

Kompleksi prijelaznih metala i kojinske kiseline: priprava i biološka aktivnost

Janković, Jelena

Undergraduate thesis / Završni rad

2024

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, Department of Chemistry / Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Odjel za kemiju**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:182:463340>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-10-04**

Repository / Repozitorij:

[Repository of the Department of Chemistry, Osijek](#)



Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku – Odjel za kemiju

Prijediplomski studij Kemija

Jelena Janković

**KOMPLEKSI PRIJELAZNIH METALA I
KOJINSKE KISELINE: PRIPRAVA I
BIOLOŠKA AKTIVNOST**

Završni rad

Mentorica: izv. prof. dr. sc. Martina Šrajer Gajdošik

Neposredna voditeljica: Nikolina Filipović, mag. educ. chem.

Osijek, 2024.

Naziv sveučilišta: **Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku – Odjel za kemiju**

Naziv studija: **Sveučilišni prijediplomski studij Kemija**

Znanstveno područje: Prirodne znanosti

Znanstveno polje: Kemija

Znanstvena grana: Anorganska kemija / Biokemija

KOMPLEKSI PRIJELAZNIH METALA I KOJINSKE KISELINE: PRIPRAVA I BIOLOŠKA AKTIVNOST

JELENA JANKOVIĆ

Rad je izrađen na: Sveučilištu u Osijeku – Odjel za kemiju

Mentor: izv. prof. dr. sc. Martina Šrajer Gajdošik

Neposredni voditelj: Nikolina Filipović, mag. educ. chem.

Sažetak:

Kojinska kiselina (5-hidroksi-2-hidroksimetil-4-piron, $C_6H_6O_4$) je organska kiselina koja je dobro topljiva u vodi, etanolu i acetonu. Jedan je od nusprodukata u procesu fermentacije riže za slad koji se koristi u proizvodnji sakea, japanskog rižinog vina. Inhibitor je rasta bakterija, gljivica te spriječava razmnožavanje virusa. Zbog mogućnosti modifikacije strukture, što za posljedicu ima brojne strukturne transformacije, danas je poznat velik broj derivata kojinske kiseline, kao i kompleksa prijelaznih metala u kojima se ona koristi kao ligand. Spomenute se skupine spojeva intenzivno proučavaju zbog svoje potencijalne biološke aktivnosti. U ovom radu predstavljeni su značajni rezultati iz literaturno dostupnih podataka koji pokazuju raznovrsnost pripreme kompleksa kojinske kiseline, zastupljenost esencijalnih metalnih iona u takvim spojevima, kao i njihovu biološku evaluaciju. U prvom dijelu rada opisane su strukturne značajke kojinske kiseline, najčešće metode pripreme kompleksa s kojinskom kiselinom i testovi citotoksičnosti, nakon čega slijedi pregled novijih rezultata vezanih uz protutumorsku, antibakterijsku i antifungalnu aktivnost kompleksa prijelaznih metala s kojinskom kiselinom.

Ključne riječi: *antibakterijska aktivnost, biološka evaluacija, kojinska kiselina, mehanokemijska sinteza, sinteza u otopini, strukturna karakterizacija, protutumorska aktivnost.*

Jezik izvornika: hrvatski jezik

Završni rad obuhvaća: 44 stranice, 17 slika, 10 tablica, 102 literaturna navoda

Rad prihvaćen: 8. 7. 2024.

Stručno povjerenstvo za ocjenu rada:

1. Izv. prof. dr. sc. Elvira Kovač-Andrić
2. Izv. prof. dr. sc. Martina Šrajer Gajdošik
3. Doc. dr. sc. Olivera Galović

Rad je pohranjen: Knjižnica Odjela za kemiju, Kuhačeva 20, 31000 Osijek
Repozitorij Odjela za kemiju, Osijek

University Name: **Josip Juraj Strossmayer University of Osijek – Department of Chemistry**

Name of study programme: **University Undergraduate study programme in Chemistry**

Scientific area: Natural sciences

Scientific field: Chemistry

Scientific branch: Inorganic chemistry / Biochemistry

COMPLEXES OF TRANSITION METALS AND KOJIC ACID: PREPARATION AND BIOLOGICAL ACTIVITY

JELENA JANKOVIĆ

The paper was created on: Department of Chemistry

Supervisor: Assoc. Prof. dr. sc. Martina Šrajer Gajdošik

Assistant supervisor: Nikolina Filipović, Research Assistant

Abstract:

Kojic acid (5-hydroxy-2-hydroxymethyl-4-pyrone, C₆H₆O₄) is an organic acid that is highly soluble in water, ethanol and acetone. This acid is a by-product of the fermentation process of malted rice, which is used for the production of sake, a Japanese rice wine. It is an inhibitor for the growth of bacteria and fungi and prevents the multiplication of viruses. Today, a large number of kojic acid derivatives and transition metal complexes are known because they can change their structure, leading to structural transformations. These compounds are intensively studied due to their potential biological activity. In this paper, important results from the literature are presented, showing the diversity of preparation of kojic acid complexes, the presence of essential metal ions in such compounds and their biological evaluation. The first part of the article describes the structural characteristics of kojic acid, the most common methods for the preparation of complexes with kojic acid and cytotoxicity tests, followed by an overview of recent results on the antitumor, antibacterial and antifungal activity of complexes of transition metals with kojic acid.

Keywords: *antibacterial activity, biological evaluation, kojic acid, mechanochemical synthesis, solution synthesis, structural characterization, antitumor activity*

Original language: Croatian language

Thesis includes: 44 pages, 17 figures, 10 tables, 102 references

Thesis accepted: 8th July 2024

Reviewers:

1. Assoc. Prof.dr.sc. Elvira Kovač-Andrić
2. Assoc. Prof.dr.sc. Martina Šrajer Gajdošik
3. Assist. Prof. Olivera Galović

Thesis deposited in: Library of the Department of Chemistry, Ulica Franje Kuhača 20, Osijek
Repository of the Department of Chemistry, Osijek

Sadržaj

1. UVOD	1
2. LITERATURNI PREGLED	2
2.1. Kojinska kiselina	2
2.1.1. Strukturne značajke kojinske kiseline	3
2.1.2. Koordinacijski spojevi	5
2.1.2.1. <i>Kelatni ligandi</i>	6
2.1.2.2. <i>Kelatni efekt i stabilnost kompleksa</i>	6
2.1.3. Biološka istraživanja	7
2.1.3.1. <i>Testovi citotoksičnosti</i>	7
2.1.3.2. <i>Stanične linije kao koristan alat za biomedicinska istraživanja</i>	8
2.1.3.3. <i>Dvodimenzijaska stanična kultura</i>	8
2.1.3.4. <i>Građa bakterija i antibakterijska ispitivanja</i>	9
2.1.4. Biološka ispitivanja slobodne kojinske kiseline	10
2.1.4.1. <i>Primjena u kozmetičkoj industriji</i>	10
2.1.4.2. <i>Antibakterijska ispitivanja</i>	11
2.1.4.3. <i>Primjena kojinske kiseline u prehrambenoj industriji</i>	13
2.2. Kompleksni spojevi s kojinskom kiselinom	14
2.2.1. Metode pripreme kompleksa kojinske kiseline	15
2.2.2. Strukturna karakterizacija kompleksa s kojinskom kiselinom	19
2.2.3. Biološka važnost i primjena (prijelaznih) metala	25
2.3. Biološka aktivnost kompleksnih spojeva s kojinskom kiselinom	27
2.3.1. Protutumorska aktivnost	27
2.3.2. Antibakterijska aktivnost	28
2.3.3. <i>In vivo</i> ispitivanja	31
2.3.4. Pregled ostalih bioloških ispitivanja kompleksnih spojeva	33
3. ZAKLJUČAK	34

4. POPIS KRATICA I SIMBOLA.....	35
5. LITERATURNI IZVORI.....	37

1. UVOD

U ovom završnom radu prikazan je pregled novijih istraživanja vezanih za pripravu, strukturnu karakterizaciju i biološku aktivnost slobodne kojinske kiseline kao i kompleksa prijelaznih metala u kojima ona služi kao ligand. Kojinska kiselina pokazala se kao vrlo dobar model za izučavanje strukturnih transformacija kao i biološke aktivnosti. Uz maltol, jedan je od glavnih predstavnika hidrosipiranona – heterocikličkih spojeva koji u svojoj strukturi sadrže kisikove atome (endocikličke kisikove atome) i hidroksilne skupine (–OH). Izvrstan je donor elektrona te ima izražen afinitet prema metalnim ionima (najčešće dvovalentnim i trovalentnim poput: Fe^{2+} , Cu^{2+} , Fe^{3+} , Al^{3+}) što ju čini pogodnim prekursorom za pripravu *bis* i *tris* kompleksnih spojeva [1,2]. Prema literaturno dostupnim podacima, kompleksi kojinske kiseline pokazuju značajnu biološku aktivnost zbog čega se unazad nekoliko desetljeća intenzivno istražuju. Značajne rezultate pokazuju posebno u supresiji rasta tumorskih staničnih linija. Otkrićem cisplatina (kompleks platine koji je u kliničkoj upotrebi) i njegovih analoga započela je era istraživanja metalnih kompleksa s potencijalnim protutumorskim djelovanjem, stoga danas znanstvenici intenzivno istražuju biološki kapacitet/aktivnost kompleksa prijelaznih metala, a prvenstveno se ispituju njihova protutumorska i antibakterijska svojstva [3,4].

Cilj istraživanja je dati pregled najznačajnijih rezultata relevantne literature o biološkim učincima kojinske kiseline i njenih kompleksnih spojeva kao ishodište za istraživanje i pripravu novih, selektivnih metalnih kompleksa s ligandima iz skupine hidrosipiranona.

2. LITERATURNI PREGLED

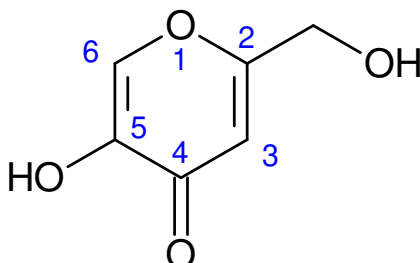
2.1. Kojinska kiselina

Kojinska kiselina, molekulske formule $C_6H_6O_4$, organski je spoj iz skupine hidroksipiranona. Hidroksipiranoni pripadaju heterocikličkim spojevima (ciklički spojevi koji u prstenu imaju barem jedan atom koji nije ugljik – heteroatom). Naziv prema IUPAC-ovoj nomenklaturi (engl. *International Union of Pure and Applied Chemistry, IUPAC* – Međunarodna unija za čistu i primijenjenu kemiju) glasi: 5-hidroksi-2-hidroksimetilpiran-4-on (Slika 1). Kojinska kiselina je potpuno topljiva u vodi, etanolu i acetonu, a djelomično u dietil-eteru, etil-acetatu, kloroformu i piridinu. U većini ostalih otapala nije topljiva [5,6]. Pri sobnoj temperaturi nalazi se u obliku bezbojnih, igličastih kristala [7].

Prema literaturno dostupnim podacima, vrelište kojinske kiseline je u rasponu između 151 °C i 154 °C [6–8]. Poprilično je nestabilna na svjetlu i povišenoj temperaturi te lako oksidira [8–10]. Glavni je produkt mikrobiološke fermentacije na čvrstoj fazi (engl. *Solid-State Fermentation, SSF*) gljivica roda *Aspergillus*, posebice *Aspergillus oryzae*. Naziv za kojinsku kiselinu izveden je od japanske riječi “koji” koja u prijevodu označava “kuhanu rižu” [7–11]. Pored gljivica iz roda *Aspergillus*, kojinska kiselina se može dobiti i iz gljivica roda *Penicillium* [12]. Mehanizam biosinteze kojinske kiseline fermentacijom ugljikohidrata do danas nije u potpunosti razjašnjen, ali pretpostavlja se da se događa izravna pretvorba glukoze u kojinsku kiselinu bez kidanja piranoznog prstena [13].

Kojinska kiselina je 1930. godine prvi puta dobivena kemijskom sintezom iz D-glukoze [14], dok ju je prirodnim putem izolirao Saito 1907. godine iz micelija *A. oryzae* uzgojenih na kuhanoj riži [5]. Kristalna i molekulska struktura kojinske kiseline riješena je 1991. godine, a sastoji se od piranonskog prstena na koji su supstituirane hidroksilna grupa na atomu C-5, hidroksimetilna grupa na atomu C-2 i okso grupa na poziciji 4 (Slika 1). Njezina biološka aktivnost povezuje se sa sposobnošću inhibicije tirozinaze (metaloenzim bakra koji katalizira sintezu melanina) u sintezi melanina te s antibakterijskim, antifungalnim, antiupalnim i protutumorskim djelovanjem. Budući da inhibira tirozinazu, koristi se kao pozitivna kontrola za usporedbu aktivnosti novih inhibitora. Utvrđeno je da kojinska kiselina sprječava fotooštećenje i nabiranje kože miševa bez dlake [15,16].

Dobar je kelator iona (prijelaznih) metala i slobodnih radikala stoga je učinkovito sredstvo za fotozaštitu. Trenutačni dokazi upućuju na to da izaziva depigmentaciju kože putem supresije slobodne tirozinaze, uglavnom zbog keliranja bakra na aktivnom mjestu enzima [15,16].

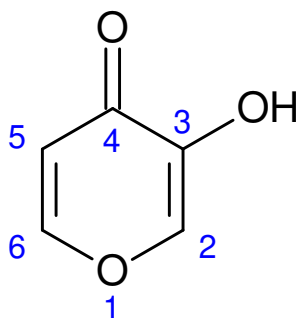


Slika 1. Strukturna formula kojinske kiseline (5-hidroksi-2-hidroksimetilpiran-4-on).

2.1.1. Strukturne značajke kojinske kiseline

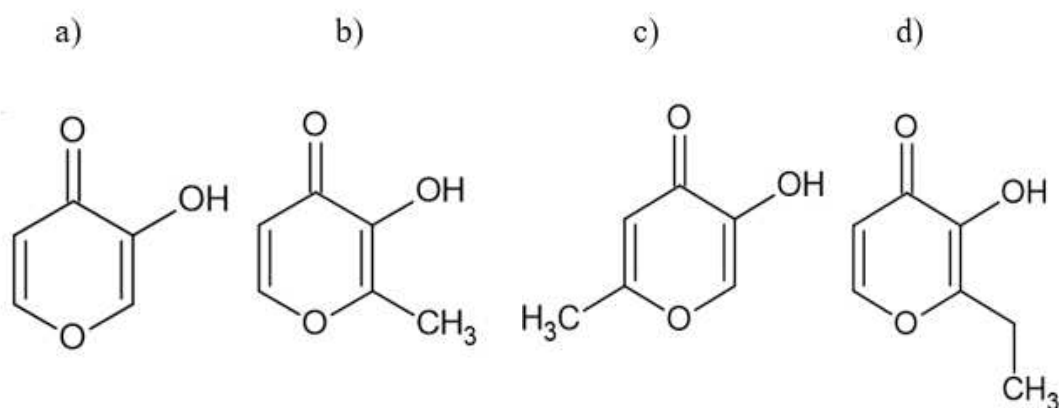
Kao što je ranije navedeno, jezgra hidropsipiranona sastoji se od nezasićenog šesteročlanog prstena koji sadrži atom kisika i keto skupinu, a kao supstituenti najčešće su vezane hidroksilne –OH ili karboksilne skupine –COOH (Slika 2). Uslijed prisustva lako disocirajućeg protona iz –OH skupine, kojinskoj kiselinu pogoduje stvaranje neutralnih, termodinamički stabilnih kompleksa s metalnim ionima unutar fiziološkog pH (7,45–7,55) [17]. Budući da egzociklički kisikovi atomi mogu donirati po dva elektronska para metalnom atomu, hidropsipiranoni stvaraju kompleksne spojeve s dvovalentnim i trovalentnim metalnim kationima. Primjena hidropsipiranona u medicinskoj anorganskoj kemiji može se podijeliti u dva glavna područja:

1. **Razvoj liganda** za sintezu *in situ* kompleksa s ionom metala.
2. **Formiranje kompleksa metalni ion-ligand** s ciljem poboljšanja apsorpcije i/ili biodistribucije određenog metalnog iona [18].



