Antioksidacijska svojstva derivata kumarina i njihovo antifungalno djelovanje prema najvažnijim mikotoksikogenim plijesnima iz hrane

Molnar, Maja

Doctoral thesis / Disertacija

2011

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, FACULTY OF FOOD TECHNOLOGY / Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Prehrambeno-tehnološki fakultet Osijek**

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:109:472198

Rights / Prava: Attribution-NonCommercial 4.0 International/Imenovanje-Nekomercijalno 4.0 međunarodna

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-29**

REPOZITORIJ PTFOS PREHRAMBENO-TEHNOLOŠKI FAKULTET OSIJEK dabar DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJI

Repository / Repozitorij:

Repository of the Faculty of Food Technology Osijek

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU

dabar DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJI

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU
PREHRAMBENO-TEHNOLOŠKI FAKULTET OSIJEK

Maja Molnar, dipl. ing.

ANTIOKSIDACIJSKA SVOJSTVA DERIVATA KUMARINA I NJIHOVO ANTIFUNGALNO DJELOVANJE PREMA NAJVAŽNIJIM MIKOTOKSIKOGENIM PLIJESNIMA IZ HRANE

DOKTORSKI RAD

Osijek, prosinac, 2011.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

doktorski rad
Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku
Prehrambeno-tehnološki fakultet Osijek
Zavod za primijenjenu kemiju i ekologiju
Katedra za kemiju i ekologiju
Franje Kuhača 20, 31000 Osijek, Hrvatska

UDK:	547.587.51 : 579.67.083 (043) 547.587.51 : 54.057 (043)
Znanstveno područje:	Biotehničke znanosti
Znanstveno polje:	Prehrambena tehnologija
Tema rada	je prihvaćena na II. redovitoj sjednici Fakultetskog vijeća Prehrambeno-tehnološkog fakulteta Osijek održanoj 25. studenog 2010.
Voditelj:	*Dr. sc. Tomislav Klapec, red. prof.*
Suvoditelj:	*Dr. sc. Milan Čačić, doc.*

ANTIOKSIDACIJSKA SVOJSTVA DERIVATA KUMARINA I NJIHOVO ANTIFUNGALNO DJELOVANJE PREMA NAJVAŽNIJIM MIKOTOKSIKOGENIM PLIJESNIMA IZ HRANE

Maja Molnar, dipl. ing.

Sažetak:

U ovom radu je izvršena sinteza derivata kumarina s potencijalnom antifungalnom i antioksidacijskom aktivnošću. Naime, prema dosadašnjim istraživanjima, pretpostavlja se da se sintetskom modifikacijom polaznog spoja 7-hidroksi-4-metilkumarina mogu poboljšati njegova antifungalna i antioksidacijska svojstva. Sintetskim putem dobivena je serija Schiffovih baza s različitim supstituentima, kao i tiosemikarbazida i tiazolidinona. Antioksidacijska aktivnost je ispitana DPPH metodom spektrofotometrijski, EPR-om (DPPH i galvinoksil radikal) i fosfomolibden metodom. Rezultati su pokazali da se supstitucijom hidroksilne skupine 7-hidroksi-4-metilkumarina može značajno povećati antioksidacijska aktivnost polaznog kumarina, osobito prisutnošću supstituenata koji sadrže dihidroksifenilnu skupinu i tiosemikarbazidnu skupinu. Derivati kumarina su ispitani i na antifungalno djelovanje prema najčešćim plijesnima namirnica, *Aspergillus flavus, A. ochraceus*, *Fusarium graminearum* i *F. verticillioides*. Novosintetizirani derivati kumarina su se pokazali i kao izvrsna antifungalna sredstva, osobito Schiffove baze s hidroksilnim skupinama, te su, ovisno o primijenjenoj plijesni, pokazali i 100% inhibiciju rasta pojedine plijesni. Supstitucijom 7-hidroksi-4-metilkumarina u položaju 7 antifungalna aktivnost prema ispitanim plijesnima, osobito prema *F. verticillioides*, se povećala u odnosu na polazni kumarin. Spojevi koji u isto vrijeme posjeduju izvrsnu antioksidacijsku i antifungalnu aktivnost su Schiffove baze s dihidroksifenilnom skupinom i tiosemikarbazidi s fenilnom skupinom (supstituiranom ili ne).

Ključne riječi: kumarin, sinteza, antifungalna aktivnost, antioksidacijska aktivnost

Rad sadrži:	stranica	138
	slika	46
	tablica	14
	priloga	0
	literaturnih referenci	207
Jezik izvornika:	hrvatski	

Sastav Povjerenstva za obranu:

1. dr. sc. *Irena Landeka Jurčević, doc.*	predsjednik
2. dr. sc. *Tomislav Klapec,* red. prof.	član-voditelj
3. dr. sc. *Milan Čačić,* doc.	član-suvoditelj
4. dr. sc. *Ivica Strelec,* doc.	zamjena člana

Datum obrane: 08. 12. 2011**.**

Rad je pohranjen u Knjižnici Prehrambeno-tehnološkog fakulteta Osijek, Nacionalnoj i sveučilišnoj knjižnici u Zagrebu, Gradskoj i sveučilišnoj knjižnici Osijek, Rektoratu Sveučilišta J. J. Strossmayera u Osijeku, Sveučilišnoj knjižnici Rijeka, Sveučilišnoj knjižnici Split, Sveučilišnoj knjižnici Pula, Sveučilišnoj knjižnici Zadar.

BASIC DOCUMENTATION CARD

dissertation

University Josip Juraj Strossmayer in Osijek
Faculty of Food Technology Osijek
Department of Applied Chemistry and Ecology
Subdepartment of Chemistry and Ecology
Franje Kuhača 20, HR-31000 Osijek, Croatia

UDC: 547.587.51 : 579.67.083 (043)
547.587.51 : 54.057 (043)
Scientific area: Biotechnical sciences
Scientific field: Food technology
Thesis subject was approved by the Faculty Council of the Faculty of Food Technology at its session no. II held on November 25th 2010.
Mentor: *Tomislav Klapec, PhD, full professor*
Co-mentor: *Milan Čačić, PhD, assistant professor*

ANTIOXIDANT PROPERTIES OF COUMARIN DERIVATIVES AND THEIR ANTIFUNGAL ACTIVITY AGAINST MOST RELEVANT MYCOTOXIGENIC FOOD MOLDS

Maja Molnar, MSc

Summary:

In this work synthesis of coumarin derivatives with potential antifungal and antioxidant activity was performed. According to recent research work, synthethic modification of 7-hydroxy-4-methylcoumarin can improve its antifungal and antioxidant activity. A series of new coumarin derivatives, Schiff bases, thiosemicarbazides and thaizolidinones was prepared by conventional synthetic routes. Antioxidant activity of the compounds was evaluated using DPPH radical scavenging method, which was performed spectrophotometrically, by EPR spectroscopy (DPPH radical and galvinoxyl radical) and phosphomolybdenum method. The results indicated that the substitution of hydroxyl group of 7-hydroxy-4-methylcoumarin with dihidroxyphenyl or thiosemicarbazide group can increase an antioxidant activity of the starting compound. Antifungal investigation of coumarin derivatives against most relevant mycotoxigenic food molds, *Aspergillus flavus*, *A. ochraceus*, *Fusarium graminearum* and *F. verticillioides,* was also performed. The results revealed strong antifungal properties of the derivatives, Schiff bases especially. Several compounds effected a 100% inhibition against selected fungi, especially Schiff bases containing hydroxyl groups. Substitution of 7-hydroxy-4-methylcoumarin in position 7 can increase antifungal activity of the starting compound, especially against *F. verticillioides*. Compounds showing potent antioxidant and antifungal activity were Schiff bases with dihydroxyphenyl substituents and thiosemicarbazides with unsubstituted or substituted phenyl groups.

Key words: coumarin, synthesis, antifungal activity, antioxidant activity
Thesis contains:
pages 138
figures 46
tables 14
supplements 0
references 207
Original in: Croatian language

Defense committee:
1. *Irena Landeka Jurčević*, PhD, assistant prof., chair person
2. *Tomislav Klapec*, PhD, prof., supervisor
3. *Milan Čačić*, PhD, assistant prof., co-supervisor
4. *Ivica Strelec*, PhD, assistant prof., stand-in

Defense date: 08. 12. 2011.

Thesis is printed and deposited in Library of the Faculty of Food Technology Osijek, National and University Library in Zagreb, City and University Library Osijek, University of J. J. Strossmayer in Osijek, University Library Rijeka, University Library Split, University Library Pula, University Library Zadar.

Zahvaljujem svojoj obitelji na svesrdnoj podršci tijekom svih ovih godina rada i izrade doktorata.

Zahvajujem svim kolegama koji su bili uz mene, bilo da se radi o moralnoj ili tehničkoj podršci.

Zahvljujem doc. dr. Milanu Čačiću koji me je uveo u svijet kumarina i organske sinteze, kao i prof. dr. Tomislavu Klapecu za pruženu pomoć prilikom izrade dijela ove disertacije.

Također zahvaljujem svima koji su mi omogućili upotrebu određene opreme i prostora, koji su mi bili nužni za izradu eksperimentalnog dijela.

