) katalizirane alkin-azidne cikloadicije

Nekatalizirana Huisgenova 1,3-dipolarna cikloadicija se kao većina cikloadicijskih reakcija odvija usklađenim mehanizmom¹⁴, pri čemu dolazi do uobičajenog pericikličkog pomaka 2π elektrona dipolarofila i 4π elektrona 1,3-dipolarne komponente. Međutim, mehanizam CuAAC reakcije jest stupnjevit te u reakciji sudjeluju najmanje dva atoma bakra. Različite kinetičke studije zajedno s kristalografskim podacima¹³ upućuju na takav put, a također se pretpostavlja da azid i alkin ne koordiniraju isti atom bakra. Takvu hipotezu potkrjepljuju i računalni podatci dobiveni primjenom DFT metode (eng. *Density functional theory*).^{9,13,15}

U prvom koraku katalitičkog ciklusa CuAAC reakcije (slika 6) dolazi do koordinacije bakra(I) na π elektrone alkina te nastaje π kompleks **II**. Uslijed koordinacije dolazi do značajnog smanjenja u pK_a vrijednosti terminalnog alkina, što olakšava njegovu deprotonaciju i omogućuje nastanak bakrovog acetilida **3**. Nastali kompleks bakrovog acetilida **III** koordinira azid pri čemu nastaje međuprodukt **IV** te se tako dodatno povećava elektrofilnost terminalnog kraja alkina. U idućem koraku dolazi do nastanka nove ugljik-dušik veze te nastaje šesteročlani bakar(III) metalocikl **V**. Pregradnjom metalocikla **V** nastaje triazolilni međuprodukt **VI** koji protonolizom daje konačni 1,2,3-triazolni produkt **VII** uz regeneraciju katalizatora **I** (slika 6).



Slika 6: Shematski prikaz pretpostavljenog mehanizma Cu(I) katalizirane 1,3-dipolarne alkin-azidne cikloadicije. (Prilagođeno prema referencama 9 i 13.)

2.1.2.2. Supstrati, katalizatori i reakcijski uvjeti

CuAAC reakcija, kao i brojne druge reakcije katalizirane prijelaznim metalom, odlikuje se iznimno bogatom paletom spojeva koji se mogu koristiti kao supstrati, katalizatori, otapala ili baze, čime beziznimno postaje jednim od glavnih sintetskih pristupa u suvremenoj organskoj

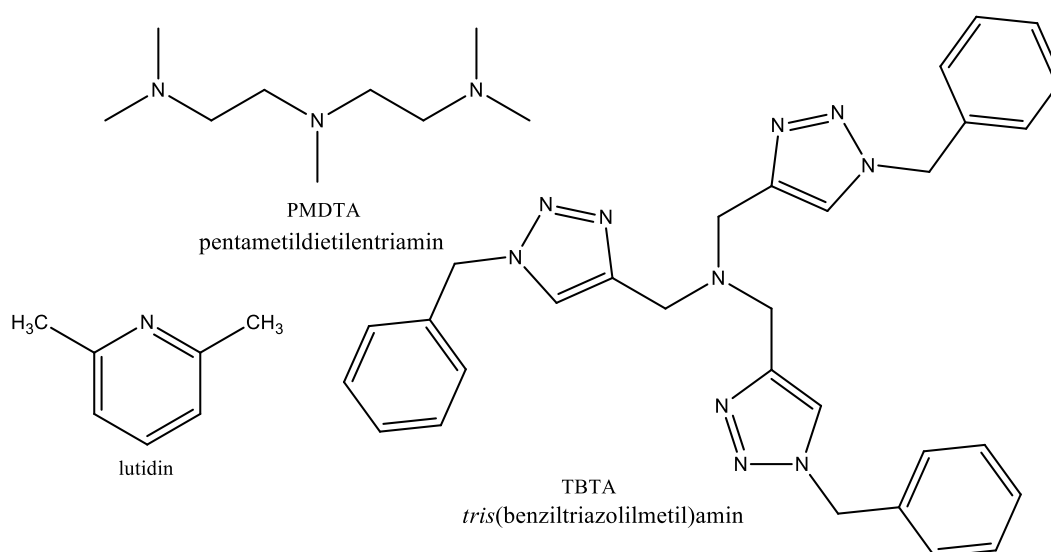
sintezi. Tako se kao supstrati mogu koristiti različiti alkini i azidi – alkilni, arilni, sulfonilni, fosforilni i dr.⁹

Odabir katalizatora u najvećoj mjeri ovisi o proučavanom sustavu i reakcijskim uvjetima. Najčešći odabir katalizatora su upravo soli i kompleksi bakra(I). S obzirom da je bakar(I) termodinamički nestabilan i lako podliježe oksidoredukcijskim reakcijama te reakcijama disproporcioniranja, potrebno je pažljivo optimirati reakcijske uvjete kako ne bi došlo do nastajanja neželjenih, sporednih produkata. Bakar(I) može se pripremiti *in situ* ili direktno uvesti u otopinu.

Za polarne supstrate najčešće se koristi metoda utemeljena na redukciji soli bakra(II) poput $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$ dobrim reducensom kao što je natrijev askorbat, gdje se *in situ* generira potrebni katalitički aktivan oblik katalizatora. Osim natrijeva askorbata, kao reducensi mogu poslužiti i hidrazin te tris(2-karboksietil)fosfin (TCEP)^{9,16}. Ova metoda ne zahtijeva deoksigeniranu atmosferu i može se izvoditi u vodenom mediju. Upotrebom vodenih otapala izbjegava se korištenje baze i zaštitnih skupina, što je dodatna prednost u biokondenzacijskim reakcijama ali i organskoj sintezi. Glavni nedostatak ove metode je redukcija bakra(II) do bakra(0), što se može izbjeći preciznim izračunom količine bakra u odnosu na redukcijsko sredstvo ili dodatkom stabilizatora bakra.

Alternativni način uvođenja katalizatora može biti i direktni dodatak soli bakra(I). U tu se svrhu najčešće koriste bakrovi(I) halogenidi poput CuI ili CuBr, no ovakav pristup zahtijeva izvođenje u deoksigeniranoj atmosferi, upotrebu otapala i baze. Štoviše, najbolji rezultati postižu se upotrebom aaminskih baza poput diizopropiletilamina (DIPEA)^{13,16} te se tako značajno smanjuje količina nusprodukata. Uporaba baze nužna je za ovakav pristup kako bi uopće mogli nastati kompleksi odgovarajućih bakrovih acetilida, što je najvjerojatnije posljedica stvaranja stabilnih klastera kod primjerice CuI.¹³ CuBr često se koristi u kemiji polimera, uz kombinaciju s pentametildietilentriaminom (PMDTA). Kao baze koriste se još i dimetiletilendiamin, trietilamin te lutidin. Nadalje, mnoga istraživanja su pokazala da je uočen pozitivan efekt katalize na čvrstoj podlozi poput korištenja zeolita¹⁷ ili nanočestica Al_2O_3 .¹⁸ U katalizi se također koriste i kompleksi bakra(I) poput $[\text{Cu}(\text{CH}_3\text{CN})_4\text{PF}_6]$, $[\text{Cu}(\text{PPh}_3)_3\text{Br}]$ ili $(\text{EtO})_3\text{P}\cdot\text{CuI}$, osobito kod reakcija u organskim otapalima gdje je slabija topljivost soli bakra(I). Mogućnost korištenja različitih liganada (slika 7) može poboljšati katalitička svojstva soli Cu(I); ligandi mogu djelovati kao akceptori protona pa nije potrebna upotreba baze. Također, štite Cu(I) od oksidacije pa reakciju nije potrebno provoditi u deoksigeniranoj atmosferi.

Najkorišteniji ligand u organskoj sintezi i biokonjugaciji je *tris*(benziltriazolilmetil) amin (TBTA). Bakar(II) također se pokazao kao vrlo učinkovit katalizator u CuAAC reakcijama, posebno Cu(OAc)₂ koji katalizira ovakve reakcija gotovo uspješno kao i Cu(I) soli.¹⁹ Budući da je poznato u literaturi²⁰ da soli bakra (II) u alkoholnim otapalima (poput MeOH, EtOH, *t*-BuOH) mogu generirati aktivnu Cu(I) vrstu potrebnu za CuAAC reakciju, u ovom Diplomskom radu kao katalizator korišten je kompleksni spoj bakra (II), [Cu(OAc)₂(H₂O)]₂ u prisutnosti metanola. Na taj način generira se aktivna Cu(I) vrsta jer dolazi do redukcije Cu(II)→Cu(I) i oksidacije alkohola u odgovarajući karbonilni spoj (aldehid ili keton).



Slika 7: Strukturne formule često upotrebljivanih liganada u CuAAC reakcijama.

(Prilagođeno prema referenci 13.)

U ovim reakcijama mogu se koristiti različita nepolarna te polarna, aprotična kao i protična otapala. Tako je uobičajeno korištenje kloroforma, diklormetana, dimetilformamida, tetrahidrofurana, acetonitrila, dimetilsulfoksida te različitih alkohola poput metanola, etanola, *tert*-butanola. Isto tako, moguće je korištenje vode u smjesi s nekim organskim otapalom, najčešće s etanolom ili *tert*-butanolom.⁹

2.2. Primjena klik-kemije

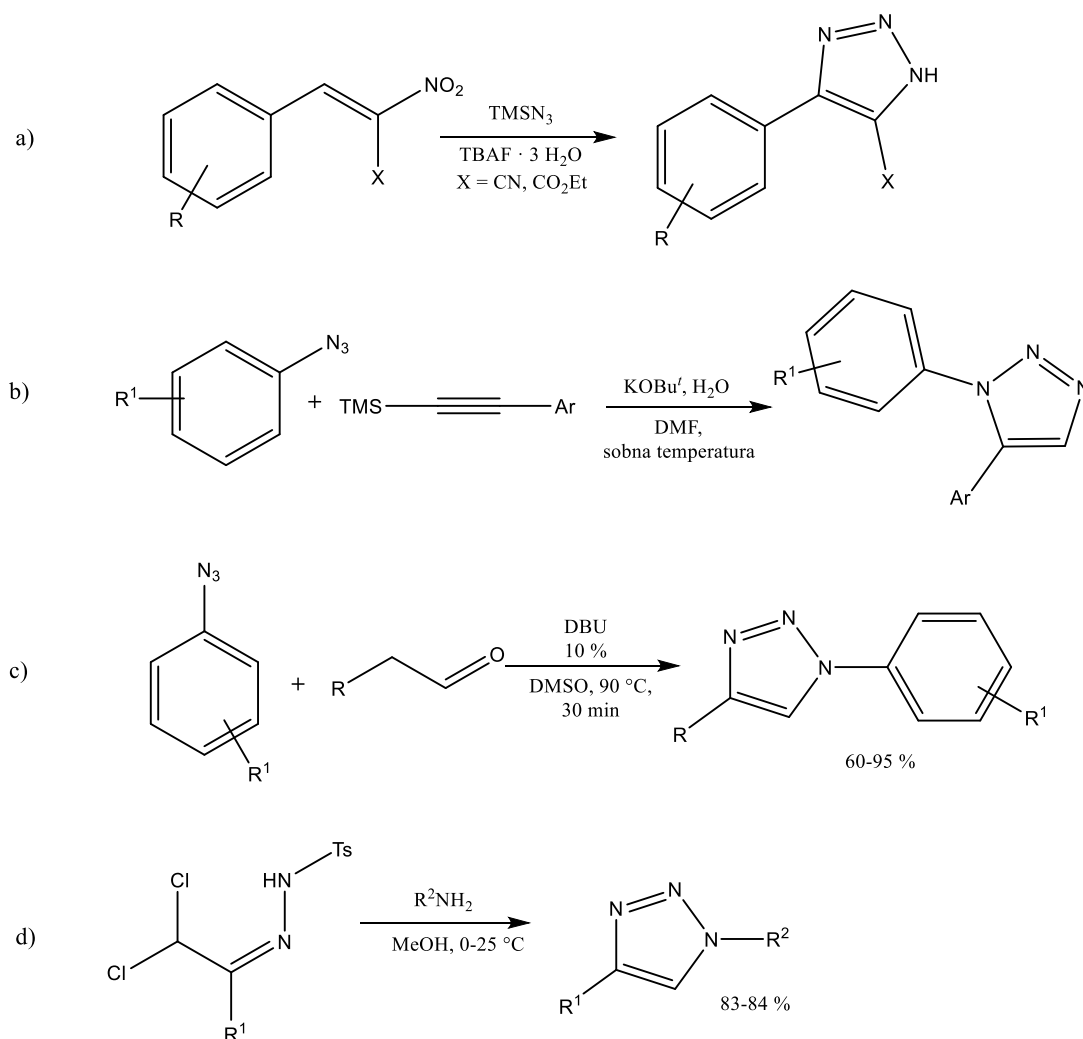
Kao što je prethodno spomenuto, klik-kemija ima iznimno široku primjenu, kako istraživačku, tako i industrijsku. Otkako se počela primjenjivati, pokazala se nezaobilaznom u različitim

područjima, od biomedicinskog područja preko kemije materijala pa do nanotehnologije i radiokemije.²¹

Triazolni prsten dobiven CuAAC reakcijama savršena je poveznica u biokondenzacijama iz nekoliko razloga. Njihova dobra topljivost u vodenom mediju otvara mogućnost *in vivo* primjene, dobri su mimetici amidne veze, ali za razliku od nje, otporni su na kiselinsku i baznu hidrolizu. Osim toga, mogu ostvarivati brojne interakcije esencijalne za biosustave, čime postaju inspiracija za sintezu mnogih biološki aktivnih derivata. Organski sintetičari u posljednje vrijeme sve više sprežu CuAAC reakciju s drugim poznatim reakcijama poput rutenijem katalizirane olefinske metateze ili intamolekulske paladijem(0) katalizirane Heckove reakcije, u svrhu dobivanja analoga kompleksnih prirodnih spojeva u što manje reakcijskih koraka. Funkcije različitih peptida poboljšane su korištenjem CuAAC reakcije, uvođenjem triazolnog prstena u strukturu koji izvrsno oponaša peptidnu vezu čime se mogu prirediti različiti inhibitori bakterijskih i virusnih proteaza²², što je od velikog značaja za farmaceutsku industriju te dizajn i razvoj novih lijekova. Posljednjih godina intenzivno se radi na usavršavanju i optimiranju klik-reakcija, pa tako upotreba mikrovalnog zračenja u sintezi bez prisutnosti otapala znatno smanjuje vrijeme izvođenja reakcija (na nekoliko minuta), te okreće ovo područje prema sve popularnijoj „zelenoj kemiji“.²³

Biokompatibilnost klik-kemije, konkretno CuAAC reakcije, prvi su pokazali Meldal i sur. prilikom sinteze peptidotriazola koristeći tehnike sinteze u čvrstom stanju uz vrlo blage reakcijske uvjete kompatibilne kemiji peptida (DIPEA, CuI, sobna temperatura), ne interferirajući sa zaštitnim skupinama poput Fmoc i Boc.¹² Otada se klik-reakcije sve češće koriste za obilježavanje različitih bioloških makromolekula, poput DNA, peptida, proteina, oligosaharida te glikokonjugata, čime se znatno olakšava proučavanje niza ključnih procesa u biološkim sustavima što vodi razvoju novih lijekova.²⁴ Zbog toksičnosti spojeva bakra, limitirana je *in vivo* primjena CuAAC reakcija pa se u novije vrijeme istraživanja usmjeravaju prema otkrivanju alternativnih metoda sinteze triazola poput SPAAC (eng. *Strain promoted alkyne azide cycloaddition*) i iEDDA reakcija²⁵ (eng. *Inverse electron demand Diels Alder*). SPAAC reakcija temelji se na kondenzaciji različitih azida s ciklooktinom kao što su dibenzilciklooktin (DBCO) ili biciklo[6.1.0]nonin (BCN) uz blage reakcijske uvjete bez upotrebe citotoksičnih spojeva bakra. No, takve reakcije dosta su sporije od CuAAC reakcija i nisu savršeno bioortogonalne jer ciklooktinski derivati mogu uzrokovati značajne perturbacije u biološkim sustavima, reagirajući s nukleofilima prisutnima u stanici i staničnoj membrani. Poboljšanje

SPAAC metode predstavlja iEDDA reakcija, čiji je prototip reakcija između *trans*-ciklooktena i tetrazina bez prisutnosti katalizatora. Takve reakcije znatno su brže od SPAAC i CuAAC reakcija, no zbog veličine reaktanata također se mogu narušiti intrinzična svojstva biomolekula nakon modifikacije obilježavanjem.²⁵⁻²⁶ Obje metode imaju prednosti i nedostatke, ali svakako su obećavajuće za daljnja istraživanja. U svrhu primjene klik-reakcija u biosustavima, danas su razvijene brojne sintetske metode dobivanja raznih triazola bez uporabe katalizatora u blagim uvjetima, uz dobra do visoka iskorištenja. Tako je moguće prirediti 1,2,3-triazolne derivate iz odgovarajućih 2-aril-1-karboksietilnitroetena ili 2-aril-1-cijanonitroetena u prisutnosti azidotrimetilsilana uz tetrabutilamonijev fluorid kao katalizator bez dodatka otapala (slika 8a). Poznata je također i bazom potpomognuta cikloadicija trimetilsililnih alkina s arilnim azidima kojom nastaju 1,5-disupstituirani triazoli pri sobnoj temperaturi. (slika 8b)²⁷ Bazno katalizirana cikloadicija različitih supstituiranih aldehida s aril-azidima regioselektivno daje 1,4-disupstituirane triazole uz odlična iskorištenja (slika 8c). 1,4-triazolne derivate moguće je prirediti i iz tosilhidrazona i primarnih amina u vrlo dobrim iskorištenjima²⁸ (slika 8d).