Slika 2. Opća strukturna formula 3-hidropsipiran-4-on.

Među hidroksipiranonima najviše su istraženi 3-hidroksipiran-4-oni, od kojih su najpoznatiji: piromekonska kiselina ($C_5H_4O_3$), maltol ($C_6H_6O_3$), alomaltol ($C_6H_6O_3$) i etilmaltol ($C_7H_8O_3$) čije su strukturne formule prikazane na Slici 3 [19, 20].

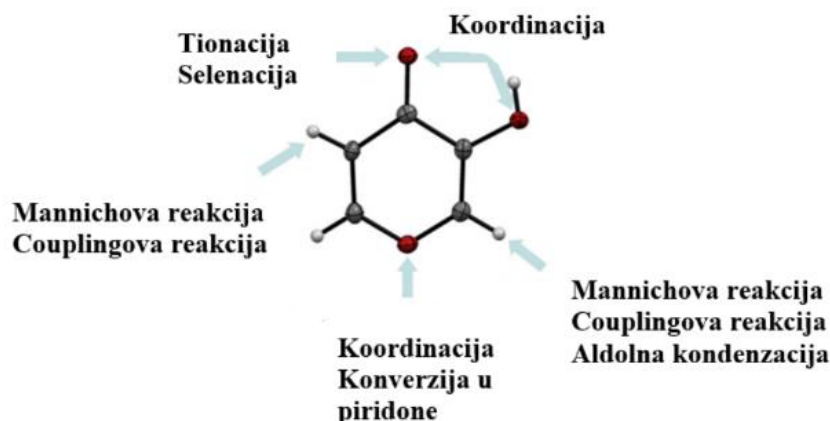


Slika 3. Strukturne formule: **a)** piromekonske kiseline ($C_5H_4O_3$), **b)** maltola ($C_6H_6O_3$), **c)** alomaltola ($C_6H_6O_3$), **d)** etilmaltola ($C_7H_8O_3$) [20].

S obzirom na međusobni položaj hidroksilne i keto skupine u prstenu, 3-hidroksipiran-4-oni pokazuju dobra kelatna svojstva, zbog čega su podložni stvaranju derivata, kao i stvaranju kompleksa [20, 21]. Zbog niskog profila toksičnosti i visoke biokompatibilnosti, maltol je strukturno i biološki najviše istražen spoj iz skupine hidroksipiran-4-ona [22]. Maltol i njegov analog etilmaltol su poznati u prehrambenoj industriji gdje se koriste kao prehrambeni aditivi (E636 i E637) koji doprinose slatkastom okusu i mirisu kruha, piva i kolača [20, 21].

Šesteročlani heterociklički prsten hidroksipirana omogućuje strukturne modifikacije na različitim pozicijama što rezultira pripremom novih derivata. Odabir mjesta modifikacije i sintetski put određuju strukturu i svojstva novonastalog spoja, a samim tim i mogućnost njegove primjene. 3-hidroksipiran-4-oni i njihovi analozi služe kao gradivni blokovi za sintezu biološki aktivnih spojeva. U strukturi hidroksipirana nailazi se na značajan broj različitih veznih mjesta s mogućnostima strukturnih modifikacija [14, 20]. Najreaktivniji centar 3-hidroksipiran-4-ona se nalazi na atomu C-2 (osim kod alomaltola čiji je najreaktivniji centar na atomu C-4) i za taj položaj karakteristične su sljedeće reakcije: aldolna kondenzacija, Mannichova reakcija i reakcije kopulacije [19, 20].

Na Slici 4 prikazani su reaktivni centri 3-hidroksipiran-4-ona i karakteristične reakcije za pojedini centar.



Slika 4. Reaktivni centri 3-hidroksipiran-4-ona i reakcije kojima podliježu. Preuzeto i prilagođeno iz: [19].

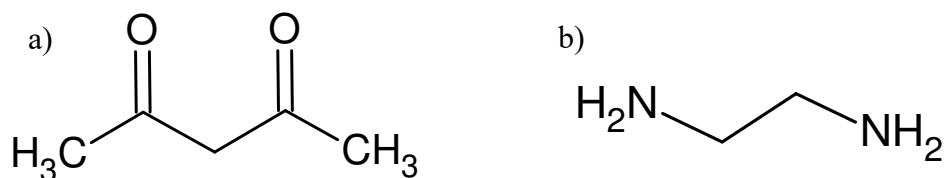
Kojinska kiselina posjeduje nekoliko važnih reakcijskih centara koji mogu biti uključeni u brojne reakcije: adicije, alkilacije, acilacije, oksidacije, otvaranje prstena te reakcije nukleofilne i elektrofilne supstitucije [14,19, 20].

Posebnost u vidu strukture kojinske kiseline u usporedbi s ostalim hidroksipiranonima jest posjedovanje hidroksimetilne skupine na atomu C-2 koja služi kao dodatni reakcijski centar te se može oksidirati Jonesovim reagensom koji se sastoji od otopine kromovog(VI) oksida (CrO_3), natrijeva ili kalijeve dikromata ($\text{Na}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$, $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$) u razrijeđenoj sumpornoj kiselini ($\text{H}_2\text{SO}_4(\text{aq})$). Nakon oksidacije navedenim reagensom, kojinska kiselina se pretvara u karboksilnu kiselinu ili u klorokojinsku kiselinu reakcijom s tionilkloridom. Hidroksilna grupa koja se nalazi na atomu C-5 u reakciji s metalima poput natrija, kalcija, bakra, nikla i kadmija dovodi, najčešće, do nastanka soli tih metala [14, 19, 20]. Strukturne modifikacije na atomu C-6 mogu se provesti aldolnom kondenzacijom ili Mannichovom reakcijom ukoliko su atomi C-2 i C-5 već supstituirani. Ovakve modifikacije su vrlo važne za sintezu novih spojeva na bazi hidroksipiranona s različitim biološkim svojstvima [19, 20].

2.1.2. Koordinacijski spojevi

Kompleksni spojevi su zanimljiva grupa spojeva koji se sastoje od centralnog metalnog kationa (CMK) koji može biti Ca^{2+} , Cu^{2+} , Fe^{2+} , Mg^{2+} , Fe^{3+} . CMK su okruženi, najčešće, neutralnim molekulama (voda, amonijak, ugljikov monoksid) ili anionima (CN^- , OH^- , F^- , NO_3^-). Anioni i manje neutralne molekule koje se nalaze oko centralnog metalnog kationa zovu se ligandima. Ligandi i centralni metalni kationi su povezani koordinacijskom vezom.

Ona se još naziva i donorsko-akceptorskom vezom zato što ligandi koji, najčešće, sadržavaju jedan ili više nevezanih elektronskih parova doniraju te parove u vezu s CMK s ciljem postizanja popunjavanja valentne ljuske metalnog kationa. Koordinacijski broj (KB) pokazuje broj liganada vezanih na CMK. Najčešći koordinacijski brojevi su 4 i 6, no mogući su i: 2, 3, 5, 7 i 8. S obzirom na broj donorskih atoma ligandi se mogu podijeliti na: monodentatne i polidentatne (bidentatni, tridentatni...). Ligandi koji posjeduju više donorskih mjesta pomoću kojih mogu tvoriti koordinacijsku vezu s centralnim metalom te tvore prstenaste strukture nazivaju se kelatnim ligandima [23–26]. Najpoznatiji primjeri kelatnih liganada su pentan-2,4-dion ($\text{CH}_3\text{COCH}_2\text{COCH}_3$) (Slika 5a) ili etilendiamin ($\text{C}_2\text{H}_4(\text{NH}_2)_2$) (Slika 5b) koji se na centralni metalni ion vežu preko svoja dva kisikova odnosno dušikova atoma [23–28].



Slika 5. Strukturna formula a) pentan-2,4-diona i b) etilendiamina. Preuzeto i prilagođeno iz: [28].

2.1.2.1. Kelatni ligandi

3-hidroksi-*n*-piranoni ($n = 2, 4$) često se koriste kao *O,O*- kelatni ligandi zbog afiniteta prema metalnim ionima te stvaranja kompleksnih spojeva. (Hidroksi)piranonski kompleksi s obzirom na slabije bidentatno vezanje (od primjerice hidroksipiridinona koji sadrže N donorne atome i pokazuju jači afinitet prema metalnim ionima, npr. Cu^{2+}), česte disocijacije kompleksa i otpuštanja metalnih iona u organizmu, služe kao transportni sustavi za dopremanje metalnih iona u dijelove organizma gdje postoji deficit metalnih iona od biološkog značaja [29–31]. Kompleksi su neutralni što im olakšava put do odredišta (biološke mete) kroz lipofilne membrane tkiva putem olakšane pasivne difuzije [19, 32].

2.1.2.2. Kelatni efekt i stabilnost kompleksa

Molekulska građa liganda može u velikoj mjeri igrati ulogu u stvaranju kompleksnih spojeva. Vrsta, broj i položaj donornih atoma su značajan čimbenik pri dizajniranju liganada za stvaranje koordinacijskih spojeva, odnosno pri dizajniranju liganada za vezanje specifičnih metalnih kationa. Značajni čimbenici koji se uzimaju u obzir pri dizajniranju

liganada su: HSAB¹ princip [33], geometrija kelatnog prstena i veličina slobodnog veznog prostora (kod cikličkih liganada). Hancock i suradnici [34] su 2013. godine objavili rad u kojemu su iznijeli rezultate DFT (engl. *Discrete Fourier Transform*) analize učinka veličine kelatnog prstena na selektivnost metalnih iona u kompleksima poliaminskih liganada. Kontrola selektivnosti metalnih iona važna je u nizu područja, primjerice za dizajniranje liganada koji bi mogli ukloniti metalne ione koji uzrokuju brojne bolesti kao što su Cu(II) i Zn(II) kod Alzheimerove bolesti i Fe(III) u Parkinsonovoj bolesti ili selektivnog uklanjanja Am(III) i Cm(III) iz smjese Ln(III) iona prilikom obrade nuklearnog otpada. Prilikom dizajniranja liganada u obzir se prvenstveno uzima izbor donorskih atoma, koji je u velikoj mjeri zasnovan na Pearsonovom HSAB principu koji mogu pomoći u predviđanju očekivane geometrijske preferencije liganda prema metalnom ionu. Dostupni literaturni podatci podržavaju ideju da peteročlani kelatni prsteni tvore stabilne komplekse kada se povezuju s većim metalnim kationima s ionskim radijusom oko 1,0 Å, dok šesteročlani kelatni prsteni stvaraju sterički najpovoljnije komplekse formiraju s manjima ionima poput Be(II) s ionskim radijusom oko 0,3 Å odnosno šesteročlani prstenovi imaju optimalnu geometriju za vezanje manjih metalnih iona [35–37].

2.1.3. Biološka istraživanja

2.1.3.1. Testovi citotoksičnosti

Za ispitivanje različitih spojeva i njihovih učinaka na ljude i životinje primjenjuju se testovi toksičnosti; za određivanje odnosa koncentracije ispitivane tvari i vremena izlaganja te mehanizama njihova djelovanja. Dije se na *in vitro* i *in vivo* testove. U biomedicinskim se istraživanjima više primjenjuju *in vitro* testovi koji podrazumijevaju različite sustave poput staničnih linija i frakcije, staničnih kultura te dijelove tkiva i kulture organa. Testovi citotoksičnosti su reproducibilni, standardizirani, relativno jeftini i brzi te se s pomoću njih mogu ispitati stanični, fiziološki i molekularni mehanizmi toksičnosti [38].

Prilikom provođenja *in vitro* testova toksičnosti, najčešće se određuje bazalna citotoksičnost koja se definira kao sposobnost staničnog preživljenja uslijed djelovanja kemijskih spojeva. Ovakva vrsta testova nudi mnoge prednosti te omogućava da se ispitivanjem spojeva na stanicama predvidi učinak na čovjeka. Služe kao svojevrsan probir supstanci za daljnja biološka ispitivanja te za generiranje toksikoloških profila.

¹ HSAB (engl. *Hard and Soft (Lewis) acids and bases*) – HSAB koncept se koristi u kemiji za objašnjenje stabilnosti spojeva, reakcijskih mehanizama i putova.

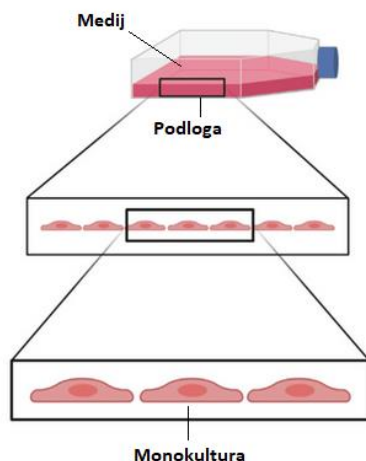
U kratkom vremenskom intervalu *in vitro* testovi omogućavaju analizu velikog broja tvari u širokom rasponu koncentracija što je svakako dobra preliminarna smjernica za planiranje daljnjih istraživanja. Najčešće primjenjivani testovi citotoksičnosti zasnivaju se na promjeni boja poput Kenacid Blue R, Neutral Red, MTT ((3-(4,5-dimetiltiazol-2)-2,5-difeniltetrazolijev bromid) i MTS ((3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-karboksimetoksifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazolij) koje omogućavaju kolorimetrijsko mjerenje stanične vijabilnosti i proliferacije [39, 40, 41].

2.1.3.2. Stanične linije kao koristan alat za biomedicinska istraživanja

Stanične kulture su kulture stanica koje se uzgajaju (kultiviraju) umjetno, izvan njihova prirodnog okruženja u kontroliranim *in vitro* uvjetima. Hranjivi medij sadrži različite aminokiseline, vitamine, soli i glukozu te serum koji predstavlja izvor polipeptidnih faktora rasta nužnih za diobu stanica. Stanice se čuvaju u posebno kontroliranim uvjetima: na temperaturi od 37 °C, pri 5 % ugljikovog(IV) oksida i 95 % atmosferskog zraka. Kako bi se spriječila kontaminacija osjetljivih staničnih kultura, moraju se održavati sterilni laboratorijski uvjeti rada [42].

2.1.3.3. Dvodimenzijaska stanična kultura

Dvodimenzijaska kultura stanica (2D kultura) je kultura stanica uzgajana na ravnoj i izduženoj površini gdje stanice mogu rasti i širiti se samo dvodimenzionalno u prostoru, a rastu u jednom sloju na podlozi (monosloju). Sve stanice u kulturi dobivaju jednaku količinu hranjivih tvari i čimbenika rasta iz medija i sve stanice su u istoj fazi staničnog ciklusa (sinkroni rast). S obzirom da rastu u monosloju, prilikom ispitivanja djelovanja spojeva, stanice su samo djelomično izložene djelovanju spoja te odgovor koji se dobije nije u cijelosti istovjetan prirodnom okruženju stanica u uvjetima *in vivo* (Slika 6) [42, 43].



Slika 6. Dvodimenzijski stanični model (2D model) u kojem stanice ostvaruju međukontakt sa susjednim stanicama, kontakt s podlogom (donji dio stanica) i kontakt s medijem (površina stanica). Preuzeto i prilagođeno iz: [43].

