

Sveučilište J.J. Strossmayera u Osijeku

Odjel za kemiju

Preddiplomski studij kemije

Marija Vladika

PRIPRAVA ESTERA PIRIDINONA S *META*-SUPSTITUIRANIM
ARILOM I CIMETNE KISELINE

Završni rad

Mentor: doc. dr. sc. Aleksandar Sečenji

Neposredni voditelj: Andrea Dandić, mag.chem.

Osijek, 2019.

SADRŽAJ

1. UVOD	1
2. LITERATURNI PREGLED	2
2.1. Struktura i svojstva hidrokspiridinona	2
2.2. Funkcionalizacija 3,4-HP	3
2.2.1. 2-Supstituirani 3-hidrokspiridin-4-oni	4
2.2.2. 5-Supstituirani 3-hidrokspiridin-4-oni	5
2.2.3. 6-Supstituirani 3-hidrokspiridin-4-oni	6
2.3. Priprava hidrokspiridinona	7
2.3.1. Harrisova metoda	7
2.3.2. Direktna metoda	8
2.3.3. Michaelova adicija	9
2.3.3.1. Michaelova adicija kao mehanizam sinteze 3,4-HP	9
2.4. Biološka aktivnost 3,4-HP	11
2.4.1. Uloga biometala u organizmu	11
2.4.1.1. Kompleksiranje metala	11
2.4.2. Deferipron i njegovo djelovanje	12
2.4.3. Poboljšanje biodostupnosti 3,4-HP	13
2.4.4. Antineurodegenerativni učinak 3,4-HP derivata	14
2.4.4.1. Alzheimerova i Parkinsonova bolest	15
2.4.4.2. Huntingtonova bolest	16
2.4.4.3. Friedreichova ataksija	16
2.4.5. Hidrokspiridinoni kao anti-mikrobna, anti-malarijska i antivirusna sredstva ..	
.....	17
2.4.6. Antitumorsko djelovanje 3,4-HP	18
2.4.7. Ostali važni biološki učinci 3,4-HP	18
3. EKSPERIMENTALNI DIO	19
3.1. Materijali i metode	19
3.2. Priprava suhog diklormetana	19
3.3. Priprava 3-hidroksi-2-metil-1-(<i>m</i> -metoksifenil)piridin-4-ona (1)	20
3.4. Priprava 3-hidroksi-2-metil-1-(<i>m</i> -metilfenil)piridin-4-ona (2)	21
3.5. Priprava estera cimetine kiseline s <i>meta</i> supstituiranim derivatima <i>N</i> -aril-3-	
hidroksi-2-metilpiridin-4-ona	22

3.5.1.	Priprava spoja [2-metil-1-(<i>m</i> -metoksifenil)piridin-4-on-3-il]-3-fenilprop-2-enoata (3)	22
3.5.2.	Priprava spoja [2-metil-1-(<i>m</i> -metilfenil)piridin-4-on-3-il]-3-fenilprop-2-enoata (4)	23
4.	REZULTATI I RASPRAVA	25
4.1.	Uvod.....	25
4.2.	Priprava <i>meta</i> supstituiranih <i>N</i> -aril-3-hidroksi-2-metilpiridin-4-ona	26
4.2.1.	Priprava 3-hidroksi-2-metil-1-(<i>m</i> -metoksifenil)piridin-4-ona (1)	26
4.2.2.	Priprava 3-hidroksi-2-metil-1-(<i>m</i> -metilfenil)piridin-4-ona (2)	27
4.3.	Priprava estera cimetne kiseline s <i>meta</i> supstituiranim derivatima <i>N</i> -aril-3-hidroksi-2-metilpiridin-4-ona	28
4.3.1.	Priprava spoja [2-metil-1-(<i>m</i> -metoksifenil)piridin-4-on-3-il]-3-fenilprop-2-enoata (3)	28
4.3.2.	Priprava spoja [2-metil-1-(<i>m</i> -metilfenil)piridin-4-on-3-il]-3-fenilprop-2-enoata (4)	29
5.	ZAKLJUČAK	31
6.	LITERATURA	32
7.	PRILOZI	33
7.1.	Popis oznaka kratica i simbola.....	33

SAŽETAK

PRIPRAVA ESTERA PIRIDINONA S *META*-SUPSTITUIRANIM ARILOM I CIMETNE KISELINE

U ovom završnom radu opisana je priprava estera *meta*-supstituiranih *N*-aril-3-hidroksipiridin-4-ona. Za esterifikaciju *N*-aril-3-hidroksipiridin-4-ona korištena je cimetna kiselina koja je uvedena metodom Steglichove esterifikacije. *Meta* supstituirani *N*-aril-3-hidroksipiridin-4-oni pripremljeni su direktnom metodom iz 3-hidroksi-2-metilpiran-4-ona (maltol) i *meta* supstituiranih anilina, uz upotrebu *p*-toluensulfonske kiseline (*p*-TsOH) kao kiselog katalizatora, u autoklavu. Pripremljeni *meta* supstituirani derivati *N*-aril-3-hidroksipiridin-4-ona poslužili su kao polazni spojevi za sintezu njihovih esterskih derivata s cimetcnom kiselinom [2-metil-1-(*m*-metoksifenil)piridin-4-on-3-il]-3-fenilprop-2-enoata (spoj 3) i [2-metil-1-(*m*-metilfenil)piridin-4-on-3-il]-3-fenilprop-2-enoata (spoj 4).

Ključne riječi: hidroksipiridinoni, Michaelova adicija, maltol, Steglichova esterifikacija, cimetcna kiselina

ABSTRACT

PREPARATION OF CINNAMIC ACID ESTERS WITH PYRIDINONES CONTAINING *META* SUBSTITUTED ARYL

In this work the preparation of *meta* substituted *N*-aryl-3-hydroxypyridin-4-one esters is described. For esterification of *N*-aryl-3-hydroxypyridin-4-one cinnamic acid is used which was introduced by Steglich esterification method. The *meta* substituted *N*-aryl-3-hydroxypyridin-4-ones were prepared by direct method from 3-hydroxy-2-methylpyran-4-one (maltol) and *meta* substituted anilines, using *p*-toluenesulfonic acid (*p*-TsOH) as acidic catalyst, in autoclave. Prepared *meta* substituted derivatives of *N*-aryl-3-hydroxypyridine-4-ones were used as starting compounds for the synthesis of ester derivatives of cinnamic acid [2-methyl-1- (*m*-methoxyphenyl) pyridin-4-one-3-yl] -3-phenylprop-2-enoate (compound **3**) and [2-methyl-1- (*m*-methylphenyl) pyridin-4-on-3-yl] -3-phenylprop-2-enoate (compound **4**).

Key words: hydroxypyridinones, Michael addition, maltol, Steglich esterification, cinnamic acid

1. UVOD

Hidroksipiridinoni (HP) su derivati piridina, heterociklički, polifunkcionalni, aromatski spojevi. Dušikov atom hidroksipiridinona je najčešće supstituiran alkilnim ili arilnim supstituentima, a hidroksilna i karbonilna skupina se međusobno nalaze u *ortho* položaju. Glavni istraživački interes za ovu skupinu kelatnih spojeva započinje nakon otkrivanja deferiprona, člana 3-hidroksi-4-piridinona (3,4-HP) koji je još u kliničkoj upotrebi kao sredstvo za keliranje željeza u osoba kod kojih je došlo do prekomjernog nakupljanja željeza u organizmu.¹

3,4-HP se posebno ističu unutar skupine hidroksipiridinona jer su se pokazali učinkovitijim kelatorima trovalentnih, tvrdih metalnih iona, primjerice Fe^{3+} i Al^{3+} , u fiziološkim uvjetima u odnosu na ostale HP-derivate. Sintetski se najčešće modificiraju uvođenjem supstituenata na različite položaje njihove osnovne heterocikličke strukture, pri čemu se vezno mjesto za ione metala, koje čine kisikovi atomi hidroksilne i keto-skupine, ne mijenja ili se privremeno zaštići.¹ Sintetskim se modifikacijama utječe na njihova fizikalno-kemijska te farmakološka svojstva, a time i potencijalno biološko djelovanje. Uvođenjem lipofilnih strukturnih motiva u strukturu 3,4-HP može se utjecati na njihov prolazak kroz biološku membranu. Jedan od načina povećanja lipofilnosti 3,4-HP u svrhu olakšavanja njihovog prolaska kroz biološku membranu jest vezanje adamantilne podjedinice na slobodnu hidroksilnu skupinu 3,4-HP, što je provedeno na Zavodu za organsku kemiju Kemijskog odsjeka PMF-a.²

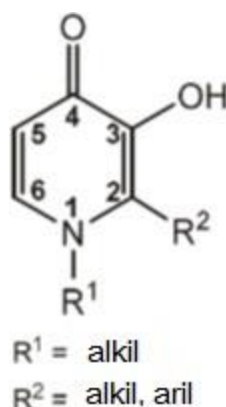
Ovaj rad nastavak je tih istraživanja, a kao lipofilna podjedinica odabrana je cimetna kiselina budući da je literaturno poznata njezina velika biološka aktivnost.³ Prema tome prvi dio ovoga rada usmjeren je na pripravu hidroksipiridinonskih prekursora, dok je u drugome djelu rada opisana priprava njihovih esterskih derivata s cimetnom kiselinom.

2. LITERATURNI PREGLED

2.1. Struktura i svojstva hidroksipiridinona

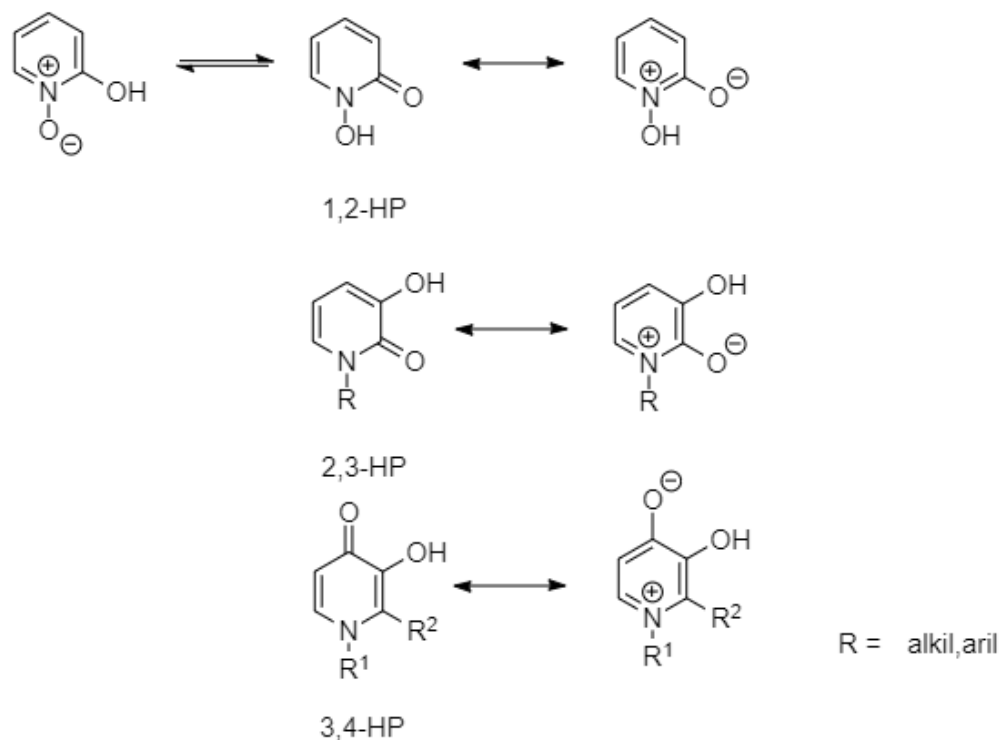
HP su heterociklički spojevi koji sadrže dušikov atom u prstenu te hidroksilnu i keto skupinu u *ortho* položaju. Literaturno su poznate tri vrste hidroksipiridinona: 1-hidroksipiridin-2-oni (1,2-HP), 3-hidroksipiridin-2-oni (3,2-HP) i 3-hidroksipiridin-4-oni (3,4-HP), ovisno o položaju hidroksilne i keto skupine s obzirom na dušikov atom u prstenu.⁴