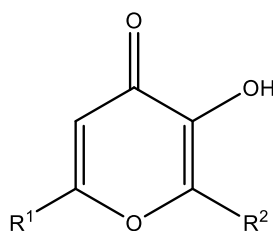
TMS= trimetilsilil
 TBAF= tetrabutilamonijev fluorid
 DBU = 1,8-diazabicyklo[5.4.0]undek-7-en
 Ts = tosil

Slika 8: Shematski prikaz alternativnih metoda sinteze različitih 1,2,3-triazolnih derivata (tzv. „copper-free” pristup). (Prilagođeno prema referencama 26-27.)

Klik-kemija primjenjuje se i u kemiji materijala, unaprijedivši sinteze različitih polimera, u prvom redu zvjezdastih polimera, blok-kopolimera i dendrimera. Osim što su omogućile jednostavnu funkcionalizaciju različitih polimera te tako proširile njihovu primjenu, klik-reakcije olakšale su pročišćavanje u takvim reakcijama, pospješile iskorištenja, a dobiveni materijali bili su znatno čišći od onih dobivenih korištenjem uobičajenih reakcija.²²

2.3. Hidroksipiran-4-oni – strukturne karakteristike i svojstva

Hidroksipiranoni pripadaju skupini heterocikličkih nezasićenih molekula s hidroksilnom skupinom u *ortho* položaju u odnosu na karbonilnu skupinu (slika 9). Takav relativni položaj ovih dvaju skupina čini ih dobrim kelatirajućim agensima koji tvore mnoštvo uglavnom neutralno nabijenih, stabilnih kompleksa s različitim metalnim ionima. Najznačajniji predstavnici hidroksipiranona su 3-hidroksipiran-2-oni i 3-hidroksipiran-4-oni. Zajednička karakteristika ovih spojeva je relativno laka funkcionalizacija, pa se vrlo jednostavno mogu prevesti u odgovarajuće tio-derivate ili njima srodne spojeve, hidroksipiridinone.²⁹



spoj	R ¹	R ²
maltol	H	CH ₃
allomaltol	CH ₃	H
etil-maltol	H	CH ₂ CH ₃
mekonična kiselina	CO ₂ H	CO ₂ H
piromekonična kiselina	H	H
komenična kiselina	CO ₂ H	H

Slika 9: Strukturne formule najznačajnijih pripadnika skupine hidroksipiran-4-ona.

Jedan od vrlo zanimljivih spojeva iz skupine hidroksipiran-4-ona je i maltol koji se odlikuje vrlo niskom toksičnošću i biodostupnošću, ali i antioksidativnim svojstvima^{4,30} pa se često koristi kao polazni spoj za sintezu biološki aktivnih spojeva. Kao što je prethodno spomenuto, maltol može tvoriti različite stabilne komplekse s mnoštvom metalnih iona, a od osobitog je značaja kompleks maltola s Fe³⁺, zbog potencijalne primjene u liječenju anemije. Za liječenje anemije često su preporučeni lijekovi na bazi kompleksa željeza(II), no Fe(II) se lako oksidira do Fe(III) u fiziološkim uvjetima, pa su potrebne velike doze da bi se postigao terapijski učinak. Budući da je Fe³⁺ podložan hidrolizi i precipitaciji u fiziološkim uvjetima, vrlo je problematično modulirati procese ključne u metabolizmu željeza. Kompleksi maltola i

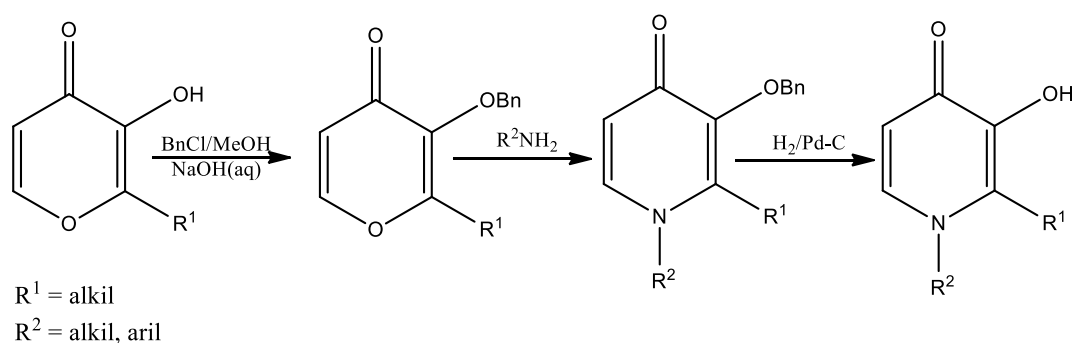
njegovog bliskog analoga, etil-maltola s Fe^{3+} , pokazali su pozitivan učinak na biodostupnost i apsorpciju, ali i na transport iona željeza s $\text{Fe}(\text{maltol})_3$ na transferin.⁴ Maltol je moguće izolirati iz kore ariša i borovih iglica, ali i sintetizirati u laboratoriju iz komercijalno dostupnih kemikalija. Prvu laboratorijsku sintezu maltola, premda u vrlo malom iskorištenju, izveo je Spielmann³¹ Mannichovom reakcijom piromekonične kiseline s formaldehidom i piperidinom, a zatim redukcijom uz paladij na ugljiku. Mnogo bolja metoda pripreme maltola je iz furfurilnog alkohola (1-(furan-2-il)etan-1-ol) sekvencijalnim reakcijama oksidacije i pregradnje koja se odvija uz 70 % iskorištenje.³²

Bliski strukturni analog maltola, kojičnu kiselinu, proizvode različite bakterijske i gljivične kulture poput *Aspergillus*, *Penicillium* ili *Acetobacter* vrsta, no moguće ju je izolirati i iz biljke planike.²⁹ Jedna od najčešćih primjena kojične kiseline je u kozmetičkoj industriji, gdje se koristi u proizvodima za izbjeljivanje kože.³³ Kojična kiselina poznati je kompetitivni inhibitor tirozinaze, enzima odgovornog za sintezu melanina i stvaranje tamnih mrlja na koži. Tirozinaza je metaloenzim, te posjeduje dva bakrova iona različitih oksidacijskih stanja (Cu^+ i Cu^{2+}) u aktivnom mjestu koja stvaraju stabilan kompleks s kojičnom kiselinom na položajima 4 i 5, što je i glavni uzrok inhibicije.³⁴

2.3.1. Sintetske strategije u kemiji hidropsipiran-4-ona

Zahvaljujući svojoj jedinstvenoj strukturi, hidropsipiranoni i njihovi strukturni analozi mogu se funkcionalizirati na mnoštvo različitih načina, što im omogućuje vrlo široku primjenu, posebno u sintezi biološki aktivnih derivata. Zbog izrazito snažnog rezonancijskog učinka hidroksilne skupine u baznim uvjetima, najreaktivniji položaji piranonskog prstena su položaji 2 i 6, gdje se može odvijati enolna kemija poput aldolne kondenzacije ili Mannichove reakcije. Sumporovi analozi hidropsipiranona mogu se pirediti iz odgovarajućih piran-4-ona upotrebom Lawessonova reagensa ili uz dodatak suviška P_4S_{10} . Hidropsipiran-4-oni su polazni spojevi za sintezu hidropsipiridin-4-ona, njihovih dušikovih analoga koji se odlikuju također širokim spektrom bioloških aktivnosti. Reakcijom hidropsipiran-4-ona s amonijakom, primarnim aminima ili aminokiselinama moguće je dobiti odgovarajuće hidropsipiridin-4-onske derivate zagrijavanjem u autoklavu, no iskorištenja takvih reakcija vrlo su mala. Poboljšanje se može postići dodatkom *p*-TsOH kao katalizatora.³⁵⁻³⁶ Jedna od metoda koja se provodi za uspješno priređivanje hidropsipiridinona i njihovih derivata je tzv. Harrisova metoda koja se sastoji od nekoliko uzastopnih koraka. Najprije se uvede benzilna zaštita na položaj 3 odgovarajućeg hidropsipiranonskog derivata (maltol ili etil-maltol) i u idućem korak uz dodatak primarnog

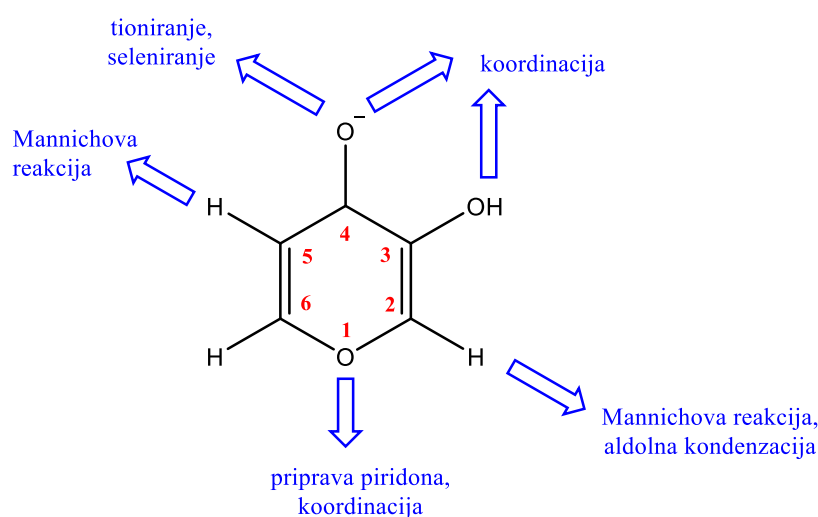
amina nastaje zaštićeni hidroksipiridinonski derivat iz kojeg se u posljednjem koraku hidrogenolizom uklanja benzilna zaštita i dobiva finalni produkt³⁶ (slika10).



Slika 10: Shematski prikaz Harrisove metode za pripremu derivata hidroksipiridin-4-ona.

Prilagođeno prema referanci 36.

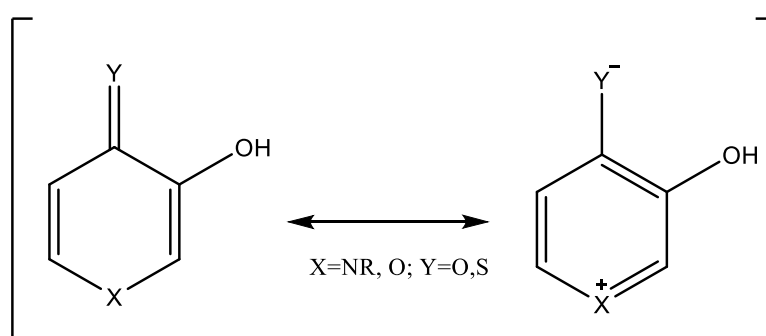
Kojična kiselina ima istu okosnicu kao i drugi hidroksipiranonski derivati, no na položaju 5 sadrži hidroksimetilnu skupinu koja otvara dodatne mogućnosti derivatizacije. Na tom položaju može se oksidirati uz pomoć npr. Jonesova reagensa do karboksilnih kiselina ili se uz tionil klorid prevodi do klorkojične kiseline. Klorkojična kiselina može reagirati s mnoštvom nukleofila poput amina, azida, alkoksidnih aniona, fenoskidnih aniona i dr., što omogućuje pripremu spektra različitih spojeva s različitim svojstvima i potencijalnim biološkim učinkom. Pod uvjetom da su pozicije 2 i 5 zaštićene, može se provesti i Mannichova reakcija na položaju 6 (slika 11).³⁵



Slika 11: Shematski prikaz mogućih sintetskih transformacija hidroksipiran-4-ona.

(Prilagođeno prema referenci 35.)

Hidroksipiranoni i hidroksipiridinoni tvore brojne stabilne komplekse s mnoštvom metalnih kationa različitih oksidacijskih stanja. Najproučavaniji kompleksi su oni koje tvore s M^{3+} ionima, konkretno kompleksi željeza(III), aluminja(III), galija(III) te indija(III). To su najčešće kompleksi tipa ML_3 , koji se obično priređuju dodatkom odgovarajućeg hidroksipiranonskog ili hidroksipiridinonskog liganda u otopinu soli odgovarajućeg metala, najčešće pri $pH > 7$ kako bi se osiguralo da ligandi budu u anionskom obliku.²⁹ Sposobnost navedenih spojeva da tvore komplekse s metalnim kationima, odnosno bidentatnost može se objasniti njihovim *zwitterionskim*, pseudoaromatskim karakterom³⁵ (slika 12).



Slika 12: Rezonantne strukture 3-hidroksi-4(tio)pir(idin)ona.

(Prilagođeno prema referenci 35.)

§ 3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. Materijali i metode

Sve kemikalije i reagensi korišteni prilikom izrade ovog diplomskog rada bili su analitičke čistoće. Sva otapala upotrijebljena su bez dodatnog pročišćavanja. Prilikom izvedbe eksperimenata korištene su mnoge komercijalno dostupne kemikalije: 3-hidroksi-2-metilpiran-4-on (maltol, *Sigma Aldrich*), kalijev karbonat (K_2CO_3 , *Kemika*), propargil-bromid (*Sigma Aldrich*) 3-(trifluorometil)anilin (*Sigma Aldrich*), anilin (*Sigma Aldrich*), 96 %-tna sumporna kiselina (H_2SO_4 , *Fluka*), *p*-toluensulfonska kiselina (*p*-TsOH, *Merck*), 5-hidroksi-2-hidroksimetilpiran-4-on (kojična kiselina, *SigmaAldrich*), natrijev jodid (NaI, *Sigma Aldrich*), natrijev nitrit ($NaNO_2$, *Sigma Aldrich*), natrijev azid (NaN_3 , *Sigma Aldrich*), tetrakis- μ -(acetato)diakvadibakar(II) ($[Cu(OAc)_2(H_2O)]_2$, *Kemika*), bezvodni natrijev sulfat (Na_2SO_4 , *Merck*), bezvodni magnezijev sulfat ($MgSO_4$, *Acros Organics*), acetonitril (MeCN, *Sigma Aldrich*), etil-acetat (EtOAc, *Fluka*), metanol (MeOH, *Fluka*), diklormetan (DCM, *Lach-Ner*), heksan (*Kemika*), prethodno pripravljeni adamantan-1-il azid.

Tijek reakcija praćen je tankoslojnom kromatografijom na pločicama silikagela (60 F254, 0,25 mm, *Fluka*) uz detekciju UV lampom pri valnoj duljini pobude $\lambda = 254$ nm te reverzibilnim vezanjem joda. Reakcije su praćene u različitim sustavima otapala, što će biti detaljnije opisano u daljnjim odlomcima. Pripravljeni spojevi pročišćeni su kromatografijom na stupcu silikagela veličine zrna 0,063 -0,200 mm (*Sigma Aldrich*).

Svi sintetizirani spojevi karakterizirani su pomoću NMR spektroskopije i spektrometrije masa (MS). 1H i ^{13}C NMR spektri snimljeni su na BrukerAdvance III HD spektrometru frekvencije 400 MHz u NMR cjevčicama promjera 5 mm pri $T = 298$ K. Spektri su snimljeni prema tetrametilsilanu kao unutarnjem standardu, a kao otapala korišteni su deuterirani dimetilsulfoksid (DMSO- d_6), deuterirani kloroform ($CDCl_3$) te deuterirani metanol (CD_3OD). Spektri masa snimljeni su na instrumentu Agilent 6410, uz ionizaciju elektroraspršenjem.

Pripravljenim triazolnim derivatima određene su i temperature tališta (gdje je bilo moguće) na uređaju *Büchi Melting Point B-545* u otvorenim kapilarama te su za svaki uzorak napravljena 3 mjerenja. Dobivene temperature tališta nisu korigirane.

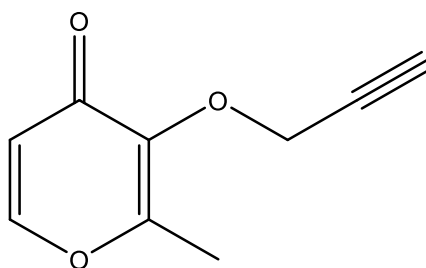
3.2. Priprava propargiliranih hidroksipiran-4-ona

3.2.1. Općeniti postupak propargiliranja

U okruglu tikvicu, postavljenu na magnetsku miješalicu i uronjenu u uljnu kupelj, dodaju se odgovarajući 3-hidroksipiran-4-on (maltol, kojična kiselina), suhi acetonitril i kalijev karbonat. Reakcijskoj smjesi se, nakon kratkog miješanja, polagano doda propargil-bromid i nastavi miješati uz refluks otapala. Na hladilo se postavi klor-kalcijeva cijev radi očuvanja suhих uvjeta potrebnih za provođenje ove reakcije. Tijek reakcije praćen je tankoslojnom kromatografijom uz detekciju UV lampom pri $\lambda = 254$ nm. Nakon završetka reakcije, reakcijska smjesa profiltrira se preko sinter lijevka, zaostali talog ispere se acetonitriplom, a matičnica se upari do suha na rotacijskom uparivaču pri čemu zaostaje talog produkta.

3.2.1.1. 2-metil-3-(prop-2-in-1-iloksi)piran-4-on (**1**)

U okruglu tikvicu od 100 mL dodaju se maltol (1 g, 7,93 mmol), suhi acetonitril (25 mL) i kalijev karbonat (1,63 g, 11,9 mmol). Zatim se doda propargil-bromid (1060 μ L, 11,9 mmol) i reakcija se miješa najprije 3h uz refluks otapala. Tijek reakcije praćen je tankoslojnom kromatografijom u etil-acetatu. Nakon ukupno 24 h, reakcijska smjesa obradi se prema postupku opisanom u poglavlju 3.2.1. Dobiven je spoj **1** u obliku žutosmeđeg ulja (1,11 g, 85 %, slika 13). $R_f = 0,45$ (etil-acetat).