2.1.3.4. Građa bakterija i antibakterijska ispitivanja

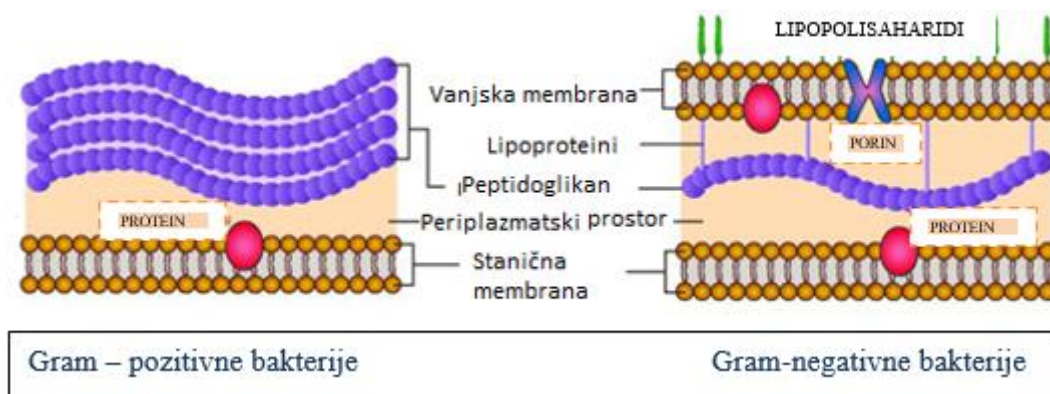
Bakterije pripadaju skupini jednostaničnih mikroorganizama, smatraju se najzastupljenijim i najrazličitijim živim organizmima. Metabolički su aktivne i vrlo lako se prilagođavaju novom okolišu putem spontane mutacije čime poboljšavaju svoju prilagodbu zbog čega su znanstvenicima zanimljive za proučavanje.

Dijele se s obzirom na:

- a) morfologiju (cilindrične, koki i bacili),
- b) metabolizam (autotrofne i heterotrofne)
- c) staničnu membranu (Gram-pozitivne i Gram-negativne) [44].

Temelj podjele s obzirom na sastav stanične membrane i reakcije na Gram test razvio je Hans Christian Gram, koji je identificirao bakterije na temelju reakcije njihovih staničnih membrana na određene boje i kemikalije [44, 45]. Razlike između Gram-pozitivnih i Gram-negativnih bakterija prvenstveno su povezane s njihovim sastavom stanične membrane (Slika 7) [45]. Gram-pozitivne bakterije imaju stanične membrane koje se uglavnom sastoje peptidoglikana (mureina). Ove bakterije se oboje u ljubičasto nakon Gram testa. Najpoznatiji predstavnici Gram-pozitivnih bakterija su: *Streptococcus*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus anthracis* i *Clostridium botulinum* [44]. Gram-negativne bakterije imaju stanične membrane sa samo tankim slojem peptidoglikana, a na vanjskoj membrani sadrže lipopolisaharidnu komponentu. Gram-negativne bakterije se oboje crveno ili ružičasto nakon Gram-testa. Najpoznatiji predstavnici Gram-negativnih bakterija su: *Escherichia coli*, *Salmonella*, *Hemophilus influenzae*, *Neisseria* i *Bordetella pertussis* [44].

Na Slici 7 nalazi se prikaz razlika u građi staničnih membrana Gram-pozitivnih i Gram-negativnih bakterija



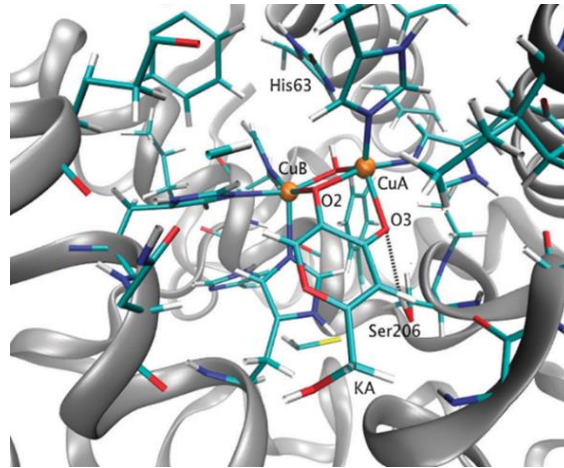
Slika 7. Razlike u građi staničnih membrana Gram-pozitivnih i Gram-negativnih bakterija.

Preuzeto i prilagođeno iz: [45].

2.1.4. Biološka ispitivanja slobodne kojinske kiseline

2.1.4.1. Primjena u kozmetičkoj industriji

Kojinska kiselina značajnu primjenu pronalazi u kozmetičkoj industriji gdje se najviše koristi kao sredstvo protiv hiperpigmentacije kože. Naime, kojinska kiselina kompetitivno inhibira tirozinazu, enzim koji kontrolira sintezu melanina koji je odgovoran za pigmentaciju kože. Kojinska kiselina stvara kelatne spojeve s bakrovim(II) ionima (Cu^{2+}) koji se nalaze u aktivnom mjestu tirozinaze. Na Slici 8 dan je prikaz vezanja kojinske kiseline na aktivno mjesto tirozinaze i to bidentatno na bakrove(II) ione pri čemu je His63 dekoordiniran te se stvara vodikova veza između Ser206 i kojinske kiseline. S obzirom na to da kojinska kiselina vrlo lako oksidira u kozmetičkoj industriji se sve češće upotrebljavaju derivati kojinske kiseline koji također inhibiraju tirozinazu. Derivati kojinske kiseline najčešće su pripremljeni modifikacijom hidroksilne skupine na atomu C-7 i to: esterifikacijom, stvaranjem hidroksifenil etera, glikozilacijom, ugradnjom u derivate aminokiselina ili tripeptida te se na taj način stabilnost i učinkovitost spojeva značajno povećavaju. Osim depigmentacijskog učinka, prema literaturno dostupnim podacima, kojinska kiselina djeluje i radioprotektivno tj. poboljšava toleranciju normalnog tkiva na zračenje [16,46–50].



Slika 8. Prikaz vezanja kojinske kiseline na aktivno mjesto bakterijske tirozinaze. Preuzeto i prilagođeno iz: [50].

2.1.4.2. Antibakterijska ispitivanja

Prema dosadašnjim istraživanjima, kojinska kiselina posjeduje potencijalna antibakterijska, antifungalna, antimikrobna i protuupalna djelovanja [14]. Yu Wu i suradnici [51] istraživali su antibakterijski učinak slobodne kojinske kiseline na pet bakterija. Istraživanje je provedeno na Gram-pozitivnim bakterijama (*Listeria monocytogenes*, *Bacillus subtilis* i *Staphylococcus aureus*) te Gram-negativnim bakterijama (*Escherichia coli* i *Salmonella typhimurium*). Na spomenutim bakterijskim vrstama, kojinska kiselina je pokazala značajno inhibicijsko djelovanje na stvaranje biofilma [51]. Biofilm je visokostrukturirana zajednica mikroorganizama, najčešće bakterija, koji su međusobno povezani i uklopljeni u izvanstanični matriks koji su sami stvorili. Glavna uloga biofilma je preživljavanje bakterija u teškim životnim uvjetima [52].

Kako bi se testirani spojevi/ligandi mogli evaluirati te kako bi se njihova biološka aktivnost mogla međusobno uspoređivati, koriste se tzv. inhibitorne koncentracije. Jedna od takvih koncentracija je i *MIC* (engl. *MIC Minimal Inhibitory Concentration* – minimalna inhibitorna koncentracija) koja predstavlja najmanju koncentraciju ispitivanoga spoja koja dovodi do inhibicije rasta mikroorganizama nakon inkubacije [53–55].

Općenita klasifikacija *MIC* vrijednosti nalazi se u Tablici 1.

Tablica 1. Klasifikacija antimikrobne aktivnosti prema *MIC* vrijednostima. Preuzeto i prilagođeno iz: [56].

<i>MIC (mM)</i>	<i>Klasifikacija antimikrobne aktivnosti</i>
0,0–0,5	izrazita antimikrobna aktivnost
0,6–1,5	srednja antimikrobna aktivnost
>1,5	slaba antimikrobna aktivnost

Vrijednosti *MIC*-a na Gram-pozitivnim bakterijama, *L. monocytogenes*, *B. subtilis*, i *S. aureus* za slobodnu kojinsku kiselinu iznosile su: 20, 20 i 10 mM, dok su na Gram-negativnim bakterijama, *E. coli* i *S. typhimurium* vrijednosti iznosile 10 i 5 mM, što ukazuje na to da su Gram-negativne bakterije bile mnogo osjetljivije na djelovanje kojinske kiseline od Gram-pozitivnih bakterija [51].

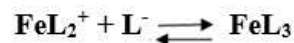
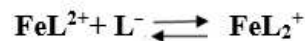
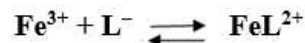
Niža vrijednost *MIC*-a ukazuje na to da je potrebna manja koncentracija ispitivane tvari za inhibiciju rasta organizma/bakterija, stoga su lijekovi s nižim *MIC* vrijednostima učinkovitiji antimikrobni agensi. Uz *MIC* u literaturi se često koriste i vrijednosti *MBC* (engl. *Minimal Bactericidal Concentration* – minimalna baktericidna koncentracija) [53-55]. U istraživanju Wu i suradnika [51] *MBC* vrijednosti slobodne kojinske kiseline na Gram-pozitivnim bakterijama bile su u rasponu od 40 do 80 mM, dok je na *E. coli* *MBC* vrijednost iznosila 20 mM. *MBC* pokazuje vrijednost najniže koncentracije antibakterijskog sredstva potrebnog za inhibiciju djelovanja i rasta ispitivanih bakterija. U spomenutom istraživanju pokazano je da kojinska kiselina degradira integritet stanične membrane bakterije, što je pokazano mjerenjem sadržaja unutarstaničnog enzima β -galaktozidaze u supernatantima. Oslobođanje K^+ iona iz citosola dovodi do promjena zeta potencijala stanica. Promjena zeta potencijala uzrokuje poremećaj subcelularne lokalizacije određenih proteina koji su povezani s diobom stanica što u konačnici za rezultat ima inaktivaciju bakterija. Smatra se da slobodna $-CH_2OH$ (hidroksimetilna) grupa na atomu C-2 kojinske kiseline ima značajnu ulogu u antibakterijskim učincima kojinske kiseline protiv Gram-negativnih bakterija [51].

2.1.4.2. Antifungalna ispitivanja

Kako bi se ispitalo antifungalno djelovanje kojinske kiseline Gui-Yang Zhu i suradnici [57] su ispitali djelovanje slobodne kojinske kiseline na gljivičnom patogenu *Sclerotinia sclerotiorum* koji napada soju te uzrokuje goleme ekonomske gubitke diljem svijeta. *S. sclerotiorum* je vrlo teško suzbiti zbog specifične strukture, sklerocija (specifični oblik gljivice), koja patogenu pruža dodatnu zaštitu. Slobodna kojinska kiselina je u *in vitro* istraživanjima pokazala vrlo učinkovito antifungalno djelovanje inhibicijom sinteze hitina, melanina i nastanak oksalne kiseline što je u konačnici inhibiralo i stvaranje sklerocija. Pri koncentraciji od 15 mM neznatno je smanjen rast micelija *Botryosphaeria dothidea*, *Valsa pyri* i *Colletotrichum brevisporum*, no ova koncentracija u potpunosti je inhibirala rast *S. sclerotiorum*. Uspoređujući antifungalno djelovanje slobodne kojinske kiseline s dostupnim, komercijalnim fungicidima, karbendazimom i proklorazom, utvrđeno je da komercijalni fungicidi pokazuju veće antifungalno djelovanje *in vitro* od slobodne kojinske kiseline [57]. Navedena tvrdnja potvrđena je i vrijednostima EC_{50} (engl. *Half Maximal Effective Concentration* – polovica efektivne koncentracije) [58,59] koje su za kojinsku kiselinu iznosile $6,3 \pm 0,7$ mM ($0,89 \pm 0,09$ mg/ml), dok su vrijednosti EC_{50} za karbendazim i prokloraz bile $2,8 \pm 0,3$ ($0,51 \pm 0,06$ mg/ml) i $0,7 \pm 0,2$ mM ($0,26 \pm 0,07$ mg/ml) (manja vrijednost znači jaču inhibiciju) [57].

2.1.4.3. Primjena kojinske kiseline u prehrambenoj industriji

Osim za navedene primjene, kojinska kiselina i u prehrambenoj industriji pronalazi raznoliku primjenu. Gljivice *Aspergillus favus* se tradicionalno koriste u proizvodnji sakea (rižino vino), miso (fermentirana sojina tjestenina) i soja sosa. Primjenjuje se za sprječavanje enzimatskog posmeđivanja hrane te za sprječavanje crnjenja voća, povrća i rakova tijekom skladištenja. Naime, kojinska kiselina ima sposobnost inhibiranja enzima polifenol-oksidade koji djeluje kada su proizvodi izloženi kisiku. Koristi se i u proizvodnji tjestenine kako bi se izbjegla promjena boje i pojava tamnih točkica čemu je razlog već navedeno inhibitorno djelovanje na enzim tirozinazu [16,60]. Upotreba kojinske kiseline je raznolika te se pored navedenih primjena upotrebljava još i u agrokulturi kao kelatni agens i aktivator ineskticida u proizvodnji pesticida. U kemijskoj industriji koristi se za dokazivanje Fe^{3+} iona s kojima tvori stabilni kompleks tamnocrvene boje. Na Slici 9 nalaze se shematski prikazi jednadžbe nastanka kompleksnih spojeva kojinske kiseline i željezovih iona [14,16].

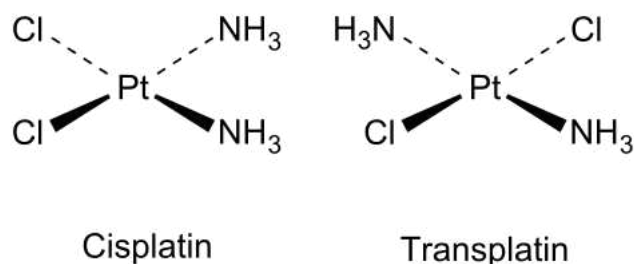


Slika 9. Shema: Nastanak kompleksa kojinske kiseline i željezovih(III) iona. Preuzeto i prilagođeno iz: [61].

2.2. Kompleksni spojevi s kojinskom kiselinom

Od otkrića cisplatina ($[\text{Pt}(\text{NH}_3)_2\text{Cl}_2]$) 1965. godine, veliki broj metalnih koordinacijskih spojeva koji sadrže ione platine(II), rutenija(II), zlata(I) ili bakra(II) i (I) su dizajnirani, sintetizirani i testirani kako bi se razvili klinički učinkoviti i sigurni lijekovi. Diamindikloroplatina(II) je kompleks s kvadratnom planarnom geometrijom s dva moguća konformacijska izomera *cis* i *trans*, odnosno cisplatin i transplatin (Slika 10) [62].

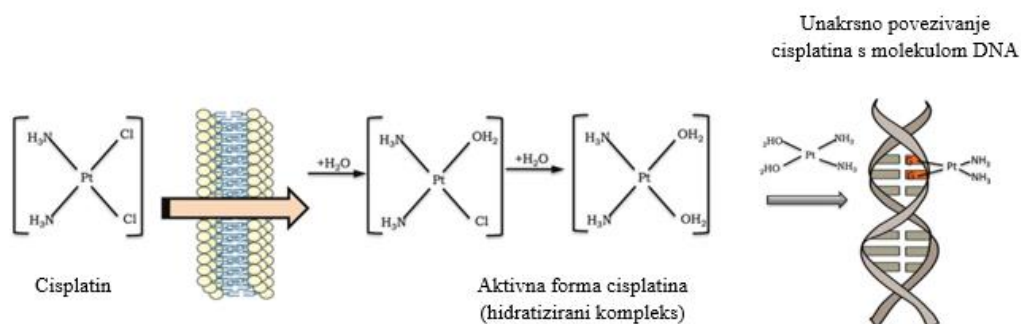
Za razliku od cisplatina, transplatin je potpuno neaktivan u tumorskim stanicama zbog kinetičke nestabilnosti koja ubrzava njegovu deaktivaciju i ograničava sposobnost ostvarivanja veza s molekulom DNA [63].



