

UNIVERZITET U BEOGRADU

HEMIJSKI FAKULTET

Marko Ž. Jeremić

**Dobijanje alkilamino i aralkilamino derivata marinskog hinona avarona i model-jedinjenja i ispitivanje njihove citotoksične i antibakterijske aktivnosti**

doktorska disertacija

Beograd, 2018.

UNIVERSITY OF BELGRADE  
FACULTY OF CHEMISTRY

Marko Ž. Jeremić

**Preparation of alkylamino and aralkylamino derivatives of marine quinone  
avarone and its model compound and investigation of their cytotoxic and  
antibacterial activity**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2018.

Mentori: **prof. dr Dušan Sladić**, redovni profesor  
Hemijski fakultet, Univerzitet u Beogradu

**dr Irena Novaković**, naučni saradnik  
Institut za hemiju, tehnologiju i metalurgiju, Centar za hemiju,  
Univerzitet u Beogradu

Članovi komisije:

**prof. dr Dušan Sladić**, redovni profesor  
Hemijski fakultet, Univerzitet u Beogradu

**dr Irena Novaković**, naučni saradnik  
Institut za hemiju, tehnologiju i metalurgiju,  
Centar za hemiju, Univerzitet u Beogradu

**dr Milica Pešić**, naučni savetnik  
Institut za biološka istraživanja „Siniša Stanković“,  
Odeljenje za neurobiologiju, Univerzitet u Beogradu

**prof. dr Mario Zlatović**, vanredni profesor  
Hemijski fakultet, Univerzitet u Beogradu

Datum odbrane:

*Ova doktorska disertacija je urađena na Katedri za organsku hemiju Hemijskog fakulteta Univerziteta u Beogradu, pod rukovodstvom prof. dr Dušana Sladića, redovnog profesora Hemijskog fakulteta Univerziteta u Beogradu, i dr Irene Novaković, naučnog saradnika Instituta za hemiju, tehnologiju i metalurgiju Univerziteta u Beogradu.*

*Prof. dr Dušanu Sladiću se zahvaljujem na predloženoj temi, ukazanom poverenju i svim konstruktivnim diskusijama i savetima tokom izrade i pisanja rada.*

*Dr Ireni Novaković se takođe zahvaljujem na saradnji i svesrdnoj pomoći tokom izrade i pisanja ove disertacije.*

*Dr Milici Pešić se zahvaljujem na pomoći tokom izvođenja eksperimenata na Institutu za biološka istraživanja „Siniša Stanković“, kao i tokom pisanja rada.*

*Prof. dr Mariu Zlatoviću se takođe zahvaljujem na saradnji i pomoći tokom izrade disertacije, kao i izuzetnoj pozitivnoj energiji koju širi oko sebe.*

*Zahvalnost dugujem i svim profesorima i kolegama sa Hemijskog fakulteta, IHTM-a, IBISS-a i ostalih naučno-istraživačkih institucija koji su nesebično i na bilo koji način doprineli izradi ove doktorske disertacije.*

*Najviše od svega, bezgraničnu zahvalnost dugujem svojoj porodici i prijateljima koji su uvek bili uz mene kad je bilo najpotrebnije, koliko god nekada bio težak i tvrdoglav, i čija je podrška sastavni deo ovog rada.*

*Marko Ž. Jeremić*

Naslov:

**Dobijanje alkilamino i aralkilamino derivata marinskog hinona avarona i model-jedinjenja i ispitivanje njihove citotoksične i antibakterijske aktivnosti**

**Sažetak:** U okviru ove doktorske disertacije sintetisana je serija alkilamino i aralkilamino derivata marinskog seskviterpenskog hinona avarona, izolovanog iz morskog sundera *Dysidea avara*, i njegovog model-jedinjenja *terc*-butilhinona.

Za sintezu su odabrani derivati za koje se smatralo da će imati negativniji redoks potencijal od polaznih hinona, i samim tim pokazivati veću biološku aktivnost.

Određena je *in vitro* citotoksična aktivnost derivata prema ćelijskoj liniji nesitnoćelijskog karcinoma pluća – NCI-H460, višestruko rezistentnoj ćelijskoj liniji nesitnoćelijskog karcinoma pluća – NCI-H460/R, kao i normalnim ćelijama humanih keratinocita – HaCaT.

Pored inhibicije rasta ćelija, ispitivana je i sposobnost derivata za indukciju ćelijske smrti, u pomenutim ćelijskim linijama.

Nekoliko derivata koji su pokazali visok stepen efikasnosti i selektivnosti ka tumorskim ćelijama, ušli su u dalja ispitivanja mehanizma dejstva i to prema sposobnosti generisanja superoksidnog anjona, kao i prema sposobnosti za narušavanje membranskog potencijala mitohondrija.

Utvrđena je i antibakterijska aktivnost novih derivata prema seriji Gram-pozitivnih, kao i Gram-negativnih bakterija. Pored toga, ispitana je i inhibitorna aktivnost prema odabranim sojevima gljivica.

*Ključne reči:* avaron, *terc*-butilhinon, citotoksičnost, mitohondrije, apoptoza, nekroza, reaktivne kiseonične vrste, antimikrobna aktivnost

Naučna oblast: Hemija

Uža naučna oblast: Organska hemija, Medicinska hemija

UDK brojevi: 547.567, 547.525

Title:

**Preparation of alkylamino and aralkylamino derivatives of marine quinone avarone and its model compound and investigation of their cytotoxic and antibacterial activity**

**Summary:** In this doctoral dissertation, a series of alkylamino and aralkylamino derivatives of marine sesquiterpene quinone avarone, isolated from marine sponge *Dysidea avara*, and its model compound *tert*-butylquinone was synthesized.

Derivatives, for which it was anticipated to possess more negative redox potentials than the parent quinones, and therefore stronger activity were chosen for synthesis.

*In vitro* cytotoxic activity of derivatives toward three cell lines, non-small cell lung carcinoma – NCI-H460, its resistant counterpart – NCI-H460/R, as well as normal human keratinocytes – HaCaT, was determined.

Besides cell growth inhibition, ability of derivatives to induce cell death, was also investigated.

Several derivatives with high efficacy and selectivity toward cancer cells have entered into further investigation of their mechanism according to the potential to generate superoxide radical anion, as well as the ability to change mitochondrial membrane potential.

Antibacterial activity of novel derivatives towards Gram-positive and Gram-negative strains of bacteria, as well as antimicrobial activity against few fungal strains, were determined.

*Keywords:* avarone, *tert*-butylquinone, cytotoxicity, mitochondria, apoptosis, necrosis, reactive oxygen species, antimicrobial activity

Scientific field: Chemistry

Scientific subfield: Organic chemistry, Medicinal chemistry

UCD numbers: 547.567, 547.525

1. Uvod.....	1
2. Opšti deo.....	2
2.1. Uloga prirodnih proizvoda u tradicionalnoj i modernoj medicini.....	2
2.2. Primena prirodnih proizvoda iz marinskih izvora i njihovih derivata u medicini.....	8
2.2.1. Prirodni proizvodi marinskog porekla koji pokazuju antimikrobnu aktivnost.....	8
2.2.2. Prirodni proizvodi marinskog porekla koji pokazuju antiparazitsku i insekticidnu aktivnost.....	10
2.2.3. Prirodni proizvodi marinskog porekla koji pokazuju antiinflamatornu i analgetičku aktivnost.....	11
2.2.4. Prirodni proizvodi marinskog porekla koji pokazuju antitumorsku aktivnost.....	12
2.2.5. Prirodni proizvodi marinskog porekla ostalih tipova aktivnosti.....	14
2.3. Morski sunderi kao izvori prirodnih proizvoda od značaja za medicinu.....	14
2.3.1. Prirodni proizvodi izolovani iz sundera koji pokazuju antimikrobnu aktivnost...	15
2.3.2. Prirodni proizvodi izolovani iz sundera koji pokazuju antiparazitsku i insekticidnu aktivnost.....	16
2.3.3. Prirodni proizvodi izolovani iz sundera koji pokazuju antiinflamatornu i analgetičku aktivnost.....	18
2.3.4. Prirodni proizvodi izolovani iz sundera koji pokazuju antitumorsku aktivnost .	18
2.3.5. Prirodni proizvodi izolovani iz sundera ostalih tipova aktivnosti.....	20
2.4. Hinoni i hidrohinoni.....	22
2.4.1. Hinonski lekovi iz klase antraciklina.....	24
2.4.2. Hinonski lekovi iz klase mitomicina.....	25
2.4.3. Hinonski lekovi iz klase antracendiona i aziridinilbenzohinona.....	26
2.4.4. Seskviterpenski hinoni i hidrohinoni marinskog porekla.....	27
2.5. Principi modifikacije prirodnih proizvoda.....	31
2.6. Reaktivne kiseonične vrste, njihova uloga u mitohondrijama i indukcija apoptoze i nekroze.....	34

3. Naši radovi.....	36
3.1. Avarol i avaron kao redoks par i mehanizam njihovog dejstva.....	37
3.2. Dobijanje i karakterizacija derivata.....	43
3.2.1. Dobijanje i karakterizacija alkilamino i aralkilamino derivata avarona.....	44
3.2.2. Dobijanje i karakterizacija alkilamino i aralkilamino derivata <i>terc</i> -butilhinona...49	
3.3. Ciklična voltometrija sintetisanih derivata.....	54
3.4. Ispitivanje biološke aktivnosti alkilamino i aralkilamino derivata hinona.....	57
3.5. Analiza tipa ćelijske smrti.....	64
3.6. Detekcija superoksidnog anjona.....	72
3.7. Detekcija gubitka membranskog potencijala mitohondrija (JC-1 test).....	74
3.8. Antimikrobna aktivnost.....	77
3.8.1. Antibakterijska aktivnost.....	78
3.8.2. Antifungalna aktivnost.....	79
4. Eksperimentalni deo.....	82
4.1. Izolovanje avarola.....	83
4.2. Dobijanja avarona.....	83
4.3. Dobijanje alkilamino i aralkilamino derivata avarona.....	83
4.3.1. 2-(Alilamino)-6-(((1 <i>R</i> ,2 <i>S</i> ,4 <i>aS</i> ,8 <i>aS</i> )-1,2,4 <i>a</i> ,5-tetrametil-1,2,3,4,4 <i>a</i> ,7,8,8 <i>a</i> - oktahidronaftalen-1-il)metil)cikloheksa-2,5-dien-1,4-dion ( <b>124a</b> ).....	84
4.3.2. 2-(Alilamino)-5-(((1 <i>R</i> ,2 <i>S</i> ,4 <i>aS</i> ,8 <i>aS</i> )-1,2,4 <i>a</i> , 5-tetrametil-1,2,3,4,4 <i>a</i> ,7,8,8 <i>a</i> - oktahidronaftalen-1-il)metil)cikloheksa-2,5-dien-1,4-dion ( <b>124b</b> ).....	85
4.3.3. 2-(Butilamino)-6-(((1 <i>R</i> ,2 <i>S</i> ,4 <i>aS</i> ,8 <i>aS</i> )-1,2,4 <i>a</i> , 5-tetrametil-1,2,3,4,4 <i>a</i> ,7,8,8 <i>a</i> - oktahidronaftalen-1-il)metil)cikloheksa-2,5-dien-1,4-dion ( <b>125a</b> ).....	85
4.3.4. 2-(Butilamino)-5-(((1 <i>R</i> ,2 <i>S</i> ,4 <i>aS</i> ,8 <i>aS</i> )-1,2,4 <i>a</i> ,5-tetrametil-1,2,3,4,4 <i>a</i> ,7,8,8 <i>a</i> - oktahidronaftalen-1-il)metil)cikloheksa-2,5-dien-1,4-dion ( <b>125b</b> ).....	86
4.3.5. 2-( <i>sek</i> -Butilamino)-6-(((1 <i>R</i> ,2 <i>S</i> ,4 <i>aS</i> ,8 <i>aS</i> )-1,2,4 <i>a</i> ,5-tetrametil-1,2,3,4,4 <i>a</i> ,7,8,8 <i>a</i> - oktahidronaftalen-1-il)metil)cikloheksa-2,5-dien-1,4-dion ( <b>126a</b> ).....	87
4.3.6. 2-( <i>sek</i> -Butilamino)-5-(((1 <i>R</i> ,2 <i>S</i> ,4 <i>aS</i> ,8 <i>aS</i> )-1,2,4 <i>a</i> ,5-tetrametil-1,2,3,4,4 <i>a</i> ,7,8,8 <i>a</i> - oktahidronaftalen-1-il)metil)cikloheksa-2,5-dien-1,4-dion ( <b>126b</b> ).....	88



4.3.7.	2-(Oktilamino)-6-(((1 <i>R</i> ,2 <i>S</i> ,4 <i>aS</i> ,8 <i>aS</i> )-1,2,4 <i>a</i> ,5-tetrametil-1,2,3,4,4 <i>a</i> ,7,8,8 <i>a</i> -oktahidronaftalen-1-il)metil)cikloheksa-2,5-dien-1,4-dion ( <b>127a</b> ).....	88
4.3.8.	2-(Oktilamino)-5-(((1 <i>R</i> ,2 <i>S</i> ,4 <i>aS</i> ,8 <i>aS</i> )-1,2,4 <i>a</i> ,5-tetrametil-1,2,3,4,4 <i>a</i> ,7,8,8 <i>a</i> -oktahidronaftalen-1-il)metil)cikloheksa-2,5-dien-1,4-dion ( <b>127b</b> ).....	89
4.3.9.	2-(Pirolidin-1-il)-6-(((1 <i>R</i> ,2 <i>S</i> ,4 <i>aS</i> ,8 <i>aS</i> )-1,2,4 <i>a</i> ,5-tetrametil-1,2,3,4,4 <i>a</i> ,7,8,8 <i>a</i> -oktahidronaftalen-1-il)metil)cikloheksa-2,5-dien-1,4-dion ( <b>128a</b> ).....	90
4.3.10.	2-(Pirolidin-1-il)-5-(((1 <i>R</i> ,2 <i>S</i> ,4 <i>aS</i> ,8 <i>aS</i> )-1,2,4 <i>a</i> ,5-tetrametil-1,2,3,4,4 <i>a</i> ,7,8,8 <i>a</i> -oktahidronaftalen-1-il)metil)cikloheksa-2,5-dien-1,4-dion ( <b>128b</b> ).....	91
4.3.11.	2-(Benzilamino)-6-(((1 <i>R</i> ,2 <i>S</i> ,4 <i>aS</i> ,8 <i>aS</i> )-1,2,4 <i>a</i> ,5-tetrametil-1,2,3,4,4 <i>a</i> ,7,8,8 <i>a</i> -oktahidronaftalen-1-il)metil)cikloheksa-2,5-dien-1,4-dion ( <b>129a</b> ).....	91
4.3.12.	2-(Benzilamino)-5-(((1 <i>R</i> ,2 <i>S</i> ,4 <i>aS</i> ,8 <i>aS</i> )-1,2,4 <i>a</i> ,5-tetrametil-1,2,3,4,4 <i>a</i> ,7,8,8 <i>a</i> -oktahidronaftalen-1-il)metil)cikloheksa-2,5-dien-1,4-dion ( <b>129b</b> ).....	92
4.3.13.	2-(Fenetilamino)-6-(((1 <i>R</i> ,2 <i>S</i> ,4 <i>aS</i> ,8 <i>aS</i> )-1,2,4 <i>a</i> ,5-tetrametil-1,2,3,4,4 <i>a</i> ,7,8,8 <i>a</i> -oktahidronaftalen-1-il)metil)cikloheksa-2,5-dien-1,4-dion ( <b>130a</b> ).....	93
4.3.14.	2-(Fenetilamino)-5-(((1 <i>R</i> ,2 <i>S</i> ,4 <i>aS</i> ,8 <i>aS</i> )-1,2,4 <i>a</i> ,5-tetrametil-1,2,3,4,4 <i>a</i> ,7,8,8 <i>a</i> -oktahidronaftalen-1-il)metil)cikloheksa-2,5-dien-1,4-dion ( <b>130b</b> ).....	94
4.4.	Dobijanje <i>terc</i> -butil-1,4-benzohinona.....	94
4.5.	Dobijanje alkilamino i aralkilamino derivata <i>terc</i> -butil-1,4-benzohinona.....	95
4.5.1.	2- <i>terc</i> -Butil-6-(metilamino)-1,4-benzohinon ( <b>131a</b> ).....	95
4.5.2.	2- <i>terc</i> -Butil-5-(metilamino)-1,4-benzohinon ( <b>131b</b> ).....	96
4.5.3.	2- <i>terc</i> -Butil-6-(etilamino)-1,4-benzohinon ( <b>132a</b> ).....	96
4.5.4.	2- <i>terc</i> -Butil-5-(etilamino)-1,4-benzohinon ( <b>132b</b> ).....	97
4.5.5.	2-(Alilamino)-6- <i>terc</i> -butil-1,4-benzohinon ( <b>133a</b> ).....	97
4.5.6.	2-(Alilamino)-5- <i>terc</i> -butil-1,4-benzohinon ( <b>133b</b> ).....	98
4.5.7.	2- <i>terc</i> -Butil-6-(butilamino)-1,4-benzohinon ( <b>134a</b> ).....	99
4.5.8.	2- <i>terc</i> -Butil-5-(butilamino)-1,4-benzohinon ( <b>134b</b> ).....	99
4.5.9.	2- <i>terc</i> -Butil-6-( <i>sek</i> -butilamino)-1,4-benzohinon ( <b>135a</b> ).....	100
4.5.10.	2- <i>terc</i> -Butil-5-( <i>sek</i> -butilamino)-1,4-benzohinon ( <b>135b</b> ).....	101
4.5.11.	2- <i>terc</i> -Butil-6-(oktilamino)-1,4-benzohinon ( <b>136a</b> ).....	101
4.5.12.	2- <i>terc</i> -Butil-5-(oktilamino)-1,4-benzohinon ( <b>136b</b> ).....	102

4.5.13. 2- <i>terc</i> -Butil-6-(pirolidin-1-il)-1,4-benzohinon ( <b>137a</b> ).....	103
4.5.14. 2- <i>terc</i> -Butil-5-(pirolidin-1-il)-1,4-benzohinon ( <b>137b</b> ).....	103
4.5.15. 2-(Benzilamino)-6-( <i>terc</i> -butil)-1,4-benzohinon ( <b>138a</b> ).....	104
4.5.16. 2-(Benzilamino)-5-( <i>terc</i> -butil)-1,4-benzohinon ( <b>138b</b> ).....	105
4.5.17. 2-( <i>terc</i> -Butil)-6-(fenetilamino)-1,4-benzohinon ( <b>139a</b> ).....	105
4.5.18. 2-( <i>terc</i> -Butil)-5-(fenetilamino)-1,4-benzohinon ( <b>139b</b> ).....	106
4.6. Ciklična voltometrija.....	107
4.7. Biologija.....	107
4.7.1. Citotoksična aktivnost. Hemikalije.....	107
4.7.2. Derivati.....	107
4.7.3. Ćelijske kulture.....	107
4.7.4. Ispitivanje citotoksičnosti MTT testom.....	108
4.7.5. Detekcija tipa ćelijske smrti.....	108
4.7.6. Detekcija superoksidnog anjona.....	109
4.7.7. JC-1 test.....	109
4.7.8. Statistička analiza.....	109
4.8. Određivanje antimikrobne aktivnosti.....	110
5. Zaključak.....	112
6. Literatura.....	114

### ***Lista skraćenica i termina***

A549	ćelijska linija humanog adenokarcinoma pluća
ACP	(engl. „ <i>acyl carrier protein</i> “) acil-noseći protein
ADP	(engl. „ <i>adenosyl diphosphate</i> “) adenzil-difosfat
Akt	protein-kinaza B
AsPC1	ćelijska linija humanog adenokarcinoma pankreasa
ATP	(engl. „ <i>adenosyl triphosphate</i> “) adenzil-trifosfat
AV	aneksin V, aneksin A5
Bcl-2	B-ćelijski limfom, regulator apoptoze
CDK	ciklin-zavisna-kinaza
c-Jun	podjedinica AP-1 transkripcionog faktora
CHOP	proapoptotski transkripcioni faktor
COX-2	ciklooksigenaza-2
DHE	dihidroetidijum
DNK	dezoksiribonukleinska kiselina
EDTA	etilendiamintetraacetat
EGF-R	receptor epidermalnog faktora rasta
EOH	2-hidroksietidijum
ERK	mitogenom-aktivirana protein-kinaza
ESI	elektrosprej jonizacija
ET-743	ekteinacidin-743
ETC	elektron-transportni lanac
FDA	(engl. „ <i>Food and Drug Administration</i> “) Agencija za hranu i lekove
FemX	ćelijska linija melanoma
FITC	fluorescein-izotiocijanat
FPPS	farnezil-difosfat-sintaza
FSA	fetalni goveđi serum
FT	furijeova transformacija

GADD153	DNK-oštećujući proapoptotski transkripcioni faktor
H460	ćelijska linija nesitnoćelijskog karcinoma pluća
H552	ćelijska linija nesitnoćelijskog karcinoma pluća
HaCaT	ćelijska linija normalnih humanih keratinocita
HCT	ćelijska linija humanog karcinoma debelog creva
HeLa	ćelijska linija raka grlića materica
HepG2	ćelijska linija humanog hepatocelularnog raka
HIV	humani imunodeficijentni virus
HIF	hipoksijom-inducibilni transkripcioni faktor
HL-60	ćelijska linija mijeloidne leukemije
HMO2	ćelijska linija humanog karcinoma želuca
HPLC	visokoefikasna tečna hromatografija
HRMS	masena spektroskopija visokog razlaganja
HT-29	ćelijska linija humanog kancera debelog creva
IC <sub>50</sub>	koncentracija jedinjenja koja inhibira 50% ispitanih ćelija ili organizama
IL-2	interleukin-2
IL-8	interleukin-8
iNOS	inducibilna azot-monoksid-sintaza
IR	infracrveni
IRS-1	supstrat insulinskog receptora
JC-1	5,5',6,6'-tetrahloro-1,1',3,3'-tetraetilbenzimidazolokarbocijanin-jodid
K-562	ćelijska linija humane hronične mijeloidne leukemije
kDa	kilodaltona
L-929	ćelijska linija mišjih fibroblasta
5-LOX	lipoksigenaza-5
MCF-7	ćelijska linija humanog karcinoma dojke
MDA-MB435	ćelijska linija humanog melanoma
MHB	Mueller-Hinton bujon

MIK	minimalna inhibitorna koncentracija
MS	masena spektroskopija
MTT	3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2 <i>H</i> -tetrazolijum-bromid
NADH	nikotinamid-adenin dinukleotid-fosfat redukovani oblik
NADPH	nikotinamid-dinukleotid-difosfat redukovani oblik
NF- $\kappa$ B	nuklearni faktor kapa lakog lanca koji stimuliše aktivirane B ćelije, transkripcioni faktor
NMR	nuklearna magnetna rezonanca
Nrf2	transkripcioni faktor odgovoran za antioksidativnu zaštitu ćelija
P388	ćelijska linija mišjeg limfoma
P450	citohrom P450
PARP	poli(ADP-riboza)polimeraza
PBS	fosfatom puferovani fiziološki rastvor
PC12	ćelijska linija adrenalnih žlezda pacova
PI	propidijum jodid
PI3K	fosfatidil-inozitol-3-kinaza
PTP1B	protein-tirozin-fosfataza 1B
QG56	ćelijska linija humanog karcinoma pluća
RI	refrakcioni indeks
RNS	reaktivne azotove vrste
ROS	reaktivne kiseonične vrste
RPMI 1640	medijum za gajenje ćelijskih kultura
SARS	(engl. „ <i>Severe Acute Respiratory Syndrome</i> “) teški akutni respiratorni sindrom
SK-OV-3	ćelijska linija humanog adenokarcinoma jajnika
SMB	Sabouraud maltozni bujon
SOD	superoksid-dismutaza
T47D	ćelijska linija humanog karcinoma dojke
TBQ	<i>tert</i> -butilhinon
TBHQ	<i>tert</i> -butilhidrohinon

TLC	tankoslojna hromatografija
TMS	tetrametilsilan
TNF- $\alpha$	faktor nekroze tumora-alfa
U937	ćelijska linija humanog limfoma
UV Vis	ultraljubičasti i vidljivi opseg talasnih dužina
WHO	(engl. „ <i>World Health Organisation</i> “) Svetska zdravstvena organizacija

## 1. UVOD

Veliku prepreku za postizanje odgovarajuće efikasnosti u lečenju kancera predstavlja pojava rezistencije. Stoga postoji stalna potreba za razvijanjem novih lekova. Jedna od strategija za razvoj novih lekova je modifikacija postojećih kako bi se dobili terapeutici sa poboljšanim farmakokinetičkim i farmakodinamičkim osobinama, pre svega većom aktivnošću i selektivnošću prema ćelijama kancera u odnosu na normalne ćelije.

Kao cilj ove doktorske disertacije postavljeno je dobijanje alkilamino i aralkilamino derivata seskviterpenskog hinona avarona, izolovanog iz morskog sunđera *Dysidea avara*, i njegovog strukturno uprošćenog sistema, *terc*-butilhinona. Dobijenim derivatima je ispitana biološka aktivnost, sa akcentom na antitumorski potencijal. Jedinjenjima sa najboljom efikasnošću i selektivnošću ka tumorskim ćelijama ispitan je potencijal na generisanje superoksidnog anjona, kao i za narušavanje membranskog potencijala mitohondrija.

U *Opštem delu* teze dat je kratak istorijat primene prirodnih proizvoda u tradicionalnoj i modernoj medicini, zatim je dat pregled primene marinskih prirodnih proizvoda u medicini. Potom je dat pregled primene prirodnih proizvoda izolovanih iz morskih sunđera. Zatim su dati osnovni podaci o hinonima kao klasi jedinjenja sa širokim opsegom aktivnosti i višestrukim mehanizmom dejstva. Na kraju je dat prikaz uloge reaktivnih kiseoničnih vrsta u prooksidativnom dejstvu prirodnih proizvoda i njihovoj citotoksičnosti.

U *Našim radovima* detaljno su prikazani rezultati dobijeni tokom izrade teze, kao i njihovo tumačenje. Obradeno je dobijanje alkilamino i aralkilamino derivata polaznih hinona, njihova karakterizacija, te ispitivanje njihove biološke aktivnosti.

U *Eksperimentalnom delu* su izloženi postupci dobijanja derivata, njihova potpuna karakterizacija, kao i detalji za izvođenje bioloških ispitivanja.

Na kraju rada se nalazi pregled korišćene literature. Kao prilog je dat CD sa spektrima sintetisanih jedinjenja.

## 2. OPŠTI DEO

### 2.1. Uloga prirodnih proizvoda u tradicionalnoj i modernoj medicini

Početna faza u razvoju novog leka je identifikacija osnovnog jedinjenja. Ovo jedinjenje može imati nizak nivo željene aktivnosti, i moguće je prisustvo sporednih efekata, ali vodeće jedinjenje daje osnovu za proces razvoja lekova. Ekstrakti dobijeni iz živih organizama obično imaju neki vid biološke aktivnosti, a jedinjenje odgovorno za tu aktivnost naziva se aktivni princip. Tradicionalna medicina je dobar izvor informacija o aktivnostima preparata (izolata) pojedinih biljnih i životinjskih vrsta. Aktivni principi ovih ekstrakata mogu biti korisni lekovi sami po sebi ili mogu poslužiti kao vodeća jedinjenja u procesu razvoja novih lekova, pa samim tim naučnici širom sveta vrše ispitivanja niza kopnenih i morskih organizama u potrazi za prirodnim proizvodima koji bi mogli imati željenu biološku aktivnost. Iako je farmaceutska industrija sintetisala na hiljade jedinjenja koja mogu biti vodeća jedinjenja, njihova strukturna raznovrsnost je mnogo manja nego kod prirodnih proizvoda. Stoga prirodni proizvodi predstavljaju daleko perspektivniju varijantu vodećih jedinjenja.

Ljudi su od pamtiveka koristili prirodne proizvode iz biljaka, životinja i mikroorganizama. O njihovoj lekovitosti ili štetnosti dolazilo se kroz empirijsku spoznaju konzumiranjem. Na ovaj način drevni ljudi su uspeli da steknu znanja o jestivim materijalima i prirodnim lekovima.<sup>1</sup>

Najstariji pisani izvori korišćenja prirodnih proizvoda potiču još iz drevne Mesopotamije,<sup>2</sup> zatim Egipta (Ebersov papirus), Kine i Grčke. Narodi srednjeg veka su sačuvali i dalje razvijali ova znanja, sa posebnim naglaskom na značaj arapskih lekara i farmaceuta u zlatno doba arapsko-islamske kulture (period od 8. do 12. veka).<sup>3</sup> Tradicionalne medicine, kao što su kineska, indijska (Ajurveda), japanska (Kampo), korejska i grčka, koriste prirodne proizvode koji se praktikuju hiljadama godina postavši uređeni medicinski sistemi. Iako mogu imati nedostatke, tradicionalne medicine i dalje predstavljaju važan izvor informacija za modernu farmaciju i medicinu.<sup>4,5</sup>

Kineska medicina, na primer, bazirana je na preko 5000 godina prakse i iskustva, i važan je izvor informacija o tačnom doziranju medikamenata, metodama pripremanja i procesiranja materijala, kao i odgovarajućih perioda za sakupljanje različitih lekovitih delova biljke. Važno je



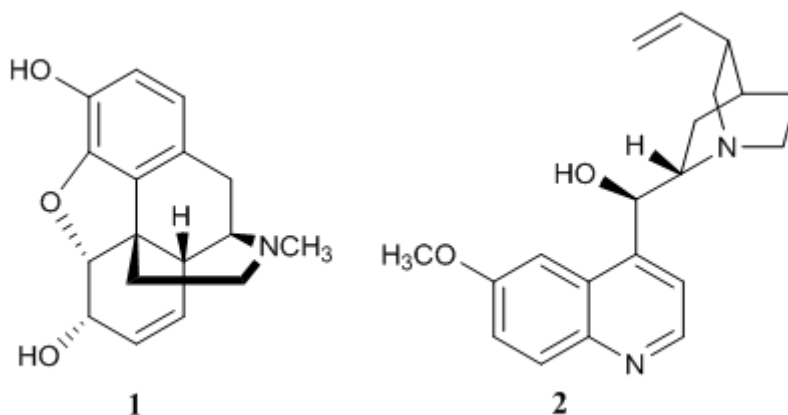
napomenuti da postoji sve veća konvergencija tradicionalne kineske i moderne medicine. Sa razvojem moderne tehnologije moguće je odrediti farmakologiju i mehanizam delovanja preparata korišćenih u kineskoj medicini.

Biljka ili preparat, korišćeni u tradicionalnoj medicini, mogu sadržavati više sastojaka kao što su alkaloidi, terpenoidi i flavonoidi. Ova jedinjenja mogu delovati sama ili u kombinaciji sa drugim jedinjenjima da bi proizvela željeni farmakološki efekat.<sup>6</sup> Pre više od 20 godina sprovedena je studija pod pokroviteljstvom Svetske zdravstvene organizacije (WHO), kako bi se utvrdilo da li je tradicionalna medicina zaista doprinela razvoju modernih lekova i došlo se do zaključka da od 122 odabrana moderna leka, 80% njih su povezani sa tradicionalnom medicinom i izolovani su iz 94 biljke ili su derivati izolovanih prirodnih proizvoda.<sup>7</sup>

Strukturna analiza i mogućnost sinteze prirodnih proizvoda dali su hemičarima priliku za modifikacije jedinjenja i dobijanje njihovih derivata, kako bi se poboljšale karakteristike poput rastvorljivosti, efikasnosti ili stabilnosti u organizmu. Hemijska sinteza prirodnih proizvoda ima više prednosti: a) čuvaju se prirodni resursi i životna okolina; b) dobija se serija intermedijera koji obično imaju identične farmakoforne osobine kao i izvorno jedinjenje, pa se mogu dobiti jednostavniji analozi; c) dobija se osnova za industrijsku proizvodnju.

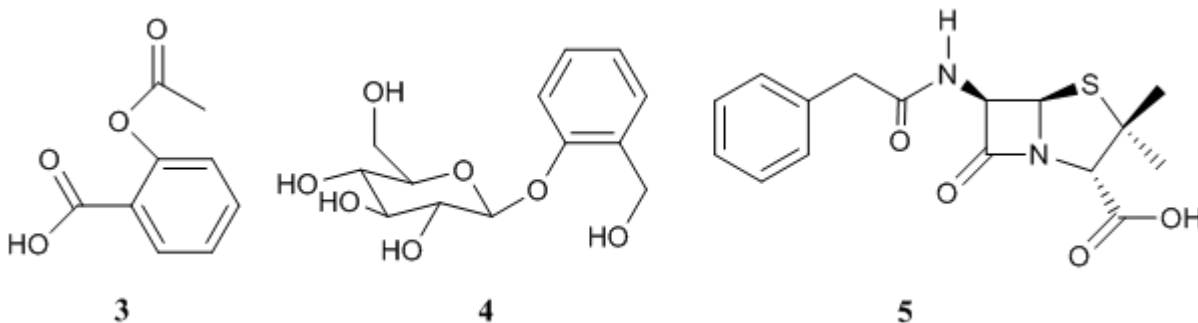
Sredinom 80-ih godina prošlog veka farmaceutska industrija je pokušala da se u potpunosti osloni na moderne tehnologije i kombinatornu hemiju u procesu razvoja novih lekova. Međutim, kako sav uloženi trud i resursi nisu dali zadovoljavajuće rezultate, poslednjih godina je ponovo aktuelizovano ispitivanje biljnih i životinjskih vrsta i mikroorganizama u cilju pronalaženja novih biološki aktivnih prirodnih proizvoda, bilo kao lekova, bilo kao vodećih jedinjenja u razvoju novih lekova.

Tradicionalni preparati prirodnih proizvoda formirali su osnovu za klinička, farmakološka i hemijska ispitivanja.<sup>8</sup> Ispitivanja prirodnih proizvoda maka (*Papaver somniferum*) dovela su do izolovanja nekoliko bioaktivnih alkaloida, među kojima je i morfin **1**, čiji se derivati i danas koriste kao nezamenljivi analgetici.<sup>9</sup> Antimalarijski agens, hinin **2** može se izolovati iz kore nekoliko vrsta drveta roda *Cinchona*.<sup>10</sup> Aspirin **3** (acetilsalicilna kiselina) je semisintetički antiinflamatorni agens koji je izveden iz prirodnog proizvoda salicina **4**,



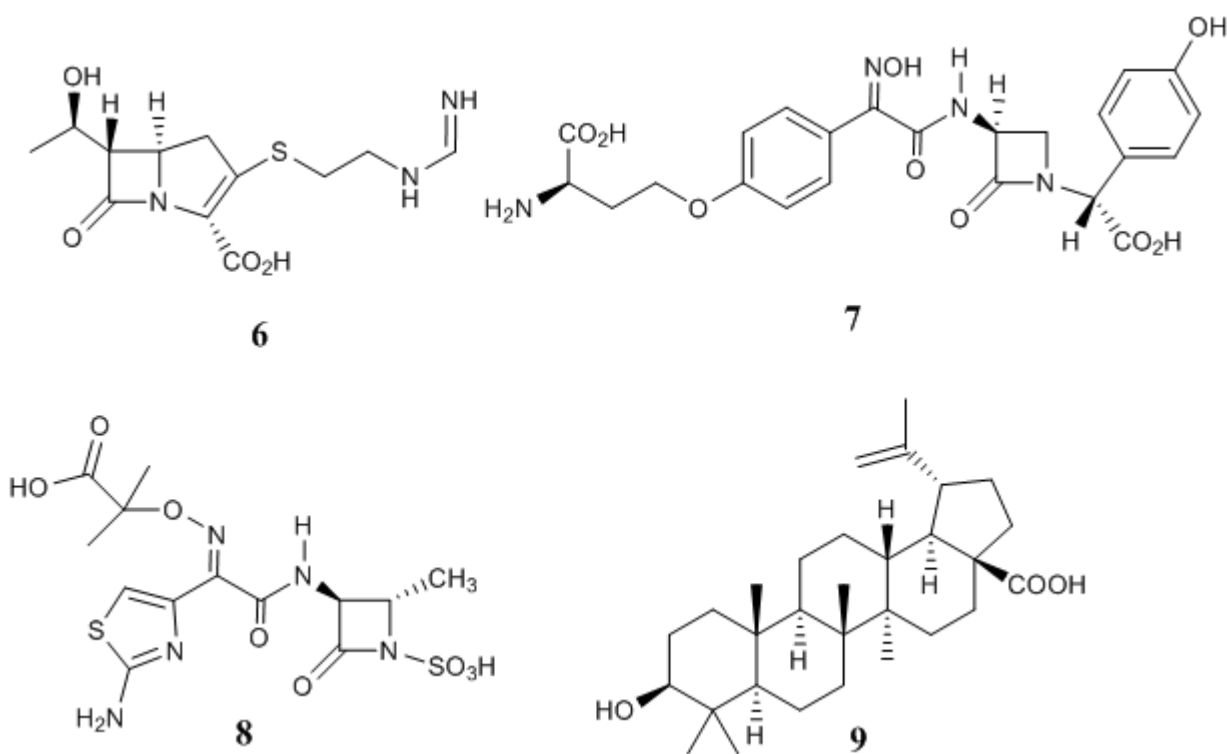
Slika 1. Strukturne formule morfina i hinina.

izolovanog iz kore vrbe *Salix alba*.<sup>11</sup> Najpoznatiji prirodni derivat izolovan iz gljivica bez svake sumnje je penicilin **5**, izolovan iz gljivice *Penicillium notatum*.<sup>12</sup> Uvođenje novih tehnika ispitivanja (engl. “*screening*”) 70-ih godina prošlog veka, dovelo je do otkrića novih klasa antibiotika karbapenema (npr. imipenema **6**) i monobaktama (npr. nokardicina **7** i aztreonama **8**).<sup>13,14</sup> Betulinska kiselina **9**, triterpenoid dobijen iz kore bele breze (*Betula pubescens*), identifikovana je kao inhibitor replikacije HIV-a,<sup>15,16</sup> dok mehanizam njenog antitumorskog dejstva uključuje inhibiciju topoizomeraze I.<sup>17</sup>

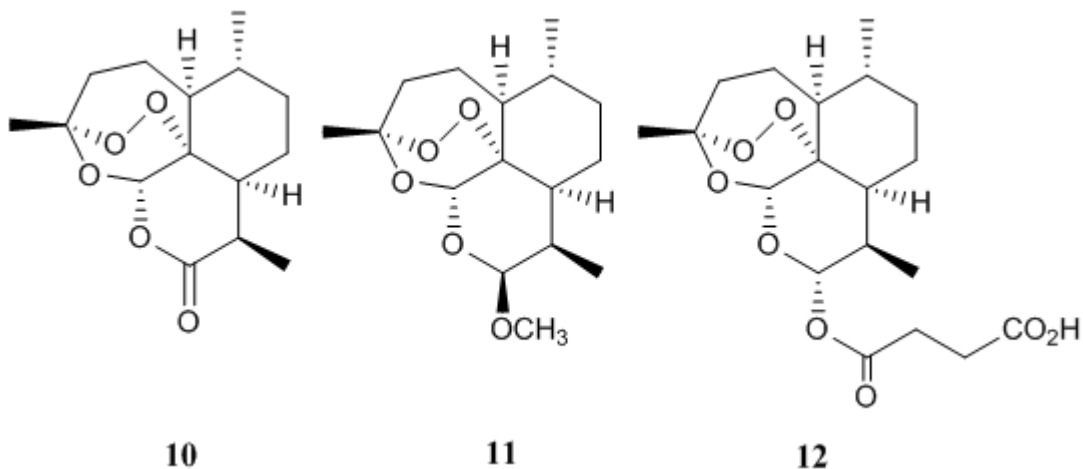


Slika 2. Strukturne formule aspirina, salicina i penicilina.

Najraniji zapisi o upotrebi biljke *Artemisia annua* u tretiranju malarije datiraju još od pre 1700 godina. Ispitivanja aktivnog principa, artemizininina **10**, uključivala su sintezu novih derivata i analoga, kao i utvrđivanje mehanizma delovanja. Kao rezultat toga, artemizinin i njegovi derivati su u širokoj upotrebi na globalnom nivou kao antimalarici novog tipa.<sup>18</sup> U poređenju sa ranije korišćenim lekovima, pre svega derivatima hinina, artemisinin ima visoku efikasnost, brzo dejstvo i nisku toksičnost. Derivati poput artemetra **11** i artesunata **12** su poboljšali efikasnost i rastvorljivost.

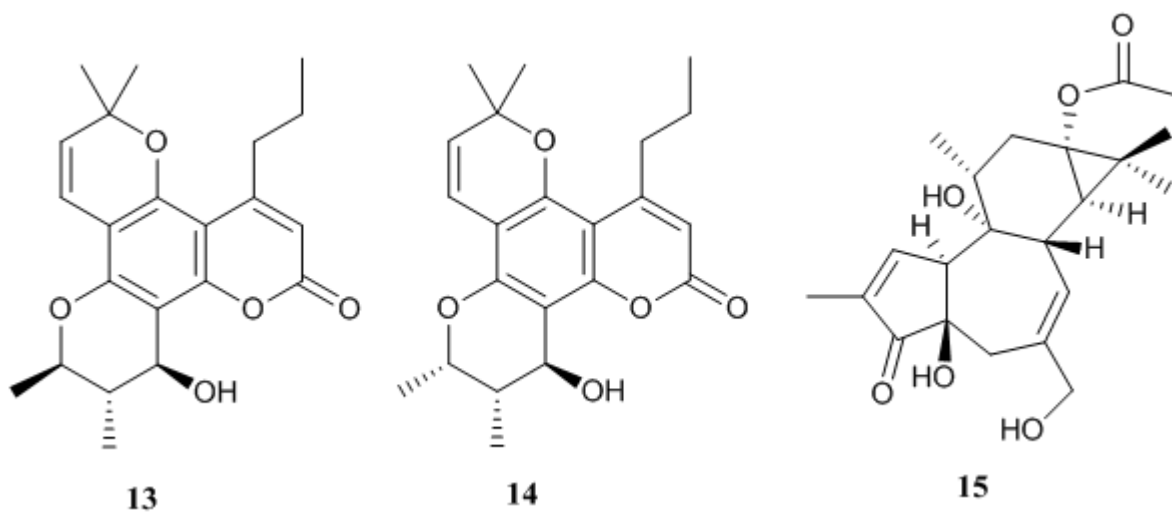


Slika 3. Strukturne formule imipenema, nokardicina, aztreonama i betulinske kiseline.



Slika 4. Strukturne formule artemizinina i njegovih derivata.

Prirodni proizvodi iz klase kalanolida pokazali su se kao najperspektivniji u tretiranju ćelija inficiranih HIV-om. Jedinjenja kalanolid A **13** i kalanolid B **14** iz biljaka porodice *Callonphylum*, kao i prostratin **15**, forbolski estar izolovan iz drveta *Homalanthus nutans*, ušla su fazu kliničkih ili prekliničkih ispitivanja.<sup>19-21</sup>

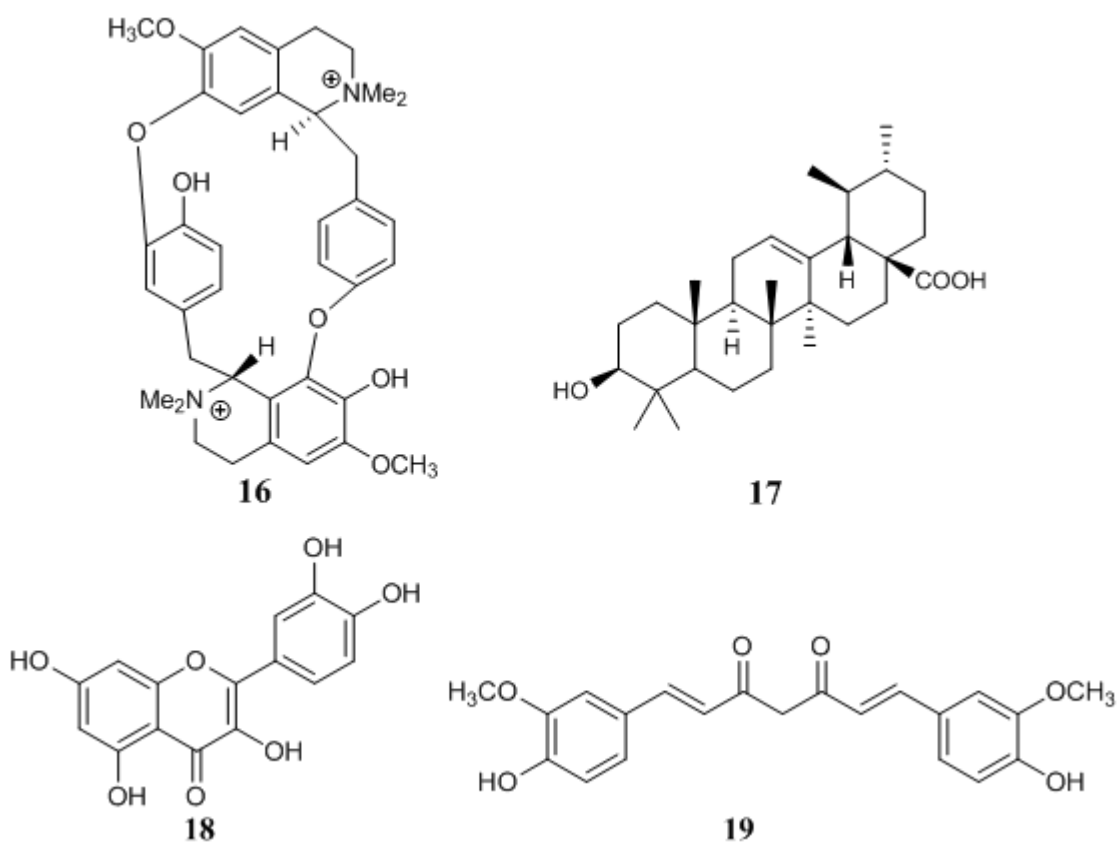


Slika 5. Strukturne formule kanadolida A i B i prostratina.

Kurare je dobro poznat parališući otrov koji koriste južnoamerički Indijanci u lovu na životinje. Iz puzavice *Chondrodendron tomentosum* izolovan je aktivni princip ovog otrova,

tubokurarinin **16**, koji je korišćen kao mišićni relaksant prilikom hirurških operacija. Danas je praktično zamenjen sintetičkim analogima.<sup>22</sup>

Ursolinska kiselina **17** je pentaciklični triterpen široko rasprostranjen u hrani i lekovitim biljkama. Pokazuje širok opseg aktivnosti, poput antioksidativne, antitumorske i antiinflamatorne.<sup>23</sup> Kvercetin **18** je flavonoid široko rasprostranjen u hrani. Može se naći u jabukama, grožđu, luku, čaju i paradajzu.<sup>24</sup> Obično se javlja kao *O*-glikozid D-glukoze.<sup>25</sup> Među polifenolima, kvercetin je naj snažniji antioksidans.<sup>26,27</sup> Inhibira enzime koji generišu reaktivne kiseonične vrste (ROS), poput ksantin-oksidadze.<sup>28</sup> Pokazuje citostatičko dejstvo na tumorske ćelije zasnovano na inhibiciji tirozin-kinaze i interakcijama sa vezivnim mestima za estrogen tipa II.<sup>29</sup> Međutim, ni ursolinska kiselina ni kvercetin nisu ušli u kliničku praksu.



Slika 6. Strukturne formule tubokurarina, ursolinske kiseline, kvercetina i kurkumina.

Kurkumin **19**, sastojak kurkume (*Curcuma longa*), začina iz indijske kuhinje, poznat je kao antiinflamatorni agens u indijskoj Ajurvedi vekovima. Kurkumin snižava ekspresiju i aktivaciju inflamatornih faktora, poput ciklooksigenaze 2 (COX-2) i 5-lipoksigenaze (5-LOX).<sup>30,31</sup> Kako su ovi inflamatorni faktori povezani sa artritismom, kurkumin se može koristiti i u tretmanu artritisa.<sup>32</sup> Pored toga, kurkumin inhibira bioaktivaciju karcinogenih jedinjenja supresijom specifičnih citohrom P450 izoenzima, a s druge strane vrši indukciju aktivnosti ili ekspresije enzima faze II koji detoksifikuju karcinogene.<sup>33</sup> Pa ipak, i pored velikog potencijala pokazanog u inicijalnim istraživanjima, kurkumin još uvek nije našao primenu u kliničkoj praksi.<sup>34</sup>

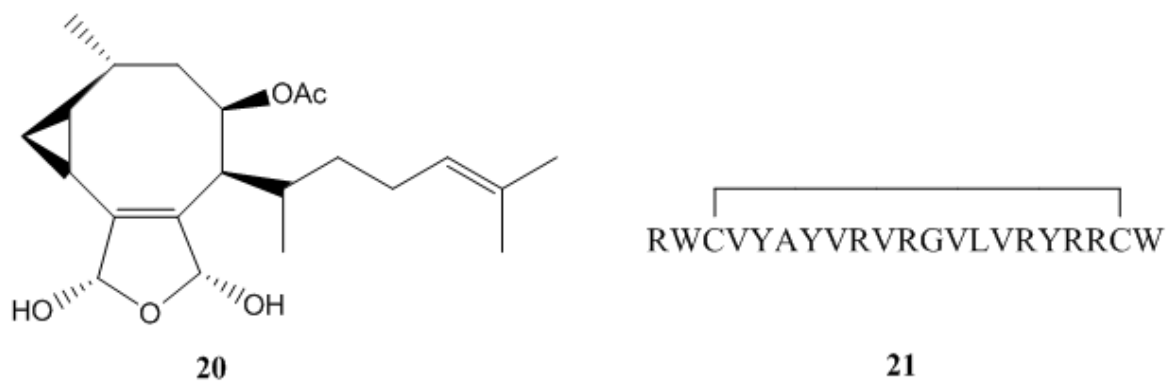
## **2.2. Primena prirodnih proizvoda iz marinskih izvora i njihovih derivata u medicini**

Progresivno istraživanje mora i morskih organizama u poslednjih pedesetak godina dovelo je do izolovanja hiljada strukturno jedinstvenih bioaktivnih prirodnih proizvoda. Komparativna analiza je pokazala da su marinski prirodni proizvodi superiorniji u odnosu na kopnene kada se sagleda raznolikost hemijskih struktura.<sup>35</sup> Oko 71% molekularnih skeleta koji se mogu naći u morskim organizmima su specifični upravo za njih. Pored toga, marinski proizvodi u proseku češće pokazuju bioaktivnost u odnosu na kopnene. U studiji citotoksičnosti američkog Nacionalnog instituta za kancer (NCI) približno 1% testiranih marinskih uzoraka pokazao je antitumorski potencijal u odnosu na svega 0,1% kopnenih uzoraka.<sup>36</sup>

Prirodni proizvodi izolovani iz morskih organizama pokazuju veliku raznovrsnost aktivnosti, između ostalih antimikrobnu, antiparazitsku, insekticidnu, analgetičku, antiinflamatornu, antitumorsku i niz drugih.

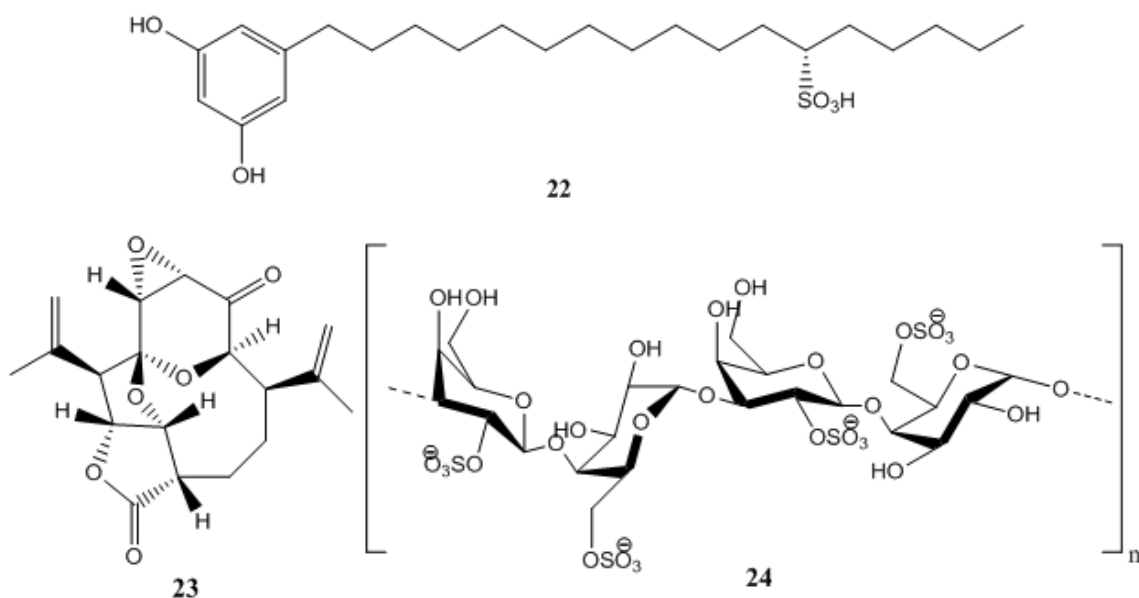
### **2.2.1. Prirodni proizvodi morskog porekla koji pokazuju antimikrobnu aktivnost**

Iz mrke alge *Dilophus ligatus* izolovan je diterpen krenuladiol **20**, koji je pokazao antimikrobnu aktivnost prema *Staphylococcus aureus*, *Micrococcus luteus* i *Aeromonas hydrophyla*.<sup>37,38</sup> Arenicin-1 **21**, peptid koji sadrži 21 aminokiselinu, izolovan iz morskog crva *Arenicola marina*, pokazao je značajnu antibakterijsku aktivnost prema *S. aureus* i *Pseudomonas aeruginosa*.<sup>39</sup> Arenicin-1 indukuje oslobađanje kalceina iz lipozoma, zbog čega se pretpostavlja



Slika 7. Strukturne formule krenuladiala i arenicina-1

da je bakterijska membrana glavna meta delovanja peptida. Sulfoalkilrezorcinol **22**, izolovan iz morskog mikroorganizma iz roda *Zygosporium*, pokazao je antimikrobnu aktivnost prema meticilin-rezistentnom soju *S. aureus*. Pretpostavlja se da mehanizam delovanja uključuje inhibiciju polimerizacije proteina FtsZ (strukturnog analoga tubulina), koji učestvuje u procesu deljenja zida bakterije.<sup>40</sup> Iz kolumbijskog korala *Pseudopterogorgia bipinnata* izolovan je diterpen bipinapterolid B **23**, koji je pokazao inhibitornu aktivnost prema H<sub>37</sub>RV soju bakterije

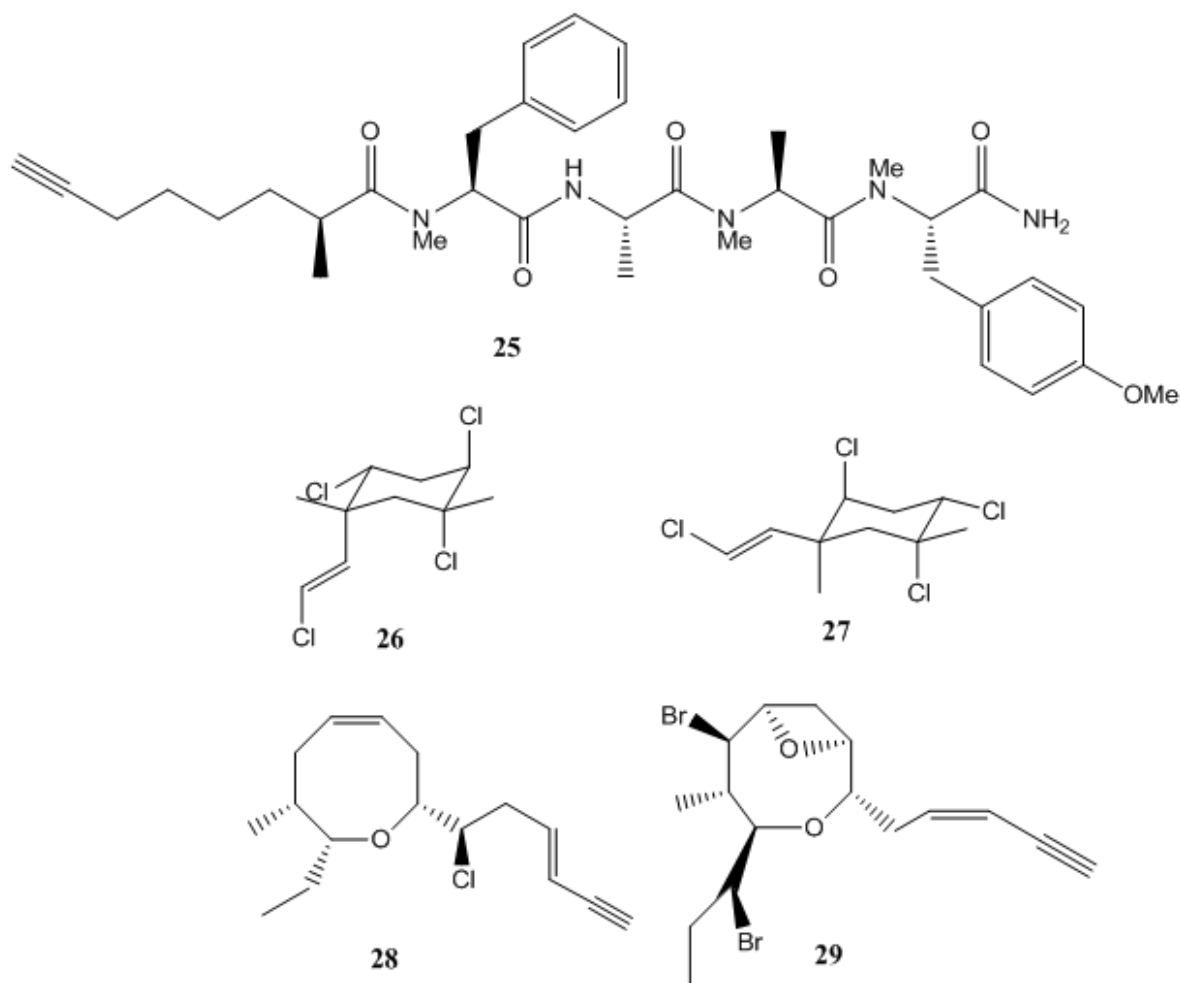


Slika 8. Strukturne formule sulfoalkilrezorcinola, bipinapterolida B i C2S-3 hibrida.