Maja

Sadržaj

1. UVOD 1

2. TEORIJSKI DIO 4

2.1. KEMIJA I IZVORI KUMARINA 5

2.1.1. Kumarin 5

2.1.2. Biosinteza kumarina 12

2.1.3. Kemijska sinteza kumarina 18

2.1.4. Metabolizam i farmakologija kumarina 21

2.1.5. Biološko djelovanje Schiffovih baza, tiosemikarbazida i tiazolidinona 29

2.2. KUMARINI I ANTIOKSIDACIJSKO DJELOVANJE 30

2.2.1. Antioksidansi i slobodni radikali 30

2.2.2. Metode određivanja antioksidacijske aktivnosti 32

2.2.3. Kumarini kao antioksidansi 40

2.3. KUMARINI I PLIJESNI 44

2.3.1. Plijesni roda *Aspergillus* 47

2.3.2. Plijesni roda *Fusarium* 50

2.3.3. Antifungalno djelovanje kumarina 55

3. EKSPERIMENTALNI DIO 62

3.1. DEFINIRANJE ZADATKA 63

3.2. METODE 63

3.2.1. Sinteza derivata kumarina 64

3.2.2. Identifikacija i karakterizacija spojeva 67

3.2.3. Ispitivanje antioksidacijske aktivnosti 69

3.2.4. Ispitivanje antifungalne aktivnosti 72

3.2.5. Statistička obrada 74

4. REZULTATI 75

4.1. IDENTIFIKACIJA I KARAKTERIZACIJA DERIVATA KUMARINA 76

4.1.1. Schiffove baze 76

4.1.2. Tiosemikarbazidi 85

4.1.3. Tiazolidinoni 87

4.2. ANTIOKSIDACIJSKA AKTIVNOST 90

4.3. ANTIFUNGALNA AKTIVNOST 99

5. RASPRAVA 104

5.1. SINTEZA DERIVATA KUMARINA 105

5.2. IDENTIFIKACIJA I KARAKTERIZACIJA DERIVATA KUMARINA 105

5.3. ANTIOKSIDACIJSKA AKTIVNOST 108

5.4. ANTIFUNGALNA AKTIVNOST 114

6. ZAKLJUČCI 118

7. LITERATURA 122

Popis oznaka, kratica i simbola

4-HDHC-GSH	4-hidroksidihidrokumarin glutation
6,7-DHC	6,7-dihidroksikumarin
ABTS	2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonska kiselina)
AFAR	aflatoksin B1-aldehid reduktaza
a_w	aktivitet vode
BDE	bond dissociation energy (energija disocijacije veze)
BHT	butilirani hidroksitoluen
BIS	bifenil sintaza
COX-2	ciklooksigenaza 2
DAMC	7,8-diacetoksi-4-metilkumarin
DHC	dihidrokumarin
DHMC	7,8-dihidroksi-4-metilkumarin
DMSO	dimetilsulfoksid
DPPH	difenilpikrilhidrazil
EFSA	European Food Safety Authority (Europska agencija za sigurnost hrane)
EPR	electron paramagnetic resonance (elektronska paramagnetska rezonancija)
ESR	electron spin resonance (elektronska spinska rezonancija)
GC-MS	gas chromatography–mass spectrometry (plinska kromatografija-spektrometrija mase)
GSTA5	glutation S-transferaza alfa 5
HAT	hydrogen atom transfer (prijenos vodikovog atoma)
HPLC-UV	high-pressure liquid chromatography with UV detector (visokotlačna tekućinska kromatografija s UV detektorom)
IP	ionizacijski potencijal
LC-MS	liquid chromatography–mass spectrometry (tekućinska kromatografija-spektrometrija mase)
LD	lethal dose (letalna doza)
MIC	minimal inhibitory concentration (minimalna inhibitorna koncentracija)
MOPS	3-(N-morfolino)propansulfonska kiselina

NCCLS	National Committee for Clinical Laboratory Standards (Nacionalni odbor za kliničke i laboratorijske standarde)
NF-κB	nuclear factor κB (nuklearni faktor κB)
NMR	nuklearna magnetska rezonancija
o-CA	*o*-kumarinska kiselina
o-HPA	*o*-hidroksifenilacetaldehid
o-HPAA	*o*-hidroksifeniloctena kiselina
o-HPE	*o*-hidroksifeniletanol
o-HPLA	*o*-hidroksifenilmliječna kiselina
o-HPPA	*o*-hidroksifenilpropionska kiselina
ORAC	oxygen radical absorbance capacity (kapacitet apsorpcije kisikovih radikala)
PAL	fenilalanin amonijeva lijaza
PDA	potato dextrose agar (agar krumpirove dekstroze)
RNS	reactive nitrogen species (reaktivne dušikove vrste)
ROS	reactive oxygen species (reaktivne kisikove vrste)
RPMI	Roswell Park Memorial Institute (Memeorijalni Institut Roswell Park)
SET	single electron transfer (prijenos jednog elektrona)
TEAC	trolox equivalence antioxidant capacity (antiokisdacijski kapacitet u ekvivalentima troloksa)
TRAP	total radical trapping antioxidant parameter (antioksidacijski parametar hvatanja ukupnih radikala)

1. UVOD

Očuvanje kvalitete namirnica tijekom procesiranja i skladištenja, kao i povećanje njihove trajnosti, jedan je od imperativa današnjice. Brojni su uzroci gubitka nutritivnih i organoleptičkih svojstava namirnica tijekom njihove obrade i skladištenja, među kojima valja izdvojiti kvarenje namirnica uzrokovano plijesnima i gubitak nutritivnih svojstava uzrokovan slobodnim radikalima.

Plijesni su jedan od glavnih uzroka mikrobiološkog kvarenja hrane i inhibicija njihovog rasta je i dalje u žarištu zanimanja znanstvene zajednice. Osim što rast mikroorganizama narušava estetski izgled namirnica, njihova prisutnost može biti uzrokom brojnih zdravstvenih problema kod ljudi. Naime, udisanje spora i fragmenata hifa plijesni može uzrokovati alergije, infekcije i razna toksična oboljenja, ovisno o vrsti plijesni, izloženosti i općem zdravstvenom stanju osobe. Također, izloženost mikotoksinima putem hrane za ljude i životinje može rezultirati pojavom brojnih oboljenja, koja se jednim imenom nazivaju mikotoksikoze (Richard, 2007.).

Poznato je mnoštvo antifungalnih spojeva biljnog podrijetla, koji mogu biti sastavni dio biljke ili ih biljka proizvodi samo u određenim uvjetima. Kumarini, koji u svojoj strukturi sadrže kondenzirani benzenski i pironski prsten, među najčešćim su sekundarnim metabolitima zelenih biljaka (Vuković i sur., 2010.) i čine važnu skupinu niskomolekularnih fenolnih spojeva (Lin i sur., 2008.). Zbog raznolikosti u biološkim svojstvima, kumarini već godinama privlače pažnju brojnih znanstvenika (Malhotra i sur., 2008.), pa tako mnoštvo istraživanja potvrđuje antimikrobnu aktivnost kumarina, kako na gram pozitivne i gram negativne bakterije (Basile i sur., 2009.), tako i na plijesni (Radulović i sur., 2006.).

Primjerice, angelicinu izoliranom iz *Diplotaenie damavandice* ili ostolu iz sušenog ploda *Cnidium monnieria,* dokazano je antifungalno djelovanje na nizu fitopatogenih plijesni (*Alternaria alternata*, *Botrytis cinerea*, *Colletotrichum musae*, *Fusarium graminearum*, *Phytophora capsici*, *Sclerotinia sclerotiorum*) (Sardari i sur., 1999.; Shi i sur., 2008.).

Kumarine karakterizira i prisutnost stiril karbonilne skupine koja se pokazala kao važan čimbenik u hvatanju reaktivnih kisikovih vrsta, pa tako kumarini mogu doprinijeti smanjenju oksidativnog oštećenja uzrokovanog slobodnim radikalima (Fylaktakidou i sur., 2004.). Autooksidacija lipida je lančana reakcija, a slobodni radikali nastali oksidacijom lipida

narušavaju kvalitetu namirnica promjenom okusa, teksture, boje i nutritivne vrijednosti tijekom prerade i skladištenja (Yeo i sur., 2010.).

Primjenom antioksidacijskih sredstava bi se također moglo posredno utjecati na biosintezu mikotoksina, jer je utvrđeno da povećane razine ROS-ova mogu potaknuti njihovu produkciju (Reverberi i sur., 2010.).

Prema dosadašnjim istraživanjima vrlo je česta pojava rezistentnosti patogena na različita, već postojeća, antimikrobna sredstva (Radulović i sur., 2006.), a zbog brze prilagodljivosti fungalnih patogena i razvijanja otpornosti prema konvencionalnim sredstvima, potreba za razvojem novih, učinkovitijih antifungalnih sredstava je velika (Soltani i sur., 2009.).

Modifikacijama već postojećih kemijskih struktura moguće je sintetizirati spojeve s poboljšanom aktivnošću i smanjenom toksičnošću, koji se mogu koristiti kao antifungalna sredstva ili u proučavanju povezanosti strukture i bioloških svojstava antifungalnih sredstava u potrazi za novim spojevima sa sličnom ili poboljšanom aktivnošću.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. KEMIJA I IZVORI KUMARINA

2.1.1. Kumarin

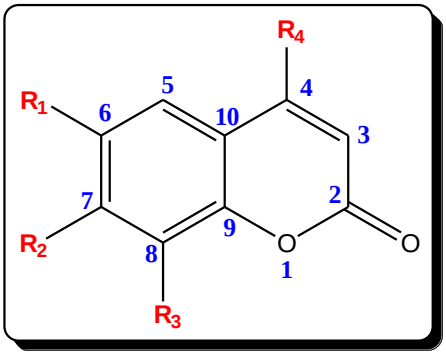
Proučavanje kumarina započelo je prije 200 godina, a prvi puta kumarin je izoliran iz biljke *Coumarouna odorata Aube (Dipteryx odorata)* 1820. g., po kojoj je i dobio ime (kumarú je naziv za drvo na jeziku južnoameričkih indijanaca iz Francuske Gvajane) (Ojala, 2001.). Inače se, umjesto sistematske nomenklature, naziv kumarin danas primjenjuje na sve derivate koji imaju benzo-*α*-piron u svojoj strukturi, a trivijalnim imenima se dodaju sufiksi ili prefiksi ovisno o vrsti supstituenata i njihovom položaju na kumarinskoj jezgri (Borges i sur., 2005).

Kumarin je kemijski spoj koji se nalazi u mnogim biljakama, osobito u tonka sjemenkama, lazarkinji i bizonskoj travi (Liu i sur., 2010.), kao i u gospinoj travi, jagodama, marelicama, višnji, cimetu, slatkoj djetelini (Aslam i sur., 2010.). Kumarin je poznat po ugodnom mirisu na vaniliju, koji neki autori karakteriziraju i kao miris na svježe pokošeno sijeno (Liu i sur., 2010.). Na sobnoj je temperaturi kumarin bijela kristalna tvar s točkom tališta 68 - 71 °C (Rodrigues i sur., 2008.), topiva u etanolu, kloroformu, dietileteru i uljima, slabo topiva u vodi (Lake, 1999.).

Kumarini pripadaju skupini spojeva koji se nazivaju benzopironi, a sastoje se od benzenskog prstena kondenziranog s pironskim prstenom, dok se u prirodi nalaze i u kombinaciji s glikozidima.

Kumarini se mogu se podijeliti u sljedeće kategorije (Ojala, 2010.):

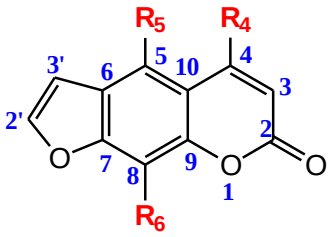
- ***Jednostavni kumarini*** – hidroksilirani, alkoksilirani i alkilirani derivati kumarina, kao i njihovi glikozidi (**Slika 1**).