Slika 10. Strukturne formule: a) cisplatina i b) transplatina. Preuzeto i prilagođeno iz: [64].

Cisplatin je prva linija terapije za mnoge vrste raka te se koristi samostalno ili u kombinaciji s drugim spojevima za liječenje mnogih vrsta ove bolesti, npr. raka testisa, jajnika, mjehura ili leukemije. Zbog niske kemijske stabilnosti cisplatin se najčešće primjenjuje intravenski. U stanice ulazi na dva načina: pasivno; jednostavnom difuzijom ili aktivnim transportnim sustavima posredovanim proteinima, npr. ljudski prijenosnik organskih kationa (hOCT2) i bakar transportni protein (Ctr1). U citoplazmi se cisplatin hidrolizira i jedan od dva kloridna liganda je istisnut vodom te nastaje aktivna forma cisplatina: $[\text{PtCl}(\text{H}_2\text{O})(\text{NH}_3)_2]$ koji se povezuje s molekulom DNA, posebno u položaju N7 gvanina i adenina i položaju N3 citozina, tvoreći monofunkcionalni adukt $[\text{PtCl}(\text{DNA})(\text{NH}_3)_2]^+$ [62]. Mehanizam djelovanja cisplatina zasniva se na vezanju hidratiziranog kompleksa (aktivna forma cisplatina) s

jezgrinom DNA što u većini slučajeva uzrokuje distorziju molekule DNA i posljedično aktivaciju mehanizma programirane stanične smrti, odnosno apoptozu (Slika 11) [62, 66–71].



Slika 11. Shema: Nastanak aktivne forme kompleksa cisplatina. Preuzeto i prilagođeno iz: [64].

Liječenje cisplatinom povezano je s brojnim nuspojavama, među kojima su najčešće: nefrotoksično (bubrezi), hepatotoksično (jetra), kardiotoksično (srce), imunotoksično (otpornost organizma), ototoksično (sluh), neurotoksično (živčani sustav), uz toksično djelovanje i na reproduktivni sustav. Smanjena funkcija antioksidativnog obrambenog sustava zabilježena je zbog oksidativnog stresa uzrokovanog stvaranjem reaktivnih vrsta kisika (engl. *Reactive Oxygen Species*, ROS), uključujući antioksidativne enzime i neenzimske molekule i smanjeni glutation čemu je uzrok prevelika citotoksičnost i smanjena selektivnost cisplatina. S obzirom na brojne nuspojave cisplatina, unazad nekoliko desetljeća znanstvenici nastoje sintetizirati nove spojeve koji neće imati toksična djelovanja na zdrave stanice, odnosno koji će biti selektivni isključivo prema tumorskim staničnim linijama [62, 66–71].

2.2.1. Metode pripreve kompleksa kojinske kiseline

Sinteza u otopini je najčešće korištena metoda pripreve kompleksa, potencijalno zbog svoje jednostavnosti, mogućnosti praćenja samog procesa i kontrole nastanka konačnog produkta (npr. promjena reakcijskih uvjeta; poput odabira otapala i/ili temperature). Odabir otapala predstavlja najvažniji korak prilikom ovakvih sinteza, stoga je vrlo važno otapalo odabrati pažljivo i racionalno jer odabir otapala u konačnici ima utjecaj na konačni produkt (čistoća, veličina, oblik, kristalni sustavi). Najčešće korištena otapala su: etanol (C_2H_5OH), metanol (CH_3OH), izopropanol (C_3H_8O), metiletilketon (C_4H_8O), tetrahidrofuran ((C_4H_8O)) i aceton (CH_3COCH_3). Najpoznatije metode sinteze u otopini su: isparavanje otapala (evaporacija),

taloženje, „slurry“ sinteza, sinteza potpomognuta ultrazvukom, tehnologija superkritičnog fluida itd. [72]. Za razliku od sinteza u otopini koje se većinom odvijaju pri atmosferskom tlaku (101 325 Pa) hidrotermalne i solvotermalne sinteze uključuju heterogene reakcije u prisutnosti vode (hidrotermalna sinteza) ili nekog drugog otapala (solvotermalna sinteza) pri visokom tlaku i temperaturi (temperatura veća od vrelišta otapala) u zatvorenom sustavu (hermetički zatvorena posuda ili visokotlačni autoklav u subkritičnim ili superkritičnim uvjetima otapala). Pod tim uvjetima dolazi do raspada gotovo svih anorganskih tvari te dolazi do kristalizacije novih faza – stvaranja novih produkata. U ovakvim se reakcijama upravo voda koristi kao najčešće otapalo budući da je ekološki prihvatljiva, jeftina, dobro istražena, dostupna te su poznate promjene njenih fizikalno-kemijskih svojstava u ovisnosti o tlaku i temperaturi [73–78].

Uz navedene sintetske metode, posljednje se desetljeće pojavljuje interes za mehanokemijskim metodama sinteze, a potaknut je potragom za novim i čistijim metodama. Mehanokemijske metode temelje se na primjeni mehaničke sile prilikom čega se polazni reaktanti usitnjavaju i miješaju mljevenjem. Mljevenje se provodi ručno, u ahatnom tarioniku ili u mlinu (npr. planetarni kuglični mlin) [79,80]. Danas se mehanokemijske metode koriste za sintezu anorganskih spojeva, kokristala, poroznih organskih materijala, metalo-organskih spojeva i polimera [80].

Mehanokemijsku sintezu moguće je provesti na tri načina:

1. NG sinteza (engl. *Neat Grinding* – sinteza bez prisutnosti otapala) podrazumijeva sintezu u suhim uvjetima gdje su reaktanti u čvrstom stanju.
2. LAG sinteza (engl. *Liquid Assisted Grinding* – tekućinski potpomognuto mljevenje) je vrsta mehanokemijske sinteze koja podrazumijeva dodatak male količine otapala koje posjeduje katalitički efekt na mljevenje i samu reakciju.
3. ILAG sinteza (engl. *Ion and Liquid Assisted Grinding* – mljevenje potpomognuto ionima i tekućinom) mehanokemijska metoda koja uz dodatak minimalne količine otapala podrazumijeva i dodatak katalitičke količine soli [81].

U Tablici 2 nalaze se odabrani kompleksni spojevi dostupni u literaturi, metode njihove pripreme te prinos, odnosno iskorištenje kemijske reakcije, tamo gdje je taj podatak bio naveden.

Tablica 2. Odabrani kompleksni spojevi, metode priprave i prinos.

<i>Kompleksni spoj</i>	<i>Metoda/e priprave</i>	<i>Prinos</i>	<i>Objašnjenje oznaka</i>	<i>Izvor</i>
$[Zn(bpy)(ka)(H_2O)Cl]$	sinteza u otopini	---	ka= kojinska kiselina	[82]
$[Zn(PPh_3)(ka)_2(H_2O)]$	sinteza u otopini	---	ka= kojinska kiselina	[82]
$[Pd(ka)(H_2O)_2]Cl$	sinteza u otopini	---	ka= kojinska kiselina	[82]
$[Pd(bpy)(ka)]Cl$	sinteza u otopini	---	bpy= 2,2'-bipiridin ka= kojinska kiselina	[82]
$[Ag(PPh_3)(ka)] \cdot H_2O$	sinteza u otopini	---	PPh ₃ = trifenilfosfin ka= kojinska kiselina	[82]
$[Pd(PPh_3)(ka)Cl] \cdot 0,5H_2O$	sinteza u otopini	---	PPh ₃ = trifenilfosfin ka= kojinska kiselina	[82]
$[Pt(PPh_3)(ka)Cl]$	sinteza u otopini	---	ka= kojinska kiselina	[82]
$[Ru(PPh_3)_2(ka)_2]$	sinteza u otopini	---	ka= kojinska kiselina	[82]
$[Rh(ka)_2(PPh_3)Cl]$	sinteza u otopini	---	PPh ₃ = trifenilfosfin ka= kojinska kiselina	[82]
$[Ag(HKA)(NO_3)] \cdot H_2O$	kuglično mljevenje i potom kristalizacija iz vode/acetona	---	HKA=kojinska kiselina	[83]
$Cu(KA)_2$	kuglično mljevenje, „slurry“ sinteza u vodi, otopinska sinteza u vodi	---	KA= kojinska kiselina	[83]

	(sve metode su rezultirale polikristalnim produktima)			
Zn(KA) ₂	„slurry“ sinteza u etanolu/vodi, otopinska sinteza u vodi, kuglično mljevenje (sve metode su rezultirale jediničnim kristalom)	---	KA= kojinska kiselina	[83]
[Ga(KA) ₂ (OH ₂) ₂][NO ₃]·H ₂ O	"slurry" sinteza u vodi, otopinska sinteza u vodi, kuglično mljevenje (sve metode su rezultirale jediničnim kristalom)	---	KA= kojinska kiselina	[83]
[Mn.A.L·2H ₂ O]	sinteza u otopini	70 %	A = L-prolin L = deprotonirani oblik kojinske kiseline	[84]
[Co.A.L]	sinteza u otopini	64 %	A = L-prolin L = deprotonirani oblik kojinske kiseline	[84]
[Ni.A.L]	sinteza u otopini	58 %	A = L-prolin L = deprotonirani oblik kojinske kiseline	[84]
[Zn.A.L]	sinteza u otopini	63 %	A = L-prolin L = deprotonirani oblik kojinske kiseline	[84]

$\text{Fe}(\text{KA})_3$	sinteza u otopini	65 %	KA= deprotonirani oblik kojinske kiseline	[85]
$[\text{VOL}^1(\text{KA})]$	sinteza u otopini	53 %	$\text{L}^1 = \text{N}'\text{-(3-etoksi-2-hidroksibenziliden)-4-metoksibenzohidrazid}$ KA= kojinska kiselina	[86]
BBOV	sinteza u otopini	50 %	BBOV=(bis(5-hidroksi-4-okso-4-piran-2-ilmetilbenzoato oksovanadij(V))	[87]
$\text{Cu}[\text{KA-F-NH}_2]$	sinteza u otopini	60 – 70 %	F=fenilalanin	[88]
$\text{Cu}[\text{KA-W-NH}_2]$	sinteza u otopini	60 – 70 %	W=triptofan	[88]
$\text{Cu}[\text{KA-Y-NH}_2]$	sinteza u otopini	60 – 70 %	Y=tirozin	[88]
$\text{Cu}[\text{KA-H-NH}_2]$	sinteza u otopini	60 – 70 %	H=histidin	[88]

Iz podataka navedenih u tablici može se zaključiti da je najviše produkata dobiveno sintezom uz otopini, najčešće korišten metalni ion je bakrov(II) ion, a prinosi se kreću između 50 – 70 %. Također, dobiveno je više monokristalnih umjesto polikristalnih uzoraka, što je omogućilo jednoznačno određivanje molekulskih i kristalnih struktura koje će biti opisane u idućem poglavlju.

2.2.2. Strukturna karakterizacija kompleksa s kojinskom kiselinom

Annan i suradnici [82] su sintetizirali i strukturno karakterizirali komplekse prijelaznih metala (Rh^{3+} , Pd^{2+} , Ag^+ i Pt^{2+}) s kojinskom kiselinom u prisutnosti 2,2'-bipiridina i trifenilfosfina te su ispitali protutumorsko djelovanje novosintetiziranih spojeva [82].

Sintetizirani su sljedeći kompleksni spojevi:

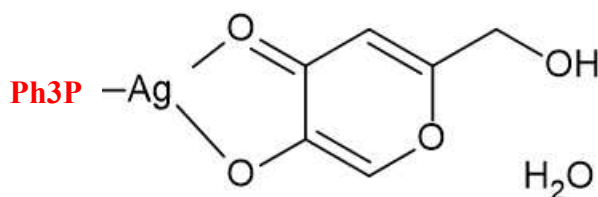
- $[\text{Zn}(\text{bpy})(\text{ka})(\text{H}_2\text{O})\text{Cl}]$,
- $[\text{Zn}(\text{PPh}_3)(\text{ka})_2(\text{H}_2\text{O})]$,
- $[\text{Pd}(\text{ka})(\text{H}_2\text{O})_2]\text{Cl}$,
- $[\text{Pd}(\text{bpy})(\text{ka})]\text{Cl}$,
- $[\text{Ag}(\text{PPh}_3)(\text{ka})] \cdot \text{H}_2\text{O}$,
- $[\text{Ru}(\text{PPh}_3)_2(\text{ka})_2]$,

g) $[\text{Rh}(\text{ka})_2(\text{PPh}_3)\text{Cl}]$ [81],

gdje je: PPh_3 = trifenilfosfin; bpy = 2,2'-bipiridin; ka = kojinska kiselina. Molekulske strukture pretpostavljene su na temelju rezultata sljedećih analitičkih metoda: infracrvena spektroskopija (engl. *Infrared Spectroscopy*, IR), nuklearna magnetska rezonancija (^1H , ^{13}C , ^{31}P) (engl. *Nuclear Magnetic Resonance*, NMR), ultraljubičasta-vidljiva spektrofotometrija (engl. *Ultraviolet-visible Spectrophotometry*, UV-Vis), elektronska ionizacija (engl. *Electron Ionization*, EI), termogravimetrijska analiza (engl. *Thermogravimetric Analysis*, TGA) [81]. Od ukupno 7 sintetiziranih spojeva, Annan i suradnici [82] su jednom spoju ($[\text{Ag}(\text{PPh}_3)(\text{ka})] \cdot \text{H}_2\text{O}$) uspjeli odrediti točnu kristalnu i molekulsku strukturu pomoću rendgenske difrakcije na jediničnom kristalu [82].

Prema rezultatima, spoj $[\text{Ag}(\text{PPh}_3)(\text{ka})] \cdot \text{H}_2\text{O}$ je neutralni kompleks čija se jedinična ćelija sastoji od jednog Ag^+ iona, molekule kojinske kiseline (ka) i molekule trifenilfosfina (PPh_3) te molekule H_2O , koja je kristalizacijska, odnosno nije izravno vezana na srebrov(I) ion. Koordinacijski broj (KB) iznosi 3. Empirijska formula kompleksa određena analitičkim tehnikama (elementna analiza) je $\text{C}_{24}\text{H}_{22}\text{AgO}_5\text{P}$, a relativna molekulska masa spoja iznosi 528,87 [81]. Spoj kristalizira u monoklinskom sustavu u $P21/n$ prostornoj skupini. Na Slici 12 prikazana je strukturna formula spoja [89].