*Mycobacterium tuberculosis*.<sup>41</sup> Iz morske alge *Cryptonemia crenulata* izolovan je D,L-galaktanski hibrid C2S-3 **24**, koji je pokazao potentnu antivirusnu aktivnost prema tri klinička soja deng virusa serotipa 2 uz nisku citotoksičnost.<sup>42</sup>

## 2.2.2. Prirodni proizvodi morskog porekla koji pokazuju antiparazitsku i insekticidnu aktivnost

Dragomabin **25**, lipopeptid izolovan iz cijanobakterije *Lyngbya majuscula*, pokazao je umerenu antimalarijsku aktivnost, uz značajnu razliku u toksičnosti prema malarijskom parazitu i ćelijama sisara.<sup>43</sup> Iz crvene alge *Plocamium cartilagineum* izolovani su ciklični polihalogenovani



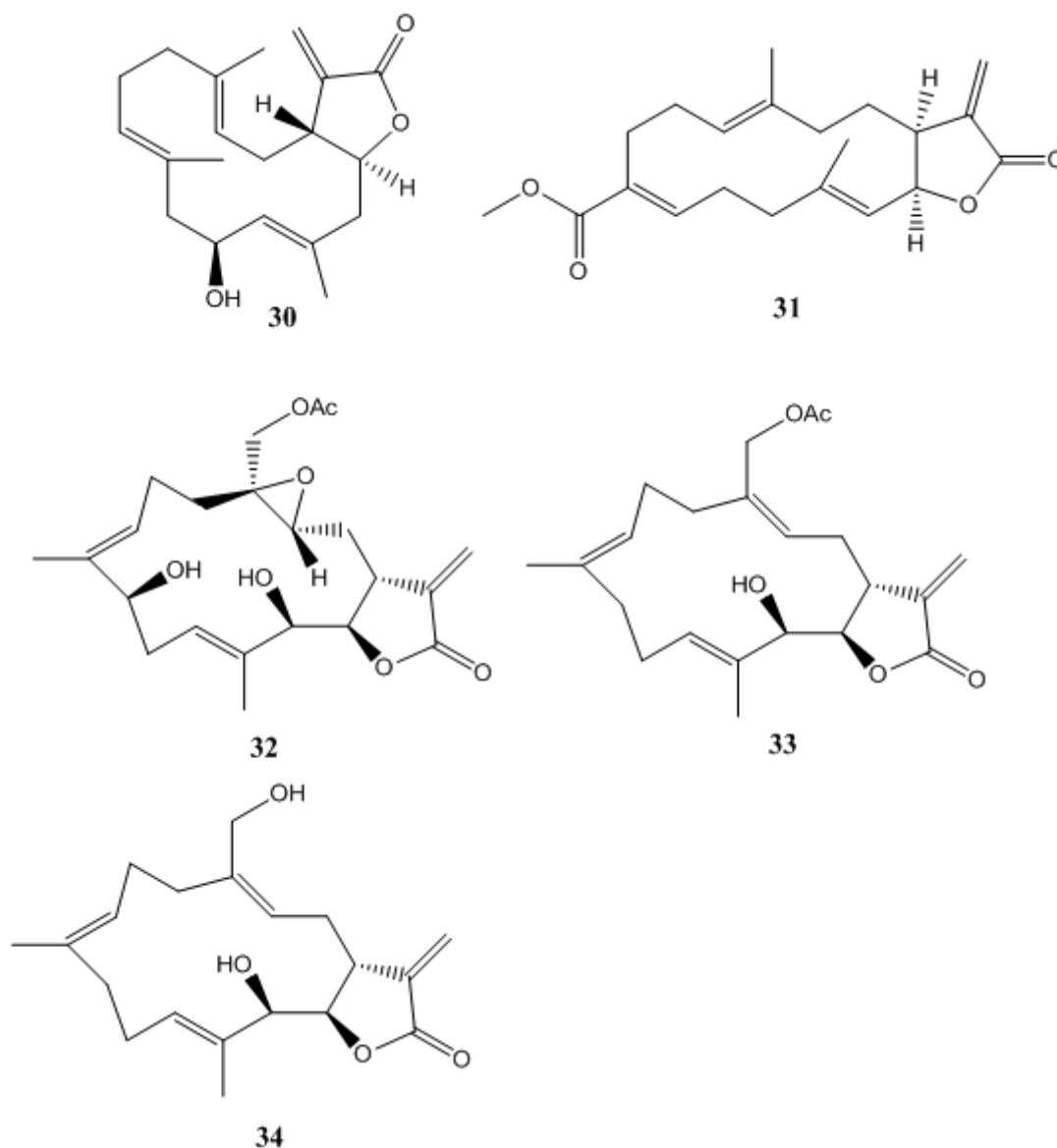
Slika 9. Strukturne formule prirodnih proizvoda morskog porekla koji pokazuju antiparazitsku i insekticidnu aktivnost.



monoterpeni **26** i **27** koji su pokazali insekticidnu aktivnost prema cikadi *Macrosteles fascifrons*. Insekticidnu aktivnost su pokazali i laurepinacin **28**, acetilenski ciklični etar iz crvene alge *Laurencia pinnata*, i (Z)-laureatin **29** iz crvene alge *Laurencia nipponica*, i jedan i drugi prema larvama komaraca *Culex pipiens*.<sup>44-46</sup>

### 2.2.3. Prirodni proizvodi morskog porekla koji pokazuju antiinflamatornu i analgetičku aktivnost

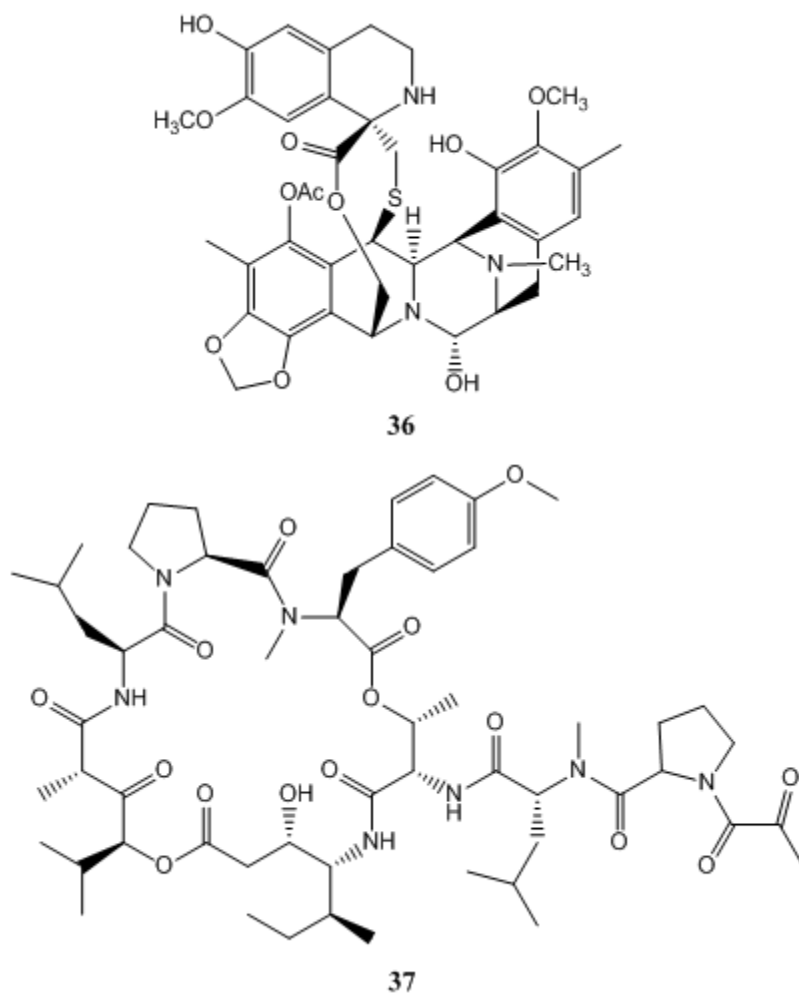
Iz koralu *Lobophytum crassum* izolovana su jedinjenja krasumolida A (**30**) i C (**31**), koji



Slika 10. Strukturne formule krasumolida A i C i durumolida A, B i C.



Ciklični depsipeptid plitidepsin **37** (Aplidin®) izolovan je iz mediteranskog plaštaša *Aplidium albicans* i koristi se u tretiranju različitih kancera, uključujući melanom, sitnoćelijski i nesitnoćelijski karcinom pluća, Nehočkinov limfom i akutnu leukemiju limfoblasta.<sup>52,53</sup> U ćelijama humanog kancera štitne žlezde blokira *in vitro* progresiju u G1 fazi ćelijskog ciklusa, uz značajno snižene nivoe ciklina D1, CDK4 i p21 proteina.<sup>54</sup>



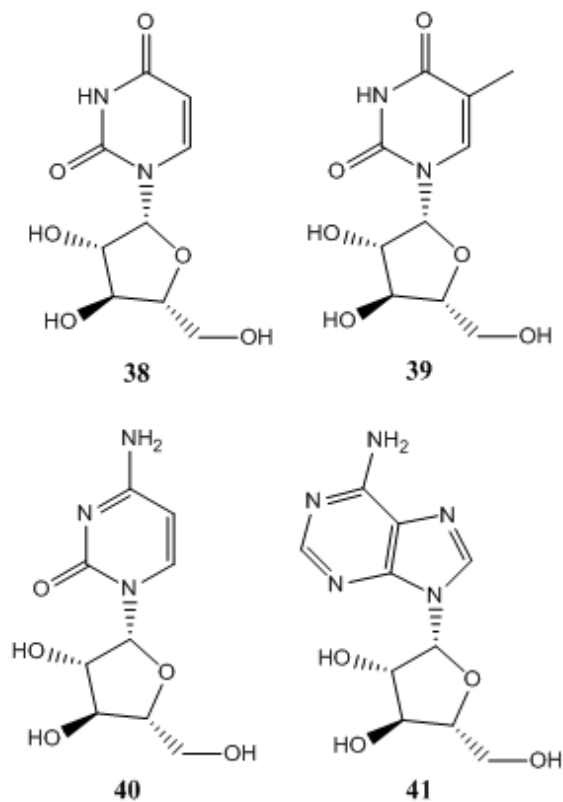
Slika 12. Strukturne formule trabektedina i plitidepsina.

### 2.2.5. Prirodni proizvodi morskog porekla ostalih tipova aktivnosti

Iz mišića južnokorejske školjke *Tegillarca granosa* izolovan je polipeptid nazvan TGAP koji je pokazao antikoagulacionu aktivnost.<sup>55</sup> Ovaj polipeptid ima molekulska masu 7,7 kDa i sekvencu HTHLQRAPHPNALGYHGK, i specifično inhibira faktor koagulacije Va, kao i molekulska interakciju između faktora IIa i Va.

### 2.3. Morski sunderi kao izvori prirodnih proizvoda od značaja za medicinu

Sunderi su sesilni organizmi i održavaju konstantan protok vode kroz svoja tela kako bi obezbedili hranu, kiseonik i uklonili otpad. Svi sunderi se hrane filtriranjem i ne poseduju fizičke načine odbrane od predatora. Stoga, nije iznenađujuće da su razvili širok opseg hemijskih jedinjenja za odbranu.<sup>56</sup> Samim tim, sunderi predstavljaju bogat izvor sekundarnih metabolita velike raznovrsnosti koji su otkriveni u poslednjih 50-ak godina.<sup>57,58</sup> Farmaceutski interes prema sunderima započeo je 50-ih godina prošlog veka ispitivanjem nukleozida spongouridina **38** i spongotimidina **39**, izolovanih iz sundera *Cryptotethya crypta*.<sup>59,60</sup>

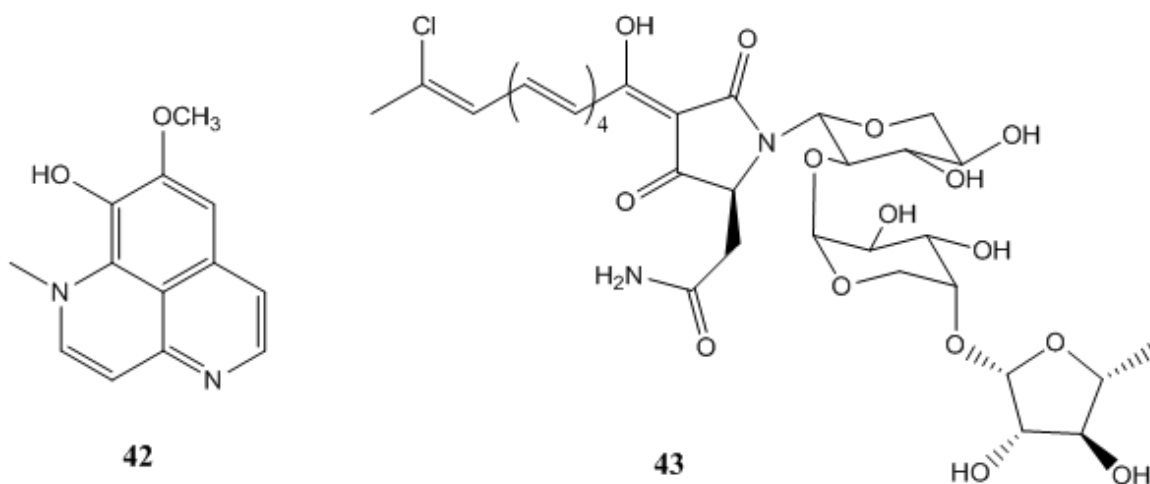


Slika 13. Strukturne formule spongouridina, spongotimidina, Ara-C i Ara-A.

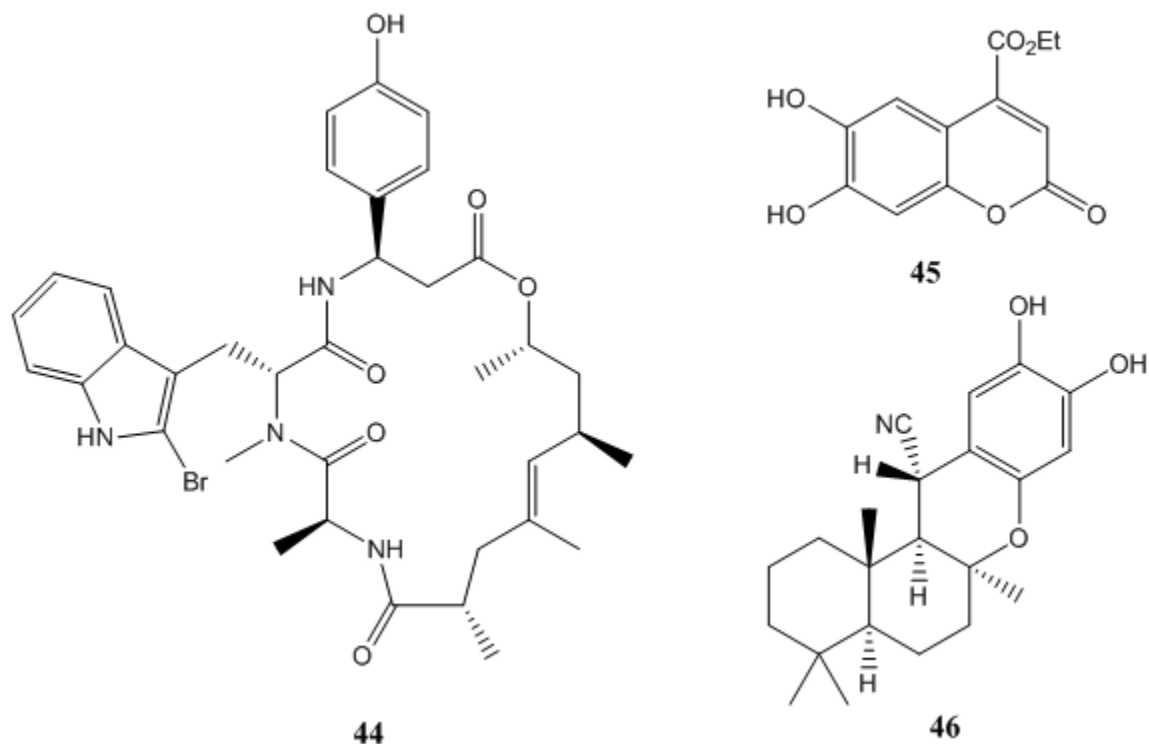
Ovi nukleozidi su bili osnova za razvoj citarabina **40** (Ara-C) i vidarabina **41** (Ara-A), prvih lekova morskog porekla odobrenih od strane američke Agencije za hranu i lekove (FDA). Citarabin se koristi u tretmanu limfoma i leukemije, a njegov fluorovani derivat je odobren za korišćenje u tretmanu tumora pluća, pankreasa, dojke i mokraćne bešike.<sup>61,62</sup> Vidarabin se koristi kao antivirusni agens, i aktivan je prema Herpes simpleks virusu.<sup>63</sup>

### 2.3.1. Prirodni proizvodi izolovani iz sunđera koji pokazuju antimikrobnu aktivnost

Iz sunđera *Aptos aptos* izolovan je alkaloid izoaaptamin **42**, koji inhibira sortazu A, enzim uključen u sortiranje proteina ćelijskog zida i virulenciju *S. aureus*, time dajući novo “vodeće jedinjenje” za potencijalni razvoj novih antibiotika.<sup>64</sup> Aurantozid K **43**, izolovan iz sunđera roda *Melophlus*,<sup>65</sup> pokazao je antifungalnu aktivnost širokog spektra dejstva, između ostalog prema sojevima *Candida albicans* (ATCC 32354 i amfotericin-rezistentnom ATCC 90873), *Cryptococcus neoformans*, *Aspergillus niger*, *Penicillium* sp., *Rhizopus sporangia* i *Sordaria* sp. Jaspamid **44** je 19-očlani ciklični depsipeptid izolovan iz sunđera *Jaspis splendens*, i pokazao je selektivnu antifungalnu aktivnost prema *C. albicans*.<sup>66</sup> Iz brazilskog morskog sunđera *Axinella* cf. *corrugata* izolovan je etil ester eskuletin-4 karboksilne kiseline **45**, koji inhibira 3CL proteazu SARS virusa.<sup>67</sup> Ova proteaza je uključena u oslobađanje replikacionih virusnih proteina. 15-Cijanopuupehenol **46** je izolovan iz sunđera reda Verongida. Pokazuje antivirusnu aktivnost prema Herpes simpleks II virusu.<sup>68</sup>



Slika 14. Strukturne formule izoaaptamina i aurantozida K.

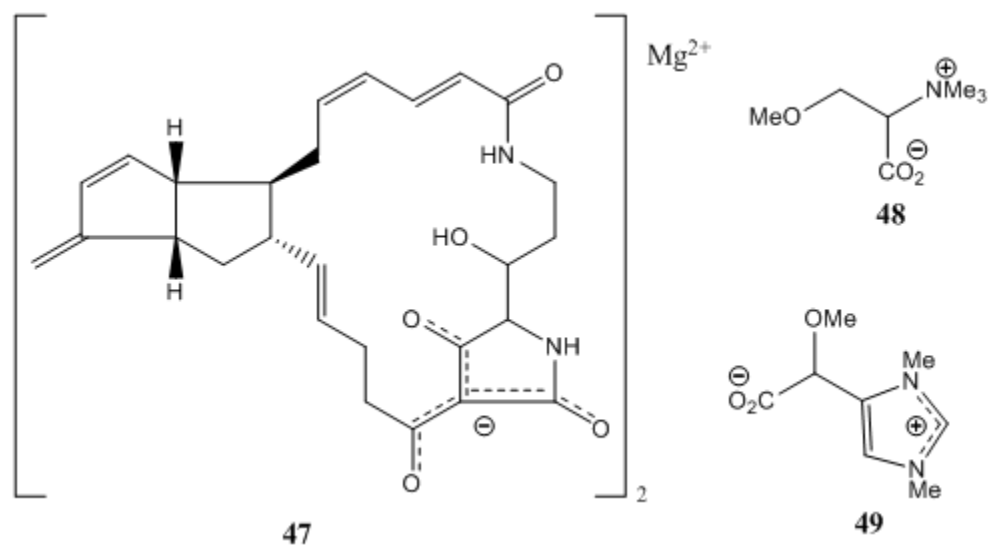


Slika 15. Strukturne formule jaspamida, etil estra eskuletin-4 karboksilne kiseline i 15-cijanopuuphenola.

### 2.3.2. Prirodni proizvodi izolovani iz sundera koji pokazuju antiparazitsku i insekticidnu aktivnost

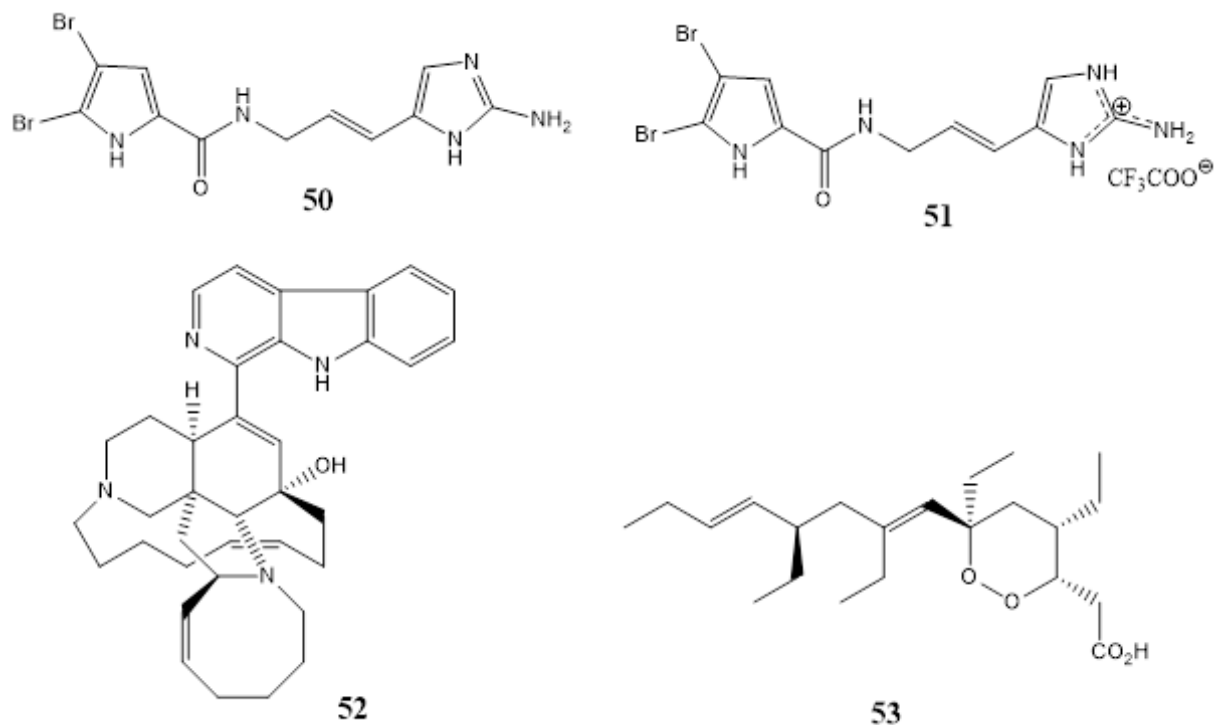
Magnezijuma so geodina A **47**, izolovana iz sundera roda *Geodia*, pokazala je izuzetnu nematocidnu aktivnost prema crvu *Haemonchus contortus*.<sup>69</sup> Dva betaina, (-)-ehinobetain A **48** i (+)-ehinobetain B **49**, izolovani iz sundera roda *Echinodictyum*, pokazali su takođe nematocidnu aktivnost prema ovom parazitu.<sup>70</sup>

(*E*)-oroidin **50** i njegov trifluoroacetat **51**, izolovani iz sundera *Agelas oroides*, pokazuju inhibiciju kulture K1 soja malarijskog parazita *Plasmodium falciparum*, uz inhibiciju enoil-ACP reduktaze, ključnog enzima sintezne kaskade masnih kiselina tipa II.<sup>71</sup> Manzamin A **52** je izolovan iz više različitih sundera, između ostalih iz sundera roda *Haliclona*.<sup>72</sup> Pokazao je snažnu



Slika 16. Strukturne formule geodina A ( $Mg^{2+}$  so), (-)-ehinobetaina A i (+)-ehinobetaina B.

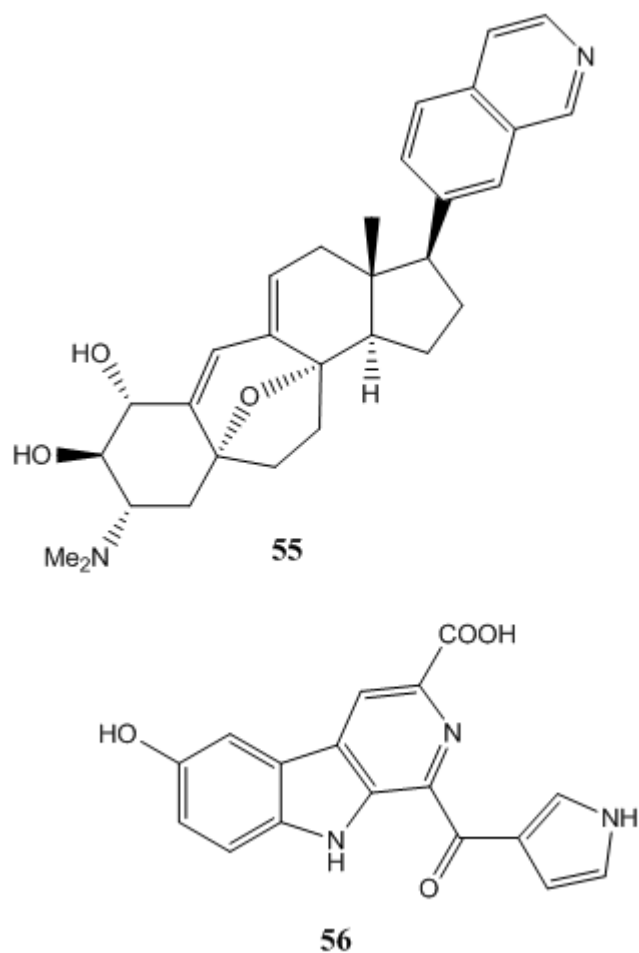
*in vitro* aktivnost prema *P. falciparum* (D6 klon). Prema istraživanjima dejstvo manzamina A podstiče poboljšanje imunog odgovora organizma.<sup>73</sup> Iz sundera *Plakortis angulospiculatus*



Slika 17. Strukturne formule (*E*)-oroidina, njegovog trifluoroacetata, manzamina A i plakortida P.

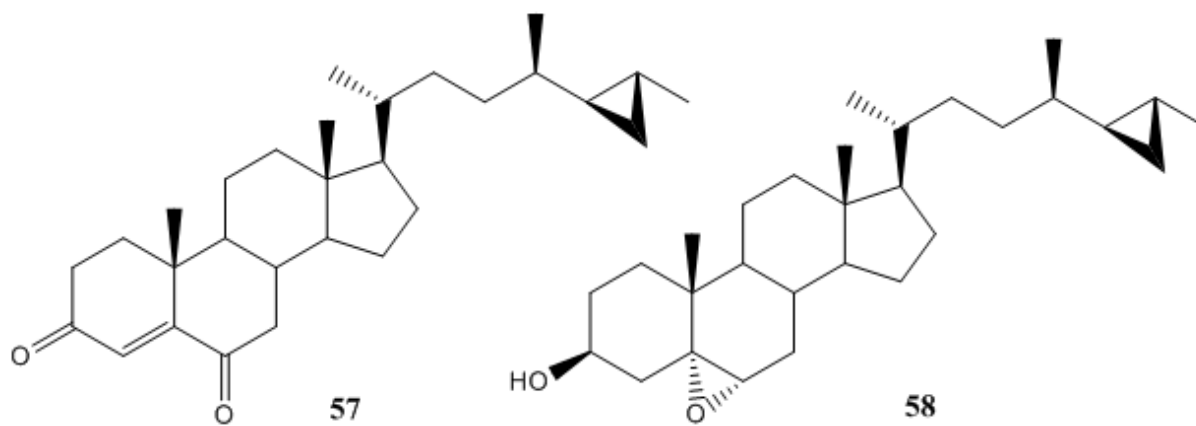




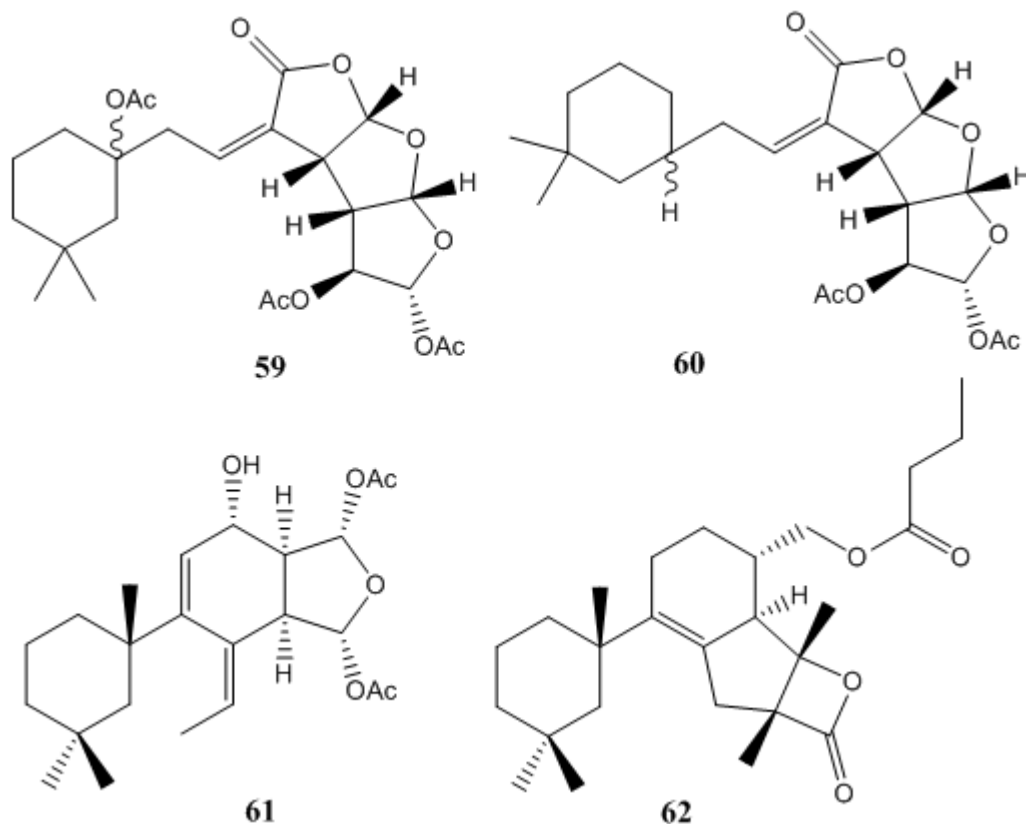


Slika 19. Strukturne formule kortistatina A i hirtiokarbolina.

(nesitnoćelijski tumor pluća), MDA-MB-435 (melanom) i U937 (limfom) .<sup>78</sup> Dva sterola **57** i **58** su izolovana iz sundera roda *Ianthella*. Testirani su na ćelijske linije tumora pluća (A549),



Slika 20. Strukturne formule petrosterol-3,6-diona i 5 $\alpha$ ,6 $\alpha$ -epoksi-petrosterola.

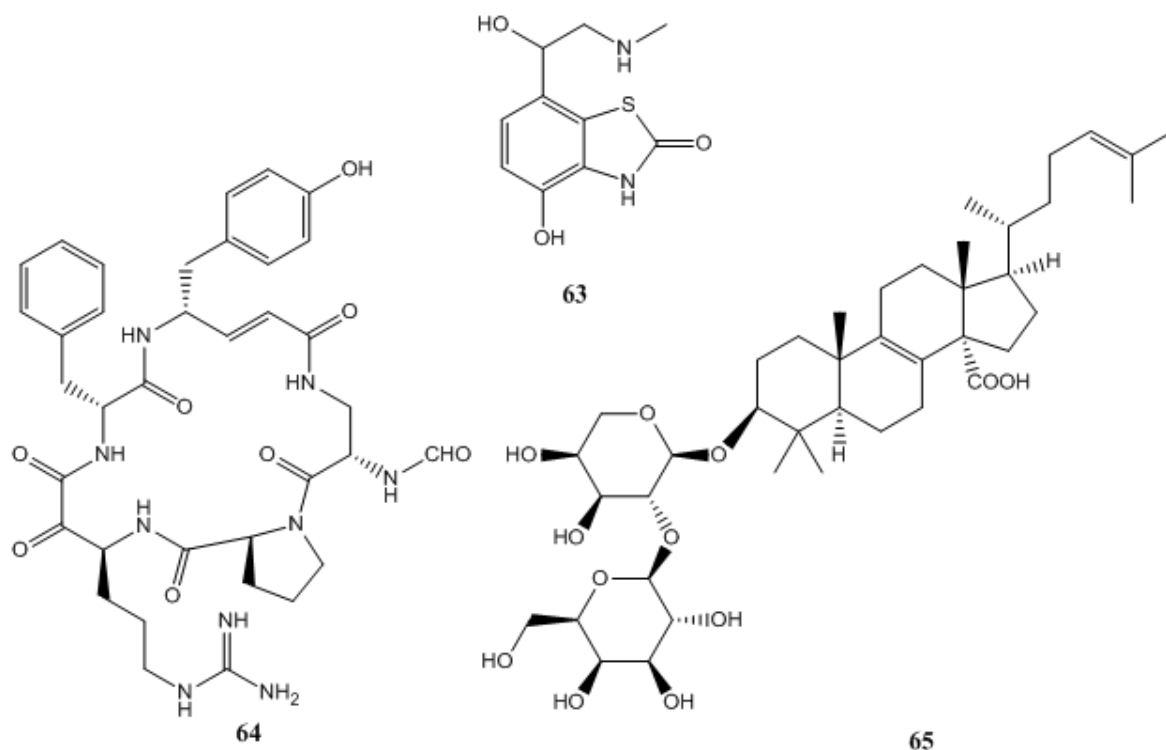


Slika 21. Strukturne formule gracilina J, K i L i 3'-norspongiolaktona.

debelog creva (HT-29), jajnika (SK-OV-3), dojke (MCF-7) i dva tipa leukemije (HL-60 i U937). Oba jedinjenja su neaktivna prema HT-29 ćelijama. Petrosterol-3,6-dion **57** inhibira HL-60, MCF-7, U937, SK-OV-3 i A549 ćelijske linije, kao i 5 $\alpha$ ,6 $\alpha$ -epoksi-petrosterol **58**. Dalja istraživanja su pokazala da dovode do indukcije apoptoze.<sup>79</sup> Terpenoidi gracilin J **59**, gracilin K **60**, gracilin L **61**, kao i diterpen 3'-norspongiolakton **62** izolovani su iz suđera roda *Spongionella*. Pokazali su citotoksičnu aktivnost prema K562 ćelijama hronične mijelogene leukemije. Gracilin L je pokazao najveću aktivnost prema receptoru epidermalnog faktora rasta (EGF-R), dok je gracilin K pokazao najnižu aktivnost.<sup>80</sup>

### 2.3.5. Prirodni proizvodi morskog porekla ostalih tipova aktivnosti

Jedinjenje S1319 **63**, izolovano iz suđera roda *Dysidea*,<sup>81</sup> ima izuzetno miorelaksantno dejstvo. Ovo jedinjenje je agonist  $\beta$ -adrenoreceptora. S1319 relaksira matericu, pa se može koristiti prilikom porođaja.<sup>82</sup> Pored toga, širi bronhije, pa se može koristiti kao antiastmatik.<sup>81</sup> Pa



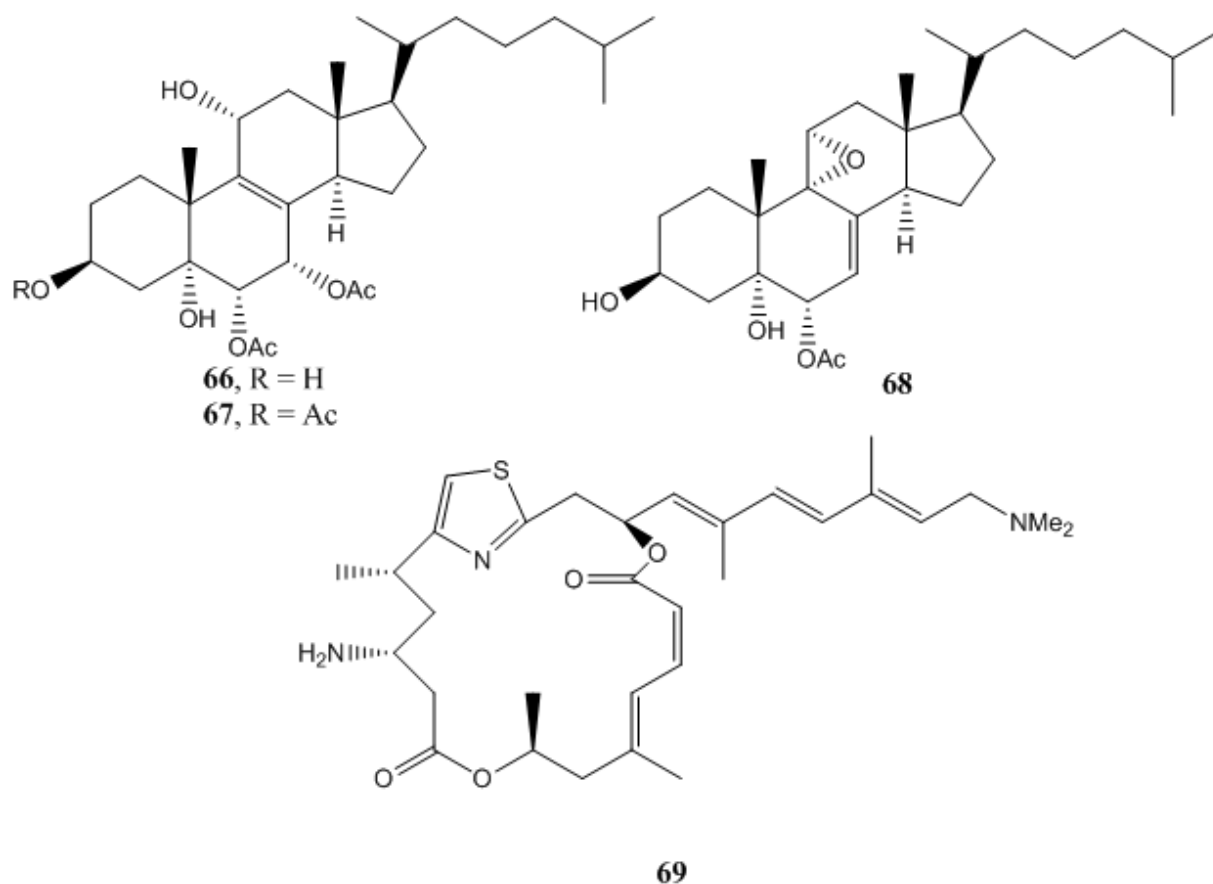
Slika 22. Strukturne formule S1319, cikloteonamida A i erilozida F.

ipak, postoje neki sporedni efekti usled aktivacije  $\beta$ -1 podtipa receptora, što dovodi do arterijske hipertenzije, tahikardije i koronarne bolesti srca.<sup>83</sup>

Cikloteonamid A **64**, izolovan iz suđera roda *Theonella*, inhibitor je serinske proteaze koja vrši konverziju fibrinogena u fibrin, i predstavlja lek izbora za tretman tromboze.<sup>84</sup>

Erilozid F **65**, izolovan iz suđera *Erylus formosus*, je potentan antagonist receptora za trombin.<sup>85</sup>

Polioksigenovani steroli **66–68** izolovani iz suđera roda *Dysidea* blokiraju vezivanje interleukina-8 (IL-8), citokina koji privlači neutrofile na mesto povrede, za odgovarajući receptor.<sup>86</sup> Time ova jedinjenja specifično inhibiraju primarni imuni odgovor. S druge strane, pateamin A **69**, izolovan iz suđera roda *Mycale*, predstavlja selektivan inhibitor proizvodnje interleukina-2 (IL-2), koji pomaže aktivaciju B i T ćelija, što vodi reakciji antigen–antitelo i iniciranju sekundarnog imunog odgovora.<sup>87</sup>



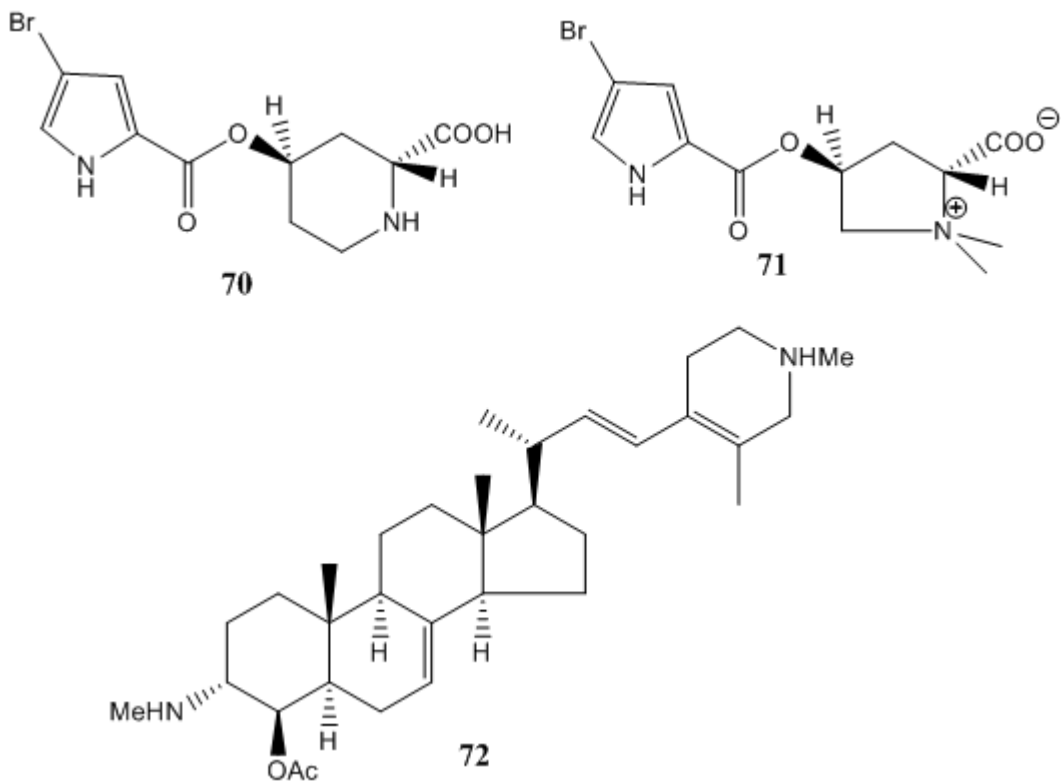
Slika 23. Strukturne formule sterola **66–68** i pateamina A.

Iz mediteranskog suđera *Axinella damicornis* izolovani su bromopirolski alkaloidi damipipekolin **70** i damituricin **71**, koji moduliraju aktivnost serotoninskih receptora *in vitro*. Iako je damipipekolin inhibirao unos  $\text{Ca}^{2+}$  u neurone, podtip serotoninskog receptora uključenog u mehanizam delovanja još uvek nije utvrđen.<sup>88</sup> Iz suđera roda *Corticium* izolovan je steroidni alkaloid 4-acetoksiplakinamin B **72**, koji je pokazao značajnu inhibiciju acetilholin-esteraze sa neobičnim mešovitim-nekompetitivnim načinom vezivanja.<sup>89</sup> Inhibitori acetilholin-esteraze mogu biti korisni u tretiranju Alchajmerove bolesti.

#### 2.4. Hinoni i hidrohinoni

Hinoni su klasa organskih jedinjenja sa širokim opsegom aktivnosti, koje uključuju herbicidnu,<sup>90</sup> antimalarijsku,<sup>91</sup> antivirusnu,<sup>92</sup> antipsorijatičku,<sup>93</sup> antileišmanijsku<sup>94</sup> i citotoksičnu aktivnost.<sup>95-97</sup>

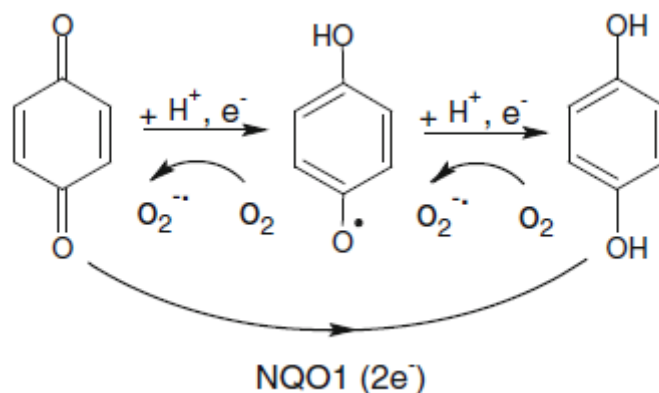
Biološka aktivnost hinona najčešće potiče od dvojakog načina delovanja. To je kombinacija



Slika 24. Strukturne formule damipipekolina, damituricina i 4-acetoksiplakinamina B.

1,4-Michael-ove adicije ćelijskih nukleofila na konjugovani enonski sistem i generisanja reaktivnih kiseoničnih vrsta (ROS) u cikličnim redoks reakcijama hinona i njihovih redoks partnera hidrohina preko semihinonskog anjona<sup>98</sup> (policiklični hinoni, poput onih iz klase antraciklina, pokazuju i treći način delovanja, a to je interkalacija u DNK heliks<sup>99</sup>). Jedinjenja koja sadrže hinonsko/hidrohinsko jezgro su široko rasprostranjena u prirodi i deo su važnih bioloških procesa, kao što su fotosinteza,<sup>100</sup> mitohondrijski elektron-transportni lanac<sup>101</sup> i zaštita organizma od oksidacionih sredstava.<sup>102</sup> Metabolički značajni hinoni poseduju terpenski bočni lanac (ubihinon, plastohinon, vitamin K) kojim se usađuju u lipidnu fazu membrane.<sup>103</sup> Hinoni i hidrohini marinskog porekla su od posebnog interesa, zbog raznovrsnosti struktura i aktivnosti, kao i velikih mogućnosti za modifikaciju.<sup>104-106</sup>

Mehanizam citotoksičnosti hinona uglavnom se pripisuje lakoći njihove redukcije, i samim tim sposobnosti da reaguju kao oksidaciona sredstva. U biološkim sistemima, hinoni podležu jedno- i dvoelektronskoj redukciji ćelijskim reduktazama, dajući odgovarajući semihinon, odnosno hidrohinon (slika 25).<sup>107</sup>

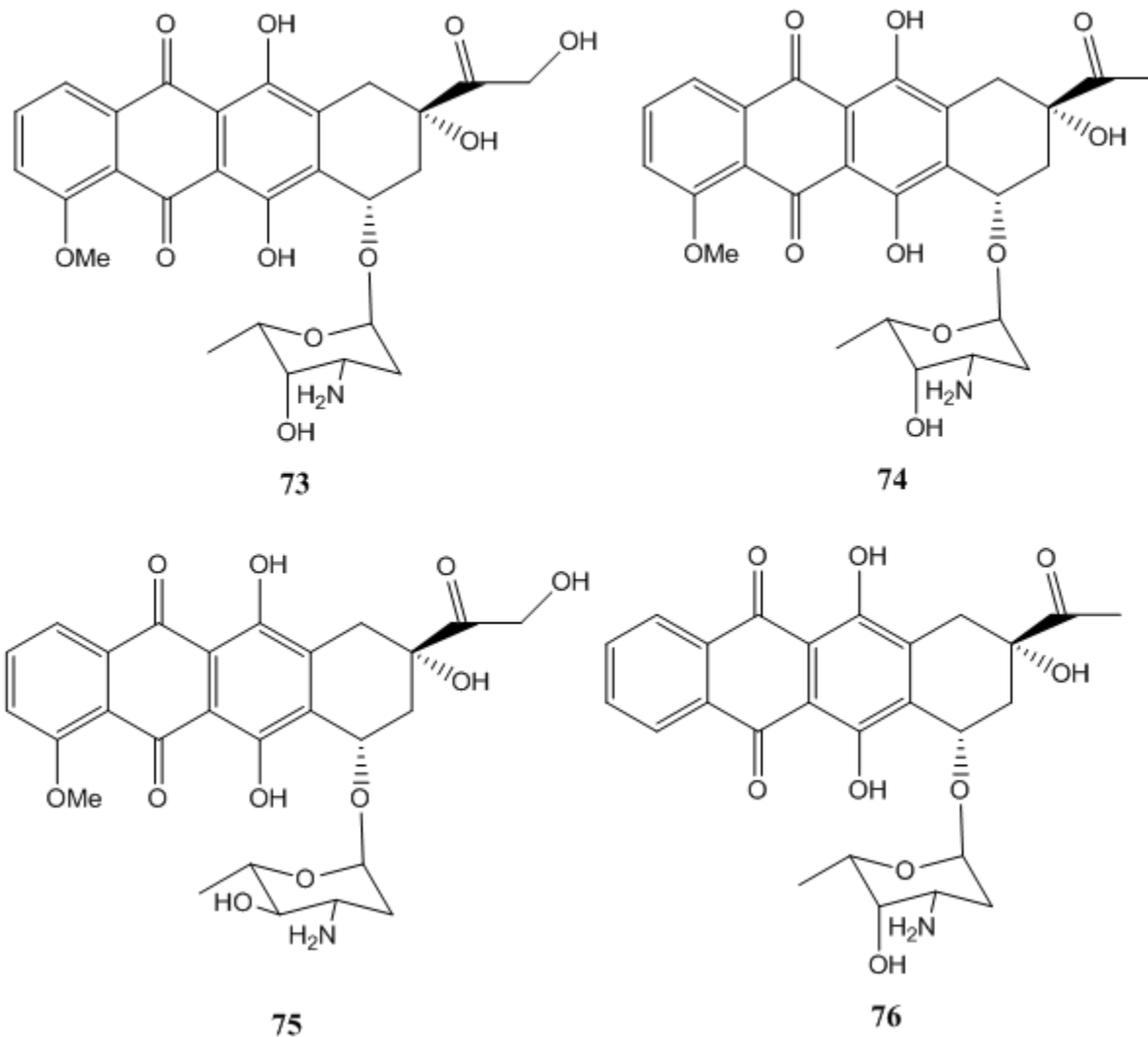


Slika 25. Jedno- i dvoelektronska redukcija hinona do semihinona ( $1e^-$ ), odnosno hidrohina ( $2e^-$ ), NQO1: NAD(P)H:hinon-oksidoireduktaza 1.

Brojna hinonska jedinjenja su u upotrebi u medicini. Posebno se izdvajaju hinoni sa antibiotskim i antitumorskim dejstvom.

#### 2.4.1. Hinonski lekovi iz klase antraciklina

Antraciklini su prvi put izolovani iz *Streptomyces* bakterija, i njihova antitumorska aktivnost je otkrivena još 60-ih godina prošlog veka.<sup>108</sup> Najpoznatiji lekovi iz ove klase, i prvi izolovani antraciklini su doksorubicin **73** i daunorubicin **74**. Tokom godina sintetisano je preko 2000 analoga doksorubicina i daunorubicina, kako bi se dobili bolji medikamenti, ali svega nekoliko derivata je odobreno za kliničku upotrebu, među njima i epirubicin **75** i idarubicin **76**. Glavni problem u primeni antraciklinskih lekova je kardiotoksičnost. Doksorubicin je jedan od najkorišćenijih antitumorskih agenasa i koristi se uglavnom u kombinaciji sa drugim lekovima. Jedan je od najefikasnijih lekova u tretmanu čvrstih tumora, poput tumora dojke, nesitnoćelijskog tumora pluća i tumora jajnika. Aktivan je i prema multiplom mijelomu, nekoliko tipova leukemije, sarkomu mekog tkiva, Hočkinovom i Nehočkinovom limfomu. Daunorubicin se koristi u tretmanu akutne leukemije limfoblasta i mijeloblasta. Idarubicin je analog daunorubicina i koristi se u tretmanu akutne mijelogene leukemije. Epirubicin je epimer doksorubicina. Ima nižu kardiotoksičnost od doksorubicina i koristi se u tretmanu raka dojke i želuca.<sup>109</sup>



Slika 26. Strukturne formule antraciklinskih citostatika.

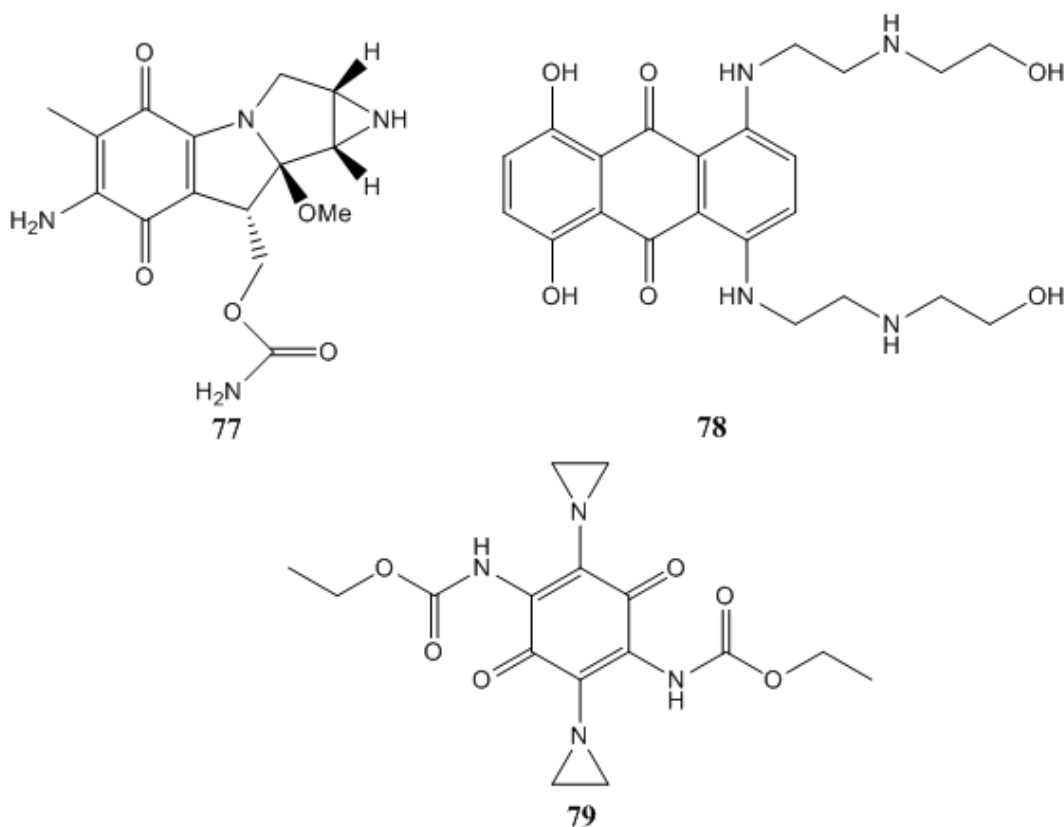
#### 2.4.2. Hinonski lekovi iz klase mitomicina

Mitomicin C **77** je antitumorski agens izolovan iz bakterije *Streptomyces caespitosus* još 1958. godine.<sup>110</sup> Decenijama je u kliničkoj upotrebi, i koristi se u tretmanu adenokarcinoma želuca i pankreasa. Pored toga aktivan je i prema metastazirajućem raku mokraćne bešike, zatim raku dojke, grlića materice i jednjaka. Koristi se ili sam ili u kombinaciji sa drugim lekovima.<sup>111</sup> S obzirom na to da se mehanizam delovanja zasniva na reduktivnoj aktivaciji, mitomicin je od izuzetne važnosti u tretmanu ćelija sa sniženim sadržajem kiseonika (hipoksični uslovi).

### 2.4.3. Hinonski lekovi iz klase antracendiona i aziridinilbenzohinona

Mitoksantron **78** je sintetičko antracendionsko jedinjenje koje se koristi u tretmanu multiple skleroze, s obzirom na to da je efikasan u usporavanju progresije bolesti delujući kao imunosupresant.<sup>112</sup> Pripada klasi antracendionskih jedinjenja i koristi se u tretmanu metastazirajućeg tumora dojke, zatim akutne mijelogene leukemije, Nehočkinovog limfoma i tumora jetre, pluća i jajnika.<sup>113</sup> Pokazano je da mitoksantron i njegovi analozi inhibiraju lipidnu peroksidaciju.<sup>114</sup>

Diazikvon **79** je aziridinilbenzohinon koji je pokazao širok opseg antitumorskog dejstva. Između ostalog koristi se u tretmanu tumora na mozgu, leukemije i raka jednjaka.<sup>115-117</sup> Pokazuje snažnu mijelosupresivnu aktivnost pa su česti ozbiljni slučajevi leukopenije, granulocitopenije i trombocitopenije.<sup>118</sup>

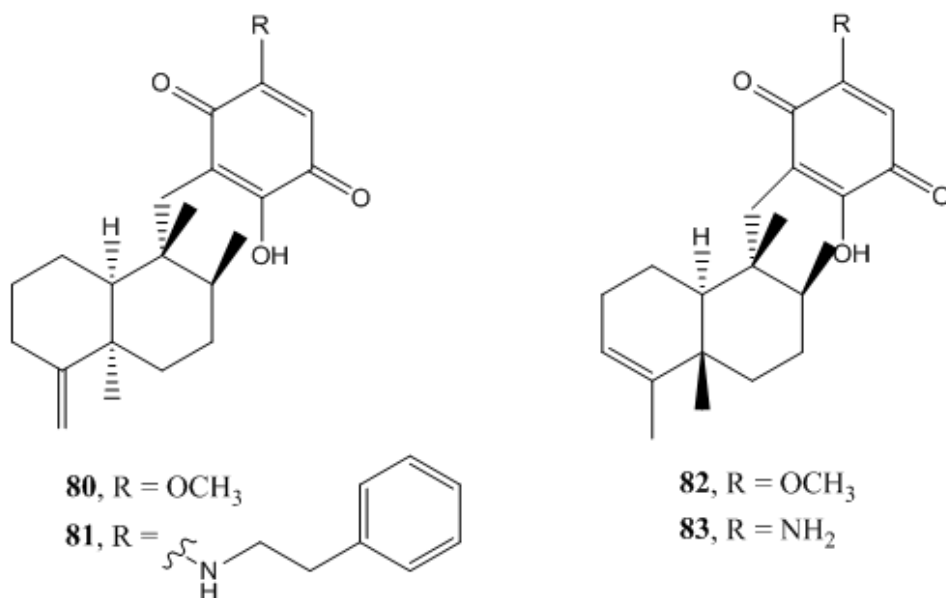


Slika 27. Strukturne formule mitomicina C, mitoksantrona i diazikvona.



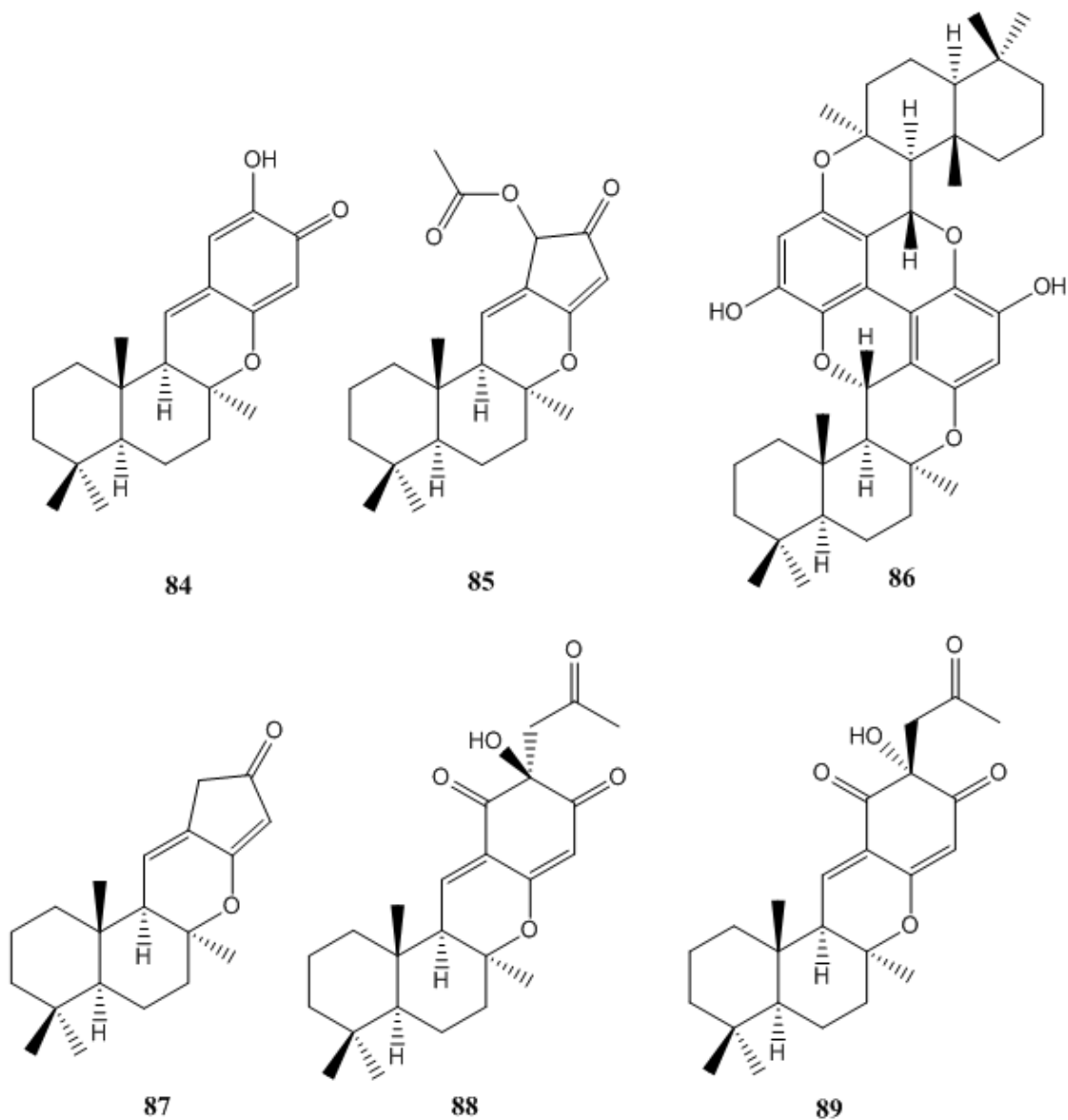
#### 2.4.4. Seskviterpenski hinoni i hidrohinoni morskog porekla

Seskviterpenski hinoni iz morskog izvora su se pokazali kao agensi širokog spektra dejstva, a pre svega kao antimikrobni i citotoksični agensi. Iz sundera *Dactylospongia elegans* izolovani su, pored ostalih jedinjenja, 5-*epi*-ilimahinon **80**, 5-*epi*-smenospongidin **81**, izospongijahinon **82** i izosmenospongina **83**. Pokazali su citotoksičnu aktivnost prema ćelijama mišjeg limfoma (L5178Y), kao i antimikrobnu aktivnost na više sojeva bakterija, i to *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923 i ATCC 700699), *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212 i ATCC 51299) i *E. faecium* (ATCC 35667 i ATCC 700221).<sup>119</sup>



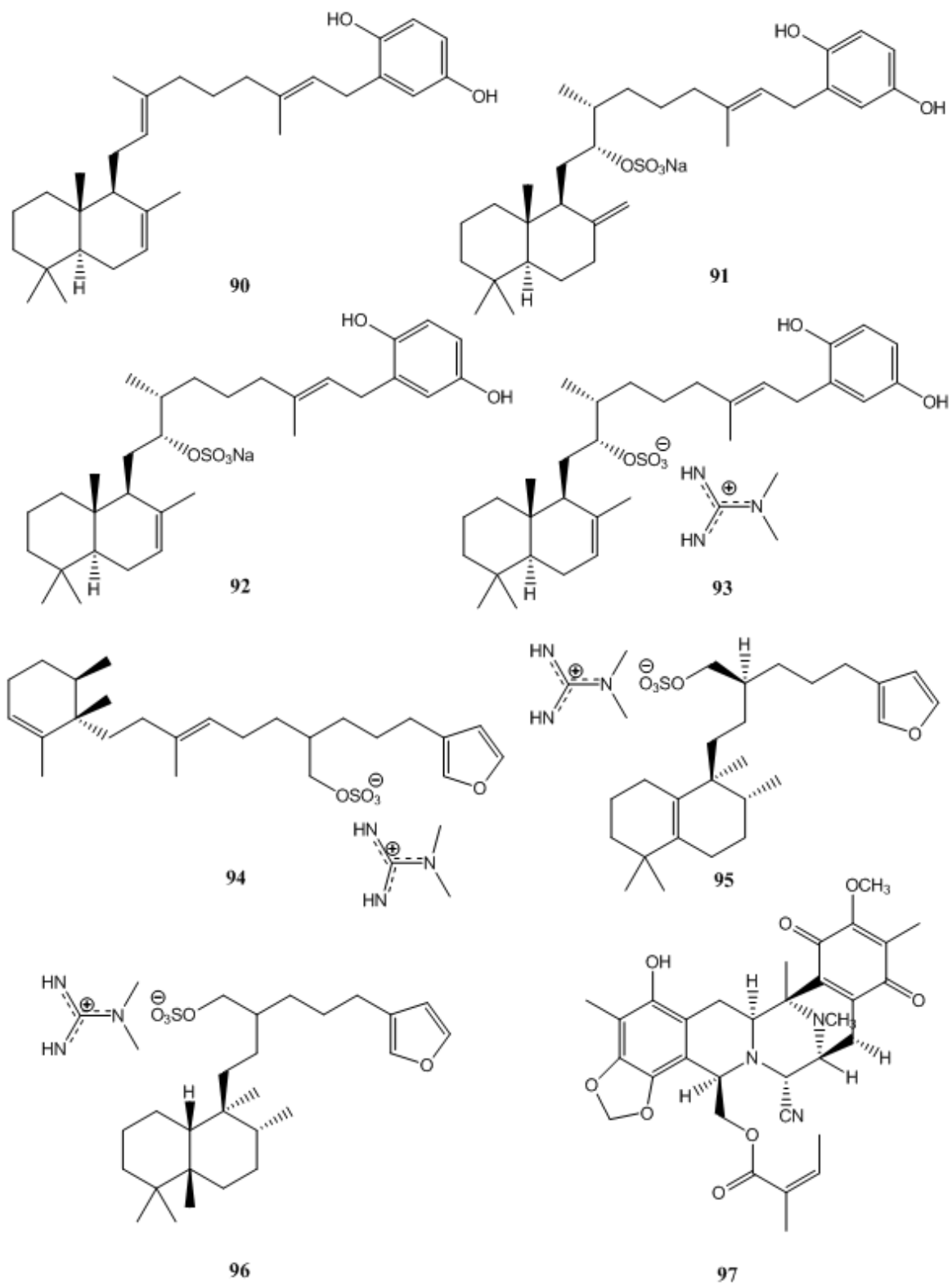
Slika 28. Strukturne formule 5-*epi*-ilimahinona, 5-*epi*-smenospongidina, izospongijahinona i izosmenospongina.