3-hidroksipiridin-4-oni (3,4-HP) su skupina heterocikličkih aromatskih spojeva s dušikovim atomom u prstenu te hidroksilnom i keto skupinom na položajima 3 i 4 (Shema 1).⁴ Prisutnost prethodno navedenih funkcionalnih skupina u strukturi 3,4-HP razlog je njihovog kelirajućeg učinka. 3,4-HP pokazuju najveći afinitet prema M(II)/M(III), a primarno se koriste kao potencijalni kelatori metalnih iona u raznim oboljenjima koja su uzrokovana suviškom metalnih iona. Suvišak metalnih iona, konkretno Fe^{3+} i Al^{3+} može uzrokovati neurodegenerativne bolesti. Nadalje, pokazalo se da ti ligandi pokazuju najveći afinitet za metalne ione pod fiziološkim uvjetima u kojima su prilično stabilni, netoksični pa čak i otporni na enzimski katalizirano cijepanje.²



Shema 1. Strukturna formula 3-hidroksipiridin-4-ona²

Hidroksipiridinoni tvore metalni kompleks s trovalentnim ionima metala. Pri fiziološkom pH (5-9,9) nastaju neutralni kompleksi u kojima je stehiometrija metala i hidroksipiridinonskog prstena 1:3. Kod 1,2-HP nastaju dva tautomera koji su međusobno u ravnoteži, dok 3,2-HP i 3,4-HP imaju samo jedan tautomer (Shema 2).⁵



Shema 2. Tautomerni oblici 1,2-HP, 3,2-HP i 3,4-HP⁵

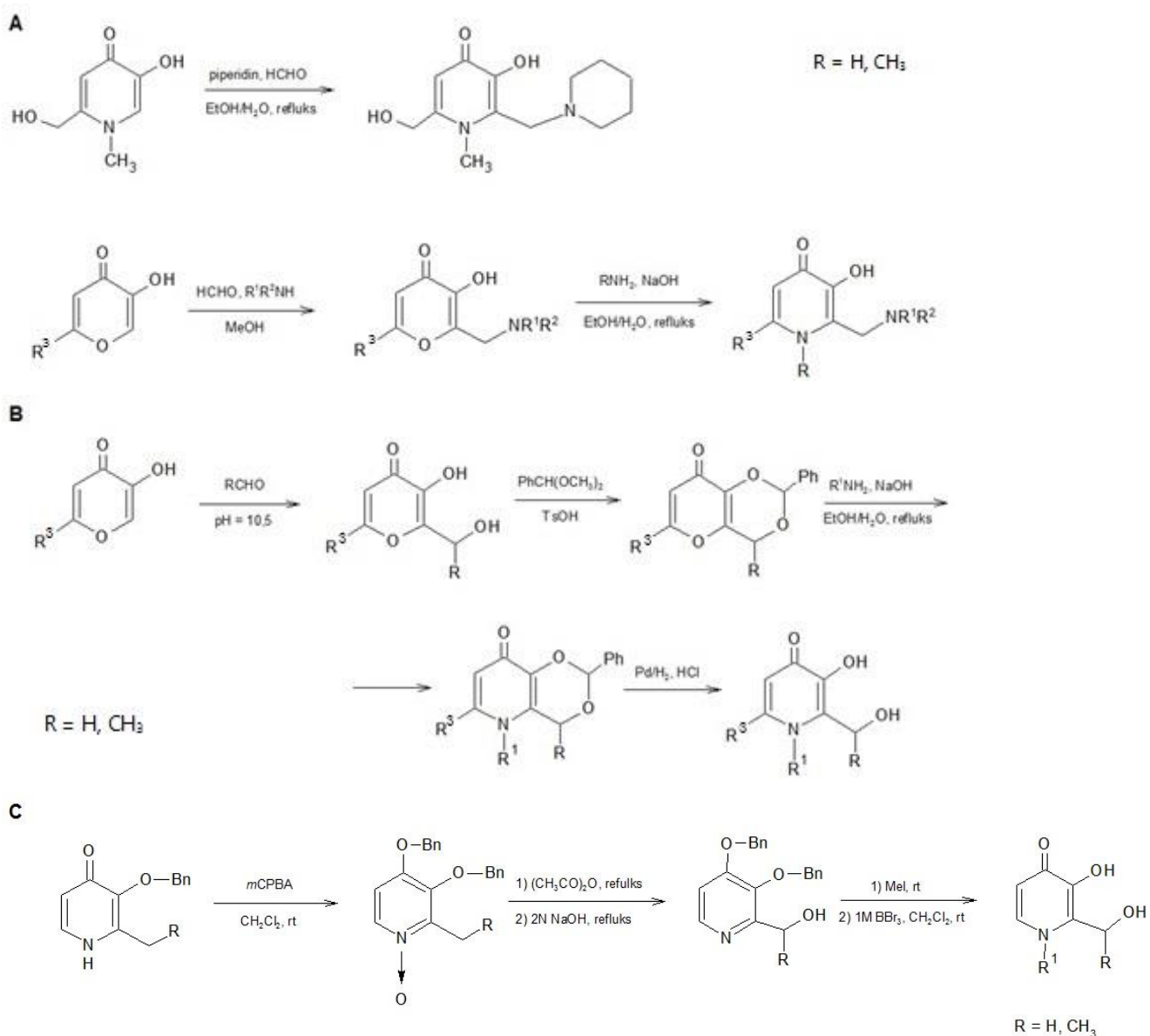
2.2. Funkcionalizacija 3,4-HP

Varijacija supstituenata na položajima 1, 2, 5 pa čak i na položaju 3 može snažno utjecati na biološku aktivnost 3,4-HP. Nekoliko 3,4-HP glikoliziranih na poziciji 3, pokazali su potencijal u liječenju Alzheimerove bolesti. Ugradnjom prikladnog supstituenta na položaj odgovoran za sposobnost keliranja 3-hidroksipiridin-4-ona, povećava se njihova topljivost i poboljšavaju se farmakokinetička svojstva, te se privremeno maskira metalno vezno mjesto i ovi spojevi postaju korisniji i učinkovitiji prolijekovi.²

Iako je većina bioloških svojstava 3,4-HP rezultat vezanja različitih supstituenata na položaj 1, postoji i određen broj spojeva sa supstituentima na C-2, dok je samo nekoliko na C-5 i C-6. Većina funkcionalnih 3,4-HP-a razvijena je s ciljem poboljšanja njihovih fizikalno-kemijskih i bioloških svojstava u svrhu njihove potencijalne primjene kao kelatnih lijekova.⁶

2.2.1. 2-Supstituirani 3-hidroksipiridin-4-oni

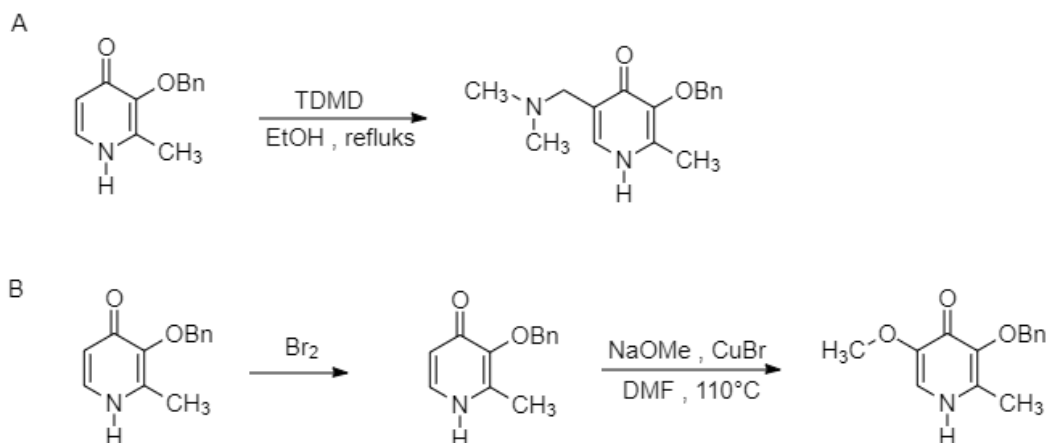
Taylor i suradnici⁷ su prvi put koristili Mannichovu reakciju za pripravu 2-supstituiranih 3,4-HP. Ova reakcija također postiže visoke prinose s odgovarajućim piranonima, koji se potom mogu prevesti u 3,4-HP (Shema 3A). Aldolna reakcija također je korištena za funkcionaliziranje položaja 2 na piromekonskoj kiselini i alomaltolu (Shema 3B) pri čemu je dobiven veliki broj derivata (1-hidroksialkil) -3-hidroksipiridin-4-ona upotrebom benzaldehid dimetil acetala kao zaštitne skupine. Prikladna metoda za sintezu 2-hidroksimetil derivata je preko piridin-*N*-oksidnog međuprodukta (Shema 3C).⁴



Shema 3. Sintaza 2-supstituiranih 3,4-HP; A) Mannichova reakcija; B) Aldolna reakcija; C) Priprava preko piridin-*N*-oksidnog međuprodukta⁴

2.2.2. 5-Supstituirani 3-hidroksipiridin-4-oni

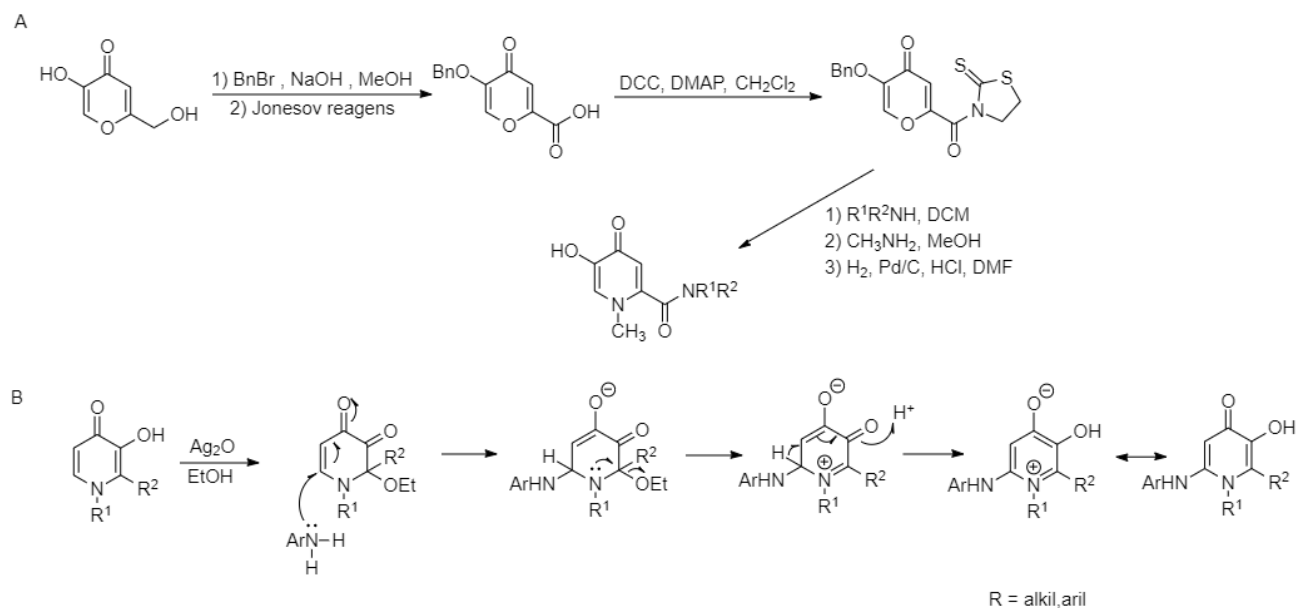
Aminometilacija 2-metil-3-hidroksipiridin-4-ona dovodi do funkcionalizacije položaja 5; ovaj pristup je korišten za sintezu opsežnog raspona supstituiranih piridin-4-ona (shema 4A). Pozicija 5 također može biti selektivno bromirana, a zatim naknadno supstituirana s metoksi skupinom (Shema 4B).⁴