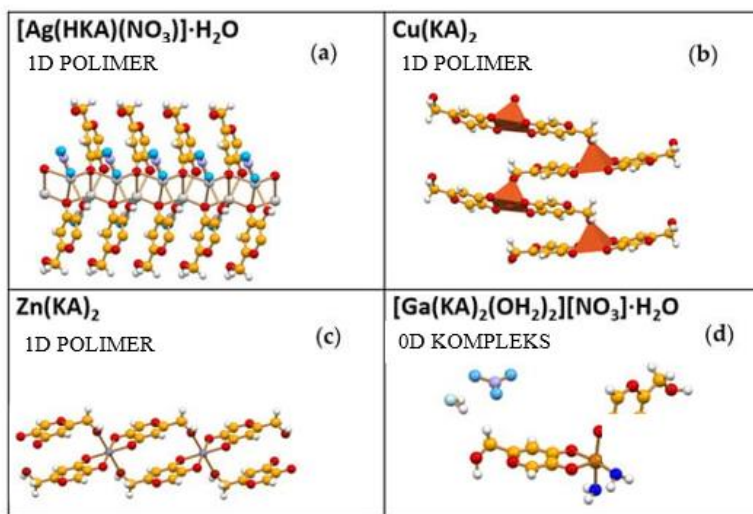
Kristalografski podatci o kristalnoj i molekulskoj strukturi spoja pohranjeni su u Cambridge kristalografskom podatkovnom centru (engl. *Cambridge Crystallographic Data Centre*, CCDC) pod identifikacijskim kodom: ZISREB [89].



Slika 12. Strukturna formula spoja $[\text{Ag}(\text{PPh}_3)(\text{ka})]$. Preuzeto i prilagođeno iz: [89].

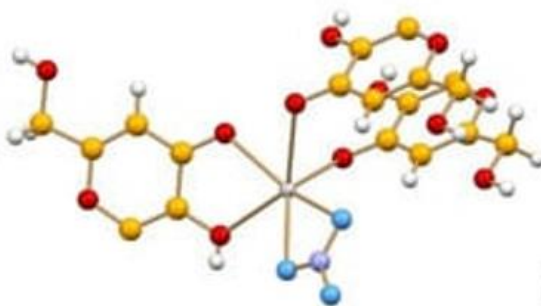
Sun i suradnici [83] su sintetizirali, strukturno karakterizirali i ispitali antibakterijsko djelovanje kompleksnih spojeva kojinske kiseline s Ag^+ , Cu^{2+} , Zn^{2+} i Ga^{3+} . Nastala su tri 1D koordinacijska polimera i jedan 0D kompleks [83]. Svi kompleksi strukturno su karakterizirani pomoću rendgenske difrakcije na jediničnom i/ili polikristalnom uzorku. Sintetizirani su sljedeći spojevi:

$[\text{Ag}(\text{HKA})(\text{NO}_3)] \cdot \text{H}_2\text{O}$, $\text{Cu}(\text{KA})_2$, $\text{Zn}(\text{KA})_2$ i $[\text{Ga}(\text{KA})_2(\text{OH}_2)_2][\text{NO}_3] \cdot \text{H}_2\text{O}$, gdje je HKA= kojinska kiselina; KA= deprotonirani oblik kojinske kiseline. Na Slici 13 prikazane su kristalne strukture sintetiziranih kompleksnih spojeva [83].



Slika 13. Kristalne strukture produkata reakcija kojinske kiseline s (a) Ag^+ , (b) Cu^{2+} , (c) Zn^{2+} i (d) Ga^{3+} solima. Preuzeto i prilagođeno iz: [83].

Sun i suradnici [83] su ustanovili da je $[\text{Ag}(\text{HKA})(\text{NO}_3)] \cdot \text{H}_2\text{O}$ neutralni spoj koji se može opisati kao hidratizirani kokristal nastao iz AgNO_3 i kojinske kiseline. Ovaj spoj jedini od ostalih sintetiziranih spojeva u ovom istraživanju posjeduje protonirani oblik kojinske kiseline. Empirijska formula kompleksa glasi $\text{C}_6\text{H}_8\text{AgNO}_7 \cdot \text{H}_2\text{O}$, a relativna molekulska masa iznosi 330 [83]. Spoj kristalizira u ortorompskom kristalnom sustavu te posjeduje $Pn2_1/a$ prostornu skupinu. Molekulska struktura kompleksnog spoja prikazana je na slici 14 [83].

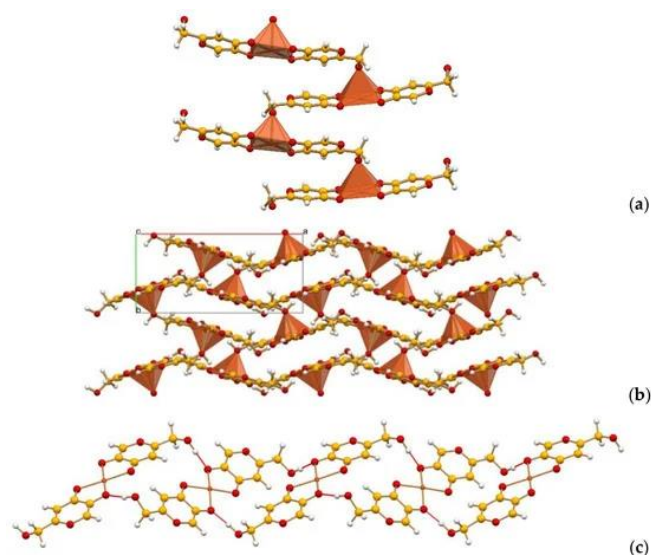


Slika 14. Molekulska struktura spoja $[\text{Ag}(\text{HKA})(\text{NO}_3)] \cdot \text{H}_2\text{O}$. Srebrov(I) ion je označen sivom bojom, kisikovi atomi vezani na dušikov atomi plavom, a kisikovi atomi crvenom bojom. Žutom bojom su označeni ugljikovi atomi, a bijelom vodikovi. Preuzeto i prilagođeno iz: [83].

U koordinacijskoj kemiji, srebrov(I) ion se uvelike koristi zbog svoje karakteristike mekog akceptora kao i zbog relativno fleksibilne koordinacijske sfere. Takva koordinacijska sfera omogućuje srebrovu(I) ionu koordinaciju različitim ligandima u različitim geometrijama kao i heteroatomima što rezultira širokim nizom mogućih koordinacijskih spojeva srebra(I). Iako se često smatra da Ag(I) preferira linearnu koordinaciju, pretragom strukturnih baza podataka kao i dostupnih radova, nađeno je da je od 3319 kristalnih struktura kompleksa srebra(I), u 24,0 % spojeva KB (koordinacijski broj) za srebrov(I) ion iznosi 2, dok 23,0 % spojeva pokazuje KB 3, a čak u 44,0 % spojeva srebro ima koordinacijski broj 4, dok preostalih 9,0 % pokazuju koordinacijske brojeve veće od četiri, u kojima koordinacijsku sferu obično popunjavaju molekule otapala ili anioni. Iz svega navedenog, vidljivo je da spojevi u kojima se nalazi srebrov(I) ion uglavnom pokazuje linearnu, trigonsku i tetraedarsku koordinaciju. Srebro ima veliki afinitet za tvrde donorske atome kao što su dušik ili kisik te atome mekih donora kao što je sumpor, što ga čini povoljnim gradivnim blokom za stvaranje koordinacijskih polimera. Grozdicki i suradnici su u svom preglednom radu izvijestili da srebrovi(I) karboksilati tvore premosne dimere kao u $[\text{Ag}_2(\text{OOC}\text{C}_6\text{H}_5)_2]$ koji se potom agregiraju i tvore polimerne mreže (npr. $[\text{Ag}(\text{OOC}\text{CF}_3)]_n$, $[\text{Ag}(\text{OOC}(\text{CH}_3)_3)]_n$, $[\text{AgOOC}(\text{CH}_3)\text{CC}(\text{H})\text{CH}_3]_n$). Njihova slaba topljivost i osjetljivost na svjetlost čine ih zahtjevnima za strukturna ispitivanja [90–92].

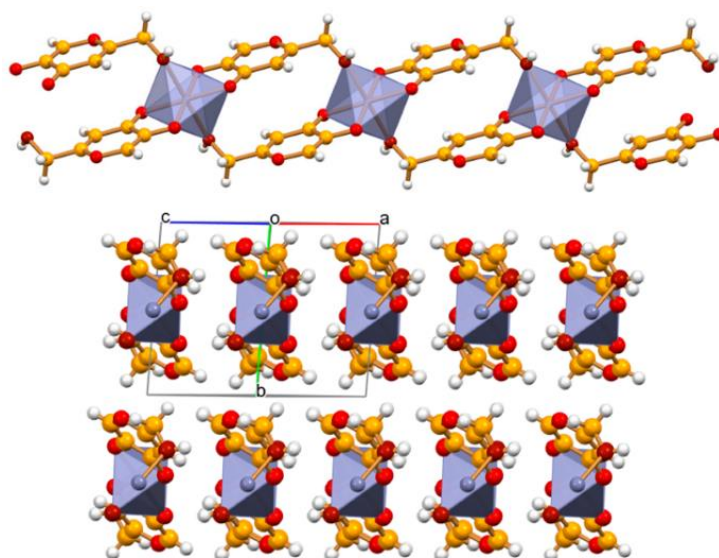
Sun i suradnici [83] ustanovili su da je u spoju $\text{Cu}(\text{KA})_2$, bakrov(II) ion koordiniran s pet atoma kisika: od kojih četiri pripadaju dvama kojatnim anionima (djeluju kao bidentatni ligandi te čine kvadratnu bazu piramidalnog poliedra) i jedan dolazi od O_{CHOH} skupine trećeg kojatnog aniona, što naposljetku uzrokuje *cik-cak* koordinaciju 1D polimera koji se proteže paralelno s kristalografskom *b*-osi. Empirijska formula kompleksnog spoja glasi $\text{C}_{12}\text{H}_{10}\text{CuO}_8$ čija relativna molekulska masa iznosi 345 [83].

Struktura spoja $\text{Cu}(\text{KA})_2$ određena je na temelju rendgenske difrakcije i TGA. Pri temperaturi od 345 K provedena je rendgenska difrakcija na polikristalnom uzorku. Kompleksni spoj kristalizira u monoklinskom kristalnom sustavu te posjeduje $Pn2_1/a$ prostornu skupinu (Slika 15) [83].



Slika 15. Poliedri kvadratne piramide atoma kisika oko kationa Cu^{+2} u $\text{Cu}(\text{KA})_2$ (a); 1D cik-cak lanci (b); vodikova veza $\text{O}\cdots(\text{H})\text{OCHOH}$ (c). Ioni bakra prikazani su tamno narančastom bojom. Preuzeto i prilagođeno iz: [83].

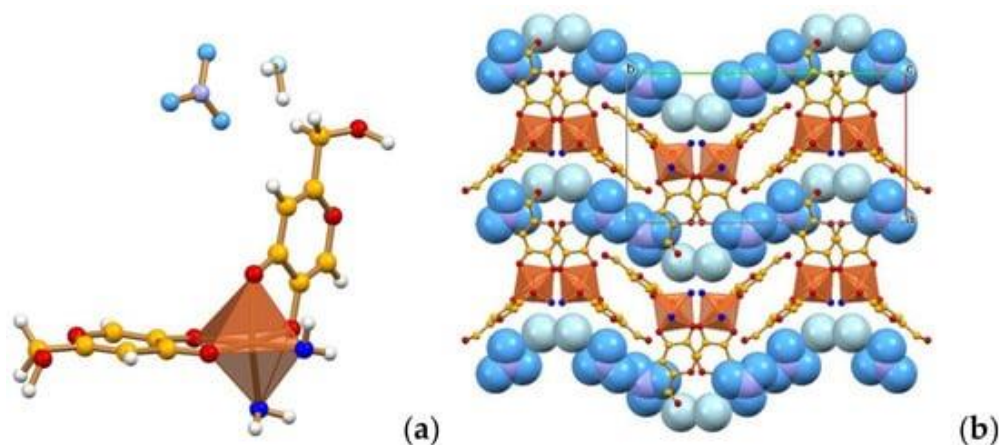
Struktura trećeg od ukupno četiri istražena spoja Sun-a i suradnika: $\text{Zn}(\text{KA})_2$ određena je rendgenskom difrakcijom na jediničnom kristalu pri temperaturi od 298 K. Kompleksni spoj kristalizira u triklinskom kristalnom sustavu te posjeduje $P-1$ prostornu skupinu (Slika 16) [83].



Slika 16. 1D koordinacijski polimer (a) koji se proteže duž smjera (010) u kristalnom $\text{Zn}(\text{KA})_2$ (b). Zn^{+2} kationi su označeni plavom bojom. Preuzeto i prilagođeno iz: [83].

U kompleksnom spoju $[\text{Ga}(\text{KA})_2(\text{OH}_2)_2][\text{NO}_3]\cdot\text{H}_2\text{O}$ kation Ga^{3+} koordiniraju dva kojatna aniona te dvije molekule vode koje popunjavaju sfernu oktaedarsku koordinaciju, za razliku

od nitratnog iona koji ne pripada koordinacijskoj sferi. Empirijska formula kompleksnog spoja je $C_{12}H_{15}GaNO_{14}$, a relativna molekulska masa iznosi 466.97 [83]. Struktura $[Ga(KA)_2(OH)_2][NO_3]\cdot H_2O$ je određena na temelju rendgenske difrakcije na monokristalnom uzorku pri temperaturi od 298 K. Spoj kristalizira u monoklinskom kristalnom sustavu te posjeduje $Pn2_1/c$ prostornu skupinu (Slika 17) [83].



Slika 17. (a) Oktaedarska koordinacija oko kationa Ga^{3+} i (b) interkalacija nitratnih aniona/molekula vode između valovitih slojeva kationa koji se protežu duž smjera b-osi. (vodikovi atomi nisu prikazani). Atomi kisika, koji dolaze od vode označeni su tamnije plavom (koordinacijska sfera) i svijetloplavom bojom; nitratni kisik je označen tirkiznom (cijan) bojom, a atomi dušika su ljubičaste boje. Preuzeto i prilagođeno iz: [83].

Sharma i suradnici [84] su sintetizirali i strukturno karakterizirali nekoliko kompleksnih spojeva prijelaznih metala s L-prolinom i kojinskom kiselinom. Opća jednadžba nastanka kompleksnih spojeva[84]:



gdje su: $M^{2+} = Mn^{2+}, Co^{2+}, Ni^{2+}$ ili Zn^{2+} , A = L-prolin i L = kojinska kiselina

Svi kompleksni spojevi su amorfni i postojani na zraku te su djelomično topljivi u metanolu, a netopljivi u vodi i organskim otapalima poput benzena (C_6H_6), kloroforma ($CHCl_3$) i ugljikovog tetraklorida (CCl_4) te zbog toga nije moguća karakterizacija konvencionalnim metodama poput osmometrije ili viskozno mjerenja [84]. Struktura kompleksnih spojeva pretpostavljena je pomoću IR, TGA, UV-VIS spektroskopije i magnetskih svojstava. Kompleks s Mn^{2+} posjeduje oktaedarsku geometriju, dok kompleksni spojevi s ostalim

metalima (Co^{2+} , Ni^{2+} ili Zn^{2+}) posjeduju tetraedarsku geometriju [84]. U literaturi često nailazi se na dodatak raznih aminokiselina kompleksnim spojevima koji pokazuju značajna protutumorska svojstva.

2.2.3. Biološka važnost i primjena (prijelaznih) metala

Biogeni elementi uključuju sljedećih deset esencijalnih metala: Na, K, Mg i Ca (elementi s bloka); Mn, Fe, Co, Cu i Zn (3d elementi) te jedan 4d element: Mo. Pored navedenih metala i drugi metali također pokazuju biogena svojstva, međutim njihova uloga nije u potpunosti razriješena. Prijelazni metali imaju neispunjene ili djelomično ispunjene d-orbitale, stoga su njihova oksidacijska stanja u spojevima promjenjiva, što zapravo objašnjava njihovu sklonost sudjelovanju u velikom broju oksidacijsko-redukcijskih procesa, čime utječu na magnetska i elektronska svojstva svojih kompleksa. Zn je iznimka zato što pripada skupini postprijelaznih metala iako se nalazi u d bloku. Tvoreći razne komplekse s brojnim bioligandima živog organizma, prijelazni metali se ponašaju kao "organizatori života". Prijelazni metali su od izuzetnog značaja u pripravi spojeva s biološkom aktivnošću jer u većini slučajeva upravo metali, a ne ligandi dovode do biološke aktivnosti [93]. U Tablici 3 navedeni su esencijalni metali, koordinacijski broj, donori atoma i bioligandi te biološka funkcija [93].