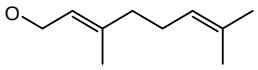


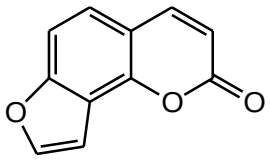
Slika 1 I) **Herniarin** R_1,R_3,R_4 = H, R_2 = OCH_3; II) **Eskuletin** R_1,R_2 = OH, R_3,R_4 = H; III) **Eskulin** R_1 = 6-glukozid, R_2 = OH, R_3,R_4 = H; IV) **Skopoletin** R_1 = OCH_3, R_2 = OH, R_3, R_4 = H; V) **Izoskopoletin** R_1 = OH, R_2 = OCH_3, R_3, R_4 = H; VI) **Umbeliferon** R_1, R_3, R_4= H, R_2 = OH; VII) **8-OAc-6-hidroksi-7-metoksi-4-**

metilokumarin R_1= OH, R_2 = OCH_3, R_3 = $OOCH_3$, R_4 = CH_3 (Zolek i sur., 2003)

- ***Furanokumarini (furokumarini)*** – prekursor im je umbeliferon (Berenbaum, 1983.), a sastoje se od peteročlanog furanskog prstena na kumarinskoj jezgri. Dijele se na *linearne* (furanski prsten u položaju 6 i 7) i *angularne* (furanski prsten u položaju 7 i 8), s različitim supstitutentima. Linearni furanokumarini su toksičniji za polifagne kukce nego njihovi hidrokumarinski prekursori, jer dvostruka veza u furanskom prstenu omogućava inaktivaciju DNA ultraljubičastim svjetlom, što nije slučaj kod angularnih furanokumarina (Berenbaum, 1983.).

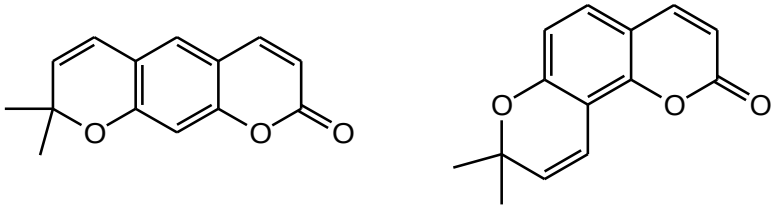


Slika 2 IX) **Bergapten** R_5 = OCH_3, R_6 = H; X) **Ksantotoksin** R_5 = H, R_6 =OCH_3; XI) **Bergamotin** R_5 = H, R_6 = 



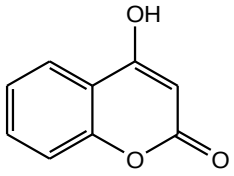
Slika 3 Angelicin

- ***Piranokumarini*** – analozi furanokumarina, ali sadrže šesteročlani prsten.



Slika 4 Ksantiletin i seselin

- ***Kumarini supstituirani na pironskom prstenu***



Slika 5 4-Hidroksikumarin

S obzirom da na kumarinskom prstenu postoji 6 položaja na kojima se može vršiti supstitucija, poznato je mnoštvo različitih derivata kumarina, bilo sintetskih ili prirodnih, a takva strukturna raznolikost uzrok je mnoštvu različitih bioloških aktivnosti. Prisutnost kumarinskih derivata u biljkama je vrlo česta, a mnoge od tih biljaka se upotrebljavaju u tradicionalnoj medicini od davnina (Ćavar i sur., 2009.; Mata i sur. 1987.; 1988.).

Biljke imaju sposobnost sinteze i akumulacije velikog broja primarnih i sekundarnih metabolita koje same koriste kao zaštitu protiv stresa iz okoliša. Upravo ti spojevi čine biljke korisnima za ljudsku upotrebu, kao začini, medicinski pripravci, itd. (Ojala, 2001.). Kumarini se u većoj količini nalaze u nekim esencijalnim uljima, osobito ulju cimeta (7 000 ppm), ulju lista kineskog cimeta (kasije) (do 87 300 ppm) i lavandinom ulju, a također i u biljkama kao što je cikorija (Lacy i O'Kennedy, 2004.). Kumarini se u prirodi nalaze kao slobodni ili u obliku heterozida u mnogim dikotiledonskim obiteljima, uključujući *Apiaceae* (*Ammi majus*), *Asteraceae* (*Trilisa odoratissima*), *Fabiaceae* (*Melilotus officinalis*), *Rosaceae* (*Prunus mahaleb* L.), *Rubiaceae* (*Asperula odorata*) i *Solanaceae* (*Atropa belladonna*) (Wienmann, 1997.), a najviše u biljkama porodice *Rutaceae* i *Umbelliferae* (Lacy i O'Kennedy, 2004.). Mnoge monokotiledonske biljke, osobito *Gramineae* i orhideje, također sadrže veće količine kumarina. Iako su raspodjeljeni u svim dijelovima biljke, u najvećoj količini se pojavljuju u plodovima, a u manjim u korijenju, stabljikama i lišću. Prisutnost u pojedinim dijelovima biljke ovisi i o okolnim uvjetima u kojima biljka raste (Lacy i O'Kennedy, 2004.), kao što su određene sezonske promjene i vremenski uvjeti (Weinmann, 1997.). Distribucija biološki aktivnih kumarina u korelaciji je s njihovom sposobnošću da djeluju kao fitoaleksini tj. oni se sintetiziraju kao odgovor na traumatsko oštećenje, kada biljka vene, tijekom bolesti ili sušenja. Uglavnom se akumuliraju na površini lišća, plodova ili sjemenja i inhibiraju rast i

sporulaciju fungalnih patogena i djeluju odbijajuće za insekte i druge kopnene beskralježnjake (Weinmann, 1997.).

Kumarini se često karakteriziraju kao obrambeni mehanizam biljaka od određenih patogenih plijesni (Razavi, 2011.; Kai i sur., 2006.) i mnoštvo je primjera koji opisuju biosintezu kumarina u biljkama kad se one nađu u nepovoljnim uvjetima. Kao primjer može se navesti biosinteza umbeliferona, skopoletina i skopolina u tkivu slatkog krumpira prilikom napada plijesni *Fusarium oxysporum* na korijen, kao i biosinteza raznih furanokumarina kod celera i pastrnjaka prilikom inokulacije korijena s plijesni *S. sclerotiorum* (Razavi, 2011.). Biosinteza furanokumarina u biljkama se smatra obrambenim mehanizmom biljaka i oni su tipični fitoaleksini, (foto)toksični za mnoštvo organizama, uključujući bakterije, plijesni, insekte i sisavce (Stanjek i Boland, 1998.; Deng i Nicholson, 2003.). Biosintezu furanokumarina mogu inducirati insekti biljojedi, infekcija patogenima, stres izazvan svjetlošću, čak i metil jasmonat koji se prenosi zrakom (Stanjek i Boland, 1998.).

Kod suncokreta se sinteza kumarina također inducira kao odgovor na stresne situacije, biotičke i abiotičke, kao i odgovor na manjak nutrijenata, ksenobiozu, agrokemikalije i biljne metabolite. Sadržaj kumarina u suncokretu koji raste u optimalnim uvjetima je vrlo nizak. Zato se njihova prisutnost smatra dobrim pokazateljem stresnih situacija i takvi se spojevi mogu u većini slučajeva definirati kao metaboliti stresa. Njihova sinteza i akumulacija u stanicama ili izlučivanje u okolni medij štiti biljku na način da sprječava germinaciju fungalnih spora, korova ili sjemena parazitskih biljaka (prva linija obrane), inhibira razvoj infektivnih struktura (plijesni, parazitski korov) ili sprječava invaziju na tkivo biljke (druga linija obrane) i na taj način lokalizira i sprječava širenje parazita. U slučaju insekata kumarini mogu štetno djelovati nakon ulaska u probavni sustav (Prats-Perez i sur., 2000.).

Hidroksikumarini su također fitoaleksini i vrlo često se javljaju kao sekundarni metaboliti u biljnom svijetu (*Rutaceae*, *Solanaceae, Apiaceae*). Također se akumuliraju u biljkama pod utjecajem mehaničkog oštećenja, oštećenja izazvanog insektima, fungalnom i bakterijskom infekcijom. Hidroksikumarini pokazuju različite biološke aktivnosti i doprinose očuvanju biljke, sudjelujući u procesu obrane od fitopatogena, odgovoru na abiotički stres, regulaciji oksidativnog stresa i vrlo vjerojatno hormonskoj regulaciji (Blagbrough i sur., 2010.). Kumarini inhibiraju regulatore rasta, indol octenu kiselinu, citokinin i gibereline,

prilikom regulacije rasta biljke. Skopoletin kao fitoaleksin se inducira mnogim plijesnima u listovima *Hevea brasiliensis* (*Euphorbiaceae*) i pokazuje antifungalno djelovanje (Blagbrough i sur., 2010.). Hidroksikumarini pokazuju i biocidna svojstva i imaju ulogu fitoaleksina i inhibitora klijavosti (germinacije) kod mnogih biljnih vrsta (Berenbaum, 1983.).

Kod nekih biljaka, kao divlja zob, kumarini se iz korijena otpuštaju u tlo, gdje predstavljaju obranu od određenih štetnih mikroorganizama. Isto su tako aktivni u metabolizmu biljaka sudjelujući u regualciji rasta (Wienmann, 1997.).

Kumarin je potentni rodenticid, štakori i drugi glodavci ga metaboliziraju do 3,4-kumarin epoksida, koji je toksičan i izaziva unutarnje krvarenje i uginuće. Ljudski organizam ga metabolizira do 7-hidroksikumarina koji je manje toksičan (Raters i Matissek, 2008.).

Iako je većina kumarina izolirana iz viših biljaka, neki su kumarini nađeni i u mikroorganizmima, kao novobiocin, kumermicin iz bakterija roda *Streptomyces*, aflatoksini iz *Aspergillus* vrsta. Kumarinski antibiotici kao novobiocin, kumermicin A1 i klorobiocin su potentni inhibitori DNA giraze (Lacy i O'Kennedy, 2004.).

Veliki broj kumarina je izoliran iz različitih citrusa (Ito i sur., 1988.; 1989.a; 1989.b; 1990.; 1991.; 1993.a; 1993.b; Ju-Ichi i sur., 1991.; Takemura i sur., 1993.a; 1993.b; 1993.c), lišća biljke *Calophyllum brasiliense* i kore ploda *Mammea americana* (Reyes-Chilpa i sur., 2008.), dok su derivati dimernih kumarina (febalin, tamnozin, todazin) izolirani iz *Rutaceaea*, a triskumarini iz *Daphne mezereum* i *Daphne oleoides* (Borges i sur., 2005.). Skopoletin je prisutan u mnogim jestivim biljkama i voću, kao zobi (*Avena sativa*), poriluku (*Allium ampeloprasum*), celeru (*Apium graveolens*), paprici (*Capsicum annuum*), feferonima (*Capsicum frutescens*), mrkvi (*Daucus carota*), radiću (*Cichorium intybus*), limunu (*Citrus limon*), grejpfrutu (*C. paradisi*), što ukazuje na njegovu nisku toksičnost i garantira njegovu sigurnu uporabu kao antifungalnog sredstva ili sinergista u kombinaciji sa sintetskim ili prirodnim tvarima, kao što je vanilin (Carpinella i sur., 2005.). Skopoletin se nalazi i u plijesnima, kao i u mnogim biljnim vrstama žitarica, *Compositaea*, leguminoza i *Solanaceaea*, dok je ajapin pronađen samo u nekim vrstama roda *Compositae* (suncokret (*Helianthus annuus*)), *Eupatorium ayapana* Vent. i *Alomia fastigiata* Benth. Prisutnost ajapina se također povezuje s otpornošću biljaka (duhan i suncokret) na mikrobne patogene (Cabello-Hurtado i sur., 1998.).