Shema 4. A) Sinteza 5-Supstituiranih 3,4-HP; B) Selektivno bromiranje pozicije 5⁴

2.2.3. 6-Supstituirani 3-hidroksipiridin-4-oni

Kojična kiselina prikladni je polazni reagens za sintezu 6-supstituiranih piridin-4-ona (npr. pegiliranih derivata). Dodatna oksidacija i naknadno stvaranje amida doveli su do sinteze širokog raspona derivata (Shema 5A). 6-supstituirani-2-alkil-3-hidroksipiridin-4-oni se također mogu pripremiti iz hidroksipiridinona kao polaznog reagensa „one pot“ sintezom pri čemu se dobivaju željeni produkti u visokom prinosu (Shema 5B).⁴



Shema 5. Sinteza 6-supstituiranih 3,4-HP A) Sinteza iz kojične kiseline; B) Sinteza 6-supstituiranih-2-alkil-3-hidroksipiridin-4-ona⁴

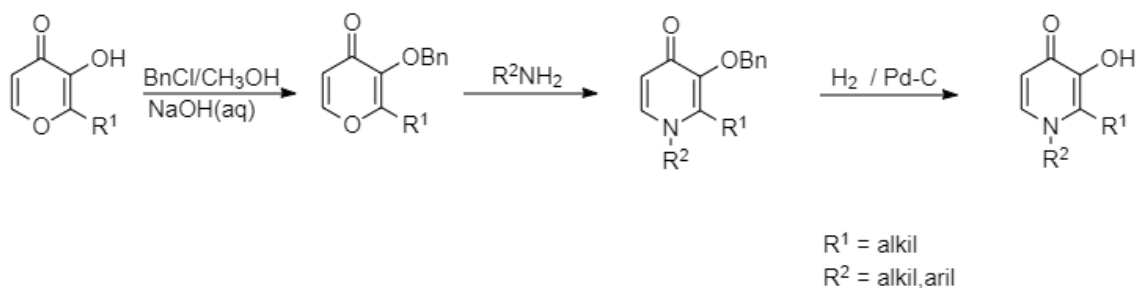
2.3. Priprava hidroksipiridinona

2.3.1. Harrisova metoda

Harrisova metoda primjenjuje se za sintezu *N*-alkilnih i *N*-arilnih 3,4-HP iz dostupnih piranonskih derivata kao što su maltol ($R^1=CH_3$) ili etilmaltol ($R^1=CH_2CH_3$) (Shema 6). Prvi korak Harrisove metode podrazumijeva benziliranje hidroksilne skupine na položaju 3 polaznog piran-4-ona (zaštita hidroksilne skupine), nakon čega u drugom koraku u reakciji s primarnim aminom ili amonijakom nastaje zaštićeni 3,4-HP, zatim u trećem koraku dolazi do uklanjanja zaštitne skupine.¹

Drugi korak se može provoditi u različitim reakcijskim uvjetima, ovisno o strukturi aminskog derivata koji se upotrebljava kao nukleofil. Ako su nukleofili alifatski amini, drugi se korak najčešće provodi u alkoholno-vodenim otapalima uz refluks. U slučaju aromatskih amina kao nukleofila, primjenjuju se postupci bez dodatka otapala uz zagrijavanje na višim temperaturama (≈ 120 °C) ili se komponente zagrijavaju u zatvorenim sustavima (autoklav, ≈ 150 °C). Razlog tome su drugačija fizikalna svojstva

aromatskih i alifatskih amina, drugačije temperature vrelišta ili tališta te činjenica da im je topljivost u vodi ili alkoholno-vodenim sredinama relativno slaba.¹

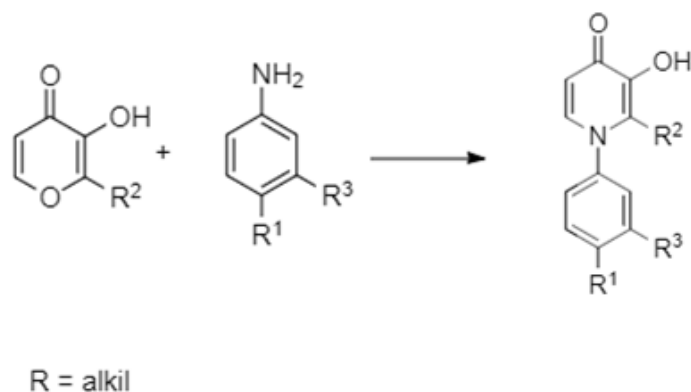


Shema 6. Priprava *N*-supstituiranih derivata 3,4-HP metodom po Harrisu¹

2.3.2. Direktna metoda

Hidroksipiranoni se mogu koristiti za sintezu analognih hidroksipiridona, reakcijom s amonijakom ili primarnim aminima (uključujući aminokiseline). Metoda koja se pretežno primjenjuje za pripravu *N*-arilnih derivata 3,4-HP, poznata i kao direktna metoda bez uvođenja zaštitnih skupina, podrazumijeva zagrijavanje nezaštićenog piranonskog derivata i odgovarajućeg arilamina. Reakcije se uobičajeno provode u jednome koraku s dodatkom kiselog katalizatora (HCl, H₂SO₄, *p*-TsOH) ili bez kiselog katalizatora, uz reflux ili u autoklavu (Shema 7). Ta reakcija je vrlo spora i često rezultira u niskim prinosima.¹

U sintezi *N*-arilnih derivata 3,4-HP optimalniji su postupci koji se provode bez dodatka otapala ili zagrijavanje u autoklavu zbog kraćih reakcijskih vremena (8 - 40 h), za razliku od klasičnog načina zagrijavanja reaktanata u otapalu uz dodatak katalizatora (50 - 72 h).¹



Shema 7. Direktna metoda pripreve *N*-arilnih 3,4-HP s dodatkom kiselog katalizatora ili bez dodatka kiselog katalizatora (Autoklav)¹

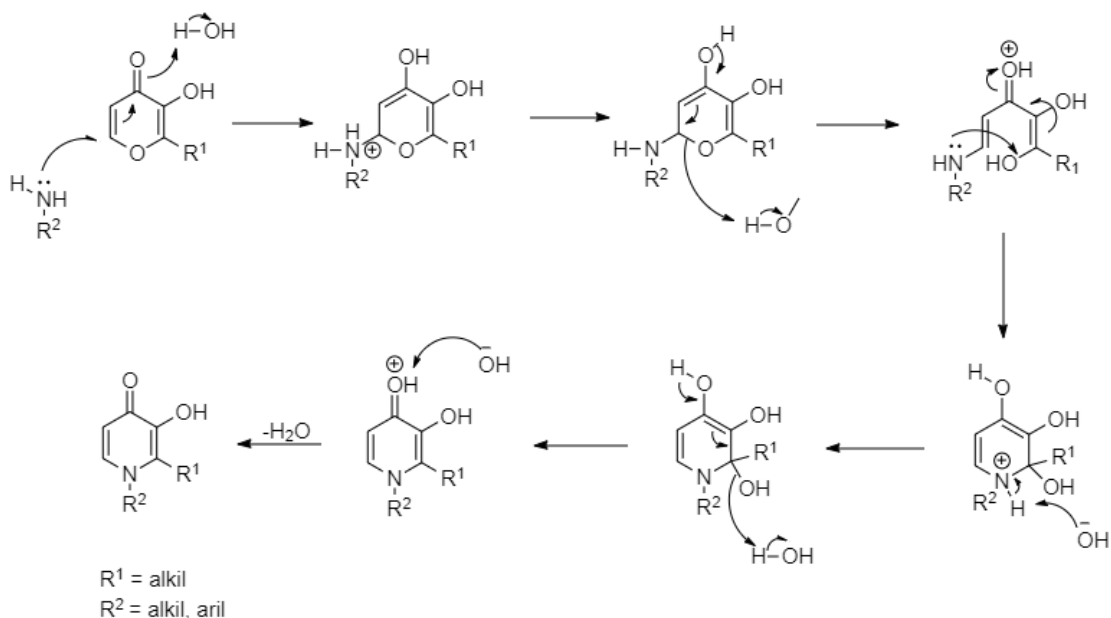
2.3.3. Michaelova adicija

Michaelova adicija je vrsta nukleofilne adicije gdje dolazi do stvaranja ugljik-ugljik veze između nukleofila (enolata) i α,β -nezasićenog karbonilnog spoja. Nukleofil se još naziva i Michaelov donor, a α,β -nezasićena karbonilna komponenta je Michaelov akceptor. Reakcija uključuje četiri koraka. U prvom koraku dolazi do nastajanja nukleofila koji se u drugom koraku veže na β -ugljikov atom α,β -nezasićenog karbonilnog spoja, pri čemu nastaje nova ugljik-ugljik veza i rezonantno stabilizirani međuprodukt. U trećem koraku nastali međuprodukt se protonira dajući produkt u enolnom obliku. Zadnji korak je tautomerizacija produkta iz enolnog oblika u keto-oblik koji je stabilniji. Svaki korak je reverzibilan što znači da je i ukupna reakcija reverzibilna.⁸

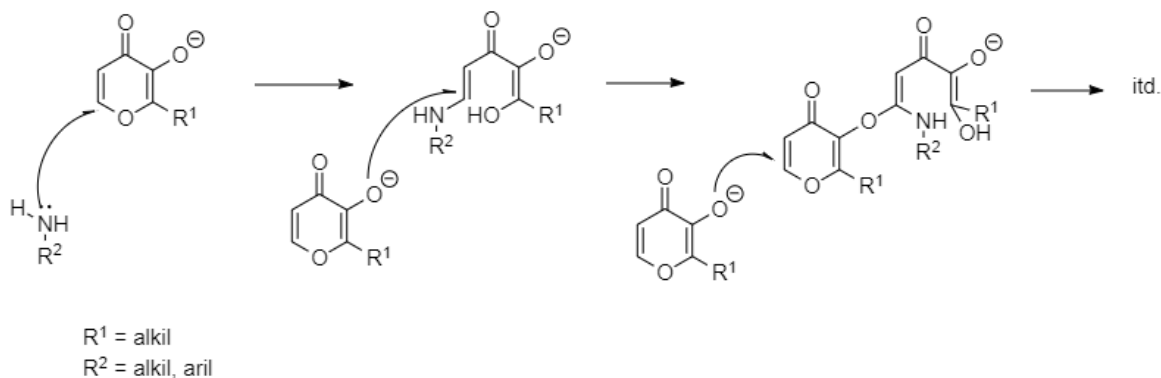
2.3.3.1. Michaelova adicija kao mehanizam sinteze 3,4-HP