Tablica 3. Biogeni metalni ioni, koordinacijski broj, donori atoma i bioligandi te biološka uloga. Preuzeto i prilagođeno iz: [93].

<i>Ime i simbol metalnog iona</i>	<i>KB, geometrija</i>	<i>Preferirani donori atoma, bioligandi</i>	<i>Biološka uloga</i>
Natrij, Na^+	6, oktaedar	O-eter, hidroksil, karboksilat	Nositelj naboja, osmotska ravnotež, živčani impulsi i kontrakcija mišića
Kalij, K^+	6-8, fleksibilna	O-eter, hidroksil, karboksilat	Nositelj naboja, osmotska ravnotež, živčani impulsi i kontrakcija mišića
Magnezij, Mg^{2+}	6, oktaedar	O-karboksilat, fosfat	Strukturna funkcija u hidrolazama, izomerazama, prijenos fosfata

Kalcij, Ca^{2+}	6-8, fleksibilna	<i>O</i> -karboksilat, karbonil, fosfat	Struktura, nositelj naboja, prijenos
Mangan, Mn^{2+} (d^5)	6, oktaedar	<i>O</i> -karboksilar, fosfat, <i>N</i> - imidazol	Strukturna funkcija u oksidazama, fotosinteza
Mangan, Mn^{3+} (d^4)	6, tetragonska	<i>O</i> -karboksilat, fosfat, Hidroksid	Strukturna funkcija u oksidazama, fotosinteza
Kobalt, Co^{2+} (d^7)	4, tetraedar	<i>S</i> -tiolat, tioeter, <i>N</i> -imidazol	Enzimaska kazaliza: prijenos alkilne skupine, oksidaze
Kobalt, Co^{3+} (d^6)	6, oktaedar	<i>O</i> -karboksilat, <i>N</i> -imidazol	Enzimaska kazaliza: prijenos alkilne skupine u vitamin B_{12} (cijanokobaltamin).
Kobalt, Co^{2+} (d^7)	6, oktaedar	<i>O</i> -karboksilat, <i>N</i> -imidazol	Enzimaska kataliza: prijenos alkilne skupine u vitamin B_{12r}
Kobalt, Co^+ (d^8)	6, oktaedar	<i>O</i> -karboksilat, <i>N</i> -imidazol	Enzimaska kataliza: prijenos alkilne skupine u vitamin B_{12s}
Bakar, Cu^+ (d^{10})	4, tetraedar	<i>S</i> -tiolat, tioeter, <i>N</i> -imidazol	Prijenos elektrona Tip II bakrene oksidaze, hidroksilaze
Bakar, Cu^{2+} (d^9)	5, kvadratna piramida 6, tetragonska	<i>O</i> -karboksilat <i>N</i> -Imidazol	Tip III bakrene hidroksilaze, O_2 transport uhemocijanin
Bakar, Cu^{2+} (d^9)	4, kvadratna planarna	<i>O</i> -karboksilat, <i>N</i> -imidazol	Enzimaska kataliza: Tip II bakar u oksidazama
Cink, Zn^{2+} (d^{10})	4, tetraedar	<i>O</i> -karboksilat, karbonil, <i>S</i> -tiolat, <i>N</i> -imidazol	Strukturna funkcija u „cinkovim prstima“ (engl. <i>zinc finger</i>)
Cink, Zn^{2+} (d^{10})	5, kvadratna piramida	<i>O</i> -karboksilat, karbonil, <i>N</i> -imidazol	regulacija gena, anhidraze, i dehidrogenaze.

			Strukturna funkcija u hidrolazama, peptidazama
Molibden, Mo ⁴⁺ (d ²)	6, oktaedar	O-oksid, karboksilat, fenolat, S-sulfid, tiolat	Enzimski kataliza, i prijenos kisika u oksidazama

2.3. Biološka aktivnost kompleksnih spojeva s kojinskom kiselinom

2.3.1. Protutumorska aktivnost

Annan i suradnici [82] sintetizirali su 5 kompleksa s kojinskom kiselinom u svrhu ispitivanja *in vitro* protutumorske aktivnosti. Sintetizirani kompleksi: ([Pd(ka)(H₂O)₂]Cl, [Zn(PPh₃)(ka)₂(H₂O)], [Pd(PPh₃)(ka)Cl], [Pt(PPh₃)(ka)Cl] i [Ag(PPh₃)(ka)]) testirani su na staničnim linijama raka jajnika (VC-8-BRCA i VC-8) [81]. Učinkovitost ispitivanih spojeva evaluirana je vrijednostima IC₅₀ (engl. *Inhibitory Concentration 50* – kvantitativna mjera koja pokazuje koliko je ispitivane tvari potrebno za postizanje 50 % inhibicije staničnog rasta) Niske vrijednosti IC₅₀ ukazuju na značajnu učinkovitost spoja pri niskim koncentracijama [94]. U Tablici 4 nalazi se klasifikacija prema citotoksičnosti s obzirom na IC₅₀ vrijednost [94,95].

Tablica 4. Općenita klasifikacija citotoksičnosti tvari s obzirom na IC₅₀ vrijednosti [95].

IC ₅₀ / μM	Citotoksičnost
<20 μM	Izrazito citotoksično
21-200 μM	Umjereno citotoksično
201-500 μM	Blago citotoksično
>500 μM	Bez citotoksičnog efekta

Kao standard za usporedbu djelovanja spojeva je korišten cisplatin čije su IC₅₀ vrijednosti iznosile 12 μM (VC-8-BRCA) odnosno 10,07 μM (VC-8). Pored kompleksnih spojeva ispitana je i protutumorska aktivnost slobodne kojinske kiseline, kako bi se potvrdilo djelovanje (uloga) kompleksa, odnosno metala u spoju. Vrijednosti IC₅₀ Ag-kompleksa i kojinske kiseline iznosile su 66,01 odnosno 71,00 μM. Ostali kompleksni spojevi pokazali

su manje IC_{50} vrijednosti od slobodne kojinske kiseline te je iz toga razvidno da protumorska aktivnost potječe od metala, a ne od liganda [82].

Najznačajniju antiproliferativnu aktivnost pokazao je spoj $[Ag(ka)(PPh_3)]$ čije IC_{50} vrijednosti iznose 8,80 odnosno 8,87 μM (vrijednosti manje od onih za cisplatin). U Tablici 5 nalaze se IC_{50} vrijednosti slobodne kojinske kiseline, cisplatina i ispitivanih kompleksnih spojeva na linijama: VC-8-BRCA i VC-8 [82].

U istraživanju nije naveden učinak spoja $[Ag(ka)(PPh_3)]$ na zdravu staničnu liniju čime bi se dobio uvid u to je li spoj i selektivan. Iz rezultata istraživanja može se zaključiti samo da ima veću citotoksičnost od cisplatina.

Tablica 5. Protutumorska aktivnost (izražena u vrijednostima IC_{50} / μM) slobodne kojinske kiseline, kompleksnih spojeva i cisplatina (standard) na staničnim linijama raka jajnika (VC-8-BRCA i VC-8). Preuzeto i prilagođeno iz: [82].

<i>Spoj</i>	<i>VC-8-BRCA</i>	<i>VC-8</i>
Kojinska kiselina	66,01±0,02	71,00±0,5
$[Pd(ka)(H_2O)_2]Cl$	46,06±0,03	52,09±0,05
$[Zn(PPh_3)(ka)_2(H_2O)]$	20,00±0,01	21,29±0,01
$[Pd(PPh_3)(ka)Cl]$	14,76±0,04	18,06±0,04
$[Pt(PPh_3)(ka)Cl]$	10,30±0 0	12,24±0,05
$[Ag(PPh_3)(ka)]$	8,79±0,01	8,87±0,02
Cisplatin (standard)	9,12±0,01	10,07±0,02

2.3.2. Antibakterijska aktivnost

Spojevima ($[Ag(HKA)(NO_3)] \cdot H_2O$, $Cu(KA)_2$, $[Ga(KA)_2(OH_2)_2][NO_3] \cdot H_2O$ i $Zn(KA)_2$) čija su strukturna obilježja pojašnjena u poglavlju 2.2.2 (Sun i suradnici [83]) ispitana je antimikrobna aktivnost. Osim spojevima, aktivnost je ispitana i čistim solima korištenim prilikom sinteze ($AgNO_3$, $Cu(NO_3)_2$, $Zn(NO_3)_2$ i $Ga(NO_3)_3$) te slobodnoj kojinskoj kiselini na sljedećim bakterijama: *E. coli*, *P. aeruginosa* i *S. aureus*. Svi testirani uzorci pokazali su antibakterijsku aktivnost. Najbolju antibakterijsku aktivnost pokazali su čisti $AgNO_3$ i $[Ag(HKA) \cdot NO_3] \cdot H_2O$. *MIC* vrijednosti (izražene u mM) čistih soli, slobodne kojinske kiseline i kompleksnih spojeva [83] nalaze se u Tablici 6.

Tablica 6. Minimalne inhibitorne koncentracije (*MIC*) soli, slobodne kojinske kiseline i kompleksa s metalima Ag, Cu, Zn i Ga. Preuzeto i prilagođeno iz: [83].

<i>Kemijska formula tvari</i>	<i>E. coli</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>S. aureus</i>
AgNO ₃	0,10	0,05	0,10
Cu(NO ₃) ₂	3,13	1,56	3,13
Zn(NO ₃) ₂	3,13	3,13	6,25
Ga(NO ₃) ₃	3,13	3,13	3,13
HKA	3,13	3,13	> 6,25
[Ag(HKA)·NO ₃]·H ₂ O	0,10	0,10	0,98
Cu(KA) ₂	>6,25	>6,25	>6,25
Zn(KA) ₂	>6,25	>6,25	>6,25
[Ga(KA) ₂ (OH ₂) ₂][NO ₃]·H ₂ O	>6,25	>6,25	>6,25

Iz Tablice 6 je razvidno da najmanje značajne rezultate antibakterijske aktivnosti (izražene *MBC*-om) pokazuju spojevi: Cu(KA)₂, [Ga(KA)₂(OH₂)₂][NO₃]·H₂O i Zn(KA)₂, a najznačajnije rezultate pokazali su AgNO₃ i [Ag(HKA)·NO₃]·H₂O. Zanimljive rezultate pokazala je i slobodna kojinska kiselina, *MBC* vrijednosti na bakterijama *E. coli* i *P. aeruginosa* bili su značajni, ali na bakteriji *S. aureus* nije pokazala značajnu inhibiciju bakterija (Tablica 7). Mogući uzrok značajnosti i razlici rezultata je razlika u prodiranju spojeva kroz staničnu membranu Gram-pozitivne bakterije [83]. Jedan od poznatih mehanizama djelovanja srebrovih(I) spojeva zasniva se na degradaciji stanične stijenke čime spojevi dopijevaju do stanične membrane. U staničnoj se membrani vežu za proteine, mijenjaju propusnost membrane što omogućava ulazak spojeva i drugih tvari u unutrašnjost same stanice. Kada spojevi dopiju unutar stanice srebrovi(I) ioni se mogu vezati na molekule DNA/RNA što posljedično dovodi do onemogućava replikacije nukleinskih kiselina, a potom i stanične smrti [96-98]. Sumarne *MIC* i *MBC* vrijednosti za najpotentnije spojeve nalaze se u Tablici 8.

Tablica 7. Minimalne baktericidne koncentracije (*MBC* izražene u mM) za čiste soli, kojinsku kiselinu i komplekse. Preuzeto i prilagođeno iz: [83].

<i>Kemijska formula tvari</i>	<i>E. coli</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>S. aureus</i>
AgNO ₃	0,10	0,05	0,10
Cu(NO ₃) ₂	3,13	1,56	3,13
Zn(NO ₃) ₂	3,13	3,13	6,25
Ga(NO ₃) ₃	3,13	3,13	3,13
HKA	3,13	3,13	>6,25
[Ag(HKA)·NO ₃]·H ₂ O	0,10	0,10	0,98
Cu(KA) ₂	>6,25	>6,25	>6,25
Zn(KA) ₂	>6,25	>6,25	>6,25
[Ga(KA) ₂ (OH ₂) ₂][NO ₃]·H ₂ O	>6,25	>6,25	>6,25

Tablica 8. Sumarne *MIC* i *MBC* vrijednosti kompleksnih spojeva Ag, Cu, Zn, Ga s kojinskom kiselinom. Preuzeto i prilagođeno iz: [83].

<i>Kompleksni spoj</i>	<i>Bakterije</i>	<i>MIC</i> (mg/mL)	<i>MBC</i> (mg/mL)	<i>Izvor</i>
[Ag(HKA)·NO ₃]·H ₂ O	<i>E. coli</i>	<0,05	0,10	[58]
	<i>P. aeruginosa</i>	<0,05	0,10	[58]
	<i>S. aureus</i>	<0,05	0,98	[58]
Cu(KA) ₂	<i>E. coli</i>	6,25	>6,25	[58]
	<i>P. aeruginosa</i>	6,25	>6,25	[58]
	<i>S. aureus</i>	1,56	>6,25	[58]
Zn(KA) ₂	<i>E. coli</i>	3,00	>6,25	[58]
	<i>P. aeruginosa</i>	1,50	>6,25	[58]
	<i>S. aureus</i>	3,00	>6,25	[58]
Ga(KA) ₂ (OH ₂) ₂ [NO ₃]·H ₂ O	<i>E. coli</i>	3,00	>6,25	[58]
	<i>P. aeruginosa</i>	3,10	>6,25	[58]
	<i>S. aureus</i>	3,00	>6,25	[58]

2.3.3. *In vivo* ispitivanja

Testiranja koja se provode na životinjama i ljudima nazivaju se *in vivo* testiranja. *In vivo* testovi citotoksičnosti provode se na za to posebno uzgajanim životinjama. Postoji više vrsta testova toksičnosti, a razlikuju se u svom cilju, te u trajanju i načinu provođenja.

Yong-Biao Wei i Xiao-Da Yang [87] proveli su *in vivo* istraživanje na ICR (izvorna skupina švicarskih miševa) [99] miševima oba spola (težina 20 ± 2 g) i na albino Sprague–Dawley štakorima (težina 220–240 g) kako bi ispitali antidijabetičko djelovanje sintetiziranih kompleksnih spojeva vanadija čije je inzulinomimetsko djelovanje (imitiraju hormon inzulin) do danas već dokazano. Sve životinje su bile u kontroliranim uvjetima (12:12 h ciklus svjetlo/tama) te su imali stalan pristup hrani i vodi [87]. ICR (CD-1®) miševi, izvorno potječu od švicarskih albino miševa, naširoko se koriste u biomedicinskim istraživanjima zbog svoje visoke reproduktivne sposobnosti, brzog rasta i snažne prilagodljivosti okolišu. Ovi miševi služe kao izvrsni modeli u širokom rasponu istraživačkih polja, uključujući starenje, toksikologiju, farmakologiju, onkologiju, imunologiju i istraživanje cjepiva. Njihova prilagodljivost i genetska varijabilnost usko odražavaju genetsku raznolikost u ljudskoj populaciji, što ih čini vrlo vrijednima u polju medicinskih istraživanja [100,101]. Wei i Yang proveli su sljedeće testove *in vivo* [87]:

1. **Test akutne toksičnosti (preliminarni test)** proveli su za spoj BBOV bis(5-hidroksi-4-okso-4-piran-2-ilmetilbenzoatooksovanadij(V) (BBOV) na ICR miševima. Rezultati se nalaze u Tablici 9. Koristili su 6 grupa po deset ICR miševa, a iz rezultata je vidljivo da je najmanji postotak smrtnosti u grupi miševa koji su dobili i najmanju dozu [87].