Prema istraživanjima Razavija (2011.), određene biljke roda *Rutaceae* i *Apiaceae* pokazuju fitotoksično djelovanje, a pretpostavlja se da je to zahvaljujući prisutnosti kumarina u tim biljkama. Naime, dokazano je da imperatorin smanjuje rast korijena i izdanka zelene salate u određenim koncentracijama, dok 7-preniloksikumarin i aurapten u potpunosti zaustavljaju klijanje zrna, kao i rast korijena i izdanka kod zelene salate. Osim ovih kumarina, fitotoksičnu aktivnost pokazuju i aviprin, ksantiletin i umbeliferon (Razavi, 2011.).

Fraxinus vrste se vrlo često koriste kao protuupalni lijek, kao npr. *Cortex fraxini* čija je upotreba kao tradicionalnog antiupalnog pripravka vrlo raširena na Tajvanu. Smatra se da svoja antiupalna svojstva duguje upravo prisutnosti fenolnih kiselina i kumarina, kao što su eskulin, eskuletin, fraksin i fraksetin (Wu i sur., 2007.), koji su prisutni i u biljci *Fraxius chinensis* (*Oleaceae*), koja također pokazuje značajna protuupalna svojstva (Lee i sur., 2007.).

Biljka *Ayapana*, koja se u biljnoj medicini često koristi kao antitumorski pripravak, je također bogat izvor prirodnih kumarina, a valja izdvojiti ajapin i ajapanin, koji su prvi puta otkriveni 1930-ih godina te herniarin (7-metoksikumarin). Potonji i njegovi derivati su se pokazali toksičnim za stanice tumora, pa čak i kod tumora koji su rezistentni na mnoštvo lijekova (Kawase i sur., 2005.; Watanabe i sur., 2005.).

Kumarin se koristi kao sredstvo za fiksiranje i pojačavanje u parfemima i dodaje se sapunu i detergentima, pasti za zube, duhanskim proizvodima i nekim alkoholnim pićima (Lake, 1999.), koristi se kao zaslađivač, pojačivač prirodnih ulja kao kod lavande, dodatak hrani u kombinaciji s vanilinom (Tyagi i sur., 2005.). Velike količine se koriste kao dodaci gumi i plastičnim materijalima, kao i u bojama i sprejevima za neutralizaciju neugodnih mirisa (Lake, 1999.).

Sadržaj kumarina u kozmetičkim proizvodima reguliran je zakonom EU (European Commission, 1976.), koji zahtijeva označavanje na proizvodima ukoliko je kumarin prisutan u količini većoj od 10 ppm u proizvodima koji se zadržavaju na koži i 100 ppm u proizvodima koji se ispiru s kože. Kumarin se koristi kao aditiv u parfemima i mirisnim proizvodima u koncentracijama od 0,5% do 6,4% i manje od 0,01% u detergentima (European Commission, 2006.).

Kumarin često nalazimo u duhanskim proizvodima i umjetnim nadomjescima za vaniliju, iako je u mnogim zemljama zabranjen kao dodatak hrani od sredine 20-og stoljeća,

jer je umjereno toksičan za jetru i bubrege (LD_{50} = 275 mg/kg). Kumarin je zabranjen kao dodatak hrani 1978. g. u SAD-u i kao dodatak cigaretama 1997. g., ali se još koristi kao dodatak u duhanu za lule (Raters i Matissek, 2008.). Iako je zabranjen kao dodatak hrani, dozvoljena je upotreba aditiva koji ga sadrže, ali samo alkoholnim pićima (Maiwein-vino s lazarkinjom; Zubrowka (votka s dodatkom bizonske trave)) (Raters i Matissek, 2008.). Maksimalno dopuštena količina kumarina u hrani i nealkoholnim pićima u Hrvatskoj propisana je Pravilnikom o aromama (Ministarstvo zdravstva i socijalne skrbi RH, 2010.), koji je usklađen s novom uredbom Europskog vijeća 1334/2008 (European Commission, 2008.), i iznosi 5 mg/kg za deserte, 15 mg/kg za fine pekarske proizvode (osim tradicionalnih pekarskih proizvoda s cimetom, koji je naveden na deklaraciji), 20 mg/kg za žitarice za doručak, uključujući muesle, i 50 mg/kg za tradicionalne pekarske proizvode s cimetom, koji je naveden na deklaraciji. Do usklađivanja s novom uredbom Europskog vijeća 1334/2008, u Hrvatskoj su propisi dopuštali razinu kumarina u hrani do 2 mg/kg s izuzetkom alkoholnih pića i karamela (do 10 mg/kg) te guma za žvakanje (50 mg/kg). Novom Uredbom ove su vrijednosti višestruko povećane pa se za većinu namirnica kreću između 5 i 20 mg/kg do čak 50 mg/kg za novouvedenu kategoriju tradicionalnih pekarskih proizvoda s cimetom, koji je naveden na deklaraciji. Većina proizvoda koji nisu odgovarali u pogledu udjela kumarina odredbama Pravilnika o aromama, udovoljava novim zahtjevima (Papić, 2009.)

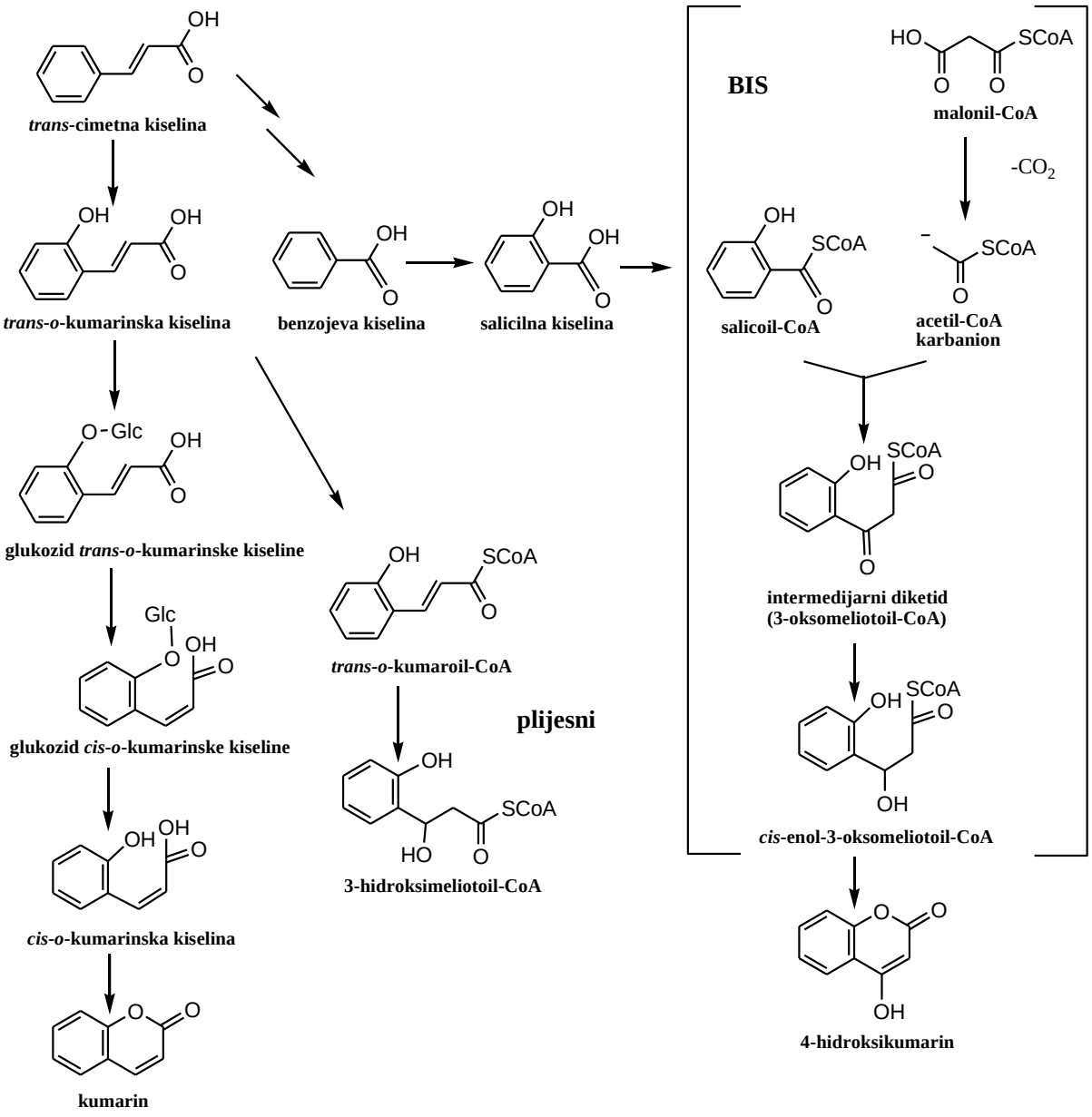
Za analizu kumarina u cimetu i namirnicama koje sadrže cimet razvijene su mnoge metode kao npr. tankoslojna kromatografija, GC-MS, HPLC-UV i LC-MS, ali su se neke metode pokazale neprikladnima za određivanje kumarina u hrani, kao npr. tekućinska kromatografija/UV, jer nisu dovoljno osjetljive da bi se njima dokazala prisutnost kumarina u koncentracijama manjim od 2 mg/kg (Raters i Matissek, 2008.).

2.1.2. Biosinteza kumarina

Biosinteza kumarina je specifična za pojedino tkivo biljaka i regulira se tijekom razvoja. Inducira se kao odgovor na mnoštvo biotičkih i abiotičkih stresova, nedostatak nutrijenata i kemijske signale kao što su biljni hormoni i metaboliti, kao i ksenobiotici (Cabello-Hurtado i sur., 1998.).

Kumarin se sintetizira u biljkama kada dođe do oštećenja biljnih stanica ili tkiva i često nije prisutan u neoštećenom tkivu biljaka. Njegov je prekursor melilotozid, glukozid *trans*-2-kumarinske kiseline, koji se akumulira u vakuolama i podliježe ili fotokemijskoj ili enzimskoj *trans*/*cis* izomerizaciji. Kada dođe do staničnog oštećenja *cis*-glikozid se oslobađa aktivnošću ekstravakuolarne *β*-glukozidaze i slobodna *cis*-2-kumarinska kiselina spontano laktonizira, pri čemu nastaje kumarin (**Slika 6**). Kada se u proces uključi *trans*-2,4-dihidroksicimetna kiselina dolazi do formacije 7-hidroksikumarina (umbeliferona) (**Slika 7**). *Para*-hidroksilacija cimetne kiseline prethodi reakciji *orto*-hidroksilacije. Direktna ciklizacija 4-kumarinske kiseline putem spirodienona ili kinolnih intermedijera se može uzeti u obzir kao alternativni mehanizam. Nastajanje nešto kompleksnijih struktura, kao kod furanokumarina i piranokumarina, odvija se putem regiospecifičnog vezivanja prenilne strane lanca na fenolnu skupinu umbeliferona. Dimetilalilna skupina zatim ciklizira s fenolnom skupinom i nastaje ili peteročlani furanski ili šesteročlani piranski heterocikl (Liu i sur., 2010.).