Slika 13: Strukturna formula spoja **1**.

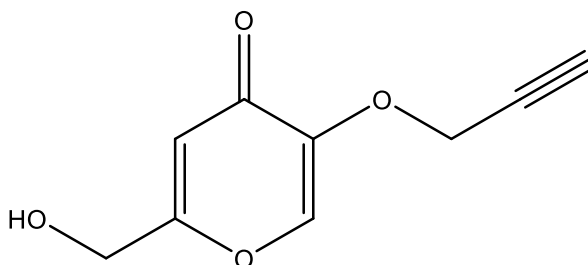
$^1\text{H NMR}$ (CDCl_3) δ / ppm: 7,63 (d, 1H, H6, $J = 5,66$ Hz); 6,34 (d, 1H, H5, $J = 5,66$ Hz); 4,87 (d, 2H, CH_2 , $J = 2,42$ Hz); 2,43 (t, 1H, CH, $J = 2,42$ Hz); 2,38 (s, 1H, CH_3).

$^{13}\text{C NMR}$ (CDCl_3) δ / ppm: 174,67 (C=O), 160,68 (C-2), 153,62 (C-6), 142,81 (C-3), 117,10 (C-5), 78,99 (CH, propargil), 75,60 (C, propargil), 58,66 (CH_2), 15,27 (CH_3).

ESI-MS: m/z 165,0 [$\text{M}+\text{H}^+$]

3.2.1.2. 2-(hidroksimetil)-5-(prop-2-in-1-iloksi)piran-4-on (**2**)

U reakcijsku tikvicu (100 mL) dodaju se redom kojična kiselina (0,51 g, 3,52 mmol), suhi acetonitril (15 mL) i kalijev karbonat (0,73 g, 5,28 mmol). Zatim se dodaju još i propargilbromid (5,28 mmol, 471 μ L), te natrijev jodid (0,21 g, 1,41 mmol). Reakcijska smjesa miješa se 24 h uz refluks otapala. Tijek reakcije praćen je tanksoljnom kromatografijom u sustavu otapala etil-acetat/metanol 5:1, v/v. Nakon završetka reakcije, reakcijska smjesa obrađena je prema prethodno opisanom postupku (poglavlje 3.2.1.). Smeđi talog spoja **2** dodatno je pročišćen kromatografijom na stupcu silikagela, pri čemu je kao eluens korištena smjesa otapala etil-acetat/metanol 5:1 v/v. Spojene čiste frakcije uparene su do suha na rotacijskom uparivaču i dobiven je spoj **2** u obliku svijetlosmeđe krutine (0,3 g, 51 %, slika 14). $R_f = 0,54$ (etil-acetat/ metanol 5:1 v/v).



Slika 14: Strukturna formula spoja **2**.

$^1\text{H NMR}$ (CDCl_3) δ / ppm: 7,81 (s, 1H, C-6); 6,54 (s, 1H, C-3); 4,73 (d, 2H, CH_2 , $J = 2,40$ Hz); 4,49 (d, 2H, $J = \text{Hz}$); 2,57 (t, 1H, CH, $J = 2,40$ Hz).

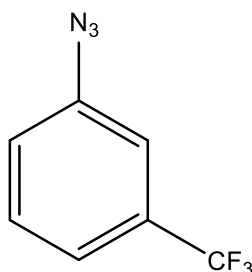
$^{13}\text{C NMR}$ (CDCl_3) δ / ppm: 175,16 (C=O), 167,93 (C-2), 145,67 (C-5), 143,26 (C-6), 112,34 (C-3), 77,22 (C, propargil), 60,68 (CH_2OH), 57,86 (CH_2).

ESI-MS: m/z 181,0 [$\text{M}+\text{H}^+$]

3.3. Priprava azida

3.3.1. Priprava 3-(trifluormetil)fenilazida (**3**)

Otopini *p*-toluensulfonske kiseline monohidrata (2,12 g, 11,16 mmol) u destiliranoj vodi (11 mL) doda se 3-(trifluormetil)anilin (155 μ L) i smjesa se kratko promiješa. Zatim se postupno dodaje bezvodni natrijev nitrit (0,77 g, 11,16 mmol) u manjim obrocima kroz 5 minuta. Reakcijska smjesa miješa se 30-35 minuta na sobnoj temperaturi. Nakon toga, reakcijskoj smjesi doda se natrijev azid (0,13 g, 1,98 mmol) i smjesa se miješa još 25-30 minuta na sobnoj temperaturi. Tijek svakog koraka reakcije praćen je tankoslojnom kromatografijom uz smjesu otapala dikormetan/heksan 5:1, *v/v*. Reakcijska smjesa obrađena je ekstrakcijom na slijedeći način: sadržaj tikvice prebačen je u lijevak za ekstrakciju i razrijeđen s jednakim volumenom destilirane vode (11 mL), zatim slijedi ekstrakcija etil-acetatom (3 \times 30 mL). Spojeni organski ekstrakti isperu se dodatno destiliranom vodom (2 \times 30 mL) te suše na bezvodnom natrijevom sulfatu. Etil-acetat većim je dijelom uparen na rotacijskom uparivaču, te je smjesa spoja **3** i ostatka etil-acetata korištena u daljnjim sintezama uz pretpostavku da je reakcija bila kvantitativna. Dobiveni spoj **3** tekućina je žute boje, čuva se u hladnjaku, dobro začepljen. $R_f = 0,79$ (DCM/heksan 5:1, *v/v*).



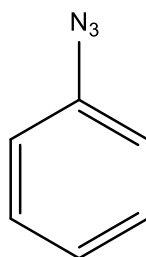
Slika 15: Strukturna formula spoja **3**.

$^1\text{H NMR}$ (CDCl_3) δ / ppm: 7,48 (t, 1H, H-Ar, $J = 7,8$ Hz); 7,40 (d, 1H, H-Ar, $J = 7,8$ Hz); 7,24 (s, 1H, H-Ar), 7,21 (d, 1H, H-Ar, $J = 8,0$ Hz).

$^{13}\text{C NMR}$ (CDCl_3) δ / ppm: 141,03 (C- N_3), 132,54, 132,21 (C- CF_3), 130,34, 122,18 (2 \times CH, Ar), 121,59, 121,46 (CH, Ar); 116,05, 116,02 (CH, Ar).

3.3.3 Priprava fenil-azida (**4**)

Anilin (250 μL , 2,8 mmol) suspendira se u destiliranoj vodi (2 mL). Slijedi dodatak koncentrirane sumporne kiseline (560 μL) u manjim obrocima, uz hlađenje reakcijske smjese na ledenoj kupelji. Reakcijskoj se smjesi kap po kap doda otopina natrijeva nitrita (0,21 g, 3,05 mmol) u destiliranoj vodi (1,24 mL). Nakon par minuta miješnja, doda se 4 mL heksana. Zatim se pažljivo doda (kap po kap) otopina natrijeva azida (0,15 g, 2,8 mmol) u vodi (1 mL). Nakon dodataka svih potrebnih komponenti, reakcijska smjesa miješa se 2 h uz hlađenje. Tijek reakcije praćen je tankoslojnom kromatografijom u sustavu otapala diklormetan/heksan 5:1 v/v. Nakon završetka reakcije, reakcijska smjesa ekstrahira se s diklormetanom (20 mL) i ispere s dodatnih 20 mL destilirane vode. Spojeni organski ekstrakti suše se na bezvodnom magnezijevom sulfatu i nakon filtriranja otapalo se upari pomoću rotacijskog uparivača. Dobiveni spoj **4** tekućina je žute boje (163,4 mg, 49 %, slika 16), te je za daljnje sintetske korake korišten bez dodatnog pročišćavanja. $R_f = 0,8$ (DCM/heksan 5:1, v/v).



Slika 16: Strukturna formula spoja **4**.

$^1\text{H NMR}$ (DMSO- d_6) δ / ppm: 7,44-7,39 (m, 2H, H-Ar); 7,22-7,18 (t, 1H, H-Ar); 7,13-7,11 (m, 2H, H-Ar).

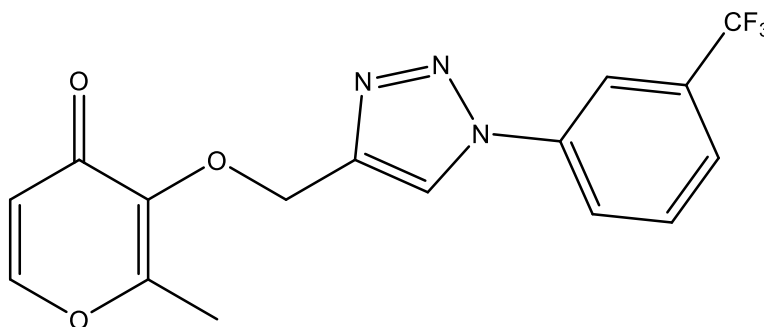
$^{13}\text{C NMR}$ (DMSO- d_6) δ / ppm: 139,21 (C-N₃), 129,91, 125,03, 118,97 (5 \times CH, Ar).

3.4. Priprava derivata triazola klik-reakcijama

Svi triazolni derivati priređeni su na isti način, korištenjem aparature za zagrijavanje uz povrat, osim spoja **5** i **6** koji su pripremljeni u autoklavu zbog prirode 3-(trifluormetil)fenilazida. Vrijeme trajanja reakcije te uvjeti eluiranja navedeni su u daljnjem tekstu.

3.4.1. 2-metil-3-((1-(3-(trifluormetil)fenil)-1,2,3-triazol-4-il)-metoksi)-piran-4-on **5**

Priređeni azid **3** otopi se u metanolu (15 mL) te se dodaju spoj **1** (204 mg, 1,24 mmol) i katalizator $[\text{Cu}(\text{OAc})_2(\text{H}_2\text{O})]_2$ (4 mg, 0,02 mmol). Nakon 24 h, doda se nova količina katalizatora (4 mg, 0,02 mmol) i reakcija se miješa dodatnih 48 sati u autoklavu pri temperaturi 60 °C. Napredovanje reakcije praćeno je tankoslojnom kromatografijom u etil-acetatu. Nakon ukupno 72 h, reakcijska smjesa je uparena i propuštena kroz stupac silikagela pri čemu je kao eluens korišten etil-acetat. Nakon kromatografije (etil-acetat) i rekromatografije (gradijentno eluiranje: etil-acetat → etil-acetat/metanol 5:1, v/v) dobiven je čisti spoj **5** u obliku žutog ulja (155,7 mg, 36 %, slika 17); $R_f = 0,29$ (etil-acetat).



Slika 17: Strukturna formula spoja **5**.

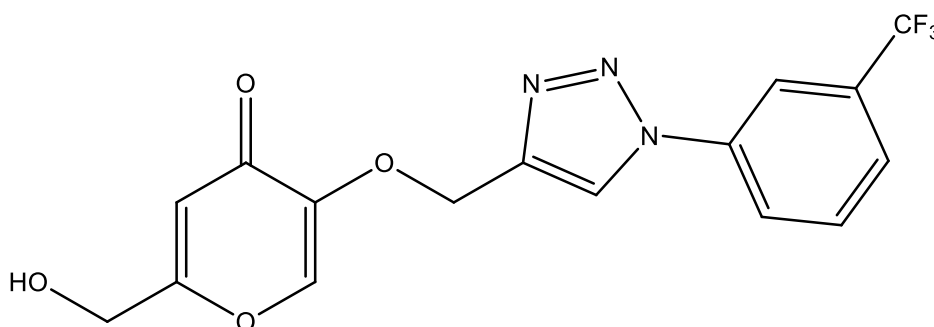
$^1\text{H NMR}$ (CD_3OD) δ / ppm: 8,77 (s, 1H, H-triazol); 8,22 (br s, 1H, H-Ar); 8,18-8,14 (m, 2H, H-Ar); 7,96 (d, 2H, H₆, $J = 5,6$ Hz); 7,92-7,89 (m, 2H, H-Ar); 7,81-7,80 (m, 2H, H-Ar); 6,43 (d, 2H, H₅, $J = 5,6$ Hz); 5,29 (s, 2H, CH₂); 2,15 (s, 3H, CH₃).

$^{13}\text{C NMR}$ (CD_3OD) δ / ppm: 177,36 (C=O); 162,98 (C-2), 156,85 (C-6); 146,03, 144,71, 138,82 (C-3, C-fenil, C-triazol); 133,56, 130,67, 129,35, 126,67 (CF₃); 132,24 (CH, Ar); 126,7, 126,64 (CH, Ar); 125,03 (CH, Ar); 124,34 (CH, triazol); 118,30, 117,34 (CH, Ar); 117,57 (C-5); 65,11 (CH₂); 15,05 (CH₃).

ESI-MS: m/z 374,2 [$\text{M}+\text{Na}$]

3.4.2. 2-(hidroksimetil)-5-((1-(3-(trifluormetil)fenil)-1,2,3-triazol-4-il)metoksi)-piran-4-on **6**

Priređeni azid **3** otopi se u metanolu (10 mL) u što se doda propargilirana kojična kiselina, spoj **2** (109,1 mg, 0,61 mmol) te katalizator $[\text{Cu}(\text{OAc})_2(\text{H}_2\text{O})]_2$ (2,6 mg, 0,01 mmol). Reakcija se provodi u autoklavu uz miješanje 24 h pri temperaturi 60 °C. Tijek reakcije praćen je tanksoljnom kromatografijom u etil-acetatu. Nakon 24 h, reakcijska smjesa je uparena i podvrgnuta pročišćavanju kromatografijom na stupcu silikagela, uz etil-acetat kao mobilnu fazu. Spojene čiste frakcije uparene su na rotacijskom uparivaču. Dobiven je spoj **6** u obliku bijele krutine (141,7 mg, 64 %, slika 18); $R_f = 0,11$ (etil-acetat).



Slika 18: Strukturna formula spoja **6**.

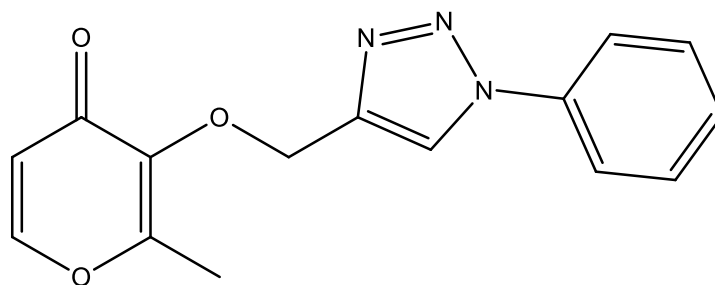
$^1\text{H NMR}$ (CD_3OD) δ / ppm: 8,85 (s, 1H, H-triazol); 8,21 (s, 1H, H₆); 8,22 (br s, 1H, H-Ar); 8,18-8,15 (m, 1H, H-Ar); 7,82-7,80 (m, 2H, H-Ar); 6,53 (s, 1H, H₃); 5,23 (s, 2H, CH₂); 4,43 (d, 2H, $J = 0,8$ Hz, CH₂OH).

$^{13}\text{C NMR}$ (CD_3OD) δ / ppm: 176,94 (C=O); 170,97 (C-2); 148,11, 145,44, 138,85 (C-5, C-fenil, C-triazol); 143,96 (C-6); 133,52, 133,19 (CCF₃); 132,24 (CH, Ar); 126,69 126,65 (CH, Ar); 125,06 (CH, Ar); 124,29 (CH-triazol); 118,37, 118,33 (CH, Ar); 111,20 (C-3); 62,05 (CH₂OH); 59,22 (CH₂).

ESI-MS: m/z 390,2 [M+Na]

3.4.3. 2-metil-3-((1-fenil-1,2,3-triazol-4-il)-metoksi)-piran-4-on **7**

Priređeni fenil azid **4** otopi se u metanolu (25 mL) i doda se spoj **1** (330 mg; 2,8 mmol). Slijedi dodatak katalizatora, $[\text{Cu}(\text{OAc})_2(\text{H}_2\text{O})]_2$ (12,2 mg; 0,06 mmol) i reakcija se miješa uz refluks metanola tijekom 96h. Napredovanje reakcije praćeno je tanksoljnom kromatografijom u etil-acetatu. Nakon završetka reakcije, reakcijska smjesa uparena je do suha, a čisti triazolni produkt izoliran je kromatografijom na stupcu silikagela uz eluiranje etil-acetatom. Nakon kromatografije, dobiven je spoj **7** u obliku bijele krutine (108 mg, 14 %, slika 19); $R_f = 0,29$ (etil-acetat).



Slika 19: Strukturna formula spoja 7.

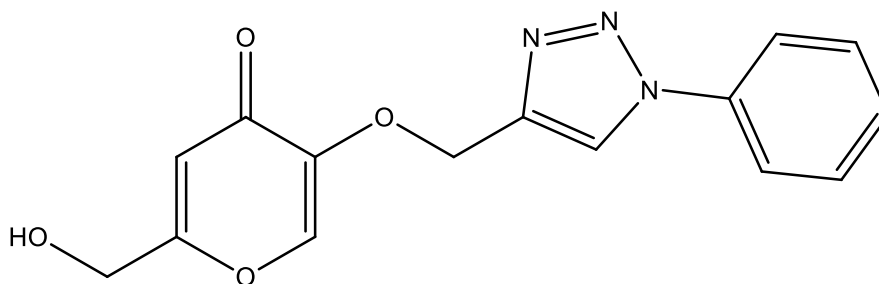
$^1\text{H NMR}$ (DMSO- d_6) δ / ppm: 8,91 (s, 1H, H-triazol); 8,06 (d, 2H, H6, $J = 5,7$ Hz); 7,92-7,89 (m, 2H, H-Ar); 7,62-7,58 (m, 2H, H-Ar); 7,52-7,47 (m, 1H, H-Ar); 6,39 (d, 2H, H5, $J = 5,4$ Hz); 5,12 (s, 2H, CH₂); 2,13 (s, 3H, CH₃).