Puupehenon **84** je meroterpen izolovan iz više sundera reda Verongida i Dyctioceratida. Pokazao je citotoksičnu aktivnost prema mišjoj leukemiji (P388), tumoru pluća (A549), debelog creva (HCT-8) i dojke (MCF-7). Takođe je pokazao i antifungalnu aktivnost prema gljivici *Candida albicans*.<sup>120</sup>



Slika 29. Strukturne formule puupehenona i njegovih metabolita.

Iz sundera roda *Dysidea* izolovan je zajedno sa svojim metabolitima 20-acetoksihaterumadienonom **85**, bis-puupehenonom **86**, haterumadienonom **87** i acetonskim aduktima **88** i **89**, i svi su testirani na inhibitornu aktivnost prema NADH-oksidazi elektron-transportnog lanca. Puupehenon je pokazao najjaču aktivnost. Jedinjenja nisu inhibirala rast

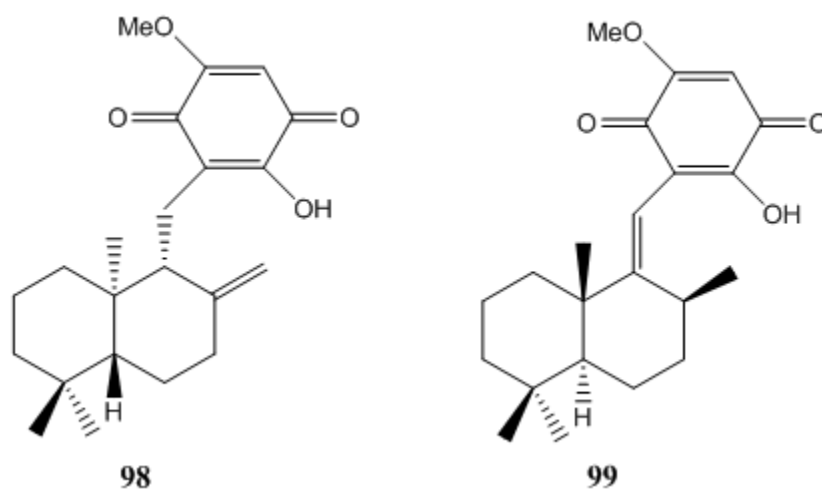


Slika 30. Strukturne formule sterola **90-96** i renieramicina T.

bakterije *Escherichia coli*. Prema gljivici *C. albicans* i bakteriji *S. aureus* puupehenon je pokazao umerenu aktivnost, dok su od svih testiranih jedinjenja acetonski adukti **88** i **89** bili najaktivniji.<sup>121</sup>

Iz sunđera roda *Dysidea* izolovano je sedam sesterterpena **90–96** koji su pokazali antibakterijsku aktivnost prema *B. subtilis* inhibicijom aktivnosti izocitrat-lijaze, ključnog enzima u glioksilatnom ciklusu koji je prisutan u većini prokariota, nižim eukariotama i biljkama, ali ne i u vertebratama.<sup>122</sup> Bistetrahidroizohinolinski derivat renijeramicin T **97** izolovan je iz sunđera roda *Xestospongia*. Pokazao je jaku citotoksičnu aktivnost prema više ćelijskih linija humanih tumora (HCT116, QG56, AsPC1 i T47D).<sup>123</sup>

Hijatelahinon **98** i spongijahinon **99** su izolovani zajedno iz sunđera roda *Spongia*, i testirani na aktivnost prema ćelijama mišjih fibroblasta (L-929), humane leukemije (K-562) i raka grlića materice (HeLa), pri čemu je hijatelahinon pokazao veću citotoksičnu aktivnost. Spongijahinon pokazuje veću citotoksičnu aktivnost prema ćelijskim linijama raka želuca (HMO2) i raka jetre (HepG2) od hijatelahinona, dok hijatelahinon pokazuje za nijansu višu aktivnost prema raku dojke (MCF-7). Oba jedinjenja su pokazala dobru inhibiciju 3 $\alpha$ -hidroksisteroid-dehidrogenaze (3 $\alpha$ -HSD), jednog od ključnih enzima inflamatorne kaskade, kao i inhibiciju oslobađanja reaktivnih kiseoničnih vrsta (ROS) sa granulocita.<sup>124</sup>

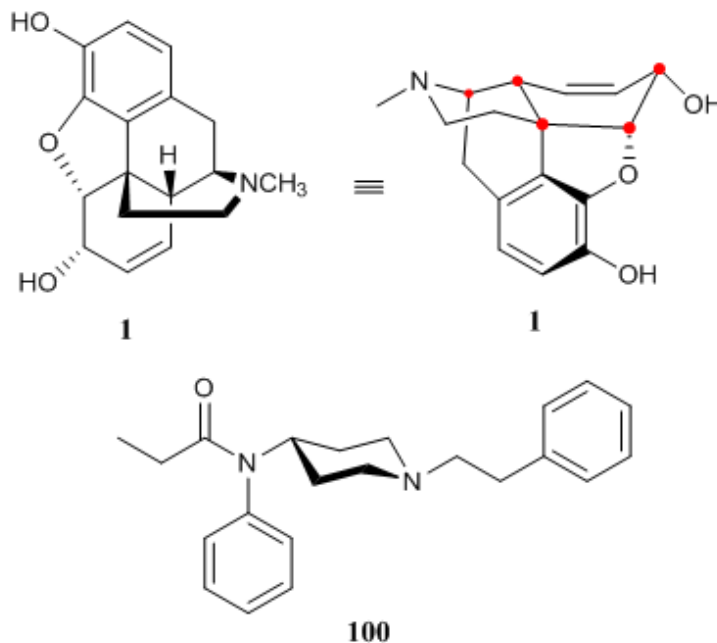


Slika 31. Strukturne formule hijatelahinona i spongijahinona.

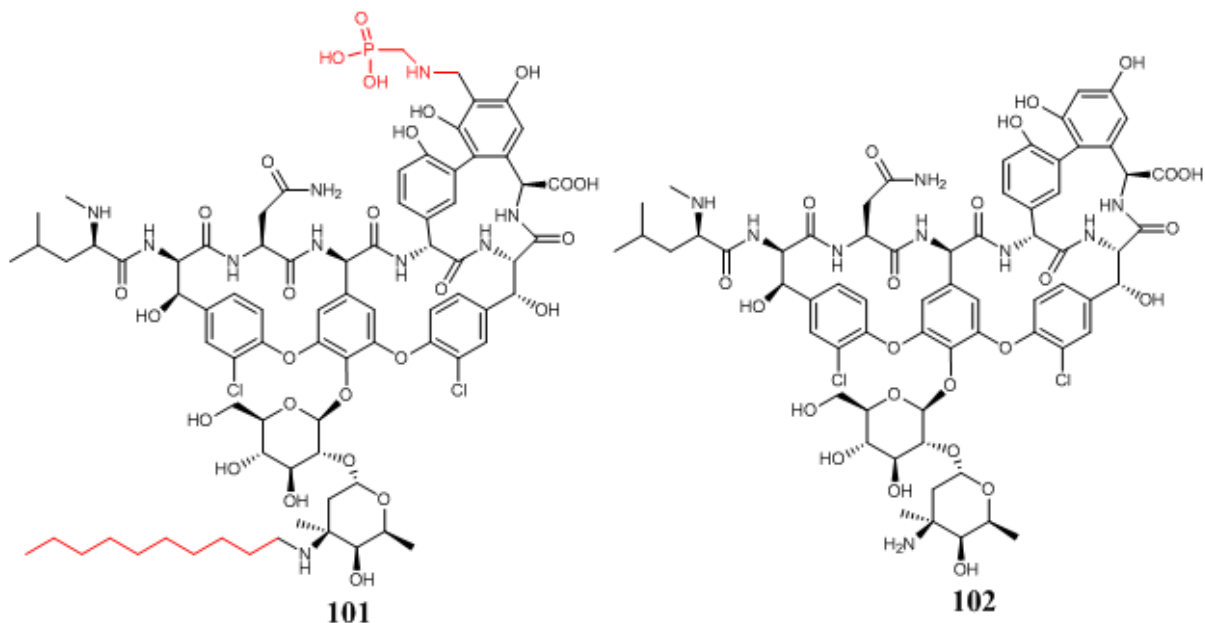
## 2.5. Principi modifikacije prirodnih proizvoda

Kako je cilj biosinteze sekundarnih metabolita, pre svega, odbrana organizama od predatora i preživljavanje/opstanak u prirodnom okruženju, izolovani prirodni proizvod je često potrebno hemijski modifikovati kako bi se poboljšale osobine poput aktivnosti i rastvorljivosti i smanjili ili potpuno ukinuli neželjeni sporedni efekti.

Često kompleksna struktura i postojanje hiralnih centara i više različitih funkcionalnih grupa omogućavaju potrebnu/pravilnu orijentaciju farmakofornih grupa za vezivanje molekula za metu, najčešće enzim ili receptor. Kako mnogi atomi u prirodnim proizvodima ne učestvuju direktno u ovim interakcijama, obično se smatraju „viškom“, pa se u procesu razvoja leka teži njihovom uklanjanju, kako bi se dobio jednostavniji analog. To se pogotovo odnosi na hiralne centre, jer se njihovom eliminacijom znatno olakšava i pojeftinjuje sinteza leka. Tako je sintetički analog morfina **1**, fentanil **100**, mnogo jednostavniji nehiralni molekul.<sup>125</sup>



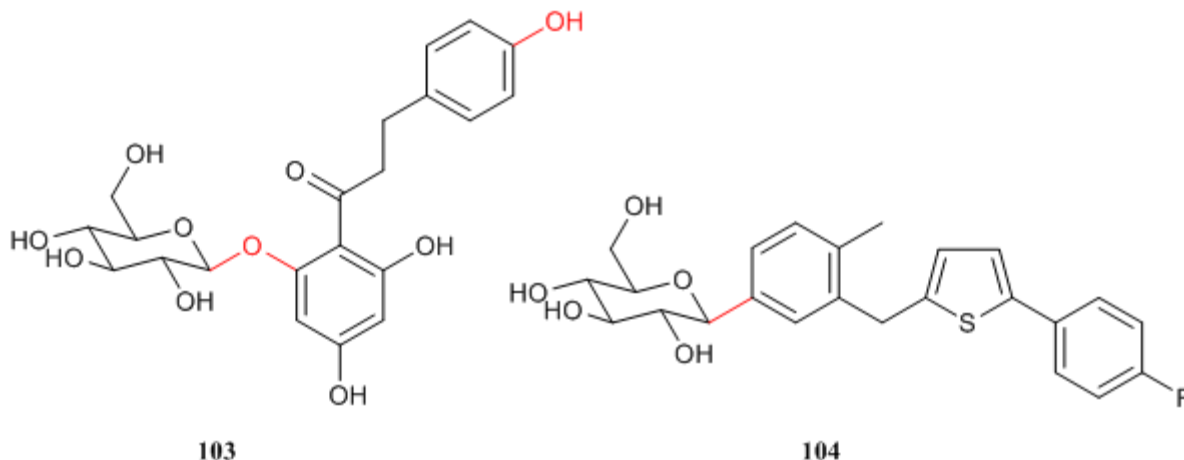
Slika 32. Pojednostavljanjem strukture morfina eliminacijom hiralnih centara (obeleženi crvenim kružićima) dobija se fentanil.



Slika 33. Strukture telavancina i vankomicina

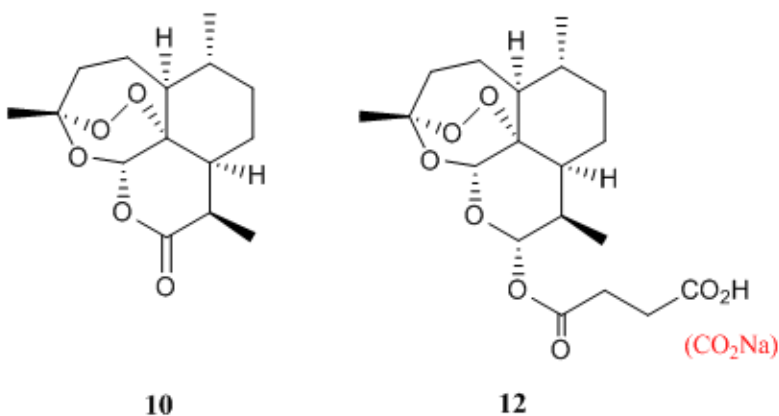
Pored pojednostavljivanja strukture i uklanjanja hiralnih centara, vodeće jedinjenje se može modifikovati kako bi se poboljšali aktivnost i/ili selektivnost. Tako na primer, telavancin **101** je sintetisan kao analog vankomicina **102**, antibiotika koji se koristi u tretmanu komplikovanih infekcija kože i krvotoka. Telavancin se vezuje za isti D-alanil-D-alanil ostatak rastućeg peptidoglikanskog lanca kao i vankomicin, ali dodavanjem alifatičnog lanca u aminošećerni deo molekula omogućeno je jače vezivanje za lipofilnu bakterijsku membranu i povećana stabilizacija molekula u neposrednoj blizini mete. Pored toga, polarni fragment aminofosfonske kiseline poboljšava balans između hidrofilnosti i lipofilnosti.<sup>126</sup>

Sintetičkom modifikacijom osnovnog jedinjenja može se poboljšati i metabolička stabilnost molekula. Prirodni proizvod *O*-glukozid florizin **103** je snažan glukozurni agens, koji inhibicijom glukoznih transportera u bubrezima smanjuje koncentraciju glukoze u krvi. Međutim njegova metabolička stabilnost je slaba, pa je serijom modifikacija dobijen kanagliflozin **104** koji je 2013. godine odobren od strane FDA za tretman dijabetesa tipa II. Uklanjanjem fenolne OH grupe na florizinu smanjena je interakcija sa enzimima faze II metabolizma, a promenom *O*-glikozidne veze u *C*-glikozidnu povećana je rezistencija prema β-glukozidazama.<sup>127</sup>

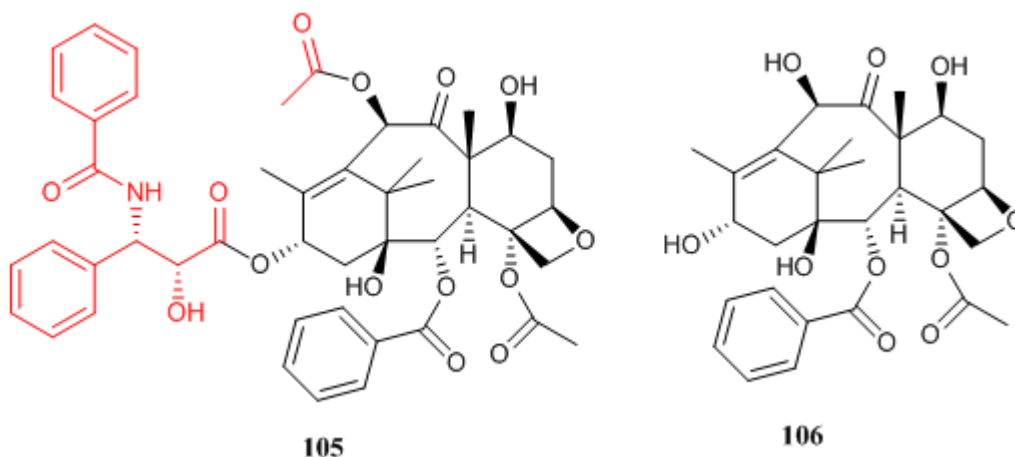


Slika 34. Strukturne formule florizina i kanagliflozina.

Ranije pomenuti artemizinin **10**, novi antimalarijski lek, ima slabu rastvorljivost u vodi. Da bi se poboljšala rastvorljivost u vodi sintetisani su monoestri dikiselina. Jedno od ovih jedinjenja, artesunat **12** (monoestar sukcininske kiseline) poseduje odličnu antimalarijsku aktivnost i njegova so sa natrijumom je rastvorljiva u vodi i pogodna za farmaceutske formulacije.<sup>128</sup> Mnogi prirodni proizvodi imaju strukturu previše složenu da bi bila moguća proizvodnja na industrijskoj skali. Takva jedinjenja se mogu dobiti samo iz prirodnih izvora. Međutim, takav proces može uništiti izvor, poput izolovanja taksola **105** iz kore tise, što dovodi do sušenja drveta. Ovaj problem se može zaobići semisintezom iz drugog prirodnog proizvoda, poput dobijanja taksola iz 10-deacetilbakatina III **106**, koji se izoluje iz iglica a ne kore tise, pa se čuva drvo. Pored toga, 10-deacetilbakatin III se izoluje u većem prinosu od samog taksola.<sup>129</sup>



Slika 35. Strukturne formule artemizinina i artesunata.



Slika 36. Strukturne formule taksola i 10-deacetilbakatina III.

## 2.6. Reaktivne kiseonične vrste, njihova uloga u mitohondrijama i indukcija apoptoze i nekroze

Endogene reaktivne kiseonične vrste (ROS) potiču od metaboličkih reakcija u mitohondrijama. ROS uključuju hidroksilni radikal, vodonik-peroksid, superoksidni anjon, singletni kiseonik i ozon. Nakon što se ROS iskoriste za unutarćelijske procese, eliminišu se iz ćelije. Tumorske ćelije adaptirane su na povišen sadržaj ROS-a u odnosu na normalne ćelije zbog bržeg metabolizma i proliferacije.<sup>130</sup> Elektroni iz transportnog lanca u mitohondrijama mogu da “iscure” i reaguju sa kiseonikom dajući superoksidni anjon, prekursor za ROS. ROS mogu oksidovati molekule poput kardiolipina (koji drži vezanim citohrom *c*) čime se olakšava oslobađanje citohroma *c* i inicijacija apoptoze. Agensi koji ometaju funkciju mitohondrija dovode do povećanog generisanja ROS-a i aktivaciju kaspazne kaskade i apoptoze. Gubitak membranskog potencijala mitohondrija takođe doprinosi inicijaciji apoptoze.<sup>131</sup> Kada prooksidativni agensi povećaju ćelijski sadržaj ROS-a, oni mogu dovesti do selektivnog ubijanja tumorskih ćelija, što ih čini terapijski korisnim. Mnogi prirodni proizvodi pokazuju ovakvu prooksidativnu aktivnost, poput već pomenutih artemizina **10**, doksorubicina **73**, taksola **105** i ursolinske kiseline **17**.<sup>132</sup>

Apoptoza i nekroza su dva glavna oblika ćelijske smrti. Apoptoza se smatra programiranim procesom, sa minimalnom količinom ATP-a koja je potrebna za sklapanje apoptozomskog kompleksa i aktiviranje kaspaza, dok se za nekrozu obično kaže da predstavlja



potpuni raspad ćelijskog metabolizma.<sup>133</sup> Najupečatljivije karakteristike apoptoze su skupljanje ćelije, fragmentacija DNK, kondenzacija hromatina, formiranje apoptotskih tela, narušavanje redoks procesa na mitohondrijama i smanjenje proizvodnje ATP-a. Integritet membrane je očuvan, pa nema ispuštanja sadržaja ćelije u okolno tkivo. Takođe makrofazi fagocitozom brzo apsorbuju apoptotska tela i susedne ćelije ne proizvode antiinflamatorne citokine, tj. prilikom procesa apoptoze ne dolazi do inflamatornih reakcija.<sup>134</sup> S druge strane, jedna od glavnih karakteristika nekroze je gubitak integriteta membrane i ispuštanje sadržaja ćelije u okolno tkivo, što vodi inflamaciji.<sup>135</sup> Inflamacija, sa svoje strane, može oštetiti ćelije i čak inicirati kancerogenezu.<sup>136</sup> Paradoksalno, isti stimulus može indukovati apoptozu ili nekrozu u zavisnosti od stanja ćelije. Tip ili stepen stimulusa može odrediti da li će biti indukovana apoptoza ili nekroza. U niskim dozama toplota, radijacija, hipoksija ili citotoksični lekovi indukuju apoptozu, dok pri većim dozama dovode do pojave nekroze.<sup>134</sup>

Povećani sadržaj ROS-a, usled različitih spoljašnjih ili unutrašnjih faktora, može dovesti do letalnih oštećenja u ćeliji, pre svega na proteinima i DNK, ukoliko ćelije ne poseduju odgovarajuće antioksidativne sisteme. Međutim, pojedine mutacije DNK koje se javljaju usled delovanja ROS-a stvaraju genomsku nestabilnost i dovode do nastajanja različitih fenotipova sposobnih da se prilagode nepovoljnim uslovima.

Grupa enzima, koja uključuje katalazu, SOD i glutacion-peroksidazu, odgovorna je za prevođenje slobodnih radikala u manje štetne vrste. Pored toga molekuli poput glutaciona i tioredoksina takođe učestvuju u održavanju redoks homeostaze. U uslovima oksidativnog stresa, npr. primenom oksidativnog hemioterapeutika, može doći do aktiviranja transkripcionih faktora, kao što su Nrf2, NF-κB, c-Jun i HIF-a što za posledicu ima povećanu ekspresiju ovih antioksidativnih sistema.<sup>137,138</sup> Pored toga, neki od ovih transkripcionih faktora utiču na ekspresiju proteina koji olakšavaju ćelijsko preživljavanje (PI3K-Akt signalni put, Bcl-2 familija proteinskih regulatora apoptoze, kaspaze), angiogenezu i metastaziranje. Povišen nivo glutaciona olakšava inaktiviranje i izbacivanje elektrofilnih antitumorskih agenasa, čime takve ćelije postaju rezistentne na lekove.<sup>139</sup>

### 3. Naši radovi

Za ispitivanje i razvoj novih lekova i strategija za borbu protiv kancera ulažu se veliki naponi i sredstva. Cilj je dobijanje novih lekova koji su efikasniji i selektivniji prema tumorskim ćelijama u odnosu na postojeće hemioterapeutike. Idejno, sa razvojem lekova može se krenuti od osnovnih, tzv. privilegovanih struktura pa se dobijanje novih hemijskih entiteta ostvaruje divergentnim sintezama ili se kao osnovna jedinjenja koriste prirodni proizvodi čije se poznate aktivnosti unapređuju sintetičkim modifikacijama (semisintetički put). Prirodni proizvodi su intenzivno ispitivani i mnogi među njima su pokazali znatnu antitumorsku aktivnost. Kompleksnost i raznovrsnost struktura koje se javljaju u prirodnim proizvodima daju potencijal za potpuno nove mehanizme delovanja na različite vrste tumora, i pružaju mogućnost za razvoj novih lekova i strategija za tretman ove bolesti. Morski organizmi, pogotovo, poseduju veliki potencijal za otkriće novih struktura iz više razloga. Raznovrsnost morskih organizama je veća od raznovrsnosti suvozemnih. Posebno su interesantni sesilni organizmi, koji se u velikoj meri oslanjaju na hemijsku zaštitu protiv predatora i obrastanja u visoko kompetitivnoj sredini. Najzad, sistematsko ispitivanje morskih organizama je otpočelo više od jednog veka kasnije od ispitivanja suvozemnih organizama.

Prethodna istraživanja su pokazala da uvođenje elektron-donorskih metoksi, alkiltio i alkilamino supstituenata na hinonsko jezgro kod avarona, metabolita morskog sunđera *Dysidea avara*, dovodi do poboljšanja citotoksične aktivnosti u odnosu na polazni hinon, pri čemu su alkilamino derivati (metilamino, konkretno) pokazali najbolju selektivnost. Međutim, broj do sada sintetisanih alkilamino derivata je bio mali. Kao jedan od ciljeva ove disertacije definisano je dobijanje serije alkilamino i aralkilamino derivata avarona. Izbor grupa koje su uvedene je izvršen tako da uključuje kraće i duže lance, račvaste strukture, nezasićene i aromatične grupe i heterociklične sisteme. Kako je jedan od ograničavajućih faktora korišćenja prirodnih proizvoda kao polaznih jedinjenja, pa tako i avarona, njihova dostupnost, deo disertacije je posvećen dobijanju alkilamino i aralkilamino derivata jednostavnijeg hinona, *terc*-butil-1,4-benzohinona, kao mimetika avarona. *terc*-Butil grupa je izabrana kao osnovni supstituent, jer je hidrofobna, ali sa manje ugljenikovih atoma od seskviterpenskog skeleta avarona, kako bi se mogle izvesti modifikacije sa supstituentima koji daju derivate različitih hidrofobnosti, zatim zbog sličnih elektron-donorskih svojstava kao seskviterpenski ostatak avarona i zbog svoje voluminoznosti. Voluminoznost *terc*-butil grupe može doprineti stabilizaciji očekivanih semihinonskih radikala. Pored toga, *terc*-butil

grupa je ahiralna, čime se smanjuje problem prečišćavanja i određivanja strukture derivata sa supstituentima koji sadrže hiralne centre. Najzad, *terc*-butil-1,4-benzohinon je komercijalno dostupno jedinjenje.

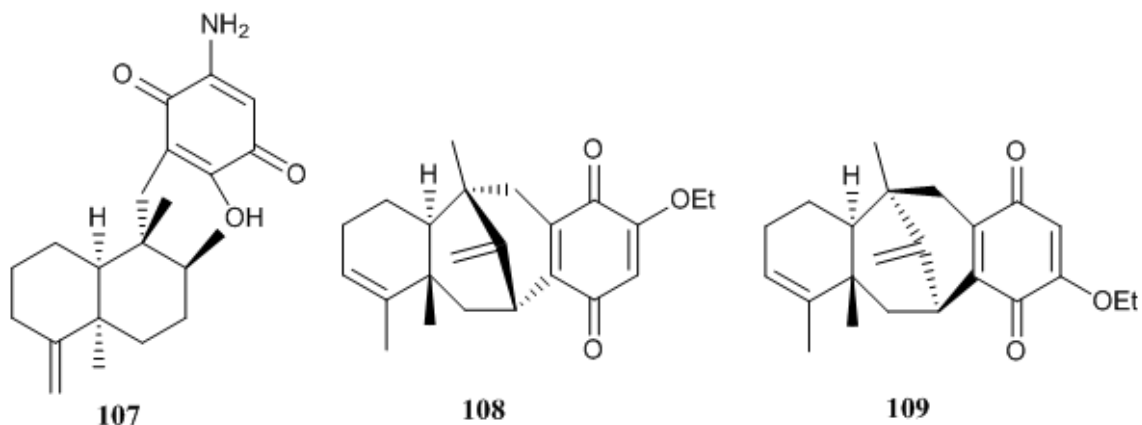
Citotoksična aktivnost sintetisanih jedinjenja ispitana je kako na humanim tumorskim ćelijama tako i na humanim normalnim ćelijama. Dobijeni rezultati u smislu veće efikasnosti derivata u odnosu na polazna jedinjenja avaron i *terc*-butil-1,4-benzohinon, kao i u smislu veće selektivnosti ka tumorskim ćelijama u odnosu na normalne ćelije su potvrđeni analizom indukcije ćelijske smrti.

Ispitana je sposobnost derivata za generisanje superoksidnog anjona, koji predstavlja sporedni produkt mitohondrijskog aerobnog disanja, karakterističnog za tumorske ćelije. Tumorske ćelije stiču adaptivnu sposobnost koja im omogućava uspostavljanje homeostaze i pri visokoj koncentraciji superoksidnog anjona i drugih slobodnih radikala koji oštećuju DNK. Međutim, određene supstance su sposobne da naruše redoks ravnotežu u tumorskim ćelijama i trajno oštete kako DNK tako i mitohondrije. Zato je u našim istraživanjima ispitivana i sposobnost novih derivata za narušavanje membranskog potencijala mitohondrija.

Na kraju, ispitana je antimikrobna aktivnost dobijenih alkilamino i aralkilamino derivata hinona.

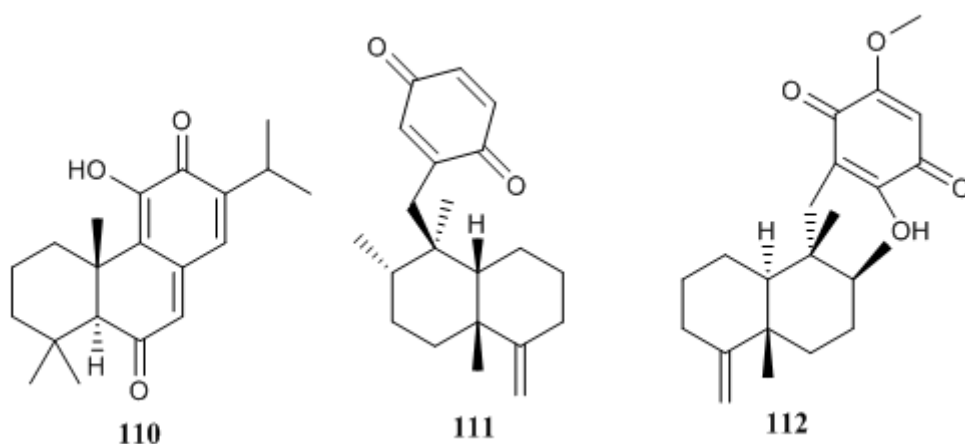
### **3.1. Avarol i avaron kao redoks par i mehanizam njihovog dejstva**

Morski sunđereri su bogat izvor bioaktivnih metabolita velike raznolikosti struktura i aktivnosti. Seskviterpenski hinoni i hidrohinoni prisutni u njima su klasa jedinjenja poznata po raznovrsnim aktivnostima poput antitumorske, antibakterijske, antiprotozoalne kao i antidijabetičke.<sup>140</sup> Tako na primer, *5-epi*-smenospongin **107** promoviše proizvodnju TNF- $\alpha$ , faktora koji se vezuje za odgovarajuće receptore i može aktivirati kaspaze čime uvodi ćeliju u apoptozu.<sup>141</sup> Protein-tirozin-fosfataza 1B (PTP1B) je ključni enzim u defosforilaciji insulinskog receptora. Defosforilacija onemogućava vezivanje insulin-receptor-supstrata (IRS-1) čime se blokira signalni put koji omogućava unos glukoze u ćeliju i sintezu glikogena, pa se smanjuje koncentracija šećera u krvi. Dizidavaroni A **108** i D **109** inhibicijom PTP1B promovišu signalnu kaskadu koja kao krajnji rezultat ima smanjeni nivo šećera u krvi, što može koristiti u terapiji dijabetesa.<sup>142</sup> Farnezil-difosfat-sintaza (FPPS) je ključni enzim u sintezi izoprenoida. Pored toga, igra ulogu u farnezilovanju (prenos farnezil

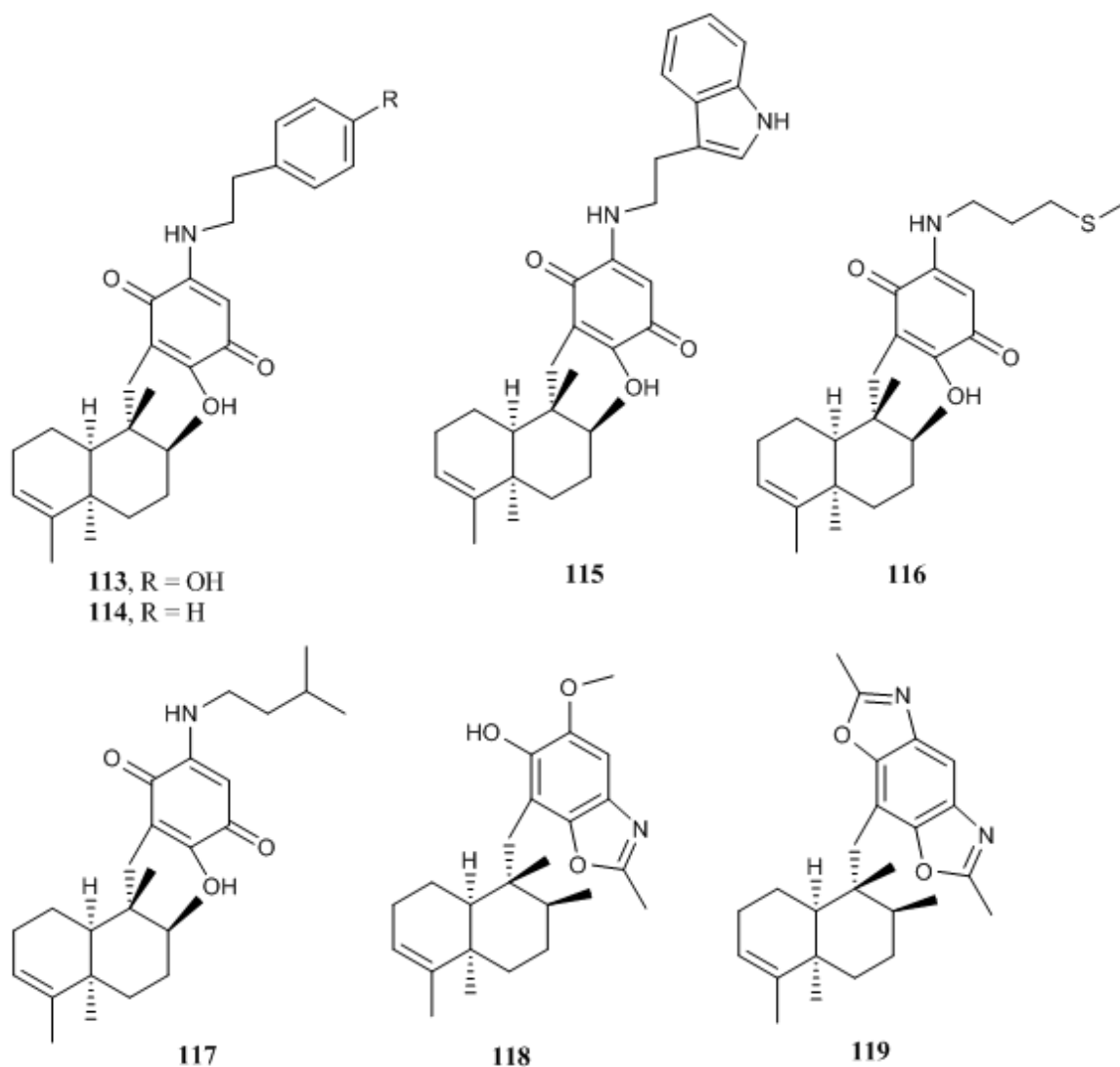


**Slika 37.** Strukturne formule 5-*epi*-smenospongina i dizidavarona A i D.

ostatka) proteina Ras iz Ras/ERK signalne kaskade. Inhibicija FPPS taksodionom **110** i arenaronom **111** blokira sintezu metabolita izvedenih iz izoprenoida i inhibira proliferaciju ćelija, što se koristi u tretmanu infekcije parazitima.<sup>143</sup> Ilimahinon **112** pokazuje antiproliferativnu aktivnost usled dejstva na više meta: aktivacijom proapoptotskog p53 proteina, kao i aktiviranjem ekspresije proapoptotskih CHOP i GADD153 proteina.<sup>144</sup> Nakidžihinoni **113–117** i nakidžinoli **118** i **119** su pokazali antiproliferativno dejstvo inhibicijom protein-kinaza, čime se remete transkripcija, imuni odgovor i ćelijski rast, što se koristi u tretmanu kancera.<sup>145</sup>

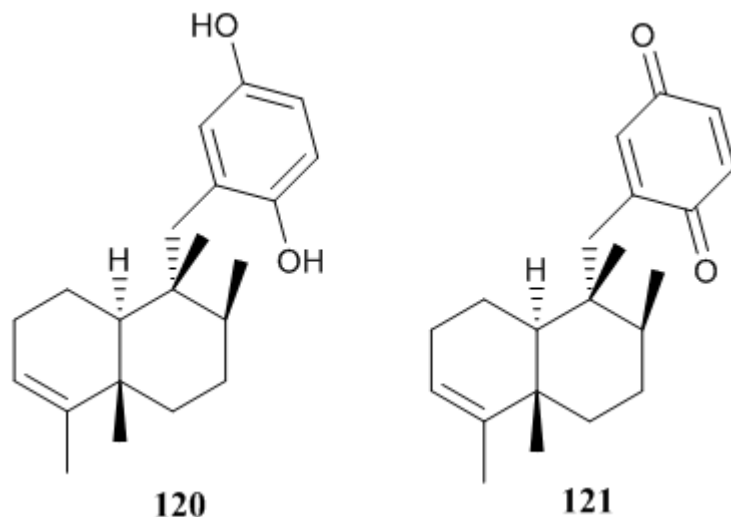


**Slika 38.** Strukturne formule taksodiona, arenarona i ilimahinona.



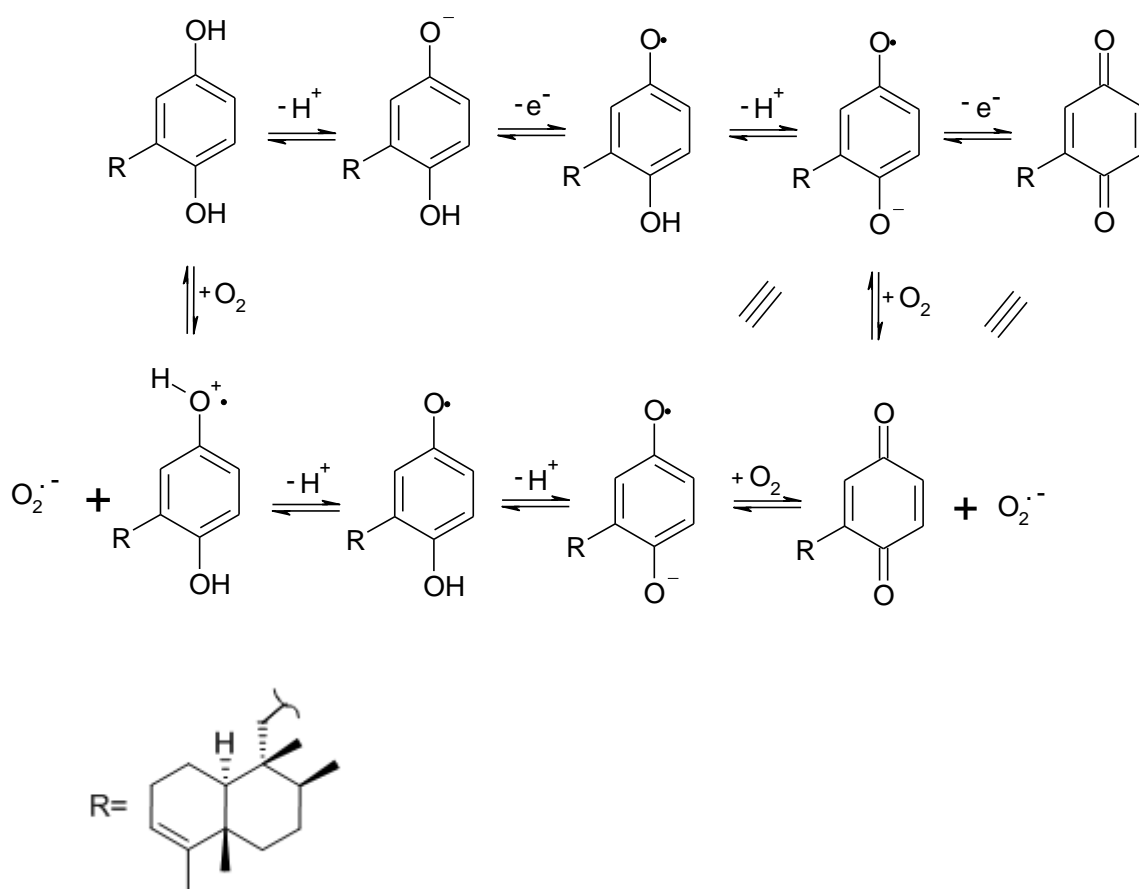
**Slika 39.** Strukturne formule 5-*epi*-nakidžihonona S, Q, T, U i N, i 5-*epi*-nakidžinola C i D, redom.

Avarol **120** i avaron **121**, redoks par sa širokim opsegom aktivnosti, izolovan je iz morskog sunđera *Dysidea avara* (slika 40). Oba jedinjenja pokazuju citotoksičnu aktivnost prema K-562 i FemX ćelijskim linijama,<sup>146</sup> inhibiciju sinteze DNK u T-limfocitima<sup>147</sup> i anti-HIV aktivnost.<sup>82</sup> Biološka aktivnost avarola i avarona povezana je sa njihovom sposobnošću da podležu reverzibilnim oksido-redukcionim reakcijama uz stvaranje semihinonskih intermedijera i kiseoničnih radikala i sposobnošću alkilovanja nukleofila prisutnih u ćeliji.



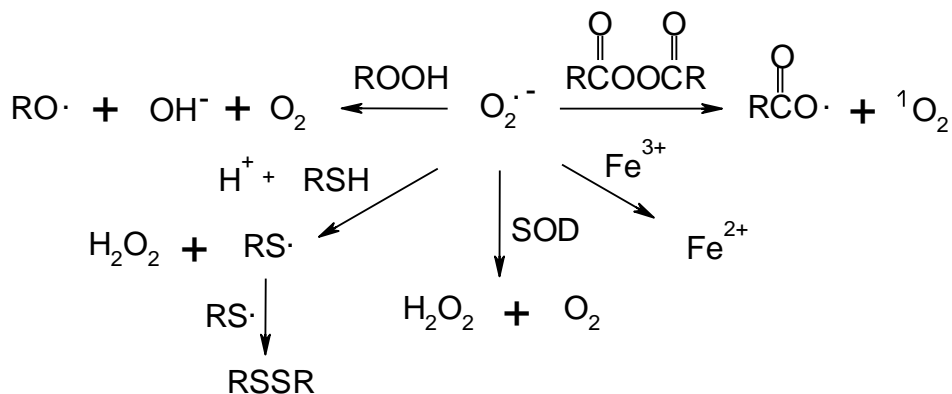
**Slika 40.** Strukturne formule avarola (**120**) i avarona (**121**)

Biolška aktivnost avarola/avarona proučava se u paru, jer je usled lakoće redoks konverzije moguće prisustvo oba oblika. Jednoelektronskom redukcijom molekulskog



**Slika 41.** Redoks promene avarol/avaron para i nastajanje superoksidnog radikala

kiseonika iz avarola nastaje radikal-katjon. Nastali radikal-katjon je jaka kiselina sa  $pK_a$  oko -5,<sup>148</sup> pa deprotonovanjem prelazi u neutralni radikal, čija je  $pK_a$  oko 4. Stoga se i on lako deprotonuje u biološkim sistemima na  $pH \approx 7$ , pri čemu nastaje semihinonski radikal-anjon (slika 41). Ovaj radikal-anjon nastaje i jednoelektronskom redukcijom avarona nekim biološkim reducensom (npr. NADH). Semihinonski radikal-anjon može direktno oštetiti ćelijske komponente,<sup>149</sup> a može i reagovati sa kiseonikom pri čemu nastaje superoksidni radikal  $O_2^{\cdot-}$  i avaron. S obzirom na redoks ravnotežu između avarola, avarona i semihinonskog radikal-anjona, moguća je kontinualna proizvodnja  $O_2^{\cdot-}$  od strane radikal-anjona u cikličnoj sekvenciji, npr. avaron +  $e^-$  = semihinon; semihinon +  $O_2$  = avaron +  $O_2^{\cdot-}$  (slika 41). Moguće reakcije superoksidnog radikal-anjona prikazane su na slici 42. Superoksidni radikal-anjon može da oksiduje merkapto grupe u disulfidne,<sup>150</sup> time menjajući konformaciju proteina, može promeniti oksidaciono stanje metala,<sup>151</sup> npr.  $Fe^{3+}$  u  $Fe^{2+}$  i uticati na katalitičke osobine enzima čiji su kofaktori metalni joni. Dejstvom superoksid-dismutaze (SOD), superoksidni radikal-anjon se disproporcioniše u vodonik-peroksid i kiseonik (slika 42).



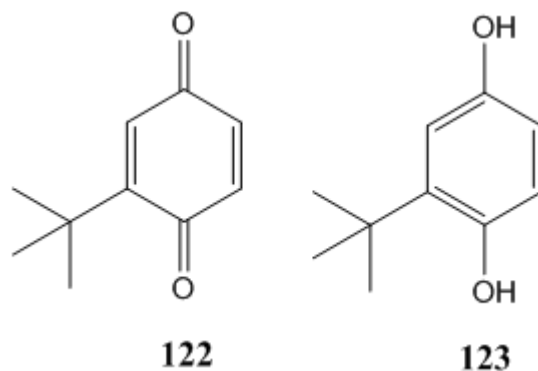
**Slika 42.** Reakcioni putevi superoksidnog radikal-anjona u ćeliji

Prethodni rezultati su pokazali da neki alkilamino derivati avarona, pogotovo 4'-(metilamino)avaron, imaju selektivnu aktivnost prema ćelijama kancera u poređenju sa normalnim ćelijama.<sup>152</sup> Pored toga, nađena je značajna razlika u aktivnosti između dva regioizomera, što ukazuje na to da način delovanja nije nespecifičan.

Kada se uzima u obzir farmakološka primena derivata prirodnih proizvoda, mora se takođe razmotriti dostupnost izvora. Avarol, kao prekursorsko jedinjenje, glavni je sastojak

sundera *D. avara* (3 g/kg sundera).<sup>153</sup> Jedan od glavnih problema primene prirodnih proizvoda je ograničena dostupnost polaznog materijala. Uzimanjem prirodnog materijala narušava se ekosistem i uništavaju kolonije sundera. Što se tiče hemijske sinteze, totalna sinteza avarola uključuje mnogo koraka, a avarol se dobija u niskom prinosu. Da bi bila postignuta održiva/isplativa proizvodnja avarola, pokušani su razni načini kultivacije sundera i/ili ćelijskih kultura.<sup>154,155</sup> Ipak, i dalje postoji problem obezbeđivanja dovoljnih količina avarola.

Moguće rešenje ovog problema je razmatranje avarola/avarona kao modela za dizajn aktivnih supstanci. U ovom radu, korišćen je relativno grub model, baziran na jednostavnom hinonu, *tert*-butilhinonu (TBQ, **122**) (slika 43). *tert*-Butil grupa je odabrana iz nekoliko razloga. Kao prvo, grupa je hidrofobna, ali sa manje ugljenikovih atoma od seskviterpenskog skeleta avarona, da bi se mogla izvesti modifikacija sa supstituentima koji daju derivate različitih hidrofobnosti. Kao drugo, grupa je voluminozna, što je bitno uzevši u obzir sterne zahteve premeštenog drimanskog skeleta avarona. Kao treće, grupa je ahiralna, čime se izbegava problem molekulske asimetrije. Kao četvrto, s obzirom na to da mehanizam delovanja derivata avarona može uključivati radikalske intermedijere, voluminoznost *tert*-butil grupe može doprineti stabilizaciji semihinonskog radikala. I konačno, kao polazno jedinjenje, *tert*-butilhinon je lako dostupan.



**Slika 43.** Strukture *tert*-butilhinona (**122**) i *tert*-butilhidrohinona (**123**)

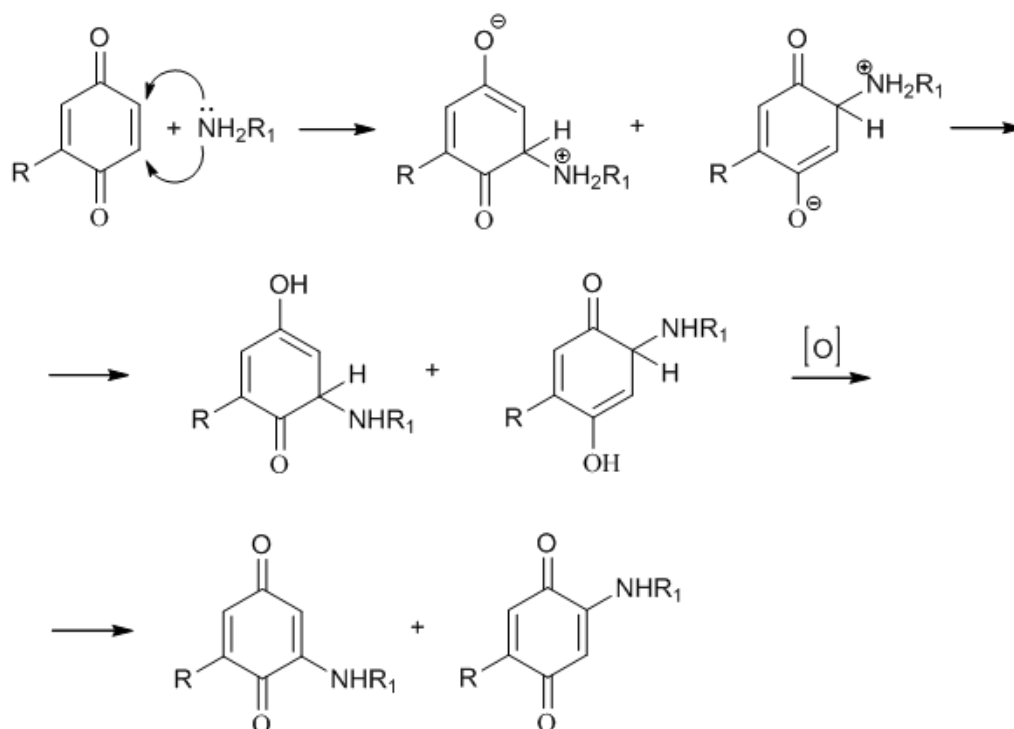
I TBQ i njegov hidrohinon (TBHQ, **123**) pokazuju citotoksičnost, pri čemu je TBQ aktivniji. Oba jedinjenja indukuju smanjenje membranskog potencijala mitohondrija, narušavanje mitohondrijske strukture uz formiranje citosolnih vakuola, oslobađanje citohroma *c* sa mitohondrija, aktivaciju kaspaza, cepanje poli(ADP-riboza)-polimeraze (PARP) i smanjenje intracelularne koncentracije glutaciona i ATP-a.<sup>156,157</sup>



### 3.2 Dobijanje i karakterizacija derivata

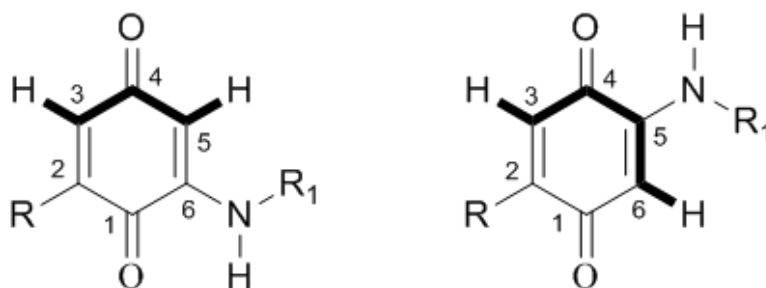
Hidrohinoni (TBHQ i avarol) su oksidovani srebro(I)-oksidom do odgovarajućih hinona. Hinoni u reakciji sa aminima daju dva regioizomera aminohinona. U prvom koraku, dodatak amina hinonu daje supstituisani hidrohinoski intermedijer, koji se potom oksiduje do aminohinona neizreagovalim polaznim hinonom ili molekulskim kiseonikom (slika 44).

Kod *terc*-butilhinona, 2,6-disupstituisani hinonski proizvod je dominirao u smesi u odnosu na 2,5-disupstituisani proizvod. S druge strane, kod avarona, u reakciji sa alilaminom 2,5-disupstituisani proizvod bio je glavni proizvod, dok je u većini slučajeva 2,6-disupstituisani proizvod bio dominantan. U reakciji sa benzilaminom i *sek*-butilaminom dobijene su približno iste količine regioizomera. Racemski *sek*-butilamin je korišćen u reakciji dobijanja *sek*-butilamino derivata. NMR spektralni podaci dobijeni u reakciji sa avaronom ukazuju na prisustvo samo jednog diastereoizomera. Konfiguracija asimetričnog ugljenika bočnog niza nije mogla biti određena, jer su svi pokušaji da proizvod bude kristalisan bili neuspešni.



Slika 44. Mehanizam nukleofilne adicije alkilamina/aralkilamina na hinon

Radi olakšane interpretacije rezultata, numeracija ugljenikovih atoma u hinonskom jezgru kod obe serije jedinjenja je zasnovana na avaronskom prstenu, tj. 3'-serija jedinjenja pokazuje 2,6-obrazac supstitucije, a 4'-serija jedinjenja pokazuje 2,5-obrazac supstitucije. Svi 2,6-disupstituisani derivati pokazuju W kuplovanje dugog dometa između hinonskih protona sa  $^4J$  oko 2 Hz, dajući signale ovih protona kao dublete. S druge strane, hinonski protoni 2,5-disupstituisanih derivata udaljeni su pet veza, pa je kuplovanje dugog dometa previše niskog intenziteta da bi bilo detektovano, što dovodi do toga da su signali hinonskih protona singleti (slika 45). Pored toga, eksperimentalno izmerene vrednosti pomeranja  $^{13}C$  ugljenika hinonskog jezgra pokazuju dobro slaganje sa očekivanim vrednostima izračunatim iz osnovne vrednosti pomeranja  $^{13}C$  atoma u 1,4-benzohinonu i dodavanjem doprinosa alkil i alkilamino/aralkilamino supstituenata,<sup>158</sup> pokazujući različite obrasce za 3' i 4' serije jedinjenja. Na ovaj način bilo je moguće nedvosmisleno razlikovanje između 3' i 4' regioizomera.

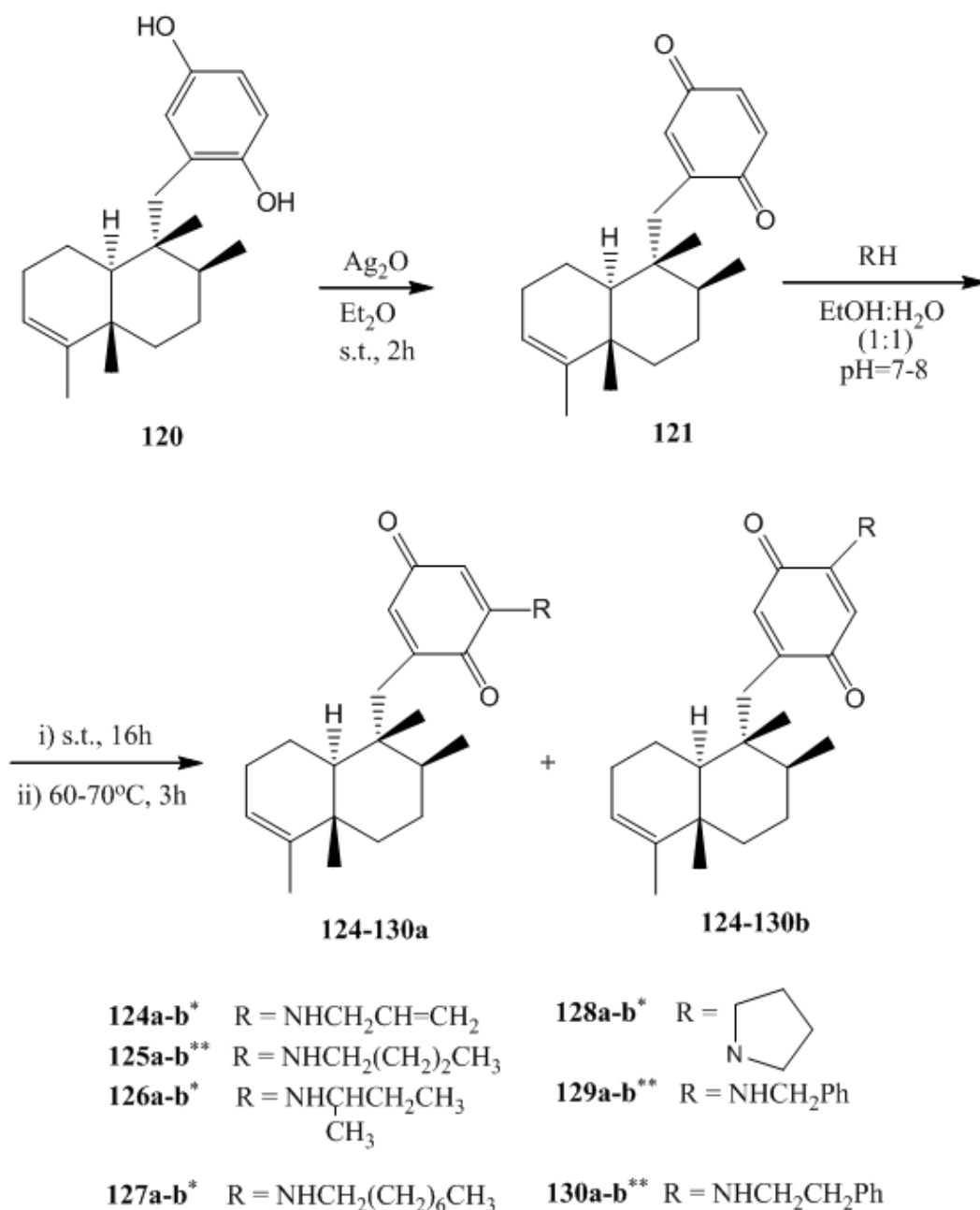


**Slika 45.** Prikaz kuplovanja dugog dometa između hinonskih protona. Na slici levo je W kuplovanje preko četiri veze ( $^4J$ ) hinonskih derivata 2,6- obrasca disupstitucije, a na slici desno je kuplovanje preko pet veza ( $^5J$ ) hinonskih derivata 2,5- obrasca disupstitucije.

### 3.2.1. Dobijanje i karakterizacija alkilamino i aralkilamino derivata avarona

Alkilamino i aralkilamino derivati avarona dobijeni su reakcijom izabranog amina sa seskviterpenskim hinonom (slika 46).

*Opšti postupak za dobijanje alkilamino i aralkilamino derivata avarona.* U etanolni rastvor avarona dodat je vodeni rastvor hidrohlorida odgovarajućeg amina čija je pH vrednost



\*derivati dobijeni metodom ii  
 \*\*derivati dobijeni metodom i

**Slika 46.** Dobijanje alkilamino i aralkilamino derivata avarona

prethodno podešena na 7–8 dodatkom čvrstog natrijum-bikarbonata. Odnos vode i etanola kao sistema rastvarača podešen je na 1:1 dodavanjem etanola i vode, ukoliko je potrebno. Reakcija se meša 16 sati na sobnoj temperaturi. Po ovoj proceduri dobijeni su derivati u reakciji sa *n*-butilaminom, *n*-oktilaminom, benzilaminom i fenetilaminom. U reakciji sa

alilaminom, *sek*-butilaminom i piroolidinom reakciono vreme je smanjeno na 3 sata uz zagrevanje smeše na 60–70°C. Nakon završetka reakcije i obrade reakcione smeše, regioizomeri su razdvojeni hromatografijom na koloni, i prečišćeni preparativnom tankoslojnom hromatografijom.

Derivat **124a** dobijen je u reakciji avarona sa alilaminom u obliku crvenkastog ulja, u prinosu od 7,2%. <sup>1</sup>H NMR spektar jedinjenja pokazuje dublet na  $\delta_{\text{H}}$  6,37 ppm koji odgovara protonu na C-6', sa konstantom kuplovanja od  $J = 2$  Hz, dok dublet na  $\delta_{\text{H}}$  5,44 ppm sa istom vrednošću konstante kuplovanja odgovara protonu na C-4', što ukazuje na 2,6-obrazac supstitucije na hinonskom jezgru, tj. alilamino grupa je supstituent na C-3' atomu. Struktura jedinjenja je potvrđena masenim spektrom visokog razlaganja koji pokazuje signale na  $m/z$  vrednostima od 368,25854 za jon  $[\text{M}+\text{H}]^+$  i 390,24116 za jon  $[\text{M}+\text{Na}]^+$ .

Derivat **124b** dobijen je u reakciji avarona sa alilaminom u obliku crvenkastog ulja, u prinosu od 16,6 %. <sup>1</sup>H NMR spektar jedinjenja pokazuje singlet na  $\delta_{\text{H}}$  6,37 ppm koji odgovara protonu na C-6', dok singlet na  $\delta_{\text{H}}$  5,46 ppm odgovara protonu na C-3', što ukazuje na 2,5-obrazac supstitucije na hinonskom jezgru, tj. alilamino grupa je supstituent na C-4' atomu. Struktura jedinjenja je potvrđena masenim spektrom visokog razlaganja koji pokazuje signale na  $m/z$  vrednostima od 368,25394 za jon  $[\text{M}+\text{H}]^+$  i 390,24053 za jon  $[\text{M}+\text{Na}]^+$ .