Tablica 9. Rezultati testa akutne toksičnosti BBOV-a. Preuzeto i prilagođeno iz: [87].

<i>Grupa</i>	<i>Broj miševa</i>	<i>Doza (mg/kg)</i>	<i>Log(doza)</i>	<i>Smrtnost</i>	<i>Postotak smrtnosti (%)</i>
1	10	3, 000	3,477	9	90, 00
2	10	2, 400	3, 380	7	70, 00
3	10	1, 920	3, 283	5	50, 00
4	10	1, 540	3, 188	4	40, 00
5	10	1, 230	3, 090	2	20, 00
6	10	0,980	2, 991	1	10, 00

2. Razina glukoze u krvi natašte kod kontrolnih i štakora s dijabetesom:

Značajna promjena ($p > 0,05$) razine glukoze u krvi kontrolnih štakora liječenih samo BBOVom nije se dogodila. No, razine glukoze u krvi štakora s dijabetesom bile su značajne ($p < 0,05$) te su značajno ($p < 0,01$) vraćene na gotovo normalnu razinu oralnom primjenom BBOV-a, i bis(maltolato)oksovanadija(IV) (BMOV) [87].

3. Test tolerancije glukoze

U usporedbi s normalnim, kontrolnim štakorima, štakori s dijabetesom, koji su liječeni BBOV-om i BMOV-om još uvijek su pokazivali značajne promjene razine glukoze u krvi, no granične vrijednosti su bile mnogo niže od vrijednosti štakora s dijabetesom ($p < 0,01$) te su se na kraju vratile gotovo normalnim razinama glukoze u krvi. Iz ovoga se može zaključiti da je tretman BBOV-om ublažio utjecaj na razinu glukoze u krvi. Tretman ligandom nije imao nikakav utjecaj ni kod normalnih kontrolnih štakora niti kod dijabetičkih štakora pa se može zaključiti kako je glavni utjecaj imao sami metal, vanadij [87].

4. Srednja smrtonosna doza (engl. *Median Lethal Dose, LD₅₀*)

Prema podacima o akutnoj toksičnosti, LD_{50} za BBOV je 1,794 mg/kg, a LD_{50} ostale kompleksne spojeve iznosi: BMOV; 902 mg/kg, BSOV (bis(5-hidroksi-4-okso-4-piran-2-il-2-hidroksi-benzoatooksovanadij(IV))); 3,200 mg/kg. Prema Loomis i Hayesovoj klasifikacija kemijska tvar s LD_{50} u rasponu od 5,000–15,000 (netoksična), 500–5,000 (blago toksična), 50–500 (umjereno toksična) i 1–50 (vrlo toksična) mg/kg. BBOV pripada skupini blago toksičnih tvari [87].

Testovi antidijabetičke aktivnosti BBOV-a pokazali su da oralna primjena BBOV poprilično smanjuje hiperglikemiju, smanjenjem aktivnost tolerancije glukoze i smanjenjem unosa hrane i vode bez snižavanja tjelesna težina u 4 tjedna tijekom liječenja kod štakora dijabetičara. LD_{50} govori da BBOV pripada skupini blago toksičnih spojeva. Rezultati dobiveni na pokusnim životinjama ukazuju na učinkovito djelovanje BBOV-a kao hipoglikemijskog agensa [87].

2.3.4. Pregled ostalih bioloških ispitivanja kompleksnih spojeva

Kako bi se ispitalo posjeduju li kompleksni spojevi depigmentacijusku aktivnost, Kwak i suradnici [88] su četiri odabrana kompleksna spoja s kojinskom kiselinom (aminokiselinama i amino skupinom) (KA-F-NH₂, KA-W-NH₂, KA-Y-NH₂ i KA-FWY-NH₂) u koncentraciji od 100mM testirali na Mel-Ab staničnu liniju koja proizvodi veliku količinu melanina. Na tretiranim staničnim linijama Mel-Ab niti jedan spoj nije pokazao citotoksičnost pri koncentraciji od 100 mM. Cu-[KA-W-NH₂] i Cu-[KA-Y-NH₂] pokazali su najveću aktivnost inhibicije melanogeneze (biosinteza melanina u melanocitima kože). Spoj Cu-[KA-FWY-NH₂] nije pokazao inhibitornu aktivnost u Mel-Ab stanicama zbog velike molekulske težine koja sprječava difundiranje u stanicu [88,102]. Pregled odabranih kompleksa s kojinskom kiselinom koji pokazuju različite biološke aktivnosti nalazi se u Tablici 10.

Tablica 10. Popis odabranih kompleksnih spojeva s kojinskom kiselinom koji posjeduju različitu biološku aktivnost.

<i>Spoj</i>	<i>Biološka aktivnost</i>	<i>Referenca</i>
BBOV	Antidijabetski učinak	[87]
	Antioksidativni učinak	[87]
Cu-[KA-W-NH ₂]	Depigmentacijski učinak	[88]
Cu-[KA-Y-NH ₂]	Depigmentacijski učinak	[88]

3. ZAKLJUČAK

Kojinska kiselina je organska kiselina koja je najpoznatija kao sredstvo protiv hiperpigmentacije kože. Prirodni je produkt mikrobiološke fermentacije na čvrstoj fazi. Nakon otkrića cisplatina koji je prvi kompleksni spoj korišten za liječenje različitih vrsta raka, nastala je potreba za pripravom i proučavanjem metalnih spojeva koji će biti biološki aktivni, ali neće imati nuspojave kao cisplatin te će biti selektivni isključivo prema tumorskim stanicama. Pregledom dostupne literature, kompleksi s kojinskom kiselinom i derivatima kojinske kiseline pokazali su izrazito velik potencijal za daljnja proučavanja bioloških učinaka. Poseban je naglasak stavljen na protutumorsku, antibakterijsku i antifungalnu aktivnost. Također je uočeno da slobodna kojinska kiselina ne pokazuje značajnu protutumorsku aktivnost u odnosu na to kada je vezana na metalni kation. U slobodnoj formi, kojinska kiselina pokazuje značajnu antibakterijsku aktivnost. Spoznaje koje su nastale kao pregled rezultata novijih istraživanja svakako imaju potencijal doprinijeti dizajnu novih spojeva koji u strukturama sadrže biološki aktivne metale poput bakra, vanadija, zlata, srebra, cinka s naglaskom na povećanju selektivnosti, odnosno minimiziranju rizika za okolno zdravo tkivo.

4. POPIS KRATICA I SIMBOLA

2D kultura – dvodimenzijska kultura

BBOV – (bis(5-hidroksi-4-okso-4-piran-2-ilmetilbenzoatooksovanadij(V))

BMOV – (bis(maltolato)oksovanadij(IV))

bpy –2,2'-bipiridin

CCDC – engl. *Cambridge Crystallographic Data Centre* – Cambridge kristalografski podatkovni centar

CMK – centralni metalni kation

EC₅₀ – engl. *Half Maximal Effective Concentration* – polovica efektivne koncentracije

EI – engl. *Electron Ionization* – Elektronska ionizacija

F – triptofan

HKA – protonirana kojinska kiselina

IC₅₀ – engl. *Half Maximal Inhibitory Concentration* – polovica maksimalne inhibirajuće koncentracije)

ILAG sinteza – engl. *Ion and Liquid Assisted Grinding* – mljevenje potpomognuto ionima i tekućinom

KA – deprotonirani oblik kojinske kiseline

KB – koordinacijski broj

LAG sinteza – engl. *Liquid Assisted Grinding* – tekućinski potpomognuto mljevenje

LD₅₀ – engl. *median lethal dose* – srednja smrtonosna doza

MAL – $M^{2+} = Mn^{2+}, Co^{2+}, Ni^{2+}$ ili Zn^{2+} , A = L-prolin i L = kojinska kiselina

MBC – engl. *Minimal Bactericidal Concentration* – minimalna baktericidna koncentracija

MIC – engl. *Minimal Inhibitory Concentration* – minimalna inhibitorna koncentracija

MTS –(3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-karboksimetoksifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazolij)

MTT – (3-(4,5-dimetiltiazol-2)-2,5-difeniltetrazolijev bromid)

NG sinteza – engl. *Neat Grinding* – sinteza bez prisutnosti otapala

NMR – engl. *NMR Nuclear Magnetic Resonance* – Nuklearna magnetska rezonancija

PPh₃ – trifenilfosfin

ROS – engl. *Reactive Oxygen Species* – reaktivne kisikove vrste

TGA – engl. *Thermogravimetric Analysis* – termogravimetrijska analiza

UV-vis spektroskopija – engl. *Ultraviolet Visible Spectroscopy*

W – triptofan

Y– tirozin

5. LITERATURNI IZVORI

1. L. Toso, G. Crisponi, V. M. Nurchi, M. Crespo-Alonso i suradnici, A family of hydroxypyrrone ligands designed and synthesized as iron chelators. *J. Inorg. Biochem.* **2013**, *127*, 220–231.
2. J. Z. Arshad, M. Hanif, Hydroxypyrrone derivatives in drug discovery: from chelation therapy to rational design of metalloenzyme inhibitors. *RSC Med Chem.* **2022**, *13*, 1127–1149.
3. <https://www.mayoclinic.org/drugs-supplements/cisplatin-intravenous-route/side-effects/drg-20062953?p=1> (28. 6. 2024.)
4. <https://www.cancer.gov/about-cancer/treatment/drugs/cisplatin> (28. 6. 2024.)
5. I. Goldberg, J.S. Rokem in Encyclopedia of Microbiology (Third Edition), Eds.: M. Schaechter, Academic Press, Oxford, **2009**, 421–442.
6. https://www.chemicalbook.com/ChemicalProductProperty_EN_CB7272507.htm (29. 4. 2024.)
7. A. Beélik in Advances in Carbohydrate Chemistry, Vol. 11 (Eds.: Melville L., Wolfrom R. Stuart Tipson), Academic Press, Montreal, **1956**, 145–183.
8. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Kojic-acid> (29. 4. 2024.)
9. E. Ephrem, H. Elaissari, H. Greige-Gerges, Improvement of skin whitening agents efficiency through encapsulation: Current state of knowledge, *Int. J. Pharm.* (Amsterdam, Neth.). **2017**, *526*, 50–68.
10. N. Ishak, A. F. B. Lajis, R. Mohamad, A. B. Ariff, M. S. Mohamed, M. Halim, H. Wasoh, Kinetics and Optimization of Lipophilic Kojic Acid Derivative Synthesis in Polar Aprotic Solvent Using Lipozyme RMIM and Its Rheological Study, *Mol.* **2018**, *23*, 501.
11. G. Büyükköroğlu, B. Şenel, G. Sevim, Vol. 2 (Eds.: Debmalya Barh), Academic Press, **2022**, 273–287.
12. L. Talakoub, I. M. Neuhaus, S. S. Yu in Cosmetic Dermatology (Eds.: M. Alam, H. B. Gladstone, R. C. Tung), W.B. Saunders, Edinburgh, **2009**, 7–34.
13. L. Wu, L. Zhang, X. Li, R. Lv, W. Cao, W. Gao, J. Liu, Z. Xie, H. Liu, Effective production of kojic acid in engineered *Aspergillus niger*. *Microb. Cell Fact*, **2023**, *22*, 40.
14. M. Zirak, B. Eftekhari-Sis, Kojic acid in organic synthesis. *Turk. J. Chem.* **2015**, *39*, 439–496.

15. V. Phasha, J. Senabe, P. Ndzotoyi, B. Okole i suradnici, Review on the Use of Kojic Acid—A Skin-Lightening Ingredient. *Cosmetics*. **2022**, 9.
16. F. Bashir, Kishwar Sultana, M. Khalid, H. Rabia i suradnici, Kojic Acid: A Comprehensive Review. *Asian Journal of Allied Health Sciences AJAHS*. **2021**.
17. V. M. Nurchi, J. I. Lachowicz, G. Crisponi, S. Murgia i suradnici, Kojic acid derivatives as powerful chelators for iron(iii) and aluminium(iii). *Dalton Trans.*, **2011**, 40, 5984–5998.
18. M. Mohammadpour, M. Behjati, A. Sadeghi, A. Fassihi, Wound healing by topical application of antioxidant iron chelators: kojic acid and deferiprone. *Int Wound J*. **2013**, 10, 260–264.
19. W. Kandjoller, A. Kurzwehnhart, M. Hanif, S. M. Meier, H. Henke, B. K. Keppler, C. G. Hartinger, Pyrone derivatives and metals: From natural products to metal-based drugs. *J. Organomet. Chem*, **2011**, 696, 999–1010.
20. K. Meglič, Priprava adamantilnih i manoznih derivata novih N-aril supstituiranih 3-hidroksipiridin-4-ona dobivenih iz kojične kiseline, Diplomski rad, 2016.
21. M. He, M. Fan, Z. Peng, G. Wang, An overview of hydroxypyranone and hydroxypyridinone as privileged scaffolds for novel drug discovery. *Eur. J. Med. Chem*. **2021**, 221, 113–546.
22. E.J. Gralla, R.B. Stebbins, G.L. Coleman, C.S. Delahunt, Toxicity studies with ethyl maltol. *Toxicol. Appl. Pharmacol*. **1969**, 15, 604–613.
23. M. Cindrić, Z. Popović, B. Purgovečki, V. Vrdoljak. Priprava i karakterizacija anorganskih spojeva: *Priprava anorganskih spojeva*. Prvo izdanje. Zagreb: Alfa, **2022**. 20–21.
24. D. Grdenić. Molekule i kristali: *Kompleksni spojevi*. Treće izdanje. Zagreb: Školska knjiga, **1987**. 257–258.
25. R.D. Gillard in Encyclopedia of Physical Science and Technology (Third Edition), (Eds.: R. A. Meyers), Academic Press, New York, **2001**, 739-760.
26. [https://chem.libretexts.org/Bookshelves/Inorganic_Chemistry/Supplemental_Modules_and_Websites_\(Inorganic_Chemistry\)/Coordination_Chemistry/Structure_and_Nomenclature_of_Coordination_Compounds/Introduction_to_Coordination_Chemistry](https://chem.libretexts.org/Bookshelves/Inorganic_Chemistry/Supplemental_Modules_and_Websites_(Inorganic_Chemistry)/Coordination_Chemistry/Structure_and_Nomenclature_of_Coordination_Compounds/Introduction_to_Coordination_Chemistry) (28. 6. 2024.)
27. MQ Dai, LY L. Yung, Ethylenediamine-Assisted Ligand Exchange and Phase Transfer of Oleophilic Quantum Dots: Stripping of Original Ligands and Preservation of Photoluminescence, *Chem. Mater*. **2013**, 25, 2193–2201.