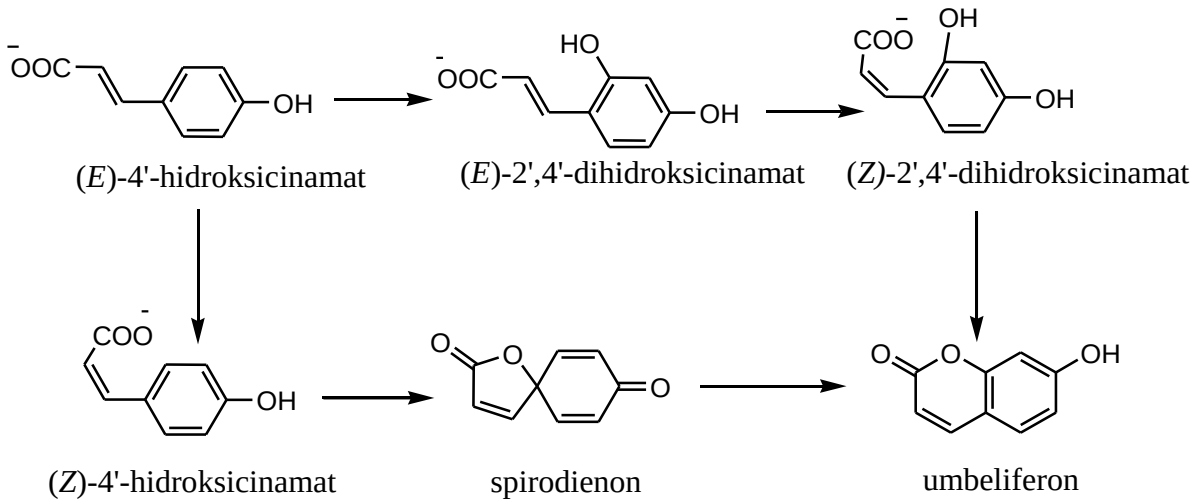
Derivat kumarina, 4-hidroksikumarin često nastaje u metaboličkom procesu mikroorganizama (**Slika 6**). Naime, kada sijeno, nastalo iz biljaka koje sadrže melilotozid ((*E*)-3-[2-(*β*-*D*-glukopiranoziloksi)fenil]-2-propen kiselina), poput djeteline (*Melilotus albus*; *Fabaceae*), fermentira, *trans*-2-kumarinska kiselina se pomoću plijesni kao *Penicillium* ili *Aspergillus* vrste, pretvara u 4-hidroksikumarin. Plijesni ne prevode kumarin u 4-hidroksikumarin. *Trans*-2-kumarinska kiselina se hidrira i nastaje 3-hidroksimelilotna kiselina, koja podliježe dehidrogenaciji i nastaje 3-oksomelilotna kiselina. Ove kiseline su prisutne kao CoA esteri. *Cis*-enol konfiguracija 3-oksomelilotne kiseline podliježe spontanoj laktonizaciji i daje 4-hidroksikumarin. Dvije molekule ovog spoja neenzimski reagiraju s formaldehidom koji je prisutan u silaži, a potječe od mikrobnih degradativnih procesa, i nastaje dikumarol. Dikumarol je poznati antikoagulans i može uzrokovati uginuće stoke unutranjim krvarenjem (Liu i sur., 2010.).



Slika 6 Predložena shema biosinteze kumarina i 4-hidroksikumarina (Liu i sur., 2010)

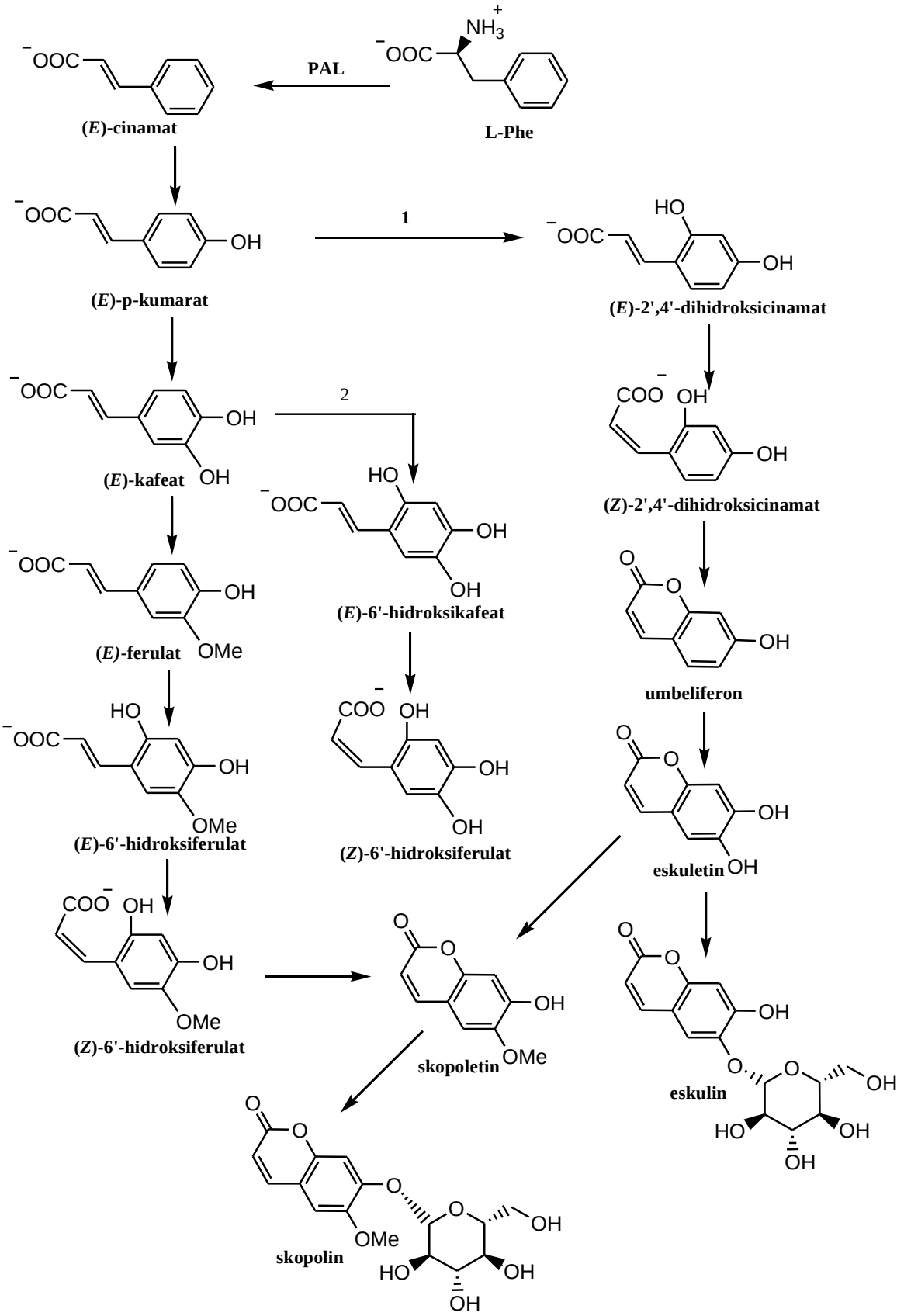
Kumarin nastaje prilikom staničnog oštećenja. 4-Hidroksikumarin nastaje djelovanjem plijesni, a može se sintetizirati i djelovanjem bifenil sintaze (BIS).

Za reakciju ciklizacije 4ʹ-hidroksicimetne kiseline predložene se dvije rute. Oksidativna ciklizacija preko spirodienonskog intermedijera rezultira nastankom umbeliferona, gdje laktonski eterski kisik potječe od karboksilne skupine (**Slika 7**) (Bayoumi i sur., 2008.).



Slika 7 Predloženi put konverzije 4-hidroksicinamata u umbeliferon (Bayoumi i sur., 2008.)

Prema dosadašnjim istraživanjima predložena su tri puta biosinteze skopoletina, preko 2',4'-dihidroksicinamata, 2',4',5'-trihidroksicinamata (6'-hidroksikafeata) ili 4'-hidroksi-3'-metoksicinamata (ferulata) (**Slika 8**). Osnovni put biosinteze skopoletina i skopolina u korijenu kasave tijekom fiziološke degradacije nakon branja odvija se preko *p*-kumarinske kiseline, kava kiseline i zatim feruličnе kiseline, koje se sve *o*-hidroksiliraju, izomeriziraju i laktoniziraju u skopoletin i zatim glukoziliraju do skopolina (Bayoumi i sur., 2008.).