Dvostruka nukleofilna konjugirana Michaelova adicija je sinteza 3,4-HP, adicijom na položaje C-2 i C-6 α,β -nezasićenog karbonilnog piranonskog derivata, gdje su nukleofili odgovarajući alkil- ili arilamini (Shema 8). Reakcijom s razgranatim alkilaminima, u bazičnom mediju, pogodno je zaštititi hidroksilnu skupinu piranona, da bi se izbjeglo deprotoniranje i stvaranje kompetirajućeg nukleofila, alkoksida, što u konačnici može dovesti do nastanka kondenzacijskih nusprodukata (Shema 9) te smanjenja prinosa reakcije. Kada se reakcije provode s manje bazičnim arilaminima, sintezu je moguće

provesti i bez zaštite njegove hidroksilne skupine, odnosno izravnim postupkom. U takvom slučaju se dodaje kiseli katalizator (*p*-TsOH) da bi se smanjila mogućnost nastanka alkoksida i spriječila sporedna reakcija. U nekataliziranoj reakciji produkt nastaje u tragovima, dok je u sintezi s *p*-TsOH ili H₂SO₄ prinos reakcije 47 %.¹



Schema 8. Mehanizam sinteze 3,4-HP Michaelovom adicijom¹



Schema 9. Sporedna reakcija sinteze 3,4-HP i stvaranje kondenzacijskog nusprodukata u bazičnim uvjetima¹

U slučaju sinteze 3,4-HP primarni amin nukleofilno napada piran-4-on, nakon čega slijedi otvaranje prstena i gubitak jedne molekule vode, zatim dolazi do zatvaranja prstena i nastanka piridinona.⁹

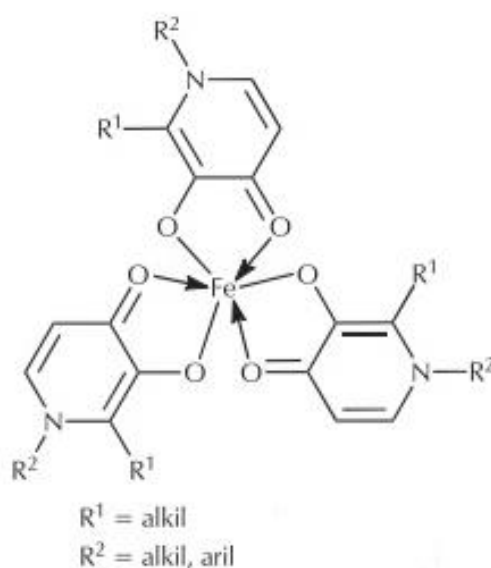
2.4. Biološka aktivnost 3,4-HP

2.4.1. Uloga biometala u organizmu

Biometal željezo ima veliku važnost za ljudski organizam jer je potreban za brojne vitalne funkcije kao što su rast, reprodukcija i imunitet. Preporučene dnevne doze željeza koje mogu varirati ovisno o spolu i dobi, su 15 mg na dan, dok je ukupna razina u organizmu zdravog čovjeka konstantna i iznosi oko 35 – 45 mg kg⁻¹. Oko 70 % željeza u organizmu nalazi se u metaloproteinima (hemoglobin u krvi i mioglobin u mišićima) ili citokromima. Hemoglobin u krvi i mioglobin u mišićima su specijalizirani za prijenos i čuvanje kisika, a citokromi sudjeluju u sintezi adenozin-trifosfata. Ostatak željeza nalazi se u jetri, slezeni i koštanoj srži, koji služi kao kofaktor za različite enzime ili se skladišti.¹⁰

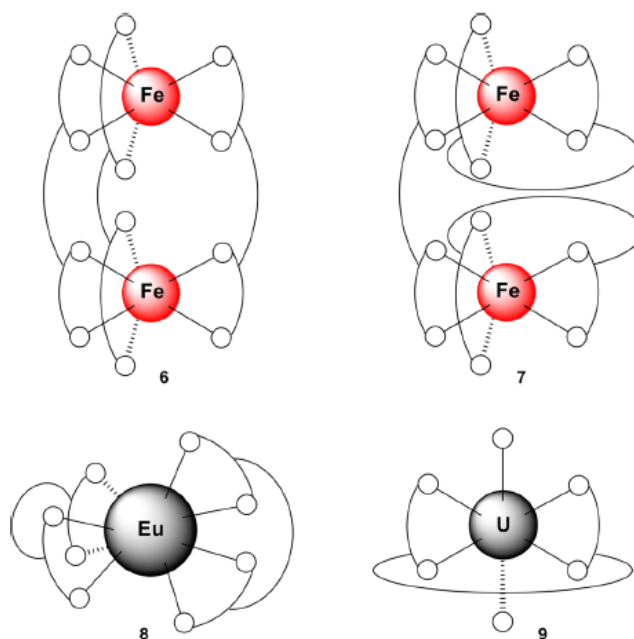
2.4.1.1. Kompleksiranje metala

Prilikom kompleksiranja trovalentnih metalnih kationa s 3,4-HP ligandima nastaju peteročlani kelatni prstenovi u kojima je metal koordiniran s dva vicinalna kisikova atoma. Sposobnost brzog vezanja HP i tvrdih metala u vodenim medijima olakšava razvoj učinkovitih primjena u biološkim i medicinskim svrhama. Pri fiziološkom pH prevladavaju nenabijeni kompleksi sastava M(III) : 3,4-HP = 1 : 3 (Shema 10). Koordinacija metalnog iona je u takvim kompleksima uglavnom nepravilna oktaedarska.¹



Shema 10. Općenita strukturalna formula kompleksa Fe(III) : 3,4-HP = 1 : 3¹

Kompleksiranjem metala s tetradentatnim HP postoje dvije moguće strukture za komplekse sa željezom (Strukture 6 i 7, slika 1), oba s omjerom metal : liganda = 2 : 3. Struktura 6 je najpovoljnija forma za hidrosamatske siderofore i 1-hidroksipiridin-2-one. Kod većih kationa, primjerice europij (III), formiraju se kompleksi s omjerom metal : liganda = 1 : 2 (struktura 8, slika 1). Nasuprot tome, s oksidacijskim vrstama kao što su UO_2^{2+} i MoO_2^{2+} , nastaju stabilni kompleksi 1 : 1 (Struktura 9, slika 1).⁴



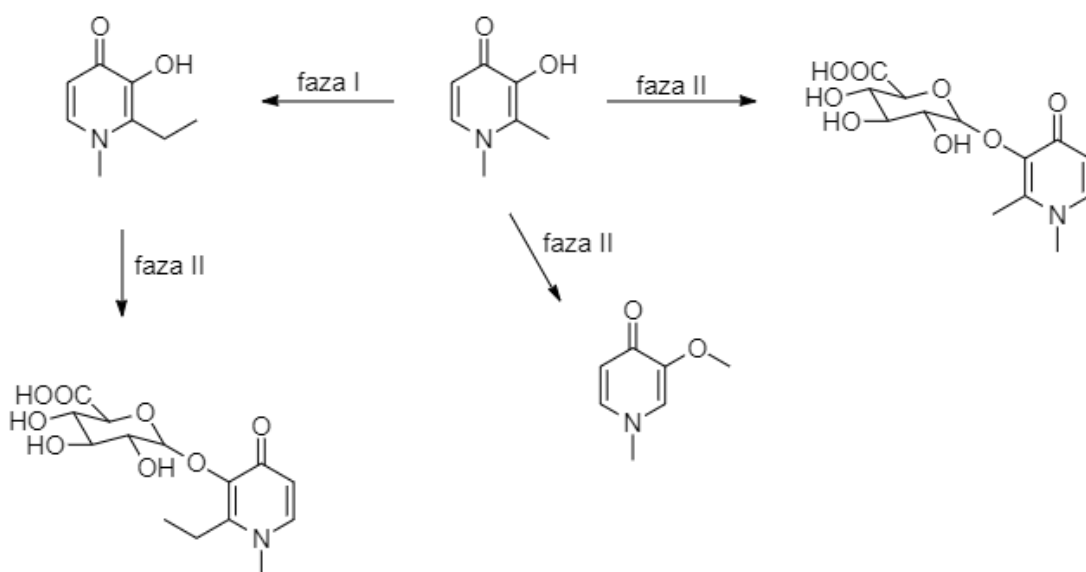
Slika 1. Moguće strukture metalnog kompleksa tetradentatnih HP⁴

2.4.2. Deferipron i njegovo djelovanje

Od otkrića deferiprona 1982. godine, heterociklički su derivati postali iznimno proučavana skupina spojeva. 3-Hidroksi-1,2-dimetilpiridin-4-on (deferipron) jedan je od najpoznatijih predstavnika te vrste spojeva. Upotrebljava se u kliničke svrhe kao sredstvo za keliranje željeza u osoba kod kojih je došlo do prekomjernog nakupljanja željeza u organizmu. Poremećaj se najčešće javlja kao posljedica određene bolesti kao što je, na primjer, nasljedna hemokromatoza, odnosno genetsko oboljenje koje rezultira pojačanim nakupljanjem željeza u organima.¹

Deferipron se upotrebljava u liječenju talasemije i srodnih krvnih oboljenja i primjenjuje se oralno. Djeluje tako da veže željezo iz skladišnog proteina feritina. Ovaj

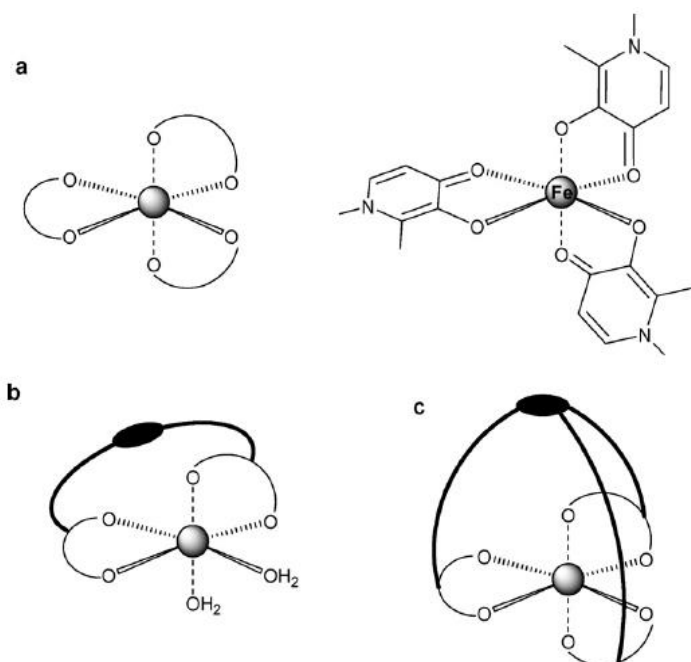
derivat ima svojih nedostataka od kojih je glavni problem njegov metabolički put (faze I i II, Shema 11) u jetri. Hidroksilna skupina piridinonskog skeleta (potrebna za kompleksiranje s metalom) podložna je glukouronidaciji, tj. enzimski kataliziranoj *N*- ili *O*-glikozidaciji neke tvari glukuronskom kiselinom. Taj postupak određene tvari čini topljivijima, te ih time eliminira iz organizma putem urinarnog trakta ili žuči. Analizom sadržaja urina ustanovljeno je da se otprilike 85% odnosno 44% doze samoga lijeka nalazi u urinu u obliku 3-*O*-glukouronidnog konjugata **A** koji nema sposobnost kompleksiranja željeza. Zbog toga se taj lijek mora primjenjivati u visokim dozama da bi se postigla njegova klinička učinkovitost.¹