Derivat **125a** dobijen je u reakciji avarona sa *n*-butilaminom u obliku crvenkastog ulja, u prinosu od 30,8 %. <sup>1</sup>H NMR spektar jedinjenja pokazuje dublet na  $\delta_{\text{H}}$  6,37 ppm koji odgovara protonu na C-6', sa konstantom kuplovanja od  $J = 2,2$  Hz, dok dublet na  $\delta_{\text{H}}$  5,42 ppm sa istom vrednošću konstante kuplovanja odgovara protonu na C-4', što ukazuje na 2,6-obrazac supstitucije na hinonskom jezgru, tj. *n*-butilamino grupa je supstituent na C-3' atomu. Struktura jedinjenja je potvrđena masenim spektrom visokog razlaganja koji pokazuje signale na  $m/z$  vrednostima od 384,28892 za jon  $[\text{M}+\text{H}]^+$  i 767,57256 za jon  $[\text{2M}+\text{H}]^+$ .

Derivat **125b** dobijen je u reakciji avarona sa *n*-butilaminom u obliku crvenkastog ulja, u prinosu od 12,6 %. <sup>1</sup>H NMR spektar jedinjenja pokazuje singlet na  $\delta_{\text{H}}$  6,36 ppm koji odgovara protonu na C-6', dok singlet na  $\delta_{\text{H}}$  5,43 ppm odgovara protonu na C-3', što ukazuje na 2,5-obrazac supstitucije na hinonskom jezgru, tj. *n*-butilamino grupa je supstituent na C-4' atomu. Struktura jedinjenja je potvrđena masenim spektrom visokog razlaganja koji pokazuje signale na  $m/z$  vrednostima od 384,28848 za jon  $[\text{M}+\text{H}]^+$  i 767,57214 za jon  $[\text{2M}+\text{H}]^+$ .

Derivat **126a** dobijen je u reakciji avarona sa *sek*-butilaminom u obliku crvenkastog ulja, u prinosu od 17,3 %.  $^1\text{H}$  NMR spektar jedinjenja pokazuje dublet na  $\delta_{\text{H}}$  6,37 ppm koji odgovara protonu na C-6', sa konstantom kuplovanja od  $J = 2$  Hz, dok dublet na  $\delta_{\text{H}}$  5,42 ppm sa istom vrednošću konstante kuplovanja odgovara protonu na C-4', što ukazuje na 2,6-obrazac supstitucije na hinonskom jezgru, tj. *sek*-butilamino grupa je supstituent na C-3' atomu. Struktura jedinjenja je potvrđena masenim spektrom visokog razlaganja koji pokazuje signal na  $m/z$  vrednosti od 384,29014 za jon  $[\text{M}+\text{H}]^+$ .

Derivat **126b** dobijen je u reakciji avarona sa *sek*-butilaminom u obliku crvenkastog ulja, u prinosu od 16,9 %.  $^1\text{H}$  NMR spektar jedinjenja pokazuje singlet na  $\delta_{\text{H}}$  6,36 ppm koji odgovara protonu na C-6', dok je singlet koji bi odgovarao protonu na C-3' preklapljen sa signalom koji potiče odaminskog protona na C-4'-NH u opsegu 5,38–5,42 ppm. Sve ovo ukazuje na 2,5-obrazac supstitucije na hinonskom jezgru, tj. *sek*-butilamino grupa je supstituent na C-4' atomu. Struktura jedinjenja je potvrđena masenim spektrom visokog razlaganja koji pokazuje signal na  $m/z$  vrednosti od 384,29020 za jon  $[\text{M}+\text{H}]^+$ .

Derivat **127a** dobijen je u reakciji avarona sa *n*-oktilaminom u obliku crvenkastog ulja, u prinosu od 46,6 %.  $^1\text{H}$  NMR spektar jedinjenja pokazuje dublet na  $\delta_{\text{H}}$  6,37 ppm koji odgovara protonu na C-6', sa konstantom kuplovanja od  $J = 2,2$  Hz, dok dublet na  $\delta_{\text{H}}$  5,41 ppm sa istom vrednošću konstante kuplovanja odgovara protonu na C-4', što ukazuje na 2,6-obrazac supstitucije na hinonskom jezgru, tj. *n*-oktilamino grupa je supstituent na C-3' atomu. Struktura jedinjenja je potvrđena masenim spektrom visokog razlaganja koji pokazuje signale na  $m/z$  vrednostima od 440,35203 za jon  $[\text{M}+\text{H}]^+$  i 879,69829 za jon  $[2\text{M}+\text{H}]^+$ .

Derivat **127b** dobijen je u reakciji avarona sa *n*-oktilaminom u obliku crvenkastog ulja, u prinosu od 22,0 %.  $^1\text{H}$  NMR spektar jedinjenja pokazuje singlet na  $\delta_{\text{H}}$  6,35 ppm koji odgovara protonu na C-6', dok singlet na  $\delta_{\text{H}}$  5,42 ppm odgovara protonu na C-3', što ukazuje na 2,5-obrazac supstitucije na hinonskom jezgru, tj. *n*-oktilamino grupa je supstituent na C-4' atomu. Struktura jedinjenja je potvrđena masenim spektrom visokog razlaganja koji pokazuje signal na  $m/z$  vrednostima od 440,35181 za jon  $[\text{M}+\text{H}]^+$  i 879,69842 za jon  $[2\text{M}+\text{H}]^+$ .

Derivat **128a** dobijen je u reakciji avarona sa pirolidinom u obliku crvenkastih kristala, u prinosu od 26,3 %.  $^1\text{H}$  NMR spektar jedinjenja pokazuje dublet na  $\delta_{\text{H}}$  6,36 ppm koji odgovara protonu na C-6', sa konstantom kuplovanja od  $J = 2$  Hz, dok dublet na  $\delta_{\text{H}}$  5,42 ppm sa istom vrednošću konstante kuplovanja odgovara protonu na C-4', što ukazuje na 2,6-

-obrazac supstitucije na hinonskom jezgru, tj. pirolidinil grupa je supstituent na C-3' atomu. U IR spektru ne javlja se karakteristična traka na  $\sim 3300\text{ cm}^{-1}$  koja potiče od vibracija NH veze, a koja se javlja kod svih derivata drugih amina iz serije, što ukazuje na to da je pirolidin vezan za hinonsko jezgro preko azota. Struktura jedinjenja je potvrđena masenim spektrom visokog razlaganja koji pokazuje signal na  $m/z$  vrednosti od 382,27388 za jon  $[M+H]^+$ .

Derivat **128b** dobijen je u reakciji avarona sa pirolidinom u obliku crvenkastih kristala, u prinosu od 48,6 %.  $^1\text{H}$  NMR spektar jedinjenja pokazuje singlet na  $\delta_{\text{H}}$  6,26 ppm koji odgovara protonu na C-6', dok singlet na  $\delta_{\text{H}}$  5,44 ppm odgovara protonu na C-3', što ukazuje na 2,5-obrazac supstitucije na hinonskom jezgru, tj. pirolidinil grupa je supstituent na C-4' atomu. U IR spektru ponovo se ne javlja karakteristična traka na  $\sim 3300\text{ cm}^{-1}$ , što ukazuje na to da je pirolidin vezan za hinonsko jezgro preko azota. Struktura jedinjenja je potvrđena masenim spektrom visoke rezolucije koji pokazuje signal na  $m/z$  vrednosti od 382,27420 za jon  $[M+H]^+$ .

Derivat **129a** dobijen je u reakciji avarona sa benzilaminom u obliku crvenkastih kristala, u prinosu od 6,2 %.  $^1\text{H}$  NMR spektar jedinjenja pokazuje dublet na  $\delta_{\text{H}}$  6,38 ppm koji odgovara protonu na C-6', sa konstantom kuplovanja od  $J = 2,4\text{ Hz}$ , dok dublet na  $\delta_{\text{H}}$  5,49 ppm sa vrednošću konstante kuplovanja od  $J = 1,6\text{ Hz}$  odgovara protonu na C-4', što ukazuje na 2,6-obrazac supstitucije na hinonskom jezgru, tj. benzilamino grupa je supstituent na C-3' atomu. Struktura jedinjenja je potvrđena masenim spektrom visokog razlaganja koji pokazuje signale na  $m/z$  vrednostima od 418,27452 za jon  $[M+H]^+$  i 456,23089 za jon  $[M+K]^+$ .

Derivat **129b** dobijen je u reakciji avarona sa benzilaminom u obliku crvenkastih kristala, u prinosu od 6,2 %.  $^1\text{H}$  NMR spektar jedinjenja pokazuje singlet na  $\delta_{\text{H}}$  6,38 ppm koji odgovara protonu na C-6', dok singlet na  $\delta_{\text{H}}$  5,50 ppm odgovara protonu na C-3', što ukazuje na 2,5-obrazac supstitucije na hinonskom jezgru, tj. benzilamino grupa je supstituent na C-4' atomu. Struktura jedinjenja je potvrđena masenim spektrom visokog razlaganja koji pokazuje signal na  $m/z$  vrednosti od 418,27438 za jon  $[M+H]^+$ .

Derivat **130a** dobijen je u reakciji avarona sa fenetilaminom u obliku crvenkastog ulja, u prinosu od 21,1 %.  $^1\text{H}$  NMR spektar jedinjenja pokazuje dublet na  $\delta_{\text{H}}$  6,37 ppm koji odgovara protonu na C-6', sa konstantom kuplovanja od  $J = 2,4\text{ Hz}$ , dok dublet na  $\delta_{\text{H}}$  5,46 ppm sa istom vrednošću konstante kuplovanja odgovara protonu na C-4', što ukazuje na 2,6-obrazac supstitucije na hinonskom jezgru, tj. benzilamino grupa je supstituent na C-3'

atomu. Struktura jedinjenja je potvrđena masenim spektrom visokog razlaganja koji pokazuje signale na  $m/z$  vrednostima od 432,28613 za jon  $[M+H]^+$  i 863,56985 za jon  $[2M+H]^+$ .

Derivat **130b** dobijen je u reakciji avarona sa fenetilaminom u obliku crvenkastih kristala, u prinosu od 25,2 %.  $^1H$  NMR spektar jedinjenja pokazuje singlet na  $\delta_H$  6,35 ppm koji odgovara protonu na C-6', dok singlet na  $\delta_H$  5,47 ppm odgovara protonu na C-3', što ukazuje na 2,5-obrazac supstitucije na hinonskom jezgru, tj. fenetilamino grupa je supstituent na C-4' atomu. Struktura jedinjenja je potvrđena masenim spektrom visokog razlaganja koji pokazuje signale na  $m/z$  vrednostima od 432,29161 za jon  $[M+H]^+$  i 863,57121 za jon  $[2M+H]^+$ .

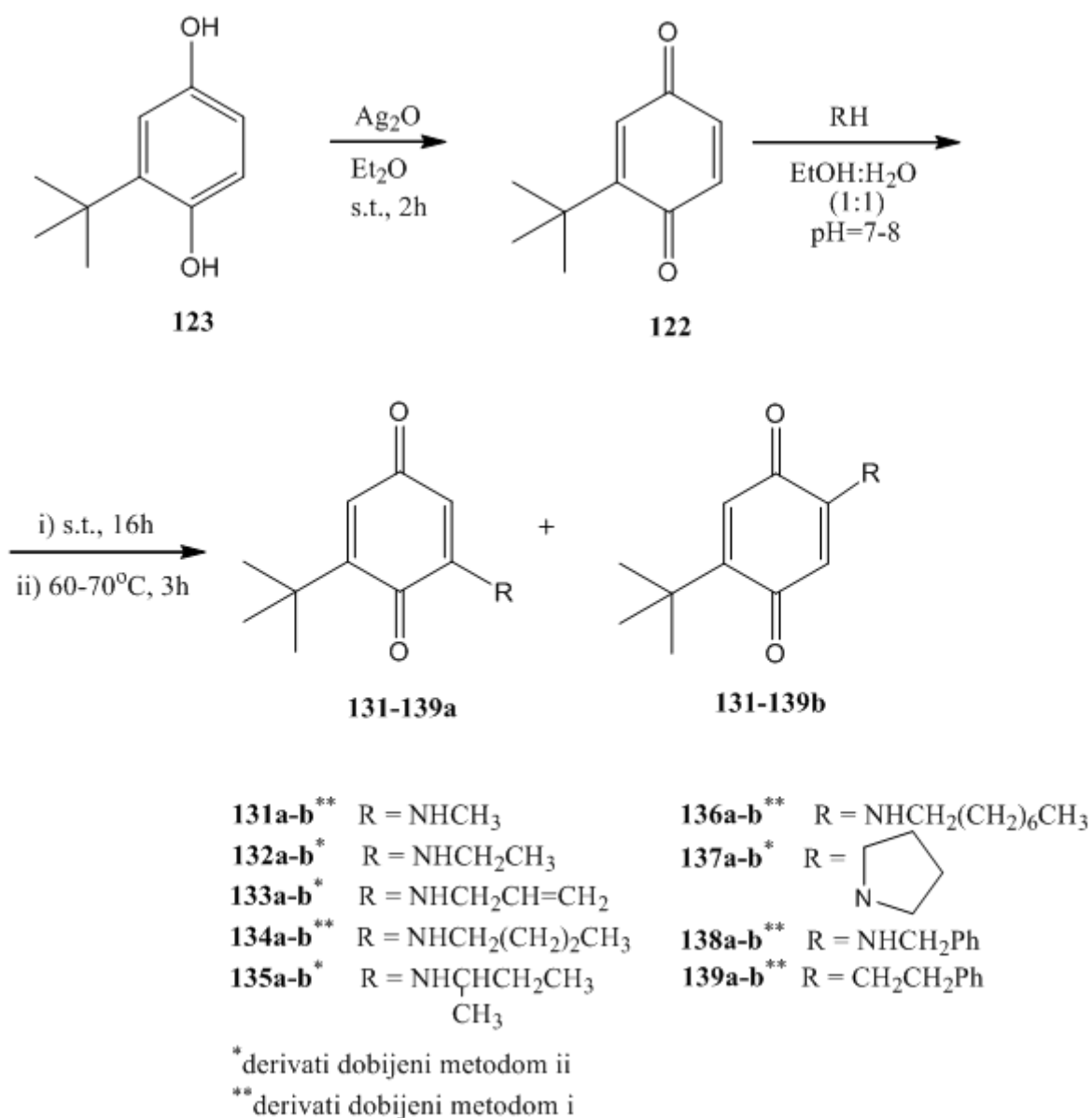
### 3.2.2. Dobijanje i karakterizacija alkilamino i aralkilamino derivata *terc*-butilhinona

Reakcioni uslovi za dobijanje TBQ derivata odgovarali su ranije pomenutim uslovima za dobijanje derivata avarona (slika 47).

Derivat **131a** dobijen je u reakciji *terc*-butilhinona sa metilaminom u obliku crvenkastih kristala, u prinosu od 59,5 %.  $^1H$  NMR spektar jedinjenja pokazuje dublet na  $\delta_H$  6,47 ppm koji odgovara protonu na C-3, sa konstantom kuplovanja od  $J = 2,5$  Hz, dok dublet na  $\delta_H$  5,41 ppm sa vrednošću konstante kuplovanja od  $J = 2$  Hz odgovara protonu na C-5, što ukazuje na 2,6-obrazac supstitucije na hinonskom jezgru, tj. metilamino grupa je supstituent na C-6 atomu. Struktura jedinjenja je potvrđena masenim spektrom visokog razlaganja koji pokazuje signal na  $m/z$  vrednosti od 194,11742 za jon  $[M+H]^+$ .

Derivat **131b** dobijen je u reakciji *terc*-butilhinona sa metilaminom u obliku crvenkastih kristala, u prinosu od 5,0 %.  $^1H$  NMR spektar jedinjenja pokazuje singlet na  $\delta_H$  6,43 ppm koji odgovara protonu na C-3, dok singlet na  $\delta_H$  5,38 ppm odgovara protonu na C-6, što ukazuje na 2,5-obrazac supstitucije na hinonskom jezgru, tj. metilamino grupa je supstituent na C-5 atomu. Struktura jedinjenja je potvrđena masenim spektrom visokog razlaganja koji pokazuje signal na  $m/z$  vrednosti od 194,11785 za jon  $[M+H]^+$ .

Derivat **132a** dobijen je u reakciji *terc*-butilhinona sa dietilaminom u obliku crvenkastog ulja, u prinosu od 5,3 %. U ovoj reakciji umesto očekivanog dietilamino supstituisanog hinona dobijen je etilamino supstituisani proizvod, kao rezultat Hoffman-olike eliminacije kojoj podleže inicijalni proizvod.<sup>159</sup>  $^1H$  NMR spektar jedinjenja pokazuje dublet



**Slika 47.** Dobijanje alkilamino i aralkilamino derivata *tert*-butilhinona

na  $\delta_{\text{H}}$  6,46 ppm koji odgovara protonu na C-3, sa konstantom kuplovanja od  $J = 2$  Hz, dok dublet na  $\delta_{\text{H}}$  5,42 ppm sa istom vrednošću konstante kuplovanja odgovara protonu na C-5, što ukazuje na 2,6-obrazac supstitucije na hinonskom jezgru, tj. etilamino grupa je supstituent na C-6 atomu. Struktura jedinjenja je potvrđena masenim spektrom visokog razlaganja koji pokazuje signale na  $m/z$  vrednostima od 208,13318 za jon  $[\text{M}+\text{H}]^+$  i 415,25877 za jon  $[\text{2M}+\text{H}]^+$ .



Derivat **132b** dobijen je u reakciji *terc*-butilhinona sa dietilaminom u obliku crvenkastih kristala, u prinosu od 2,4 %. Kao i u slučaju regioizomernog derivata **132a**, dobijen je etilamino, a ne dietilamino supstituisani hinon, usled Hoffman-olike eliminacije kojoj podleže inicijalni proizvod.<sup>159</sup> <sup>1</sup>H NMR spektar jedinjenja pokazuje singlet na  $\delta_H$  6,43 ppm koji odgovara protonu na C-3, dok singlet na  $\delta_H$  5,38 ppm odgovara protonu na C-6, što ukazuje na 2,5-obrazac supstitucije na hinonskom jezgru, tj. etilamino grupa je supstituent na C-5 atomu. Struktura jedinjenja je potvrđena masenim spektrom visokog razlaganja koji pokazuje signal na  $m/z$  vrednosti od 208,13342 za jon  $[M+H]^+$ .

Derivat **133a** dobijen je u reakciji *terc*-butilhinona sa alilaminom u obliku crvenkastih kristala, u prinosu od 41,9 %. <sup>1</sup>H NMR spektar jedinjenja pokazuje dublet na  $\delta_H$  6,47 ppm koji odgovara protonu na C-5, sa konstantom kuplovanja od  $J = 2$  Hz, dok dublet na  $\delta_H$  5,45 ppm sa istom vrednošću konstante kuplovanja odgovara protonu na C-3, što ukazuje na 2,6- -obrazac supstitucije na hinonskom jezgru, tj. alilamino grupa je supstituent na C-2 atomu. Struktura jedinjenja je potvrđena masenim spektrom visokog razlaganja koji pokazuje signal na  $m/z$  vrednosti od 220,13321 za jon  $[M+H]^+$ .

Derivat **133b** dobijen je u reakciji *terc*-butilhinona sa alilaminom u obliku crvenkastih kristala, u prinosu od 9,5 %. <sup>1</sup>H NMR spektar jedinjenja pokazuje singlet na  $\delta_H$  6,45 ppm koji odgovara protonu na C-6, dok singlet na  $\delta_H$  5,41 ppm odgovara protonu na C-3, što ukazuje na 2,5-obrazac supstitucije na hinonskom jezgru, tj. alilamino grupa je supstituent na C-2 atomu. Struktura jedinjenja je potvrđena masenim spektrom visokog razlaganja koji pokazuje signal na  $m/z$  vrednosti od 208,13311 za jon  $[M+H]^+$ .

Derivat **134a** dobijen je u reakciji *terc*-butilhinona sa *n*-butilaminom u obliku crvenkastih kristala, u prinosu od 41,9 %. <sup>1</sup>H NMR spektar jedinjenja pokazuje dublet na  $\delta_H$  6,46 ppm koji odgovara protonu na C-3, sa konstantom kuplovanja od  $J = 2,5$  Hz, dok dublet na  $\delta_H$  5,42 ppm sa istom vrednošću konstante kuplovanja odgovara protonu na C-5, što ukazuje na 2,6-obrazac supstitucije na hinonskom jezgru, tj. *n*-butilamino grupa je supstituent na C-6 atomu. Struktura jedinjenja je potvrđena masenim spektrom visokog razlaganja koji pokazuje signal na  $m/z$  vrednosti od 236,16460 za jon  $[M+H]^+$ .

Derivat **134b** dobijen je u reakciji *terc*-butilhinona sa *n*-butilaminom u obliku crvenkastih kristala, u prinosu od 12,8 %. <sup>1</sup>H NMR spektar jedinjenja pokazuje singlet na  $\delta_H$  6,43 ppm koji odgovara protonu na C-3, dok je singlet koji bi odgovarao protonu na C-6

preklopljen sa signalom koji potiče odaminskog protona na C-5-NH na pomeranju 5,38 ppm. Sve ovo ukazuje na 2,5-obrazac supstitucije na hinonskom jezgru, tj. *n*-butilamino grupa je supstituent na C-5 atomu. Struktura jedinjenja je potvrđena masenim spektrom visokog razlaganja koji pokazuje signale na *m/z* vrednostima od 236,16462 za jon  $[M+H]^+$  i 471,32154 za jon  $[2M+H]^+$ .

Derivat **135a** dobijen je u reakciji *terc*-butilhinona sa *sek*-butilaminom u obliku crvenkastog ulja, u prinosu od 32,4 %.  $^1\text{H}$  NMR spektar jedinjenja pokazuje dublet na  $\delta_{\text{H}}$  6,46 ppm koji odgovara protonu na C-3, sa konstantom kuplovanja od  $J = 2$  Hz, dok dublet na  $\delta_{\text{H}}$  5,42 ppm sa istom vrednošću konstante kuplovanja odgovara protonu na C-5, što ukazuje na 2,6-obrazac supstitucije na hinonskom jezgru, tj. *sek*-butilamino grupa je supstituent na C-6 atomu. Struktura jedinjenja je potvrđena masenim spektrom visokog razlaganja koji pokazuje signale na *m/z* vrednostima od 236,16441 za jon  $[M+H]^+$  i 274,12284 za jon  $[M+K]^+$ .

Derivat **135b** dobijen je u reakciji *terc*-butilhinona sa *sek*-butilaminom u obliku crvenkastog ulja, u prinosu od 9,6 %.  $^1\text{H}$  NMR spektar jedinjenja pokazuje singlet na  $\delta_{\text{H}}$  6,43 ppm koji odgovara protonu na C-3, dok singlet na  $\delta_{\text{H}}$  5,38 ppm odgovara protonu na C-6, što ukazuje na 2,5-obrazac supstitucije na hinonskom jezgru, tj. *sek*-butilamino grupa je supstituent na C-5 atomu. Struktura jedinjenja je potvrđena masenim spektrom visokog razlaganja koji pokazuje signale na *m/z* vrednostima od 236,16475 za jon  $[M+H]^+$  i 274,12345 za jon  $[M+K]^+$ .

Derivat **136a** dobijen je u reakciji *terc*-butilhinona sa *n*-oktilaminom u obliku crvenkastog ulja, u prinosu od 52,0 %.  $^1\text{H}$  NMR spektar jedinjenja pokazuje dublet na  $\delta_{\text{H}}$  6,46 ppm koji odgovara protonu na C-3, sa konstantom kuplovanja od  $J = 2,5$  Hz, dok dublet na  $\delta_{\text{H}}$  5,41 ppm sa istom vrednošću konstante kuplovanja odgovara protonu na C-5, što ukazuje na 2,6-obrazac supstitucije na hinonskom jezgru, tj. *n*-oktilamino grupa je supstituent na C-6 atomu. Struktura jedinjenja je potvrđena masenim spektrom visokog razlaganja koji pokazuje signale na *m/z* vrednostima od 292,22811 za jon  $[M+H]^+$  i 583,44804 za jon  $[2M+H]^+$ .

Derivat **136b** dobijen je u reakciji *terc*-butilhinona sa *n*-oktilaminom u obliku crvenkastog ulja, u prinosu od 9,4 %.  $^1\text{H}$  NMR spektar jedinjenja pokazuje singlet na  $\delta_{\text{H}}$  6,43 ppm koji odgovara protonu na C-3, dok singlet na  $\delta_{\text{H}}$  5,38 ppm odgovara protonu na C-6, što ukazuje na 2,5-obrazac supstitucije na hinonskom jezgru, tj. *n*-oktilamino grupa je supstituent

na C-5 atomu. Struktura jedinjenja je potvrđena masenim spektrom visokog razlaganja koji pokazuje signal na  $m/z$  vrednosti od 292,22813 za jon  $[M+H]^+$ .

Derivat **137a** dobijen je u reakciji *tert*-butilhinona sa pirolidinom u obliku crvenkastih kristala, u prinosu od 14,8 %.  $^1\text{H}$  NMR spektar jedinjenja pokazuje dublet na  $\delta_{\text{H}}$  6,45 ppm koji odgovara protonu na C-3, sa konstantom kuplovanja od  $J = 2$  Hz, dok dublet na  $\delta_{\text{H}}$  5,41 ppm sa istom vrednošću konstante kuplovanja odgovara protonu na C-5, što ukazuje na 2,6-obrazac supstitucije na hinonskom jezgru, tj. pirolidinil grupa je supstituent na C-6 atomu. U IR spektru se ne javlja karakteristična traka na  $\sim 3300$   $\text{cm}^{-1}$  koja potiče od vibracija NH veze, a koja se javlja kod svih derivata drugih amina iz serije, što ukazuje na to da je pirolidin vezan za hinonsko jezgro preko azota. Struktura jedinjenja je potvrđena masenim spektrom visokog razlaganja koji pokazuje signale na  $m/z$  vrednostima od 234,14892 za jon  $[M+H]^+$  i 272,11865 za jon  $[M+K]^+$ .

Derivat **137b** dobijen je u reakciji *tert*-butilhinona sa pirolidinom u obliku crvenkastih kristala, u prinosu od 11,4 %.  $^1\text{H}$  NMR spektar jedinjenja pokazuje singlet na  $\delta_{\text{H}}$  6,31 ppm koji odgovara protonu na C-3, dok singlet na  $\delta_{\text{H}}$  5,38 ppm odgovara protonu na C-6, što ukazuje na 2,5-obrazac supstitucije na hinonskom jezgru, tj. pirolidinil grupa je supstituent na C-5 atomu. U IR spektru se ponovo ne javlja karakteristična traka na  $\sim 3300$   $\text{cm}^{-1}$ , što ukazuje na vezivanje pirolidina preko azota. Struktura jedinjenja je potvrđena masenim spektrom visokog razlaganja koji pokazuje signal na  $m/z$  vrednosti od 234,14952 za jon  $[M+H]^+$ .

Derivat **138a** dobijen je u reakciji *tert*-butilhinona sa benzilaminom u obliku crvenkastih kristala, u prinosu od 41,5 %.  $^1\text{H}$  NMR spektar jedinjenja pokazuje dublet na  $\delta_{\text{H}}$  6,46 ppm koji odgovara protonu na C-5, sa konstantom kuplovanja od  $J = 2$  Hz, dok dublet na  $\delta_{\text{H}}$  5,48 ppm sa istom vrednošću konstante kuplovanja odgovara protonu na C-3, što ukazuje na 2,6-obrazac supstitucije na hinonskom jezgru, tj. benzilamino grupa je supstituent na C-2 atomu. Struktura jedinjenja je potvrđena masenim spektrom visokog razlaganja koji pokazuje signale na  $m/z$  vrednostima od 270,14903 za jon  $[M+H]^+$  i 539,28999 za jon  $[2M+H]^+$ .

Derivat **138b** je dobijen u reakciji *tert*-butilhinona sa benzilaminom u obliku crvenkastog ulja, u prinosu od 7,0 %.  $^1\text{H}$  NMR spektar jedinjenja pokazuje singlet na  $\delta_{\text{H}}$  6,45 ppm koji odgovara protonu na C-6, dok singlet na  $\delta_{\text{H}}$  5,45 ppm odgovara protonu na C-3, što

ukazuje na 2,5-obrazac supstitucije na hinonskom jezgru, tj. benzilamino grupa je supstituent na C-2 atomu. Struktura jedinjenja je potvrđena masenim spektrom visokog razlaganja koji pokazuje signal na  $m/z$  vrednosti od 270,14910 za jon  $[M+H]^+$ .

Derivat **139a** je dobijen u reakciji *terc*-butilhinona sa fenetilaminom u obliku crvenkastog ulja, u prinosu od 35,5 %.  $^1\text{H}$  NMR spektar jedinjenja pokazuje dublet na  $\delta_{\text{H}}$  6,46 ppm koji odgovara protonu na C-3, sa konstantom kuplovanja od  $J = 3$  Hz, dok dublet na  $\delta_{\text{H}}$  5,47 ppm sa istom vrednošću konstante kuplovanja odgovara protonu na C-5, što ukazuje na 2,6-obrazac supstitucije na hinonskom jezgru, tj. fenetilamino grupa je supstituent na C-6 atomu. Struktura jedinjenja je potvrđena masenim spektrom visokog razlaganja koji pokazuje signale na  $m/z$  vrednostima od 284,16454 za jon  $[M+H]^+$  i 567,32097 za jon  $[2M+H]^+$ .

Derivat **139b** je dobijen u reakciji *terc*-butilhinona sa fenetilaminom u obliku crvenkastih kristala, u prinosu od 8,1 %.  $^1\text{H}$  NMR spektar jedinjenja pokazuje singlet na  $\delta_{\text{H}}$  6,42 ppm koji odgovara protonu na C-3, dok singlet na  $\delta_{\text{H}}$  5,44 ppm odgovara protonu na C-6, što ukazuje na 2,5-obrazac supstitucije na hinonskom jezgru, tj. benzilamino grupa je supstituent na C-5 atomu. Struktura jedinjenja je potvrđena masenim spektrom visokog razlaganja koji pokazuje signal na  $m/z$  vrednosti od 284,16424 za jon  $[M+H]^+$ .

### 3.3. Ciklična voltometrija sintetisanih derivata

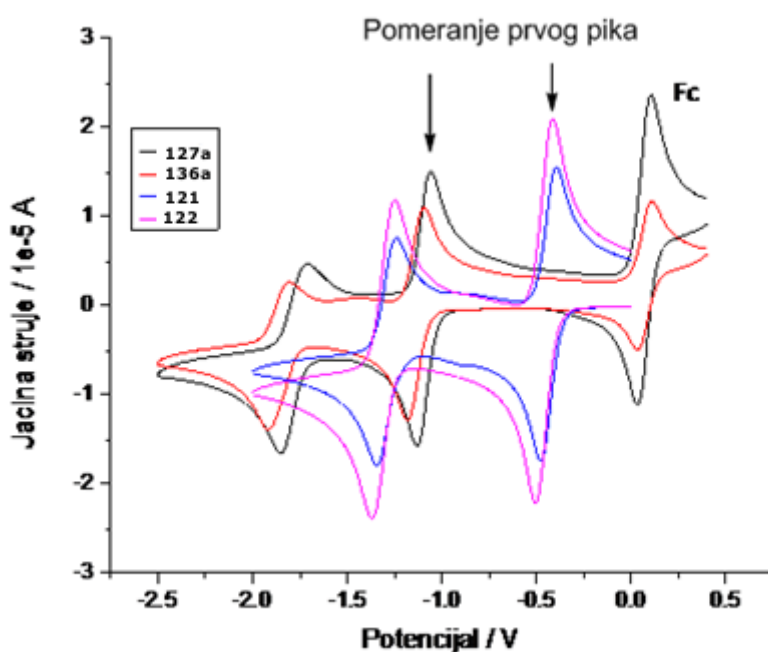
Tipično elektrohemijsko ponašanje hinona u dimetil-sulfoksidu je opaženo kod svih sintetisanih jedinjenja, tj. dva talasa koji potiču od redukcije hinona do semihinonskog radikal-anjona i potom do hidrohinskog dianjona. Prvi talas redukcije je potpuno reverzibilan, što ukazuje na proces kontrolisan difuzijom.

Međutim, drugi proces redukcije nije reverzibilan, pa ima veća razdvajanja potencijala vrha talasa.

Derivatizacija nije narušila prirodu ova dva procesa, već je pomerila potencijale vrha talasa. Kao što je i očekivano, svi derivati imaju negativniji potencijal redukcije od polaznih hinona (Tabela 1 i 2, slika 48).

**Tabela 1.** Voltametrijski polutalasnici potencijali i standardni redoks potencijali avaronskih derivata i avarona (u voltima prema srebrno/srebro-hloridnoj elektrodi).

	Ec1	Ea1	Ec2	Ea2	$E^0_1/\text{Fc}$
<b>124a</b>	-1,170	-1,113	-1,830	-1,741	-1,142
<b>124b</b>	-1,177	-1,117	-1,799	-1,689	-1,150
<b>125a</b>	-1,138	-1,067	-1,876	-1,747	-1,172
<b>125b</b>	-1,148	-1,078	-1,888	-1,749	-1,182
<b>126a</b>	-1,193	-1,127	-1,881	-1,774	-1,158
<b>126b</b>	-1,201	-1,133	-1,859	-1,713	-1,168
<b>127a</b>	-1,132	-1,059	-1,852	-1,711	-1,165
<b>127b</b>	-1,144	-1,076	-1,849	-1,684	-1,179
<b>128a</b>	-1,267	-1,163	-1,883	-1,710	-1,217
<b>128b</b>	-1,259	-1,177	-1,861	-1,704	-1,218
<b>129a</b>	-1,115	-1,043	-1,865	-1,733	-1,147
<b>129b</b>	-1,123	-1,054	-1,840	-1,685	-1,157
<b>130a</b>	-1,123	-1,052	-1,876	-1,747	-1,156
<b>130b</b>	-1,131	-1,061	-1,869	-1,729	-1,164
<b>121</b>	-0,479	-0,394	-1,345	-1,242	-0,506

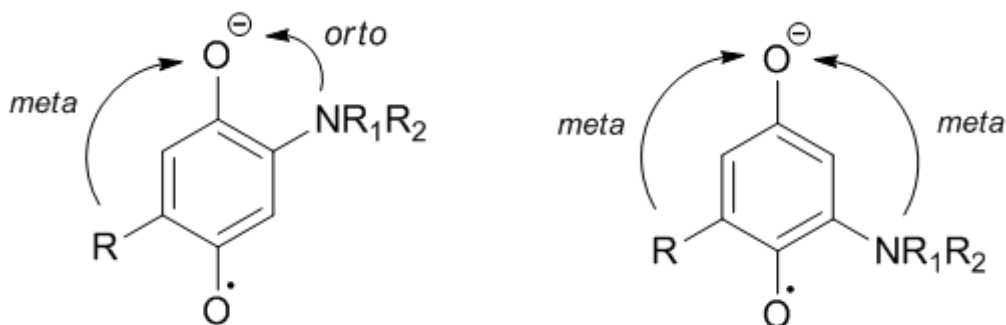


**Slika 48.** Ciklični voltamogram avarona (**121**), *terc*-butilhinona (**122**) i njihovih 3'-(*n*-oktilamino) derivata (**127a** i **136a**, respektivno). Referentno jedinjenje je ferocen (**Fc**).

Može se pretpostaviti da amino supstituent svojom elektron-donorskom sposobnošću destabilizuje intermedijerni semihinon u odnosu na odgovarajući hinon. Ovaj efekat vodi negativnom pomeranju potencijala pika. S obzirom na to da alkil grupa amino supstituenta utiče na elektron-donorsku sposobnost supstituenta, pirolidino derivati imaju najnegativnije potencijale redukcije, dok benzilamino i alilamino derivati imaju najmanje negativne (tj. najpozitivnije) potencijale redukcije zbog slabog elektron-privlačnog efekta fenil, odnosno alil grupe. Promene u dužini lanaca nisu znatno uticale na redoks osobine, kao što je bilo i očekivano. Položaj supstituenta igra posebnu ulogu u pomeranju potencijala pika. Primećeno je da 4'-derivati generalno imaju za oko 10 do 20 mV negativnije potencijale pikova od odgovarajućih 3'-derivata. Povoljniji položaj amino i alkil supstituenata u semihinonskom anjon-radikalu, kad su oba u meta položaju u odnosu na negativni kiseonik, verovatni je razlog za ovakvo ponašanje (slika 49).

**Tabela 2.** Voltametrijski polutalasnici potencijali i standardni redoks potencijali *terc*-butilhinonskih derivata i *terc*-butilhinona (u voltima prema srebro/srebro-hloridnoj elektrodi).

	Ec1	Ea1	Ec2	Ea2	E <sup>0</sup> <sub>1/Fc</sub>
<b>131a</b>	-1,200	-1,104	-1,910	-1,785	-1,213
<b>131b</b>	-1,200	-1,124	-1,906	-1,766	-1,223
<b>132a</b>	-1,160	-1,080	-1,896	-1,746	-1,191
<b>132b</b>	-1,170	-1,102	-1,860	-1,672	-1,211
<b>133a</b>	-1,180	-1,121	-1,812	-1,712	-1,149
<b>133b</b>	-1,210	-1,152	-1,848	-1,733	-1,181
<b>134a</b>	-1,160	-1,081	-1,892	-1,759	-1,192
<b>134b</b>	-1,182	-1,096	-1,921	-1,773	-1,210
<b>135a</b>	-1,210	-1,126	-1,890	-1,741	-1,170
<b>135b</b>	-1,218	-1,154	-1,868	-1,744	-1,186
<b>136a</b>	-1,183	-1,095	-1,917	-1,806	-1,200
<b>136b</b>	-1,199	-1,116	-1,933	-1,785	-1,219
<b>137a</b>	-1,276	-1,214	-1,876	-1,694	-1,244
<b>137b</b>	-1,276	-1,214	-1,865	-1,749	-1,243
<b>138a</b>	-1,128	-1,053	-1,800	-1,619	-1,159
<b>138b</b>	-1,141	-1,071	-1,803	-1,593	-1,174
<b>139a</b>	-1,135	-1,069	-1,889	-1,749	-1,174
<b>139b</b>	-1,147	-1,084	-1,873	-1,728	-1,188
<b>122</b>	-0,506	-0,413	-1,369	-1,249	-0,520



**Slika 49.** Negativniji redoks potencijali 2,5-disupstituisanih derivata kao posledica veće destabilizacije intermedijernog semihinonskog radikal-anjona u odnosu na 2,6-disupstituisane derivate.

### 3.4. Ispitivanje biološke aktivnosti alkilamino i aralkilamino derivata hinona

Sposobnost inhibicije rasta ćelija pod dejstvom *terc*-butilhinonskih derivata upoređena je sa odgovarajućim avaronskim derivatima. Citotoksičnost je ispitana na nesitnoćelijskom karcinomu pluća – NCI-H460, njegovoj rezistentnoj varijanti – NCI-H460/R, kao i na normalnim ćelijama humanih keratinocita – HaCaT.

Inhibicija ćelijskog rasta je utvrđena MTT testom na ćelijama tretiranim 72 sata, a svi rezultati su prikazani u Tabeli 3 i na slici 50. Takođe, prikazani su i rezultati za polazne hinone, TBQ i avaron, kao i referentno jedinjenje CDDP (cisplatin), hemioterapeutik odobren od strane FDA za tretman nesitnoćelijskog karcinoma pluća.<sup>160</sup> CDDP je efikasnije delovao na rezistentne (NCI-H460/R) u poređenju sa osetljivim (NCI-H460) tumorskim ćelijama. Najveću efikasnost u pogledu citotoksičnog dejstva, CDDP je ostvario na normalnim humanim keratinocitima, što ukazuje na nepostojanje selektivnosti ka tumorskim ćelijama. TBQ je bio neaktivan u svim ćelijskim linijama, dok je avaron pokazao najbolji efekat na rezistentnim ćelijama. Derivati su pokazali uglavnom veću citotoksičnu aktivnost od polaznih hinona. Tretman avaronskim 2,6-disupstituisanim *sek*-butilamino i alilamino derivatima (**126a** i **124a**) dao je najniže IC<sub>50</sub> vrednosti (ispod 5 μM), a na njihovu aktivnost nije uticalo prisustvo rezistentnog fenotipa. Međutim, **126a** i **124a** nisu pokazali selektivnost ka tumorskim ćelijama delujući skoro istovetno i na tumorske, i na normalne ćelije.

**Tabela 3.** Citotoksična aktivnost avarona (**121**), *terc*-butilhinona (**122**) i njihovih derivata prema ćelijama nesitnoćelijskog karcinoma pluća (nerezistentnoj – NCI-H460 i rezistentnoj – NCI-H460/R formi) kao i normalnim humanim keratinocitima (HaCaT).

Jedinjenja	IC <sub>50</sub> (μM)			Jedinjenja	IC <sub>50</sub> (μM)		
	NCI-H460	NCI-H460/R	HaCaT		NCI-H460	NCI-H460/R	HaCaT
CDDP <sup>c</sup>	5,2 ± 0,4	1,7 ± 0,1	0,7 ± 0,1	CDDP <sup>c</sup>	5,2 ± 0,4	1,7 ± 0,1	0,7 ± 0,1
<b>121</b> <sup>a,c</sup>	84 ± 9	24 ± 4	37 ± 8	<b>122</b> <sup>c</sup>	>100	72 ± 8	95 ± 4
<b>124a</b>	2,8 ± 0,03	3 ± 0,1	3,5 ± 0,1	<b>131a</b>	25 ± 3	23 ± 4	10 ± 4
<b>124b</b>	18 ± 1,3	24,2 ± 0,7	19,2 ± 0,4	<b>131b</b>	63 ± 2	58 ± 2	28 ± 1
<b>125a</b> <sup>c</sup>	16 ± 2	6 ± 2	16 ± 4	<b>132a</b> <sup>a</sup>	13 ± 2	14 ± 5	30 ± 5
<b>125b</b> <sup>a,c</sup>	>100	>100	>100	<b>132b</b>	64 ± 2	65 ± 1	75 ± 4
<b>126a</b>	3,5 ± 0,04	3,8 ± 0,1	4 ± 0,1	<b>133a</b>	9,6 ± 0,1	12,6 ± 0,4	8,5 ± 0,4
<b>126b</b>	37,5 ± 1,1	44,4 ± 0,9	40,6 ± 2	<b>133b</b>	18,3 ± 0,6	21,8 ± 0,2	23,9 ± 0,7
<b>127a</b>	38 ± 3	35 ± 1	17 ± 7	<b>134a</b>	14 ± 3	13 ± 1	11 ± 2
<b>127b</b> <sup>a</sup>	>100	>100	>100	<b>134b</b> <sup>a,b</sup>	36 ± 1	72 ± 3	>100
<b>128a</b>	28,2 ± 3,7	20,4 ± 1,2	19,3 ± 0,8	<b>135a</b> <sup>a,b</sup>	10,5 ± 0,4	16,3 ± 1,3	24,4 ± 1,5
<b>128b</b> <sup>a</sup>	8,9 ± 1,5	7,1 ± 0,2	15,1 ± 0,3	<b>135b</b> <sup>a,b</sup>	36,6 ± 1,8	96,3 ± 3,9	72,5 ± 1,5
<b>129a</b> <sup>b</sup>	54,4 ± 2,2	26,3 ± 2,6	12 ± 1	<b>136a</b> <sup>a</sup>	20 ± 3	21 ± 3	30 ± 2
<b>129b</b>	>100	>100	42,2 ± 3,0	<b>136b</b> <sup>a</sup>	70 ± 1	65 ± 3	>100
<b>130a</b> <sup>a,c</sup>	21 ± 4	11 ± 1	23 ± 4	<b>137a</b> <sup>b</sup>	40,9 ± 0,4	65,9 ± 2,6	36,8 ± 4
<b>130b</b> <sup>a,c</sup>	>100	91 ± 1	>100	<b>137b</b> <sup>b</sup>	44,4 ± 4,0	85,7 ± 2,6	26,8 ± 2,4
				<b>138a</b> <sup>a,c</sup>	14 ± 2	10 ± 2	21 ± 1
				<b>138b</b> <sup>a,c</sup>	19 ± 4	15 ± 2	28 ± 2
				<b>139a</b> <sup>a,c</sup>	14 ± 1	6 ± 1	23 ± 2
				<b>139b</b> <sup>a</sup>	35 ± 3	33 ± 2	>100

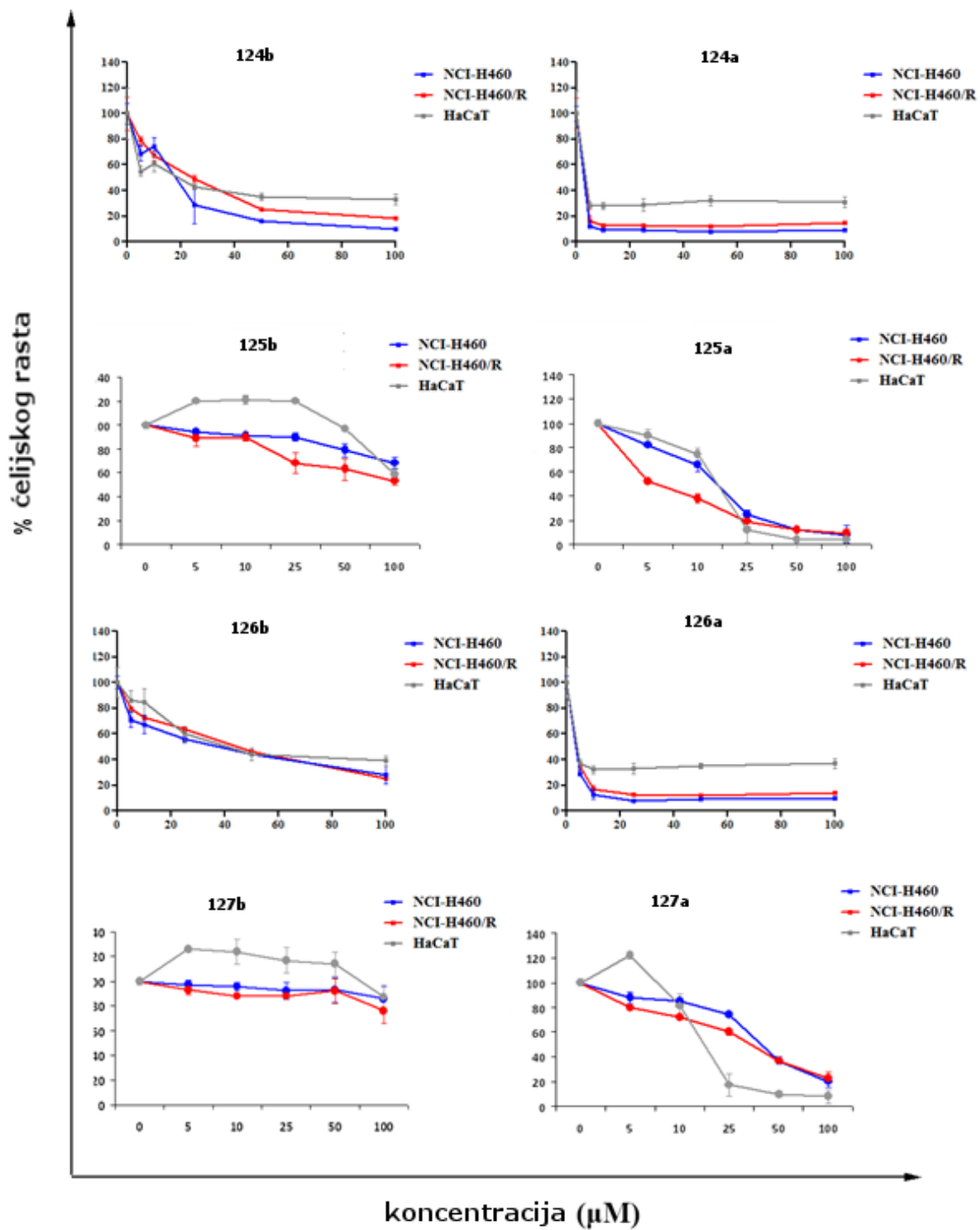
IC<sub>50</sub> vrednosti su izračunate iz minimalno tri nezavisna eksperimenta (prosečna vrednost ± standardna devijacija)

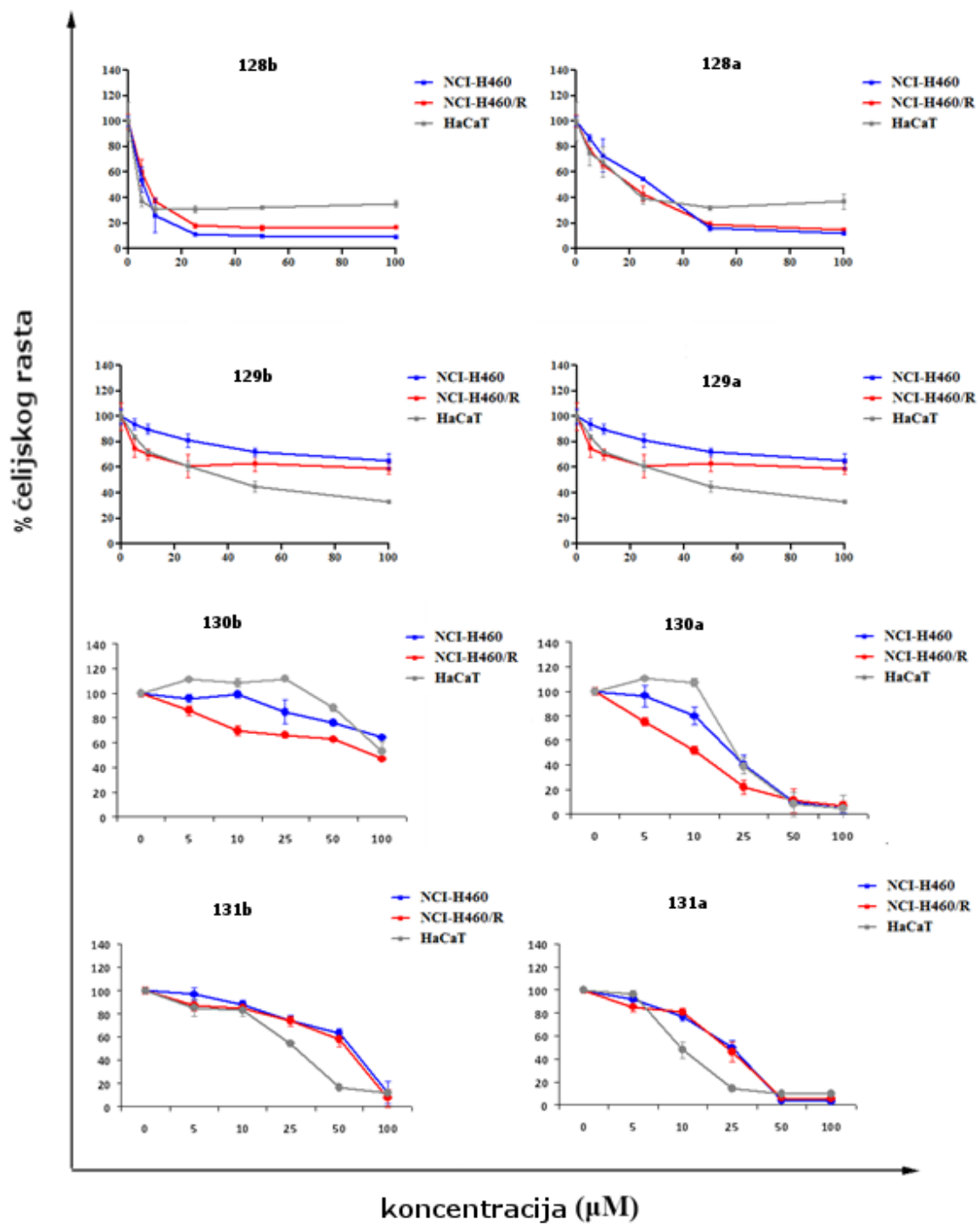
<sup>a</sup>Selektivnost prema ćelijama kancera (IC<sub>50</sub> vrednost bilo osetljivih ili rezistentnih tumorskih ćelija ≤ 1,5 puta od IC<sub>50</sub> normalnih ćelija. Dozno-zavisne krive inhibicije ćelijskog rasta su prikazane na slici 3)

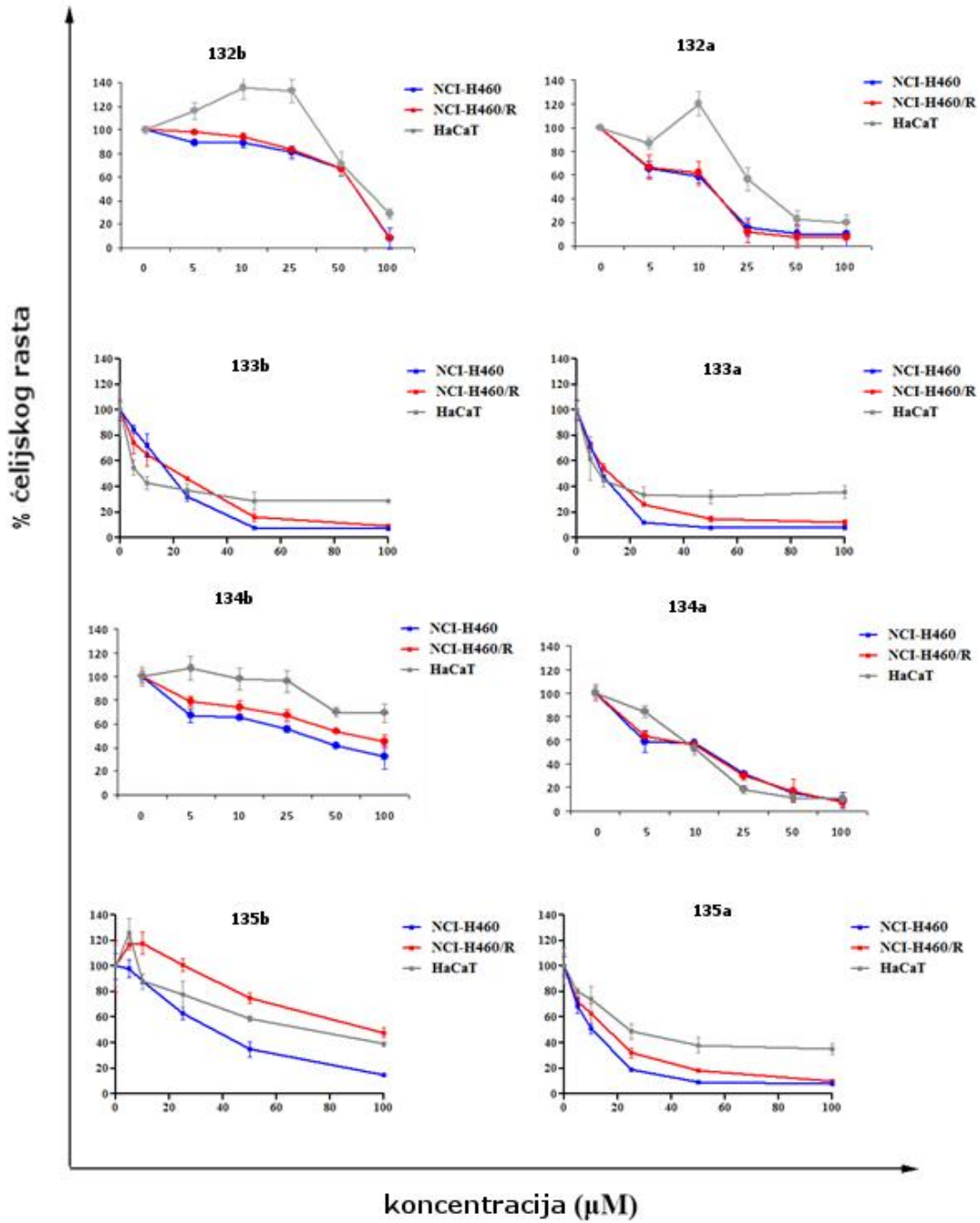
<sup>b</sup>Rezistencija (niža efikasnost u NCI-H460/R u poređenju sa NCI-H460) (IC<sub>50</sub> osetljivih tumorskih ćelija ≤ 1,5 puta od IC<sub>50</sub> odgovarajućih rezistentnih ćelija)

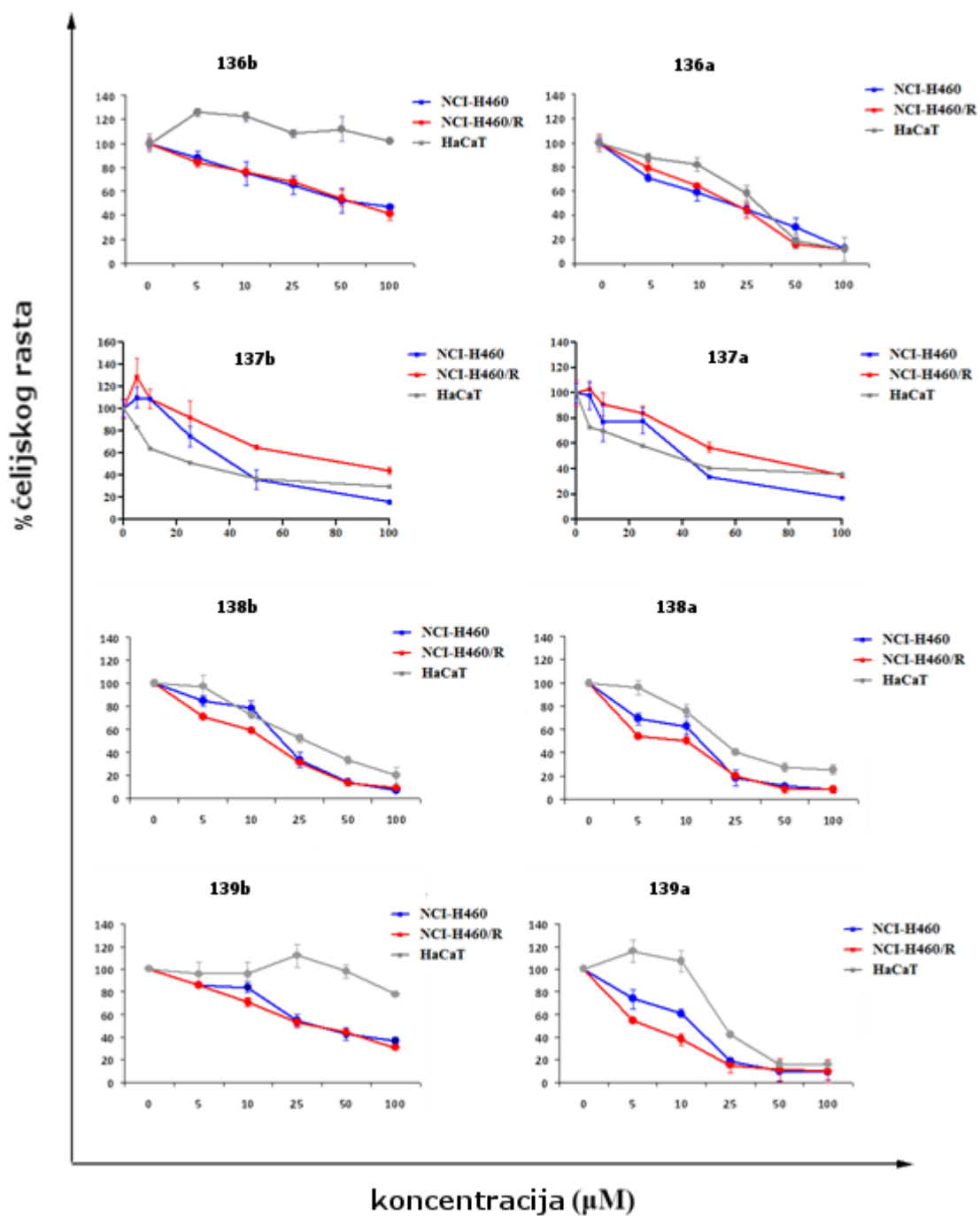
<sup>c</sup>Selektivnost prema rezistentnim ćelijama (veća efikasnost na NCI-H460/R u poređenju sa NCI-H460) (IC<sub>50</sub> osetljivih tumorskih ćelija ≥ 1,5 puta od IC<sub>50</sub> odgovarajućih rezistentnih ćelija)











**Slika 50.** Inhibicija ćelijskog rasta alkilamino i aralkilamino derivata polaznih hinona. Citotoksićni potencijal ispitan je MTT testom u tri ćelijske linije (NCI-H460, NCI-H460/R i HaCaT). Tretman je trajao 72 sata.

Odgovarajući 2,5-disupstituisani derivati **126b** i **124b** pokazali su odsustvo selektivnosti prema tumorskim ćelijama, s tim što je njihova aktivnost bila znatno slabija u odnosu na 2,6-pandane. Slično tome, 2,6-disupstituisani TBQ alilamino derivat **133a** sa  $IC_{50}$  vrednostima oko 10  $\mu$ M bio je efikasniji od svog regioizomera **133b**, ali takođe bez selektivnosti prema tumorskim ćelijama. Benzilamino avaronski derivat **129b** je bio najmanje aktivan u svim ćelijskim linijama, dok su  $IC_{50}$  vrednosti za odgovarajuće **129a** jedinjenje i dva pirolidinska TBQ derivata **137a** i **137b** bile iznad 25  $\mu$ M u tumorskim ćelijama. Ova četiri derivata su pokazala veću aktivnost u normalnim ćelijama. Jedinjenja **135a** i **128b** su pokazala dobar profil citotoksičnosti i selektivnosti prema tumorskim ćelijskim linijama, dok prisustvo rezistentnog fenotipa nije značajno umanjilo njihovu aktivnost.