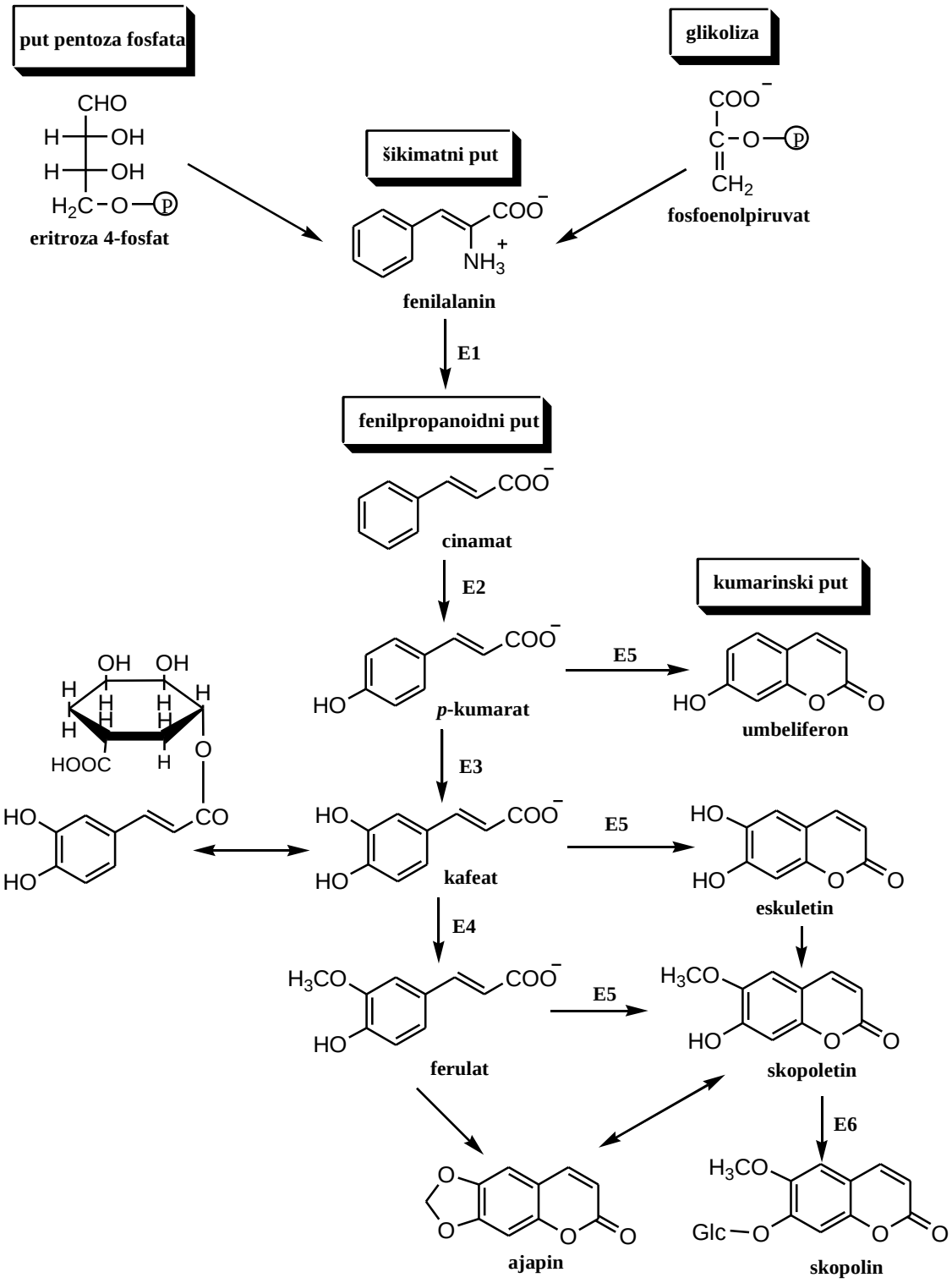
Slika 8 Tri predložena biosintetska puta dobivanja skopoletina (Bayoumi i sur., 2008.)

Radi jednostavnosti karboksilat anion je izostavljen nakon (*E*)-cinamata; PAL – fenilalanin amonijeva lijaza.

Derivati kumarina koji se vrlo često javljaju u prirodi su umbeliferon (7-hidroksikumarin), eskuletin (6,7-dihidroksikumarin), herniarin (7-metoksikumarin), psoralen i imperatorin. Inače se kumarin i njegovi derivati ubrajaju u skupinu fenilpropanoida. Poput ostalih fenilpropanoida, kumarini nastaju iz metabolizma fenilalanina preko cimetne kiseline ili *p*-kumarinske kiseline. Specifičnost procesa leži u 2'-hidroksilaciji, poslije koje dolazi fotokatalizirana izomerizacija dvostruke veze i zatim spontana laktonizacija. U rijetkim slučajevima, dolazi do glukozilacije cimetne kiseline, koja prethodi laktonizaciji. U tim slučajevima, kumarin nastaje nakon ozljede tkiva i enzimske hidrolize. Nastanak di i trihidroksikumarina i njihovih etera uključuje hidroksilaciju umbeliferona, prije nego laktonizaciju odgovarajuće cimetne kiseline. Prenilacija benzenskog prstena dimetilalil pirofosfatom u položaju 6 molekule 7-hidroksikumarina daje tzv. linearne furanokumarine i piranokumarine, dok u položaju 8 daje angularne homologe. Formacija furanokumarina uključuje dva sukcesivna koraka: stereospecifičnu oksidaciju u položaju 4' i eliminaciju hidroksiizopropil ostatka u položaju 5' retroaldolnom kondenzacijom. Supstitucija u položaju 5' i/ili 8' furanokumarina se događa kasnije i katalizirana je oksidazama i *O*-metiltransferazama (Ojala, 2001.).

Kumarini koji sadrže supstituent s kisikom u položaju 7 (kao npr. umbeliferon) se razlikuju od onih koji tu skupinu nemaju po tome što im je prekursor *p*-kumarinska kiselina, dok je za kumarin prekursor nesupstituirana *cis*-cimetna kiselina (Berenbaum, 1983.).

Kumarini se mogu sintetizirati *de novo* iz fenilalanina ili iz fenola, kao u slučaju suncokreta iz klorogenske kiseline. Točan put nastanka kumarina iz specifičnih cimetnih kiselina (kumarata, kafeata ili ferulata) je gotovo nepoznat, iako je kao ključni korak predloženo enzimsko djelovanje cinamat-2-hidroksilaze (**Slika 9**) (Prats-Perez i sur., 2000.).



Slika 9 Predloženi put sinteze nekih kumarina u biljkama (Prats-Perez i sur., 2000.)

E1 – fenilalanin amonij liaza; E2 – cinamat 4-hidroksilaza; E3 – 4-kumarat-3-hidroksilaza; E4 – *O*-metiltransferaza; E5 – cinamat 2-hidroksilaza; E6 – glikozil transferaza

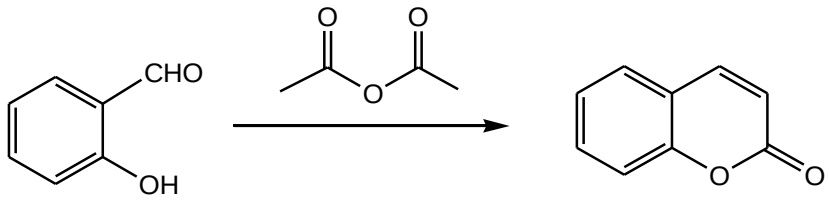
Kumarini se u biljkama većinom sintetiziraju u nadzemnim dijelovima (list) odakle se mogu prenijeti do korijena. Mogu se akumulirati unutarstanično (skopolin), inkorporirati u staničnu stijenku (skopolin u reakciji kataliziranoj skopoletin peroksidazom) ili izlučivati (ajapin). Kapacitet sinteze kumarina među biljnim vrstama je različit, što bi moglo objasniti i njihovu različitu otpornost na biotički stres (Prats-Perez i sur., 2000.).

2.1.3. Kemijska sinteza kumarina

Kumarini se iz biljaka mogu dobiti ekstrakcijom različitim metodama, međutim ekstrakcija je često dugotrajna i potrebna je sofisticirana oprema da bi se dobio čisti spoj. Kao alternativna metoda nameće se sinteza derivata kumarina (Ćavar i sur., 2009.), koja je postala još popularnija zbog raznolike biološke aktivnosti kumarina i njegovih derivata. Povijest sinteze kumarina seže do sredine 19. st. kada je Perkin prvi puta sintetizirao kumarin, a reakcija i danas nosi njegovo ime.

Kumarini se mogu sintetizirati Perkinovom, Pechmannovom ili Knoevenagelovom reakcijom, kao i Wittigovom, Kostanecki-Robinsonovom i Reformatsky reakcijom (Borges i sur., 2005.).

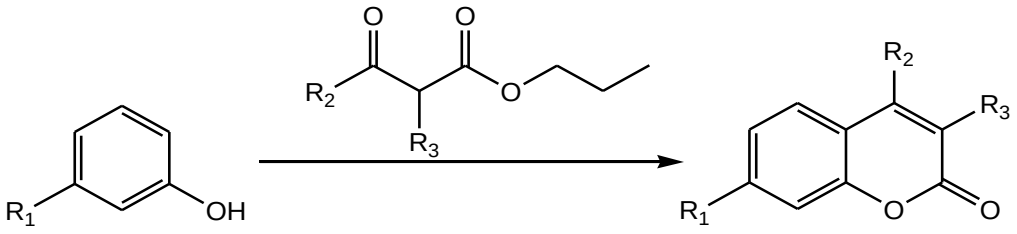
Perkinova reakcija podrazumijeva sintezu kumarina aldolnom kondenzacijom aromatskog *o*-hidroksibenzaldehida i anhidrida kiselina u prisutnosti alkalne soli ili kiseline (**Slika 10**) (Borges i sur., 2005.).



Slika 10 Perkinova kondenzacija

Jedna od metoda sinteze kumarina je i Pechmannova kondenzacija (**Slika 11**), gdje se kumarin dobije kondenzacijom fenola s β-ketoesterima u prisutnosti kiselog katalizatora.

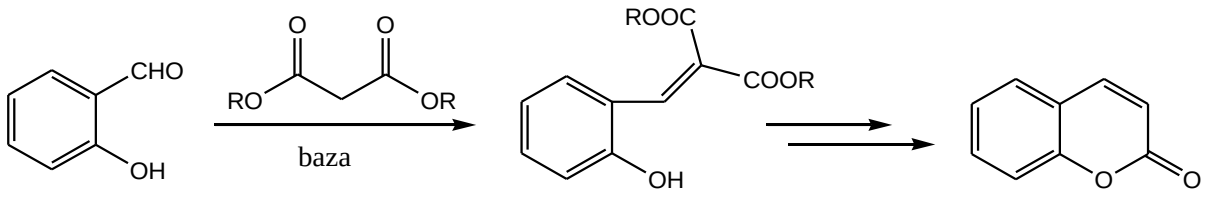
Kada se za sintezu koriste esteri acetooctene kiselina i njezini derivati, reakcija se naziva Pechmann-Duisberg kondenzacija (Borges i sur., 2005.).



Slika 11 Pechmannova kondenzacija

Perkinova i Pechmannova kondenzacija su dva najčešća načina sinteze kumarina, ali su njihovi glavni nedostaci upotreba suviška anhidrida octene kiselina, acil klorida, visoke temperature i upotreba jakih kiselina, a mnoge funkcionalne skupine ne mogu podnijeti takve rigorozne uvjete (Roussaki i sur., 2010.).

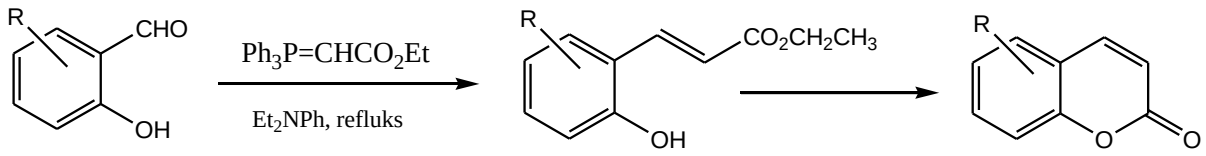
Kondenzacija aldehida s aktivnim metilenskim spojevima u prisutnosti amonijaka ili amina se naziva Knoevenagelova kondenzacija (**Slika 12**). Obično je katalizirana slabim bazama ili određenom kombinacijom amina i karboksilnih ili Lewisovih kiselina u homogenim uvjetima. Nadalje, kada se u reakciji koriste malonska kiselina i piridin, sa ili bez tragova piperidina, reakcija se naziva Doebnerova modifikacija (Borges i sur., 2005.).