Shema 11. Metabolički put deferiprona u jetri čovjeka¹

2.4.3. Poboljšanje biodostupnosti 3,4-HP

Za bidentatne 3,4-HP kelatore, vezanje funkcionalne skupine pojavljuje se kao prvi korak poboljšanju fizikalno-kemijskih i bioloških svojstava, kako bi se omogućila prioritarna biodistribucija u nekim organima ili tkivima, ili neka sposobnost za molekularno prepoznavanje specifičnih bioloških ciljeva. Molekularna masa bidentatnih HP-a je obično niska (<500), dok se lipofilnost i naboj u fiziološkim uvjetima mogu modulirati uvođenjem prikladnih supstituenata u strukturu 3,4-HP. Kako bi se povećala kelirajuća učinkovitost HP-baziranih liganada dodaju se dvije ili tri kelatne skupine na isti skelet (Shema 12).⁶



Shema 12. Načini koordinacije za komplekse HP-derivata s trovalentnim metalnim ionima:

a) 1:3 M^{3+} / mono-HP; b) 1:1 M^{3+} / bis-HP; c) M^{3+} / tris-HP⁶

2.4.4. Antineurodegenerativni učinak 3,4-HP derivata

Neurodegenerativne bolesti najčešće započinju u ranom djetinjstvu te imaju sporo progresirajući tijek. Prve se manifestacije javljaju nakon četvrtog ili petog desetljeća života. Dovode do postepenog i progresivnog odumiranja živčanih stanica što posljedično vodi disfunkciji živčanog sustava. U neurodegenerativne se bolesti ubrajaju Alzheimerova bolest, Parkinsonova bolest, frontotemporalna demencija, Huntingtonova bolest, progresivna supranuklearna paraliza, kortikobazalna degeneracija, prionska bolest, amiotrofična lateralna skleroza i spinocerebelarne ataksije. Zajednička karakteristika ovih bolesti je stvaranje i taloženje nakupina proteina koje toksično djeluju na neurone.¹¹

Idealni kandidati za uklanjanje nakupina proteina, odnosno keliranje željeza iz moždanog tkiva su 3,4-HP. Osim što su to spojevi male molekulske mase, imaju i visoku selektivnost za trovalentne katione metala. Lako se sintetski modificiraju, čime se pospješuje prolazak kroz krvno moždanu barijeru (BBB). Glukolizacija je jedan od sintetskih postupaka koji se primjenjuju za bolju permeabilnost kroz BBB, a to

podrazumijeva uvođenje glukoze podjedinice u osnovnu strukturu 3,4-HP. BBB je za razliku od ostalih membrana u organizmu obogaćena proteinima koji služe za transport glukoze te se pretpostavlja da će oni poslužiti u prijenosu glikoziliranog spoja u moždano tkivo. Glukoza se podjedinica može uvesti na različite položaje derivata 3,4-HP: na neku od funkcijskih skupina alkilne poveznice uvedene na položaj 1 (nije nužno njezino cijepanje pomoću enzima nakon prolaska kroz BBB) ili na hidroksilnu skupinu na položaju 3 piridinonskog prstena čime se privremeno blokira kelirajuće vezno mjesto za željezo i zapravo se time priprema proljek. U slučaju vezanja na hidroksilnu skupinu na položaju 3, nastala glikozidna veza se nakon prolaska kroz BBB mora pocijepati enzimskim putem pomoću β -glukozidaza koje su prisutne u mozgu.¹⁰

2.4.4.1. Alzheimerova i Parkinsonova bolest

Neurodegenerativne bolesti (Alzheimerova i Parkinsonova bolest) su okarakterizirane stvaranjem proteinskih agregata u mozgu, što vodi do gubitka funkcije sinapse i živčanih stanica. Kod Alzheimerove bolesti dolazi do izvanstanične akumulacije β -amiloidnih peptida ($A\beta_{40}$ i $A\beta_{42}$) u amiloidne ploče. Napredovanjem Alzheimerove bolesti dolazi do demencije, gubitka pamćenja, poremećaja mišljenja, te promjena u ponašanju bolesnika. Postoje dvije vrste trenutno poznate Alzheimerove bolesti: rani početak bolesti, u kojem se simptomi pojavljuju prije 65. godine života i kasniji početak bolesti, gdje se simptomi pojavljuju nakon 65. godine života. Kod Parkinsonove bolesti dolazi do poremećaja pokreta zbog smanjenja lučenja dopamina u dijelu mozga koji ima važnu ulogu u kontroli voljnih pokreta, odnosno do izvanstanične akumulacije proteina α -sinukleina. Pretpostavlja se da važnu ulogu u inicijaciji tih neuropatoloških procesa imaju mutacije gena koji kodiraju navedene proteine.^{10,12}

Peptidi $A\beta_{42}$ i $A\beta_{40}$ nastaju proteolitičkim cijepanjem velikog transmembranskog glikoproteina pod nazivom prekursor amiloidnog proteina koje kataliziraju sekretaze. Razlikuju se po tome što peptid $A\beta_{42}$ stvara proteinske agregate znatno brže od peptida $A\beta_{40}$. Važnu ulogu u procesu akumulacije navedenih proteina igraju poremećaji u homeostazi nekih prijelaznih metala, poput bakra, željeza i cinka. Metaloprotein $A\beta_{42}$ sadrži vezna mjesta za Fe(II) i Fe(III) u svojim *N*-terminalnim regijama te može doprinijeti oksidoreduktivnom ciklusu i nastanku ROS-vrsta. Prema istraživanjima, povezuje se sta-

nični oksidativni stres s neurodegenerativnim oboljenjima, u Parkinsonovoj i Alzheimerovoj bolesti te u oboljenjima kao što su Huntingtonova bolest i Friedreichova ataksija. Metodama *in vitro* uz detekciju mikroskopskim i spektroskopskim tehnikama dokazano je da inkubacijom imobiliziranih β -amiloidnih peptida s metalima (Cu(II), Fe(III), ili Zn(II)) kataliziraju stvaranje neželjenih $A\beta_{42}$ agregata te mijenjaju i njihovu morfologiju.¹⁰

2.4.4.2. Huntingtonova bolest

Huntingtonova bolest predstavlja jednu od najučestalijih monogenских nasljednih bolesti živčanog sustava. To je bolest odrasle dobi najčešće između tridesete i pedesete godine života. Kada se javlja kod osoba mlađih od dvadeset godina (juvenilni oblik) dolazi do bržeg tijeka bolesti. Manifestira se psihičkim poremećajima koji nastaju kao posljedica smrti neurona u bazalnim ganglijima i ostalom moždanom tkivu. Zahvaćene osobe imaju produljen slijed CAG trinukleotida unutar egzona 1 HTT gena, koji kodira protein huntingtin. U normalnim alelima broj CAG tripleta varira između 6 i 36, a kod bolesnika između 37 i 121. Moguće je da ponavljanje tripleta ekspandira tijekom gametogeneze te stvori što dulje poliglutaminske proteine.¹¹

2.4.4.3. Friedreichova ataksija

Friedreichova ataksija je najčešći oblik naslijeđene ataksije, odnosno gubitka koordinacije mišićnih pokreta. Trenutno ne postoji učinkovit tretman za stanje, što dovodi do degeneracije živčanog i mišićnog tkiva, te u mnogim slučajevima prerane smrti povezane s bolestima srca. Autosomno recesivno stanje je uzrokovano ponavljanjem u genu koji kodira protein frataksin, što dovodi do smanjenja ekspresije i smanjene koncentracije proteina. Iako je cjelokupna funkcija frataksina još uvijek predmet rasprave, poznato je kako on sudjeluje u sintezi i održavanju hema i klastera željezo-sumpor. Kao i kod brojnih drugih neuroloških poremećaja, postoje dokazi koji ukazuju na povišene razine željeza u mozgu, a postoje i dokazi za povećanje taloženja željeza u srcu, jetri i slezeni.¹³ Preosjetljivost stanica Friedreichove ataksije na željezo i izazove oksidativnog stresa

usmjeravaju budući terapijski razvoj ne samo na antioksidanse već i na agense za kompleksiranje željeza.¹²

2.4.5. Hidroksipiridinoni kao anti-mikrobna, anti-malarijska i antivirusna sredstva

Željezo je vrlo značajno za sve mikroorganizme koji trebaju ovaj element za svoje stanične funkcije, uključujući proizvodnju energije, replikaciju DNA i zaštitu od reaktivnih kisikovih vrsta. Željezo dobivaju iz okoliša izlučivanjem jakih i selektivnih sredstava za odvajanje željeza, općenito spojeva niske molekularne mase, zvanih siderofori (tetradentati ili heksadentati). Terapijska strategija za suzbijanje mikrobnih infekcija uključuje liječenje jakim kemijskim sredstvima. Literaturno je poznato antimikrobno djelovanje sredstva za keliranje protiv brojnih zaraznih bolesti, uključujući malariju, hepatitis C, tuberkulozu i infekcije mikobakterijama. HP su među tim sredstvima za keliranje i već se pokazali inhibirajući rast za nekoliko bakterija i gljivica, kao što su *Escherichia coli*, *Listeria innocua*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Candida albicans* i *Mycobacterium avium*.⁶

Funkcionalizacija 3,4-HP usmjerena je na razvijanje antimikrobnih lijekova s potencijalnom primjenom u liječenju nekoliko slučajeva infekcija, uključujući *N*-derivatizaciju 3-hidroksi-2-metil-4-piridinona s alkilaminom i alkilamidima. Neki od tih derivata postižu (pri 20 mM liganda) 90-100% -tnu inhibiciju rasta *E. coli* i *L. innocua*. Kasnije su položaji 2 ili 6 heterocikličkog prstena derivatizirani s hidrofobnim aromatskim skupinama, kao što su fenil, piridil ili naftil, koji su rezultirali aktivnostima prema nekoliko bakterija i gljivica. Specifična funkcionalizacija je nužna u slučajevima određenih mikobakterija, kao što je *M. avium*. Ova mikobakterija živi i proliferira unutar makrofaga njihovih domaćina, a nije osjetljiva na tradicionalnu terapiju željeznim kelatorima.⁶

Malarija je također glavni globalni zdravstveni problem, za koji se procjenjuje da utječe na više od 2 milijarde ljudi. Uzrokovana je protozoanskim parazitom *Plasmodium*, koji se prenosi ugrizom zaražene ženke komarca *Anopheles*. Najozbiljniju vrstu bolesti uzrokuje *P. falciparum*. Slično kao i kod ostalih patogena, *P. falciparum* zahtijeva željezo za njegov razvoj i proliferaciju, a pretpostavlja se da ga ekstrahira iz hemoglobina prisutnih

u eritrocitima domaćina. Liječenje jakim kelatorima željeza, kao što je DFO, pokazalo se da inhibira rast parazita, što očigledno uključuje intracelularnu kelaciju željeznih bazena unutar parazitiziranih stanica.⁶

2.4.6. Antitumorsko djelovanje 3,4-HP

Tumor je naziv za abnormalnu nakupinu tkiva, koja može biti maligna, zloćudna ili kancerogena, odnosno benigna, dobroćudna ili nekancerogena. Samo maligni tumori napadaju okolna tkiva i metastaziraju.¹² Jedan od načina antitumorskog djelovanja kelatora zasniva se na vezanju željeza. Pri tome se tumorskoj stanici oduzima moć proliferacije. Poznato je da tumorske stanice imaju veću potrebu za željezom od zdravih stanica zbog brzog proliferiranja. U njima je metabolizam željeza izmijenjen. Tumorske stanice, za razliku od zdravih stanica, imaju veći broj transferinskih receptora na površini što te dolazi do većeg unosa željeza. RR, kojemu je za aktivnost potrebno željezo, katalizira redukciju ribonukleotida u njihove deoksiribonukleotidne analoge važne za sintezu DNA. Inaktivacija ovoga enzima uzrokuje prestanak sinteze DNA odnosno terminaciju proliferacije.⁶