Iako nije bilo moguće napraviti direktnu korelaciju između redoks osobina i citotoksičnosti derivata sa različitim supstuentima, potrebno je naglasiti da je od dva regioizomera, izomer sa manje negativnim katodnim potencijalom prvog talasa, tj. izomer koji lakše podleže formiranju semihinonskih radikala, po pravilu uvek bio aktivniji.

U TBQ seriji jedinjenja, 2,6-supstituisani derivati (**131–139a**) su uvek bili aktivniji prema tumorskim ćelijama od 2,5-supstituisanih analoga (**131–139b**). Uvođenje voluminozne *sek*-butilamino grupe u položaj 6 (derivat **135a**), tj. bliže *terc*-butil grupi, nije uticalo na aktivnost prema tumorskim ćelijama, ali je umanjilo toksičnost prema normalnim ćelijama, tako da je, u suprotnosti sa 6-(*n*-butilamino) derivatom (**134a**), odgovarajući *sek*-butilamino supstituisani hinon pokazao izraženu selektivnost prema ćelijskim linijama kancera. Ovakva aktivnost nije zabeležena za udaljeni 5-supstuent (**134b** i **135b**). Uvođenje alilamino grupe (derivati **133a** i **133b**) dalo je proizvode sa većom citotoksičnošću od sličnih derivata sa linearnim zasićenim alkilamino supstuentima, ali je izgubljena selektivnost koju je pokazao 6-(etilamino) derivat (**132a**).<sup>161</sup> 5-(Alilamino) i 5-(benzilamino) proizvodi (**133b** i **138b**) su bili jedini 5-supstituisani proizvodi koji su pokazali relativno visoku citotoksičnost, ali je samo benzilamino derivat pokazao selektivnost prema tumorskim ćelijama. Pirolidinski i metilamino derivati (**137a**, **137b**, **131a** i **131b**) su bili znatno aktivniji prema normalnim ćelijama nego prema ćelijama kancera. Fenetilamino derivat **139a** je pokazao najjaču aktivnost prema rezistentnim ćelijama kancera od svih TBQ derivata uz dobru selektivnost prema tumorskim ćelijama. Za nijansu slabiju selektivnost, uz gotovo identičnu antitumorsku aktivnost, pokazao je benzilamino derivat **138a**. Kada se razmotri čitava serija jedinjenja, za jaku citotoksičnu aktivnost prema tumorskim ćelijama potrebno je prisustvo nezasićenog ili

voluminoznog supstituenta u poziciji 6. Za postizanje selektivnosti set supstituenata je sužen na voluminozne grupe, štaviše na aralkil grupe (benzilamino, fenetilamino) ako se uzme u obzir selektivnost prema rezistentnim ćelijama.

Što se tiče avaronskih derivata, 3'-derivati (2,6-supstitucija, derivati **124–130a**) bili su uvek aktivniji od 4'-derivata (2,5-supstitucija, derivati **124–130b**), uz izuzetak pirolidinskih derivata (**128a** i **128b**), gde važi obrnuto. Unutar ove serije, uvođenje grananja ili nezasićenja u alkilamino supstituent povećalo je citotoksičnost bez obzira na položaj supstituenta. Derivati 3'-(*sek*-butilamino)avaron (**126a**) i 3'-(alilamino)avaron (**124a**) su pokazali IC<sub>50</sub> vrednosti u opsegu 3–4 μM. Nažalost, selektivnost prema rezistentnim ćelijama, koju je pokazao 3'-(*n*-butilamino)avaron se izgubila.<sup>161</sup> Benzilamino derivati (**129a** i **129b**) su bili manje aktivni prema tumorskim ćelijama od fenetilamino derivata (**130a** i **130b**). 4'-Pirolidinski derivat (aktivniji regioizomer **128b**) pokazao je značajnu citotoksičnost na tumorskim ćelijama, sa IC<sub>50</sub> vrednošću 7,1 μM na rezistentnim ćelijama, kao i dobru selektivnost. 3'-Derivat **128a** pokazao je umerenu aktivnost, bez selektivnosti. Sumirajući ove rezultate može se izvući sledeći zaključak: neophodni preduslov da avaronski derivat ima visoku aktivnost prema tumorskim ćelijama je supstituent sa relativno niskim brojem C-atoma u položaju 3' ili pirolidin u položaju 4'. Samo nerazgranati zasićeni butilamino derivat i heterociklični pirolidinski derivat su pokazali odgovarajuću selektivnost.

### 3.5. Analiza tipa ćelijske smrti

Štetno delovanje fizičkih i hemijskih agenasa često ima za posledicu ćelijsku smrt. Dva dominantna tipa ćelijske smrti su apoptoza i nekroza. Nekroza je ATP-nezavisna i praćena je povećanjem zapremine ili tzv. oticanjem ćelijskih organela i same ćelije, kondenzacijom hromatina, gubitkom gradijenta jona, povećanom propustljivošću uz gubitak integriteta ćelijske membrane i ispuštanjem sadržaja citosola u ćelijsko okruženje.<sup>162</sup> Apoptoza je proces koji zahteva izvesnu količinu ATP-a, tj. utrošak energije i praćena je smanjenom zapreminom tzv. skupljanjem ćelije, takođe kondenzacijom hromatina, fragmentacijom DNK i aktivacijom kaspaza. U početnoj fazi integritet plazma membrane nije narušen, ali dolazi do strukturnih promena u membrani apoptotičnih ćelija.<sup>163</sup>

Apoptoza i nekroza mogu imati i zajedničke osobine u zavisnosti od tipa ćelije i agenasa odgovornog za ćelijsku smrt. Tako na primer, propustljivost mitohondrijske membrane, koja je rezultat otvaranja pora u unutrašnjoj membrani mitohondrija, može biti

izmenjena i apoptozom i nekrozom.<sup>164</sup> Pored toga, oba tipa ćelijske smrti karakteriše fragmentacija DNK.

Postojanje višestrukih puteva ćelijske smrti stvorilo je potrebu za razvojem različitih metoda za identifikaciju tipa ćelijske smrti. Jedan od najboljih markera ćelijske smrti je narušen integritet ćelijske membrane. Propustljivost plazma membrane se najčešće procenjuje nakupljanjem propidijum-jodida (PI) u ćeliji, jer je očuvana membrana nepropustljiva za ovu boju.<sup>165,166</sup>

Protočna citometrija omogućava određivanje tipa ćelijske smrti na osnovu istovremenog obeležavanja ćelija u uzorcima aneksin V–FITC i PI. Aneksin V se vezuje za fosfatidilserin, fosfolipid koji se premešta sa unutrašnje na spoljašnju stranu membrane relativno rano u procesu apoptoze. Nekroza se detektuje merenjem propustljivosti plazma membrane za PI koji se vezuje za DNK ćelija sa oštećenom membranom.

Sposobnost indukovanja ćelijske smrti *terc*-butilhinonskih i avaronskih derivata pri koncentraciji 25  $\mu\text{M}$  analizirana je 72 sata nakon tretiranja ćelija i upoređena sa polaznim jedinjenjima TBQ i avaronom, kao i kontrolnim jedinjenjem, CDDP-om (Tabela 4, slika 51).

Oba pirolidinska *terc*-butilhinonska derivata (**137a** i **137b**) su pokazala značajnu aktivnost prema osetljivim ćelijama NCI-H460 (Tabela 4A) indukujući i apoptozu i nekrozu, što nije zabeleženo kod rezistentnih NCI-H460/R ćelija (Tabela 4B), kao ni kod normalnih HaCaT ćelija (Tabela 4C). Alilamino derivati **133a** i **133b** indukovali su apoptotski tip ćelijske smrti u obe tumorske ćelijske linije (Tabela 4A, B) u poređenju sa normalnim ćelijama (Tabela 4C), pokazujući izuzetnu selektivnost ka tumorskim ćelijama. Ovaj rezultat nije u skladu sa  $\text{IC}_{50}$  vrednostima dobijenim u testu citotoksičnosti, gde praktično ne postoji selektivnost (Tabela 3). Međutim, na slici 50 se jasno vidi da pri višim koncentracijama (iznad 20  $\mu\text{M}$ ) **133a** i **133b** imaju značajno bolji efekat na tumorskim u odnosu na normalne ćelije. *sek*-Butilamino derivati **135a** i **135b** su takođe indukovali apoptozu, najefikasnije u NCI-H460 ćelijama (Tabela 4A) što je u skladu sa njihovim citotoksičnim efektom (Tabela 3).

Tumorske ćelije tretirane avaronskim pirolidinskim derivatima **128a** i **128b** predominantno su podlegle nekrozi (Tabela 4A, B). Na taj način potvrđena je razlika u efikasnosti **128a** i **128b**. Oba jedinjenja su pokazala izuzetnu selektivnost neznatno

indukujući smrt normalnih ćelija (Tabela 4C). Jedinjenja **124a** i **124b** (alilamino derivati avarona) takođe su predominantno indukovala nekrozu u tumorskim ćelijama pri čemu je **124a** bio značajno potentniji (Tabela 4A, B). I u slučaju **124a** i **124b** primena koncentracije od 25  $\mu$ M je pokazala selektivnost ka tumorskim ćelijama i slabiju efikasnost kod normalnih ćelija (Tabela 4C) iako test citotoksičnosti nije utvrdio selektivnost ovih derivata. Međutim, na slici 50 se uočava da postoji selektivnost **124a** i **124b**, ali tek pri višim koncentracijama od onih koje izazivaju 50% inhibicije ćelijskog rasta. *sek*-Butilamino derivat **126a** je pokazao veći potencijal za indukciju nekroze, u odnosu na **126b** (Tabela 4A, B). Derivat **126a** je

**Tabela 4A.** Indukcija ćelijske smrti pod dejstvom novih derivata upoređena sa dejstvom polaznih hinona **121** i **122** i kontrolnog jedinjenja (CDDP) u NCI-H460 ćelijama.

	Žive	Rana	Kasna	Nekroza
	ćelije	apoptoza	apoptoza	
	AV-PI-	AV+PI-	AV+PI+	AV-PI+
kontrola	95,5	2	1,1	1,3
<b>CDDP</b>	66	1,6	5,2	27,2
<b>121</b>	74	3,4	16,3	6,3
<b>122</b>	95,2	0,5	0,5	3,8
<b>124a</b>	28,6	12,5	18	40,9
<b>124b</b>	72,1	3,5	7	17,4
<b>126a</b>	53,9	6,6	5,7	33,8
<b>126b</b>	81,4	0,7	3,9	13,9
<b>127a</b>	95,7	0,1	0,3	3,9
<b>127b</b>	95,1	0	0,3	4,6
<b>128a</b>	83,6	2	3,5	10,9
<b>128b</b>	31	3,4	10	55,6
<b>130a</b>	71,7	0,1	0,2	28
<b>130b</b>	92	0,3	0,5	7,2
<b>133a</b>	5,1	24,9	61,4	8,6
<b>133b</b>	4,9	23,1	63,9	8,1
<b>135a</b>	43,8	21,9	28,2	6,1
<b>135b</b>	85,6	3,5	4,9	6
<b>136a</b>	54,9	0,2	2,9	42
<b>136b</b>	80,9	0,1	1,7	17,3
<b>137a</b>	67,4	4,7	11,4	16,5
<b>137b</b>	51	5,3	18,1	25,6
<b>139a</b>	66,1	2,4	9,5	22
<b>139b</b>	80,8	0,8	5,4	13



slično kao **133a**, **133b**, **124a** i **124b** pokazao selektivnost ka tumorskim ćelijama pri višim koncentracijama, što potvrđuje analiza ćelijske smrti (Tabela 4A, B i C), kao i profili inhibicije ćelijskog rasta (slika 50). Fenetilamino i *n*-oktilamino derivati, kako avaronski tako i *terc*-butilhinonski, uglavnom su indukovali nekrozu, pri čemu su 2,6-disupstituisani derivati bili uvek aktivniji. Pored toga, TBQ derivati **136a** i **139a** su pokazali dobru selektivnost prema tumorskim ćelijama (Tabela 4A, B i C), fenetilamino više prema rezistentnim NCI-H460/R, a *n*-oktilamino prema osetljivim NCI-H460 ćelijskim linijama, što je u saglasju sa rezultatima dobijenim ispitivanjem citotoksičnosti (Tabela 3).

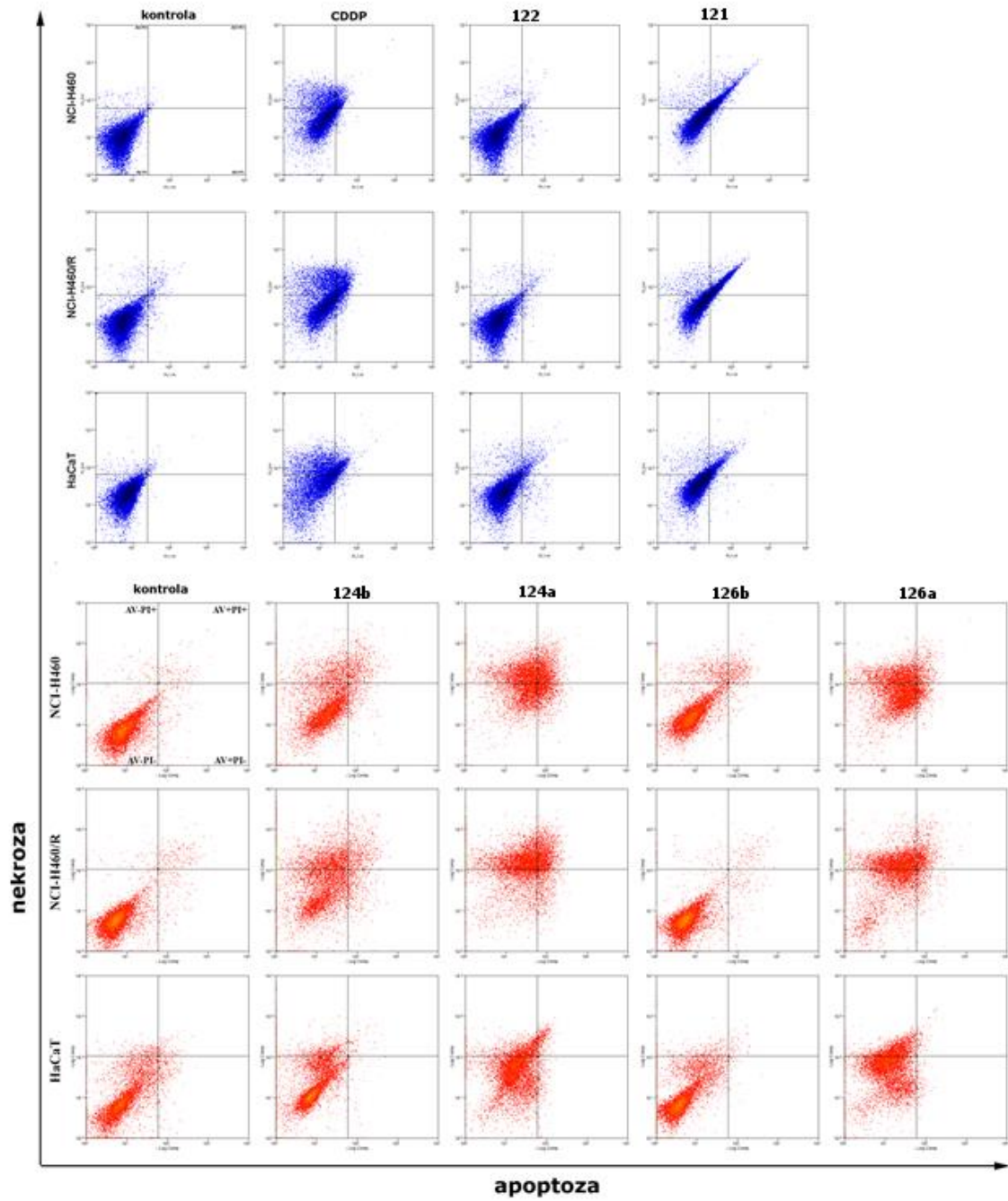
**Tabela 4B.** Indukcija ćelijske smrti pod dejstvom novih derivata upoređena sa dejstvom polaznih hinona **121** i **122** i kontrolnog jedinjenja (CDDP) u NCI-H460/R ćelijama.

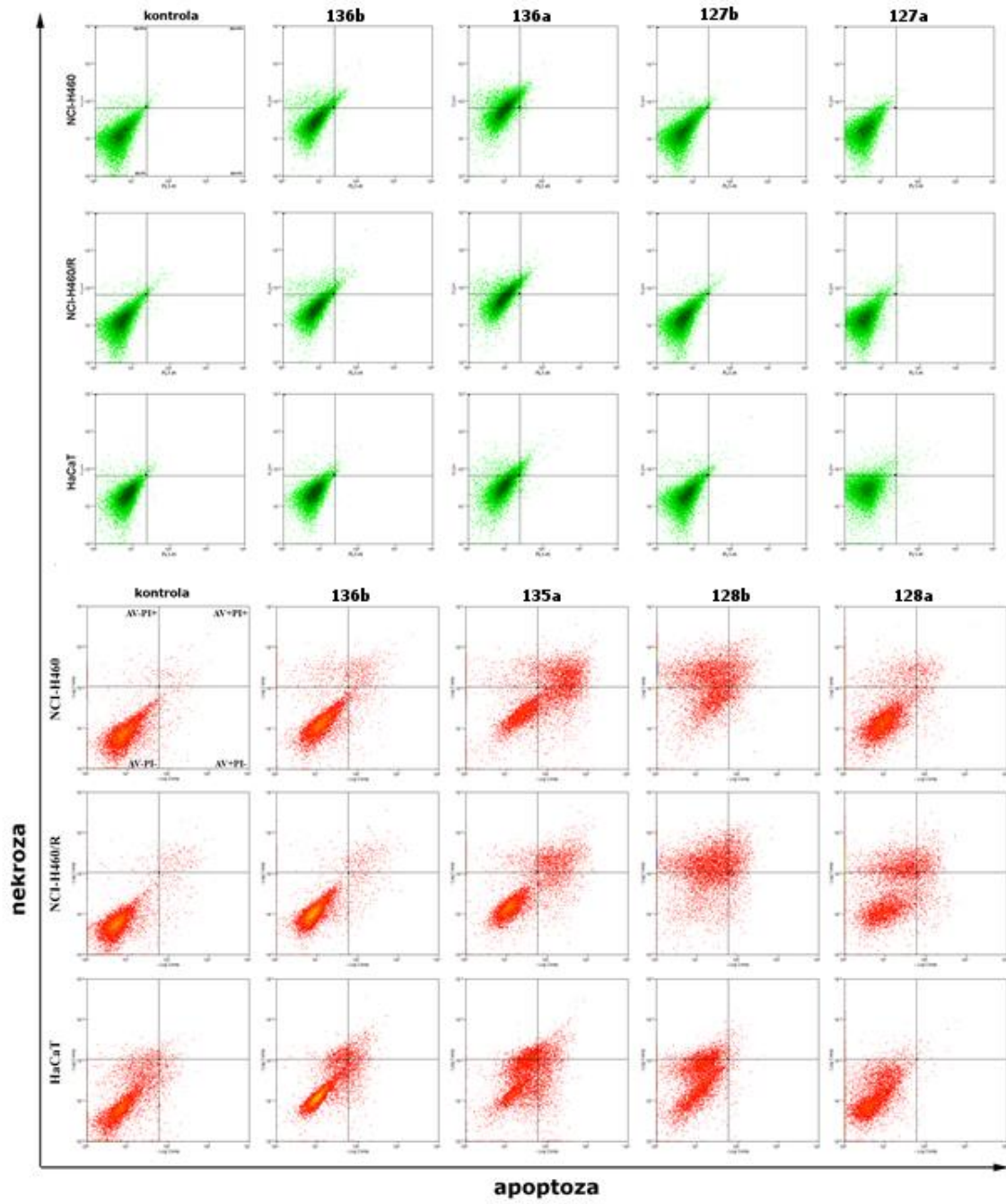
	Žive	Rana	Kasna	Nekroza
	ćelije	apoptoza	apoptoza	
	AV-PI-	AV+PI-	AV+PI+	AV-PI+
kontrola	95,6	1,6	1,9	0,9
<b>CDDP</b>	55,3	3,8	13,3	27,6
<b>121</b>	65,8	2,6	22,7	8,9
<b>122</b>	95,2	0,5	1,2	3,1
<b>124a</b>	21,7	6,6	19,2	52,5
<b>124b</b>	55,1	4,4	7,1	33,4
<b>126a</b>	38,4	3,8	9,8	48
<b>126b</b>	96,3	1,5	1,4	0,8
<b>127a</b>	92,6	0	0,1	7,3
<b>127b</b>	96,1	0,1	0,7	3,1
<b>128a</b>	58,7	5,2	7,7	28,4
<b>128b</b>	26,9	3,9	10,9	58,3
<b>130a</b>	53	1,2	3,5	42,3
<b>130b</b>	94,9	0,4	0,6	4,1
<b>133a</b>	7,3	4,1	64,4	24,2
<b>133b</b>	11,8	6,3	63,4	18,5
<b>135a</b>	68,4	9,2	17,5	4,9
<b>135b</b>	93	2,3	3,2	1,5
<b>136a</b>	61,4	0,1	2,1	36,4
<b>136b</b>	83,9	0,2	1,9	14
<b>137a</b>	91,8	2	4,1	2,1
<b>137b</b>	84,8	2	5,5	7,7
<b>139a</b>	45,9	2	11,8	40,3
<b>139b</b>	81	1,3	3,6	14,1

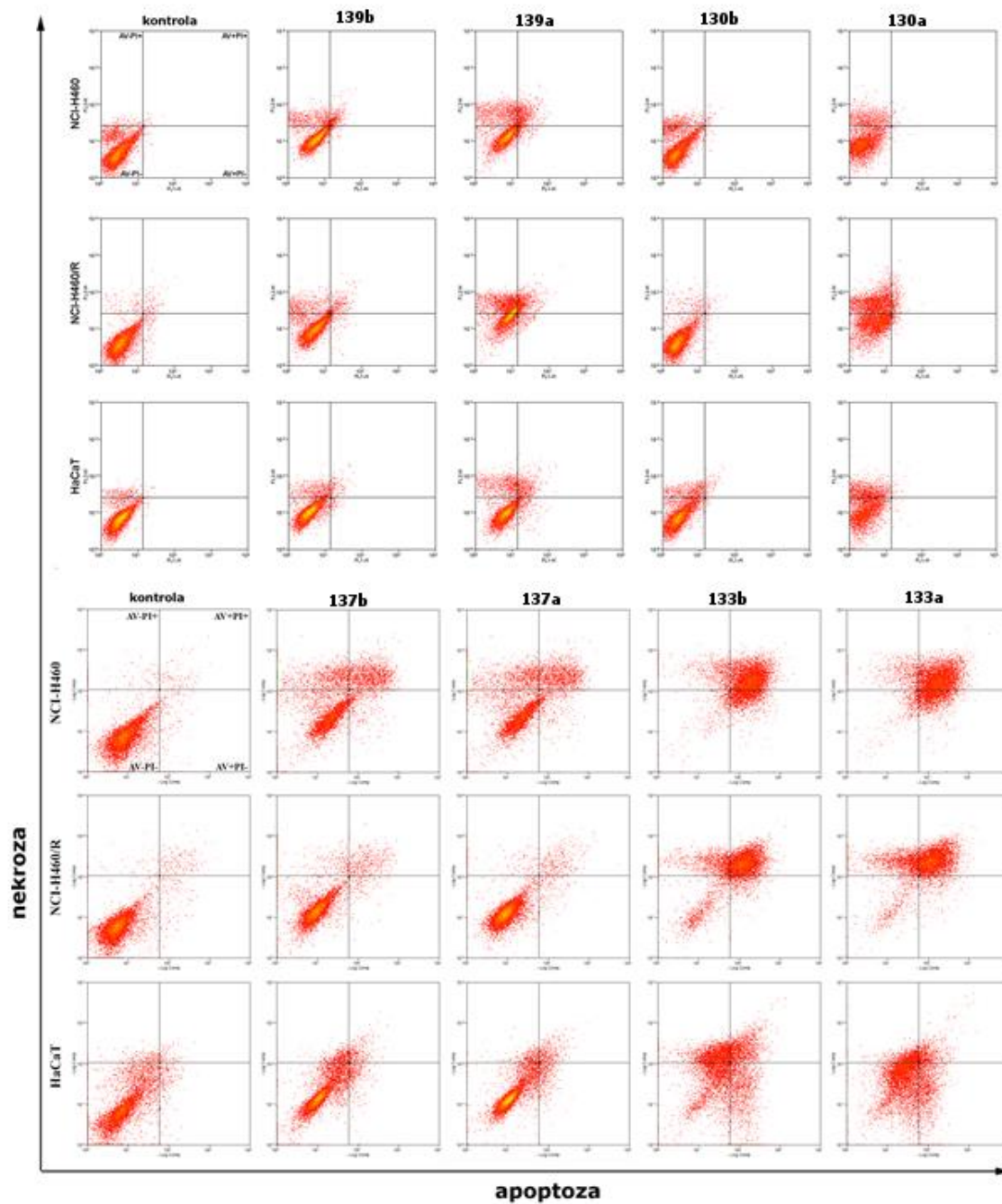
Tip ćelijske smrti koji indukuju jedinjenja **133a** i **133b** značajno se razlikuje od ostalih jedinjenja. Dok većina derivata indukuje nekrozu, **133a** i **133b** uvode ćelije u apoptozu. Kasna apoptoza je procentualno najzastupljenija zbog dugotrajnog tretmana koji je trajao 72 sata. Značajna detekcija rane apoptoze iziskuje analizu rezultata nakon kraćeg perioda izlaganja dejstvu **133a** i **133b**. Važan rezultat predstavlja i uočena selektivnost ka tumorskim ćelijama, pogotovo u slučaju **133a**. Ovakva razlika u aktivnosti može se

**Tabela 4C.** Indukcija ćelijske smrti pod dejstvom novih derivata upoređena sa dejstvom polaznih hinona **121** i **122** i kontrolnog jedinjenja (CDDP) u HaCaT ćelijama.

	Žive ćelije	Rana apoptoza	Kasna apoptoza	Nekroza
	AV-PI-	AV+PI-	AV+PI+	AV-PI+
kontrola	93,6	2,9	1	2,4
<b>CDDP</b>	53,5	1,4	9	36,1
<b>121</b>	78,3	2,5	10,1	9,1
<b>122</b>	86,8	1,9	3,8	7,5
<b>124a</b>	73,8	2,4	4,1	19,7
<b>124b</b>	89,3	0,6	0,8	9,3
<b>126a</b>	72,3	1,1	1	25,6
<b>126b</b>	95,7	0,5	0,6	3,2
<b>127a</b>	85,3	0,3	0,6	13,8
<b>127b</b>	93,4	0,1	0,7	5,8
<b>128a</b>	97,2	0,3	0,3	2,2
<b>128b</b>	83,7	0,9	1,1	14,3
<b>130a</b>	58,1	0,2	0,4	41,3
<b>130b</b>	89,5	0,3	1	9,2
<b>133a</b>	61,5	15,9	8,1	14,5
<b>133b</b>	33,5	18,8	18,9	28,8
<b>135a</b>	64	14,2	9,7	12,1
<b>135b</b>	82	6,8	5,5	5,7
<b>136a</b>	77	0,6	2,6	19,8
<b>136b</b>	93,8	0	0,5	5,7
<b>137a</b>	85,9	4,8	4,9	4,4
<b>137b</b>	85,3	4,9	4	5,8
<b>139a</b>	74,8	4,1	6,9	14,2
<b>139b</b>	89,2	0,8	1,7	8,3







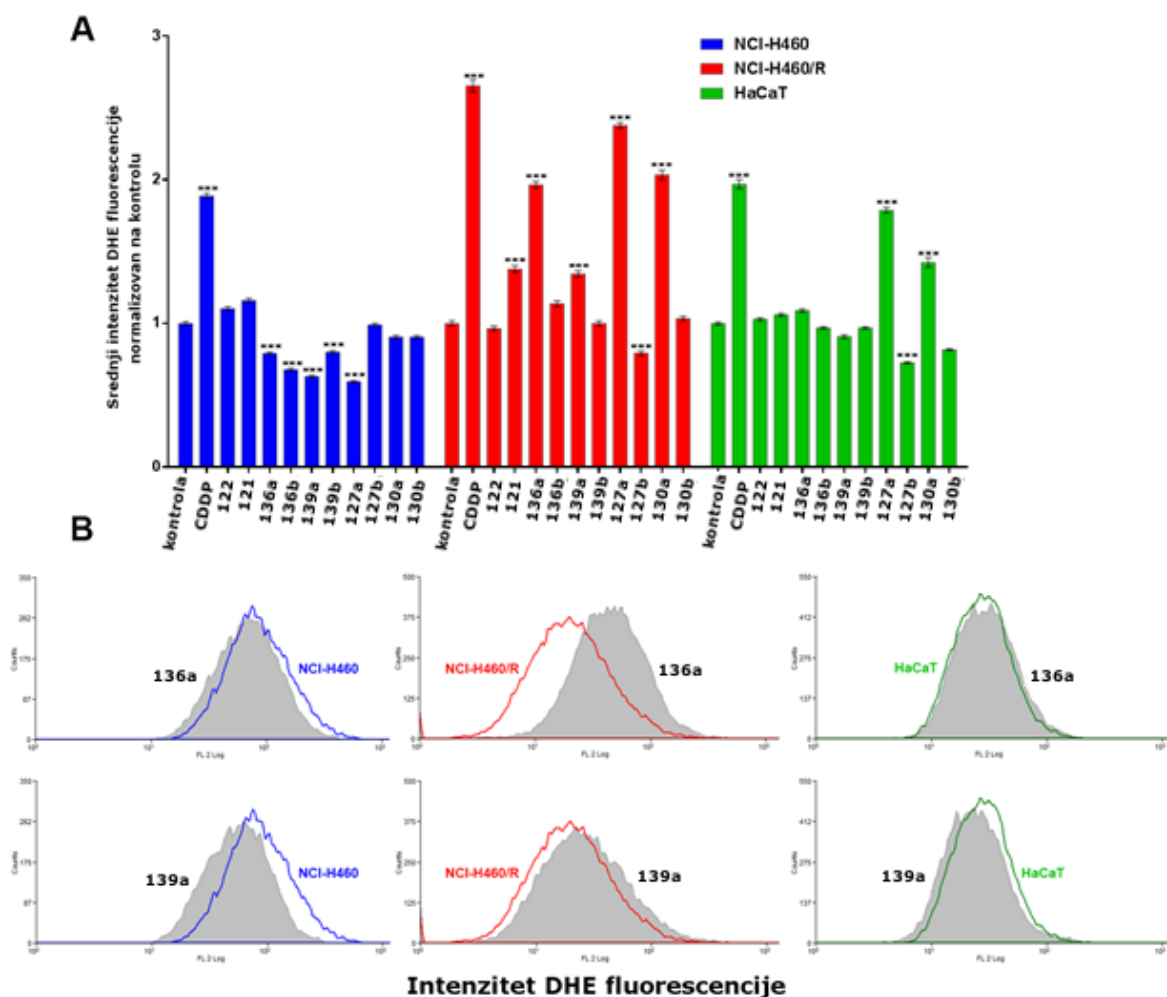
**Slika 51.** Indukcija ćelijske smrti pod dejstvom polaznih hinona i njihovih derivata: tip ćelijske smrti ispitivan je protočnom citometrijom (AV/PI) bojenje. Test razlikuje žive ćelije (AV-PI-), ćelije u ranoj apoptozi (AV+PI-), ćelije u kasnoj apoptozi i nekrozi (AV+PI+) i već mrtve ćelije (AV-PI+).

pripisati alil ostatku. Verovatni razlog je dodatno generisanje ROS-a preko alil radikala, formiranog razgradnjom semihinonskog radikala generisanog jednoelektronskom redukcijom alilaminohinona (drugi proizvod je aminohinon) i/ili formiranje citotoksičnog akroleina oksidativnim metabolizmom alilaminohinona.<sup>167</sup> Uzevši u obzir da alilamino TBQ derivati preferencijalno indukuju apoptozu, i da tumorske ćelije imaju poremećen redoks status u odnosu na normalne ćelije,<sup>168</sup> ovo se čini kao moguće objašnjenje za selektivnost.

### 3.6. Detekcija superoksidnog anjona

Superoxidni anjon ( $O_2^-$ ), predstavlja jednu od zastupljenijih reaktivnih kiseoničnih vrsta, a nastaje kao proizvod jednoelektronske redukcije molekuskog kiseonika. Ova kiseonična vrsta učestvuje u prenosu signala unutar ćelije, i obično njegova povišena koncentracija u ćeliji ukazuje na oksidativni stres.<sup>169</sup> Od superoksidnog anjona nastaju druge reaktivne vrste kao što su vodonik-peroksid i hidroksilni radikal ( $\cdot OH$ ), kao i reaktivne azotove vrste (RNS).<sup>170-172</sup> Unutarćelijski nivo  $O_2^-$  je vezan za različite procese u tumorskim ćelijama, kao što su nekontrolisana proliferacija ćelija, odgovor na signale koji bi ćeliju trebalo da uvedu u apoptozu, ali i druge patologije uključujući kardiovaskularne bolesti i dijabetes.<sup>173-176</sup> Teško je detektovati i kvantifikovati  $O_2^-$  zbog njegovog kratkog polživota (nekoliko sekundi), brzog prevođenja u druge reaktivne vrste i brze reakcije sa različitim intra- i ekstracelularnim sakupljačima (engl. „scavengers“)  $O_2^-$  kao što je antioksidativni enzim superoksid-dismutaza (SOD), ali i antioksidativni vitamini C i E, glutation i azot-monoksid (NO).<sup>177</sup>

Od 90-ih godina prošlog veka fluorescencija koja potiče od oksidacije dihidroetidijuma (DHE) se koristi za ispitivanje nivoa  $O_2^-$ .<sup>178</sup> Proizvodi oksidacije dihidroetidijuma superoksidnim anjonom su dobro proučeni. U prisustvu  $O_2^-$ , DHE se oksiduje do 2-hidroksietidijuma (EOH) i intermedijernih proizvoda. Ovi intermedijerni proizvodi mogu reagovati sa hidroksilnim radikalom ili vodonik-peroksidom, i dati etidijum ( $E^+$ ). Dobijanje 2-hidroksietidijuma u reakciji DHE sa superoksidnim anjonom je reakcija specifična za  $O_2^-$ , što je jasno pokazano visokoefikasnim tečnohromatografskim (HPLC) studijama. 2-Hidroksietidijum se, poput etidijuma, vezuje za DNK, formirajući stabilan kompleks koji pokazuje crvenu fluorescenciju pod rodaminskim filterom. Fluorescencija EOH meri se na talasnim dužinama ekscitacije 480 nm, a emisije 580-590 nm.



**Slika 52.** Uticaj hinonskih derivata na proizvodnju superoksidnog anjona. Srednja DHE fluorescencija očitana je u tri ćelijske linije tretirane sa 5  $\mu\text{M}$  CDDP-a i 25  $\mu\text{M}$  **122**, **121**, **136a**, **136b**, **139a**, **139b**, **127a**, **127b**, **130a** i **130b** na protočnom citometru (A). Statistički značajna razlika u odnosu na odgovarajuću netretiranu kontrolu:  $p < 0,001$  (\*\*\*) . Profil protočne citometrije ćelija tretiranih i netretiranih sa 25  $\mu\text{M}$  **136a** i **139a** (B).

Dobijeni rezultati ukazuju na značajan potencijal 2,6-disupstituisanih derivata (**136a**, **127a**, **139a** i **130a**) za generisanje superoksidnog anjona u rezistentnim tumorskim ćelijama NCI-H460/R, dok 2,5-disupstituisani derivati (**136b**, **127b**, **139b** i **130b**) nisu pokazali prooksidativnu aktivnost (slika 52A). Efekat je bio izraženiji kada su primenjeni avaronski derivati (**127a** i **130a**, slika 52A). Veća aktivnost 2,6-disupstituisanih jedinjenja ne može biti direktno pripisana razlikama u redoks osobinama, s obzirom na to da ne postoji značajna razlika u njihovim elektrohemijskim parametrima ( $E^{\circ}_1$  je negativniji za 2,5-disupstituisane



derivate za svega 0,01–0,02 V). Samim tim, povećanje nivoa ROS-a može biti posledica promena aktivnosti antioksidativnih enzima. Kao što je ranije naglašeno,<sup>179</sup> rezistentne tumorske ćelije (NCI-H460/R) imaju niži antioksidativni kapacitet od svog osetljivog pandana (NCI-H460). Pre svega, ekspresija MnSOD enzima (odgovornog za metabolizam superoksidnog anjona) je značajno smanjena u NCI-H460/R ćelijama. Kao posledica toga, jedinjenja **136a**, **139a** i **127a** su pokazala različiti obrazac delovanja u NCI-H460 ćelijama snižavanjem nivoa superoksidnog anjona, što je u skladu sa ranijim nalazima da *tert*-butilhidrohinon deluje kao sakupljač  $O_2^{\cdot-}$ .<sup>180</sup>

Mehanizam odgovoran za različit način delovanja u osetljivim i rezistentnim tumorskim ćelijama biće predmet daljih proučavanja.

U normalnim ćelijama, *tert*-butilhinonski derivati **136a** i **139a** nisu promenili sadržaj superoksidnog anjona, dok su odgovarajući avaronski derivati **127a** i **130a** povećali njegov sadržaj, ali je prooksidativni efekat slabiji od onog postignutog u rezistentnim ćelijama. Kontrolno jedinjenje **121** je takođe imalo prooksidativno dejstvo u rezistentnim ćelijama, dok je CDDP indukovao povećanje  $O_2^{\cdot-}$  u svim testiranim ćelijskim linijama. Reprezentativni profili fluorescencije DHE indukovane derivatima **136a** i **139a** prikazani su na slici 52B.

### 3.7. Detekcija gubitka membranskog potencijala mitohondrija (JC-1 test)

Pored regulacije fundamentalnih ćelijskih procesa, kao što su respiracija i oksidativna fosforilacija, mitohondrije takođe učestvuju u aktivaciji apoptoze.<sup>181</sup> Oslobođanje citohroma *c* iz mitohondrija je centralni događaj u inicijaciji apoptoze, koji indukuje sklapanje apoptozoma potrebnog za aktivaciju kaspaza.<sup>182,183</sup>

Potencijal membrana mitohondrija ( $\Delta\Psi_m$ ) je vitalan za proizvodnju ATP-a i veliki pad  $\Delta\Psi_m$  obično dovodi do smrti ćelije.  $\Delta\Psi_m$  i nivoi ROS-a daju važan uvid u fiziološko stanje ćelije i dobri su indikatori nefunkcionalnih mitohondrija i oksidativnog stresa.

Mitohondrije generišu ATP korišćenjem gradijenta elektrohemijskog potencijala protona, koji se stvara serijskim redukcijama elektronima kroz respiratorni elektron-transportni lanac (ETC). Reduktivni transfer elektrona kroz ETC proteinske komplekse I-IV na unutrašnjoj mitohondrijskoj membrani obezbeđuje energiju za pomeranje protona nasuprot gradijenta koncentracije kroz unutrašnju membranu mitohondrija (van mitohondrijske citoplazme). Ovo dovodi do akumulacije  $H^+$  van membrane, koji se potom vraćaju nazad u



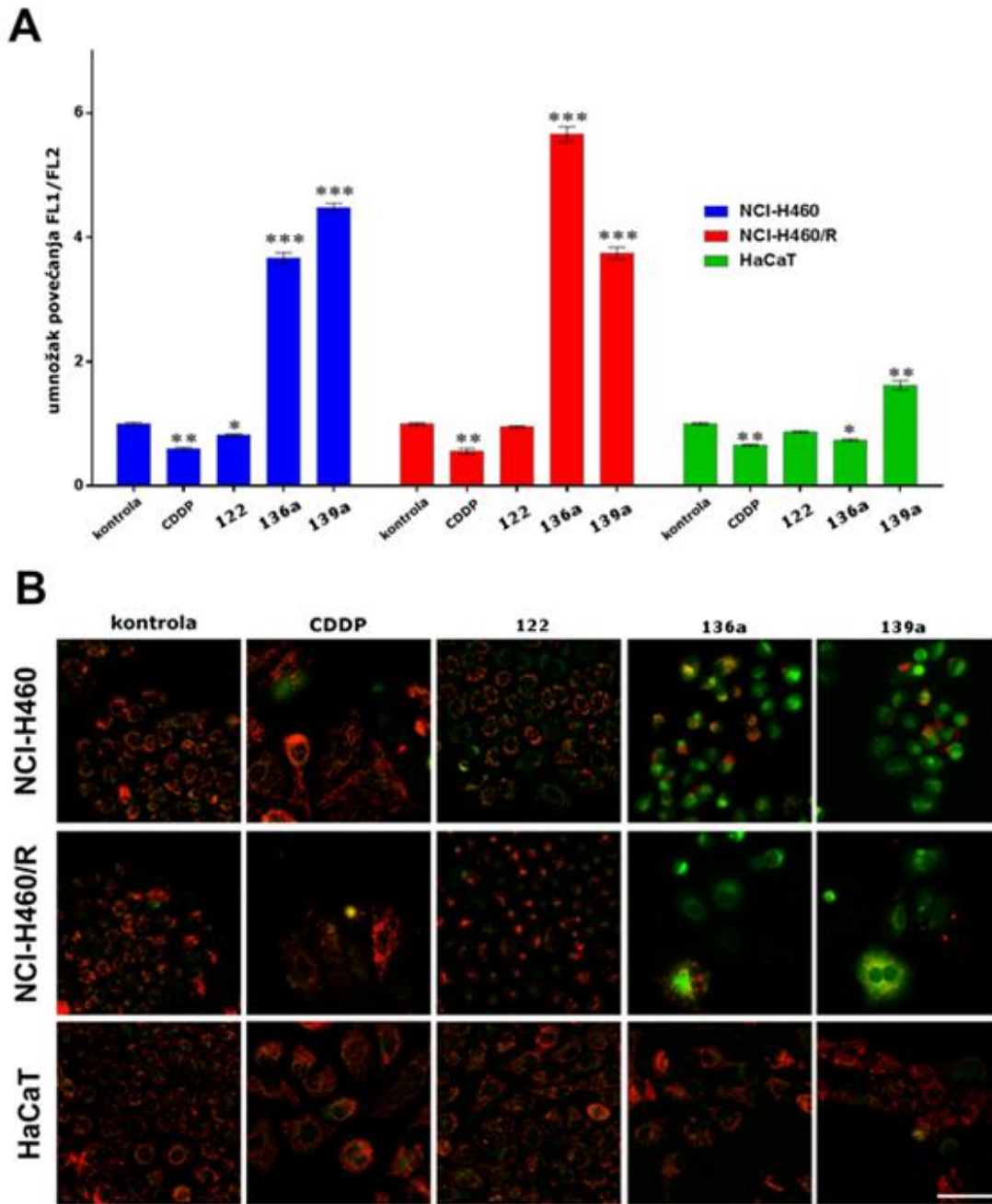
mitochondriju dejstvom  $F_1/F_0$  ATP-sintaze (kompleks V), čime se proizvodi ATP i kompletira ETC. Pokretačka snaga koja vraća protone u mitochondriju (tj.  $\Delta p$ ) je kombinacija membranskog potencijala mitochondrija ( $\Delta\Psi_m$ , električni gradijent) i mitochondrijskog gradijenta pH ( $\Delta pH_m$ , hemijski gradijent). Zajedno, ovi faktori omogućavaju mitochondrijama kontrolu nad energetskim metabolizmom, homeostazom jona, kao i nad ćelijskom smrću. Dok  $\Delta p$  obezbeđuje bioenergetsku pokretačku snagu za proizvodnju ATP-a i kontrolu proizvodnje ATP-a,  $\Delta\Psi_m$  obezbeđuje gradijent naelektrisanja koji je potreban za sekvestraciju  $Ca^{2+}$  jona, i reguliše proizvodnju ROS-a, i samim tim je centralni regulator zdravlja ćelije.<sup>184</sup>

Tokom stresa,  $\Delta\Psi_m$  može biti izmenjen promenama koncentracije jona ( $Ca^{2+}$  ili  $K^+$ ), čime se menja  $\Delta p$  i time proizvodnja ATP-a. Kada fluks jona nadvlada sposobnost mitochondrija da neutrališu ove promene, dolazi do kolapsa  $\Delta p$  ili  $\Delta\Psi_m$  i prestanka proizvodnje ATP-a i bioenergetskog stresa.

Za jedinjenja iz klase *p*-benzohinona je zabeleženo da narušavaju membranski potencijal mitochondrija u hepatocitima pacova i formiraju ROS u PC12 ćelijama.<sup>185</sup> *terc*-Butilhidrohinon i *terc*-butilhinon, koji su pokazali veliki antitumorski potencijal,<sup>186</sup> smanjuju membranski potencijal mitochondrija, narušavaju njihovu strukturu, dovode do oslobađanja citohroma *c* iz mitochondrija, aktiviraju kaspaze koje indukuju cepanje poli(ADP-riboza)-polimeraze kod ćelija akutne mijeloidne leukemije U937.<sup>156</sup>

Poslednjih godina fluorescentne boje za merenje membranskog potencijala mitochondrija ( $\Delta\Psi_m$ ) su postale uobičajeni alati za praćenje promena ovog važnog fiziološkog mitochondrijskog parametra.

Nekoliko fluorescentnih lipofilnih katjonskih boja (metil (TMRM) i etil (TMRE) estri tetrametilrodamina, rodamin 123 (Rho123) i JC-1 (5,5',6,6'-tetrahloro-1,1',3,3'-tetraetilbenzimidazolokarbocijanin-jodid)) su postale važan alat za merenje  $\Delta\Psi_m$ .<sup>184</sup> Kao pozitivno naelektrisani molekuli, ove boje će se akumulirati u mitochondrijama obrnuto proporcionalno veličini  $\Delta\Psi_m$ . U zdravim ćelijama, sa visokim vrednostima  $\Delta\Psi_m$ , JC-1 spontano formira agregate poznate kao J-agregati koji pokazuju intenzivno crvenu fluorescenciju. S druge strane, u apoptotskim ili oštećenim ćelijama sa niskim  $\Delta\Psi_m$ , JC-1 ostaje u monomernoj formi, koja pokazuje zelenu fluorescenciju. Odnos zelene i crvene fluorescencije zavisi samo od membranskog potencijala, ali ne i od drugih faktora, kao što su veličina, oblik i gustina mitochondrija. Kada su ekscitovani na 488 nm, JC-1 monomeri



**Slika 53.** Gubitak mitohondrijskog transmembranskog potencijala ( $\Delta\Psi_m$ ) u tumorskim ćelijama. NCI-H460, NCI-H460/R i HaCaT ćelije netretirane i tretirane sa 5  $\mu\text{M}$  CDDP-a i 25  $\mu\text{M}$  hinonom **122** i njegovim derivatima **136a** i **139a** obeležene su JC-1 bojom tokom 15 minuta na 37°C za analizu protočnom citometrijom (A) i snimanje na fluorescentnom mikroskopu (B). Razmera = 50  $\mu\text{m}$ . Statistički značajna razlika u odnosu na odgovarajuću netretiranu kontrolu:  $p < 0,05$  (\*),  $p < 0,01$  (\*\*),  $p < 0,001$  (\*\*\*)

emituju zelenu fluorescenciju sa maksimumom na 530 nm, dok agregati emituju narandžasto-crvenu fluorescenciju sa maksimumom na 585 nm. Analiza JC-1 fluorescencije omogućava komparativno merenje membranskog potencijala u ćelijskim populacijama.

Naša istraživanja su pokazala da je proizvodnja superoksidnog anjona indukovana jedinjenjem **136a** bila praćena kolapsom transmembranskog potencijala mitohondrija ( $\Delta\Psi_m$ ). Jedinjenja **136a** i **139a** pri koncentraciji od 25  $\mu\text{M}$  indukuju značajnu depolarizaciju mitohondrijske membrane u tumorskim ćelijama, dok na mitohondrijama normalnih keratinocita taj efekat nije bio izražen (slika 53A). Zanimljivo je da je gubitak potencijala mitohondrija zabeležen i u osetljivim NCI-H460, i u rezistentnim NCI-H460/R ćelijama uprkos različitom obrascu delovanja (indukovanje antioksidativnog, odnosno prooksidativnog efekta, slika 52). Stoga se može pretpostaviti da su mitohondrije tumorskih ćelija osetljive na neravnotežu redoks sistema bez obzira na to da li je ta neravnoteža uzrokovana smanjenjem ili povećanjem sadržaja superoksidnog anjona. Promene u sadržaju JC-1 monomera i agregata potvrđene su i na fluorescentnom mikroskopu (slika 53B).

### 3.8. Antimikrobna aktivnost

Prevelika i neselektivna upotreba antibiotika dovela je do pojave multirezistentnih bakterijskih sojeva. Rezistencija prema antibioticima je jedan od najvećih problema sa kojima se suočava narodno zdravstvo. Bakterije sojeva *Escherichia coli* i *Staphylococcus aureus* su uobičajene u infekcijama stečenim u zdravstvenim ustanovama. Ovaj problem je posledica adaptacije infektivnih patogena na antibiotike koji se koriste u medicini, u bolnicama, proizvodnji hrane, na farmama i domaćinstvima.<sup>187-190</sup> Bakterije razvijaju rezistenciju prema svim poznatim antibioticima, i samim tim, velike su poteškoće povezane sa multirezistentnim bakterijama. Usled rezistencije, vek upotrebe svakog antibiotika je ograničen.

Pored generisanja slobodnih radikala, hinoni ireverzibilno reaguju sa nukleofilnim aminokiselinama iz sastava proteina, često vodeći gubitku funkcije proteina. Iz tog razloga, potencijalni opseg antimikrobnih efekata hinona je veliki. Verovatne mete u mikroorganizmima su površinski izloženi adhezini, polipeptidi ćelijskog zida i membranski vezani enzimi. Hinoni takođe mogu supstrate učiniti nedostupnim za mikroorganizme. U literaturi je opisano antimikrobno dejstvo niza hinonskih jedinjenja, poput antrahinona iz biljke *Cassia italica*,<sup>191</sup> i hipericina.<sup>192</sup>

Metode razblaženja su najpogodnije metode za određivanje MIC vrednosti, s obzirom na to da omogućavaju procenu koncentracije testiranih antimikrobnih agenasa u agaru ili bujonu. Metode razblaženja u agaru ili bujonu mogu biti korišćene za kvantitativno merenje *in vitro* antimikrobne aktivnosti prema bakterijama i gljivicama. MIC vrednost koja je zabeležena definiše se kao najniža koncentracija ispitanog antimikrobnog agensa koji inhibira vidljivi rast testiranog mikroorganizma, i obično se izražava u µg/mL ili mg/L.<sup>193</sup>

Mikro- ili makrorazblaženje u bujonu je jedna od najosnovnijih metoda testiranja podložnosti antimikrobnim agensima. Procedura uključuje pripremu dvostrukog razblaženja antimikrobnog agensa (tj. 1, 2, 4, 8, itd. mg/mL) u tečnom hranljivom medijumu rastvorenom u epruветama sa minimalnom zapreminom od 2 mL (makrorazblaženje) ili u manjim zapreminama koristeći mikrotitar ploče od 96 bunara (mikrorazblaženje). U svaku epruветu ili bunar dodaje se mikroorganizam u istom medijumu, i nakon mešanja, tube ili mikrotitar ploče se inkubiraju pod pogodnim uslovima u zavisnosti od testiranog mikroorganizma.

MIC je najniža koncentracija antimikrobnog agensa koja potpuno inhibira rast mikroorganizma u epruветama ili bunarima detektovan golim okom.

### 3.8.1. Antibakterijska aktivnost

Svi sintetisani derivati su bili testirani na antimikrobnu aktivnost prema seriji Gram-pozitivnih i Gram-negativnih bakterija i njihove aktivnosti su upoređene sa komercijalnim antibiotikom, amikacinom (Tabela 5).

Određivanje antibakterijske aktivnosti pokazalo je najveću aktivnost prema bakterijama *E. coli*, *S. aureus* i *Micrococcus luteus* (ATCC 10240). Antibakterijska aktivnost slična amikacinu nađena je za jedinjenja **134a**, **138a** i **139a** prema *E. coli* i *S. aureus*, dok su derivati **134a** i **138a** prema *M. luteus* (ATCC 10240) pokazali jaču aktivnost od amikacina. Malo slabiju aktivnost, ali još uvek uporedivu sa amikacinom, pokazala su jedinjenja **134b** prema *E. coli*, zatim **132a** i **131b** prema *S. aureus* i **132a** i **138b** prema *M. luteus* (ATCC 10240). Najširi opseg dejstva pokazali su alilamino derivati **133a** i **133b** i to prema *S. aureus*, *Kocuria rhizophila*, *Clostridium sporogenes*, *E. coli*, *Proteus hauseri* i *M. luteus* (ATCC 10240) (samo **133b**), doduše uz aktivnost malo slabiju u odnosu na amikacin. Najslabiju aktivnost pokazali su *n*-oktilamino derivati pri čemu je **136a** neaktivan u opsegu

koncentracija korišćenih u testu. Avaronski derivati su pokazali slabu aktivnost verovatno zbog nedovoljne hidrofилности.

Uopšteno gledano, da bi pokazali aktivnost uporedivu sa amikacinom *terc*-butilhinonski derivati bi trebalo da imaju 2,6-disupstituciju i aralkilamino ili nerazgranatu alkilamino grupu srednje veličine lanca u položaju 3'.

### 3.8.2. Antifungalna aktivnost

Jedinjenja su testirana za aktivnost prema tri soja gljivica *Candida albicans*, *Saccharomyces cerevisiae* i *Aspergillus brasiliensis*. Od svih testiranih jedinjenja, derivati **134a**, **139a** i **133a** su pokazali najjaču aktivnost, kao i aktivnost prema sva tri soja, značajno veću od nistatina (Tabela 6).

Većina testiranih derivata pokazala je jaču aktivnost prema *C. albicans* od nistatina, pri čemu su jedinjenja **135a**, **133a**, **133b**, **137a** i **139a** imala vrednost MIC-a za dva reda veličine nižu od nistatina (ispod 50  $\mu$ M). Što se tiče druga dva soja gljivica, većina TBQ derivata pokazuju aktivnost uporedivu ili čak bolju od nistatina (**133a**, **133b**, **137a**, **131a**, **131b**, **132a**, **132b** i **134a** za *A. brasiliensis*, a **133a**, **137a**, **134a**, **134b**, **136a** i **139a** za *S. cerevisiae*). Na osnovu ovih rezultata može se zaključiti da, za jaku anti-*Candida* aktivnost, jedinjenja treba da budu 6-supstituisani 2-*terc*-butilhinoni (izuzetak su alilamino derivati, kod kojih oba izomera pokazuju sličnu aktivnost).

Što se tiče avaronskih derivata, pirolidinski, *sek*-butilamino i alilamino derivati pokazuju aktivnost uporedivu, pa čak i bolju od nistatina, osim **124a** i **124b** za *S. cerevisiae*. Ostali derivati avarona nisu imali značajnu aktivnost prema testiranim sojevima gljivica.

**Tabela 5.** *In vitro* aktivnost prema Gram-negativnim i Gram-pozitivnim bakterijama.

Jedinjenja	MIC (mM)									
	<i>S. aureus</i>	<i>K. rhizophila</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>M. luteus</i> (ATCC 10240)	<i>M. luteus</i> (ATCC 4698)	<i>C. sporogenes</i>	<i>E. coli</i>	<i>P. hauseri</i>	<i>S. enterica</i>	<i>P. aeruginosa</i>
124a	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/
124b	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/
125a	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/
125b	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/
126a	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/
126b	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/
127a	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/
127b	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/
128a	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/
128b	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/
129a	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/
129b	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/
130a	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/
130b	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/
131a	0,051	0,813	1,621	0,202	1,621	1,621	0,202	1,621	1,621	3,238
131b	0,025	0,409	0,813	0,103	0,831	0,813	0,104	0,813	0,813	1,621
132a	0,024	0,381	0,758	0,024	0,758	0,758	0,024	0,758	0,381	0,758
132b	0,096	0,758	1,512	0,048	1,512	1,512	0,188	1,512	0,758	3,019
133a	0,36	0,045	0,716	0,178	0,178	0,36	0,022	0,36	0,091	0,716
133b	0,36	0,045	0,716	0,36	0,36	0,36	0,022	0,36	0,178	0,716
134a	0,009	/	1,237	0,009	0,154	1,237	0,009	/	0,62	0,62
134b	0,038	2,47	1,237	0,038	2,47	1,237	0,019	1,237	0,62	0,62
135a	0,667	0,085	0,667	0,085	0,166	0,667	0,021	1,33	0,166	2,656
135b	0,667	0,042	1,33	0,085	0,166	0,667	0,085	1,33	0,166	2,656
136a	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/
136b	4,295	4,295	4,295	2,147	4,295	2,147	4,295	2,147	2,147	2,147
137a	2,679	0,086	2,679	0,339	0,085	2,679	0,339	2,679	0,673	2,679
137b	2,679	0,167	1,342	0,673	2,679	2,679	0,167	2,679	2,679	2,679
138a	0,009	/	2,323	0,009	4,646	2,323	0,009	/	4,646	2,323
138b	0,072	4,646	4,646	0,018	2,323	2,323	0,036	2,323	4,646	4,646
139a	0,009	17,667	4,416	0,034	2,208	4,416	0,009	17,667	4,416	4,416
139b	/	2,208	4,416	4,416	2,208	2,208	/	2,208	4,416	2,208
Amikacin	0,019	0,003	0,072	0,014	0,003	0,026	0,009	0,012	0,014	0,085

**Tabela 6.** *In vitro* antifungalna aktivnost.

Jedinjenja	MIC (mM)		
	<i>C. albicans</i>	<i>A. brasiliensis</i>	<i>S. cerevisiae</i>
<b>124a</b>	0,852	1,701	3,401
<b>124b</b>	1,701	1,701	3,401
<b>125a</b>	/	/	/
<b>125b</b>	/	/	/
<b>126a</b>	0,410	1,631	0,817
<b>126b</b>	0,410	1,631	1,631
<b>127a</b>	/	/	/
<b>127b</b>	/	/	/
<b>128a</b>	1,638	1,638	0,820
<b>128b</b>	1,638	1,638	0,411
<b>129a</b>	/	/	/
<b>129b</b>	/	/	/
<b>130a</b>	/	/	/
<b>130b</b>	/	/	/
<b>131a</b>	1,621	3,238	0,103
<b>131b</b>	1,621	1,621	0,051
<b>132a</b>	1,512	1,512	0,048
<b>132b</b>	1,512	3,019	0,381
<b>133a</b>	0,047	0,360	0,360
<b>133b</b>	0,047	0,716	1,427
<b>134a</b>	0,077	0,154	0,620
<b>134b</b>	0,077	0,154	2,464
<b>135a</b>	0,042	1,330	1,330
<b>135b</b>	0,166	2,656	2,656
<b>136a</b>	0,067	0,539	2,147
<b>136b</b>	4,295	4,295	2,147
<b>137a</b>	0,042	0,339	0,673
<b>137b</b>	0,673	2,679	2,679
<b>138a</b>	2,323	2,323	2,323
<b>138b</b>	/	/	/
<b>139a</b>	0,034	0,034	1,106
<b>139b</b>	2,208	2,208	1,106
Nistatin	2,700	1,350	1,350

## 4. Eksperimentalni deo

$^1\text{H}$  NMR spektri su snimljeni na instrumentima Varian Gemini 2000 na 200 MHz i Bruker Avance III na 500 MHz. Snimanja su obavljena u deuterohloroformu ( $\text{CDCl}_3$ ) na temperaturi od 298 K, a hemijska pomeranja ( $\delta$ -skala) su izražena u ppm vrednostima u odnosu na tetrametilsilan (TMS) kao interni standard, dok su konstante kuplovanja  $J$  date u hercima (Hz). Multiplicitet signala je označen kao s (singlet), bs (prošireni singlet), d (dublet), dd (dublet dubleta), t (triplet), q (kvartet) i m (multiplet).

$^{13}\text{C}$  NMR spektri su snimljeni na instrumentima Varian Gemini 2000 na 50 MHz i Bruker Avance III na 125 MHz. Snimanja su obavljena u deuterohloroformu ( $\text{CDCl}_3$ ) na temperaturi od 298 K, a hemijska pomeranja ( $\delta$ -skala) su izražena u ppm vrednostima u odnosu na tetrametilsilan (TMS) kao interni standard.

Svi maseni spektri su zabeleženi tehnikom elektrosprej jonizacije na masenom spektrometru Mass Spectrometer 6210 Time-of-flight LC-MS system (Agilent Technologies) u pozitivnom jon-modu. Uzorci su rastvarani u metanolu HPLC čistoće.

Ciklični voltamogrami su snimljeni na potenciostatu CHI 1760B (CH instruments, Austin, TX, SAD).

UV/Vis spektri su snimljeni na spektrofotometru GBC Cintra 40 i LLG Labware LLG-uniSPEC2.

IR spektri su snimljeni na Thermo Scientific Nicolet 6700 FT-IR (Smart orbit) spektrofotometru, a položaj traka je dat u  $\text{cm}^{-1}$ .

Vrednosti optičke rotacije su izmerene na polarimetru Rudolph Research Analytical Autopol IV, na sobnoj temperaturi.

Temperature topljenja su određene na aparatu Boetius PHMK, VEB Analytic, Drezden, Nemačka, i nisu korigovane.

Svi reagensi i rastvarači su dobijeni iz komercijalnih izvora (Merck, Fluka, Sigma-Aldrich, Acros Organics).

Sve reakcije su rađene na atmosferskom pritisku uz mešanje na magnetnoj mešalici, ukoliko drugačije nije naglašeno.

Tok reakcija je praćen tankoslojnom hromatografijom (TLC) na aluminijumskim pločicama Kieselgel 60 GF<sub>254</sub> (Merck), uz korišćenje UV svetla za vizualizaciju.