Slika 12 Knoevenagelova kondenzacija

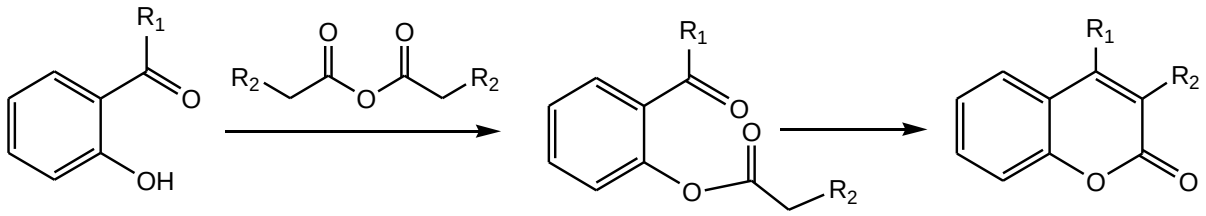
U Wittigovoj reakciji dolazi do formacije alkena iz karbonilnih spojeva i fosfonijevih ilida, preko betaina i/ili intermedijera oksafosfetana (**Slika 13**). Kada se ilid zamijeni s fosfino

oksid karbanionom ili fosfonat karbanionom, reakcija se naziva Hornerova ili Horner-Emmons-Wadsworthova (Borges i sur., 2005.).



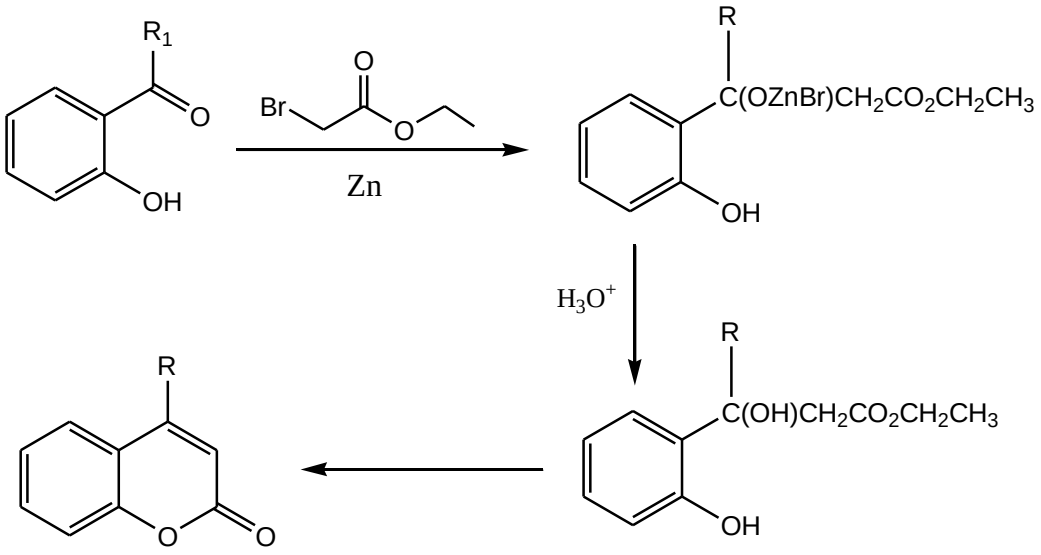
Slika 13 Wittigova reakcija

U Kostanecki-Robinsonovoj reakciji kumarini, najčešće 3- i 4- supstituirani kumarini, nastaju u reakciji acilacije *o*-hidroksiaril ketona s anhidridima alifatskih kiselina, nakon čega slijedi ciklizacija (**Slika 14**) (Borges i sur., 2005.).



Slika 14 Kostanecki-Robinsonova reakcija

Kondenzacijom aldehida ili ketona s organocinkovim derivatima *α*-haloestera nastaju *β*-hidroksiesteri, a reakcija se naziva Reformatskyjeva reakcija. U određenim uvjetima može doći do laktonizacije i nastanka kumarina (**Slika 15**).



Slika 15 Reformatskyjeva reakcija

2.1.4. Metabolizam i farmakologija kumarina

Kumarini pokazuju mnoštvo bioloških aktivnosti, uključujući antikoagulacijsku, estrogenu, dermalno fotosenzitirajuću, antimikrobnu, vazodilatacijsku, moluskicidnu (ubijanje mekušaca) aktivnost, djeluju kao antihelmintici (paraziti, crvi (helminti) u živim organizmima, najčešće probavnom sustavu), sedativi i hipnotici, a pokazuju i analgetsko i hipotermičko djelovanje. Neke vrste biološkog djelovanja kumarina navedene su u **Tablici 1** (Ojala, 2001.). Najviše se ističu određeni aflatoksini koji pokazuju značajnu hepatotoksičnost i karcinogenost, dikumarol s antikoagulacijskim djelovanjem i novobiocin i kumermicin A s antibiotičkom aktivnošću (Sardari i sur., 2000.).

Od 1954. g. kumarin je od strane FDA (Food and Drug Administration - Uprava za hranu i lijekove) klasificiran kao toksična supstanca, koja je potencijalni promotor tumora jetre u štakora i njegova upotreba je zabranjena. Prema istraživanjima provedenima na štakorima NIOSH (National Institute for Occupational Safety and Health - Nacionalni institut za zaštitu na radu) je kumarin proglasio kemijskim karcinogenom (Lacy i O'Kennedy, 2004.).

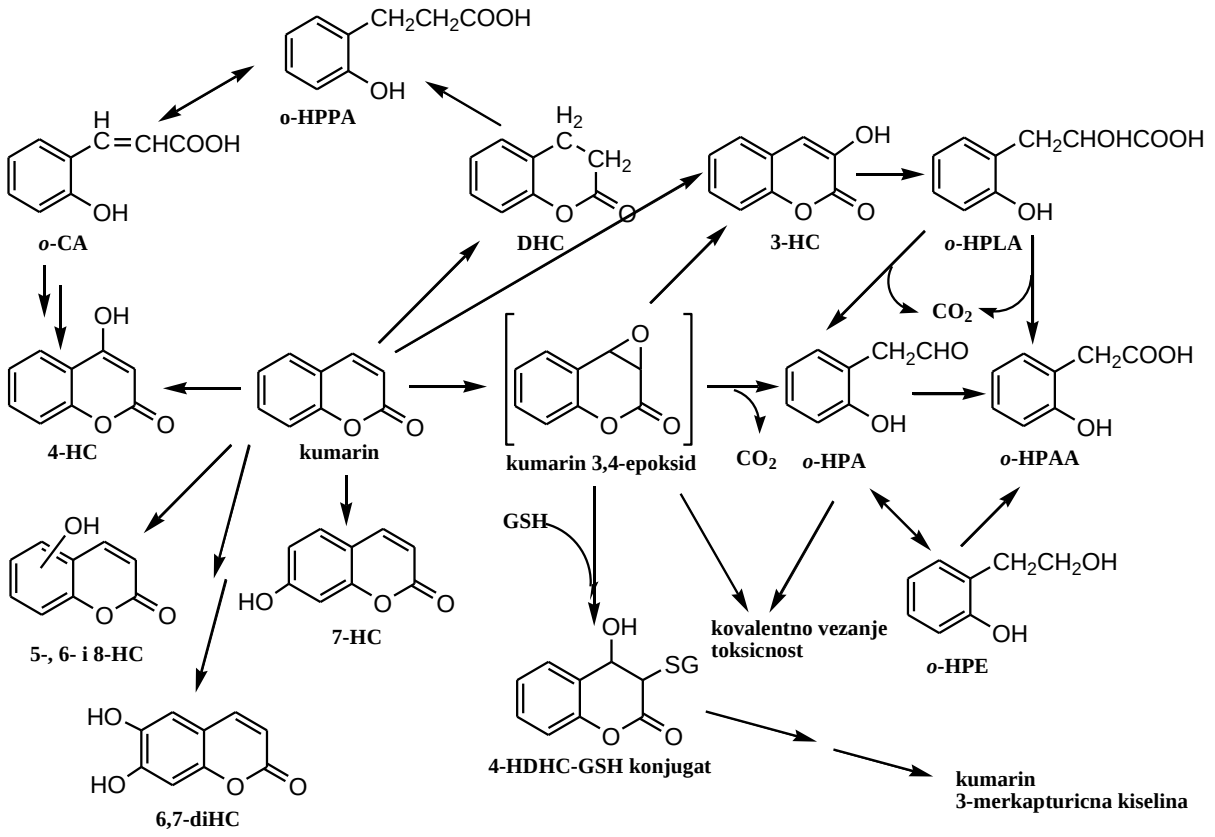
Istraživanje metabolizma kumarina uključuje mnoge studije *in vivo* i *in vitro*, kao i mnoge životinjske vrste, uključujući čovjeka. Kumarin se može metabolizirati hidroksilacijom na svih šest dostupnih položaja (3, 4, 5, 6, 7, 8) i pritom dati 3-, 4-, 5-, 6-, 7- i 8-hidroksikumarine, kao i otvaranjem laktonskog prstena pri čemu nastaju različiti produkti,

kao *o*-hidroksifenilacetaldehid (*o*-HPA), *o*-hidroksifeniletanol (*o*-HPE), o-hidroksifeniloctena kiselina (*o*-HPAA) i *o*-hidroksifenilmliječna kiselina (*o*-HPLA) (Lake, 1999.). Dodatni metaboliti koji mogu nastati su 6,7-dihidroksikumarin, *o*-kumarinska kiselina, *o*-hidroksifenilpropionska kiselina i dihidrokumarin (**Slika 16**). Dva važna puta metabolizma kumarina su 7-hidroksilacija i metabolizam laktonskog prstena, koji uključuje otvaranje prstena i otpuštanje ugljikovog atoma 2, pri čemu nastaje ugljikov dioksid (ovaj se korak u starijoj literaturi naziva i 3-hidroksilacija). Kod većine ljudi kumarin se brzo apsorbira i metabolizira jetrenim CYP2A6 (citokrom P450 2A6 je enzim koji pokazuje aktivnost 7-hidroksilaze kumarina) do 7-hidroksikumarina, koji se izlučuje u urinu kao glukuronidni i sulfatni konjugati. Dostupni podaci potvrđuju da kumarin nije genotoksičan (Lake, 1999.). Za razliku od štakora i miševa, kod kojih veće doze kumarina mogu uzrokovati toksičnost i karcinogenezu, toksičnost za ljude nije dokazana. Kod pojedinaca, koji su uzimali terapeutske doze kumarina, i do 1900 puta veće od onih kojima je čovjek izložen prehranom i kozmetičkim proizvodima, nije utvrđena veza izloženosti i pojave hepatotoksičnosti. Niska toksičnost se temelji na razlici u biotransformaciji kumarina i eliminaciji metabolita kumarina iz tijela kod određenih vrsta (Lake, 1999.). Studije na pavijanima, sirijskim hrčcima i određenim vrstama miševa su pokazale da su oni otporni na akutnu hepatotoksičnost izazvanu kumarinima. Relativna otpornost jetre i/ili hepatocita ljudi i cynomolgus majmuna na toksičnost kumarina se povezuje sa 7-hidroksilacijom, osnovnim metaboličkim putem kumarina kod ovih vrsta, koji je u biti detoksifikacija. Kod štakora se hepatotoksičnost ove vrste pripisuje izlučivanju metabolita kumarina u žuč, što može rezultirati enterohepatičkom cirkulacijom koja povećava izloženost jetrenih stanica toksičnim metabolitima kumarina. Vrste kao sirijski hrčak, pavijan i čovjek izlučuju metabolite kumarina primarno u urinu (Lacy i O'Kennedy, 2004.) i brzo izlučivanje kumarina, osobito u obliku 7-hidroksikumarina, u urinu ljudi daje naslutiti da u ovom slučaju nema izlučivanja u žuč. Vrijeme poluživota (half-life) za eliminaciju kumarina je oko 1-2 sata (Lake, 1999.), a bioraspoloživost kumarina u ljudskom organizmu je samo oko 1-5% (Hoult i Paya, 1996.). Mala izloženost kumarinima iz prehrane i određenih kozmetičkih proizvoda ne bi trebala izazvati hepatotoksičnost, čak niti u pojedinaca sa smanjenom aktivnošću 7-hidroksilaze (Lacy i O'Kennedy, 2004.).