2.4.7. Ostali važni biološki učinci 3,4-HP

Od ostalih vrsta bioloških aktivnosti koju pokazuju derivati 3,4-HP poznata je antibakterijska, te antiadhezijska aktivnost. Pokazalo se da ti spojevi mogu inhibirati rast mnogih bakterija te je važno nekoliko dodatnih strukturnih faktora. Na primjer, uvođenje alkilamidnih ili alkilaminskih supstituenata na dušikov atom piridinonskog skeleta ili supstitucija položaja 2 i 6. Antiadhezijska aktivnost tih derivata, prvi je put ispitana na α -manozidnim derivatima *N*-aril supstituiranih 3,4-HP *in vitro* uporabom testa inhibicije aglutinacije uropatogene bakterije *E. coli* na eritrocite iz krvi zamorca. Pokazalo se da svi spojevi umjereno inhibiraju hemaglutinaciju.¹⁰

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. Materijali i metode

U sintezama su korišteni dostupni polazni spojevi, otapala i reagensi: natrijev karbonat (5%-tni), kalcijev klorid, natrijev hidroksid (Fluka), 4-dimetilaminopiridin (DMAP; Merck), *N*-(3-dimetilaminopropil)-*N*-etilkarbodiimid hidroklorid (EDC × HCl, Sigma-Aldrich), 3-hidroksi-2-metilpiran-4-on (maltol; Sigma-Aldrich), *m*-anisidin, *m*-toluidin, *p*-toluensulfonska kiselina (*p*-TsOH; Merck), bezvodni natrijev sulfat (Merck), natrijev hidrogenkarbonat (Fluka), klorovodična kiselina (Sigma-Aldrich), etanol (Fluka), metanol (Fluka), diklormetan (DCM; Lach-Ner), etil-acetat (Fluka) i cimetna kiselina (studentski preparat). Sva korištena otapala su pročišćavana i sušena prema uobičajenim postupcima.¹⁴

Za pročišćavanje spojeva korištene su kromatografija na stupcu i prekrystalizacija iz odgovarajućeg otapala. Za praćenje tijeka reakcije, kontrolu čistoće spojeva i preliminarnu identifikaciju produkata korištena je tankoslojna kromatografija na pločicama silikagela. (60 F 254, 0,25 mm, Fluka). Za detekciju komponenti korištena je UV svjetlost valne duljine 254 nm ireverzibilna adicija joda. Za kromatografiju na stupcu i tankoslojnu kromatografiju je sustav otapala: Etil-acetat/metanol, 5:1

¹H NMR i ¹³C NMR spektri snimljeni su na instrumentu Bruker AV 600 na sobnoj temperaturi pri 400 MHz, 600MHz i 150 MHzu deuteriranom metanolu (CD₃OD) i deuteriranom dimetilsulfoksidu (DMSO-*d*₆) kao otapalu.

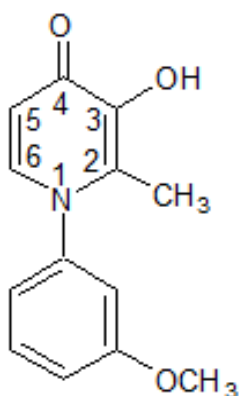
3.2. Priprava suhog diklormetana

U lijevku za odjeljivanje od 2L, izmučkan je diklormetan s 600 mL, 5%-tnog natrijevog karbonata te ispušten u erlenmayerovu tikvicu od 1L. Diklormetan se ponovno ekstrahira s 600 mL vode te ispusti u suhu erlenmayerovu tivicu. Dodatkom kalcijevog klorida nastaje mutna otopina koja stoji 24h bez miješanja.

U tikvicu od 2L kroz lijevak preko vaticе ulije se 1L diklormetana i stave se kamenčići za vrenje. Na složenu aparaturu za destilaciju spoji se tikvica u kojoj se nalazi diklormetan. Tikvica s diklormetanom se zagrijava a destilat se skuplja u tikvicu pri temperaturi 40-41°C. U tikvicu sa suhim diklormetanom stavljaju se molekulska sita.

3.3. Priprava 3-hidroksi-2-metil-1-(*m*-metoksifenil)piridin-4-ona (1)

U staklenu cijev dodani su maltol (1 g, 7.931 mmol), *m*-anisidin (891,1 µL, 7.931 mmol), *p*-TsOH (151 mg, 0,7931mmol) i voda (20 mL). Staklena cijev je zatvorena i prebačena u metalni nosač te grijana 48 h na temperaturi od 150 °C. Nakon 48 h reakcijska smjesa se filtrira preko Büchnerovog lijevka. Hlađenjem matičnice dolazi do kristalizacije, a nastali talog se odfiltrira preko Büchnerovog lijevka. Dobiven je žuti kristalni produkt **1** (773 mg, 42%); $R_f=0,60$ (etil-acetat/metanol, 5:1) *t.t.* 239,2-241,1°C.



Slika 2. Strukturna formula spoja **1**

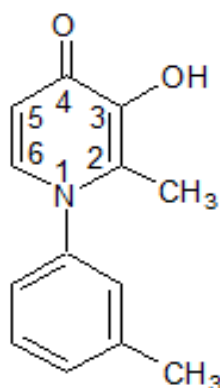
^1H NMR δ / ppm:

1.99 (s, 3H, CH₃), 3.81 (s, 3H, OCH₃), 6.20 (d, 1H, J = 7.30 Hz, H-5), 6.99–7.01 (m, 1H, H-Ar), 7.06 (s, 1H, H-Ar), 7.09–7.11 (m, 1H, H-Ar), 7.46 (t, 1H, J = 8.09 Hz, H-Ar), 7.54 (d, 1H, J = 7.30 Hz, H-6).

^{13}C NMR δ / ppm: 13.16, 55.47, 110.64, 112.60, 114.91, 118.90, 130.28, 128.47, 137.69, 142.55, 144.88, 159.83, 169.51

3.4. Priprava 3-hidroksi-2-metil-1-(*m*-metilfenil)piridin-4-ona (2)

U staklenu cijev dodani su maltol (1 g, 7,931 mmol), *m*-toluidin (849 mg, 7,931 mmol), *p*-TsOH (150,8 mg, 0,79 mmol) i voda (20 mL). Staklena cijev prebačena je u metalni nosač te grijana 48 h na temperaturi od 150 °C. Reakcijska smjesa obrađena je na jednak način kao u slučaju priprave spoja 1 (poglavlje 6.3.). Dobiven je žuti kristalni produkt **2** (490 mg, 29%); $R_f=0,85$ (etil-acetat/metanol, 5:1) *t.t.* 166-168°C.



Slika 3. Strukturna formula spoja **2**

^1H NMR (600 MHz, DMSO-) δ (ppm):

1,97 (s, 3H, CH₃), 2,38 (s, 3H, CH₃-Ar), 6,20 (d, 1H, $J=7,30$ Hz, H-5), 7,24 (d, 1H, $J=7,80$ Hz, H-Ar), 7,27 (s, 1H, H-Ar), 7,35 (d, 1H, $J=7,61$ Hz, H-Ar), 7,44 (t, 1H, $J=7,65$ Hz, H-Ar), 7,53 (d, 1H, $J=7,32$ Hz, H-6).

^{13}C NMR (150 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 13,25 (CH₃), 20,64 (CH₃-Ar), 110,71 (C-5), 123,88, 127,30, 129,30, 129,61 (4 CH, Ar), 128,50 (C-2), 137,75 (C-6), 139,41 (C-CH₃), 141,48 (C-N), 144,94 (C-3), 169,88 (C=O).

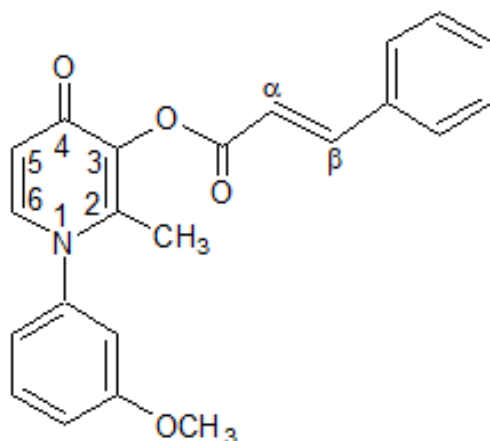
3.5. Priprava estera cimetine kiseline s *meta* supstituiranim derivatima *N*-aril-3-hidroksi-2-metilpiridin-4-ona

Za dobivanje estera cimetine kiseline s *meta* supstituiranim derivatima *N*-aril-3-hidroksi-2-metilpiridin-4-ona korištena je metoda Steglichove esterifikacije. Reakcije su provedene u suhom DCM kao otapalu u trajanju od 24h. Za Steglichovu esterifikaciju korišteni su *N*-aril-3-hidroksi-2-metilpiridin-4-on, cimetna kiselina, DMAP i EDC x HCl u navedenim omjerima=1 : 1: 0,1 : 1,1. Cimetna kiselina je prije reakcije pročišćena prekrizacijom iz vruće vodene otopine.

3.5.1. Priprava spoja [2-metil-1-(*m*-metoksifenil)piridin-4-on-3-il]-3-fenilprop-2-enoata (3)

Spoj **1** (100 mg, 0,432 mmol) otopljen je u okrugloj tikvici u suhom DCM (3 mL), dodani su cimetna kiselina (64 mg, 0,432 mmol) i DMAP (5,3 mg, 0,0432 mmol). Reakcijska smjesa se hladi na ledenoj kupelji uz miješanje na magnetskoj mješalici. U ohlađenu reakcijsku smjesu se doda EDC × HCl (91,1 mg, 0,475 mmol). Reakcijska smjesa se nastavlja miješati na magnetskoj mješalici najprije na ledenoj kupelji a zatim pri sobnoj temperaturi 24 h. Spoj **3** je pripravljen prema omjeru n(3-hidroksi-2-metil-1-(*m*-metoksifenil)piridin-4-on): n(cimetna kiselina): n(EDC×HCl): n(DMAP) = 1 : 1 : 1,1 : 0,1.

Nakon 24 h u reakcijsku smjesu je dodan DCM (12 mL) i reakcijska smjesa je ekstrahirana 2 puta otopinom klorovodice kiseline (25 mL, 0,5 mol dm⁻³), 1 puta sa zasićenom otopinom natrijeva-hidrogenkarbonata (25 mL) i 1 puta s destiliranom vodom (25 mL). Organski slojevi se sakupe i suše na bezvodnom natrijevom sulfatu. Nakon filtriranja sredstva za sušenje, DCM se upari na rotacijskom uparivaču uz sniženi tlak. Nakon pročišćavanja kromatografijom na stupcu silikagela (sustav otapala A), dobiven je kristalni produkt; spoj **3** (105 mg, 67%); R_f=0,68 (etil-acetat/metanol, 5:1).