$^{13}\text{C NMR}$ (DMSO- d_6) δ / ppm: 174,39 (C=O); 160,08 (C-2), 155,60 (C-6); 144,36, 143,24, 137,02 (C-3, C-fenil, C-triazol); 130,40, 129,22, 120,56 (5 \times CH, Ar); 123,46 (CH, triazol); 116,97 (C-5); 64,01 (CH₂); 14,97 (CH₃).

ESI-MS: m/z 306,2 [M+Na]

3.4.4. 2-(hidroksimetil)-5-((1-fenil-1,2,3-triazol-4-il)metoksi)-piran-4-on 8

Otopini spoja **4** (73,8 mg; 0,62 mmol) u metanolu (11 mL) doda se spoj **2** (111,6 mg, 0,62 mmol) i katalizator [Cu(OAc)₂(H₂O)]₂ (2,7 mg, 0,01 mmol). Reakcijska smjesa zagrijava se uz povrat uz miješanje 24 h. Tijek reakcije praćen je tankoslojnom kromatografijom (etil-acetat). Nakon 24 h, otapalo se upari na rotacijskom uparivaču, a produkt je pročišćen kromatografijom na koloni (etil-acetat) i dobiven je spoj **8** u obliku bijele krutine. (121, 7 mg, 66 %, slika 20); $R_f = 0,15$ (etil-acetat).



Slika 20: Strukturna formula spoja 8.

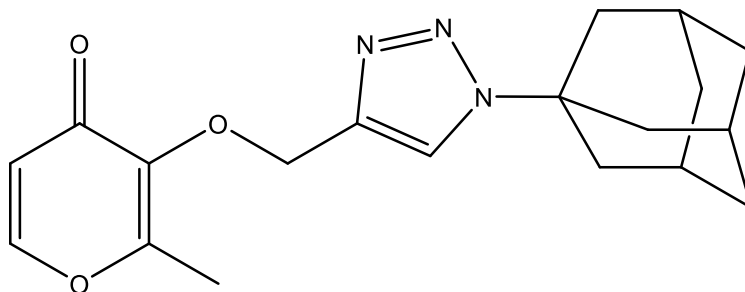
$^1\text{H NMR}$ (DMSO- d_6) δ / ppm: 8,95 (s, 1H, H-triazol); 8,27 (s, 1H, H6,); 7,92 (d, 2H, H-Ar, $J = 7,7$ Hz); 7,63-7,59 (m, 2H, H-Ar); 7,51 (t, 1H, H-Ar, $J = 7,4$ Hz); 6,34 (s, 1H, H3); 5,13 (s, 2H, CH₂); 4,31 (s, 2H, CH₂OH).

$^{13}\text{C NMR}$ (DMSO- d_6) δ / ppm: 173,08 (C=O); 168,10 (C-2); 146,11, 143,02, 143,46, 136,43 (C-5, C-fenil, C-triazol); 141,72 (C-6); 129,82, 128,72, 120,09 (5 \times CH, Ar); 123,15 (CH-triazol); 111,20 (C-3); 62,05 (CH₂OH); 59,22 (CH₂).

ESI-MS: m/z 322,2 [M+Na]

3.4.5. 3-((1-adamantil)-1,2,3-triazol-4-il)metoksi-2-metil-piran-4-on **9**

Spoj **1** (109 mg, mmol) otopi se u metanolu (11 mL) te se dodaju još adamantan-il-azid (117,7 mg, 0,66 mmol) i katalizator [Cu(OAc)₂(H₂O)]₂ (2,9 mg, 0,01 mmol). Reakcijska smjesa miješa se uz refluks otapala 24 h. Nakon 24 h, doda se još 11 mL metanola kao i katalizator (2,9 mg, 0,01 mmol) i reakcija se ostavi miješati dodatnih 48 h. Tijek reakcije praćen je tankoslojnom kromatografijom (etil-acetat). Nakon 72 h, reakcija je prekinuta i otapalo je upareno na rotacijskom uparivaču. Reakcijska smjesa podvrgnuta je kromatografiji na stupcu silikagela, uz gradijentno eluiranje (etil-acetat \rightarrow etil-acetat/metanol 5:1, v/v). Dobiven je spoj **9** u obliku bijele krutine (154,3 mg, 68 %, slika 21); $R_f = 0,22$ (etil-acetat).



Slika 21: Strukturna formula spoja **9**.

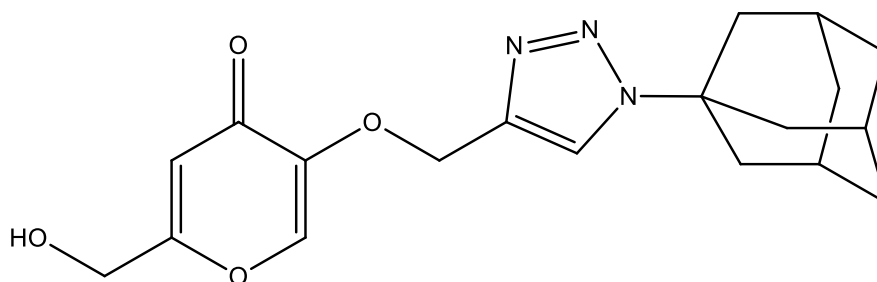
$^1\text{H NMR}$ (DMSO- d_6) δ / ppm: 8,27 (s, 1H, H-triazol); 8,04 (d, 2H, H6, $J = 5,7$ Hz); 6,36 (d, 2H, H5, $J = 5,7$ Hz); 5,08 (s, 2H, CH₂); 2,18 (br s, 3H, H β -Ad); 2,16 (br s, 6H, H γ -Ad); 2,01 (s, 3H, CH₃); 1,73 (t, 6H, H α -Ad, $J = 2,7$ Hz).

$^{13}\text{C NMR}$ (DMSO- d_6) δ / ppm: 173,85 (C=O); 159,53, 142,66, 142,08 (C-2, C-3, C-triazol); 154,98 (C-6); 121,39 (CH, triazol); 116,36 (C-5); 63,76 (CH₂); 58,89 (C, Ad); 42,13 (CH₂, Ad- γ); 35,20 (CH₂, Ad- α); 28,79 (CH, Ad- β); 14,26 (CH₃).

ESI-MS: m/z 364,3 [M+Na]

3.4.6. 5-((adamant-1-il)-1,2,3-triazol-4-il)metoksi)-2-(hidroksimetil)-piran-4-on **10**

U tikvicu se dodaju spoj **2** (101 mg, 0,56 mmol), adamantan-1-il-azid (98,4 mg; 0,56 mmol) otopljeni u metanolu (10 mL) te katalizator, $[\text{Cu}(\text{OAc})_2(\text{H}_2\text{O})]_2$ (2,4 mg; 0,01 mmol). Reakcijska smjesa miješa se uz refluks otapala tijekom ukupno 96 h. Nakon 24 h od postavljanja reakcije, dodaju se dodatne količine otapala (3 mL) i katalizatora (5 mg; 0,03 mmol). Napredovanje reakcije praćeno je tankoslojnom kromatografijom u etil-acetatu. Nakon 96 h, reakcijska smjesa obrađena je na sljedeći način: otapalo je upareno na rotacijskom uparivaču i smjesa je pročišćena kromatografijom na stupcu silikagela uz gradijentno eluiranje (etil-acetat → etil-acetat/metanol 5:1, v/v). Dobiven je spoj **10** u obliku bijele krutine (61,6 mg, 31 %; slika 22); R_f (etil-acetat) = 0,24.



Slika 22: Strukturna formula spoja **10**.

$^1\text{H NMR}$ (DMSO- d_6) δ / ppm: 8,34 (s, 1H, H-triazol); 8,24 (s, 1H, H6); 6,32 (s, 1H, H3); 4,98 (s, 2H, CH_2); 4,30 (d, 2H, CH_2OH , $J = 5,8$ Hz), 2,18 (br s, 9H, $\text{H}\beta\text{-Ad}$, $\text{H}\gamma\text{-Ad}$); 1,74 (s, 6H, $\text{H}\alpha\text{-Ad}$).

$^{13}\text{C NMR}$ (DMSO- d_6) δ / ppm: 172,97 (C=O); 168,01 (C-2); 146,36, 141,24 (C-5, C-triazol), 140,90 (C-6); 121,57 (CH-triazol); 111,05 (C-3); 62,19 (CH_2); 59,24 (C, Ad); 42,13 (CH_2 , Ad- γ); 35,19 (CH_2 , Ad- α); 28,80 (CH, Ad- β).

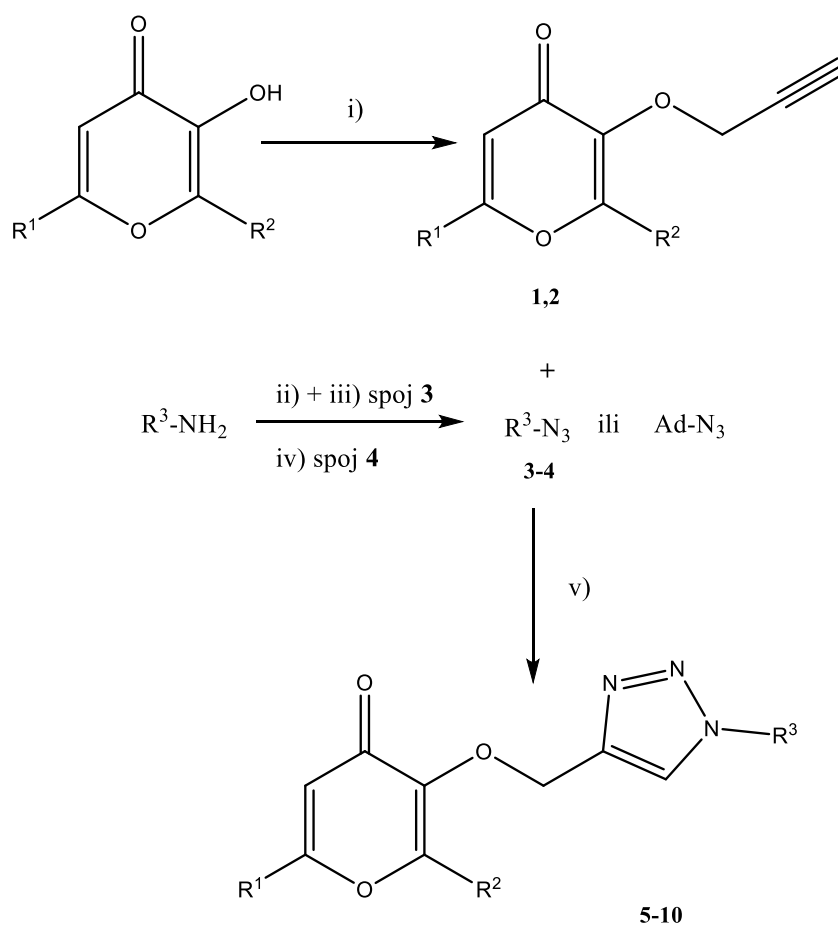
ESI-MS: m/z 380,3 [M+Na]

§ 4. REZULTATI I RASPRAVA

4.1. Uvod

U sklopu ovog diplomskog rada prikazana je sinteza 6 potpuno novih triazolnih derivata hidroksipiran-4-ona te je nekima od njih ispitan antitumorski učinak *in vitro*. Spojevi **5-10** pripremljeni su poznatom klik-reakcijom, točnije Huisgenovom bakrom kataliziranom 1,3-dipolarnom cikloadicijskom reakcijom. U takvim reakcijama iz terminalnog alkina i azida regioselektivno nastaje 1,4-disupstituirani 1,2,3-triazolni produkt. Prilikom pripreme ciljnih molekula **5-10** korišten je konvergentni pristup sintezi, što znači da su zasebno pripremljeni alkinski prekursori, kao i azidni prekursori koji su potom kondenzirani (slike 23 i 24). Alkinski prekursori **1** i **2** dobiveni su iz maltola i kojične kiseline, reakcijom propargiliranja uz prisutnost baze, u klasičnim uvjetima Williamsonove sinteze etera. Aromatski azidi **3** i **4** pripremljeni su iz odgovarajućih anilinskih derivata, uz nastanak dijazonijeve soli kao međuprodukta.

Modifikacija odabranih hidroksipiran-4-ona uvođenjem triazolne podjedinice u strukturu odabrana je zbog povećanja biološke aktivnosti tih spojeva³, te su varirani supstituenti na triazolnoj podjedinici u nadi pronalaska struktura s optimalnim biološkim učinkom. Adamantilna podjedinica vrlo je čest strukturni motiv u spojevima koji pokazuju širok spektar bioloških aktivnosti i u brojnim slučajevima ima pozitivan utjecaj na njezino povećanje.⁵⁻⁶ Nadalje, zbog svoje lipofilnosti ostvaruje povoljne interakcije s membranskim fosfolipidnim dvoslojem, čime se znatno olakšava njezin prolazak kroz membranu, a time i unos u stanicu. S obzirom da je nedavno ispitana biološka aktivnost nitro-derivata triazola³, uvođenje trifluormetilfenilnog supstituenta na triazolni prsten pokazao se kao logičan odabir jer je ta skupina po svojim elektronskim svojstvima dobar analog nitro-skupine. Također, njezina prisutnost ima utjecaja i na ostvarivanje različitih inter- i intramolekulskih interakcija, lipofilnost i kiselinsko-bazna svojstva³⁷ što je od velikog značaja za proučavanje biosustava. Fenilni supstituent odabran je kako bi se proučio utjecaj samog aromatskog prstena na biološku aktivnost, te supstituenata na istom.

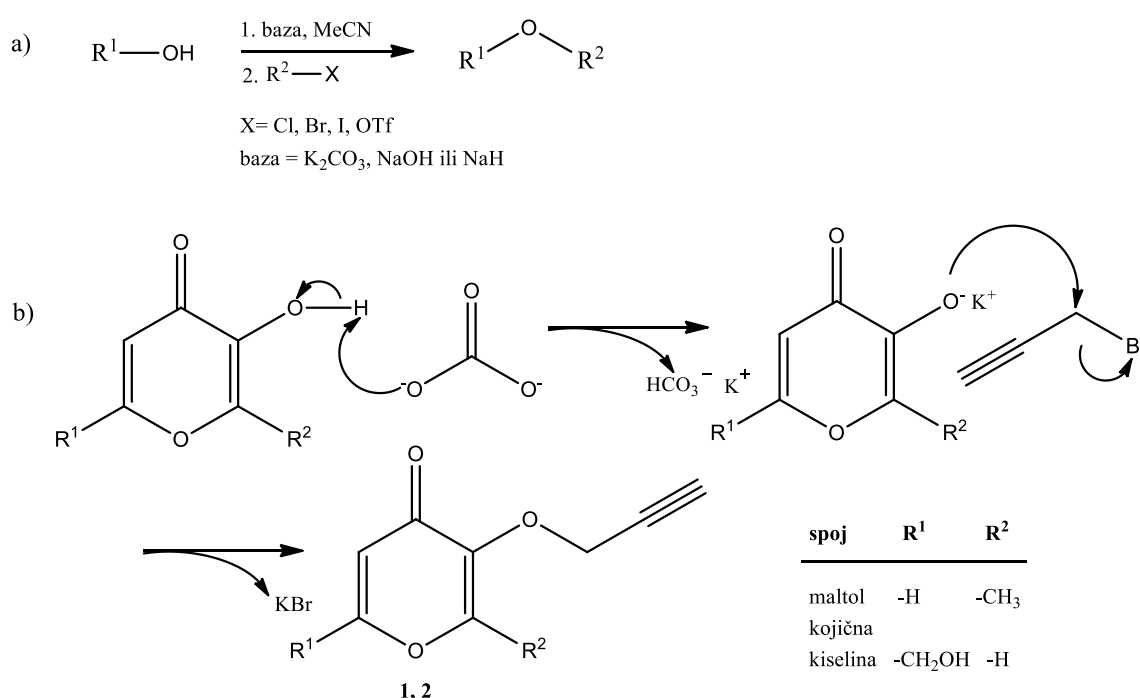


spoj	R ¹	R ²	R ³	t/h
1	-H	-CH ₃	-	
2	-CH ₂ OH	-H	-	
3	-	-	3-(trifluormetil)fenil	
4	-	-	fenil	
5	-H	-CH ₃	3-(trifluormetil)fenil	72
6	-CH ₂ OH	-H	3-(trifluormetil)fenil	24
7	-H	-CH ₃	fenil	96
8	-CH ₂ OH	-H	fenil	24
9	-H	-CH ₃	adamantan-1-il	72
10	-CH ₂ OH	-H	adamantan-1-il	96

Slika 23: Shematski prikaz sinteze ciljnih molekula **5-10**. i) HC≡CCH₂Br, K₂CO₃, suhi CH₃CN, 24 h, Δ; spoj **3**: ii) NaNO₂, *p*-TsOH, H₂O, 30-35 min, 25 °C; iii) NaN₃, H₂O, 25-30 min, 25 °C; spoj **4**: iv) konc. H₂SO₄, NaNO₂(aq), NaN₃(aq), C₆H₆, H₂O, 2h, 0°C; v) [Cu(OAc)₂(H₂O)]₂, MeOH, 60 °C.