Hromatografska prečišćavanja su rađena primenom (i) gravitacione hromatografije na koloni (Kieselgel 60, 0,063-0,200 mm, E. Merck), (ii) hromatografije na koloni pod sniženim pritiskom (Kieselgel 60, 0,015-0,040 mm, E. Merck), (iii) preparativne tankoslojne hromatografije na pločama (20 x 20 cm) na koje se kao stacionarna faza nanosi Kieselgel 60 GF<sub>254</sub> (1 mm). Hromatografija pod sniženim pritiskom rađena je na Büchi modularnom



sistemu, koristeći module C-615 (menadžer pumpi), 2 x C-601 (pumpa), C-660 (frakcioni kolektor) i dva redno vezana detektora Bischoff RI detektor i Büchi UV detektor (modul C-640).

Ekstrakti su sušeni iznad anhidrovanog natrijum-sulfata.

Organski rastvarači su destilovani pre upotrebe.

Uparavanje rastvarača je vršeno na rotacionom vakuum uparivaču pri temperaturama vodenog kupatila do 40°C.

Za sintezu derivata, korišćeni su komercijalno dostupni amini bez dodatnog prečišćavanja.

#### **4.1. Izolovanje avarola**

Avarol je izolovan iz morskog sundera *Dysidea avara*. Sirovi materijal je sakupljen izranjanjem u Bokokotorskom zalivu, Crna Gora.

Svež sunder (3kg) se homogenizuje u Waring blenderu sa 250 ml etanola. Dobijena masa sa ekstrahuje tri puta sa po 500 ml etil-acetata uz mešanje u toku 2 h. Ekstrakti se spoje i isperu tri puta sa po 500 ml vode. Nakon što se organski sloj osuši iznad anhidrovanog natrijum-sulfata, rastvarač se ukloni na vakuum uparivaču. Zaostala tamno braon smolasta masa (48 g) se parcijalno prečišćava primenom hromatografije pod sniženim pritiskom.

Deo ekstrakta se rastvori u etil-acetatu, doda se silika-gel (20 g), pa se potom rastvarač upari. Na prethodno pripremljenu kolonu (dužina 46 cm, 380 g silika gela) postavi se 'kolač'. Eluiranje avarola se započinje eluentom petrol-etar (t.k. 40°–60°C):etil-acetat (95:5, 2 h), a nastavlja eluentom petrol-etar (t.k. 40°–60°C):etil-acetat (9:1). Silazak jedinjenja je praćen na UV detektoru, na 249 nm i 291 nm.

#### **4.2. Dobijanje avarona**

Avarol (1,1 g, 3,5 mmol) se rastvori u dietil-etru (100 ml). Srebro(I)-oksid (1,1 g, 4,7 mmol) se dodaje u porcijama u reakcionu smesu, i smesa se meša 2 h n sobnoj temperaturi. Nakon ovog perioda, doda se natrijum-sulfat i smesa se ostavi da stoji tokom noći. Elementarno srebro, višak srebro(I)-oksida i natrijum-sulfat se uklone filtracijom preko infuzorijske zemlje (Kieselguhr). Dietil-etar se upari na vakuum uparivaču, a dobijeni proizvod, avaron, je korišćen dalje bez dodatnog prečišćavanja. Prinos reakcije je bio kvantitativan.

#### **4.3. Dobijanje alkilamino i aralkilamino derivata avarona**

*Opšti postupak za dobijanje alkilamino i aralkil amino derivata avarona.* Avaron (300 mg, 0,96 mmol, osim ako nije drugačije naglašeno) rastvori se u etanolu (50 ml). Hidrohloridne soli amina (u velikom višku 22x) pripremljene su iz alkilamina i aralkilamina kao vodeni rastvori ako su amini bili rastvorljivi u vodi, ili kao rastvori u smesi vode i etanola

(1:1) ako amini nisu bili rastvorljivi u vodi. pH vrednost ovih rastvora je podešena na pH = 7–8 dodatkom čvrstog natrijum-bikarbonata, i rastvori su dodati u rastvor hinona. Voda i etanol su dodavani u reakcionu smesu do konačne zapremine od 300 ml i konačnog odnosa vode i etanola 1:1. Reakcija se meša 16 sati na sobnoj temperaturi. Po ovoj proceduri dobijeni su derivati u reakciji sa *n*-butilaminom, *n*-oktilaminom, benzilaminom i fenetilaminom. U reakciji sa alilaminom, *sec*-butilaminom i pirolidinom reakciono vreme je smanjeno na 3 sata uz zagrevanje smeše na 60–70°C. Etanol je uklonjen uparavanjem na vakuum uparivaču, reakciona smesa je ekstrahovana metilen-hloridom, dva puta sa po polovinom zapremine vodenog sloja. Organski sloj je odvojen, osušen nad anhidrovanim natrijum-sulfatom, i rastvarač uklonjen na vakuum uparivaču. Sirovi proizvodi su razdvojeni hromatografijom na koloni i prečišćeni tankoslojnom hromatografijom, koristeći naznačene rastvarače.

#### 4.3.1. 2-(Alilamino)-6-(((1*R*,2*S*,4*aS*,8*aS*)-1,2,4*a*,5-tetrametil-1,2,3,4,4*a*,7,8,8*a*-oktahidronaftalen-1-il)metil)cikloheksa-2,5-dien-1,4-dion (**124a**)

Prema opštem postupku za dobijanje alkilamino i aralkilamino derivata avarona, jedinjenje **124a** se dobija iz avarona (300mg, 0,96 mmol) i alilamina (1,206 g/1,58 ml, 21,12 mmol). Reakciona smesa se meša 3 h na temperaturi 60–70°C. Jedinjenje je razdvojeno od svog regioizomera hromatografijom pod sniženim pritiskom koristeći petrol-etar (t.k. 40–60°C):etil-acetat (85:15) kao eluent ( $R_f = 0,27$ ) i prečišćeno preparativnom tankoslojnom hromatografijom koristeći petrol-etar (t.k. 40–60°C):etil-acetat (8:2) kao eluent ( $R_f = 0,44$ ) tri puta, zbog blizine sa avarolom kao sporednim proizvodom reakcije ( $R_f = 0,36$ ), što je kao rezultat imalo nizak prinos. Proizvod je dobijen kao crvenobraon ulje. Prinos 25,3 mg; 7,2 %.

Fizičke konstante i spektroskopski podaci za **124a**:

$[\alpha]^{20} = -50^\circ$  ( $c = 0,083$  mg/mL in MeOH); UV-Vis ( $c = 0,083$  mg/mL in MeOH,  $\lambda_{max}/nm$ , ( $\epsilon/dm^2 mol^{-1}$ ): 286 ( $2,19 \times 10^4$ ), 484 ( $0,97 \times 10^4$ ).

IR (ATR) 3389,6; 3298,1; 2959,9; 1669,8; 1633,1; 1585,2; 1501,3; 1440,8; 1380,2; 1344,5; 1289,0; 1246,9; 1189,2; 1093,0; 1028,2; 913,7; 801,4; 632,0; 442,5  $cm^{-1}$ .

$^1H$  NMR (200 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$  (ppm): 6,37 (d, 1H,  $J = 2$  Hz, C6'-H), 5,70-6,00 (m, 2H, C2''-H, C4'-NH), 5,44 (d, 1H,  $J = 2$  Hz, C3'-H), 5,31 (m, 1H, C3''-H<sub>a</sub>), 5,23 (t, 1H,  $J = 2$  Hz, C3''-H<sub>b</sub>), 5,14 (s, 1H, C3-H), 3,74 (t, 2H,  $J = 6$  Hz, C1''-H<sub>2</sub>), 2,63 (d, 1H,  $J = 14$  Hz, C15-H<sub>a</sub>), 2,38 (d, 1H,  $J = 12$  Hz, C15-H<sub>b</sub>), 1,80-2,10 (m, 4H, C2-H<sub>2</sub>, C6-H<sub>2</sub>), 1,10-1,70 (m, 9H, C1-H<sub>2</sub>, C7-H<sub>2</sub>, C8-H, C10-H, C11-H<sub>3</sub>), 0,80-1,10 (m, 9H, C14-H<sub>3</sub>, C13-H<sub>3</sub>, C12-H<sub>3</sub>).

$^{13}C$  NMR (50 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$  (ppm): 185,6 (C5'), 183,9 (C2'), 146,6 (C3'), 144,0 (C4), 142,2 (C1'), 139,6 (C6'), 131,7 (C2''), 120,6 (C3), 118,3 (C3''), 98,5 (C4'), 46,7 (C10), 45,0 (C1''), 42,0 (C5), 38,4 (C9), 36,6 (C8), 36,0 (C6), 35,0 (C15), 27,4 (C7), 26,5 (C2), 20,0 (C12), 19,3 (C1), 18,0 (C11), 17,6 (C14), 16,7 (C13).

HRMS (ESI):  $m/z$  izračunato za  $C_{24}H_{34}NO_2$  368,25841, nađeno  $[(M+H)^+]$  368,25854; izračunato za  $C_{24}H_{33}NO_2Na$  390,24035, nađeno  $[(M+Na)^+]$  390,24116.

$E_{1/2}$ :  $E_{cl} = -1,170$  V,  $E_{al} = -1,113$  V,  $E_{c2} = -1,830$  V,  $E_{a2} = -1,741$  V,  $E^0_{I/Fc} = -1,142$  V.

#### 4.3.2. 2-(Alilamino)-5-(((1*R*,2*S*,4*aS*,8*aS*)-1,2,4*a*,5-tetrametil-1,2,3,4,4*a*,7,8,8*a*-oktahidronaftalen-1-il)metil)cikloheksa-2,5-dien-1,4-dion (**124b**)

Prema opštem postupku za dobijanje alkilamino i aralkilamino derivata avarona, jedinjenje **124b** se dobija iz avarona (300mg, 0,96 mmol) i alilamina (1,206 g/1,58 ml, 21,12 mmol). Reakciona smesa se meša 3 h na temperaturi 60–70°C. Jedinjenje je razdvojeno od svog regioizomera hromatografijom pod sniženim pritiskom koristeći petrol-etar (t.k. 40–60°C):etil-acetat (85:15) kao eluent ( $R_f = 0,35$ ) i prečišćeno preparativnom tankoslojnom hromatografijom koristeći petrol-etar (t.k. 40–60°C):etil-acetat (8:2) kao eluent ( $R_f = 0,61$ ). Proizvod je dobijen kao crvenobraon ulje. Prinos 58,5 mg; 16,6 %.

Fizičke konstante i spektroskopski podaci za **124b**:

$[\alpha]^{20} = +70^\circ$  ( $c = 0,083$  mg/mL, MeOH). UV-Vis ( $c = 0,083$  mg/mL, MeOH,  $\lambda_{max}/nm$ , ( $\epsilon/dm^2 mol^{-1}$ )): 286 ( $4,14 \times 10^4$ ), 480 ( $1,05 \times 10^4$ ).

IR (ATR) 3332,0; 3082,7; 2925,0; 1663,1; 1624,2; 1586,5; 1506,3; 1448,2; 1379,0; 1339,4; 1312,2; 1255,8; 1224,2; 1205,0; 1098,8; 1037,4; 915,8; 840,8; 798,9; 566,6; 459,9  $cm^{-1}$ .

$^1H$  NMR (200 MHz,  $CDCl_3$ ):  $\delta$  (ppm) 6,37 (s, 1H, C6'-**H**), 5,85 (m, 1H, C2''-**H**), 5,61 (bs, 1H, C4'-**NH**), 5,46 (s, 1H, C4'-**H**), 5,30 (m, 1H, C3''-**H<sub>a</sub>**), 5,24 (t, 1H,  $J = 2$  Hz, C3''-**H<sub>b</sub>**), 5,15 (s, 1H, C3-**H**), 3,73 (t, 2H,  $J = 6$  Hz, C1''-**H<sub>2</sub>**), 2,65 (d, 1H,  $J = 14$  Hz, C15-**H<sub>a</sub>**), 2,47 (d, 1H,  $J = 14$  Hz, C15-**H<sub>b</sub>**), 1,80-2,10 (m, 4H, C2-**H<sub>2</sub>**, C6-**H<sub>2</sub>**), 1,10-1,70 (m, 9H, C1-**H<sub>2</sub>**, C7-**H<sub>2</sub>**, C8-**H**, C10-**H**, C11-**H<sub>3</sub>**), 0,80-1,10 (m, 9H, C14-**H<sub>3</sub>**, C13-**H<sub>3</sub>**, C12-**H<sub>3</sub>**).

$^{13}C$  NMR (50MHz,  $CDCl_3$ ):  $\delta$  (ppm) 185,4 (**C2'**), 183,5 (**C5'**), 151,1 (**C1'**), 145,8 (**C4'**), 144,0 (**C4**), 131,8 (**C6'**, **C2''**), 120,7 (**C3**), 118,2 (**C3''**), 99,1 (**C3'**), 47,2 (**C10**), 44,7 (**C1''**), 43,1 (**C5**), 38,5 (**C9**), 37,1 (**C8**), 36,1 (**C6**), 35,7 (**C15**), 27,5 (**C7**), 26,5 (**C2**), 20,0 (**C12**), 19,4 (**C1**), 18,0 (**C11**), 17,7 (**C14**), 16,8 (**C13**).

HRMS (ESI):  $m/z$  izračunato za  $C_{24}H_{34}NO_2$  368,25841, nađeno  $[(M+H)^+]$  368,25934; izračunato za  $C_{24}H_{33}NO_2Na$  390,24035; nađeno  $[(M+Na)^+]$  390,24053.

$E_{1/2}$ :  $E_{cl} = -1,177$  V,  $E_{al} = -1,117$  V,  $E_{c2} = -1,799$  V,  $E_{a2} = -1,689$  V,  $E^0_{I/Fc} = -1,150$  V.

#### 4.3.3. 2-(Butilamino)-6-(((1*R*,2*S*,4*aS*,8*aS*)-1,2,4*a*,5-tetrametil-1,2,3,4,4*a*,7,8,8*a*-oktahidronaftalen-1-il)metil)cikloheksa-2,5-dien-1,4-dion (**125a**)

Prema opštem postupku za dobijanje alkilamino i aralkilamino derivata avarona, jedinjenje **125a** se dobija iz avarona (220mg, 0,705 mmol) i *n*-butilamina (1,13 g/1,54 mL, 15,51 mmol). Reakciona smesa se meša 16 h na sobnoj temperaturi. Jedinjenje je razdvojeno od svog regioizomera hromatografijom pod sniženim pritiskom koristeći toluen:etil-acetat (9:1) kao eluent ( $R_f = 0,40$ ) i prečišćeno preparativnom tankoslojnom hromatografijom koristeći toluen:etilacetat (9:1) kao eluent. Proizvod je dobijen kao crvenobraon ulje. Prinos 41,6 mg; 30,8 %.

Fizičke konstante i spektroskopski podaci za **125a**:

$[\alpha]^{20} = -40^\circ$  ( $c = 0,083$  mg/mL, MeOH). **UV-Vis** ( $c = 0,083$  mg/mL, MeOH,  $\lambda_{\max}/\text{nm}$ , ( $\epsilon/\text{dm}^2\text{mol}^{-1}$ )): 292 ( $4,81 \times 10^4$ ), 496 ( $2,14 \times 10^4$ ).

**IR** (ATR) 3389,7; 3301,5; 2958,9; 2931,8; 2870,2; 1671,4; 1635,4; 1588,0; 1508,1; 1464,5; 1380,1; 1346,8; 1287,9; 1250,3; 1190,5; 1124,5; 1090,0; 1040,6; 914,5; 802,1; 737,7  $\text{cm}^{-1}$ .

**$^1\text{H}$  NMR** (200 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  (ppm) 6,37 (d,  $J = 2,2$  Hz, 1H, C6'-**H**), 5,63 (bs, 1H, C3'-N-**H**), 5,42 (d,  $J = 2,2$  Hz, 1H, C4'-**H**), 5,14 (s, 1H, C3-**H**), 3,07 (dd, 2H, C1''-**H**<sub>2</sub>), 2,62 (d,  $J = 13,4$  Hz, 1H, C15-**Hb**), 2,37 (d,  $J = 13,4$  Hz, 1H, C15-**Ha**), 1,80-2,20 (m, 4H, C2-**H**<sub>2</sub>, C6-**H**<sub>2</sub>), 1,20-1,70 (m, 16H, C1-**H**<sub>2</sub>, C7-**H**<sub>2</sub>, C8-**H**, C10-**H**, C11-**H**<sub>3</sub>, C12-**H**<sub>3</sub>, C2''-**H**<sub>2</sub>, C3''-**H**<sub>2</sub>), 0,80-1,10 (m, 9H, C4''-**H**<sub>3</sub>, C13-**H**<sub>3</sub>, C14-**H**<sub>3</sub>).

**$^{13}\text{C}$  NMR** (50MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  (ppm) 185,5 (1C, **C5'**), 184,0 (1C, **C2'**), 146,8 (1C, **C3'**), 144,0 (1C, **C4**), 142,0 (1C, **C1'**), 139,9 (1C, **C6'**), 120,6 (1C, **C3**), 97,6 (1C, **C4'**), 46,7 (1C, **C10**), 42,3 (1C, **C1''**), 42,0 (1C, **C5**), 38,4 (1C, **C9**), 36,5 (1C, **C8**), 35,9 (1C, **C6**), 34,9 (1C, **C15**), 30,1 (1C, **C2''**), 27,3 (1C, **C7**), 26,5 (1C, **C2**), 20,1 (1C, **C3''**), 20,0 (1C, **C1**), 19,3 (1C, **C12**), 18,0 (1C, **C11**), 17,7 (1C, **C14**), 16,6 (1C, **C13**), 13,7 (1C, **C4''**).

**HRMS** (ESI):  $m/z$  izračunato za  $\text{C}_{25}\text{H}_{38}\text{NO}_2$  384,28971, nađeno  $[(\text{M}+\text{H})^+]$  384,28892; izračunato za  $\text{C}_{50}\text{H}_{75}\text{N}_2\text{O}_4$  767,57214; nađeno  $[(2\text{M}+\text{H})^+]$  767,57256.

$E_{1/2}$ :  $E_{c1} = -1,138$  V,  $E_{a1} = -1,067$  V,  $E_{c2} = -1,876$  V,  $E_{a2} = -1,747$  V,  $E^\circ_{1/\text{Fc}} = -1,172$  V.

#### 4.3.4. 2-(Butilamino)-5-(((1R,2S,4aS,8aS)-1,2,4a,5-tetrametil-1,2,3,4,4a,7,8,8a-oktahidronaftalen-1-il)metil)cikloheksa-2,5-dien-1,4-dion (**125b**)

Prema opštem postupku za dobijanje alkilamino i aralkilamino derivata avarona, jedinjenje **125b** se dobija iz avarona (220 mg, 0,705 mmol) i *n*-butilamina (1,13 g/1,54 mL, 15,51 mmol). Reakciona smesa se meša 16 h na sobnoj temperaturi. Jedinjenje je razdvojeno od svog regioizomera hromatografijom pod sniženim pritiskom koristeći toluen:etil-acetat (9:1) kao eluent ( $R_f = 0,60$ ) i prečišćeno preparativnom tankoslojnom hromatografijom koristeći toluen:etilacetat (9:1) kao eluent. Proizvod je dobijen kao crvenobraon ulje. Prinos 17,0 mg; 12,6 %.

Fizičke konstante i spektroskopski podaci za **125b**:

$[\alpha]^{20} = +80^\circ$  ( $c = 0,083$  mg/mL, MeOH). **UV-Vis** ( $c = 0,083$  mg/mL, MeOH,  $\lambda_{\max}/\text{nm}$ , ( $\epsilon/\text{dm}^2\text{mol}^{-1}$ )): 292 ( $6,14 \times 10^4$ ), 490 ( $1,66 \times 10^4$ ).

**IR** (ATR) 3354,6; 2959,1; 2932,1; 2868,3; 1665,5; 1628,5; 1593,4; 1514,3; 1463,3; 1380,6; 1318,2; 1241,7; 1222,4; 1197,9; 1130,0; 1099,9; 898,7; 842,9  $\text{cm}^{-1}$ .

**$^1\text{H}$  NMR** (200 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  (ppm) 6,36 (s, 1H, C6'-**H**), 5,51 (bs, 1H, C4'-N-**H**), 5,43 (s, 1H, C3'-**H**), 5,15 (s, 1H, C3-**H**), 3,07 (dd, 2H, C1''-**H**<sub>2</sub>), 2,65 (d, 1H, C15-**Hb**), 2,46 (d, 1H,

C15-**H<sub>a</sub>**), 1,80-2,20 (m, 4H, C2-**H<sub>2</sub>**, C6-**H<sub>2</sub>**), 1,20-1,70 (m, 16H, C1-**H<sub>2</sub>**, C7-**H<sub>2</sub>**, C8-**H**, C10-**H**, C11-**H<sub>3</sub>**, C12-**H<sub>3</sub>**, C2''-**H<sub>2</sub>**, C3''-**H<sub>2</sub>**), 0,80-1,10 (m, 9H, C4''-**H<sub>3</sub>**, C13-**H<sub>3</sub>**, C14-**H<sub>3</sub>**).

<sup>13</sup>C NMR (50MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ (ppm) 185,2 (1C, **C2'**), 183,7 (1C, **C5'**), 151,3 (1C, **C4'**), 146,1 (1C, **C4**), 144,0 (1C, **C1'**), 131,7 (1C, **C6'**), 120,8 (1C, **C3**), 98,2 (1C, **C3'**), 47,2 (1C, **C10**), 43,1 (1C, **C1''**), 42,0 (1C, **C5**), 38,5 (1C, **C9**), 37,0 (1C, **C8**), 36,1 (1C, **C6**), 35,7 (1C, **C15**), 30,2 (1C, **C2''**), 27,5 (1C, **C7**), 26,5 (1C, **C2**), 20,1 (1C, **C3''**), 20,0 (1C, **C1**), 19,4 (1C, **C12**), 18,0 (1C, **C11**), 17,8 (1C, **C14**), 16,8 (1C, **C13**), 13,6 (1C, **C4''**).

HRMS (ESI): *m/z* izračunato za C<sub>25</sub>H<sub>38</sub>NO<sub>2</sub> 384,28971, nađeno [(M+H)<sup>+</sup>] 384,28848; izračunato za C<sub>50</sub>H<sub>75</sub>N<sub>2</sub>O<sub>4</sub> 767,57214; nađeno [(2M+H)<sup>+</sup>] 767,57067.

E<sub>1/2</sub>: E<sub>cl</sub> = -1,148 V, E<sub>al</sub> = -1,078 V, E<sub>c2</sub> = -1,888 V, E<sub>a2</sub> = -1,749 V, E<sup>0</sup><sub>1/Fc</sub> = -1,182 V.

#### 4.3.5. 2-(*sek*-Butilamino)-6-(((1*R*,2*S*,4*aS*,8*aS*)-1,2,4*a*,5-tetrametil-1,2,3,4,4*a*,7,8,8*a*-oktahidronaftalen-1-il)metil)cikloheksa-2,5-dien-1,4-dion (**126a**)

Prema opštem postupku za dobijanje alkilamino i aralkilamino derivata avarona, jedinjenje **126a** se dobija iz avarona (300 mg, 0,96 mmol) i *sek*-butilamina (1,54 g/2,14 mL, 21,12 mmol). Reakciona smesa se meša 3 h na temperaturi 60–70°C. Jedinjenje je razdvojeno od svog regioizomera hromatografijom na koloni pod sniženim pritiskom koristeći petrol-etar (t.k. 40–60°C):etil-acetat (9:1) kao eluent (R<sub>f</sub> = 0,26) i prečišćeno preparativnom tankoslojnom hromatografijom koristeći petrol-etar (t.k. 40–60°C):etil:acetat (9:1) kao eluent. Proizvod je dobijen kao crvenobraon ulje. Prinos 63,9 mg, 17,3 %.

Fizičke konstante i spektroskopski podaci za **126a**:

[α]<sup>20</sup> = -120° (*c* = 0,083 mg/mL, MeOH). UV-Vis (*c* = 0,083 mg/mL, MeOH, λ<sub>max</sub>/nm, (ε/dm<sup>2</sup>mol<sup>-1</sup>)): 286 (2,91x10<sup>4</sup>), 492 (1,28x10<sup>4</sup>).

IR (ATR) 3377,5; 3291,2; 2962,5; 2928,9; 1669,4; 1633,9; 1585,2; 1505,9; 1453,0; 1380,3; 1340,2; 1288,1; 1261,4; 1190,2; 1149,4; 1099,4; 1048,3; 912,3; 801,5; 445,6 cm<sup>-1</sup>.

<sup>1</sup>H NMR (200 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ (ppm) 6,37 (d, 1H, *J* = 2 Hz, C6'-**H**), 5,52 (d, 1H, *J* = 8 Hz, C3'-**NH**), 5,42 (d, 1H, *J* = 2 Hz, C4'-**H**), 5,14 (s, 1H, C3-**H**), 3,28 (m, 1H, C2''-**H**), 2,61 (dd, 1H, *J*<sub>1</sub> = 2 Hz, *J*<sub>2</sub> = 14 Hz, C15-**H<sub>a</sub>**), 2,37 (dd, 1H, *J*<sub>1</sub> = 4 Hz, *J*<sub>2</sub> = 14 Hz, C15-**H<sub>b</sub>**), 1,80-2,10 (m, 4H, C2-**H<sub>2</sub>**, C6-**H<sub>2</sub>**), 1,10-1,70 (m, 14H, C1-**H<sub>2</sub>**, C7-**H<sub>2</sub>**, C8-**H**, C10-**H**, C11-**H<sub>3</sub>**, C1''-**H<sub>3</sub>**, C3''-**H<sub>2</sub>**), 0,80-1,10 (m, 12H, C14-**H<sub>3</sub>**, C13-**H<sub>3</sub>**, C4''-**H<sub>3</sub>**, C12-**H<sub>3</sub>**).

<sup>13</sup>C NMR (50MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ (ppm) ) 185,5 (**C5'**), 184,1 (**C2'**), 146,0 (**C3'**), 144,0 (**C4**), 142,0 (**C1'**), 139,8 (**C6'**), 120,6 (**C3**), 97,6 (**C4'**), 49,6 (**C2''**), 46,7 (**C10**), 42,0 (**C5**), 38,4 (**C9**), 36,6 (**C8**), 36,0 (**C6**), 35,0 (**C15**), 28,7 (**C3''**), 27,4 (**C7**), 26,5 (**C2**), 20,0 (**C12**), 19,3 (**C1**), 19,0 (**C1''**), 18,0 (**C11**), 17,7 (**C14**), 16,7 (**C13**), 10,2 (**C4''**).

HRMS (ESI): *m/z* izračunato za C<sub>25</sub>H<sub>38</sub>NO<sub>2</sub> 384,28971; nađeno [(M+H)<sup>+</sup>] 384,29014.

E<sub>1/2</sub>: E<sub>cl</sub> = -1,193 V, E<sub>al</sub> = -1,127 V, E<sub>c2</sub> = -1,881 V, E<sub>a2</sub> = -1,774 V, E<sup>0</sup><sub>1/Fc</sub> = -1,158 V.

#### 4.3.6. 2-(*sek*-Butilamino)-5-(((1*R*,2*S*,4*aS*,8*aS*)-1,2,4*a*,5-tetrametil-1,2,3,4,4*a*,7,8,8*a*-oktahidronaftalen-1-il)metil)cikloheksa-2,5-dien-1,4-dion (**126b**)

Prema opštem postupku za dobijanje alkilamino i aralkilamino derivata avarona, jedinjenje **126b** se dobija iz avarona (300 mg, 0,96 mmol) i *sek*-butilamina (1,54 g/2,14 mL, 21,12 mmol). Reakciona smesa se meša 3 h na temperaturi 60–70°C. Jedinjenje je razdvojeno od svog regioizomera hromatografijom na koloni pod sniženim pritiskom koristeći petrol-etar (t.k. 40–60°C):etil-acetat (9:1) kao eluent ( $R_f = 0,49$ ) i prečišćeno preparativnom tankoslojnom hromatografijom koristeći petrol-etar (t.k. 40–60°C):etil:acetat (9:1) kao eluent. Proizvod je dobijen kao crvenobraon ulje. Prinos 62,2 mg, 16,9 %.

Fizičke konstante i spektroskopski podaci za **126b**:

$[\alpha]^{20} = 0^\circ$  ( $c = 0,083$  mg/mL, MeOH). UV–Vis ( $c = 0,083$  mg/mL, MeOH,  $\lambda_{\max}/\text{nm}$ , ( $\epsilon/\text{dm}^2\text{mol}^{-1}$ ): 288 ( $4,54 \times 10^4$ ), 488 ( $1,27 \times 10^4$ ).

$^1\text{H NMR}$  (200 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  (ppm) 6,36 (s, 1H, C6'-H), 5,38-5,42 (m, 2H, C4'-NH, C3'-H), 5,17 (s, 1H, C3-H), 3,29 (m, 1H, C2''-H), 2,64 (dd, 1H,  $J_1 = 2$  Hz,  $J_2 = 12$  Hz, C15-H<sub>a</sub>), 2,48 (dd, 1H,  $J_1 = 2$  Hz,  $J_2 = 14$  Hz, C15-H<sub>b</sub>), 1,80-2,10 (m, 4H, C2-H<sub>2</sub>, C6-H<sub>2</sub>), 1,10-1,70 (m, 14H, C1-H<sub>2</sub>, C7-H<sub>2</sub>, C8-H, C10-H, C11-H<sub>3</sub>, C1''-H<sub>3</sub>, C3''-H<sub>2</sub>), 0,80-1,10 (m, 12H, C14-H<sub>3</sub>, C13-H<sub>3</sub>, C4''-H<sub>3</sub>, C12-H<sub>3</sub>).

$^{13}\text{C NMR}$  (50 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  (ppm) 185,2 (C2'), 183,8 (C5'), 151,2 (C1'), 145,2 (C4'), 144,0 (C4), 131,8 (C6'), 120,7 (C3), 98,2 (C3'), 49,3 (C2''), 47,1 (C10), 43,1 (C5), 38,5 (C9), 37,0 (C8), 36,0 (C6), 35,6 (C15), 28,7 (C3''), 27,5 (C7), 26,4 (C2), 20,0 (C2), 19,4 (C1), 19,1 (C1''), 18,0 (C11), 17,7 (C14), 16,8 (C13), 10,2 (C4'').

HRMS (ESI):  $m/z$  izračunato za  $\text{C}_{25}\text{H}_{38}\text{NO}_2$  384,28971; nađeno  $[(\text{M}+\text{H})^+]$  384,29020.

$E_{1/2}$ :  $E_{c1} = -1,201$  V,  $E_{a1} = -1,133$  V,  $E_{c2} = -1,859$  V,  $E_{a2} = -1,713$  V,  $E^0_{1/\text{Fc}} = -1,168$  V.

#### 4.3.7. 2-(Oktilamino)-6-(((1*R*,2*S*,4*aS*,8*aS*)-1,2,4*a*,5-tetrametil-1,2,3,4,4*a*,7,8,8*a*-oktahidronaftalen-1-il)metil)cikloheksa-2,5-dien-1,4-dion (**127a**)

Prema opštem postupku za dobijanje alkilamino i aralkilamino derivata avarona, jedinjenje **127a** se dobija iz avarona (300 mg, 0,96 mmol) i *n*-oktilamina (2,73 g/3,5 mL, 21,12 mmol). Reakciona smesa se meša 16 h na sobnoj temperaturi. Jedinjenje je razdvojeno hromatografijom na koloni od svog regioizomera koristeći toluen:etil-acetat (9:1) kao eluent ( $R_f = 0,57$ ) i prečišćeno preparativnom tankoslojnom hromatografijom koristeći toluen:etil-acetat kao eluent. Proizvod je dobijen kao crvenobraon ulje. Prinos 98,6 mg, 46,6 %.

Fizičke konstante i spektroskopski podaci za **127a**:

$[\alpha]^{20} = +10^\circ$  ( $c = 0,083$  mg/mL, MeOH). UV–Vis ( $c = 0,083$  mg/mL, MeOH,  $\lambda_{\max}/\text{nm}$ , ( $\epsilon/\text{dm}^2\text{mol}^{-1}$ ): 292 ( $4,87 \times 10^4$ ), 496 ( $2,28 \times 10^4$ ).

**IR** (ATR) 3390,2; 3314,7; 2927,6; 2856,3; 1671,0; 1635,4; 1588,3; 1507,5; 1465,6; 1345,7; 1249,8; 1193,0  $\text{cm}^{-1}$ .

**$^1\text{H}$  NMR** (200 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  (ppm) 6,37 (d,  $J = 2.2$  Hz, 1H, C6'-**H**), 5,62 (s, 1H, C3'N-**H**), 5,41 (d,  $J = 2.2$  Hz, 1H, C4'-**H**), 5,14 (s, 1H, C3-**H**), 3,06 (dd, 2H, C1''-**H**<sub>2</sub>), 2,37 (d,  $J = 14$  Hz, 1H, C15-**H**<sub>a</sub>), 2,62 (d,  $J = 14$  Hz, 1H, C15-**H**<sub>b</sub>), 1,80-2,20 (m, 4H, C2-**H**<sub>2</sub>, C6-**H**<sub>2</sub>), 1,20-1,70 (m, 24H, C1-**H**<sub>2</sub>, C7-**H**<sub>2</sub>, C8-**H**, C10-**H**, C11-**H**<sub>3</sub>, C12-**H**<sub>3</sub>, C2''-**H**<sub>2</sub>, C3''-**H**<sub>2</sub>, C4''-**H**<sub>2</sub>, C5''-**H**<sub>2</sub>, C6''-**H**<sub>2</sub>, C7''-**H**<sub>2</sub>), 0,80-1,10 (m, 9H, C8''-**H**<sub>3</sub>, C13-**H**<sub>3</sub>, C14-**H**<sub>3</sub>).

**$^{13}\text{C}$  NMR** (50 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  (ppm) 185,5 (1C, **C5'**), 184,0 (1C, **C2'**), 146,8 (1C, **C3'**), 144,0 (1C, **C4**), 142,0 (1C, **C1'**), 139,9 (1C, **C6'**), 120,6 (1C, **C3**), 97,6 (1C, **C4'**), 46,7 (1C, **C10**), 42,6 (1C, **C1''**), 42,0 (1C, **C5**), 38,4 (1C, **C9**), 36,5 (1C, **C8**), 35,9 (1C, **C6**), 34,9 (1C, **C15**), 31,7 (1C, **C6''**), 29,1 (2C, **C2''**, **C5''**), 28,1 (1C, **C4''**), 27,3 (1C, **C7**), 27,0 (1C, **C3''**), 26,5 (1C, **C2**), 22,6 (1C, **C7''**), 20,0 (1C, **C12**), 19,3 (1C, **C1**), 18,0 (1C, **C11**), 17,7 (1C, **C14**), 16,6 (1C, **C13**), 14,0 (1C, **C8''**).

**HRMS** (ESI):  $m/z$  izračunato za  $\text{C}_{29}\text{H}_{46}\text{NO}_2$  440,35231, nađeno  $[(\text{M}+\text{H})^+]$  440,35203; izračunato za  $\text{C}_{38}\text{H}_{91}\text{N}_2\text{O}_4$  879,69734; nađeno  $[(2\text{M}+\text{H})^+]$  879,69829.

**$E_{1/2}$** :  $E_{cl} = -1,132$  V,  $E_{al} = -1,059$  V,  $E_{c2} = -1,852$  V,  $E_{a2} = -1,711$  V,  $E^{\circ}/\text{Fc} = -1,165$  V.

#### 4.3.8. 2-(Oktilamino)-5-(((1R,2S,4aS,8aS)-1,2,4a,5-tetrametil-1,2,3,4,4a,7,8,8a-oktahidronaftalen-1-il)metil)cikloheksa-2,5-dien-1,4-dion (**127b**)

Prema opštem postupku za dobijanje alkilamino i aralkilamino derivata avarona, jedinjenje **127b** se dobija iz avarona (300 mg, 0,96 mmol) i *n*-oktilamina (2,73 g/3,5 mL, 21,12 mmol). Reakciona smesa se meša 16 h na sobnoj temperaturi. Jedinjenje je razdvojeno hromatografijom na koloni od svog regioizomera koristeći toluen:etil-acetat (9:1) kao eluent ( $R_f = 0,75$ ) i prečišćeno preparativnom tankoslojnom hromatografijom koristeći hloroform ( $R_f = 0,60$ ) kao eluent. Proizvod je dobijen kao crvenobraon ulje. Prinos 46,6 mg, 20,0 %.

Fizičke konstante i spektroskopski podaci za **127b**:

$[\alpha]^{20} = +50^{\circ}$  ( $c = 0,083$  mg/mL, MeOH). **UV-Vis** ( $c = 0,083$  mg/mL, MeOH,  $\lambda_{\text{max}}/\text{nm}$ , ( $\epsilon/\text{dm}^2\text{mol}^{-1}$ ): 290 ( $7,35 \times 10^4$ ), 490 ( $2,01 \times 10^4$ ).

**IR** (ATR) 3391,3; 3359,3; 2957,7; 2928,7; 2857,1; 1666,6; 1628,9; 1594,0; 1512,7; 1467,9; 1382,4; 1312,8; 1221,6  $\text{cm}^{-1}$ .

**$^1\text{H}$  NMR** (200 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  (ppm) 6,35 (s, 1H, C6'-**H**), 5,50 (bs, 1H, C4'N-**H**), 5,42 (s, 1H, C3'-**H**), 5,15 (s, 1H, C3-**H**), 3,06 (dd, 2H, C1''-**H**<sub>2</sub>), 2,65 (d,  $J = 13.6$  Hz, 1H, C15-**H**<sub>b</sub>), 2,46 (d,  $J = 13$  Hz, 1H, C15-**H**<sub>a</sub>), 1,80-2,20 (m, 4H, C2-**H**<sub>2</sub>, C6-**H**<sub>2</sub>), 1,20-1,70 (m, 24H, C1-**H**<sub>2</sub>, C7-**H**<sub>2</sub>, C8-**H**, C10-**H**, C11-**H**<sub>3</sub>, C12-**H**<sub>3</sub>, C2''-**H**<sub>2</sub>, C3''-**H**<sub>2</sub>, C4''-**H**<sub>2</sub>, C5''-**H**<sub>2</sub>, C6''-**H**<sub>2</sub>, C7''-**H**<sub>2</sub>), 0,80-1,10 (m, 9H, C8''-**H**<sub>3</sub>, C13-**H**<sub>3</sub>, C14-**H**<sub>3</sub>).

**$^{13}\text{C}$  NMR** (50 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  (ppm) 185,2 (1C, **C2'**), 183,7 (1C, **C5'**), 151,3 (1C, **C4'**), 146,1 (1C, **C4**), 144,0 (1C, **C1'**), 131,7 (1C, **C6'**), 120,8 (1C, **C3**), 98,2 (1C, **C3'**), 47,2 (1C,

**C10**), 43,1 (1C, **C1''**), 42,3 (1C, **C5**), 38,5 (1C, **C9**), 37,0 (1C, **C8**) 36,1 (1C, **C6**), 35,7 (1C, **C15**), 31,7 (1C, **C6''**), 29,2 (1C, **C2''**), 29,1 (1C, **C5''**), 28,2 (1C, **C4''**), 27,5 (1C, **C7**), 27,0 (1C, **C3''**), 26,5 (1C, **C2**), 22,6 (1C, **C7''**), 20,0 (1C, **C12**), 19,4 (1C, **C1**), 18,0 (1C, **C11**), 17,8 (1C, **C14**), 16,8 (1C, **C13**), 14,0 (1C, **C8''**).

**HRMS** (ESI):  $m/z$  izračunato za  $C_{29}H_{46}NO_2$  440,35231, nađeno  $[(M+H)^+]$  440,35181; izračunato za  $C_{58}H_{91}N_2O_4$  879,69734; nađeno  $[(2M+H)^+]$  879,69842.

**E<sub>1/2</sub>**:  $E_{c1} = -1,144$  V,  $E_{a1} = -1,076$  V,  $E_{c2} = -1,849$  V,  $E_{a2} = -1,684$  V,  $E^0_{i}/Fc = -1,179$  V.

#### 4.3.9. 2-(Pirolidin-1-il)-6-(((1*R*,2*S*,4*aS*,8*aS*)-1,2,4*a*,5-tetrametil-1,2,3,4,4*a*,7,8,8*a*-oktahidronaftalen-1-il)metil)cikloheksa-2,5-dien-1,4-dion (**128a**)

Prema opštem postupku za dobijanje alkilamino i aralkilamino derivata avarona, jedinjenje **128a** se dobija iz avarona (300 mg, 0,96 mmol) i pirolidina (1,5 g/1,8 mL, 21,12 mmol). Reakciona smesa se meša 3 h na temperaturi 60–70°C. Jedinjenje je razdvojeno od svog regioizomera hromatografijom na koloni pod sniženim pritiskom koristeći petrol-etar (t.k. 40–60°C):etil-acetat (8:2) kao eluent ( $R_f = 0,18$ ) i prečišćeno preparativnom tankoslojnom hromatografijom koristeći petrol-etar (t.k. 40–60°C):etil-acetat (7:3) kao eluent ( $R_f = 0,22$ ). Proizvod je dobijen u obliku crvenobraon kristala. Prinos 96,4 mg, 26,3 %.

Fizičke konstante i spektroskopski podaci za **128a**:

**t.t.** 121°C.  $[\alpha]^{20} = +60^\circ$  ( $c = 0,083$  mg/mL, MeOH). **UV-Vis** ( $c = 0,083$  mg/mL, MeOH,  $\lambda_{max}/nm$ , ( $\epsilon/dm^2 mol^{-1}$ ): 292 ( $2,79 \times 10^4$ ), 506 ( $2,14 \times 10^4$ ).

**IR** (ATR) 3322,8; 2961,3; 1669,7; 1635,2; 1588,8; 1559,0; 1454,4; 1415,1; 1378,8; 1334,9; 1284,4; 1261,7; 1188,9; 1098,3; 1024,9; 912,0; 860,7; 799,6; 755,1  $cm^{-1}$ .

**<sup>1</sup>H NMR** (500 MHz,  $CDCl_3$ ):  $\delta$  (ppm) 6,36 (d, 1H,  $J = 2$  Hz, C6'-**H**), 5,42 (d, 1H,  $J = 2$  Hz, C4'-**H**), 5,13 (s, 1H, C3-**H**), 3,52 (m, 4H, C1''-**H**<sub>2</sub>, C4''-**H**<sub>2</sub>), 2,67 (d, 1H,  $J = 4$  Hz, C15-**H**<sub>a</sub>), 2,37 (d, 1H,  $J = 6$  Hz, C15-**H**<sub>b</sub>), 1,10-1,70 (m, 9H, C1-**H**<sub>2</sub>; C7-**H**<sub>2</sub>; C8-**H**; C10-**H**; C11-**H**<sub>3</sub>), 1,90-2,10 (m, 8H, C2-**H**<sub>2</sub>; C6-**H**<sub>2</sub>; C2''-**H**<sub>2</sub>; C3''-**H**<sub>2</sub>), 0,80-1,10 (m, 9H, C14-**H**<sub>3</sub>; C13-**H**<sub>3</sub>; C12-**H**<sub>3</sub>).

**<sup>13</sup>C NMR** (125MHz,  $CDCl_3$ ):  $\delta$  (ppm) 185,6 (1C, **C5'**), 185,0 (1C, **C2'**), 148,6 (1C, **C3'**), 144,3 (1C, **C4**), 143,1 (1C, **C1'**), 138,5 (1C, **C6'**), 120,8 (1C, **C3**), 101,8 (1C, **C4'**), 50,9 (2C, **C1''**, **C4''**), 47,0 (1C, **C10**), 42,2 (1C, **C5**), 38,9 (1C, **C9**), 36,9 (1C, **C8**), 36,2 (1C, **C6**), 35,3 (1C, **C15**), 27,6 (1C, **C7**), 26,8 (2C, **C2''**, **C3''**), 20,2 (1C, **C2**), 19,4 (1C, **C12**), 18,3 (1C, **C1**), 17,9 (1C, **C11**), 17,0 (1C, **C14**), 16,9 (1C, **C13**).

**HRMS** (ESI):  $m/z$  izračunato za  $C_{25}H_{36}NO_2$  382,27406, nađeno  $[(M+H)^+]$  382,27388.

**E<sub>1/2</sub>**:  $E_{c1} = -1,267$  V,  $E_{a1} = -1,163$  V,  $E_{c2} = -1,883$  V,  $E_{a2} = -1,710$  V,  $E^0_{i}/Fc = -1,217$  V.



**4.3.10.** 2-(Pirolidin-1-il)-5-(((1*R*,2*S*,4*aS*,8*aS*)-1,2,4*a*,5-tetrametil-1,2,3,4,4*a*,7,8,8*a*-oktahidronaftalen-1-il)metil)cikloheksa-2,5-dien-1,4-dion (**128b**)

Prema opštem postupku za dobijanje alkilamino i aralkilamino derivata avarona, jedinjenje **128b** se dobija iz avarona (300 mg, 0,96 mmol) i pirolidina (1,5 g/1,8 mL, 21,12 mmol). Reakciona smesa se meša 3 h na temperaturi 60–70°C. Jedinjenje je razdvojeno od svog regioizomera hromatografijom na koloni pod sniženim pritiskom koristeći petrol-etar (t.k. 40–60°C):etil-acetat (9:1) kao eluent ( $R_f = 0,32$ ) i prečišćeno preparativnom tankoslojnom hromatografijom koristeći petrol-etar (t.k. 40–60°C):etil-acetat (8:2) kao eluent ( $R_f = 0,45$ ). Proizvod je dobijen u obliku crvenobraon kristala. Prinos 48,6 mg, 13,2 %.

Fizičke konstante i spektroskopski podaci za **128b**:

**t.t.** 42°C.  $[\alpha]^{20} = +30^\circ$  ( $c = 0,083$  mg/mL, MeOH). **UV-Vis** ( $c = 0,083$  mg/mL, MeOH,  $\lambda_{\max}/\text{nm}$ , ( $\epsilon/\text{dm}^2\text{mol}^{-1}$ ): 294 ( $2,79 \times 10^4$ ), 506 ( $2,14 \times 10^4$ ).

**IR** (ATR) 3330,7; 2961,4; 1661,5; 1629,5; 1562,5; 1451,0; 1379,6; 1260,4; 1227,2; 1096,2; 1024,5; 800,7; 756,6  $\text{cm}^{-1}$ .

**<sup>1</sup>H NMR** (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  (ppm) 6,26 (s, 1H, C6'-**H**), 5,44 (s, 1H, C3'-**H**), 5,15 (s, 1H, C3-**H**), 3,54 (m, 4H, C1''-**H**<sub>2</sub>, C4''-**H**<sub>2</sub>), 2,63 (d, 1H,  $J = 6$  Hz, C15-**H**<sub>a</sub>), 2,46 (d, 1H,  $J = 6$  Hz, C15-**H**<sub>b</sub>), 1,90-2,10 (m, 8H, C2-**H**<sub>2</sub>; C6-**H**<sub>2</sub>; C2''-**H**<sub>2</sub>; C3''-**H**<sub>2</sub>), 1,10-1,70 (m, 9H, C1-**H**<sub>2</sub>; C7-**H**<sub>2</sub>; C8-**H**; C10-**H**; C11-**H**<sub>3</sub>), 0,80-1,10 (m, 9H, C14-**H**<sub>3</sub>; C13-**H**<sub>3</sub>; C12-**H**<sub>3</sub>).

**<sup>13</sup>C NMR** (125MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  (ppm) 185,3 (**C2'**), 184,8 (**C5'**), 149,5 (**C1'**), 147,0 (**C4'**), 144,2 (**C4**), 133,2 (**C6'**), 121,0 (**C3**), 102,3 (**C3'**), 50,6 (2C, **C1''**, **C4''**), 47,4 (**C10**), 43,1 (**C5**), 38,7 (**C9**), 37,2 (**C8**), 36,4 (**C6**), 35,5 (**C15**), 27,8 (**C7**), 26,8 (2C, **C2''**, **C3''**), 20,2 (**C2**), 19,6 (**C12**), 18,3 (**C1**), 18,0 (**C11**), 17,0 (**C14**), 14,4 (**C13**).

**HRMS** (ESI):  $m/z$  izračunato za  $\text{C}_{25}\text{H}_{36}\text{NO}_2$  382,27406, nađeno  $[(M+H)^+]$  382,27420.

**E<sub>1/2</sub>**:  $E_{cl} = -1,259$  V,  $E_{al} = -1,177$  V,  $E_{c2} = -1,861$  V,  $E_{a2} = -1,704$  V,  $E^0_{1/Fc} = -1,218$  V.

**4.3.11.** 2-(Benzilamino)-6-(((1*R*,2*S*,4*aS*,8*aS*)-1,2,4*a*,5-tetrametil-1,2,3,4,4*a*,7,8,8*a*-oktahidronaftalen-1-il)metil)cikloheksa-2,5-dien-1,4-dion (**129a**)

Prema opštem postupku za dobijanje alkilamino i aralkilamino derivata avarona, jedinjenje **129a** se dobija iz avarona (300 mg, 0,96 mmol) i benzilamina (2,26 g/2,31 mL, 21,12 mmol). Reakciona smesa se meša 16 h na sobnoj temperaturi. Jedinjenje je razdvojeno od svog regioizomera hromatografijom na koloni koristeći toluen kao eluent ( $R_f = 0,19$ ) i prečišćeno preparativnom tankoslojnom hromatografijom koristeći heksan:aceton (7:3) kao eluent ( $R_f = 0,61$ ). Proizvod je dobijen u obliku crvenobraon kristala. Prinos 24,8 mg, 6,2 %.

Fizičke konstante i spektroskopski podaci za **129a**:

**t.t.** 85°C.  $[\alpha]^{20} = +10^\circ$  ( $c = 0,083$  mg/mL, MeOH). **UV-Vis** ( $c = 0,083$  mg/mL, MeOH,  $\lambda_{\max}/\text{nm}$ , ( $\epsilon/\text{dm}^2\text{mol}^{-1}$ ): 288 ( $4,21 \times 10^4$ ), 488 ( $1,89 \times 10^4$ ).

**IR** (ATR) 3387,5; 2960,4; 1670,3; 1635,2; 1587,2; 1503,3; 1454,9; 1379,9; 1346,3; 1251,2; 1189,3; 1095,3; 1072,1; 1027,5; 912,9; 803,0; 736,4; 699,2  $\text{cm}^{-1}$ .

**$^1\text{H}$  NMR** (200 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  (ppm) 7,20-7,50 (m, 5H, C3''-**H**, C4''-**H**, C5''-**H**, C6''-**H**, C7''-**H**), 6,38 (d, 1H,  $J = 2.4$  Hz, C6'-**H**), 5,93 (bs, 1H, C3'-N-**H**), 5,49 (d, 1H,  $J = 1.6$  Hz, C4'-**H**), 5,14 (s, 1H, C3-**H**), 4,27 (d, 2H,  $J = 5.6$  Hz, C1''-**H**<sub>2</sub>), 2,63 (d, 1H,  $J = 14$  Hz, C15-**H**<sub>b</sub>), 2,39 (d, 1H,  $J = 14$  Hz, C15-**H**<sub>a</sub>), 1,80-2,20 (m, 4H, C2-**H**<sub>2</sub>, C6-**H**<sub>2</sub>), 1,20-1,80 (m, 12H, C1-**H**<sub>2</sub>, C7-**H**<sub>2</sub>, C8-**H**, C10-**H**, C11-**H**<sub>3</sub>, C12-**H**<sub>3</sub>), 0,80-1,10 (m, 6H, C13-**H**<sub>3</sub>, C14-**H**<sub>3</sub>).

**$^{13}\text{C}$  NMR** (50 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  (ppm) 185,7 (**C5'**), 183,9 (**C2'**), 146,6 (**C3'**), 144,0 (**C4**), 142,2 (**C1'**), 139,6 (**C6'**), 135,9 (**C2''**), 129,0 (2C, **C4''**, **C6''**), 128,1 (2C, **C3''**, **C7''**), 127,7 (**C5''**), 120,6 (**C3**), 98,6 (**C4'**), 46,9 (**C1''**), 46,7 (**C10**), 42,1 (**C5**), 38,4 (**C9**), 36,6 (**C8**), 36,0 (**C6**), 35,0 (**C15**), 27,3 (**C7**), 26,5 (**C2**), 20,0 (**C12**), 19,3 (**C1**), 18,0 (**C11**), 17,7 (**C14**), 16,6 (**C13**).

**HRMS** (ESI):  $m/z$  izračunato za  $\text{C}_{28}\text{H}_{36}\text{NO}_2$  418,27406, nađeno  $[(\text{M}+\text{H})^+]$  418,27452; izračunato za  $\text{C}_{28}\text{H}_{35}\text{NO}_2\text{K}$  456,22994, nađeno  $[(\text{M}+\text{K})^+]$  456,23089.

$E_{1/2}$ :  $E_{cl} = -1,115$  V,  $E_{al} = -1,043$  V,  $E_{c2} = -1,865$  V,  $E_{a2} = -1,733$  V,  $E^0_{I/\text{Fc}} = -1,147$  V.

#### 4.3.12. 2-(Benzilamino)-5-(((1R,2S,4aS,8aS)-1,2,4a,5-tetrametil-1,2,3,4,4a,7,8,8a-oktahidronaftalen-1-il)metil)cikloheksa-2,5-dien-1,4-dion (**129b**)

Prema opštem postupku za dobijanje alkilamino i aralkilamino derivata avarona, jedinjenje **129b** se dobija iz avarona (300 mg, 0,96 mmol) i benzilamina (2,26 g/2,31 mL, 21,12 mmol). Reakciona smesa se meša 16 h na sobnoj temperaturi. Jedinjenje je razdvojeno od svog regioizomera hromatografijom na koloni koristeći toluen kao eluent ( $R_f = 0,36$ ) i prečišćeno preparativnom tankoslojnom hromatografijom koristeći heksan:acetone (7:3) kao eluent ( $R_f = 0,65$ ). Proizvod je dobijen u obliku crvenobraon kristala. Prinos 24,7 mg, 6,2 %.

Fizičke konstante i spektroskopski podaci za **129b**:

**t.t.** 107°C.  $[\alpha]^{20} = +50^\circ$  ( $c = 0,083$  mg/mL, MeOH). **UV-Vis** ( $c = 0,083$  mg/mL, MeOH,  $\lambda_{\text{max}}/\text{nm}$ , ( $\epsilon/\text{dm}^2\text{mol}^{-1}$ ): 290 ( $7,57 \times 10^4$ ), 484 ( $2,02 \times 10^4$ ).

**IR** (ATR) 3383,4 2932,6 1665,8 1628,4 1529,6; 1512,3; 1453,9; 1379,7; 1313,5; 1245,1; 1221,9; 1098,6; 1030,1; 901,1; 839,2; 736,1; 698,9  $\text{cm}^{-1}$ .

**$^1\text{H}$  NMR** (200 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  (ppm) 7,20-7,50 (m, 5H, C3''-**H**, C4''-**H**, C5''-**H**, C6''-**H**, C7''-**H**), 6,38 (s, 1H, C6'-**H**), 5,80 (bs, 1H, C4'-N-**H**), 5,50 (s, 1H, C3'-**H**), 5,16 (s, 1H, C3-**H**), 4,26 (d, 1H,  $J = 5.8$  Hz, C1''-**H**<sub>2</sub>), 2,65 (d, 1H,  $J = 12.8$  Hz, C15-**H**<sub>b</sub>), 2,47 (d, 1H,  $J = 12.8$  Hz, C15-**H**<sub>a</sub>), 1,80-1,20 (m, 4H, C2-**H**<sub>2</sub>, C6-**H**<sub>2</sub>), 1,20-1,80 (m, 12H, C1-**H**<sub>2</sub>, C7-**H**<sub>2</sub>, C8-**H**, C10-**H**, C11-**H**<sub>3</sub>, C12-**H**<sub>3</sub>), 0,80-1,10 (m, 6H, C13-**H**<sub>3</sub>, C14-**H**<sub>3</sub>).

**$^{13}\text{C}$  NMR** (50 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  (ppm) 185,4 (**C2'**), 183,5 (**C5'**), 151,1 (**C4'**), 145,8 (**C4**), 144,0 (**C1'**), 136,0 (**C2''**), 131,9 (**C6'**), 129,0 (2C, **C4''**, **C6''**), 128,1 (2C, **C3''**, **C7''**), 127,8 (**C5''**), 120,7 (**C3**), 99,2 (**C3'**), 47,1 (**C10**), 46,6 (**C1''**), 43,1 (**C5**), 38,5 (**C9**), 37,0 (**C8**), 36,0

(**C6**), 35,7 (**C15**), 27,5 (**C7**), 26,4 (**C2**), 20,0 (**C12**), 19,3 (**C1**), 18,0 (**C11**), 17,7 (**C14**), 16,8 (**C13**).

HRMS (ESI):  $m/z$  izračunato za  $C_{28}H_{36}NO_2$  418,27406, nađeno  $[(M+H)^+]$  418,27438.

$E_{1/2}$ :  $E_{c1} = -1,123$  V,  $E_{a1} = -1,054$  V,  $E_{c2} = -1,840$  V,  $E_{a2} = -1,685$  V,  $E^{\circ}_1/Fc = -1,157$  V.

**4.3.13.** 2-(Fenetilamino)-6-(((1*R*,2*S*,4*aS*,8*aS*)-1,2,4*a*,5-tetrametil-1,2,3,4,4*a*,7,8,8*a*-oktahidronaftalen-1-il)metil)cikloheksa-2,5-dien-1,4-dion (**130a**)

Prema opštem postupku za dobijanje alkilamino i aralkilamino derivata avarona, jedinjenje **130a** se dobija iz avarona (200 mg, 0,64 mmol) i fenetilamina (1,71 g/1,77 mL, 14,1 mmol). Reakciona smesa se meša 16 h na sobnoj temperaturi. Jedinjenje je razdvojeno od svog regioizomera hromatografijom na koloni koristeći toluen:etil-acetat (9:1) kao eluent ( $R_f = 0,58$ ) i prečišćeno preparativnom tankoslojnom hromatografijom koristeći heksan:aceton (8:2) kao eluent ( $R_f = 0,38$ ). Proizvod je dobijen kao crvenobraon ulje. Prinos 43,7mg, 12,1 %.

Fizičke konstante i spektroskopski podaci za **130a**:

$[\alpha]^{20} = +50^{\circ}$  ( $c = 0,083$  mg/mL, MeOH). UV-Vis ( $c = 0,083$  mg/mL, MeOH,  $\lambda_{max}/nm$ , ( $\epsilon/dm^2 mol^{-1}$ ): 288 ( $4,44 \times 10^4$ ), 494 ( $2,08 \times 10^4$ ).

IR (ATR) 3381,8; 2931,7; 1733,0; 1671,1; 1635,8 1587,9; 1507,0; 1456,9; 1380,3; 1347,2; 1253,4; 1197,6; 1096,4; 1028,3; 913,0; 889,1; 803,6; 744,7; 700,5  $cm^{-1}$ .

$^1H$  NMR (200 MHz,  $CDCl_3$ ):  $\delta$  (ppm) 7,10-7,40 (m, 5H, C4''-**H**, C5''-**H**, C6''-**H**, C7''-**H**, C8''-**H**), 6,37 (d,  $J = 2,4$  Hz, 1H, C6'-**H**), 5,46 (d,  $J = 2,4$  Hz, 1H, C4'-**H**), 5,68 (bs, 1H, C3'-N-**H**), 5,12 (s, 1H, C3-**H**), 3,35 (dd, 2H, C1''-**H**<sub>2</sub>), 2,92 (t,  $J = 7$  Hz, 2H, C2''-**H**<sub>2</sub>), 2,63 (d,  $J = 14$  Hz, 1H, C15-**H**<sub>b</sub>), 2,34 (d,  $J = 14$  Hz, 1H, C15-**H**<sub>a</sub>), 1,80-2.20 (m, 4H, C2-**H**<sub>2</sub>, C6-**H**<sub>2</sub>), 1,20-1,80 (m, 12H, C1-**H**<sub>2</sub>, C7-**H**<sub>2</sub>, C8-**H**, C10-**H**, C11-**H**<sub>3</sub>, C12-**H**<sub>3</sub>), 0,80-1,10 (m, 6H, C13-**H**<sub>3</sub>, C14-**H**<sub>3</sub>).

$^{13}C$  NMR (50 MHz,  $CDCl_3$ ):  $\delta$  (ppm) 185,6 (1C, **C5'**), 183,8 (1C, **C2'**), 146,6 (1C, **C3'**), 144,0 (1C, **C4**), 142,2 (1C, **C1'**), 139,7 (1C, **C6'**), 137,8 (1C, **C3''**), 128,8 (2C, **C5''**, **C7''**), 128,6 (2C, **C4''**, **C8''**), 126,9 (1C, **C6''**), 120,6 (1C, **C3**), 97,9 (1C, **C4'**), 46,7 (1C, **C10**), 43,7 (1C, **C1''**), 42,0 (1C, **C5**), 38,4 (1C, **C9**), 36,5 (1C, **C8**), 36,0 (1C, **C6**), 35,9 (1C, **C2''**), 34,2 (1C, **C15**), 27,3 (1C, **C7**), 26,5 (1C, **C2**), 20,0 (1C, **C12**), 19,3 (1C, **C1**), 18,0 (1C, **C11**), 17,7 (1C, **C14**), 16,6 (1C, **C13**).

HRMS (ESI):  $m/z$  izračunato za  $C_{29}H_{38}NO_2$  432,28971, nađeno  $[(M+H)^+]$  432,28613; izračunato za  $C_{58}H_{75}N_2O_4$  863,57214; nađeno  $[(2M+H)^+]$  863,56985.

$E_{1/2}$ :  $E_{c1} = -1,123$  V,  $E_{a1} = -1,052$  V,  $E_{c2} = -1,876$  V,  $E_{a2} = -1,747$  V,  $E^{\circ}_1/Fc = -1,156$  V.