Slika 4. Strukturna formula spoja **3**

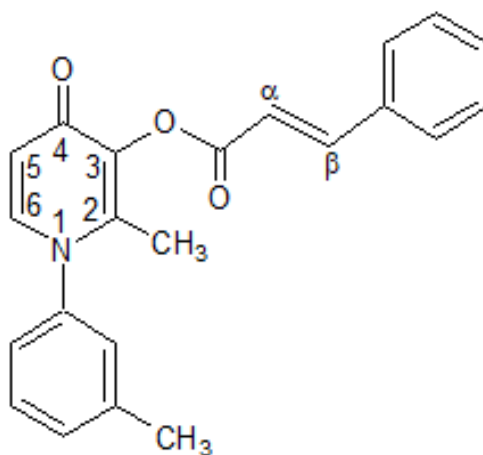
^1H NMR (400MHz, CD_3OD) δ /ppm:

2,04 (s, CH_3), 3,84 (s, OCH_3), 6,51 (d, 1H, $J=7,62$ Hz, H-5), 6,71 (d, 1H, $J=16,00$ Hz, H- α), 6,82-6,84 (m, 1H, H-Ar) 6,87-6,89 (m, 1H, H-Ar), 7,02-7,05 (m, 1H, H-Ar), 7,35 (d, 1H, $J=7,00$ Hz, H-6), 7,38-7,41 (m, 3H, $m+p$ -HAr_{cim}), 7,43 (d, 1H, $J=8,14$ Hz, H-Ar), 7,55-7,57 (m, 2H, o -HAr_{cim}), 7,89 (d, 1H, $J=16,01$ Hz, H- β)

3.5.2. Priprava spoja [2-metil-1-(*m*-metilfenil)piridin-4-on-3-il]-3-fenilprop-2-enoata (**4**)

Spoj **4** pripravljen je na jednak način kao spoj **3**. Spoj **2** (100 mg, 0,465 mmol) otopljen je u okrugloj tikvici u suhom DCM (3 mL), dodani su cimetna kiselina (68,97 mg, 0,465 mmol) i DMAP (5,67 mg, 0,0465 mmol) u prethodno spomenutim omjerima (poglavlje 3.5.).

Nakon 24 h reakcijska smjesa je obrađena na način kako je opisano u poglavlju 3.5. Nakon pročišćavanja kromatografijom na stupcu silikagela (etil-acetat/metanol, 5:1), dobiven je kristalni produkt; spoj **4** (0,94 mg, 63%); $R_f=0,74$ (etil-acetat/metanol, 5:1).



Slika 5. Strukturna formula spoja 4

$^1\text{H NMR}$ (400MHz, CD_3OD) δ /ppm:

2,09 (s, CH_3), 2,47 (s, $\text{CH}_3\text{-Ar}$), 6,60 (d, 1H, $J=7,52\text{Hz}$, H-5), 6,83 (d, 1H, $J=16,02\text{Hz}$, H- α), 7,27-7,29 (m, 1H, H-Ar), 7,32-7,33 (m, 1H, H-Ar), 7,42-7,43 (m, 1H, H-Ar), 7,45-7,48 (m, 3H, $m+p\text{-HAr}_{\text{cim}}$), 7,49-7,53 (m, 1H, H-Ar) 7,69-7,73 (m, 2H, $o\text{-HAr}_{\text{cim}}$), 7,82 (d, 1H, $J=7,52$ Hz, H-6), 7,95 (d, 1H, $J=16,03$ Hz, H- β)

4. REZULTATI I RASPRAVA

4.1. Uvod

Spoj **1**, 3-hidroksi-2-metil-1-(*m*-metoksifenil)piridin-4-on i spoj **2**, 3-hidroksi-2-metil-1-(*m*-metilfenil)piridin-4-on pripadaju skupini *N*-aril-3-hidroksipiridin-4-ona. 3,4-HP pripadaju u skupinu hidroksipiridinona, a u svojoj strukturi sadrže hidroksilnu skupinu na položaju **3** te keto skupinu na položaju **4**.⁴

Ovakvi spojevi posjeduju veliku biološku aktivnost, a iz literature je poznata njihova antineurodegenerativna¹, antimikrobna⁶, antimalarijska⁶, antivirusna⁶, kao i antitumorska aktivnost⁶. Hidroksipiridinonski skelet se vrlo lako strukturno modificira uvođenjem različitih supstituenata na položaje 1, 2 i 5 prema tome postoji veliki broj njihovih derivata.^{2,4,6}

Osnovni hidroksipiridinonski skelet se može strukturno modificirati vezanjem supstituenata na položaj **3** osnovnog hidroksipiridinonskog skeleta čime se povećava njegova lipofilnost u svrhu olakšavanja prolaska spoja kroz biomembranu.⁶ Ovaj rad nastavak je prethodnih istraživanja koja su provedena na Zavodu za organsku kemiju Kemijskog odsjeka PMF-a gdje je pripremljen čitav niz *N*-aril supstituiranih 3,4-HP i njihovih adamantilnih derivata.¹ U ovome radu kao lipofilna podjedinica odabrana je cimetna kiselina koja i sama pokazuje veliku biološku aktivnost.¹⁵ Prema tome prvi dio ovoga rada usmjeren je na pripremu osnovnih hidroksipiridinonskih prekursora (spojeva **1** i **2**) dok je u drugome djelu opisana priprava njihovih esterskih derivata s cimetnom kiselinom. Konačni produkti, spojevi **3** i **4** sintetizirani su u svrhu ispitivanja njihove biološke aktivnosti.

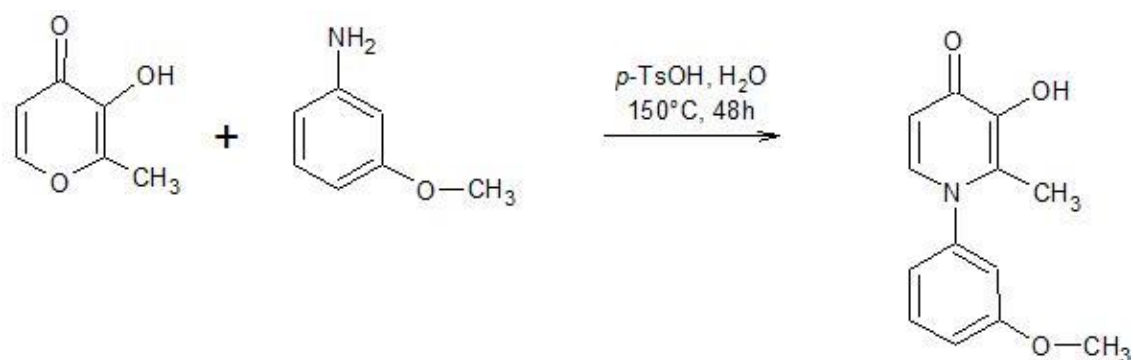
4.2. Priprava *meta* supstituiranih *N*-aril-3-hidroksi-2-metilpiridin-4-ona

Kao polazni reagens za pripravu *meta* supstituiranih derivata *N*-aril-3-hidroksi-2-metilpiridin-4-ona korišten je 3-hidroksi-2-metilpiran-4-on (maltol). Literaturno opisan¹ postupak sinteze spojeva **1** i **2** modificiran je upotrebom *p*-toluensulfonske kiseline (*p*-TsOH) kao kiselog katalizatora. Kao što je prethodno spomenuto, u kiselim reakcijskim uvjetima smanjena je mogućnost nastajanja alkoksida što onemogućava nastanak kondenzacijskih nusprodukata koji mogu utjecati na smanjenje ukupnog prinosa reakcije. Priprava 3-hidroksi-2-metil-1-(*m*-metoksifenil)piridin-4-ona (**1**) i 3-hidroksi-2-metil-1-(*m*-metilfenil)piridin-4-ona (**2**) iz maltola kao polaznog spoja provedena je izravno (bez zaštite hidroksilne skupine) uz upotrebu *meta* supstituiranih anilina kao Michaelovih donora.

Pripravljeni *meta* supstituirani derivati *N*-aril-3-hidroksi-2-metil-piridin-4-oni poslužili su kao polazni spojevi za sintezu esterskih derivata cimetne kiseline. Spoj **1** i spoj **2** razlikuju se prema vrsti supstituenta na arilnom dijelu 3,4-HP. Prema tome na ovaj način moguće je ispitati utjecaj vrste supstituenta na biološku aktivnost pripravljenih konačnih produkata **3** i **4**.

4.2.1. Priprava 3-hidroksi-2-metil-1-(*m*-metoksifenil)piridin-4-ona (**1**)

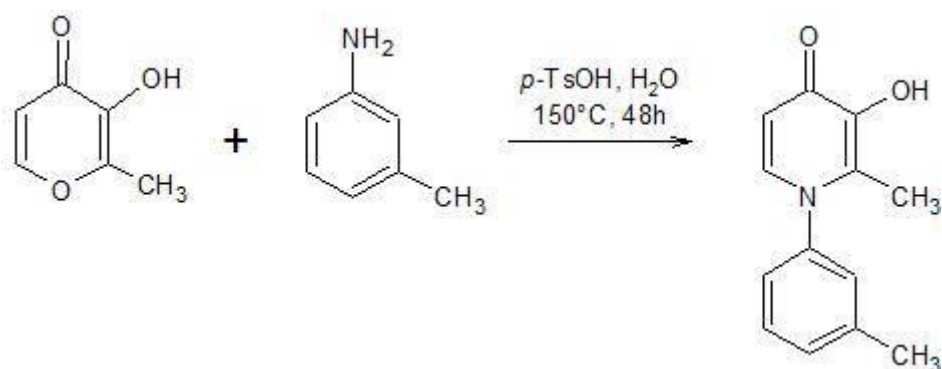
Sinteza spoja **1** (3-hidroksi-2-metil-1-(*m*-metoksifenil)piridin-4-on) provedena je upotrebom *m*-anisidina i maltola kao polaznih reagensa, uz dodatak vode i *p*-TsOH kao kiselog katalizatora. Spoj **1** pripravljen je u jednom koraku, kako je opisano u poglavlju 3.3. Sinteza 3,4-HP Michaelovom adicijom iz primarnog amina i maltola podrazumijeva upotrebu kiseloga katalizatora. Kiseli katalizator dodaje se kako ne bi došlo do deprotoniranja hidroksilne skupine maltola i nastajanja kondenzacijskih nusprodukata, te kako ne bi došlo do smanjenja ukupnog prinosa reakcije.¹ S obzirom da aril-amini nisu u potpunosti protonirani, sinteza je moguća u kiselim uvjetima. Iako direktna metoda pripreme spoja **1** nižim prinosom (42%), puno je jednostavnija od Harrisove metode koja obuhvaća više reakcijskih koraka. Spoj **1** služi kao polazni spoj za pripravu spoja **3**, njegovog esterskog derivata.¹



Shema 13. Priprava spoja 1

4.2.2. Priprava 3-hidroksi-2-metil-1-(*m*-metilfenil)piridin-4-ona (2)

Spoj 2 (3-hidroksi-2-metil-1-(*m*-metilfenil)piridin-4-on) je dobiven na isti način kao i spoj 1. Pripravljen je u jednom koraku, kao što je opisano u poglavlju 3.3. zagrijavanjem ekvimolarnih količina *m*-toluidina i maltola u vodi uz upotrebu *p*-TsOH kao kiselog katalizatora. Reakcijom *m*-toluidina i maltola sintetiziran je odgovarajući 3,4-HP, spoj 2, u niskom prinosu (29 %) no i u ovome slučaju kao u slučaju spoja 1 korištena je direktna metoda zbog njezine jednostavnosti u odnosu na Harrisovu metodu koja podrazumijeva više reakcijskih koraka.¹ Spoj 2 poslužio je kao polazni spoj za pripravu njegovog esterskog derivata s cimetnom kiselinom, spoja 4.