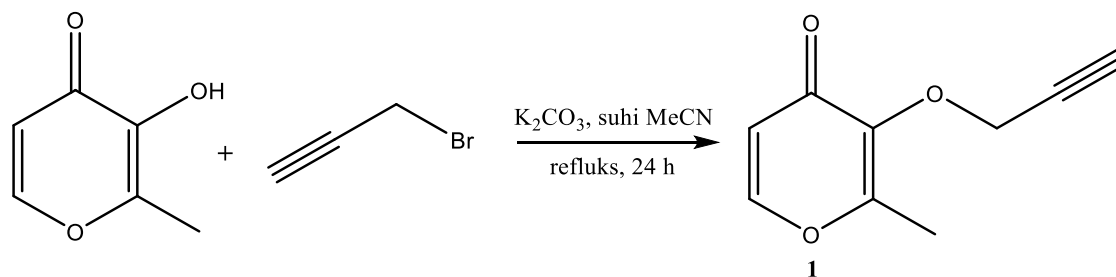
4.2. Priprava propargiliranih prekursora 1 i 2

Williamsonova sinteza etera jedan je od najpoznatijih i najjednostavnijih načina priprave etera. Radi se o reakciji nukleofilne supstitucije koja se odvija poznatim S_N2 mehanizmom (slika 24) gdje nukleofilni alkoksidni anion nastao deprotonacijom alkohola bazom (najčešće NaOH, K_2CO_3 ili NaH) reagira najčešće s primarnim alkil-halogenidom ili triflatom (dobre izlazne skupine). U slučaju sekundarnih alkil-halogenida ili triflata, dolazi do sporednih eliminacijskih reakcija.³⁸ Odabir baze i otapala ovisi o prirodi polaznih spojeva.



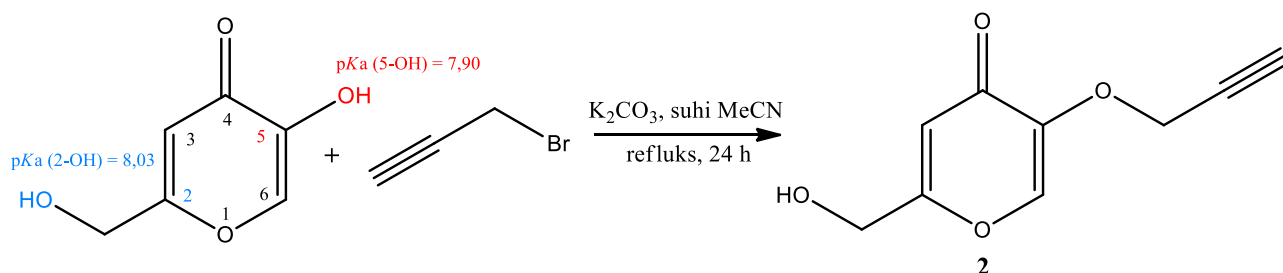
Slika 24: a) Općenita shema Williamsonove sinteze etera, b) mehanizam reakcije na primjeru spojeva pripremljenih u ovome radu.

Terminalni alkini potrebni za klik-reakciju pripremljeni su iz odabranih hidrokspiran-4-ona, maltola i kojične kiseline, Williamsonovom sintezom etera gdje je kao baza korišten kalijev karbonat. Baza deprotonira hidroksilnu skupinu maltola i generira nukleofilni alkoksidni anion koji u S_N2 reakciji s propargil-bromidom daje željeni spoj **1** (slike 24 i 25). Obje reakcije provedene su u suhim uvjetima (suhi MeCN), uz zadovoljavajuća iskorištenja (redom 85 % i 51 %).



Slika 25: Shematski prikaz pripreve propargiliranog prekursora 1.

Za razliku od maltola, kojična kiselina ima dva potencijalna reakcijska centra, odnosno dvije hidroksilne skupine podložne deprotonaciji (na položajima 2 i 5) i prema tome mogu nastati dva različita alkoksidna aniona. Budući da su hidroksilne skupine kojične kiseline različite kiselosti,⁵ pogodnim odabirom baze može se utjecati na regiokemijski ishod reakcije. U ovom slučaju, odabir kalijevog karbonata kao baze rezultira deprotonacijom kiselije hidroksilne skupine na položaju 5 piranonskog prstena (slika 26).



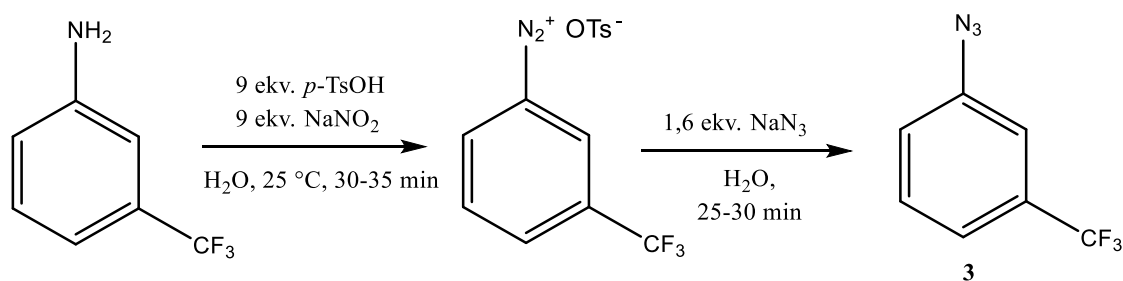
Slika 26: Shematski prikaz pripreve propargiliranog prekursora 2.

Dodatak natrijeva jodida ubrzava i pospešuje ovu reakciju jer dolazi do izmjene jodida s bromidom iz alkil-halogenida, te se na taj način *in situ* dobiva mnogo reaktivniji spoj. S obzirom da se prilikom S_N2 reakcija generira negativni naboj na izlaznoj skupini u koraku koji određuje brzinu reakcije, brže reakcije će biti na onim skupinama koje mogu bolje prihvatiti taj negativni naboj. Drugim riječima, jakost konjugirane kiseline izlazne skupine govori nam o tome koje će izlazne skupine biti bolje, tako u slučaju halogenida vrijedi sljedeće pravilo: $I^- > Br^- > Cl^- > F^-$.³⁹

4.3. Priprava aromatskih azida 3 i 4

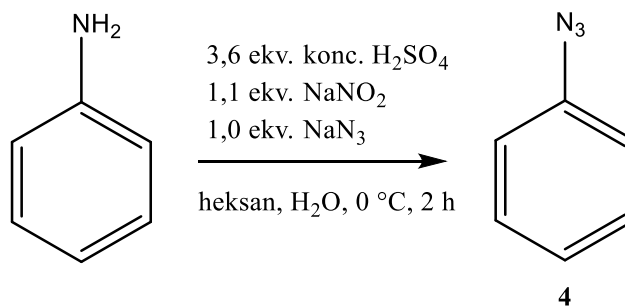
Aromatski azidi 3 i 4 pripremljeni su na dva različita načina. Azid 3 pripremljen je iz odgovarajućeg anilinskog derivata u dva koraka. U prvom je koraku u prisutnosti *para*-toluensulfonske kiseline i natrijeva nitrita anilinski derivat preveden u aril-diazonijev tosilat, a

reakcija se odvija aril-kationskim mehanizmom. U drugom koraku, dolazi do nukleofilne aromatske supstitucije natrijevim azidom uz izlazak dušika (slika 27). Ova metoda ima niz prednosti, od kojih treba istaknuti jednostavnu i brzu obradu reakcije smjese jer nije potrebno izolirati aril-diazonijeve soli (engl. *one pot reaction*)⁴⁰ čime se značajno utječe na ukupni prinos reakcije. Također, blagi reakcijski uvjeti dodatna su prednost ove metode – kao otapalo koristi se voda, a reakcija se provodi pri sobnoj temperaturi. Unatoč svim prednostima ove metode, bilo je dosta izazovno prirediti spoj **3** zbog njegove (ne)stabilnosti. Nakon nekoliko pokušaja, pronađeno je optimalno vrijeme za izvođenje drugog koraka reakcije (ne smije biti niti prekratko niti predugo), te same obrade reakcijske smjese i uvjeta uparavanja. Takav pristup upotrijebljen je zbog izrazito niskog vrelišta spoja **3** te je u sljedećim sintetskim koracima (klik-reakcijama) korišten u svježe uparenom obliku i bez dodatnog pročišćavanja na koloni.



Slika 27: Shematski prikaz pripreme spoja **3** iz odgovarajućeg anilina.

Ipak, ova metoda nije se pokazala učinkovitom za priređivanje fenilazida (**4**) zbog nastanka različitih neželjenih nusprodukata.⁴⁰ Snižavanjem temperature na 5 °C može se prirediti fenilazid ovom metodom, uz solidan prinos od 67 %.⁴⁰ Fenilazid (**4**) priređen je na alternativni način, prema literaturno opisanom postupku⁴¹ kojim ga je moguće pripremiti u vrlo visokom iskorištenju (98 %) i bez dodatnog pročišćavanja (slika 28). Unatoč tome, u našem slučaju nije postignut takav prinos (49 %), što bi se najvjerojatnije moglo pripisati (ne)stabilnosti azida **4** koji upravo zbog toga zahtijeva vrlo pažljivo rukovanje. Isto tako, idući sintetski korak nije bio proveden isti dan, što bi također mogao biti bitan faktor za niži prinos reakcije. Uzevši u obzir fizikalna i kemijska svojstva spoja **4**, bilo bi potrebno dodatno istražiti metode njegove pripreme ili optimirati uvjete reakcije kako bi se dobio što čišći spoj u što većem prinosu.



Slika 28: Shematski prikaz priprave spoja **4** iz odgovarajućeg anilina.

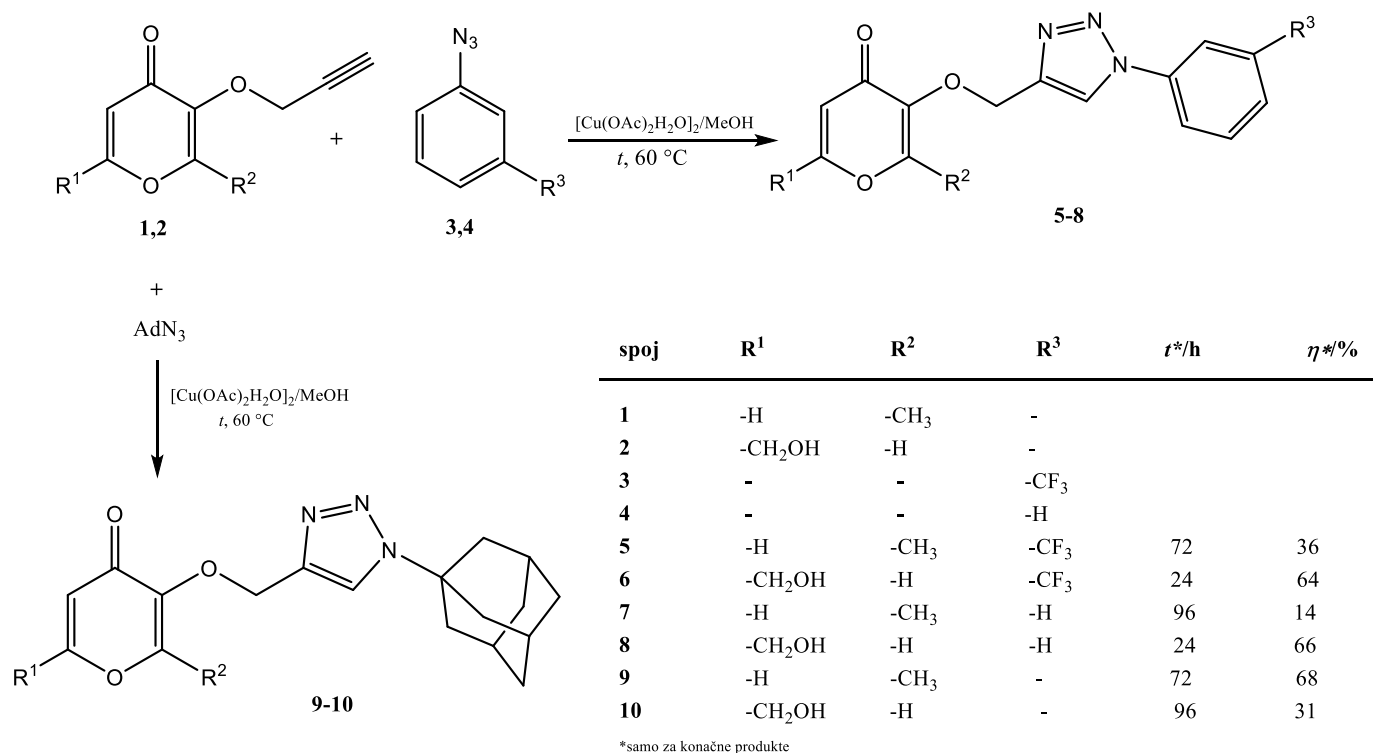
Strukture oba azida potvrđene su ^1H NMR i ^{13}C NMR spektroskopijom, te tankoslojnom kromatografijom usporedbom s uzorkom standarda.

4.4. Priprava 1,2,3-triazola klik-reakcijama

Provedeno je ukupno šest klik reakcija u kojima su kao alkinska komponenta korišteni spojevi **1** i **2**, a kao azidna komponenta spojevi **3** i **4** te adamantan-il-azid. Sve reakcije provedene su u metanolu, uz prisutnost $[\text{Cu}(\text{OAc})_2\text{H}_2\text{O}]_2$ kao katalizatora te su rezultirale nastankom ciljnih spojeva **5-10** (slika 30). Svi ciljni spojevi **5-10** podvrgnuti su pročišćavanju kolonskom kromatografijom radi postizanja što veće čistoće potrebne za biološka testiranja.

Prinosi za provedene klik-reakcije bili su vrlo dobri do umjereni za spojeve **5**, **6**, **8** i **9** (između 36 i 70 %) no spojevi **7** i **10** pripremljeni su uz vrlo male prinose koji redom iznose 14 % i 31 %. U slučaju spoja **5**, vrlo mali prinos je vjerojatno posljedica velikih gubitaka uslijed pročišćavanja, konkretno rekromatografije i uočeno je da se spoj **5** vrlo sporo eluira s kolone, odnosno da se najvjerojatnije snažno veže na punilo silikagel. U svrhu poboljšanja prinosa, treba posebno modificirati korak pročišćavanja isprobavanjem različitih otapala, kao i sustava otapala te naći optimalan sustav koji bi u ovom slučaju dao bolje rezultate. Također, s obzirom da je nakon same sinteze spoja **5** ostalo dosta neizreagirano spoja **1**, potrebno je optimirati količine polaznih spojeva za klik-reakciju ili pronaći bolje otapalo koje je slične polarnosti kao metanol, ali ima niže vrelište zbog nestabilnosti polaznog azida **3**. Isto tako, za ovu metodu priprave triazola, predviđeno trajanje reakcije je između 3,5 h i 24 h,⁴² a svaka od navedenih reakcija u kojoj je zabilježeno izrazito malo iskorištenje trajala je između 72 i 96 h, što može sugerirati da je potrebno naći bolju metodu za priređivanje tih spojeva. To posebno vrijedi u slučaju spojeva **7** i **10**, gdje je svaka klik-reakcija trajala čak 96 h, čak i uz dodatak katalizatora u više obroka. Za triazolne derivate (**6** i **8**) pripremljene u vrlo dobrim prinosima, duljina trajanja

reakcije iznosila je 24 h, a spoj **9** je unatoč trajanju reakcije od 72 h bio pripravljen u zadovoljavajućem prinosu (68 %).



Slika 29: Shematski prikaz priprave triazolnih derivata **5-10**.

Bez obzira na to, priređena je dovoljna količina spojeva **5-10** potrebna za njihovu identifikaciju spektroskopskim i spektrometrijskim tehnikama, kao i za biološka testiranja. Strukture svih spojeva potvrđene su ¹H NMR i ¹³C NMR spektroskopijom, spektrometrijom masa te tankoslojnom kromatografijom usporedbom s uzorkom standarda.

4.5. Biološka testiranja pripravljenih triazolnih derivata

Trima triazolnim derivatima pripravljenima u ovome radu (spojevi **6**, **7** i **9**) ispitan je antitumorski učinak *in vitro* na staničnim linijama karcinoma debelog crijeva (HTC116), dojke (MCF7), pluća (NCI-H460), gušterače (PANC-1) i leukemije (THP-1). Kao kontrolne stanice korištene su normalne stanice humanih fibroblasta pluća (NHLF). Dobiveni rezultati izraženi kao IC₅₀ vrijednosti u jedinicama množinske koncentracije, u našem slučaju u μmol/dm³(μM),

prikazani su u tablici 1. Dva od tri ispitana spoja, **7** i **9**, pokazali su umjeren, ali selektivan učinak na stanice pluća. Valja istaknuti da niti jedan od ispitanih spojeva ne pokazuje citotoksičnost prema normalnim stanicama (NHLF).

Tablica 1: IC₅₀ vrijednost (μM) spojeva ispitanih na pet tumorskih staničnih linija

OZNAKA SPOJA	HTC116	MCF-7	NCI- H460	PANC-1	THP-1	NHLF
6	>100	>100	>100	>100	>100	>100
7	>100	>100	19,4	>100	>100	>100
9	>100	>100	14,8	>100	>100	>100
Staurosporine	0,08	0,18	0,26	0,18	0,03	<0.005

U nastavku istraživanja potrebno je ispitati antitumorski učinak preostalih spojeva pripremljenih u ovome radu. Ova su istraživanja dio šireg projekta kojem je cilj prirediti zadovoljavajući broj triazolnih derivata hidoksipiran-4-ona i ispitati njihov antitumorski učinak na istim staničnim linijama. Dobiveni rezultati poslužit će za izgradnju QSAR (*Quantitative Structure-Activity Relationship*) modela koji povezuju strukturne odlike spojeva s njihovom biološkom aktivnošću. Nakon identifikacije molekulskih svojstva s najvećim utjecajem na aktivnost istraživane klase spojeva pristupit će se dizajnu novih spojeva te u konačnici sintezi onih kojima QSAR modeli predviđaju najbolju aktivnost.