#### 4.3.14. 2-(Fenetilamino)-5-(((1*R*,2*S*,4*aS*,8*aS*)-1,2,4*a*,5-tetrametil-1,2,3,4,4*a*,7,8,8*a*-oktahidronaftalen-1-il)metil)cikloheksa-2,5-dien-1,4-dion (**130b**)

Prema opštem postupku za dobijanje alkilamino i aralkilamino derivata avarona, jedinjenje **130b** se dobija iz avarona (200 mg, 0,64 mmol) i fenetilamina (1,71 g/1,77 mL, 14,1 mmol). Reakciona smesa se meša 16 h na sobnoj temperaturi. Jedinjenje je razdvojeno od svog regioizomera hromatografijom na koloni koristeći toluen:etil-acetat (9:1) kao eluent ( $R_f = 0,76$ ) i prečišćeno preparativnom tankoslojnom hromatografijom koristeći heksan:aceton (8:2) kao eluent ( $R_f = 0,49$ ). Proizvod je dobijen u obliku crvenobraon kristala. Prinos 52,4 mg, 25,2 %.

Fizičke konstante i spektroskopski podaci za **130b**:

**t.t.** 122–123°C.  $[\alpha]^{20} = +40^\circ$  ( $c = 0,083$  mg/mL, MeOH). **UV–Vis** ( $c = 0,083$  mg/mL, MeOH,  $\lambda_{\max}/\text{nm}$ , ( $\epsilon/\text{dm}^2\text{mol}^{-1}$ )): 290 ( $7,01 \times 10^4$ ), 488 ( $1,93 \times 10^4$ ).

**IR** (ATR) 3360,9; 2932,4; 2361,1; 1666,3; 1628,8; 1592,8; 1513,6; 1454,4; 1380,1; 1317,6; 1248,3; 1221,8; 1098,8; 1032,4; 898,8; 800,1; 747,2; 700,8  $\text{cm}^{-1}$ .

**<sup>1</sup>H NMR** (200 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  (ppm) 7,10-7,40 (m, 5H, C4''-H, C5''-H, C6''-H, C7''-H, C8''-H), 6,35 (s, 1H, C6'-H), 5,57 (bs, 1H, C4'-N-H), 5,47 (s, 1H, C3'-H), 5,15 (s, 1H, C3-H), 3,35 (dd, 2H, C1''-H<sub>2</sub>), 2,93 (t,  $J = 7,4$  Hz, 2H, C2''-H<sub>2</sub>), 2,65 (d,  $J = 13$  Hz, 1H, C15-H<sub>b</sub>), 2,46 (d,  $J = 13$  Hz, 1H, C15-H<sub>a</sub>), 1,80-2,20 (m, 4H, C2-H<sub>2</sub>, C6-H<sub>2</sub>), 1,20-1,80 (m, 12H, C1-H<sub>2</sub>, C7-H<sub>2</sub>, C8-H, C10-H, C11-H<sub>3</sub>, C12-H<sub>3</sub>), 0,80-1,10 (m, 6H, C13-H<sub>3</sub>, C14-H<sub>3</sub>).

**<sup>13</sup>C NMR** (50 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  (ppm) 185,3 (1C, C2'), 183,4 (1C, C5'), 151,2 (1C, C4'), 145,8 (1C, C4), 144,0 (1C, C1'), 137,8 (1C, C3''), 131,8 (1C, C6'), 128,8 (2C, C5''; C7''), 128,6 (2C, C4''; C8''), 126,9 (1C, C6''), 120,7 (1C, C3), 98,5 (1C, C3'), 47,1 (1C, C10), 43,4 (1C, C1''), 43,1 (1C, C5), 38,5 (1C, C9), 37,0 (1C, C8), 36,0 (1C, C6), 35,7 (1C, C2''), 34,4 (1C, C15), 27,5 (1C, C7), 26,4 (1C, C2), 20,0 (1C, C12), 19,3 (1C, C1), 18,0 (1C, C11), 17,7 (1C, C14), 16,8 (1C, C13).

**HRMS** (ESI):  $m/z$  izračunato za  $\text{C}_{29}\text{H}_{38}\text{NO}_2$  432,28971, nađeno  $[(M+H)^+]$  432,29161; izračunato za  $\text{C}_{58}\text{H}_{75}\text{N}_2\text{O}_4$  863,57214; nađeno  $[(2M+H)^+]$  863,57121.

**E<sub>1/2</sub>**:  $E_{cl} = -1,131$  V,  $E_{al} = -1,061$  V,  $E_{c2} = -1,869$  V,  $E_{a2} = -1,729$  V,  $E^\circ_{I/Fc} = -1,164$  V.

#### 4.4. Dobijanje *terc*-butil-1,4-benzohinona

*terc*-Butilhidrohinon (2 g, 12 mmol) rastvori se u dietil-etru (100 ml). Srebro(I)-oksid (3,74 g, 16,14 mmol) se dodaje u porcijama u reakcionu smesu, i smesa se meša 2 h n sobnoj temperaturi. Nakon ovog perioda, natrijum-sulfat se dodaje i smesa se ostavi da stoji tokom noći. Elementarno srebro, višak srebro(I)-oksida i natrijum-sulfat se uklone filtracijom preko infuzorijske zemlje (Kieselguhr). Dietil-etar se upari na vakuum uparivaču, a dobijeni proizvod, *terc*-butil-1,4-benzohinon, korišćen je dalje bez dodatnog prečišćavanja. Prinos reakcije je bio kvantitativan.

#### 4.5. Dobijanje alkilamino i aralkilamino derivata *terc*-butil-1,4-benzohinona

*Opšti postupak za dobijanje alkilamino i aralkil amino derivata terc-butil-1,4-benzohinona.* *terc*-Butil-1,4-benzohinon (300 mg, 1,83 mmol, osim ako nije drugačije naglašeno) rastvori se u etanolu (50 ml). Hidrohloridne soli amina (u velikom višku 22x) pripremljene su iz alkilamina i aralkilamina kao vodeni rastvori ako su amini bili rastvorljivi u vodi, ili kao rastvori u smesi vode i etanola 1:1 ako amini nisu bili rastvorljivi u vodi. pH vrednost ovih rastvora je podešena na pH = 7–8 dodatkom čvrstog natrijum-bikarbonata, i rastvori su dodavani u rastvor hinona. Voda i etanol su dodavani u reakcionu smesu do konačne zapremine od 300 ml i konačnog odnosa vode i etanola 1:1. Reakcija se meša 16 sati na sobnoj temperaturi. Po ovoj proceduri dobijeni su derivati u reakciji sa *n*-butilaminom, *n*-oktilaminom, benzilaminom i fenetilaminom. U reakciji sa alilaminom, *sek*-butilaminom i pirolidinom reakciono vreme je smanjeno na 3 sata uz zagrevanje smeše na 60–70°C. Etanol je uklonjen uparavanjem na vakuum uparivaču, reakciona smesa je ekstrahovana metilenhloridom, dva puta sa po polovinom zapremine vodenog sloja. Organski sloj je odvojen, osušen nad anhidrovanim natrijum-sulfatom, i rastvarač uklonjen na vakuum uparivaču. Sirovi proizvodi su razdvojeni hromatografijom na koloni i prečišćeni tankoslojnom hromatografijom, koristeći naznačene rastvarače.

##### 4.5.1. 2-*terc*-Butil-6-(metilamino)-1,4-benzohinon (**131a**)

Prema opštem postupku za dobijanje alkilamino i aralkilamino derivata *terc*-butil-1,4-benzohinona, jedinjenje **131a** se dobija iz *terc*-butil-1,4-benzohinona (300 mg, 1,83 mmol) i metilamin-hidrohlorida (1,5 g, 22,2 mmol). Reakciona smesa se meša 16 h na sobnoj temperaturi. Jedinjenje je razdvojeno od svog regioizomera hromatografijom na koloni koristeći toluen:etil-acetat (9:1) kao eluent ( $R_f = 0,24$ ) i prečišćeno preparativnom tankoslojnom hromatografijom koristeći toluen:etil-acetat (9:1) kao eluent. Proizvod je dobijen u obliku crvenobraon kristala. Prinos 105,0 mg, 59,5 %.

Fizičke konstante i spektroskopski podaci za **131a**:

**t.t.** 178°C. **UV–Vis** ( $c = 0,083$  mg/mL, MeOH,  $\lambda_{max}/nm$ , ( $\epsilon/ dm^2 mol^{-1}$ )): 276 ( $7,68 \times 10^4$ ), 482 ( $2,50 \times 10^4$ ).

**IR** (ATR) 3310,7; 3070,8; 3003,1; 2962,9; 2921,9; 2874,1; 2803,2; 1674,7; 1625,9; 1575,2; 1499,9; 1449,2; 1411,6; 1373,8; 1339,6; 1261,1; 1206,6; 1176,5; 1138,6; 1068,4; 907,1; 796,1  $cm^{-1}$ .

**<sup>1</sup>H NMR** (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  (ppm) 6,47 (d,  $J = 2,5$  Hz 1H, C3-**H**), 5,79 (bs, 1H, C6-N**H**CH<sub>3</sub>), 5,41 (d,  $J = 2$  Hz, 1H, C5-**H**), 2,85 (d,  $J = 5,5$  Hz, 3H, C6-N**H**C**H**<sub>3</sub>), 1,26 (s, 9H, C2-C(**CH**<sub>3</sub>)<sub>3</sub>).

**<sup>13</sup>C NMR** (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  (ppm) 186,0 (1C, **C4**), 183,1 (1C, **C1**), 151,2 (1C, **C2**), 148,6 (1C, **C6**), 135,0 (1C, **C3**), 96,7 (1C, **C5**), 34,7 (1C, C2-**C**(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 29,2 (1C, C6-N**H**CH<sub>3</sub>), 29,0 (3C, C2-C(**CH**<sub>3</sub>)<sub>3</sub>).

**HRMS** (ESI):  $m/z$  izračunato za  $C_{11}H_{16}NO_2$  194,11756, nađeno  $[(M+H)^+]$  194,11742; izračunato za  $C_{22}H_{31}N_2O_4$  387,22783; nađeno  $[(2M+H)^+]$  387,22765.

$E_{1/2} E_{cl} = -1,200$  V,  $E_{al} = -1,104$  V,  $E_{c2} = -1,910$  V,  $E_{a2} = -1,785$  V,  $E^{\circ}_l/Fc = -1,213$  V.

#### 4.5.2. 2-*terc*-Butil-5-(metilamino)-1,4-benzohinon (**131b**)

Prema opštem postupku za dobijanje alkilamino i aralkilamino derivata *terc*-butil-1,4-benzohinona, jedinjenje **131b** se dobija iz *terc*-butil-1,4-benzohinona (300 mg, 1,83 mmol) i metilamin-hidrohlorida (1,5 g, 22,2 mmol). Reakciona smesa se meša 16 h na sobnoj temperaturi. Jedinjenje je razdvojeno od svog regioizomera hromatografijom na koloni koristeći toluen:etil-acetat (9:1) kao eluent ( $R_f = 0,46$ ) i prečišćeno preparativnom tankoslojnom hromatografijom koristeći toluen:etil-acetat (9:1) kao eluent. Proizvod je dobijen u obliku crvenobraon kristala. Prinos 8,9 mg, 5,0 %.

Fizičke konstante i spektroskopski podaci za **131b**:

**t.t.** 94°C. **UV-Vis** ( $c = 0,083$  mg/mL, MeOH,  $\lambda_{max}/nm$ , ( $\epsilon/dm^2mol^{-1}$ ): 274 ( $7,62 \times 10^4$ ), 478 ( $1,62 \times 10^4$ ).

**<sup>1</sup>H NMR** (500 MHz,  $CDCl_3$ ):  $\delta$  (ppm) 6,43 (s, 1H, C3-**H**), 5,44 (bs, 1H, C5-N**H**CH<sub>3</sub>), 5,38 (s, 1H, C6-**H**), 2,82 (d,  $J = 5$  Hz, 3H, C5-N**H**C**H**<sub>3</sub>), 1,30 (s, 9H, C2-C(**CH**<sub>3</sub>)<sub>3</sub>).

**<sup>13</sup>C NMR** (125 MHz,  $CDCl_3$ ):  $\delta$  (ppm) 184,8 (1C, **C4**), 159,7 (1C, **C2**), 146,3 (1C, **C5**), 127,4 (1C, **C3**), 100,2 (1C, **C6**), 35,7 (1C, C2-C(**CH**<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 29,7 (3C, C2-C(**CH**<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 28,9 (1C, C5-N**H**C**H**<sub>3</sub>).

**HRMS** (ESI):  $m/z$  izračunato za  $C_{11}H_{16}NO_2$  194,11756, nađeno  $[(M+H)^+]$  194,11785.

$E_{1/2} E_{cl} = -1,200$  V,  $E_{al} = -1,124$  V,  $E_{c2} = -1,906$  V,  $E_{a2} = -1,766$  V,  $E^{\circ}_l/Fc = -1,223$  V.

#### 4.5.3. 2-*terc*-Butil-6-(etilamino)-1,4-benzohinon (**132a**)

Prema opštem postupku za dobijanje alkilamino i aralkilamino derivata *terc*-butil-1,4-benzohinona, jedinjenje **132a** se dobija iz *terc*-butil-1,4-benzohinona (307 mg, 1,87 mmol) i dietilamina (3 g/4,3 mL, 41,13 mmol). Reakciona smesa se meša 16 h na sobnoj temperaturi. Jedinjenje je razdvojeno od svog regioizomera hromatografijom na koloni koristeći toluen:etil-acetat (9:1) kao eluent ( $R_f = 0,32$ ) i prečišćeno preparativnom tankoslojnom hromatografijom koristeći heksan:aceton (8:2) kao eluent ( $R_f = 0,43$ ). Proizvod je dobijen kao crvenobraon ulje. Prinos 10,2 mg, 5,3 %.

Fizičke konstante i spektroskopski podaci za **132a**:

**UV-Vis** ( $c = 0,083$  mg/mL, MeOH,  $\lambda_{max}/nm$ , ( $\epsilon/dm^2mol^{-1}$ ): 278 ( $6,69 \times 10^4$ ) 484 ( $2,38 \times 10^4$ ).

**IR** (ATR) 3386,0; 3320,5; 2962,3; 2871,9; 1729,3; 1670,7; 1631,5; 1584,7; 1506,5; 1466,8; 1362,3; 1338,0; 1257,5; 1169,9; 1095,0; 1062,9; 907,4; 804,4  $cm^{-1}$ .

**<sup>1</sup>H NMR** (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ (ppm) 6,46 (d, *J* = 2 Hz, 1H, C3-**H**), 5,64 (bs, 1H, C6-N**HEt**), 5,42 (d, *J* = 2 Hz, 1H, C5-**H**), 3,14 (kvintet, *J* = 7 Hz, 2H, C1'-**H**<sub>2</sub>), 1,29 (t, *J* = 7 Hz, 3H, C2'-**H**<sub>3</sub>), 1,26 (s, 9H, C2-C(**CH**<sub>3</sub>)<sub>3</sub>).

**<sup>13</sup>C NMR** (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ (ppm) 186,1 (**C4**), 183,2 (**C1**), 151,2 (**C2**), 147,4 (**C6**), 135,0 (**C3**), 97,0 (**C5**), 37,3 (**C1'**), 34,7 (1C, C2-**C**(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 29,0 (3C, C2-C(**CH**<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 13,4 (**C2'**).

**HRMS** (ESI): *m/z* izračunato za C<sub>12</sub>H<sub>18</sub>NO<sub>2</sub> 208,13321, nađeno [(M+H)<sup>+</sup>] 208,13318; izračunato za C<sub>24</sub>H<sub>35</sub>N<sub>2</sub>O<sub>4</sub> 415,25913; nađeno [(2M+H)<sup>+</sup>] 415,25877.

**E<sub>1/2</sub>** *E<sub>cl</sub>* = -1,160 V, *E<sub>al</sub>* = -1,080 V, *E<sub>c2</sub>* = -1,896 V, *E<sub>a2</sub>* = -1,746 V, *E<sup>o</sup><sub>i</sub>/Fc* = -1,191 V.

#### 4.5.4. 2-*terc*-Butil-5-(etilamino)-1,4-benzohinon (**132b**)

Prema opštem postupku za dobijanje alkilamino i aralkilamino derivata *terc*-butil-1,4-benzohinona, jedinjenje **132b** se dobija iz *terc*-butil-1,4-benzohinona (307 mg, 1,87 mmol) i dietilamina (3 g/4,3 mL, 41,13 mmol). Reakciona smesa se meša 16 h na sobnoj temperaturi. Jedinjenje je razdvojeno od svog regioizomera hromatografijom na koloni koristeći toluen:etil-acetat (9:1) kao eluent (*R<sub>f</sub>* = 0,54) i prečišćeno preparativnom tankoslojnom hromatografijom koristeći heksan:aceton (8:2) kao eluent (*R<sub>f</sub>* = 0,583). Proizvod je dobijen u obliku crvenobraon kristala. Prinos 4,5 mg, 2,4 %.

Fizičke konstante i spektroskopski podaci za **132b**:

**t.t.** 136°C. **UV-Vis** (*c* = 0,083 mg/mL, MeOH, λ<sub>max</sub>/nm, (ε/ dm<sup>2</sup> mol<sup>-1</sup>)): 266 (4,16x10<sup>4</sup>) 480 (0,39x10<sup>4</sup>).

**IR** (ATR) 3391,6; 3057,3; 2962,3; 1669,7; 1644,4; 1625,9; 1590,6; 1513,3; 1475,6; 1364,1; 1265,7; 1221,2; 1183,8; 1108,3; 1018,1; 894,2; 865,0; 831,9; 739,2 cm<sup>-1</sup>.

**<sup>1</sup>H NMR** (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ (ppm) 6,43 (s, 1H, C3-**H**), 5,38 (s, 1H, C6-**H**), 5,34 (bs, 1H, C5-N**HEt**), 3,11 (kvintet, *J* = 7 Hz, 2H, C1'-**H**<sub>2</sub>), 1,30 (s, 9H, C2-C(**CH**<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 1,27 (t, *J* = 7 Hz, 3H, C2'-**H**<sub>3</sub>).

**<sup>13</sup>C NMR** (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ (ppm) 185,9 (**C1**), 184,8 (**C4**), 159,7 (**C2**), 145,2 (**C5**), 127,4 (**C3**), 100,4 (**C6**), 37,0 (**C1'**), 35,7 (C2-**C**(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 29,7 (3C, C2-C(**CH**<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 13,5 (**C2'**).

**HRMS** (ESI): *m/z* izračunato za C<sub>12</sub>H<sub>18</sub>NO<sub>2</sub> 208,13321, nađeno [(M+H)<sup>+</sup>] 208,13342.

**E<sub>1/2</sub>** *E<sub>cl</sub>* = -1,170 V, *E<sub>al</sub>* = -1,102 V, *E<sub>c2</sub>* = -1,860 V, *E<sub>a2</sub>* = -1,672 V *E<sup>o</sup><sub>i</sub>/Fc* = -1,211 V.

#### 4.5.5. 2-(Alilamino)-6-*terc*-butil-1,4-benzohinon (**133a**)

Prema opštem postupku za dobijanje alkilamino i aralkilamino derivata *terc*-butil-1,4-benzohinona, jedinjenje **133a** se dobija iz *terc*-butil-1,4-benzohinona (300 mg, 1,83 mmol) i alilamina (2,29 g/3 mL, 40,19 mmol). Reakciona smesa se meša 3 h na temperaturi 60–70°C. Jedinjenje je razdvojeno od svog regioizomera hromatografijom na koloni koristeći

toluen:etil-acetat (9:1) kao eluent ( $R_f = 0,35$ ) i prečišćeno preparativnom tankoslojnom hromatografijom koristeći heksan:aceton (8:2) kao eluent ( $R_f = 0,45$ ). Proizvod je dobijen u obliku crvenobraon kristala. Prinos 168 mg, 41,9 %.

Fizičke konstante i spektroskopski podaci za **133a**:

**t.t.** 64°C. **UV-Vis** ( $c = 0,083$  mg/mL, MeOH,  $\lambda_{\max}/\text{nm}$ , ( $\epsilon/\text{dm}^2\text{mol}^{-1}$ )): 272 ( $6,55 \times 10^4$ ), 476 ( $2,33 \times 10^4$ ).

**IR** (ATR) 3285,2; 3073,0; 2990,4; 2961,0; 2908,9; 2871,0; 1672,7; 1627,2; 1578,9; 1498,6; 1431,8; 1368,6; 1339,4; 1293,3; 1249,9; 1204,0; 1163,8; 1073,2; 991,0; 914,8; 804,2; 702,9; 643,5  $\text{cm}^{-1}$ .

**$^1\text{H}$  NMR** (200 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  (ppm) 6,47 (d, 1H,  $J = 2$  Hz, C5-**H**), 5,86 (m, 2H, C2-N**H**, C2'-**H**), 5,45 (d, 1H,  $J = 2$  Hz, C3-**H**), 5,31 (dd, 1H,  $J_1 = 8$  Hz,  $J_2 = 1$  Hz, C3'-**H<sub>a</sub>**), 5,24 (s, 1H, C3'-**H<sub>b</sub>**), 3,75 (t, 2H,  $J = 6$  Hz, C1'-**H<sub>2</sub>**), 1,27 (s, 9H, C6-C(**CH<sub>3</sub>**)<sub>3</sub>).

**$^{13}\text{C}$  NMR** (50 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  (ppm) 186,2 (**C4**), 183,1 (**C1**), 151,3 (**C6**), 147,3 (**C2**), 134,8 (**C2'**), 131,7 (**C5**), 118,1 (**C3'**), 97,8 (**C3**), 44,9 (**C1'**), 34,7 (C6-C(**CH<sub>3</sub>**)<sub>3</sub>), 28,9 (3C, C6-C(**CH<sub>3</sub>**)<sub>3</sub>).

**HRMS** (ESI):  $m/z$  izračunato za  $\text{C}_{13}\text{H}_{18}\text{NO}_2$  220,13321, nađeno  $[(\text{M}+\text{H})^+]$  220,13319.

$E_{1/2}$   $E_{c1} = -1,180$  V,  $E_{a1} = -1,121$  V,  $E_{c2} = -1,812$  V,  $E_{a2} = -1,712$  V,  $E^0_{1/\text{Fc}} = -1,149$  V.

#### 4.5.6. 2-(Alilamino)-5-*terc*-butil-1,4-benzohinon (**133b**)

Prema opštem postupku za dobijanje alkilamino i aralkilamino derivata *terc*-butil-1,4-benzohinona, jedinjenje **133b** se dobija iz *terc*-butil-1,4-benzohinona (300 mg, 1,83 mmol) i alilamina (2,29 g/3 mL, 40,19 mmol). Reakciona smesa se meša 3 h na temperaturi 60–70°C. Jedinjenje je razdvojeno od svog regioizomera hromatografijom na koloni koristeći toluen:etil-acetat (9:1) kao eluent ( $R_f = 0,57$ ) i prečišćeno preparativnom tankoslojnom hromatografijom koristeći heksan:aceton (8:2) kao eluent ( $R_f = 0,54$ ). Proizvod je dobijen u obliku crvenobraon kristala. Prinos 38 mg, 9,5 %.

Fizičke konstante i spektroskopski podaci za **133b**:

**t.t.** 39°C. **UV-Vis** ( $c = 0,083$  mg/mL, MeOH,  $\lambda_{\max}/\text{nm}$ , ( $\epsilon/\text{dm}^2\text{mol}^{-1}$ )): 270 ( $6,52 \times 10^4$ ), 474 ( $1,47 \times 10^4$ ).

**IR** (ATR) 3387,7; 3066,5; 3004,4; 2960,7; 2915,5; 2870,4; 1669,9; 1627,0; 1588,7; 1512,9; 1456,1; 1389,9; 1338,5; 1248,3; 1224,7; 1187,2; 1017,4; 991,9; 929,3; 895,9; 836,8  $\text{cm}^{-1}$ .

**$^1\text{H}$  NMR** (200 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  (ppm) 6,45 (s, 1H, C6-**H**), 5,84 (m, 1H, C2'-**H**), 5,54 (bs, 1H, C2-N**H**), 5,41 (s, 1H, C3-**H**), 5,28 (d, 1H,  $J = 6$  Hz, C3'-**H<sub>a</sub>**), 5,22 (s, 1H, C3'-**H<sub>b</sub>**), 3,73 (t, 2H,  $J = 6$  Hz, C1'-**H<sub>2</sub>**), 1,30 (s, 9H, C5-C(**CH<sub>3</sub>**)<sub>3</sub>).



$^{13}\text{C}$  NMR (50 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  (ppm) 186,0 (**C4**), 184,8 (**C1**), 159,5 (**C5**), 145,1 (**C2**), 131,8 (**C2'**), 127,5 (**C6**), 118,0 (**C3'**), 101,1 (**C3**), 44,7 (**C1'**), 35,7 (C5-**C**( $\text{CH}_3$ )<sub>3</sub>), 29,6 (3C, C5-**C**( $\text{CH}_3$ )<sub>3</sub>).

HRMS (ESI):  $m/z$  izračunato za  $\text{C}_{13}\text{H}_{18}\text{NO}_2$  220,13321, nađeno  $[(\text{M}+\text{H})^+]$  220,13311.

$E_{1/2}$   $E_{cl} = -1,210$  V,  $E_{al} = -1,152$  V,  $E_{c2} = -1,848$  V,  $E_{a2} = -1,733$  V,  $E^{\circ}_l/\text{Fc} = -1,181$  V.

#### 4.5.7. 2-*terc*-Butil-6-(butilamino)-1,4-benzohinon (**134a**)

Prema opštem postupku za dobijanje alkilamino i aralkilamino derivata *terc*-butil-1,4-benzohinona, jedinjenje **134a** se dobija iz *terc*-butil-1,4-benzohinona (312 mg, 1,9 mmol) i *n*-butilamina (1,68 g/2,28 mL, 23 mmol). Reakciona smesa se meša 16 h na sobnoj temperaturi. Jedinjenje je razdvojeno od svog regioizomera hromatografijom na koloni koristeći toluen:etil-acetat (9:1) kao eluent ( $R_f = 0,44$ ) i prečišćeno preparativnom tankoslojnom hromatografijom koristeći toluen:etil-acetat (9:1) kao eluent. Proizvod je dobijen kao crvenobraon ulje. Prinos 124,9 mg, 55,9 %.

Fizičke konstante i spektroskopski podaci za **134a**:

UV-Vis ( $c = 0,083$  mg/mL, MeOH,  $\lambda_{\text{max}}/\text{nm}$ , ( $\epsilon/\text{dm}^2\text{mol}^{-1}$ )): 278 ( $5,81 \times 10^4$ ), 488 ( $2,12 \times 10^4$ ).

IR (ATR) 3387,2; 3302,5; 2993,1; 2959,9; 2932,2; 2871,0; 2363,4; 1670,3; 1632,4; 1586,0; 1506,9; 1465,7; 1363,2; 1338,8; 1255,9; 1206,4; 1164,9; 1075,9; 964,9; 905,5; 807,1  $\text{cm}^{-1}$ .

$^1\text{H}$  NMR (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  (ppm) 6,46 (d,  $J = 2,5$  Hz, 1H, C3-**H**), 5,69 (bs, 1H, C6-**NH**<sup>n</sup>Bu), 5,42 (d,  $J = 2,5$  Hz, 1H, C5-**H**), 3,08 (q,  $J = 2,8$  Hz, 2H, C1'-**H**<sub>2</sub>), 1,64 (kvintet,  $J = 3$  Hz, 2H, C2'-**H**<sub>2</sub>), 1,42 (sektet,  $J = 3$  Hz, 2H, C3'-**H**<sub>2</sub>), 1,26 (s, 9H, C2-**C**( $\text{CH}_3$ )<sub>3</sub>), 0,96 (t,  $J = 3$  Hz, 3H, C4'-**H**<sub>3</sub>).

$^{13}\text{C}$  NMR (125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  (ppm) 186,0 (1C, **C4**), 183,2 (1C, **C1**), 151,2 (1C, **C2**), 147,6 (1C, **C6**), 135,1 (1C, **C3**), 97,0 (1C, **C5**), 42,3 (1C, **C1'**), 34,7 (1C, C2-**C**( $\text{CH}_3$ )<sub>3</sub>), 30,2 (1C, **C2'**), 29,0 (3C, C2-**C**( $\text{CH}_3$ )<sub>3</sub>), 20,2 (1C, **C3'**), 13,7 (1C, **C4'**)-

HRMS (ESI):  $m/z$  izračunato za  $\text{C}_{14}\text{H}_{22}\text{NO}_2$  236,16451, nađeno  $[(\text{M}+\text{H})^+]$  236,16460.

$E_{1/2}$   $E_{cl} = -1,160$  V,  $E_{al} = -1,081$  V,  $E_{c2} = -1,892$  V,  $E_{a2} = -1,759$  V,  $E^{\circ}_l/\text{Fc} = -1,192$  V.

#### 4.5.8. 2-*terc*-Butil-5-(butilamino)-1,4-benzohinon (**134b**)

Prema opštem postupku za dobijanje alkilamino i aralkilamino derivata *terc*-butil-1,4-benzohinona, jedinjenje **134b** se dobija iz *terc*-butil-1,4-benzohinona (312 mg, 1,9 mmol) i *n*-butilamina (1,68 g/2,28 mL, 23 mmol). Reakciona smesa se meša 16 h na sobnoj temperaturi. Jedinjenje je razdvojeno od svog regioizomera hromatografijom na koloni koristeći toluen:etil-acetat (9:1) kao eluent ( $R_f = 0,70$ ) i prečišćeno preparativnom tankoslojnom hromatografijom koristeći toluen:etil-acetat (9:1) kao eluent. Proizvod je dobijen u obliku crvenobraon kristala. Prinos 28,7 mg, 12,8 %.

Fizičke konstante i spektroskopski podaci za **134b**:

**t.t** 59°C. **UV-Vis** ( $c = 0,083$  mg/mL, MeOH,  $\lambda_{\max}/\text{nm}$ , ( $\epsilon/\text{dm}^2\text{mol}^{-1}$ ): 274 ( $5,93 \times 10^4$ ), 484 ( $1,93 \times 10^4$ ).

**IR** (ATR) 3734,1; 3294,1; 3081,5; 3003,2; 2958,7; 2929,5; 2869,7; 2195,6; 2156,3; 2025,5; 1970,3; 1671,7; 1624,5; 1578,0; 1509,8; 1459,3; 1349,3; 1297,6; 1237,7; 1191,0; 1066,0; 1015,8; 893,5; 841,2; 672,0  $\text{cm}^{-1}$ .

**<sup>1</sup>H NMR** (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  (ppm) 6,43 (s, 1H, C3-**H**), 5,38 (s, 2H, C4-N**H**<sup>n</sup>Bu, C6-**H**), 3,06 (q,  $J = 2,6$  Hz, 2H, C1'-**H**<sub>2</sub>), 1,61 (kvintet,  $J = 3$  Hz, 2H, C2'-**H**<sub>2</sub>), 1,40 (sektet,  $J = 3$  Hz, 2H, C3'-**H**<sub>2</sub>), 1,30 (s, 9H, C2-C(**CH**<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 0,95 (t,  $J = 3$  Hz, 3H, C4'-**H**<sub>3</sub>).

**<sup>13</sup>C NMR** (125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  (ppm) 185,8 (1C, **C1**), 184,9 (1C, **C4**), 159,7 (1C, **C2**), 145,4 (1C, **C5**), 127,4 (1C, **C3**), 100,3 (1C, **C6**), 42,0 (1C, **C1'**), 35,7 (1C, C2-C(**CH**<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 30,3 (1C, **C3'**), 29,7 (3C, C2-C(**CH**<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 20,2 (1C, **C3'**), 13,7 (1C, **C4'**).

**HRMS** (ESI):  $m/z$  izračunato za  $\text{C}_{14}\text{H}_{22}\text{NO}_2$  236,16451, nađeno  $[(\text{M}+\text{H})^+]$  236,16462; izračunato za  $\text{C}_{28}\text{H}_{43}\text{N}_2\text{O}_4$  471,32173; nađeno  $[(2\text{M}+\text{H})^+]$  471,32154.

$E_{1/2}$   $E_{cl} = -1,182$  V,  $E_{al} = -1,096$  V,  $E_{c2} = -1,921$  V,  $E_{a2} = -1,773$  V,  $E^\circ_{l/\text{Fc}} = -1,210$  V.

#### 4.5.9. 2-*terc*-Butil-6-(*sek*-butilamino)-1,4-benzohinon (**135a**)

Prema opštem postupku za dobijanje alkilamino i aralkilamino derivata *terc*-butil-1,4-benzohinona, jedinjenje **135a** se dobija iz *terc*-butil-1,4-benzohinona (300 mg, 1,83 mmol) i *sek*-butilamina (3 g/4,06 mL, 40,19 mmol). Reakciona smesa se meša 3 h na temperaturi 60–70°C. Jedinjenje je razdvojeno od svog regioizomera hromatografijom na koloni koristeći toluen:etil-acetat (9:1) kao eluent ( $R_f = 0,46$ ) i prečišćeno preparativnom tankoslojnom hromatografijom koristeći heksan:aceton (9:1) kao eluent ( $R_f = 0,36$ ). Proizvod je dobijen kao crvenobraon ulje. Prinos 139,2 mg, 32,4 %.

Fizičke konstante i spektroskopski podaci za **135a**:

**UV-Vis** ( $c = 0,083$  mg/mL, MeOH,  $\lambda_{\max}/\text{nm}$ , ( $\epsilon/\text{dm}^2\text{mol}^{-1}$ ): 274 ( $6,61 \times 10^4$ ), 486 ( $2,63 \times 10^4$ ).

**IR** (ATR) 3378,8; 3288,5; 2965,8; 2874,5; 1669,8; 1632,8; 1586,2; 1508,0; 1457,4; 1343,5; 1263,7; 1170,7; 1008,6; 906,3; 808,5  $\text{cm}^{-1}$ .

**<sup>1</sup>H NMR** (200 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  (ppm) 6,46 (d, 1H,  $J = 2$  Hz, C3-**H**), 5,58 (d, 1H,  $J = 6$  Hz, C6-N**H**), 5,42 (d, 1H,  $J = 2$  Hz, C5-**H**), 3,29 (m, 1H, C2'-**H**), 1,57 (m, 2H, C3'-**H**<sub>2</sub>), 1,27 (s, 9H, C2-C(**CH**<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 1,12 (d, 3H,  $J = 6$  Hz, C1'-**H**<sub>3</sub>), 0,95 (t, 3H,  $J = 7-8$  Hz, C4'-**H**<sub>3</sub>).

**<sup>13</sup>C NMR** (50 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  (ppm) 186,0 (**C4**), 183,4 (**C1**), 151,2 (**C2**), 146,7 (**C6**), 135,1 (**C3**), 97,0 (**C5**), 49,6 (**C2'**), 34,7 (C2-C(**CH**<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 29,0 (3C, C2-C(**CH**<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 28,7 (**C3'**), 19,0 (**C1'**), 10,2 (**C4'**).

**HRMS** (ESI):  $m/z$  izračunato za  $C_{14}H_{22}NO_2$  236,16451, nađeno  $[(M+H)^+]$  236,16441; izračunato za  $C_{14}H_{21}NO_2K$  274,12039, nađeno  $[(M+K)^+]$  274,12284.

$E_{1/2} E_{cl} = -1,210$  V,  $E_{al} = -1,126$  V,  $E_{c2} = -1,890$  V,  $E_{a2} = -1,741$  V,  $E^0_{1/Fc} = -1,170$  V.

#### 4.5.10. 2-*terc*-Butil-5-(*sek*-butilamino)-1,4-benzohinon (**135b**)

Prema opštem postupku za dobijanje alkilamino i aralkilamino derivata *terc*-butil-1,4-benzohinona, jedinjenje **135b** se dobija iz *terc*-butil-1,4-benzohinona (300 mg, 1,83 mmol) i *sek*-butilamina (3 g/4,06 mL, 40,19 mmol). Reakciona smesa se meša 3 h na temperaturi 60–70°C. Jedinjenje je razdvojeno od svog regioizomera hromatografijom na koloni koristeći toluen:etil-acetat (9:1) kao eluent ( $R_f = 0,70$ ) i prečišćeno preparativnom tankoslojnom hromatografijom koristeći heksan:aceton (9:1) kao eluent ( $R_f = 0,53$ ). Proizvod je dobijen kao crvenobraon ulje. Prinos 41,2 mg, 9,6 %.

Fizičke konstante i spektroskopski podaci za **135b**:

**UV–Vis** ( $c = 0,083$  mg/mL, MeOH,  $\lambda_{max}/nm$ , ( $\epsilon/dm^2mol^{-1}$ )): 270 ( $7,86 \times 10^4$ ), 482 ( $2,24 \times 10^4$ ).

**IR** (ATR) 3378,9; 3348,2; 2965,4; 2874,9; 1669,3; 1627,0; 1588,0; 1515,0; 1484,2; 1456,6; 1386,8; 1343,9; 1222,9; 1188,8; 1047,4; 1017,1; 894,9; 834,5  $cm^{-1}$ .

**$^1H$  NMR** (200 MHz,  $CDCl_3$ ):  $\delta$  (ppm) 6,43 (s, 1H, C3-**H**), 5,38 (s, 1H, C6-**H**), 5,28 (bs, 1H, C5-**NH**), 3,28 (m, 1H, C2'-**H**), 1,57 (m, 2H, C3'-**H**<sub>2</sub>), 1,30 (s, 9H, C2-C(**CH**<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 1,19 (d, 3H,  $J = 6$  Hz, C1'-**H**<sub>3</sub>), 0,93 (t, 3H,  $J = 8$  Hz, C4'-**H**<sub>3</sub>).

**$^{13}C$  NMR** (50 MHz,  $CDCl_3$ ):  $\delta$  (ppm) 185,9 (**C1**), 185,0 (**C4**), 160,0 (**C2**), 144,5 (**C5**), 127,4 (**C3**), 100,2 (**C6**), 49,3 (**C2'**), 35,7 (C2-C(**CH**<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 29,6 (3C, C2-C(**CH**<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 28,8 (**C3'**), 19,2 (**C1'**), 10,2 (**C4'**).

**HRMS** (ESI):  $m/z$  izračunato za  $C_{14}H_{22}NO_2$  236,16451, nađeno  $[(M+H)^+]$  236,16475; izračunato za  $C_{14}H_{21}NO_2K$  274,12039, nađeno  $[(M+K)^+]$  274,12345.

$E_{1/2} E_{cl} = -1,218$  V,  $E_{al} = -1,154$  V,  $E_{c2} = -1,868$  V,  $E_{a2} = -1,744$  V,  $E^0_{1/Fc} = -1,186$  V.

#### 4.5.11. 2-*terc*-Butil-6-(*oktil*amino)-1,4-benzohinon (**136a**)

Prema opštem postupku za dobijanje alkilamino i aralkilamino derivata *terc*-butil-1,4-benzohinona, jedinjenje **136a** se dobija iz *terc*-butil-1,4-benzohinona (300 mg, 1,83 mmol) i *n*-oktilamina (2,87 g/3,68 mL, 22,22 mmol). Reakciona smesa se meša 16 h na sobnoj temperaturi. Jedinjenje je razdvojeno od svog regioizomera hromatografijom na koloni koristeći toluen:etil-acetat (9:1) kao eluent ( $R_f = 0,56$ ) i prečišćeno preparativnom tankoslojnom hromatografijom koristeći toluen:etil-acetat (9:1) kao eluent. Proizvod je dobijen kao crvenobraon ulje. Prinos 138,5 mg, 52,0 %.

Fizičke konstante i spektroskopski podaci za **136a**:

**UV–Vis** ( $c = 0,083$  mg/mL, MeOH,  $\lambda_{max}/nm$ , ( $\epsilon/dm^2mol^{-1}$ )): 276 ( $6,79 \times 10^4$ ) 488 ( $2,52 \times 10^4$ ).

**IR** (ATR) 3390,5; 3295,0; 2957,4; 2927,3; 2856,5; 1669,7; 1631,8; 1585,7; 1506,4; 1465,0; 1362,9; 1338,9; 1255,8; 1160,4; 1074,0; 906,4; 807,2  $\text{cm}^{-1}$ .

**$^1\text{H}$  NMR** (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  (ppm) 6,46 (d,  $J = 2,5$  Hz, 1H, C3-**H**), 5,70 (bs, 1H, C5-N**H**<sup>n</sup>Oct), 5,41 (d,  $J = 2,5$  Hz, 1H, C5-**H**), 3,07 (q,  $J = 2,8$  Hz, 2H, C1'-**H**<sub>2</sub>), 1,64 (kvintet,  $J = 3$  Hz, 2H, C2'-**H**<sub>2</sub>), 1,26 (m, 19H), 0,89 (t,  $J = 2,8$  Hz, 3H, C8'-**H**<sub>3</sub>).

**$^{13}\text{C}$  NMR** (125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  (ppm) 186,0 (1C, **C4**), 183,2 (1C, **C1**), 151,2 (1C, **C2**), 147,5 (1C, **C6**), 135,1 (1C, **C3**), 97,0 (1C, **C5**), 42,6 (1C, **C1'**), 34,7 (1C, C2-C(**CH**<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 31,7 (1C, **C2'/C6'**), 29,2 (1C, **C4'/C5'**), 29,1 (1C, **C4'/C5'**), 29,0 (3C, C2-C(**CH**<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 28,2 (1C, **C2'/C6'**), 27,0 (1C, **C3'**), 22,6 (1C, **C7'**), 14,0 (1C, **C8'**).

**HRMS** (ESI):  $m/z$  izračunato za  $\text{C}_{18}\text{H}_{30}\text{NO}_2$  292,22711, nađeno  $[(\text{M}+\text{H})^+]$  292,22811; izračunato za  $\text{C}_{36}\text{H}_{59}\text{N}_2\text{O}_4$  583,44693; nađeno  $[(2\text{M}+\text{H})^+]$  583,44804.

$E_{1/2} E_{cl} = -1,183$  V,  $E_{a1} = -1,095$  V,  $E_{c2} = -1,917$  V,  $E_{a2} = -1,806$  V,  $E^\circ_{l/\text{Fc}} = -1,200$  V.

#### 4.5.12. 2-*terc*-Butil-5-(oktilamino)-1,4-benzohinon (**136b**)

Prema opštem postupku za dobijanje alkilamino i aralkilamino derivata *terc*-butil-1,4-benzohinona, jedinjenje **136b** se dobija iz *terc*-butil-1,4-benzohinona (300 mg, 1,83 mmol) i *n*-oktilamina (2,87 g/3,68 mL, 22,22 mmol). Reakciona smesa se meša 16 h na sobnoj temperaturi. Jedinjenje je razdvojeno od svog regioizomera hromatografijom na koloni koristeći toluen:etil-acetat (9:1) kao eluent ( $R_f = 0,76$ ) i prečišćeno preparativnom tankoslojnom hromatografijom koristeći toluen:etil-acetat (9:1) kao eluent. Proizvod je dobijen kao crvenobraon ulje. Prinos 25,0 mg, 9,4 %.

Fizičke konstante i spektroskopski podaci za **136b**:

**UV-Vis** ( $c = 0,083$  mg/mL, MeOH,  $\lambda_{\text{max}}/\text{nm}$ , ( $\epsilon/\text{dm}^2\text{mol}^{-1}$ ): 274 ( $9,08 \times 10^4$ ), 484 ( $2,18 \times 10^4$ ).

**IR** (ATR) 3392,8; 2925,6; 2856,0; 1735,9; 1669,2; 1625,9; 1587,4; 1514,1; 1462,0; 1364,7; 1338,1; 1226,9; 1187,8; 1019,9; 952,4; 798,3  $\text{cm}^{-1}$ .

**$^1\text{H}$  NMR** (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  (ppm) 6,43 (s, 1H, C3-**H**), 5,40 (bs, 1H, C5-N**H**<sup>n</sup>Oct), 5,38 (s, 1H, C6-**H**), 3,05 (q,  $J = 2,8$  Hz, 2H, C1'-**H**<sub>2</sub>), 1,62 (kvintet,  $J = 2,8$  Hz, 2H, C2'-**H**<sub>2</sub>), 1,30 (m, 19H), 0,88 (t,  $J = 3$  Hz, 3H, C8'-**H**<sub>3</sub>).

**$^{13}\text{C}$  NMR** (125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  (ppm) 185,8 (1C, **C1**), 184,9 (1C, **C4**), 159,7 (1C, **C2**), 145,3 (1C, **C5**), 127,4 (1C, **C3**), 100,2 (1C, **C6**), 42,3 (1C, **C1'**), 35,7 (1C, C2-C(**CH**<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 31,7 (1C, **C2'/C6'**), 29,7 (3C, C2-C(**CH**<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 29,2 (1C, **C4'/C5'**), 29,1 (1C, **C4'/C5'**), 28,2 (1C, **C2'/C6'**), 27,0 (1C, **C3'**), 22,6 (1C, **C7'**), 14,0 (1C, **C8'**).

**HRMS** (ESI):  $m/z$  izračunato za  $\text{C}_{18}\text{H}_{30}\text{NO}_2$  292,22711, nađeno  $[(\text{M}+\text{H})^+]$  292,22813.

$E_{1/2} E_{cl} = -1,199$  V,  $E_{a1} = -1,116$  V,  $E_{c2} = -1,933$  V,  $E_{a2} = -1,785$  V,  $E^\circ_{l/\text{Fc}} = -1,219$  V.

#### 4.5.13. 2-*tert*-Butil-6-(pirolidin-1-il)-1,4-benzohinon (**137a**)

Prema opštem postupku za dobijanje alkilamino i aralkilamino derivata *tert*-butil-1,4-benzohinona, jedinjenje **137a** se dobija iz *tert*-butil-1,4-benzohinona (300 mg, 1,83 mmol) i pirolidina (2,86 g/3,3 mL, 40,19 mmol). Reakciona smesa se meša 3 h na temperaturi 60–70°C. jedinjenje je razdvojeno od svog regioizomera hromatografijom na koloni koristeći toluen:etil-acetat (8:2) kao eluent ( $R_f = 0,31$ ) i prečišćeno preparativnom tankoslojnom hromatografijom koristeći toluen:etil-acetat (8:2), a potom heksan:aceton (7:3) kao eluent ( $R_f = 0,45$ ). Proizvod je dobijen u obliku crvenobraon kristala. Prinos 63 mg, 14,8 %.

Fizičke konstante i spektroskopski podaci za **137a**:

**t.t.** 106–107°C. **UV–Vis** ( $c = 0,083$  mg/mL in MeOH,  $\lambda_{\max}/\text{nm}$ , ( $\epsilon/\text{dm}^2\text{mol}^{-1}$ ): 274 ( $4,80 \times 10^4$ ), 500 ( $3,20 \times 10^4$ ).

**IR** (ATR) 2963,1; 2873,3; 1669,9; 1631,7; 1597,6; 1562,7; 1480,3; 1457,6; 1413,0; 1365,9; 1335,7; 1314,5; 1286,6; 1249,7; 1174,1; 1156,1; 1120,3; 1048,7; 998,9; 907,4; 796,0  $\text{cm}^{-1}$ .

**$^1\text{H}$  NMR** (200 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  (ppm) 6,45 (d, 1H,  $J = 2$  Hz, C3-**H**), 5,41 (d, 1H,  $J = 2$  Hz, C5-**H**), 3,53 (bs, 4H, C1'-**H**<sub>2</sub>, C4'-**H**<sub>2</sub>), 1,95 (m, 4H, C2'-**H**<sub>2</sub>, C3'-**H**<sub>2</sub>), 1,25 (s, 9H, C2-C(**CH**<sub>3</sub>)<sub>3</sub>).

**$^{13}\text{C}$  NMR** (125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  (ppm) 185,5 (**C4**), 185,4 (**C1**), 151,8 (**C2**), 149,3 (**C6**), 133,8 (**C3**), 101,0 (**C5**), 50,8 (2C, **C1'**, **C4'**), 34,9 (C2-C(**CH**<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 29,2 (3C, C2-C(**CH**<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 25,1 (2C, **C2'**, **C3'**).

**HRMS** (ESI):  $m/z$  izračunato za  $\text{C}_{14}\text{H}_{20}\text{NO}_2$  234,14886, nađeno  $[(\text{M}+\text{H})^+]$  234,14892; izračunato za  $\text{C}_{14}\text{H}_{19}\text{NO}_2\text{K}$  272,10474, nađeno  $[(\text{M}+\text{K})^+]$  272,11865.

$E_{1/2}$   $E_{c1} = -1,276$  V,  $E_{a1} = -1,214$  V,  $E_{c2} = -1,876$  V,  $E_{a2} = -1,694$  V,  $E^0_{1/\text{Fc}} = -1,244$  V.

#### 4.5.14. 2-*tert*-Butil-5-(pirolidin-1-il)-1,4-benzohinon (**137b**)

Prema opštem postupku za dobijanje alkilamino i aralkilamino derivata *tert*-butil-1,4-benzohinona, jedinjenje **137b** se dobija iz *tert*-butil-1,4-benzohinona (300 mg, 1,83 mmol) i pirolidina (2,86 g/3,3 mL, 40,19 mmol). Reakciona smesa se meša 3 h na temperaturi 60–70°C. jedinjenje je razdvojeno od svog regioizomera hromatografijom na koloni koristeći toluen:etil-acetat (9:1) kao eluent ( $R_f = 0,49$ ) i prečišćeno preparativnom tankoslojnom hromatografijom koristeći heksan:aceton (7:3) kao eluent ( $R_f = 0,56$ ). Proizvod je dobijen u obliku crvenobraon kristala. Prinos 48,6 mg, 11,4 %.

Fizičke konstante i spektroskopski podaci za **137b**:

**t.t.** 136°C. **UV–Vis** ( $c = 0,083$  mg/mL, MeOH,  $\lambda_{\max}/\text{nm}$ , ( $\epsilon/\text{dm}^2\text{mol}^{-1}$ ): 276 ( $6,64 \times 10^4$ ), 502 ( $3,09 \times 10^4$ ).

**IR** (ATR) 3359,4; 3191,1; 3046,7; 2956,1; 2924,3; 2854,7; 1738,7; 1660,1; 1626,3; 1581,9; 1454,9; 1427,3; 1369,8; 1343,0; 1324,0; 1260,5; 1195,7; 1054,8; 1018,8; 929,3; 899,4; 838,5  $\text{cm}^{-1}$ .

**$^1\text{H}$  NMR** (200 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  (ppm) 6,31 (s, 1H, C3-**H**), 5,38 (s, 1H, C6-**H**), 3,51 (m, 4H, C1'-**H**<sub>2</sub>, C4'-**H**<sub>2</sub>), 1,93 (m, 4H, C2'-**H**<sub>2</sub>, C3'-**H**<sub>2</sub>), 1,28 (s, 9H, C2-C(**CH**<sub>3</sub>)<sub>3</sub>).

**$^{13}\text{C}$  NMR** (50 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  (ppm) 186,3 (**C1**), 185,1 (**C4**), 157,8 (**C2**), 146,2 (**C5**), 128,5 (**C3**), 104,2 (**C6**), 50,2 (2H, **C1'**, **C4'**), 35,2 (C2-C(**CH**<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 29,5 (3C, C2-C(**CH**<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 25,4 (2C, **C2'**, **C3'**).

**HRMS** (ESI):  $m/z$  izračunato za  $\text{C}_{14}\text{H}_{20}\text{NO}_2$  234,14886, nađeno  $[(\text{M}+\text{H})^+]$  234,14952.

$E_{1/2}$   $E_{cl}$  = -1,276 V,  $E_{al}$  = -1,214 V,  $E_{c2}$  = -1,865 V,  $E_{a2}$  = -1,749 V,  $E^0_{l}/\text{Fc}$  = -1,243 V.

#### 4.5.15. 2-(Benzilamino)-6-(*terc*-butil)-1,4-benzohinon (**138a**)

Prema opštem postupku za dobijanje alkilamino i aralkilamino derivata *terc*-butil-1,4-benzohinona, jedinjenje **138a** se dobija iz *terc*-butil-1,4-benzohinona (300 mg, 1,83 mmol) i benzilamina (4,3 g/4,4 mL, 40,2 mmol). Reakciona smesa se meša 16 h na sobnoj temperaturi. Jedinjenje je razdvojeno od svog regioizomera hromatografijom na koloni koristeći toluen:etil-acetat (9:1) kao eluent ( $R_f$  = 0,39) i prečišćeno preparativnom tankoslojnom hromatografijom koristeći heksan:aceton (8:2) kao eluent ( $R_f$  = 0,41). Proizvod je dobijen u obliku crvenobraon kristala. Prinos 102,1 mg, 41,5 %.

Fizičke konstante i spektroskopski podaci za **138a**:

**t.t.** 132°C. **UV-Vis** ( $c$  = 0,083 mg/mL, MeOH,  $\lambda_{\text{max}}/\text{nm}$ , ( $\epsilon/\text{dm}^2\text{mol}^{-1}$ ): 276 ( $5,35 \times 10^4$ ), 480 ( $1,83 \times 10^4$ ).

**IR** (ATR) 3566,5; 3511,2; 3362,5; 3199,2; 3063,5; 3031,6; 2998,8; 2965,5; 2873,6; 1671,8; 1634,9; 1587,5; 1504,2; 1456,7; 1364,2; 1340,1; 1257,8; 1163,4; 1061,1; 909,6  $\text{cm}^{-1}$ .

**$^1\text{H}$  NMR** (200 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  (ppm) 7,32 (m, 5H, C3'-**H**, C4'-**H**, C5'-**H**, C6'-**H**, C7'-**H**), 6,46 (d,  $J$  = 2 Hz, 1H, C5-**H**), 6,01 (bs, 1H, C2-N**H**CH<sub>2</sub>Ph), 5,48 (d,  $J$  = 2 Hz, 1H, C3-**H**), 4,26 (d,  $J$  = 4 Hz, 2H, C1'-**H**<sub>2</sub>), 1,27 (s, 9H, C6-C(**CH**<sub>3</sub>)<sub>3</sub>).

**$^{13}\text{C}$  NMR** (50 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  (ppm) 186,2 (1C, **C4**), 183,2 (1C, **C1**), 151,4 (1C, **C6**), 147,3 (1C, **C2**), 136,0 (1C, **C2'**), 134,8 (1C, **C5**), 129,0 (2C, **C4'**, **C6'**), 128,1 (1C, **C5'**), 127,7 (2C, **C3'**, **C7'**), 98,0 (1C, **C3**), 46,9 (1C, **C1'**), 34,8 (1C, C6-C(**CH**<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 29,0 (3C, C6-C(**CH**<sub>3</sub>)<sub>3</sub>).

**HRMS** (ESI):  $m/z$  izračunato za  $\text{C}_{17}\text{H}_{20}\text{NO}_2$  270,14886, nađeno  $[(\text{M}+\text{H})^+]$  270,14903; izračunato za  $\text{C}_{34}\text{H}_{39}\text{N}_2\text{O}_4$  539,29043, nađeno  $[(2\text{M}+\text{H})^+]$  539,28999.

$E_{1/2}$   $E_{cl}$  = -1,128 V,  $E_{al}$  = -1,053 V,  $E_{cl}$  = -1,800 V,  $E_{a2}$  = -1,619 V,  $E^0_{l}/\text{Fc}$  = -1,159 V.

#### 4.5.16. 2-(Benzilamino)-5-(*terc*-butil)1,4-benzohinon (**138b**)

Prema opštem postupku za dobijanje alkilamino i aralkilamino derivata *terc*-butil-1,4-benzohinona, jedinjenje **138b** se dobija iz *terc*-butil-1,4-benzohinona (300 mg, 1,83 mmol) i benzilamina (4,3 g/4,2 mL, 40,2 mmol). Reakciona smesa se meša 16 h na sobnoj temperaturi. Jedinjenje je razdvojeno od svog regioizomera hromatografijom na koloni koristeći toluen:etil-acetat (9:1) kao eluent ( $R_f = 0,51$ ) i prečišćeno preparativnom tankoslojnom hromatografijom koristeći heksan:aceton (8:2) kao eluent ( $R_f = 0,49$ ). Proizvod je dobijen kao crvenobraon ulje. Prinos 17,1 mg, 7,0 %.

Fizičke konstante i spektroskopski podaci za **138b**:

**UV-Vis** ( $c = 0,083$  mg/mL, MeOH,  $\lambda_{\max}/\text{nm}$ , ( $\epsilon/\text{dm}^2\text{mol}^{-1}$ ): 276 ( $8,60 \times 10^4$ ), 476 ( $1,62 \times 10^4$ ).

**IR** (ATR) 3384,0; 3061,9; 3029,6; 3003,0; 2960,7; 2920,8; 2868,3; 1668,5; 1626,6; 1587,3; 1513,4; 1455,3; 1389,0; 1360,7; 1337,5; 1229,2; 1182,8; 1062,3; 1021,6; 895,4; 836,0; 803,8; 741,1; 700,4  $\text{cm}^{-1}$ .

**$^1\text{H}$  NMR** (200 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  (ppm) 7,32 (m, 5H, C3'-**H**, C4'-**H**, C5'-**H**, C6'-**H**, C7'-**H**), 6,45 (s, 1H, C6-**H**), 5,74 (bs, 1H, C2-N**H**CH<sub>2</sub>Ph), 5,45 (s, 1H, C3-**H**), 4,26 (d,  $J = 6$  Hz, 2H, C1'-**H**<sub>2</sub>), 1,29 (s, 9H, C5-C(**CH**<sub>3</sub>)<sub>3</sub>).

**$^{13}\text{C}$  NMR** (50 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  (ppm) 186,0 (1C, **C4**), 184,8 (1C, **C1**), 159,5 (1C, **C5**), 145,1 (1C, **C2**), 136,1 (1C, **C2'**), 128,9 (2C, **C4'**, **C6'**), 128,0 (1C, **C6**), 127,6 (2C, **C3'**, **C7'**), 127,5 (1C, **C5'**), 101,2 (1C, **C3**), 46,6 (1C, **C1'**), 35,7 (1C, C5-**C**(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 29,6 (3C, C5-**C**(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>).

**HRMS** (ESI):  $m/z$  izračunato za  $\text{C}_{17}\text{H}_{20}\text{NO}_2$  270,14886, nađeno  $[(\text{M}+\text{H})^+]$  270,14910.

$E_{1/2} E_{cl} = -1,141$  V,  $E_{a1} = -1,071$  V,  $E_{c2} = -1,803$  V,  $E_{a2} = -1,593$  V,  $E^{\circ}_i/\text{Fc} = -1,174$  V.

#### 4.5.17. 2-(*terc*-Butil)-6-(fenetilamino)-1,4-benzohinon (**139a**)

Prema opštem postupku za dobijanje alkilamino i aralkilamino derivata *terc*-butil-1,4-benzohinona, jedinjenje **139a** se dobija iz *terc*-butil-1,4-benzohinona (300 mg, 1,83 mmol) i fenetilamina (4,87 g/5,05 mL, 40,2 mmol). Reakciona smesa se meša 16 h na sobnoj temperaturi. Jedinjenje je razdvojeno od svog regioizomera hromatografijom na koloni koristeći toluen:etil-acetat (9:1) kao eluent ( $R_f = 0,38$ ) i prečišćeno preparativnom tankoslojnom hromatografijom koristeći heksan:aceton (7:3) kao eluent ( $R_f = 0,44$ ). Proizvod je dobijen kao crvenobraon ulje. Prinos 91,9 mg, 35,5 %.

Fizičke konstante i spektroskopski podaci za **139a**:

**UV-Vis** ( $c = 0,083$  mg/mL, MeOH,  $\lambda_{\max}/\text{nm}$ , ( $\epsilon/\text{dm}^2\text{mol}^{-1}$ ): 276 ( $6,59 \times 10^4$ ), 486 ( $2,37 \times 10^4$ ).

**IR** (ATR) 3378,8; 3304,2; 3062,4; 3027,5; 2961,2; 2870,6; 1669,4; 1632,6; 1585,9; 1505,4; 1461,8; 1362,7; 1339,1; 1255,5; 1196,7; 1157,0; 905,4; 700,9  $\text{cm}^{-1}$ .

**<sup>1</sup>H NMR** (200 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ (ppm) 7,22-7,34 (m, 5H, {C4'-C8'}-**H**), 6,45 (d, *J* = 3 Hz, 1H, C3-**H**), 5,76 (bs, 1H, C6-N**H**CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>Ph), 5,47 (d, *J* = 3 Hz, 1H, C5-**H**), 3,35 (q, *J* = 7 Hz, 2H, C1'-**H**<sub>2</sub>), 2,94 (t, *J* = 7 Hz, 2H, C2'-**H**), 1,26 (s, 9H, C2-C(**CH**<sub>3</sub>)<sub>3</sub>).

**<sup>13</sup>C NMR** (50 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ (ppm) 186,1 (1C, **C4**), 183,1 (1C, **C1**), 151,3 (1C, **C2**), 147,3 (1C, **C6**), 137,8 (1C, **C3'**), 134,9 (1C, **C3**), 128,9 (2C, **C5'**, **C7'**), 128,6 (2C, **C4'**, **C8'**), 126,9 (1C, **C6'**), 97,3 (1C, **C5**), 43,7 (1C, **C1'**), 34,7 (1C, **C2'**), 34,3 (1C, C2-C(**CH**<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 28,9 (3C, C2-C(**CH**<sub>3</sub>)<sub>3</sub>).

**HRMS** (ESI): *m/z* izračunato za C<sub>18</sub>H<sub>22</sub>NO<sub>2</sub> 284,16451, nađeno [(M+H)<sup>+</sup>] 284,16454; izračunato za C<sub>36</sub>H<sub>43</sub>N<sub>2</sub>O<sub>4</sub> 567,32173, nađeno [(2M+H)<sup>+</sup>] 567,32097.

**E**<sub>1/2</sub> **E**<sub>cl</sub> = -1,135 V, **E**<sub>al</sub> = -1,069 V, **E**<sub>c2</sub> = -1,889 V, **E**<sub>a2</sub> = -1,749 V, **E**<sup>o</sup><sub>i</sub>/Fc = -1,174 V.