Shema 14. Priprava spoja 2

4.3. Priprava estera cimetine kiseline s *meta* supstituiranim derivatima *N*-**aril-3-hidroksi-2-metilpiridin-4-ona**

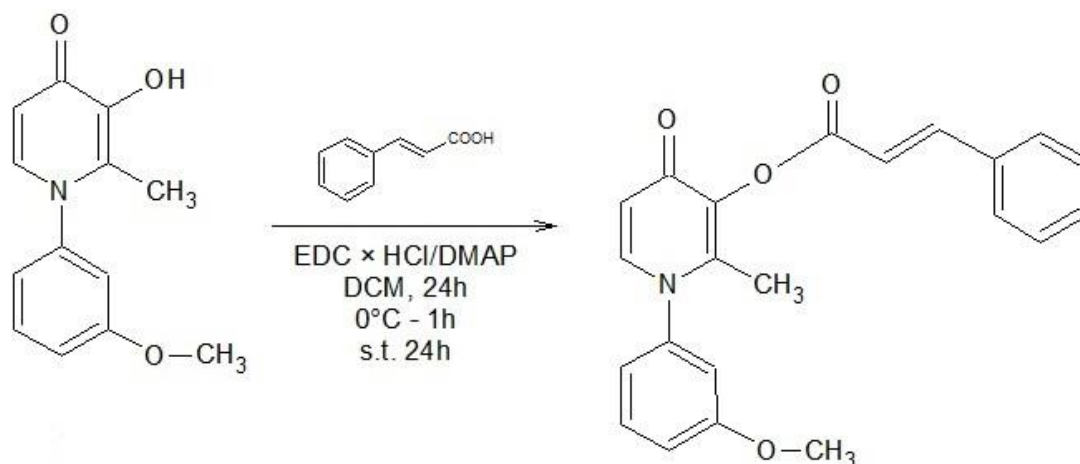
Literaturno je poznato kako povećanje lipofilnosti 3,4-HP, odnosno vezanje funkcionalne skupine u strukturu 3,4-HP dovodi do poboljšanja fizikalno-kemijskih i bioloških svojstava. Na ovaj način povećava se biodostupnost 3,4-HP i sposobnost njihova prijelaza kroz BBB.⁶ Prema tome u ovome radu opisana je funkcionalizacija položaja 3 osnovnog hidroksipiridinonskog skeleta, pri čemu je kao lipofilna podjedinica korištena cimena kiselina koja i sama posjeduje veliku biološku aktivnost.¹⁵

Za pripravu spojeva **3** i **4** korištena je Steglichova esterifikacija, odnosno metoda dobivanja estera u blagim reakcijskim uvjetima. U Steglichovoj esterifikaciji se koristi alkohol i karboksilna kiselina, najčešće uz DCC (*N,N'*-dicikloheksilkarbodiimid) kao aktivator i DMAP (4-dimetilaminopiridin) kao katalizator.¹⁶ U ovome radu kao polazni spojevi za sintezu estera korišteni su cimena kiselina i *meta* supstituirani derivati *N*-aril-3-hidroksi-2-metilpiridin-4-ona (spojevi **1** i **2**), EDC × HCl kao aktivator karboksilne skupine i DMAP kao katalizator. U slučaju sinteze oba derivata, spojeva **3** i **4** omjer korištenih reagenasa je isti: *n* (*meta* supstituirani *N*-aril-3-hidroksipiridin-4-on): *n* (cimena kiselina): *n* (EDC x HCl): *n* (DMAP)=1 : 1: 1,1 : 0,1. Sintetizirani spojevi **3** i **4** razlikuju se prema vrsti supstituenta na arilnom dijelu 3,4-HP čime je moguće ispitati njihov utjecaj na biološku aktivnost konačnih produkata.

4.3.1. Priprava spoja [2-metil-1-(*m*-metoksifenil)piridin-4-on-3-il]-3-fenilprop-2-enoata (**3**)

Za sintezu spoja **3** kao polazni reagens korišten je spoj **1** na čiju se slobodnu hidroksilnu skupinu Steglichovom esterifikacijom vezala cimena kiselina. DMAP je korišten kao katalizator, a kao aktivator je korišten je EDC × HCl da bi se izbjeglo stvaranje DHU kao nepoželjnog nusprodukta. Sinteza spoja **3** je uspješno provedena što je pretpostavljeno tankoslojnom kromatografijom te potvrđeno ¹H NMR spektroskopijom. Pročišćavanje spoja kromatografijom na stupcu silikagela dovelo je do njegovog raspada, kao i prekriztalizacija iz odgovarajućeg otapala (metanol, etil-acetat). Zbog problema prilikom

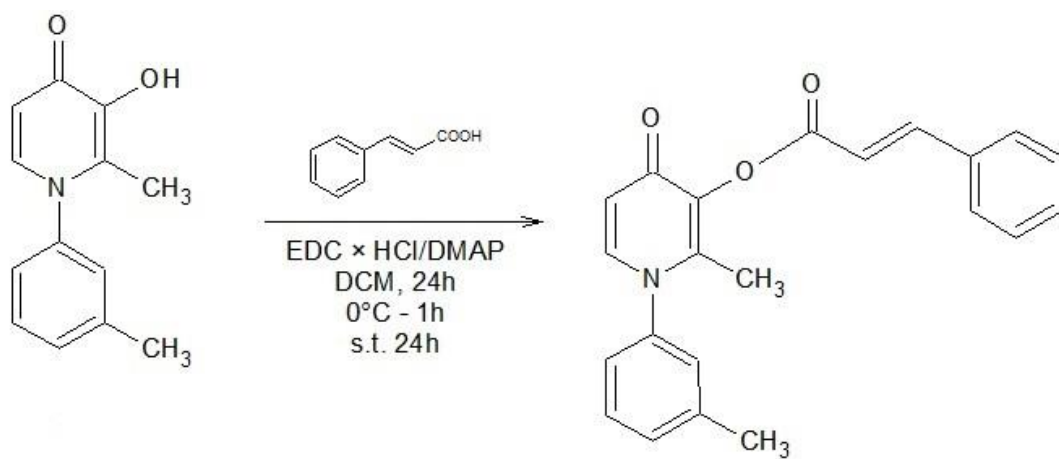
pročišćavanja spoja **3** i nestabilnosti spoja pri sobnoj temperaturi spoju **3** se neće ispitivati biološka aktivnost.



Shema 15. Priprava spoja **3**

4.3.2. Priprava spoja [2-metil-1-(*m*-metilfenil)piridin-4-on-3-il]-3-fenilprop-2-enoata (**4**)

S ciljem povećanja lipofilnosti 3-hidroksi-2-metil-1-(*m*-metilfenil)piridin-4-ona (**2**) Steglichovom esterifikacijom cimetna je kiselina vezana na OH skupinu spoja **2**. Spoj **4** pripravljen je na jednak način kao i prethodno pripravljeni spoj **3**, tako da su spoju **2** dodani cimetna kiselina, EDC x HCl i DMAP. Uspješno je pripravljen esterski derivat 3-hidroksi-2-metil-1-(*m*-metilfenil)piridin-4-on (**4**), što je pretpostavljeno tankoslojnom kromatografijom te potvrđeno ¹H NMR spektroskopijom. Pročišćavanjem spoja **4** kromatografijom na stupcu i prekrizacijom (etil-acetat, metanol) također je došlo do raspada spoja. Zbog nestabilnosti spoja pri sobnoj temperaturi spoj **4** neće poslužiti za ispitivanje njegove biološke aktivnosti.



Shema 16. Priprava spoja 4

5. ZAKLJUČAK

Sinteze spojeva **1** [3-hidroksi-2-metil-1-(*m*-metoksifenil)piridin-4-on] i **2** [3-hidroksi-2-metil-1-(*m*-metilfenil)piridin-4-on] provedene su direktnom metodom u jednom reakcijskom koraku, upotrebom *meta* supstituiranih anilinskih derivata i maltola kao polaznih reagensa, uz dodatak vode i *p*-TsOH kao kiselog katalizatora, u zatvorenoj staklenoj cijevi. Tako pripravljeni spojevi **1** i **2** služe kao polazni reagensi za pripravu spojeva **3** [2-metil-1-(*m*-metoksifenil)piridin-4-on-3-il]-3-fenilprop-2-enoata] i **4** [3-hidroksi-2-metil-1-(*m*-metilfenil)piridin-4-on] metodom dobivanja estera u blagim reakcijskim uvjetima (Steglichova esterifikacija). Spojevi **3** i **4** pripravljeni su u svrhu njihove biološke evaluacije, no zbog problema prilikom pročišćavanja spojeva te zbog nestabilnosti spojeva pri sobnoj temperaturi spojevima **3** i **4** neće biti ispitana njihova biološka aktivnost.

6. LITERATURA

1. Ž. Car, V. Petrović Peroković, S. Tomić Pisarović, *Kem. Ind.* **65** (2016) 595-604.
2. V. Petrović Peroković, B. Prugovečki, Ž. Car, *Croat.Chem.Acta* **86** (2013) 317-323.
3. D. Gabre, *Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry*, **9** (2012), 193-196.
4. A. Cilibrizzi, V. Abbate, Y.L. Chen, Y. Ma, T. Zhou, R. C. Hider, *Chemical Reviews* **118** (2018), 7657-7701.
5. L. Saghaei, and R.C. Hider, *Res.Pharm. Sci.* **3** (1) (2008) 21-30.
6. M. A. Santos, S. M. Marques, S. Chaves, *Coord. Chem. Rev.* **256** (2012), 240-259.
7. Patel, M. K.; Fox, R.; Taylor, P. D., *Tetrahedron* **52** (1996), 1835–1840.
8. J.G. Smith., *Organic chemistry*, McGraw-Hill, New York, 2011.
9. R. L. N. Harris. *Aust. J. Chem.* **29** (1976), 1329 -1334.
10. Ž. Car, V. Petrović Peroković, S. Tomić Pisarović, *Kem. Ind.* **66** (2017), 17-28.
11. I. Gašparović, N. Starčević-Čizmarević, O. Peroković, *Medicina Fluminensis*, **49** (2), 144-156.
12. Lauren E. Scott and Chris Orvig, *Chemical Reviews* **109** (2009), 4885-4910.
13. Bradley, J. L.; Blake, J. C.; Chamberlain, S.; Thomas, P. K.; Cooper, J. M.; Schapira, A. H. V. *Hum. Mol. Genet.* **9** (2000), 275-282.
14. *Vogel's Textbook of practical Organic Chemistry*, 4th edition, Longman, London, 1978.
15. P. Sharma, *J. Chem. Pharm. Res.* **3** (2011), 403-423.
16. B. Neises, W. Steglich, *Agnew. Chem. Int. Ed. Engl.* **17** (1978) 522-524.

7. PRILOZI

7.1. Popis oznaka kratica i simbola

BBB	eng. blood brain barrier
Bn	benzil
CH ₃ OH	metanol
DCC	<i>N,N'</i> -dicikloheksilkarbodiimid
DCM	diklormetan
DFO	desferioksamin B
DMAP	dimetilaminopiridin
DMF	dimetilformamid
DNA	deoksiribonukleinska kiselina
EDC × HCl	<i>N</i> -(3-dimetilaminopropil)- <i>N</i> -etilkarbodiimid hidroklorid
EtOH	etanol
HP	hidroksipiridinoni
1,2-HP	1-hidroksipiridin-2-oni
3,2-HP	3-hidroksipiridin-2-oni
3,4-HP	3-hidroksi-piridin-4-oni
<i>m</i>	eng. <i>meta</i>
<i>m</i> CPBA	<i>m</i> -klorperoksidbenzenska kiselina
MeOH	metanol
NaOH	natrijevhidroksid
NMR	nuklearna magnetska rezonancija
<i>o</i>	eng. <i>ortho</i>
<i>p</i>	eng. <i>para</i>
<i>p</i> -TsOH	<i>p</i> -toluensulfonska kiselina
ROS	eng. reactive oxygen species
RR	eng. ribonucleotide reductase
TMDM	tetrametildiaminometan
t.t.	temperatura taljenja
UV	eng. ultraviolet (ultraljubičasto)