§ 5. ZAKLJUČAK

- Propargiliranjem odabranih hidroksipiran-4-ona, maltola i kojične kiseline, uspješno su pripremljeni alkinski prekursori **1** i **2** za klik-reakcije.
- Uspješno su priređena dva aromatska azida: 3-(trifluormetil)fenilazid **3** i fenilazid **4**. Priprava aromatskih azida bila je vrlo izazovna zbog hlapivosti oba spoja te se nije sa sigurnošću mogao izračunati prinos ovih reakcija.
- Bakrom kataliziranim klik-reakcijama između pripremljenih alkina **1** i **2** i azida **3** i **4** te prethodno pripremljenog adamantan-1-ilazida pripremljeni su ciljni triazolni derivati **5-10** u umjerenim do vrlo dobrim prinosima. Reakcije koje su rezultirale niskim do umjerenim prinosima treba još dodatno optimirati u svrhu poboljšanja prinosa. Variranjem otapala, katalizatora i temperature moglo bi se utjecati na vrijeme trajanja klik-reakcija te bi se, uz optimiranje koraka pročišćavanja, mogao postići bolji prinos reakcija.
- Od tri ispitana spoja (**6**, **7** i **9**) spojevi **7** i **9** su pokazali umjeren *in vitro* antitumorski učinak i to selektivno na stanice raka pluća. Ispitani spojevi nisu citotoksični prema normalnim stanicama (NHLF).
- Dobiveni rezultati poslužit će za izgradnju QSAR (*Quantitative Structure-Activity Relationship*) modela koji povezuju strukturne odlike spojeva s njihovom biološkom aktivnošću u svrhu dizajna i sinteze novih derivata s poboljšanim biološkim učinkom.

§ 6. POPIS OZNAKA, KRATICA I SIMBOLA (prema potrebi)

Ad – adamantan-1-il

BCN – biciklo[6.1.0]nonin

CDCl₃ – deuterirani kloroform

CD₃OD – deuterirani metanol

CuAAC – bakrom katalizirana alkin-azidna cikloadicija (eng. *Copper catalysed Alkine Azide Cycloaddition*)

DBCO – dibenzilciklooktin

DBU – 1,8-diazabiciklo[5.4.0]undek-7-en

DCM – diklormetan

DFT –teorija funkcionala gustoće (eng. *Density functional theory*)

DIPEA – *N,N*-diizopropiletilamin

DMF – *N,N*-dimetilformamid

DMSO – dimetil-sulfoksid

DMSO-*d*₆ – deuterirani dimetil-sulfoksid

EtOAc – etil-acetat

EtOH – etanol

iEDDA – (eng. *Inverse electron demand Diels Alder*)

KOBu^t – kalijev *tert*-butoksid

MeCN – acetonitril

MeOH – metanol

MS – spektrometrija masa

NMR – nuklearna magnetna rezonancija

PMDTA – pentametildietilentriamin

ppm – dijelova na milijun (eng. *parts per million*)

p-TsOH – *para*-toluensulfonska kiselina

QSAR – kvantitativni odnos strukture i reaktivnosti (eng. *Quantitative Structure to Activity Relationship*)

R_f – retencijski faktor

SPAAC – napetošću potpomognuta cikloadicija alkina i azida (eng. *strain-promoted azide-alkyne cycloaddition*)

TBAF – tetrabutilamonijev fluorid

TBTA – *tris*(benziltriazolilmetil) amin

TCEP – *tris*(2-karboksietil) fosfin

TLC – tanksolojna kromatografija

TMS – tetrametilsilan

TMSN₃ – trimetilsililni azid

Tf – triflat

Ts – tosilat

UV – ultraljubičasto (eng. *ultraviolet*)

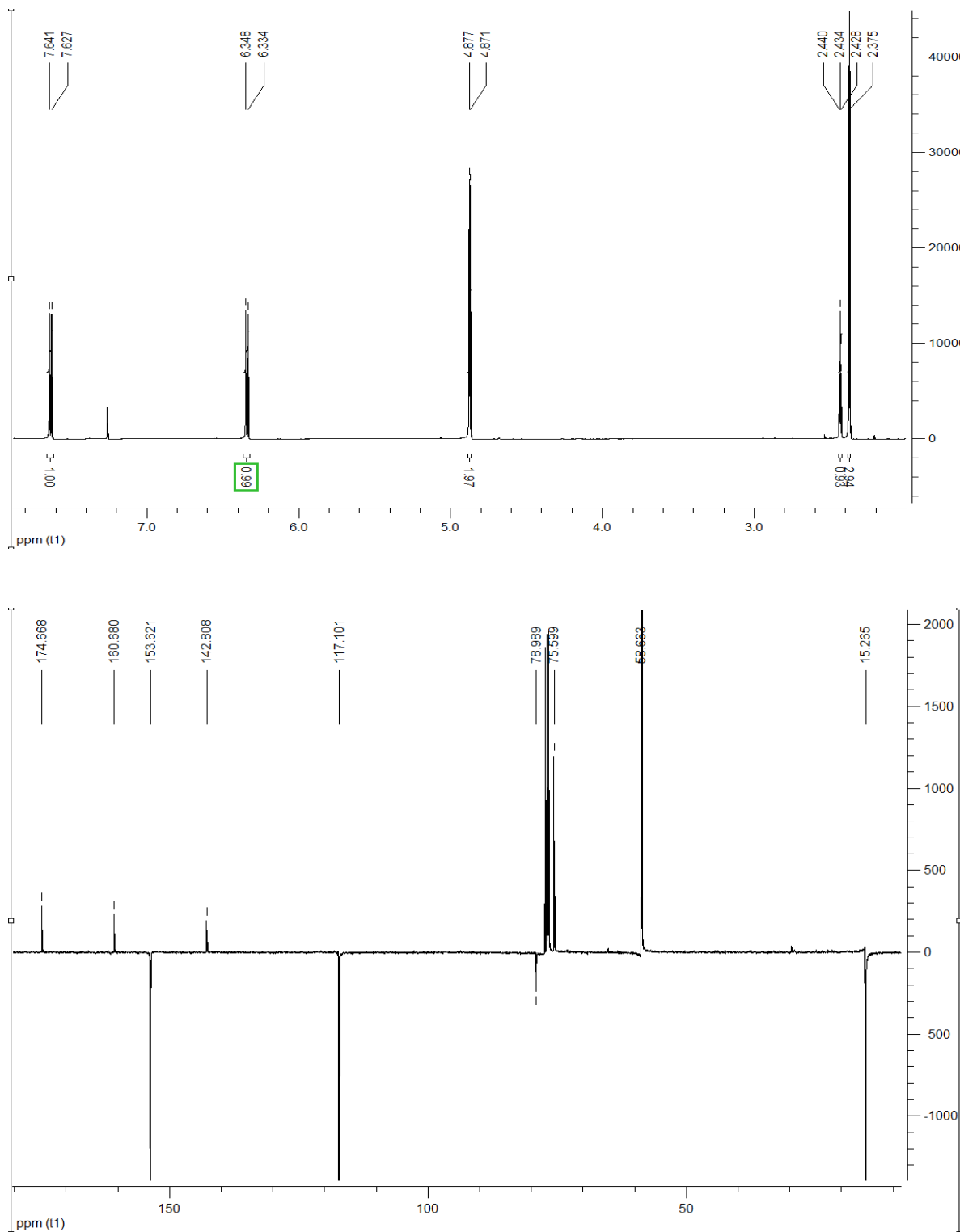
§ 7. LITERATURNI IZVORI

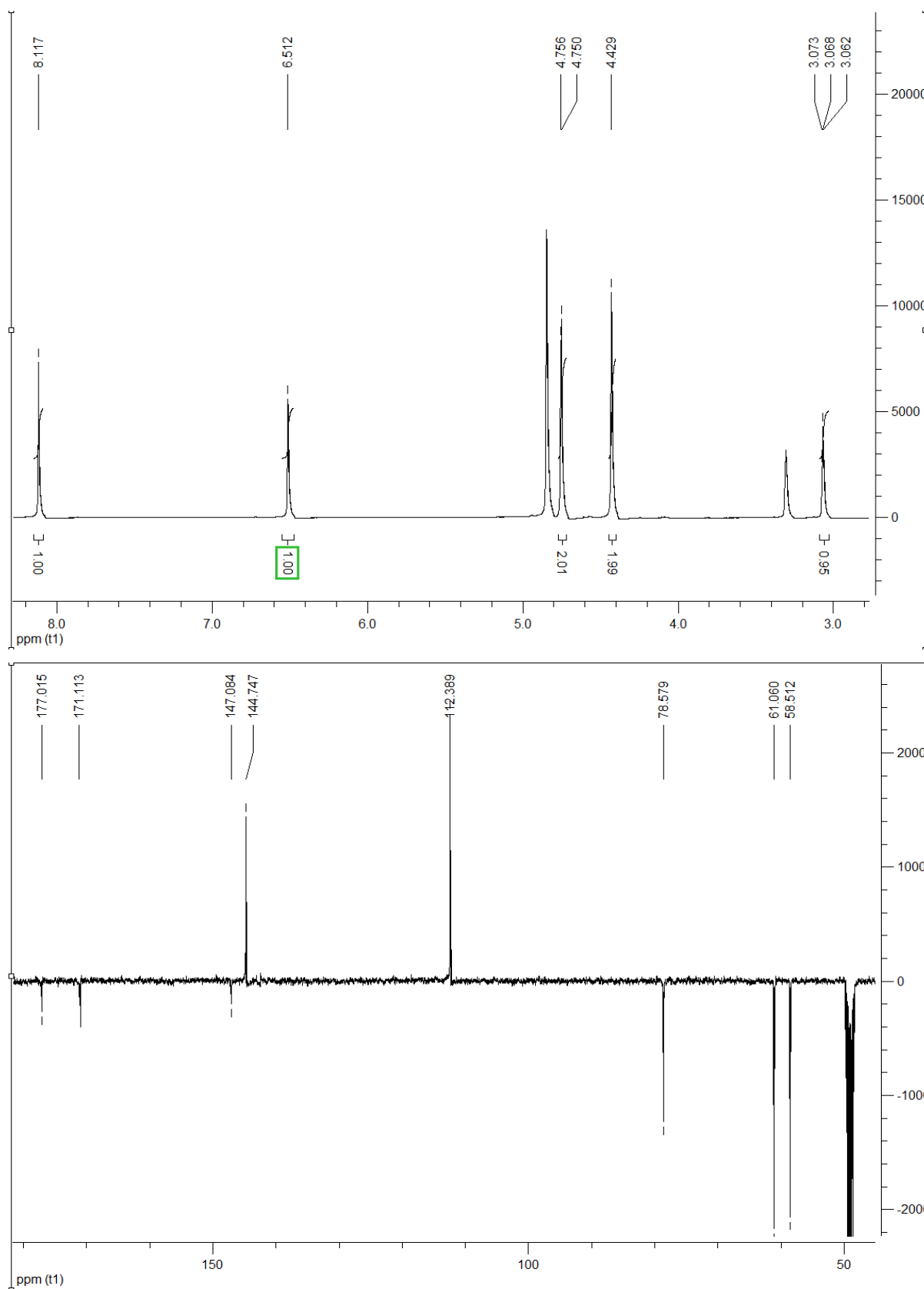
1. D. Vušak, *QSAR analiza i sinteza biološki aktivnih amino supstituiranih benzimidazo[1,2-a]kinolina*, Diplomski rad, Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu, 2014. str. 19–21.
2. D. Dheer, V. Singh, R. Shankar, *Bioorg. Chem.* **71** (2017) 30–49.
3. L. Ozdanovac, *Priprava 1,2,3-triazolnih derivata piran-4-ona iz meta- i para-nitrofenilazida i njihov biološki učinak*, Diplomski rad, Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu, 2018. str. 44, 52–53.
4. K. H. Thompson, C. A. Barta and C. Orvig, *Chem. Soc. Rev.* **35** (2006) 545–556.
5. L. Burnett, W. F. Bergfeld, D. V. Belsito, R. A. Hill, C. D. Klaassen, D. C. Liebler, J. G. Marks, R. C. Shank, T. J. Slaga, P. W. Snyder, F. A. Andersen, *Int. J. Toxicol.* **29** (2010) 244S–250S.
6. V. Petrović Peroković, A. Usenik, A. Jurić, Ž. Car, T. Opačak-Bernardi, S. Tomić, *Mol. Divers.* (2019), DOI: 10.1007/s11030-019-09948-1.
7. V. Petrović Peroković, Ž. Car, T. Opačak-Bernardi, I. Martin-Kleiner, M. Kralj, S. Tomić, *Mol. Divers.* **21** (2017) 881–891.
8. H. C. Kolb, M. G. Finn, K. B. Sharpless, *Angew. Chem. Int. Ed.* **40** (2001) 2004–2021.
9. D. Saftić et al. *Kem. Ind.* **64** (2015) 481–498.
10. W. H. Pearson, A. Padwa (ur.), *Synthetic applications of 1,3-dipolar cycloaddition chemistry toward heterocycles and natural products*, Vol. 59, John Wiley & Sons, New York, 2002, str. 623.
11. F. Himo, T. Lovell, R. Hilgraf, V. V. Rostovtsev, L. Noodleman, K. B. Sharpless, V. V. Fokin, *J. Am. Chem. Soc.* **127** (2005) 210–216.
12. W. Tornøe, C. Christensen, M. Meldal, *J. Org. Chem.* **67** (2002) 3057–3064.
13. M. Meldal, C. W. Tornøe, *Chem. Rev.* **108** (2008) 2952–3015.
14. R. Huisgen, *Angew. Chem.* **7** (1968) 321–406.
15. T. Worrel et. al, *Science*, **340** (2013) 457–460.
16. J. E. Hein, V. Fokin, *Chem. Soc. Rev.* **39** (2010) 1302–1315.
17. S. Chassaing, M. Kumarraja, A. Sido, P. Paleand, J. Sommer, *Org. Lett.* **9** (2007) 883–886.
18. F. Alonso, Y. Moglie, G. Radivoy, M. Yus, *Tetrahedron Lett.* **50** (2009) 2358–2362.

19. K. R. Reddy, K. Rajgopal, M. L. Kantam, *Synlett* (2006) 957–959.
20. W.S. Brotherton, Development of copper(II) azide-alkyne cycloaddition reactions using chelating azides, Doktorski rad, Florida State University, 2012. str. 23-26.
21. J. P. Meyer, P. Adumeau, J. S. Lewis, B. M. Zeglis, *Bioconjugate. Chem.* **27** (2016) 2–10.
22. L. Liang, D. Astruc, *Coord. Chem. Rev.* **255** (2011) 2933–2945.
23. K. Bougrin, A. Loupy, M. Soufiaoui, *J. Photochem. Photobiol.C.* **6** (2005) 139–167.
24. J. E. Moses, A. D. Moorhouse, *Chem. Soc. Rev.* **36** (2007) 1249–1262.
25. E. Kim, H. Koo, *Chem. Sci.* **34** (2019) 7835–7851.
26. [https://www.cell.com/trends/chemistry/fulltext/S2589-5974\(19\)30201-1](https://www.cell.com/trends/chemistry/fulltext/S2589-5974(19)30201-1) (datum pristupa 20.11.2019.)
27. M. S. Singh, S. Chowdhury, S. Koley, *Tetrahedron* **72** (2016) 5257–5283.
28. H. B. Jalani, A. C. Karagoz, S. B. Tsogoeva, *Synthesis* **49** (2017) 29–41.
29. J. Burgess, M. Rangel, *Adv. Inorg. Chem.* **60** (2008) 167–244.
30. S. A. Mukha et al., *Chem. Sustainable Dev.* **15** (2007) 449–459.
31. M. A. Spielmann, M. Freifelder, *J. Am. Chem. Soc.* **69** (1947) 2908–2909.
32. T. M. Brennan, P. D. Weeks, D. P. Brannegan, D. E. Kuhla, M. L. Elliott, H. A. Watson, B. Wlodecki, *Tetrahedron Lett.* **4** (1978) 331–334.
33. M. D. Aytimir, G. Karakaya, D. Ekinici (ur.) *Medical chemistry and drug design*, InTech, 2012. str. 1–26.
34. J. Cabanes, S. Chazarra, F. Garcia-Carmona, *J. Pharm. Pharmacol.* **46** (1994) 982–985.
35. W. Kandioller, A. Kurzwernhart, M. Hanif, S. M. Meier, H. Henke, B. K. Keppler, C. G. Hartinger, *J. Organomet. Chem.* **696** (2011) 999–1010.
36. Ž. Car, V. Petrović Peroković, S. Tomić Pisarović, *Kem. Ind.* **65** (2016) 595–604.
37. B. E. Smart, *J. Fluorine Chem.* **109** (2001) 3–11.
38. L. G. Wade Jr. *Organic Chemistry*, Pearson, 2013., str. 500–501.
39. J. Clayden, N. Greeves, S. Warren, P. Wothers, *Organic chemistry*, Oxford University Press, 2012., str. 428.
40. K. V. Kutonova, M. E. Trusova, P. S. Postnikov, V. D. Filimonov, J. Parello, *Synthesis* **45** (2013) 2706–2710.
41. A. R. Hamann, C. de Kock, P. J. Smith, W. A. L. van Otterlo, M. A. L. Blackie, *S. Afr. J. Chem.* **66** (2013) 231–236.