#### 4.5.18. 2-(*terc*-Butil)-5-(fenetilamino)-1,4-benzohinon (**139b**)

Prema opštem postupku za dobijanje alkilamino i aralkilamino derivata *terc*-butil-1,4-benzohinona, jedinjenje **139b** se dobija iz *terc*-butil-1,4-benzohinona (300 mg, 1,83 mmol) i fenetilamina (4,87 g/5,05 mL, 40,2 mmol). Reakciona smesa se meša 16 h na sobnoj temperaturi. Jedinjenje je razdvojeno od svog regioizomera hromatografijom na koloni koristeći toluen:etil-acetat (9:1) kao eluent (*R*<sub>f</sub> = 0,62) i prečišćeno preparativnom tankoslojnom hromatografijom koristeći heksan:aceton (7:3) kao eluent (*R*<sub>f</sub> = 0,51). Proizvod je dobijen u obliku crveno-braon kristala. Prinos 21,0 mg, 8,1 %.

Fizičke konstante i spektroskopski podaci za **139b**:

**t.t.** 100°C. **UV-Vis** (*c* = 0,083 mg/mL, MeOH, λ<sub>max</sub>/nm, (ε/ dm<sup>2</sup>mol<sup>-1</sup>)): 274 (9,02x10<sup>4</sup>), 482 (2,14x10<sup>4</sup>).

**IR** (ATR) 3278,2; 3065,1; 3029,6; 3005,1; 2959,5; 2871,0; 1670,7; 1622,8; 1583,3; 1508,1; 1455,9; 1360,2; 1284,0; 1236,5; 1197,8; 1068,2; 1021,3; 895,2; 841,4; 749,3; 699,6 cm<sup>-1</sup>.

**<sup>1</sup>H NMR** (200 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ (ppm) 7,17-7,37 (m, 5H, {C4'-C8'}-**H**), 6,42 (s, 1H, C3-**H**), 5,46 (bs, 1H, C5-N**H**CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>Ph), 5,44 (s, 1H, C6-**H**), 3,34 (q, *J* = 6,6 Hz, 2H, C1'-**H**<sub>2</sub>), 2,91 (t, *J* = 6,8 Hz, 2H, C2'-**H**<sub>2</sub>), 1,30 (s, 9H, C2-C(**CH**<sub>3</sub>)<sub>3</sub>).

**<sup>13</sup>C NMR** (50 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ (ppm) 185,9 (1C, **C1**), 184,7 (1C, **C4**), 159,6 (1C, **C2**), 145,1 (1C, **C5**), 137,9 (1C, **C3'**), 128,8 (2C, **C5'**, **C7'**), 128,6 (2C, **C4'**, **C8'**), 127,5 (1C, **C3**), 126,9 (1C, **C6'**), 100,6 (1C, **C6**), 43,4 (1C, **C1'**), 35,7 (1C, **C2'**), 34,3 (1C, C2-C(**CH**<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 29,6 (3C, C2-C(**CH**<sub>3</sub>)<sub>3</sub>).

**HRMS** (ESI): *m/z* izračunato za C<sub>18</sub>H<sub>22</sub>NO<sub>2</sub> 284,16451, nađeno [(M+H)<sup>+</sup>] 284,16424.

**E**<sub>1/2</sub> **E**<sub>cl</sub> = -1,147 V, **E**<sub>al</sub> = -1,084 V, **E**<sub>c2</sub> = -1,873 V, **E**<sub>a2</sub> = -1,728 V, **E**<sup>o</sup><sub>i</sub>/Fc = -1,188 V.



## 4.6. Ciklična voltometrija

Za voltametrijska merenja je korišćena elektrohemijska ćelija sa tri elektrode. Kao radna elektroda je upotrebljen disk od staklastog ugljenika (prečnik 2 mm), dok je kao pomoćna elektroda korišćena platinska žica. Referentna elektroda je bila srebrna žica uronjena u rastvor elektrolita. Rastvor referentne elektrode se sastojao od 0,1 M tetrabutilamonijum-perhlorata i 0,01 M srebro-nitrata rastvorenih u dimetilsulfoksidu koji je prethodno predestilovan pod sniženim pritiskom. Alkilamino i aralkilamino derivati su rastvoreni u 0,1 M rastvoru tetrabutilamonijum-perhlorata u predestilovanom dimetilsulfoksidu, u koncentraciji 2 mM. Vrednosti potencijala su date u odnosu na ferocen. Sva merenja su rađena na sobnoj temperaturi u atmosferi azota.

## 4.7. Biologija

### 4.7.1. Citotoksična aktivnost. Hemikalije

RPMI 1640 i DMEM medijumi za propagaciju ćelija, penicilin–streptomycin rastvor, smeša antibiotika i antimikotika, L-glutamin i tripsin/EDTA su kupljeni od PAA, Beč, Austrija. Fetalni goveđi serum (FSA), dimetil-sulfoksid (DMSO) i 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2*H*-tetrazolijum-bromid (MTT) su nabavljeni od Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Nemačka. Propidijum-jodid (PI) i aneksin V–FITC (AV) su kupljeni od Abcam, Kembridž, Velika Britanija. Dihidroetidijum (DHE) je nabavljen of Molecular Probes<sup>®</sup>, Invitrogen, CA, SAD, dok je JC-1 je kupljen od BD Pharmingen<sup>™</sup>, BD Biosciences, San Hoze, CA, SAD.

### 4.7.2. Derivati

Sva ispitivana jedinjenja su rastvorena u etanolu i alikvoti koncentracije 20 mM su čuvani na 4°C. Radni rastvori derivata su dobijeni razblaživanjem u vodi do koncentracije 1 mM neposredno pre upotrebe. CDDP je nabavljen od Pfizer (Pert) Pty Ltd, Bentli, Australija i čuvan kao vodeni rastvor na sobnoj temperaturi u koncentraciji 1 mM.

### 4.7.3. Ćelijske kulture

NCI-H460 ćelijska linija nesitnoćelijskog karcinoma pluća je kupljena od American Type Culture Collection, Rokvil, MD, SAD. NCI-H460/R ćelije su dobijene kontinuiranim izlaganjem izvornih NCI-H460 ćelija dejstvu doksorubicina i okarakterisane kao višestruko rezistentne ćelije.<sup>194</sup> HaCaT ćelijska linija (normalni humani keratinociti nabavljeni od CLS – Cell Line Service, Epelhajm, Nemačka) je dobijena ljubaznošću prof Jörg Andrä, Odeljenje za biofiziku, Istraživački centar, Borstel, Lajbnic-centar za medicinu i bionauke, Borstel, Nemačka. NCI-H460 i NCI-H460/R su održavane u RPMI 1640 medijumu obogaćenim sa 10% FBS, 2 mM L-glutamina i rastvorom koji je sadržavao 10000 U/mL penicilina, 10 mg/mL streptomicina i 25 µg/mL amfotericina B. HaCaT ćelije su kultivisane u DMEM medijumu obogaćenim sa 10% FBS, 4g/L glukoze, 2 mM L-glutamina i rastvorom koji je sadržavao 5000 U/mL penicilina i 5 mg/mL streptomicina. NCI-H460 i NCI-H460/R ćelije su kultivisane i propagirane u intervalima od 72 h koristeći 0,25% tripsin/EDTA. Zasejavanje ćelija je vršeno u svežem medijumu pri gustinama ćelija od 8000 i 16000 ćelija/cm<sup>2</sup>. HaCaT

ćelije su kultivisane i propagirane u intervalima od 144 h koristeći 0,25% tripsin/EDTA, a sejanje je vršeno u svežem medijumu pri gustini ćelija od 64000 ćelija/cm<sup>2</sup>.

#### 4.7.4. Ispitivanje citotoksičnosti MTT testom

Efekat sintetisanih jedinjenja na vijabilnost tumorskih ćelija je određen MTT testom, zasnovanim na redukciji 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2*H*-tetrazolijum-bromida u formazan u aktivnim mitohondrijama živih ćelija. Ukratko, ćelije su sejane u mikrotitar ploče sa 96 bunarića pri gustini: 1000 ćelija po bunariću za NCI-H460, 2000 za NCI-H460/R i 4000 bunar za HaCaT u zapremini od 100 µL adekvatnog medijuma. Nakon 24 h, ćelije su tretirane jedinjenjima i inkubirane narednih 72 h. MTT je dodat do finalne koncentracije od 0,4 mg/mL u svaki bunarić i ploče su inkubirane na 37°C još 4 h. Medium je zatim odstranjen, i dodato je 100 µL dimetil-sulfoksida da rastvori formazanski proizvod, čija je količina proporcionalna broju živih ćelija sa aktivnim mitohondrijama. Apsorbancija rastvorene boje je merena na 540 nm, sa korekcijom na 670 nm, na automatskom čitaču mikrotitar ploča (LKB 5060-060 Micro Plate Reader, Beč, Austrija)

Inhibicija rasta (I) određena je prema sledećoj jednačini:

$$I (\%) = (1 - (A_{\text{tretirani uzorak}}/A_{\text{netretirani uzorak}})) \times 100, \text{ gde je } A \text{ apsorbancija.}$$

IC<sub>50</sub> vrednosti su definisane kao koncentracija svakog derivata koja inhibira ćelijski rast 50%. Ove vrednosti su izračunate linearnom regresionom analizom koristeći Excel softver.

#### 4.7.5. Detekcija tipa ćelijske smrti

Procenat ćelija u apoptozi, nekrozi kao i živih ćelija, nakon tretmana derivatima i CDDP-om, određen je obeležavanjem ćelija aneksinom V-FITC (AV) i propidijum-jodidom (PI). Prethodno, NCI-H460 i NCI-H460/R ćelije su zasejane u ploče od 6 bunarića i inkubirane tokom noći pri gustini od 50000 ćelija po bunariću, dok su HaCaT ćelije sejane pri gustini od 100000 ćelija po bunariću. Ćelije su podvrgnute jednokratnom tretmanu sa 25 µM TBQ (**5**) i njegovim derivatima kao i avaronom (**4**) i njegovim derivatima. CDDP je korišćen kao pozitivna kontrola pri koncentraciji od 5 µM. Nakon 72 h, sve ćelije, uključujući adherentne i odlepljene ćelije, su sakupljene i centrifugirane. Ćelije su potom resuspendovane u 100 µL vezujućeg pufera obogaćenog sa 5 µL AV i 5 µL PI prema uputstvu proizvođača. Nakon perioda inkubacije (5 minuta na sobnoj temperaturi), novih 400 µL vezujućeg pufera je dodato. Ćelije obeležene aneksinom V i propidijum-jodidom su analizirane na protočnom citometru ne kasnije od 1 h od obeležavanja. Intenzitet fluorescencije (zelena FL1-H i crvena FL2-H) je meren na FACSCalibur protočnom citometru (Becton Dickinson, Oksford, Velika Britanija). U svakom uzorku, 10000 ćelija je očitavano (uz isključivanje ćelijskih artefakata), i procenat živih ćelija (AV-PI-), ćelija u ranoj apoptozi (AV+PI-), apoptozi i nekrozi (AV+PI+) kao i mrtvih ćelija (AV-PI+) analiziran je CellQuest Pro data analysis softverom.

#### 4.7.6. Detekcija superoksidnog anjona

Protočna citometrijska analiza intenziteta DHE fluorescencije je korišćena za detekciju nivoa superoksidnog anjona u ćelijama. Prethodno, NCI-H460 i NCI-H460/R ćelije su zasejane u ploče sa 6 bunarića i inkubirane preko noći pri gustini od 50000 ćelija po bunariću, dok su HaCaT ćelije sejane pri gustini od 100000 ćelija po bunariću. Ćelije su tretirane polaznim hinonima avaronom (4) i *terc*-butilhinonom (5) i njihovim derivatima pri koncentraciji od 25  $\mu\text{M}$ . CDDP je takođe kao i u prethodnom testu korišćen kao pozitivna kontrola u koncentraciji od 5  $\mu\text{M}$ . Nakon 72 h, adherentne ćelije su sakupljene tripsinizacijom i centrifugiranjem. Inkubacija u adekvatnom medijumu sa 1  $\mu\text{M}$  DHE je trajala 30 minuta na 37°C u mraku. Ćelije su potom dva puta isprane fosfatnim puferom (PBS) i DHE fluorescencija je analizirana protočnom citometrijom (ekscitacija na 488 nm, emisija na 585 nm, FL2-H kanal). Srednji intenzitet fluorescencije (MFI) korigovan je u odnosu na autofluorescenciju neobojenih ćelija.

#### 4.7.7. JC-1 test

JC-1 je katjonska boja čije nagomilavanje u mitohondrijama zavisi od membranskog potencijala mitohondrija. Pod normalnim uslovima, JC-1 se nagomilava u zdravim mitohondrijama u obliku crvenih agregata koji se detektuju u FL2-H kanalu na protočnom citometru, dok u mitohondrijama sa depolarizovanim  $\Delta\Psi_m$  boja ostaje u citoplazmi u monomernom obliku koji se detektuje u FL1-H kanalu kao zelena fluorescencija. Prema tome, u mitohondrijama kod kojih dolazi do prelaska iz polarizovanog u depolarizovani  $\Delta\Psi_m$ , JC-1 izlazi iz mitohondrija u citoplazmu što dovodi do povećanja intenziteta zelene fluorescencije, a smanjenja intenziteta crvene fluorescencije.

Prema uputstvima proizvođača, kontrolne ćelije i ćelije podvrgnute tretmanu, kao što je opisano u prethodnom testu, su inkubirane sa JC-1 reagensom 15 minuta na 37°C u CO<sub>2</sub> inkubatoru. Nakon dva ispiranja u 1 x Assay Bufer rastvoru, ćelije su resuspendovane u fosfatnom puferu (PBS) pre analize na protočnom citometru.

Žive ćelije obeležene JC-1 su bile ispitane i pod Zeiss Axiovert fluorescentnim mikroskopom (Carl Zeiss Foundation, Oberkochen, Nemačka) koristeći AxioVision 4.6 softver.

#### 4.7.8. Statistička analiza

Statistička analiza je izvršena upotrebom GraphPad Prism 6 softvera. Pri analizi rezultata dobijenih MTT testom, razlika između grupa utvrđena je Student-ovim t-testom, a razlike su smatrane su statistički značajnim ako je  $p < 0,05$ . Rezultati dobijeni metodom protočne citometrije su ispitani pomoću Two-way ANOVA i Tukey post-hoc testom višestrukih poređenja.

#### 4.8. Određivanje antimikrobne aktivnosti

Antimikrobna aktivnost ispitana je korišćenjem metode mikrorazblaženja prema NCCLS metodi.<sup>138</sup> Za ispitivanje antibakterijske aktivnosti sintetisanih jedinjenja, korišćeno je šest sojeva Gram-pozitivnih bakterija: *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538), *Bacillus subtilis* (ATCC 6633), *Clostridium sporogenes* (ATCC 19404), *Streptosporangium longisporum* (ATCC 25212), *Micrococcus luteus* (ATCC 10240), *Micrococcus luteus* (ATCC 4698) i *Kocuria rhizophila* (ATCC 9341), i četiri soja Gram-negativnih bakterija: *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 9027), *Proteus hauseri* (ATCC 13315) i *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Enteritidis (ATCC 13076). U cilju određivanja antifungalne aktivnosti, alkilamino I aralkilamino derivati hinona ispitivani su na tri soja gljivica: *Candida albicans* (ATCC 10231), *Saccharomyces cerevisiae* (ATCC 9763) and *Aspergillus brasiliensis* (ATCC 16404). Kao medijum za gajenje bakterija korišćen je Mueller-Hinton bujon (Biolab, Mađarska), dok je za gajenje kultura gljivica korišćen Sabouraud maltozni bujon (Torlak, Srbija). Pripremljeni su po uputstvu proizvođača.

Mueller-Hinton bujon (MHB):

MHB prah	22 g
destilovana voda	1000 mL

Sabouraud maltozni bujon (SMB):

SMB prah	50 g
destilovana voda	1000 mL

Podloge se zagrevaju do potpunog rastvaranja praha, a zatim autoklaviraju na 121°C u toku 15 minuta.

U epruvetu sa mikrobima doda se po 5 mL fiziološkog rastvora.

Osnovni rastvor ispitivanih jedinjenja napravljen je rastvaranjem u dimetil-sulfoksidu, u koncentraciji 10 mg/mL. Kao kontrolni antibiotik korišćen je amikacin, dok je kao kontrolni antimikotik korišćen nistatin.

Minimalna inhibitorna koncentracija (MIK) sintetisanih jedinjenja određena je mikrodilucionom metodom, dvostrukim razblaženjem derivata u mikrotitar pločama. Mikrotitar ploča sadrži 96 bunara, zapremine 300 µL, koji su poređani u 8 redova i 12 kolona.

U svaki bunar doda se po 100  $\mu\text{L}$  sveže podloge. Zatim se u svaki prvi bunar u redu doda po 100  $\mu\text{L}$  osnovnog rastvora (10 mg/mL) ispitivanog jedinjenja. Nakon mešanja sa prethodno dodatom podlogom, 100  $\mu\text{L}$  rastvora iz prvog bunara se prebaci u drugi bunar u istom redu, pa iz drugog u treći, i tako do poslednjeg, odakle se izbaci ista zapremina rastvora. Ovom metodom se napravi serija dvostrukih razblaženja u svakom redu za jedno ispitivano jedinjenje. Kao pozitivna kontrola za rast bakterija korišćen je amikacin, dok je za rast gljivica korišćen nistatin (1 mg/100  $\mu\text{L}$ ). S obzirom na to da su jedinjenja rastvorena u dimetil-sulfoksidu, rastvarač je korišćen kao negativna kontrola.

U svaki bunar se doda po 10  $\mu\text{L}$  bakterija ( $10^6$  ćelija po bunaru) ili gljivica ( $10^5$  spora po bunaru). Mikrotitar ploče sa bakterijama se inkubiraju na  $37^\circ\text{C}$  u toku 24 h, dok se one sa gljivicama inkubiraju na  $28^\circ\text{C}$  u toku 48 h. Najniža koncentracija jedinjenja koja inhibira rast mikroba definisana je kao minimalna koncentracija koja ne dovodi do vidljivog rasta ćelija u bunaru.

## 5. ZAKLJUČAK

U skladu sa postavljenim ciljem ove doktorske disertacije sintetisano je četrnaest alkilamino i aralkilamino derivata morskog prirodnog proizvoda hinonskog tipa avarona poreklom iz morskog sunđera *Dysidea avara*, kao i osamnaest derivata avaronskog mimetika, *terc*-butilhinona. Iz svake reakcije polaznih hinona sa serijom alkil- i aralkilamina dobijena su po dva regioizomerna jedinjenja, pri čemu su derivati 2,6-obrasca disupstitucije dobijeni u većem prinosu od svojih regioizomera, jer je položaj 6 aktiviraniji za napad nukleofila u odnosu na položaj 5. Pored toga derivati 2,6-obrasca disupstitucije generalno imaju za oko 10 do 20 mV pozitivnije potencijale pikova od odgovarajućih regioizomera, tj. lakše se redukuju i generišu reaktivne kiseonične vrste. Veća stabilnost semihinonskog radikala kada su oba elektron-donorska supstituenta, tj. amino i alkil grupa, u meta položaju u odnosu na negativno naelektrisani kiseonikov atom jeste razlog za ovakvo elektrohemijsko ponašanje.

Na osnovu uporedne analize njihovog antitumorskog dejstva i ispitivanja mogućeg mehanizma dejstva proizašli su sledeći zaključci:

1. Avaronski derivati su pokazali veći potencijal za inhibiciju rasta tumorskih ćelija u odnosu na avaron. Analiza povezanosti strukture sa antitumorskom aktivnošću pokazala je da od dva regioizomerna proizvoda u reakciji avarona sa alkil-, odnosno aralkilaminom, 3'-serija derivata (2,6-obrazac disupstitucije hinonskog jezgra) pokazuje veću aktivnost od 4'-serije derivata (2,5-obrazac disupstitucije), uz izuzetak pirolidinskih derivata, gde važi obrnuto. Iz dobijenih rezultata zaključeno je da je za visoku aktivnost avaronskih derivata prema tumorskim ćelijama neophodni preduslov prisustvo supstituenta sa relativno niskim brojem C-atoma u položaju 3' ili pirolidin u položaju 4'. Zadovoljavajuću selektivnost ka tumorskim ćelijama su pokazali samo zasićeni butilamino derivat i heterociklični pirolidinski derivat.
2. Uporedna analiza antitumorske aktivnosti *terc*-butilhinonske serije derivata pokazala je da su 2,6-disupstituisani derivati, kao i avaronski, aktivniji prema tumorskim ćelijama od 2,5-disupstituisanih analoga. Za jaku citotoksičnu aktivnost odgovorno je prisustvo nezasićenog ili voluminoznog supstituenta u položaju 6. Zadovoljavajuću selektivnost pokazali su derivati sa voluminoznim supstituentima.
3. Analiza indukcije ćelijske smrti je pokazala da većina derivata izaziva nekrozu, dok su proces apoptoze preferencijalno pokretali alilamino i *sek*-butilamino derivati *terc*-butilhinona. Selektivnost prema tumorskim ćelijama su pokazali *terc*-butilhinonski derivati. Najperspektivnije dejstvo su pokazali alilamino derivati *terc*-butilhinona, koji su preferencijalno indukovali apoptozu i pokazali visoku selektivnost prema tumorskim ćelijama u odnosu na normalne ćelije.
4. Ispitivanje sposobnosti generisanja superoksidnog anjona pokazalo je da jedinjenja sa 2,6-obrascem disupstitucije poseduju značajan potencijal za generisanje reaktivnih

kiseoničnih vrsta, posebno kada su u pitanju avaronski derivati. 2,5-Disupstituisani derivati nisu pokazali potencijal za stvaranje superoksidnog anjona iako među regioizomerima ne postoji značajna razlika u elektrohemijским parametrima.

5. 2,6-Disupstituisani *n*-oktilamino i fenetilamino derivati *terc*-butilhinona indukuju značajnu depolarizaciju mitohondrijske membrane u tumorskim ćelijama, dok na mitohondrijama normalnih ćelija nisu uočene promene u polarizaciji membrane. Antitumorska aktivnost ovih derivata, kao i njihova selektivnost potvrđena na nivou ćelijske smrti, stvaranja reaktivnih kiseoničnih vrsta i menjanja polarizacije membrane mitohondrija ukazuje na veliki potencijal ovih jedinjenja za razvoj novih antitumorskih lekova.

Iz rezultata ispitivanja antibakterijskog i antimikotičkog dejstva, proizašli su sledeći zaključci:

1. Prema rezultatima testa antibakterijske aktivnosti, efikasnost uporedivu sa amikacinom postižu *terc*-butilhinonski derivati sa 2,6-disupstitucijom i aralkilamino ili nerazgranatom alkilamino grupom srednje veličine lanca u položaju 6. Avaronski derivati su pokazali slabu aktivnost.
2. Analizom antimikotičkog dejstva, utvrđeno je da većina testiranih jedinjenja pokazuje jaču aktivnost od nistatina prema *C. albicans*, dok su aktivnost jaču od nistatina za druga dva soja gljivica imali *terc*-butilhinonski derivati.

**OPŠTI ZAKLJUČAK:** Rezultati ove disertacije pokazuju da istraživanja alkil(aralkil)amino derivata, kako avarona tako i njegovih mimetika, mogu doprineti pronalasku jedinjenja sa velikim antitumorskim potencijalom koji se ogleda kako u selektivnosti prema tumorskim ćelijama u odnosu na normalne ćelije, tako i u efikasnosti prema rezistentnim tumorskim ćelijama. Pored toga, novi derivati mogu poslužiti i za dobijanje novih antifungalnih i antibakterijskih agenasa.

## 6. Literatura

1. X. M. Gao, T. M. Zhang, J. R. Zhang, J. S. Guo, G. S. Zhong, *Chinese Materia Medica*, China Press of traditional Chinese Medicine, Peking, Kina, **2007**.
2. G. M. Cragg, D. J. Newman, *Pure Appl. Chem.* **2005**, *77*, 7–24.
3. D. Campbell, *Arabian Medicine and its influence on the Middle Ages Vol 1*, Routledge, Taylor & Francis Group, Abingdon, Velika Britanija, **2000**.
4. D. S. Fabricant, N. R. Farnsworth, *Environ. Health Perspect.* **2001**, *109*, 69–75.
5. J. C. Dong, *Evid. Based Complment. Altern. Med.* **2013**, *2013*.
6. S. Parasuraman, G. S. Thing, S. A. Dhanaraj, *Pharmacogn. Rev.* **2014**, *8*, 73–80.
7. N. R. Farnsworth, O. Akerele, A. S. Bingel, D. D. Soejarto, Z. Guo, *Bull. World Health Organ.* **1985**, *63*, 965–981.
8. P. K. Perera, *Biochem. Anal. Biochem.* **2017**, *6*, 311–313.
9. “Opioid Agonists And Antagonists”, T. Ogura, T. D. Egan, in *Pharmacology and Physiology for Anesthesia*, Saunders, Elsevier, Filadelfija, SAD, **2013**, 253–271.
10. L. J. Bruce-Chwatt, *Interdiscipl. Sci. Rev.* **1990**, *15*, 85–93.
11. A. Der Marderosian, J. A. Beutler, *The Review of Natural Products*, 2nd Ed., Facts and Comparison, Sijetl, SAD, **2002**, 13–43.
12. J. Mann, *Murder, Magic, and Medicine*, Oxford University Press, Njujork, SAD, **1994**, 164–170.
13. J. D. Williams, *Int. J. Antimicrob. Agents* **1999**, *12* (Supp. 1), S2–S7.
14. A. Fabretti, C. O. Gualerzi, L. Brandi, *FEBS Lett.* **2011**, *585*, 1673–1681.
15. D. E. Martin, R. Blum, J. Wilton, *Antimicrob. Agents Chemother.* **2007**, *51*, 3063–3066.
16. Y. Kashiwada, F. Hashimoto, L. M. Cosentino, *J. Med. Chem.* **1996**, *39*, 1016–1017.
17. P. Yogeewari, D. Sriram, *Curr. Med. Chem.* **2005**, *12*, 657–666.
18. Y. Li, *Acta Pharmacol. Sin.* **2012**, *33*, 1141–1146.
19. Y. Kashmann, K. R. Gustafson, R. W. Fuller, J. H. Cardellin, J. B. McMahon, M. J. Currens, R. W. Buckheist, S. H. Hughes, G. M. Cragg, M. R. Boyd, *J. Med. Chem.* **1992**, *35*, 2735–2743.
20. K. R. Gustafson, J. H. Cardellina II, J. B. McMahon, R. J. Gulakowski, J. Ishitoya, Z. Szallasi, N. E. Lewin, P. M. Blumberg, O. S. Weislow, J. A. Butler, R. W. Buckheit Jr., G. M. Cragg, P. A. Cox, J. P. Bader, M. R. Boyd, *J. Med. Chem* **1992**, *35*, 1978–1986.
21. P. A. Cox, *Pharm. Biol.* **2001**, *39*, 33–40.
22. P. M. Dewick, *Medicinal Natural Products: A Biosynthetic Approach*, 2<sup>nd</sup> Ed., John Wiley and Sons, Vest Saseks, Velika Britanija, **2002**.
23. Y. Mizushina, A. Iida, K. Ohta, F. Sugawara, K. Sakaguchi, *Biochem. J.* **2000**, *350*, 757–763.
24. G. S. Kelly, *Altern. Med. Rev.* **2011**, *16*, 172–194.



25. C. S. Yang, J. M. Landau, M. T. Huang, H. L. Newmark, *Annu. Rev. Nutr.* **2001**, *21*, 381–406.
26. W. Bors, W. Heller, C. Michel, M. Saran, *Methods Enzymol.* **1990**, *186*, 343–355.
27. R. L. Am. *J. Clin. Nutr.* **2003**, *78*, 570–578S.
28. A. J. Day, Y. Bao, M. R. Morgan, G. Williamson, *Free Rad. Biol. Med.* **2000**, *29*, 1234–1243.
29. D. W. Lamson, M. S. Brignall, *Altern. Med. Rev.* **2000**, *5*, 196–208.
30. S. Aggarwal, H. Ichikawa, Y. Takada, S. K. Sandur, S. Shishodia, B. B. Aggarwal, *Mol. Pharmacol.* **2006**, *69*, 195–206.
31. E. Skrzypczak-Jankun, K. Zhou, N. P. McCabe, S. H. Selman, J. Jankun, *Int. J. Mol. Med.* **2003**, *12*, 17–24.
32. D. Khanna, G. Sethi, K. S. Ahn, M. K. Pandey, A. B. Kunnumakkara, B. Sung, A. Aggarwal, B. B. Aggarwal, *Curr. Opin. Pharmacol.* **2007**, *7*, 344–351.
33. “Cancer chemopreventive effects of curcumin” Y. J. Surh, K. S. Chun, in *The Molecular Targets and Therapeutic Uses of Curcumin in Health and Disease*, Springer, London, Velika Britanija, **2007**, 149–172.
34. K. M. Nelson, J. L. Dahlin, J. Bisson, J. Graham, G. F. Pauli, M. A. Walters, *J. Med. Chem.* **2017**, *60*, 1620–1637.
35. D. X. Kong, Y. Y. Jiang, H. Y. Zhang, *Drug Discov. Today* **2010**, *15*, 884–886.
36. M. H. G. Munro, J. W. Blunt, E. J. Dumdei, S. J. H. Hickford, *J. Biotechnol.* **1999**, *70*, 15–25.
37. D. J. Faulkner, *Nat. Prod. Rep.* **1998**, *20*, 269–309.
38. C. Tringali, G. Oriente, M. Piattelli, C. Geraci, G. Nicolosi, E. Breitmaier, *Can. J. Chem.* **1988**, *66*, 2799–2802.
39. J. U. Lee, D. I. Kang, W. L. Zhu, S. Y. Shin, K. S. Hahm, Y. Kim, *Biopolymers* **2007**, *88*, 208–216.
40. K. Kanoh, K. Adachi, S. Matsuda, Y. Shizuri, K. Yasumoto, T. Kusumi, K. Okumura, T. Kirikae, *J. Antibiot.* **2008**, *61*, 192–194.
41. C. A. Ospina, A. D. Rodriguez, H. Zhao, R. G. Raptis, *Tetrahedron Lett.* **2007**, *48*, 7520–7523.
42. L. B. Talarico, M. E. Duarte, R. G. Zibetti, E. B. Damonte, *Planta Med.* **2007**, *73*, 1464–1468.
43. K. L. McPhail, J. Correa, R. G. Linington, J. Gonzalez, E. Ortega-Barria, T. L. Capson, W. H. Gerwick, *J. Nat. Prod.* **2007**, *70*, 984–988.
44. A. San-Martin, R. Negrete, J. Roviroso, *Phytochemistry* **1991**, *30*, 2165–2169.
45. A. Fukuzawa, T. Masamune, *Tetrahedron Lett.* **1981**, *22*, 4081–4084.
46. K. Watanabe, K. Umeda, M. Miyakado, *Agric. Biol. Chem.* **1989**, *53*, 2513–2515.
47. C. H. Chao, Z. H. Wen, Y. C. Wu, H. C. Yeh, J. H. Sheu, *J. Nat. Prod.* **2008**, *71*, 1819–1824.

48. S. Cheng, Z. Wen, S. Chiou, C. Hsu, S. Wang, C. Dai, M. Y. Chiang, C. Duh, *Tetrahedron* **2008**, *64*, 9698–9704.
49. A. San-Martin, R. Negrete, J. Rovirosa, *Phytochemistry* **1991**, *30*, 2165–2169.
50. E. M. Gordon, K. K. Sankhala, N. Chawla, S. P. Chawla, *Adv. Ther.* **2016**, *33*, 1055–1071.
51. I. Manzanares, C. Cuevas, R. Garcia-Nieto, E. Marco, F. Gago, *Curr. Med. Chem. Anticancer Agents* **2001**, *1*, 257–276.
52. A. M. S. Mayer, K. B. Glaser, C. Cuevas, R. S. Jacobs, W. Kem, R. D. Little, J. M. McIntosh, D. J. Newman, B. C. Potts, D. E. Shuster, *Trends Pharmacol. Sci.* **2010**, *31*, 255–265.
53. “Ecteinacidin 743 (ET-743, Yondelis), aplidin and kahalide F”, R. Henriquez, G. Faircloth, C. Cuevas, in *Anticancer Agents from Natural Products*, G. M. Cragg, D. G. I. Kingston, D. J. Newman, Taylor and Francis, Boca Raton, SAD, **2005**, 215–240.
54. S. B. Bravo, M. E. Garcia-Rendueles, R. Seoane, V. Dosil, J. Cameselle-Teijeiro, L. Lopez-Lazaro, J. Zalvide, F. Barreiro, C. M. Pombo, C. V. Alvarez, *Clin. Cancer Res.* **2005**, *11*, 7664–7673.
55. W. K. Jung, H. Y. Jo, Z. J. Qian, Y. J. Jeong, S. G. Park, I. W. Choi, S. K. Kim, *J. Biochem. Mol. Biol.* **2007**, *40*, 832–838.
56. T. R. Thomas, D. P. Kavlekar, P. A. LokaBharathi, *Mar. Drugs* **2010**, *8*, 1417–1468.
57. D. J. Faulkner, *Nat. Prod. Rep.* **2002**, *19*, 1–48.
58. J. W. Blunt, B. R. Copp, M. H. Munro, P. T. Northcote, M. R. Prinsep, **2005**, *22*, 15–61.
59. W. Bergmann, R. J. Feeney, *J. Am. Chem. Soc.* **1950**, *72*, 2809–2810.
60. W. Bergmann, R. J. Feeney, *J. Org. Chem.* **1951**, *16*, 981–987.
61. R. L. Momparler, *Exp. Hematol. Oncol.* **2013**, *2*:20.
62. G. Schwartzmann, *Ann. Oncol.* **2000**, *11*, 235–243.
63. H. J. Field, E. De Clerq, *Microbiology Today* **2004**, *31*, 58–61.
64. K. H. Jang, S. C. Chung, J. Shin, S. H. Lee, T. I. Kim, H. S. Lee, K. B. Oh, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2007**, *17*, 5366–5369.
65. R. Kumar, R. Subramani, K.-D. Feussner, W. Aalbersberg, *Mar. Drugs*, **2012**, *10*, 200–208.
66. S. S. Ebada, V. Wray, N. J. de Voogd, Z. Deng, W. Lin, P. Proksch, *Mar. Drugs*, **2009**, *7*, 435–444.
67. S. P. de Lira, M. H. Selegim, D. E. Williams, F. Marion, P. Hamill, F. Jean, R. J. Andersen, E. Hajdu, R. G. Berlinck, *J. Braz. Chem. Soc.* **2007**, *18*, 440–443.
68. M. T. Hamann, P. J. Scheuer, *Tetrahedron Lett.* **1991**, *32*, 5671–5672.
69. R. J. Capon, C. Skene, E. Lacey, J. H. Gill, D. Wadsworth, T. Friedel, *J. Nat. Prod.* **1999**, *62*, 1256–1259.
70. R. J. Capon, D. Vuong, M. McNally, T. Peterle, N. Trotter, E. Lacey, J. H. Gill, *Org. Biomol. Chem.* **2005**, *3*, 118–122.

71. D. Tasdemir, B. Topaloglu, R. Perozzo, R. Brun, R. O'Neill, N. M. Carballeira, X. Zhang, P. J. Tonge, A. Linden, P. Ruedi, *Bioorg. Med. Chem.* **2007**, *15*, 6834–6845.
72. R. Sakai, T. Higa, C. W. Jefford, G. Bernardinelli, *J. Am. Chem. Soc.* **1986**, *108*, 6404–6405.
73. K. K. Ang, M. J. Holmes, U. A. Kara, *Parasitol. Res.* **2001**, *87*, 715–721.
74. M. H. Kossuga, A. M. Nascimento, J. Q. Reimao, A. G. Tempone, N. N. Taniwaki, K. Veloso, A. G. Ferreira, B.C. Cavalcanti, C. Pessoa, M. O. Moraes, A. M. Mayer, E. Hajdu, R. G. Berlinck, *Braz. J. Nat. Prod.* **2008**, *71*, 334–339.
75. A. M. S. Mayer, R. S. Jacobs, *Mem. Calif. Acad. Sci.* **1988**, *13*, 133.
76. S. Aoki, Y. Watanabe, M. Sanagawa, A. Setiawan, N. Kotoku, M. Kobayashi, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 3148–3149.
77. G. Mousseau, M. A. Clementz, W. N. Bakeman, N. Nagarsheth, M. Cameron, J. Shi, P. Baran, R. Fromentin, N. Chomont, S. T. Valente, *Cell Host Microbe* **2012**, *12*, 97–108.
78. W. D. Inman, W. M. Bray, N. C. Gassner, R. S. Lokey, K. Tenney, Y. Y. C. Shen, K. TenDyke, T. Suh, P. Crews, *J. Nat. Prod.* **2010**, *73*, 255–257.
79. H. T. Nguyen, V. M. Chau, T. H. Tran, V. K. Phan, T. H. Hoang, T. D. Nguyen, X. N. Nguyen, B. H. Tai, J. H. Hyun, H. K. Kang, Y. H. Kim, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2009**, *19*, 4584–4588.
80. M. E. Rateb, W. E. Houssen, M. Schumacher, W. T. A. Harrison, M. Diederich, R. Ebel, M. Jaspars, *J. Nat. Prod.* **2009**, *72*, 1471–1476.
81. H. Suzuki, K. Shindo, A. Ueno, T. Miura, M. Takei, M. Sakakibara, H. Fukamachi, J. Tanaka, T. Higa, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1999**, *9*, 1361–1364.
82. M. C. Denny, D. D. Houlihan, H. McMillan, J. J. Morrison, *Am. J. Obstet. Gynecol.* **2002**, *187*, 641–647.
83. U. Borchard, *J. Clin. Basic Cardiol.* **1998**, *1*, 5–9.
84. B. E. Maryanoff, X. Qiu, K. P. Padmanabhan, A. Tulinsky, H. R. Almond, P. Andrade-Gordon, M. N. Greco, J. A. Kauffman, K. C. Nicolaou, A. Liu, P. H. Brungs, N. Fusetani, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1993**, *90*, 8048–8052.
85. R. T. Shuman, R. B. Rothenberger, C. S. Campbell, G. F. Smith, D. S. Gifford-Moore, P. D. Gesellchen, *J. Med. Chem.* **1993**, *36*, 314–319.
86. P. de Almeida Leone, J. Redburn, J. N. Hooper, R. J. Quinn, *J. Nat. Prod.* **2000**, *63*, 694–697.
87. D. Romo, R. M. Rzas, H. A. Shea, K. Park, J. M. Langenhan, L. Sun, A. Akhiezer, J. O. Liu, *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 12237–12254.
88. A. Aiello, E. Giordano, M. Menna, W. E. Müller, S. Perović-Ottstadt, H. C. Schröder, *Bioorg. Med. Chem.* **2007**, *15*, 5877–5887.
89. R. Langjae, S. Bussarawit, S. Yuenyongsawad, K. Ingkaninan, A. Plubrukarn, *Steroids* **2007**, *72*, 682–685.
90. M. González-Ibarra, N. Farfán, C. Trejo, S. Uribe, B. Lotina-Hennsen, *J. Agric. Food Chem.* **2005**, *53*, 3415–3420.

91. T.-S. Lin, L.-Y. Zhu, S.-P. Xu, A. A. Divo, A. C. Sartorelli, *J. Med. Chem.* **1991**, *34*, 1634–1639.
92. P. S. Sarin, D. Sun, A. Thornton, W. E. G. Müller, *J. Natl. Cancer Inst.* **1987**, *78*, 663–666.
93. K. Müller, A. Sellmer, W. Wiegrebe, *J. Nat. Prod.* **1999**, *62*, 1134–1136.
94. A. J. M. da Silva, C. D. Netto, W. Pacienza-Lima, E. C. Torres-Santos, B. Rossi-Bergman, S. Maurel, A. Valentin, P. R. R. Costa, *J. Braz. Chem. Soc.* **2009**, *20*, 176–182.
95. L.-Y. Tao, J.-Y. Zhang, Y.-J. Liang, L.-M. Chen, L.-S. Zheng, F. Wang, Y.-J. Mi, Z.-G. She, K. K. W. To, Y.-C. Lin, L.-W. Fu, *Mar. Drugs* **2010**, *8*, 1094–1105.
96. V. Kuete, L. K. Omosa, V. R. Sipowo Tala, J. O. Midiwo, A. T. Mbaveng, S. Swaleh, O. Karaosmanoğlu, H. Sivas, *BMC Pharmacol. Toxicol.* **2016**, *17*:60.
97. R. R. Kitagawa, W. Vilegas, I. Z. Carlos, M. S. G. Raddi, *Braz. J. Pharmacogn.* **2011**, *21*, 1084–1088.
98. X. Wang, B. Thomas, R. Sachdeva, L. Arteburn, L. Frye, P. G. Hatcher, D. G. Cornwell, J. Ma, *PNAS* **2006**, *103*, 3604–3609.
99. G. N. Hartobágyi, *Drugs*, **1997**, *54*(Suppl. 4), 1–7.
100. C. S. Coates, J. Ziegler, K. Manz, J. Good, B. Kang, S. Milikisiyants, R. Chatterjee, S. Hao, J. H. Golbeck, K. V. Lakshmi, *J. Phys. Chem. B* **2013**, *117*, 7210–7220.
101. G. Lenaz, M. L. Genova, *Biochim. Biophys. Acta, Bioenergetics* **2009**, *1787*, 563–573.
102. M. G. Traber, J. F. Stevens, *Free Radical Biol. Med.* **2011**, *51*, 1000–1013.
103. B. Nowicka, J. Kruk, *Biochim. Biophys. Acta*, **2010**, *1797*, 1587–1605.
104. A. Kijjoa, P. Sawangwong, *Mar. Drugs* **2004**, *2*, 73–82.
105. T. F. Molinski, D. S. Dalisay, S. L. Lievens, J. P. Saludes, *Nat. Rev. Drug Discov.* **2009**, *8*, 69–85.
106. M. Gordaliza, *Mar. Drugs* **2010**, *8*, 2849–2870.
107. N. El-Najjar, H. Gali-Muhtasib, R. A. Ketola, P. Vuorela, A. Urtti, H. Vuorela, *Phytochem. Rev.* **2011**, *10*, 353–370,
108. H. Brockmann, *Fort. Chem. Org. Nat.* **1963**, *21*, 121–182.
109. H. CortésFunes, C. Coronado, *Cardiovasc. Toxicol.* **2007**, *7*, 56–60.
110. S. T. Crooke, W. T. Bradner, *Cancer Treat. Rev.* **1976**, *3*, 121–139.
111. W. T. Bradner, *Cancer Treat. Rev.* **2001**, *27*, 35–50.
112. E. J. Fox, *Clin. Ther.* **2006**, *28*, 461–474.
113. H. Lenk, U. Müller, S. Tanneberger, *Anticancer Res.* **1987**, *7*, 1257–1264.
114. E. D. Kharasch, R. F. Novak, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **1983**, *226*, 500–506.
115. R. T. Eagan, R. P. Dinapoli, T. L. Cascino, B. Scheithauer, B. P. O'Neill, J. R. O'Fallon, *J. Neuro-Oncol.* **1987**, *5*, 309–314.
116. P. C. Amrein, R. B. Davis, R. J. Mayer, C. A. Schiffer, *Am. J. Hematol.* **1990**, *35*, 80–83.
117. F. Muñoz, E. Velez-García, J. A. Neidhart, J. F. Bender, M. Becker, A. J. Grillo-Lopez, *Cancer Chemother. Pharmacol.* **1987**, *19*, 265–268.

118. J. F. Bender, A. J. Grillo-Lopez, J. G. Psada Jr., *Invest. New Drugs* **1983**, *1*, 71–84.
119. S. S. Ebada, N. de Voogd, R. Kalscheuer, W. E. G. Müller, chaidir, P. Proksch, *Phytochem. Lett.* **2017**, *22*, 154–158.
120. S. Kohmoto, O. J. McConnell, A. Wright, F. Koehn, W. Thompson, M. Lui, K. M. Snader, *J. Nat. Prod.* **1987**, *50*, 336–336.
121. M. L. Ciavatta, M. P. L. Gresa, M. Gavagnin, V. Romero, D. Melck, E. Manzo, Y.-W. Guo, R. van Soest, G. Cimino, *Tetrahedron* **2007**, *63*, 1380–1384.
122. D. Lee, J. Shin, K. M. Yoon, T. Kim, S. H. Lee, H. S. Lee, K. B. Oh, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2008**, *18*, 5377–5380.
123. N. Daikuhara, Y. Tada, S. Yamaki, K. Charupant, S. Amnuoypol, K. Suwanborirux, N. Saito, *Tetrahedron Lett.* **2009**, *50*, 4276–4278.
124. T. Laube, A. Bernet, H.-M. Dahse, I. D. Jacobsen, K. Seifert, *Bioorg. Med. Chem.* **2009**, *17*, 1422–1427.
125. T. H. Stanley, *J. Pain* **2014**, *15*, 1215–1226.
126. M. E. Stryjewski, D. R. Graham, S. E. Wilson, W. O’Riordan, D. Young, A. Lentnek, D. P. Ross, V. G. Fowler, A. Hopkins, H. D. Friedland, S. L. Barriere, M. M. Kitt, G. R. Corey, *Clin. Infect. Dis.* **2008**, *46*, 1683–1693.
127. S. Nomura, S. Samasaki, M. Hongu, E. Kawanishi, Y. Koga, T. Sakamoto, Y. Yamamoto, K. Ueta, H. Kimata, K. Nakayama, M. Tsuda-Tsukimoto, *J. Med. Chem.* **2010**, *53*, 6355–6360.
128. Z. Guo, *Acta Pharm. Sin. B* **2016**, *6*, 115–124.
129. D. Wianowska, M. Ł. Hajnos, A. L. Dawidowicz, A. Oniszczyk, M. Waksmundzka-Hajnos, K. Głowniak, *J. Liq. Chromatogr. R. T.* **2009**, *32*, 589–601.
130. Jagtap, C. Szabo, *Nat. Rev. Drug. Discov.* **2005**, *4*, 421–440.
131. E. Zamani, F. Shaki, S. AbedianKenari, M. Shokrzadeh, *Biomed. Pharmacother.* **2017**, *94*, 523–530.
132. C. Martín-Cordero, A. J. León-González, J. M. Calderón-Montaño, E. Burgos-Morón, M. López-Lázaro, *Curr. Drug Targets* **2012**, *13*, 1006–1028.
133. “Apoptosis, Necrosis and autophagy”, E. White, D. R. Green, A. G. Letai, in *The Molecular Basis of Cancer* 4<sup>th</sup> Ed, (Eds: J. Mendelsohn, J. W. Gray, P. M. Howley, M. A. Israel, C. B. Thompson), Elsevier Saunders, Philadelphia, **2015**, 209–228e3.
134. S. Elmore, *Toxicol. Pathol.* **2007**, *35*, 495–516.
135. K. L. Rock, H. Kono, *Annu. Rev. Pathol.* **2008**, *3*, 99–126.
136. L. M. Coussens, Z. Werb, *Nature* **2002**, *420*, 860–867.
137. S. Kumari, A. K. Badana, M. M. G, G. S, R. Malla, *Biomark. Insights* **2018**, *13*, 1–9.
138. E. I. Chen, J. Hewel, J. S. Krueger, C. Tiraby, M. R. Weber, A. Kralli, K. Becker, J. R, Yates III, B. Felding-Habermann, *Cancer Res.* **2007**, *67*, 1472–1486.
139. S. Yadav, E. Zajac, S. S. Singhal, S. Awasthi, *Cancer Metastasis Rev.* **2007**, *26*, 59–69.
140. Y. Fu, P. Wu, J. Xue, X. Wei, *J. Nat. Prod.* **2014**, *77*, 1791–1799.

141. T. Oda, W. Wang, K. Ukai, T. Nakazava, M. A. Mochizuki, *Mar. Drugs* **2007**, *5*, 151–156.
142. W. H. Jiao, X. J. Huang, J. S. Yang, F. Yang, S. J. Piao, H. Gao, J. Li, W. C. Chen, H. W. Lin, *Org. Lett.* **2012**, *14*, 202–205.
143. Y. L. Liu, S. Lindert, W. Zhu, K. Wang, A. McCammon, E. Oldfield, *PNAS*, **2014**, *111*, E2530–E2539.
144. L. Du, Y. D. Zhou, D. G. Nagle, *J. Nat. Prod.* **2013**, *76*, 1175–1181.
145. G. Daletos, N. J. de Voogd, W. E. G. Müller, V. Wray, W. Lin, D. Feger, M. Kubbutat, A. H. Aly, P. Proksch, *J. Nat. Prod.* **2014**, *77*, 218–226.
146. T. Božić, I. Novaković, M. J. Gašić, Z. Juranić, T. Stanojković, S. Tufegdžić, Z. Kljajić, D. Sladić, *Eur. J. Med. Chem.* **2010**, *45*, 923–929.
147. W. E. G. Müller, C. Sobel, W. Sachsse, B. Diehl-Seifert, R. K. Zahn, E. Eich, Z. Kljajić, H.-C. Schröder, *Eur. J. Cancer Clin. Oncol.* **1986**, *22*, 473–476.
148. E. J. Land, G. Porter, E. Strachan, *Trans. Faraday Soc.* **1961**, *57*, 1885–1893.
149. C. C. Winterbourn, J. K. French, R. F. C. Claridge, *FEBS Lett.* **1978**, *94*, 269–272.
150. K. Asada, S. Kanamatsu, *Agric. Biol. Chem.* **1976**, *40*, 1891–1892.
151. K. F. Long, P. B. McKay, J. L. Poyer, *J. Biol. Chem.* **1973**, *248*, 7792–7797.
152. T. Božić, I. Novaković, M. J. Gašić, Z. Juranić, T. Stanojković, S. Tufegdžić, Z. Kljajić, D. Sladić, *Eur. J. Med. Chem.* **2010**, *45*, 923–929.
153. W. E. G. Müller, R. K. Zahn, M. J. Gašić, N. Dogović, A. Maidhof, C. Becker, B. Diehl-Seifert, E. Eich, *Comp. Biochem. Physiol. Part C* **1985**, *80*, 47–52.
154. W. E. G. Müller, V. A. Grebenjuk, G. Le Penec, H.-C. Schröder, F. Brümmer, U. Hentschel, I. M. Müller, H.-J. Breter, *Mar. Biotechnol.* **2004**, *6*, 105–117.
155. D. Mendola, S. de Caralt, M. J. Uriz, F. van den End, J. L. Van Leeuwen, R. H. Wijffels, *Mar. Biotechnol.* **2008**, *10*, 622–630.
156. T. Okubo, Y. Yokohama, K. Kano, I. Kano, *Food Chem. Toxicol.* **2003**, *41*, 679–688.
157. X. Shi, X. Lan, X. Li, X. Chen, B. Z. Carter, X. Wang, J. Liu, *Med. Chem.* **2014**, *4*, 786–790.
158. I. Trifunović, D. Sladić, N. Dogović, M. J. Gašić, *J. Serb. Chem. Soc.* **1987**, *52*, 559–563.
159. C. Zhang, M. Wang, Z. Fan, L.-P. Sun, A. Zhang, *J. Org. Chem.* **2014**, *79*, 7626–7632.
160. National Cancer Institute (NCI). Dostupno sa: <https://www.cancer.gov/about-cancer/treatment/drugs/lung>, poslednji pristup 10/04/2018.
161. M. Jeremić, M. Pešić, J. Dinić, J. Banković, I. Novaković, D. Šegan, D. Sladić, *Eur. J. Med. Chem.* **2016**, *118*, 107–120.
162. J. Tait, *J. Nucl. Med.* **2008**, *49*, 1573–1576.
163. J. J. Lemasters, T. Qian, C. A. Bradham, W. E. Cascio, L. C. Trost, Y. Nishimura, A. L. Nieminen, B. Herman, *J. Bioenerg. Biomembr.* **1999**, *31*, 305–319.
164. J. J. Lemasters, T. P. Theruvath, Z. Zhong, A. Nieminen, *Biochem. Biophys. Acta* **2009**, *1787*, 1395–1401.

165. T. J. Monks, R. J. Highet, S. S. Lau, *Mol. Pharmacol.* **1988**, *34*, 492–500.
166. J. J. Mertens, N. W. Gibson, S. S. Lau, T. J. Monks, *Arch. Biochem. Biophys.* **1995**, *320*, 51–58.
167. P. J. Boor, R. M. Hysmith, *Toxicology* **1987**, *44*, 129–145.
168. S. Toyokuni, K. Okamoto, J. Yodoi, H. Hiai, *FEBS Lett.* **1995**, *358*, 1–3.
169. W. Droge, *Physiol. Rev.* **2002**, *82*, 47–95.
170. M. Fujita, R. Tsuruta, S. Kasaoka, K. Fujimoto, R. Tanaka, Y. Oda, M. Nanba, M. Igarashi, M. Yuasa, T. Yoshikawa, T. Maekawa, *Free Radic. Biol. Med.* **2009**, *47*, 1039–1048.
171. H. M. Peshavariya, G. J. Dusting, S. Selemidis, *Free Radic. Res.* **2007**, *41*, 699–712.
172. A. Rojas, H. Figueroa, L. Re, m. A. Morales, *Arch. Med. Res.* **2006**, *37*, 436–448.
173. C. D. Georgiu, I. Papapostolou, N. Patsoukis, T. Tsegenidis, T. Sideris, *Anal. Biochem.* **2005**, *347*, 144–151.
174. R. McFarland, A. Blokhin, J. Sydnor, J. Mariani, M. W. Vogel, *Dev. Neurobiol.* **2007**, *67*, 1032–1046.
175. S. W. Ryter, H. P. Kim, A. Hoetzel, J. W. Park, K. Nakahira, X. Wang, A. M. Choi, *Antioxid. Redox. Signal.* **2007**, *9*, 49–89.
176. M. M. Tarpey, C. R. White, E. Suarez, G. Richardson, R. Radi, B. A. Freeman, *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* **2004**, *286*, R431–R444.
177. T. Deng, K. Xu, L. Zhang, X. Zheng, *Cell Biol. Int.* **2008**, *32*, 1425–1432.
178. S. Selemidis, G. J. Dusting, H. Peshavariya, B. K. Kemp-Harper, G. R. Drummond, *Cardiovasc. Res.* **2007**, *75*, 349–358.
179. T. Stanković, B. Dankó, A. Martins, M. Dragoj, S. Stojković, A. Isaković, H. C. Wang, Y. C. Wu, A. Hunyadi, M. Pešić, *Cancer Chem. Pharmacol.* **2015**, *76*, 555–565.
180. O. A. Badary, R. A. Taha, A. M. Gamal El-Din, M. H. Abdel-Wahab, *Drug Chem. Toxicol.* **2003**, *26*, 87–98.
181. R. A. Gottlieb, *FEBS Lett.* **2000**, *482*, 6–12.
182. M. O. Hengartner, *Nature* **2000**, *407*, 770–776.
183. C. Adrain, S. J. Martin, *Trends Biochem. Sci.* **2001**, *26*, 390–397.
184. S. W. Perry, J. P. Norman, J. Barbieri, E. B. Brown, H. A. Gelbard, *Biotechniques* **2011**, *50*, 98–115.
185. A. Siraki, T. S. Chan, p. J. O'Brien, *Toxicol. Sci.* **2004**, *81*, 148–159.
186. N. Gharavi, S. Haggarty, A. O. S. El-Kadi, *Curr. Drug Metab.* **2007**, *8*, 1–7.
187. S. F. Bloomfield, *J. Appl. Microbiol.* **2002**, *92*, S144–S157.
188. S. A. McEwen, P. J. Fedorka-Cray, *Clin. Inf. Dis.* **2002**, *34*, S93–S106.
189. A. K. Vidaver, *Antimicrob. Plant. Agric.* **2002**, *34*, S107–S110.
190. R. Wise, E. J. L. Soulsby, *Vet. Rec.* **2002**, *151*, 371–372.
191. M. H. Kazmi, A. Malik, S. Hameed, N. Akhtar, S. Noor Ali, *Phytochemistry* **1994**, *36*, 761–763.
192. J. A. Duke, *Handbook of medicinal herbs*, CRC Press Inc., Boca Raton, **1995**.

193. M. Balouiri, M. Sadiki, S. K. Ibnsouda, *J. Pharmaceut. Anal.* **2016**, *6*, 71–79.
194. M. Pešić, J. Marković, D. Janković, I. Marković, Lj. Rakić, S. Kanazir, S. Ruždijić, *J. Chemotherapy* **2006**, *18*, 66–73.
195. National Committee for Clinical Laboratory Standards (2000) Approval standard document M7-A5, Vilanova, Pa, SAD.



## BIOGRAFIJA

Marko Jeremić je rođen 30. novembra 1981. godine u Kraljevu, Srbija. Osnovnu školu i gimnaziju je završio u Trsteniku. Hemijski fakultet Univerziteta u Beogradu je upisao 2000. godine na smeru diplomirani hemičar. Diplomirao je 2009. godine i iste godine upisao master studije na Hemijskom fakultetu. Master studije je završio 2010. godine i potom upisao doktorske studije.

Od jula 2011. godine je zaposlen kao istraživač-pripravnik pri Inovacionom centru Hemijskog fakulteta Univerziteta u Beogradu. Od septembra 2013. godine radi u zvanju istraživača-saradnika. Od 2012. godine je angažovan u nastavi na predmetu Organska hemija za studente Biološkog fakulteta.

Do sada je učestvovao u izvođenju dva naučno-istraživačka projekta finansirana od strane Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja. Objavio je tri naučna rada u međunarodnim časopisima.

Član je Srpskog hemijskog društva.

## IZJAVA O AUTORSTVU

Ime i prezime autora Marko Ž. Jeremić

Broj indeksa DH35/2010

### Izjavljujem

da je doktorska disertacija pod naslovom

Dobijanje alkilamino i aralkilamino derivata marinskog hinona avarona i njegovog model-

---

jedinjenja i ispitivanje njihove citotoksične i antibakterijske aktivnosti

---

- rezultat sopstvenog istraživačkog rada;
- da disertacija u celini ni u delovima nije bila predložena za sticanje druge diplome prema studijskim programima drugih visokoškolskih ustanova;
- da su rezultati korektno navedeni i
- da nisam kršio/la autorska prava i koristio/la intelektualnu svojinu drugih lica.

### Potpis autora

U Beogradu, 1. 8. 2018.

---

## Izjava o istovetnosti štampane i elektronske verzije doktorskog rada

Ime i prezime autora Marko Ž. Jeremić

Broj indeksa DH35/2010

Studijski program Doktor hemijskih nauka

Naslov rada Dobijanje alkilamino i aralkilamino derivata marinskog hinona avarona i njegovog model-jedinjenja i ispitivanje njihove citotoksične i antibakterijske aktivnosti

Mentor prof. dr Dušan Sladić, dr Irena Novaković

Izjavljujem da je štampana verzija mog doktorskog rada istovetna elektronskoj verziji koju sam predao/la radi pohranjenja u **Digitalnom repozitorijumu Univerziteta u Beogradu.**

Dozvoljavam da se objave moji lični podaci vezani za dobijanje akademskog naziva doktora nauka, kao što su ime i prezime, godina i mesto rođenja i datum odbrane rada.

Ovi lični podaci mogu se objaviti na mrežnim stanicama digitalne biblioteke, u elektronskom katalogu i u publikacijama Univerziteta u Beogradu.

**Potpis autora**

U Beogradu, 1. 8. 2018.

---

## Izjava o korišćenju

Ovlašćujem Univerzitetsku biblioteku „Svetozar Marković“ da u Digitalni repozitorijum Univerziteta u Beogradu unese moju doktorsku disertaciju pod naslovom:

Dobijanje alkilamino i aralkilamino derivata marinskog hinona avarona i njegovog model-  
jedinjenja i ispitivanje njihove citotoksične i antibakterijske aktivnosti

koja je moje autorsko delo.

Disertaciju sa svim priložima predao/la sam u elektronskom formatu pogodnom za trajno arhiviranje.

Moju doktorsku disertaciju pohranjenu u Digitalnom repozitorijumu Univerziteta u Beogradu i dostupnu u otvorenom pristupu mogu da koriste svi koji poštuju odredbe sadržane u odabranom tipu licence Kreativne zajednice (Creative Commons) za koju sam se odlučio/la.

1. Autorstvo (CC BY)
2. Autorstvo – nekomercijalno (CC BY-NC)
3. Autorstvo – nekomercijalno – bez prerade (CC BY-NC-ND)
4. Autorstvo – nekomercijalno – deliti pod istim uslovima (CC BY-NC-SA)
5. Autorstvo – bez prerade (CC BY-ND)
6. Autorstvo – deliti pod istim uslovima (CC BY-SA)

(Molimo da zaokružite samo jednu od šest ponuđenih licenci.

Kratak opis je sastavni deo ove izjave.)

**Potpis autora**

U Beogradu, 1. 8. 2018.

\_\_\_\_\_

1. **Autorstvo.** Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, i prerade, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence, čak i u komercijalne svrhe. Ovo je najslobodnija od svih licenci.
2. **Autorstvo – nekomercijalno.** Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, i prerade, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence. Ova licenca ne dozvoljava komercijalnu upotrebu delova.
3. **Autorstvo – nekomercijalno –bez prerada.** Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, bez promena, preoblikovanja ili upotrebe dela u svom delu, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence. Ova licenca ne dozvoljava komercijalnu upotrebu dela. U odnosu na sve ostale licence, ovom licencom se ograničava najveći obim prava korišćenja dela.
4. **Autorstvo – nekomercijalno – deliti pod istim uslovima.** Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, i prerade, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence i ako se prerada distribuira pod istom ili sličnom licencom. Ova licenca ne dozvoljava komercijalnu upotrebu dela i prerada.
5. **Autorstvo – bez prerada.** Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, bez promena, preoblikovanja ili upotrebe dela u svom delu, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence. Ova licenca dozvoljava komercijalnu upotrebu dela.
6. **Autorstvo – deliti pod istim uslovima.** Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, i prerade, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence i ako se prerada distribuira pod istom ili sličnom licencom. Ova licenca dozvoljava komercijalnu upotrebu dela i prerada. Slična je softverskim licencama, odnosno licencama otvorenog koda.