28. <https://www.molport.com/shop/compound/Molport-000-871-954> (7. 6. 2024.)
29. L. Ozdanovac, Priprava 1,2,3-triazolnih derivata piran-4-ona iz meta i para-nitrofenilazida i njihov biološki učinak, Diplomski rad, 2018.
30. A. E. Martell, R. D. Hancock, *Chelating Ligands// Metal Complexes in Aqueous Solutions/* A. E. Martell, R. D. Hancock. Boston: Springer, **1996**. 63–95.
31. R. E. Scarrow, P. E. Riley, K. Abu Dari, D. L. White, K. N. Raymond, *J. Inorg. Chem.*, **2003**, *42*, 2665–2674.
32. T. Hedlund, L. O. Öhmann, *Equilibrium and Structural Studies of Silicon(IV) and Aluminium(III) in Aqueous Solution*. 19. Composition and Stability of Aluminium Complexes with Kojic Acid and Maltol. *Acta Chem. Scand. Ser.* **1988**, *42*, 702–704.
33. <https://scienceinfo.com/hsab-principle-application-limitation/> (28. 6. 2024.)
34. T. O. Hancock, S. Hess, A.A.J. Marley, C. F. Choudhury, An accumulation of preference: Two alternative dynamic models for understanding transport choices. *Transportation Research Part B: Methodological*. **2021**, *149*, 250–282.
35. [https://chem.libretexts.org/Courses/Saint_Marys_College_Notre_Dame_IN/CHEM_342%3A_Bio-inorganic_Chemistry/Readings/Week_3%3A_Metal-Ligand_Interactions_continued.../3.1_Ligands_with_more_than_one_donor_atom_\(Chelating_Ligands\)_have_enhanced_metal_ion_affinity/3.1.2%3A_The_Chelate_Effect_\(and_Macrocycle_Effect\)](https://chem.libretexts.org/Courses/Saint_Marys_College_Notre_Dame_IN/CHEM_342%3A_Bio-inorganic_Chemistry/Readings/Week_3%3A_Metal-Ligand_Interactions_continued.../3.1_Ligands_with_more_than_one_donor_atom_(Chelating_Ligands)_have_enhanced_metal_ion_affinity/3.1.2%3A_The_Chelate_Effect_(and_Macrocycle_Effect)) (28. 6. 2024.)
36. A. Sengupta, A. Seitz, K. M. Merz Jr., Simulating the Chelate Effect. *J. Am. Chem. Soc.* **2018**, *140*, 15166–15169.
37. chromeextension://efaidnbmnnnibpcajpegglefindmkaj/https://www.dalalinstitute.com/wp-content/uploads/sites/2/Books/A-Textbook-of-Inorganic-Chemistry-Volume-1/ATOICV1-2-4-Chelate-Effect-and-Its-Thermodynamic-Origin.pdf (28.6.2024.)
38. S. Markossian, A. Grossman, M. Arkin, D. Auld i suradnici in Assay Guidance Manual [Internet], (Eds.: Eli Lilly & Company and the National Center for Advancing Translational Sciences), 2004.
39. M. Ghasemi, T. Turnbull, S. Sebastian, I. Kempson, The MTT Assay: Utility, Limitations, Pitfalls, and Interpretation in Bulk and Single-Cell Analysis. *Int J Mol Sci.* **2021**, *22*, 12827.
40. B. Gopu, P. Kour, R. Pandian, K. Singh, Insights into the drug screening approaches in leishmaniasis. *Int Immunopharmacol.* **2023**, *114*, 109591.

41. Y. Rai, R. Pathak, N. Kumari, D. K. Sah i suradnici, Mitochondrial biogenesis and metabolic hyperactivation limits the application of MTT assay in the estimation of radiation induced growth inhibition. *Sci Rep.* **2018**, *8*, 1531.
42. S. Mustć, D. Kifer, AM Domijan, AM Marjanović Čermak, Ispitivanje toksičnosti na staničnim kulturama. *Farm. Glas.* **2022**, *78*, 1–14.
43. N. Filipović, Priprava, strukturna karakterizacija i biološka aktivnost neutralnih kompleksa prijelaznih metala na 3D staničnim modelima *in vitro*, Doktorska disertacija, 2024.
44. C. Jiménez-Jiménez, V. M. Moreno, M. Vallet-Regí, Bacteria-Assisted Transport of Nanomaterials to Improve Drug Delivery in Cancer Therapy, *Nanomaterials.* **2022**, *12*, 288.
45. [https://byjus.com/biology/difference-between-gram-positive-and-gram-negative-](https://byjus.com/biology/difference-between-gram-positive-and-gram-negative/) (9. 5. 2024.)
46. YM Chen, C. Li, WJ Zhang, Y. Shi, ZJ Wen, QX Chen, Q. Wang, Kinetic and computational molecular docking simulation study of novel kojic acid derivatives as anti-tyrosinase and antioxidant agents., *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.* **2019**, *34*, 990–998.
47. Y. S. Lee, J. H. Park, M. H. Kim, S. H. Seo i suradnici, Synthesis of tyrosinase inhibitory kojic acid derivative. *Arch. Pharm.* **2006**, *339*, 111–114.
48. A. Ayuhastuti, I. S. K. Syah , S. Megantara, A. Y. Chaerunisaa, Nanotechnology-Enhanced Cosmetic Application of Kojic Acid Dipalmitate, a Kojic Acid Derivate with Improved Properties. *Cosmetic.* **2024**, *11*, 21.
49. S. Emami, S.J. Hosseinimehr, S.M.Taghdisi, S. Akhlaghpour, Kojic acid and its manganese and zinc complexes as potential radioprotective agents. *Bioorg. MedChem. Lett.*, **2007**, *17*, 45–48.
50. C. Bochot, A. Gouron, L. Bubacco, A. Milet, C. Philouze, M. Re'glie i suradnici, Probing kojic acid binding to tyrosinase enzyme: insights from a model complex and QM/MM calculations. *Chem. Commun.* **2013**, *50*, 308 – 310.
51. Y. Wu, Y. Shi, LY Zeng, Y. Pan i suradnici, Evaluation of antibacterial and anti-biofilm properties of kojic acid against five food-related bacteria and related subcellular mechanisms of bacterial inactivation. *Food Sci. Technol. Int.* **2019**, *25*, 3–15.
52. J. Kuzel, Biofilm kao faktor virulencije bakterije *Acinetobacter baumannii*, Završni rad, 2017.

53. JM Andrews, Determination of minimum inhibitory concentrations. *J Antimicrob Chemother.* **2001**, 48.
54. <https://www.nelsonlabs.com/testing/mic-mbc/> (28. 6. 2024.)
55. <https://www.qlaboratories.com/minimum-inhibitory-mic-and-minimum-bactericidal-concentration-mbc-evaluations-as-rd-tools/> (28. 6. 2024.)
56. A. Ahmed, A Study On Antibacterial Activities Of Essential Oils From Most Commonly Used Spices In Zanzibar Against Milk Spoilage Bacteria, Doktorska disertacija, 2015.
57. GY Zhu, XC Shi, SY Wang, B. Wang, P. Laborda, Antifungal Mechanism and Efficacy of Kojic Acid for the Control of *Sclerotinia sclerotiorum* in Soybean. *Front. Plant Sci.* **2022**, 13.
58. <https://nanotempertech.com/nanopedia/ec50/> (28. 6. 2024.)
59. <https://www.graphpad.com/support/faq/50-of-what-how-exactly-are-ic50-and-ec50-defined/> (28. 6. 2024.)
60. S.M. Son, K.D. Moon, C.Y. Lee, Inhibitory effects of various antibrowning agents on apple slices. *Food Chemistry.* **2001**, 73, 23–30.
61. J. Šima, R. Sipos, Applied Photochemistry Of Iron(III) Compounds, 22nd International Conference on Coordination and Bioinorganic Chemistry, **2009**, 9.
62. F. Trudu, F Amato, P. Vaňhara, T. Pivetta, E.M. Peña-Méndez J. Havel, Coordination compounds in cancer: Past, present and perspectives. *J. Appl. Biomed.* **2015**, 13, 79–103.
63. Z. Deng, Houzong Yao, Z. Wang, Guangyu Zhu, Comprehensive Inorganic Chemistry III, (Eds.: J. Reedijk, K. R. Poepelmeier), Elsevier, Oxford, **2023**, 808–846.
64. C. Rocha, M. Silva, A. Quinet, J. Cabral-Neto, C. Menck, C. (2018). DNA repair pathways and cisplatin resistance: an intimate relationship. *Clinics*, **2018**, 1–10.
65. <https://chemicalstatistician.wordpress.com/2014/06/18/organic-and-inorganic-chemistry-lesson-of-the-day-cistrans-isomers/> (10. 6. 2024.)
66. S. Ghosh, Cisplatin: The first metal based anticancer drug. *Bioorg. Chem.* **2019**, 88, 102925.
67. T.G. Towne, A. Murray, Encyclopedia of Toxicology (Third Edition), (Eds.: Philip Wexler), Elsevier, Oxford, **2023**, 808–846.
68. <https://chemocare.com/druginfo/cisplatin> (28.6.2024.)
69. S. Dasari, P. B. Tchounwou, Cisplatin in cancer therapy: Molecular mechanisms of action. *Eur. J. Pharmacol.* **2014**, 740, 64–78.

70. <https://go.drugbank.com/drugs/DB00515> (28. 6. 2024.)
71. S.A. Aldossary, Review on Pharmacology of Cisplatin: Clinical Use, Toxicity and Mechanism of Resistance of Cisplatin. *Biomed Pharmacol J.* **2019**, *12*, 1–15.
72. M. Rodriguesa, B. Baptistab, J. A. Lopesb i M. C. Sarraguça, *Int. J. Pharm.* **2018**, *547*, 404–420.
73. C. M. O. González, E. M. C. Morales, A. M. N. Tellez, T. E. S. Quezada i suradnici, Handbook of Greener Synthesis of Nanomaterials and Compounds, (Eds.:B. Kharisov, O. Kharissova), Elsevier, **2021**, 407–448.
74. D. Cinčić, DK Bučar, E. Meštrović, Hidrotermalna i solvotermalna sinteza koordinacijskih polimera // XVIII. hrvatski skup kemičara i kemijskih inženjera - sažeci / Stanka Zrnčić (ur.). Zagreb: Publisher, 2003. str. 25
75. K. Mužina, Hidrotermalna sinteza i karakterizacija bakrom dopiranoga cerijeva(IV) oksida, Doktorska disertacija, 2022.
76. A. Judin, Solvotermalne sinteze kompleksa kobalta s 1H-Benzimidazol-2-Metanolom, Završni rad, 2017.
77. A. Puškarić, Solvotermalna i mehanokemijska sinteza dipeptidnih i imidazolatnih metaloorganskih mreža, Doktorska disertacija, 2020.
78. A. Vicić, Hidrotermalna sinteza složenih metalnih oksida, Završni rad, 2020.
79. V. Medvarić, Kemijska sinteza u čvrstom stanju metodama ubrzanog starenja, Završni rad, 2018.
80. D. Ozer, Mechanochemistry: A Power Tool for Green Synthesis, *Advances in Green Synthesis.* **2021**, *3*, 1–6.
81. D. Šinjori, Mehanokemijska sinteza kompleksa prijelaznih metala u zeolitima, Završni rad, 2022.
82. N. A . Annan, I. S. Butler, H. M. Titi, Y. El-Lazeik, B. J. Jean-Claude, S. I. Mostafa, DNA interaction and anticancer evaluation of new zinc(II), ruthenium(II), rhodium(III), palladium(II), silver(I) and platinum(II) complexes based on kojic acid; X-ray crystal structure of [Ag(ka)(PPh₃)]·H₂O. *Inorg. Chim. Acta.* **2019**, *487*, 433–447.
83. R. Sun ,L. Casali, R. J. Turner , Da. Braga i F. Grepioni, Exploring the Co-Crystallization of Kojic Acid with Silver(I), Copper(II), Zinc(II), and Gallium(III) for Potential Antibacterial Application. *Mol.* **2023**, *28*, 1244–1248.

84. S. Sharma, J. Ramani, J. Bhalodia i Jasmin Bhalodia, N. Patel i suradnici, Synthesis, characterization and antimicrobial activity of some transition metal complexes (Mn, Co, Zn, Ni) with L-proline and Kojic acid. *Adv. Appl. Sci. Res.* **2011**, *2*, 374–382.
85. V. M. Nurchi, G. Crisponi, J. Z. Lachowicz, S. Murgia i suradnici, Iron (III) and aluminum (III) complexes with hydroxypyronone ligands aimed to design kojic acid derivatives with new perspectives. *J. Inorg. Biochem.* **2010**, *104*, 560–569.
86. L. Wua, W. Lia, Y. J. Mei, Syntheses, Crystal Structures, and Antibacterial Activity of Mononuclear Vanadium(V) Complexes with Aroylhydrazones and Pyrone as Mixed Ligands. *Russ. J. Coord. Chem.* **2019**, *45*, 154–162.
87. YB Wei i XD Yang, Synthesis, characterization and anti-diabetic therapeutic potential of a new benzyl acid-derivatized kojic acid vanadyl complex. *BioMetals.* **2012**, *25*, 1261–1268.
88. SY Kwak, HR Choi, KC Parkb i YS Lee, Kojic acid-amino acid amide metal complexes and their melanogenesis inhibitory activities. *J. Pept. Sci.* **2011**, *17*, 791–797.
89. <https://www.ccdc.cam.ac.uk/structures/Search?Ccdcid=ZISREB&DatabaseToSearch=Published> (9. 6. 2024.)
90. N.I. Tikhonov, S.S. Khutsishvili, L. I. Larina, A.S. Pozdnyakov i suradnici, Silver polymer complexes as precursors of nanocomposites based on polymers of 1-vinyl-1,2,4-triazole. *J. Mol. Struct.* **2019**, *1180*, 272-279.
91. W. Zhang, G. Ye, D. Liao, X. Chen i suradnici, Recent Advances of Silver-Based Coordination Polymers on Antibacterial Applications, *Molecules.* **2022**, *21*, 7166.
92. XY Yu, R. Zhang, SL Li, SH Yu i suradnici, A new silver-organic coordination polymer: Synthesis, crystal structure, fluorescence and antibacterial activity. *Inorg. Chem. Commun.* **2020**, *116*, 107897.
93. I. Kostova, The Role of Complexes of Biogenic Metals in Living Organisms. *Inorganics*, **2023**, *11*, 56–70.
94. C. Berrouet, N. Dorilas, K.A. Rejniak, N. Tuncer , Comparison of Drug Inhibitory Effects (IC50) in Monolayer and Spheroid Cultures. *Bull Math Biol.* **2020**, *82*, 68.
95. T. Widiandani, T. Tandian, B. D. Zufar, A. Suryadi, B. T. Purwanto i suradnici, *In vitro* study of pinostrobin propionate and pinostrobin butyrate: Cytotoxic activity against breast cancer cell T47D and its selectivity indeks. *J Public Health Afr.* **2023**, *14*, 2516.

96. E. O. Mikhailova, Silver Nanoparticles: Mechanism of Action and Probable Bio-Application. *J Funct Biomater*. **2020**, *11*, 84.
97. G. Kuzderová, M. Rendošová, R. Gyepes, S. Sovová i suradnici, Antimicrobial and Anticancer Application of Silver(I) Dipeptide Complexes. *Molecules*. **2021**, *26*, 6335.
98. W. K. Jung, H. C. Koo, K. W. Kim, S. Shin, Antibacterial Activity and Mechanism of Action of the Silver Ion in *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. *Appl Environ Microbiol*. **2008**, *74*.
99. <https://www.inotivco.com/models/icr-mice> (28. 6. 2024.)
100. S. S. Hwang, W. Bayne, F. Theeuwes, In vivo evaluation of controlled-release products. *J Pharm Sci*. **1993**, *8*, 1145–1150.
101. K. Sonaje, YH Lin, JH Juang, SP Wey i suradnici, In vivo evaluation of safety and efficacy of self-assembled nanoparticles for oral insulin delivery. *Biomaterials*. **2009**, *30*, 2329–2339.
102. I. Wawrzyk-Bochenek, M. Rahnama, M. Stachura, S. Wilczyński i suradnici, Evaluation of the Reduction of Skin Hyperpigmentation Changes under the Influence of a Preparation Containing Kojic Acid Using Hyperspectral Imaging—Preliminary Study. **2023**, *12*, 2710.