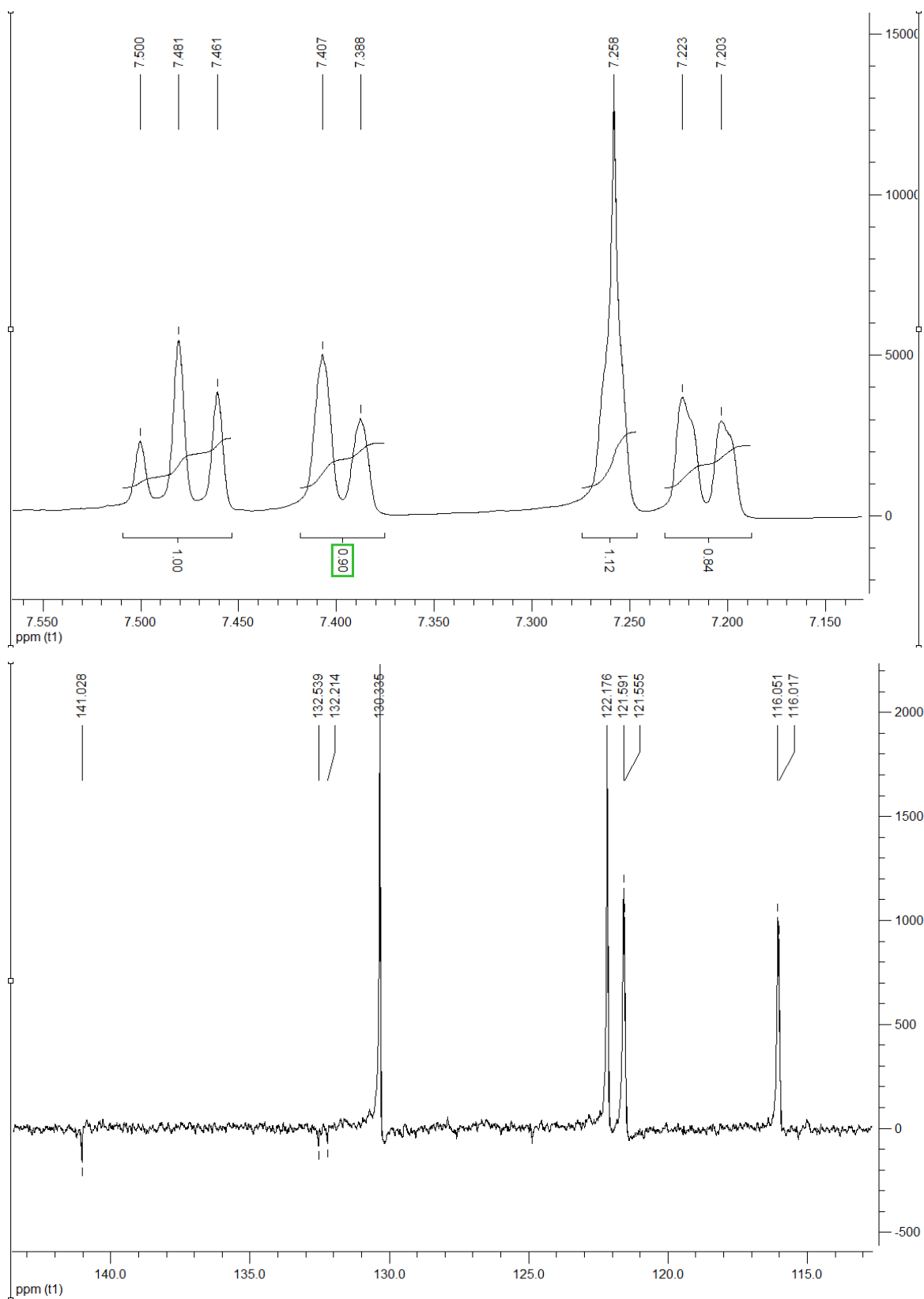
-
42. M. Tireli, S. Maračić, S. Lukin, M. J. Kulcsar, D. Žilić, M. Cetina, I. Halasz, S. Raić-Malić, K. Užarević, *Beilstein J. Org. Chem.* **13** (2017) 2532–2363.

§ 8. DODATAK

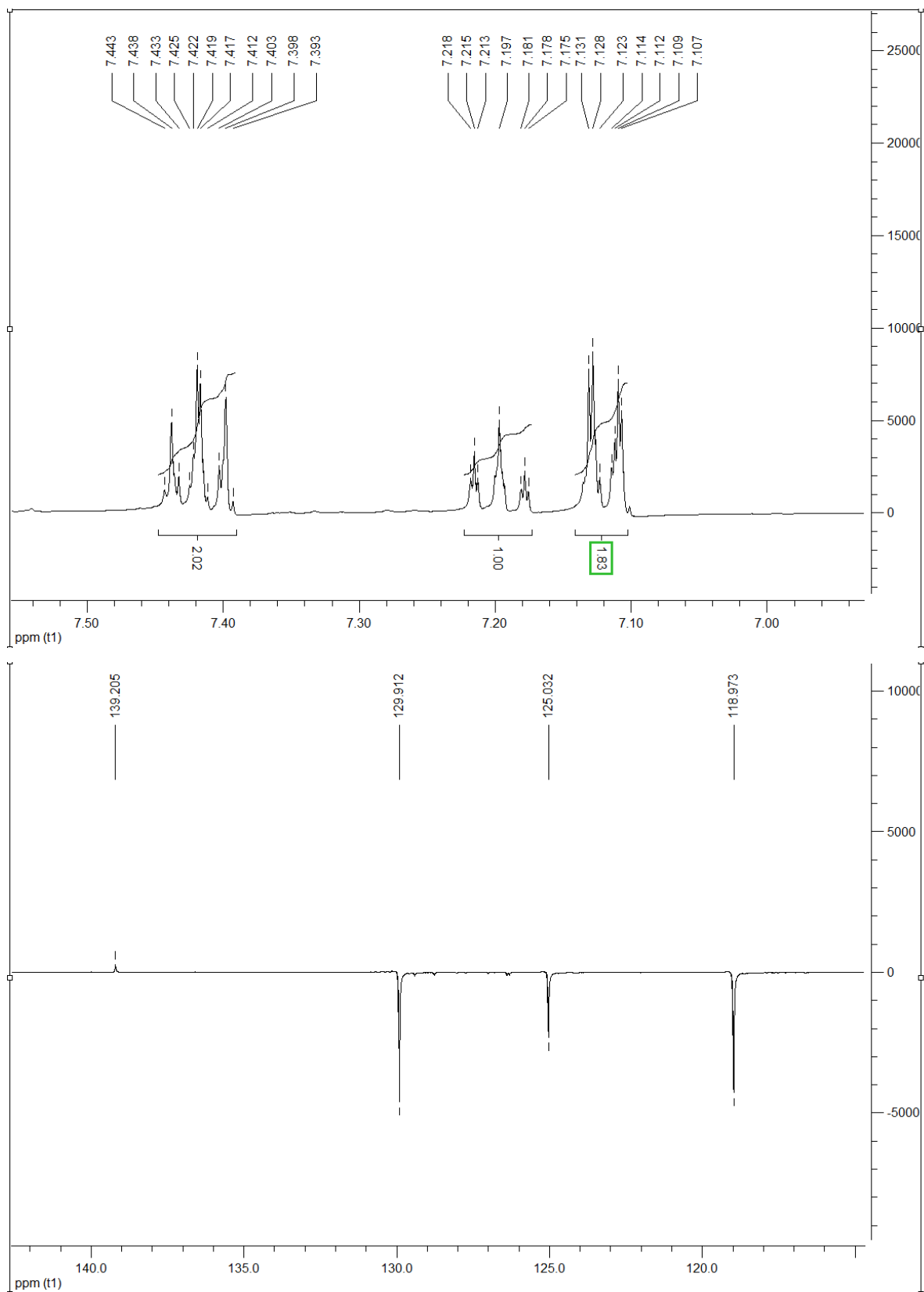
Slika D1: ¹H NMR i ¹³C NMR (DEPTQ) spektri spoja 1 snimljeni u CDCl₃.



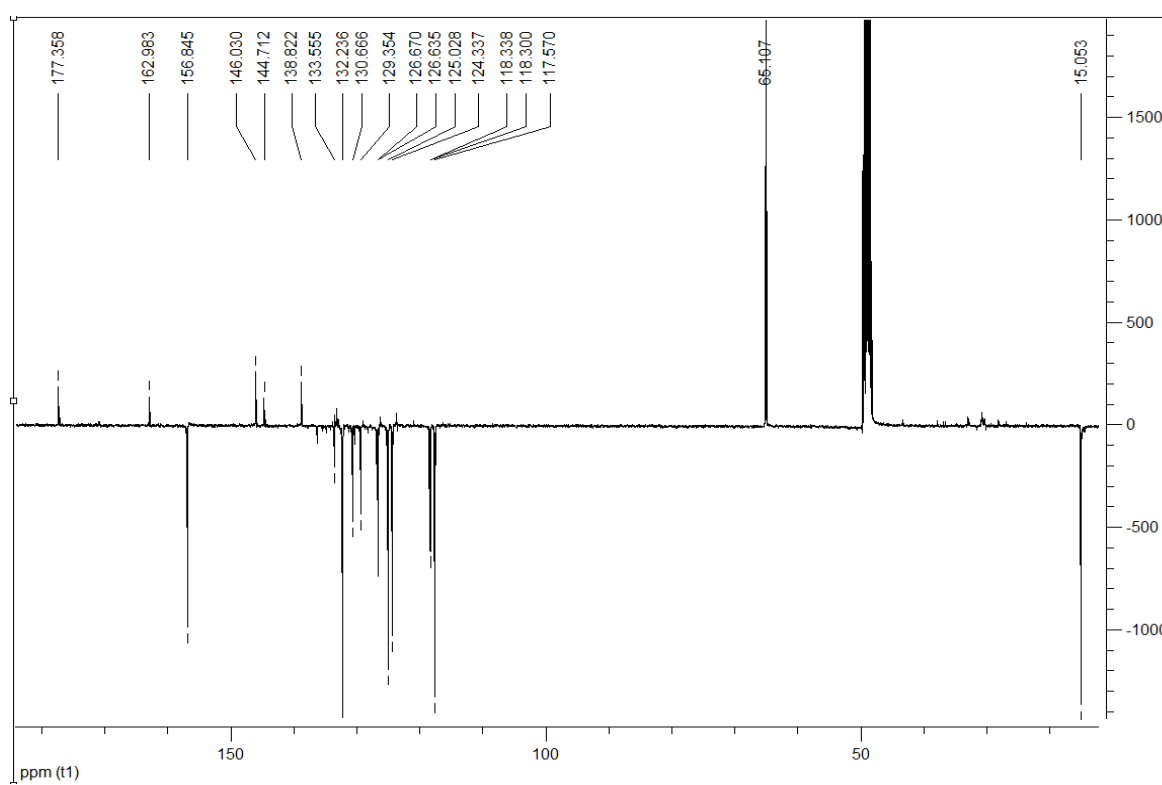
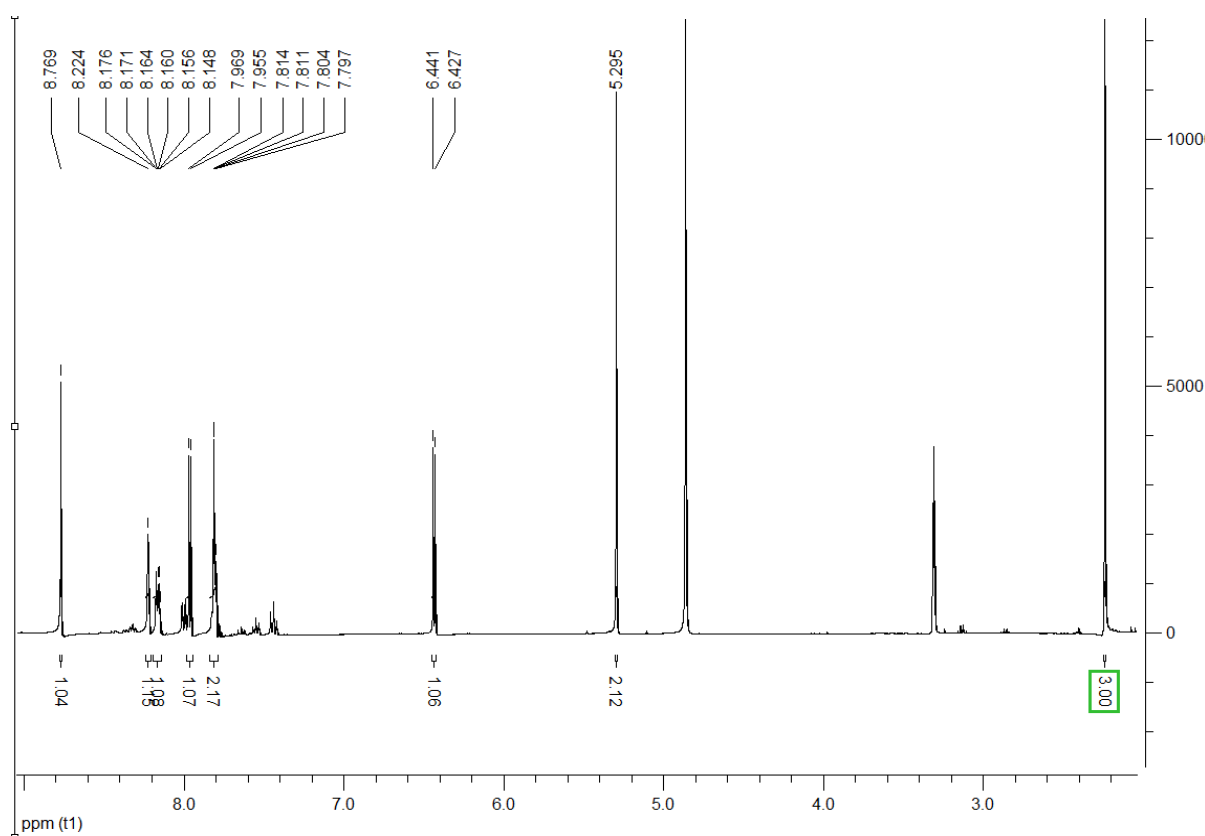
Slika D2: ¹H NMR i ¹³C NMR (DEPTQ) spektri spoja **2** snimljeni u CD₃OD.



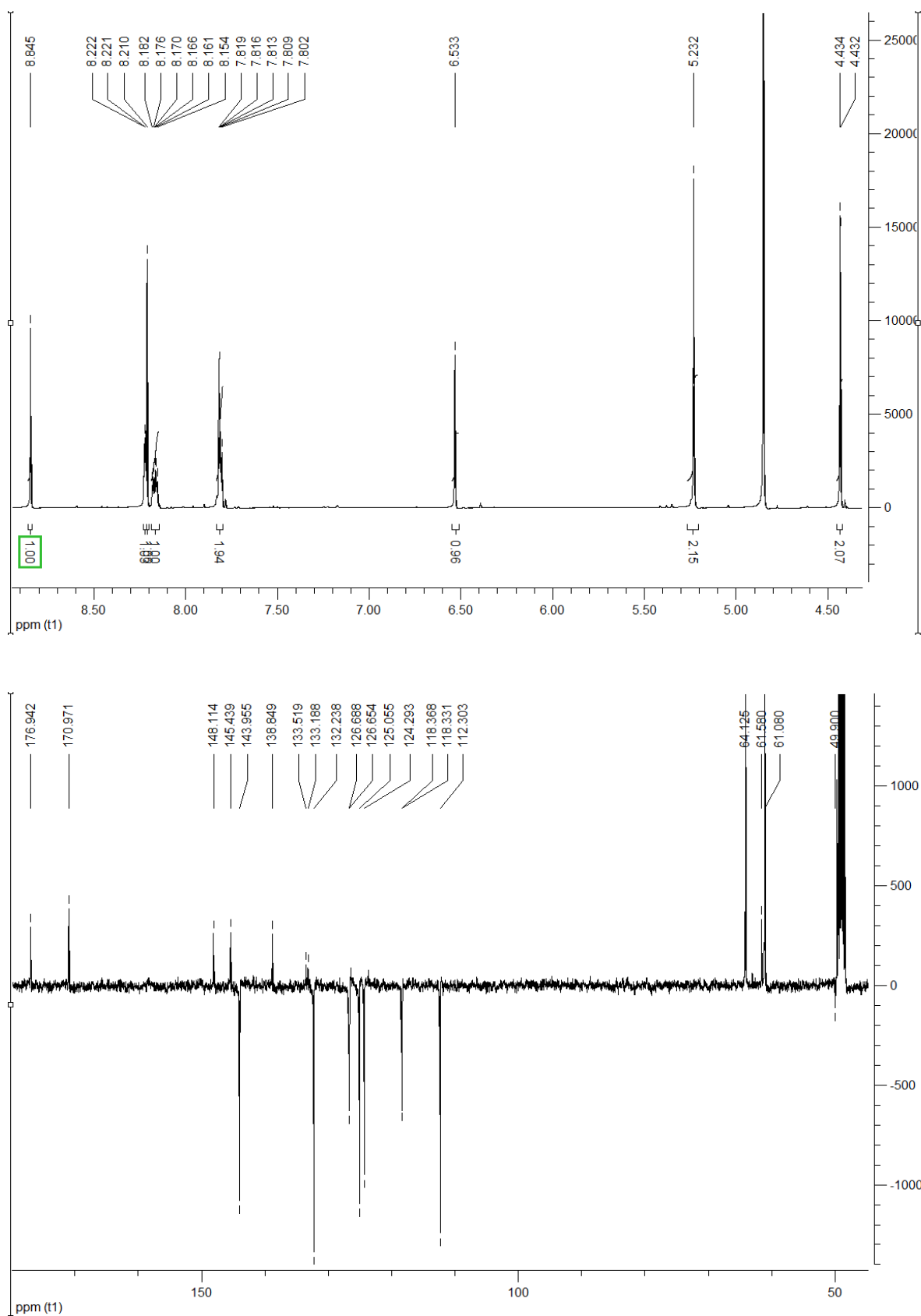
Slika D3: ^1H NMR i ^{13}C NMR (DEPTQ) spektri spoja 3 snimljeni u CDCl_3 .



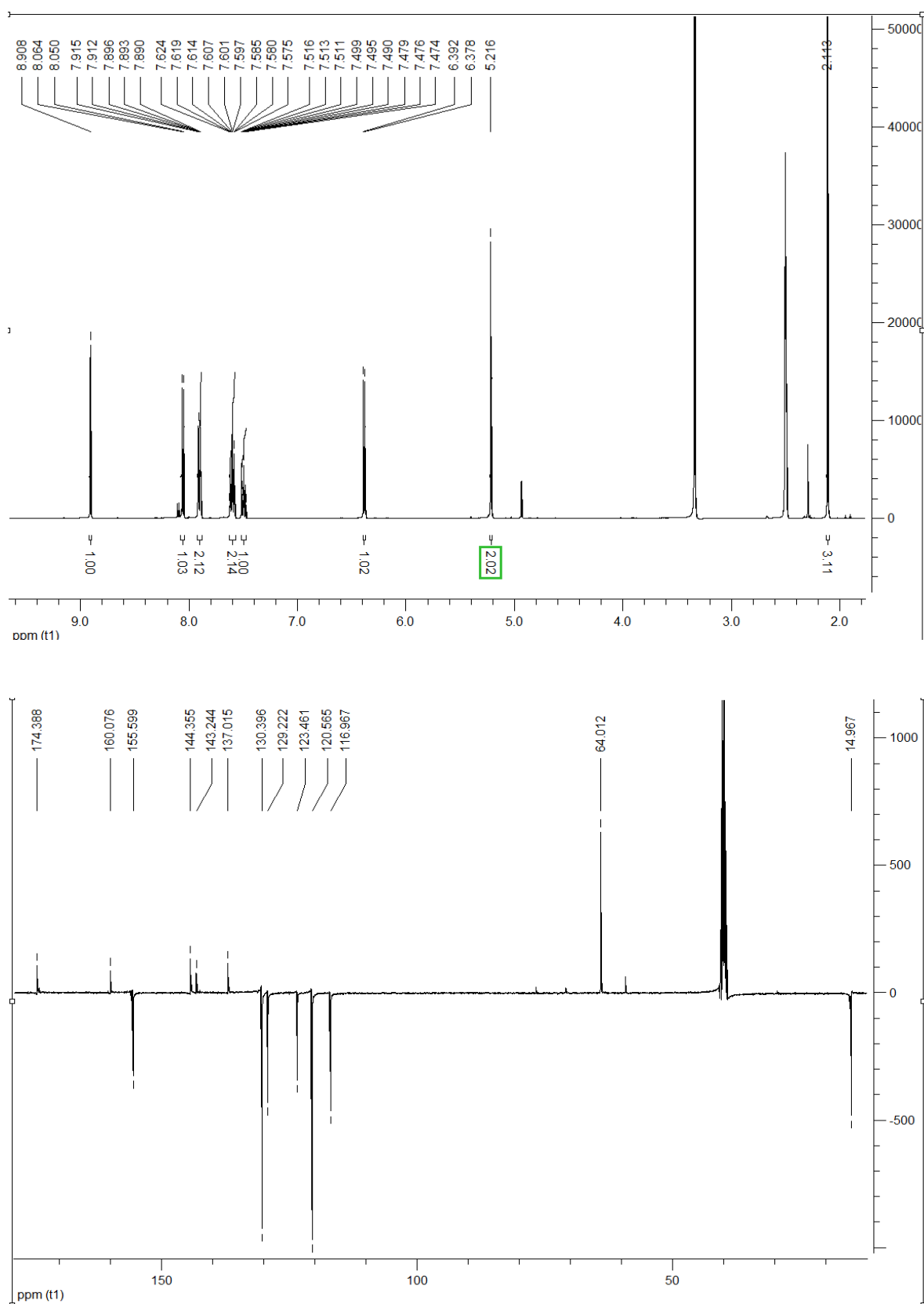
Slika D4: ^1H NMR i ^{13}C NMR (DEPTQ) spektri spoja 4 snimljeni u $\text{DMSO-}d_6$.



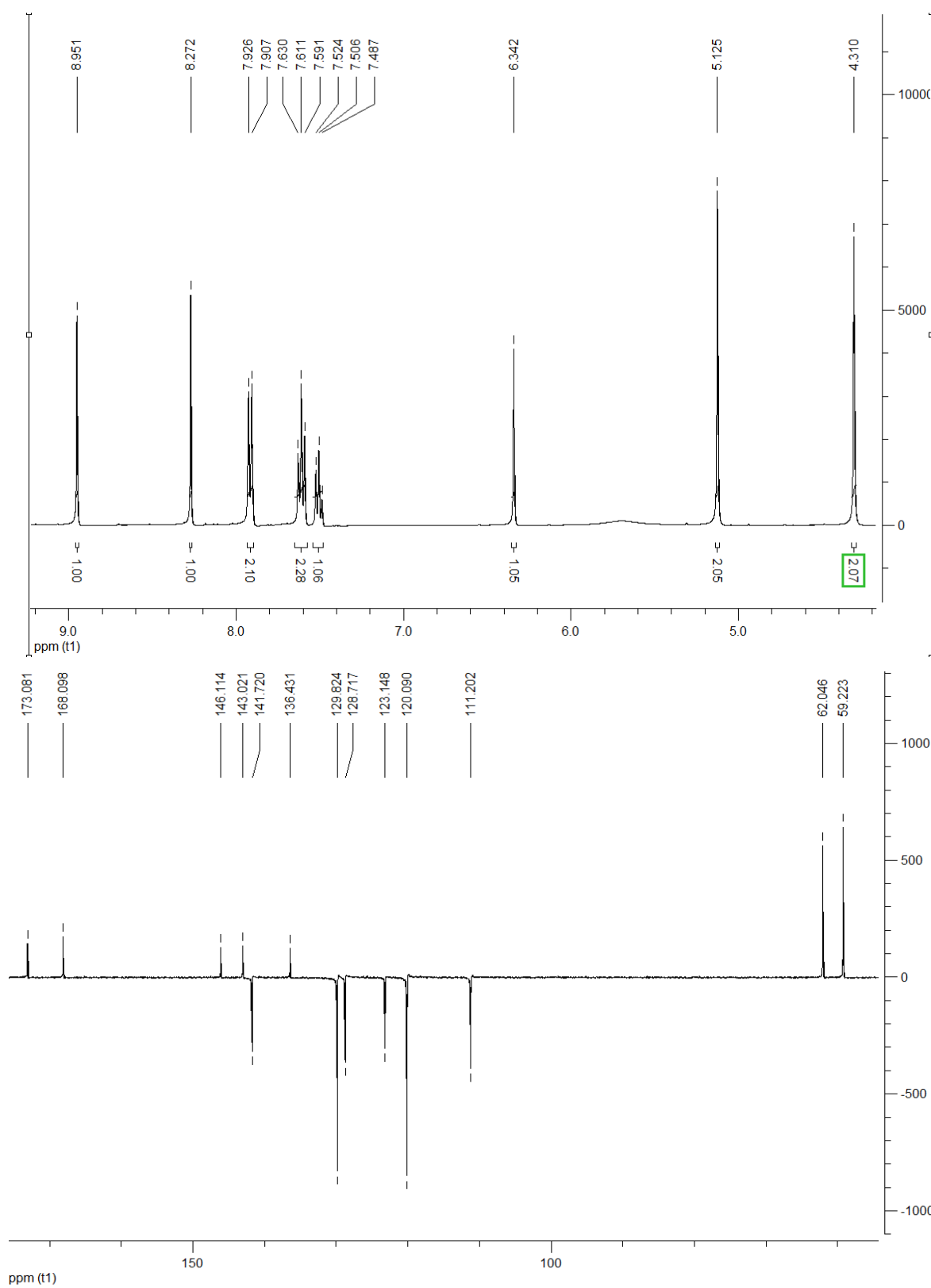
Slika D5: ¹H NMR i ¹³C NMR (DEPTQ) spektri spoja 5 snimljeni u CD₃OD.



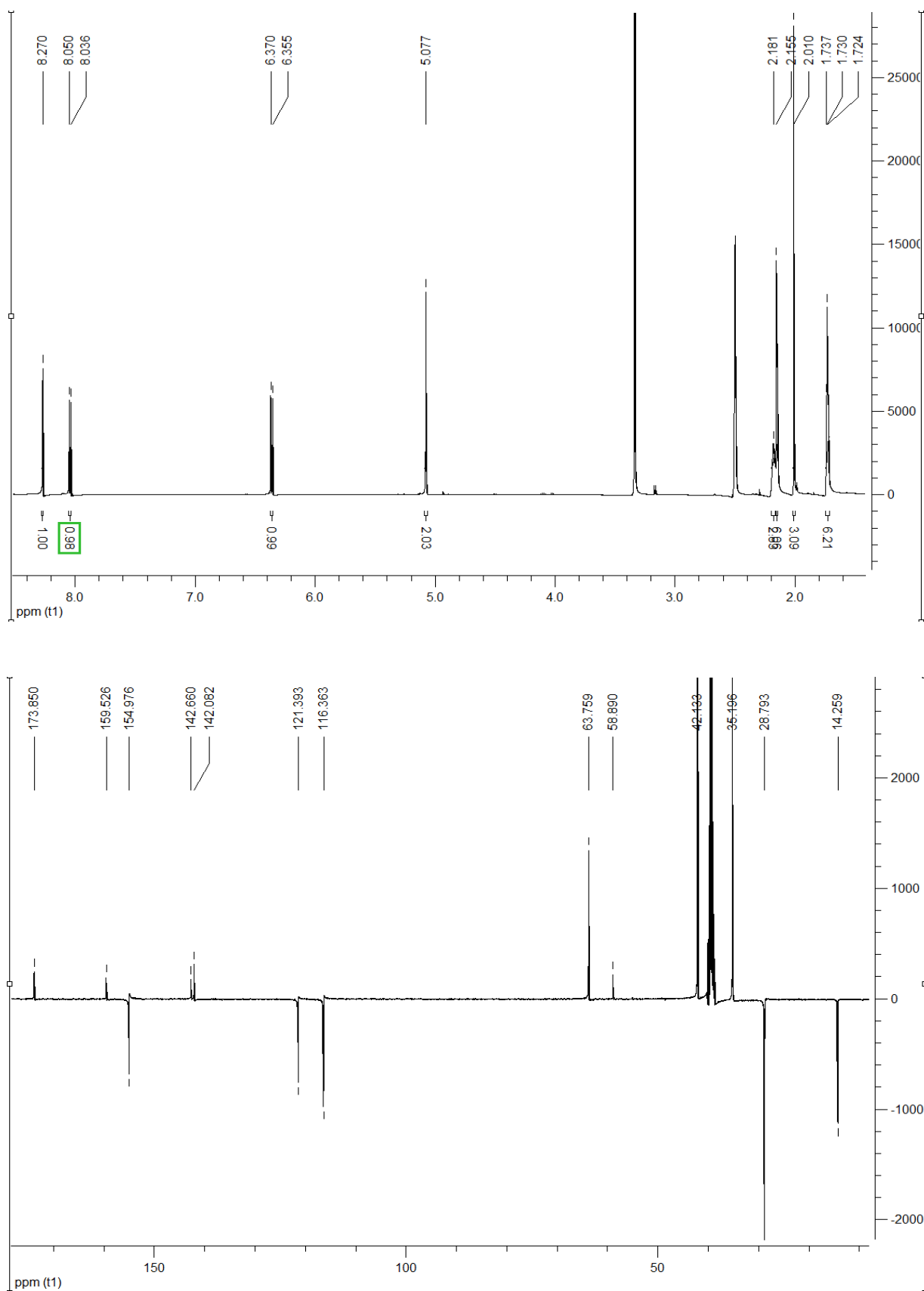
Slika D6: ^1H NMR i ^{13}C NMR (DEPTQ) spektri spoja 6 snimljeni u CD_3OD .



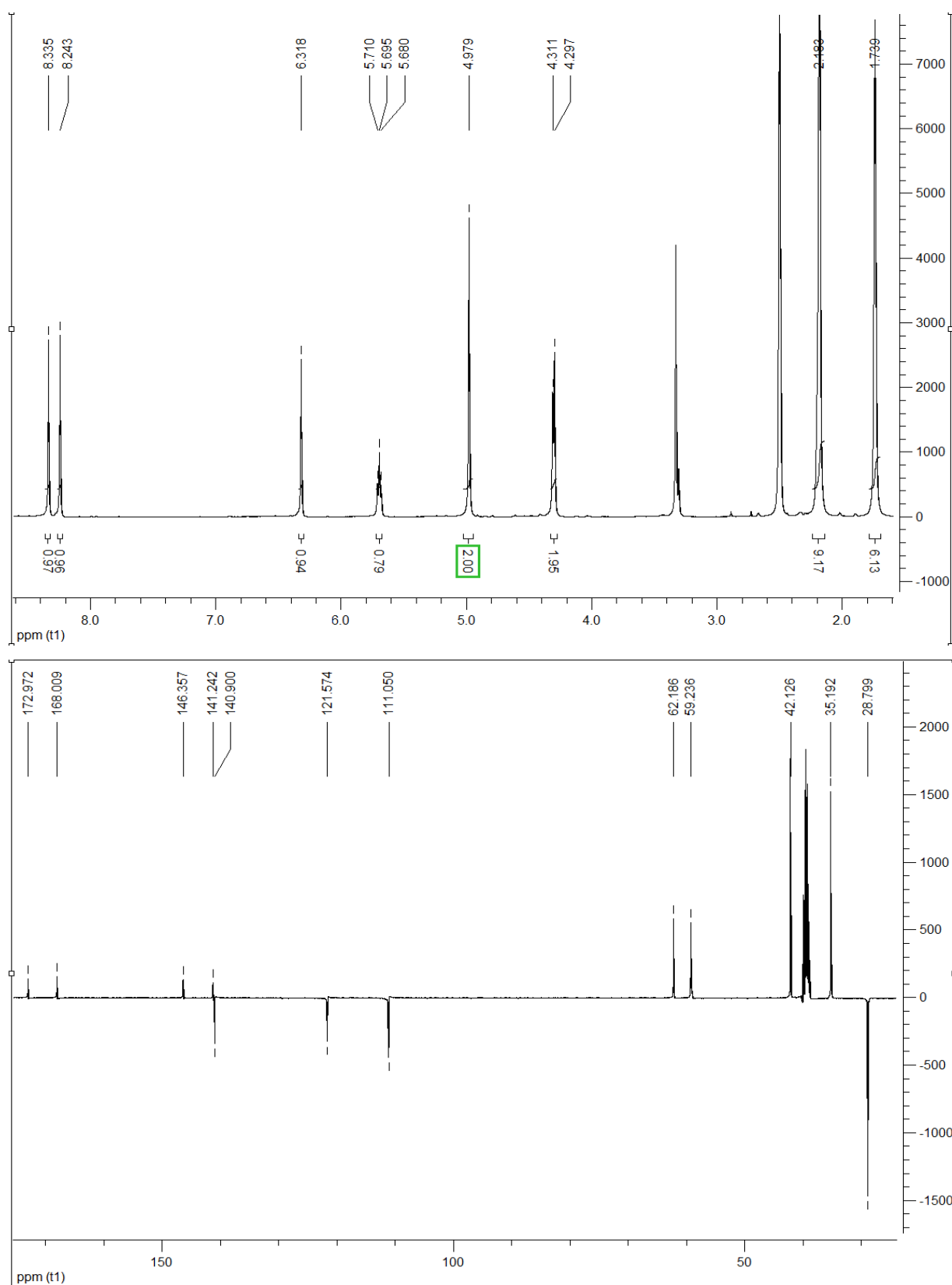
Slika D7: ^1H NMR i ^{13}C NMR (DEPTQ) spektri spoja 7 snimljeni u $\text{DMSO-}d_6$.



Slika D8: ^1H NMR i ^{13}C NMR (DEPTQ) spektri spoja 8 snimljeni u $\text{DMSO-}d_6$.



Slika D9: ^1H NMR i ^{13}C NMR (DEPTQ) spektri spoja 9 snimljeni u $\text{DMSO-}d_6$.



Slika D10: ¹H NMR i ¹³C NMR (DEPTQ) spektri spoja **10** snimljeni u DMSO-*d*₆.

§ 9. ŽIVOTOPIS

Osobni podatci

Ime i prezime: Ines Žepić

Datum rođenja: 28.09.1993.

Mjesto rođenja: Mannheim Neckarau, Njemačka

Obrazovanje

2000.–2003. Osnovna škola Vrbani, Zagreb

2003.–2008. Osnovna škola Tituša Brezovačkog, Zagreb

2008.–2012. Gimnazija Lucijana Vranjanina, Zagreb

2012.–2017. Preddiplomski studij kemije, Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu

2017.–2019. Diplomski studij kemije (organska kemija i biokemija), Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu,

Sudjelovanja u popularizaciji znanosti

2015. Otvoreni dan kemije

2017. Prva radionica HDKI-HKD: Intelektualno vlasništvo i komercijalni nastup za novo eksperimentalno i tehnološko rješenje u organskoj kemiji, Kemijski odsjek, PMF