Kod štakora je, za razliku od ljudi, dominirajuća reakcija 3,4-epoksidacija pri čemu je glavni metabolit jetrenih mikrosoma *o*-HPA, koji se povezuje s akutnom plućnom toksičnošću

i plućnim tumorima kod miševa, dok je glavni urinarni metabolit *o*-HPAA (**Slika 17**) (EFSA, 2004.). Usporedba među vrstama pokazuje da su hepatociti štakora najosjetljiviji na toksičnost kumarina i njegovih derivata, dok su humani hepatociti najotporniji (Kostova, 2005.).

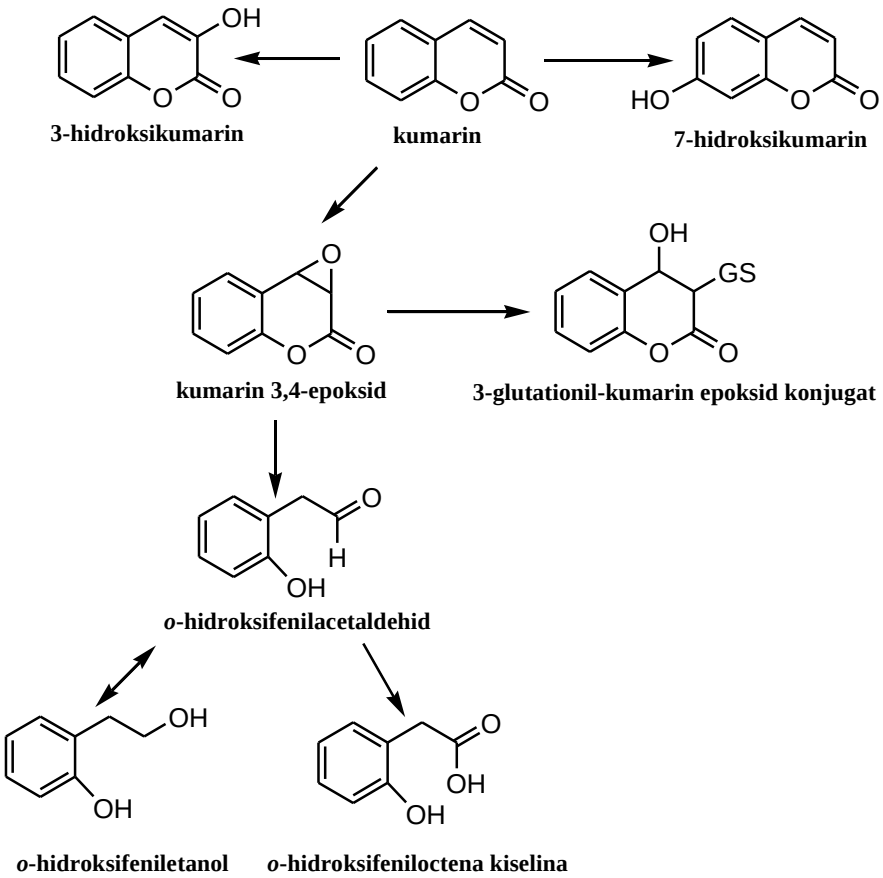
Rezultati svih ovih istraživanja (Lake, 1999.; EFSA, 2004.; Kostova, 2005.) potvrđuju da je citoksičnost kumarina ovisna o metabolizmu i vrsti organizma, što znači da štakori nisu pogodan model za procjenu farmakoloških učinaka kumarina na ljudski organizam (Kostova, 2005.; Lacy i O'Kennedy, 2004.).



Slika 16 Neki putevi metabolizma kumarina (Lake, 1999.)

Prikazani metaboliti su: 3-, 4-, 5-, 6- 7- i 8-hidroksikumarin (3-HC, 4-HC, 5-HC, 6-HC, 7-HC, 8-HC), *o*-hidroksifenilacetaldehid (*o*-HPA), *o*-hidroksifeniletanol (*o*-HPE), *o*-hidroksifeniloctena kiselina (*o*-HPAA), *o*-hidroksifenilmliječna kiselina (*o*-HPLA), *o*-hidroksifenilpropionska kiselina (*o*-HPPA), *o*-kumarinska kiselina (*o*-CA), dihidrokumarin (DHC), 6,7-dihidroksikumarin (6,7-DHC), 4-hidroksidihidrokumarin-glutation konjugat (4-HDHC-GSH konjugat)

Nakon oralne terapije kumarin se brzo apsorbira iz gastrointestinalnog trakta i distribuira tijelom (Lacy i O'Kennedy, 2004.). Neki autori ističu kako bi kumarin mogao biti toksičan jer podliježe oksidativnoj dekarboksilaciji, što rezultira nastankom derivata *o*-hidroksifenilacetaldehida ili *o*-hidroksifeniloctene kiseline koji mogu stvarati stabilne komplekse s teškim metalima u tijelu, dok 4-metilkumarin ne podliježe oksidativnoj dekarboksilaciji i nije toksičan (Malhotra i sur., 2008.; Foti i sur., 2005.). Nesupstituirani kumarini tijekom metabolizma mogu stvarati 3,4-epokside kumarina, koji su toksični, dok sintetski 4-metilkumarini ne induciraju nastanak epoksida jer nisu supstrat za jetrenu P450 monooksigenazu (Natella i sur., 2010.).



Slika 17 Glavni metabolički putevi biotransformacije kumarina (EFSA, 2004.)

Kumarini pokazuju mnoštvo različitih bioloških aktivnosti (**Tablica 1**), koje uključuju inhibiciju agregacije krvnih pločica, citokroma P450 i steroidne 5α-reduktaze, spazmolitičku, antikoagulacijsku, antibakterijsku, antikancerogenu i anti HIV aktivnost (Kostova, 2005.;

Kashman i sur., 1992.; Zhou i sur., 2000.). Kumarini pokazuju i mnoštvo drugih bioloških aktivnosti, kao prevenciju od bolesti, modulaciju rasta i antioksidacijska svojstva, kao i antitumorske učinke, a mogu i uzrokovati značajne promjene u regulaciji imunološkog odgovora, rastu stanica i diferencijaciji (Lacy i O'Kennedy, 2004.).

Biljni ekstrakti koji sadrže derivate kumarina su se u povijesti često koristili kao biljni lijekovi, te se i danas istražuju zbog svojih bioloških svojstava. Istraživanja su pokazala da su kumarini vrlo aktivni, pa tako kumarini s fenolnim hidroksilnim skupinama pokazuju sposobnost hvatanja slobodnih radikala, osobito reaktivnih kisikovih vrsta (Dighe i sur., 2010.; Kalkambar, 2011.) i često se koriste kao inhibitori ciklooksigenaze i lipoksigenaze u upalnom ciklusu (Kalkhambkar, 2011.). Mnoštvo kumarina utječe na formaciju i hvatanje reaktivnih kisikovih (ROS) i dušikovih vrsta (RNS) i na taj način djeluju kao antioksidansi, što uključuje niz različitih molekularnih mehanizama djelovanja i vjerojatno je povezano s njihovom strukturnom sličnošću s flavonoidima i benzofenonima (Ćavar i sur., 2009.). Eskuletin i 4-metileskuletin sinergistički djeluju s α-tokoferolom u obrani od citotoksičnosti izazvane hidroperoksidom linoleinske kiseline, pri čemu važnu ulogu ima *orto* kateholna skupina na kumarinu (Kostova, 2005.). Eskuletin, 4-metileskuletin, fraksetin i kava kiselina pokazuju aktivnost hvatanja slobodnih radikala DPPH. Antioksidans aurapten (7-geraniloksikumarin), koji je izoliran iz kore citrusa (*Citrus natsudaidai Hayata*), dokazano posjeduje kemopreventivni učinak na kemijski induciranu karcinogenezu (Kostova, 2005.).

Tablica 1 Biološko djelovanje kumarina

Biološko djelovanje	**Izvor**
Antiinflamatorno djelovanje, *in vitro* i *in vivo*	Ojala (2001.); O'Keneddy i Thornes (1997.); Sardari i sur. (2000.); Silvan i sur. (1996.)
Analgetsko djelovanje	O'Keneddy i Thornes (1997.)
Antifungalna aktivnost	Sardari i sur. (1999.); Farshori i sur. (2011.)
Antiaritmičko djelovanje	Sardari i sur.(2000.)
Antihelmintska aktivnost	O'Keneddy i Thornes (1997.)
Antihipertenzijska aktivnost	Pandey i sur. (2004.)
Antikancerogeno djelovanje	Manojkumar i sur. (2009.); Ojala (2001.)
Antikoagulacijsko djelovanje	Kostova i sur. (2005.); Ojala (2001.)
Antileukemijsko djelovanje	Kotali i sur. (2008.)
Antimalarijska aktivnost, *in vivo* i *in vitro*	Ojala (2001.)
Antimikrobna aktivnost	Kwon i sur. (1997.); Ojala (2001.); Mohareb i sur.

	(2009.); O'Keneddy i Thornes (1997.)
Antipiretičko djelovanje	O'Keneddy i Thornes (1997.)
Antiviralna aktivnost, *in vitro*	Ojala (2001.); Pandey i sur. (2004.)
Citostatički efekt, in vivo	Ojala (2001.)
Diuretičko djelovanje	O'Keneddy i Thornes (1997.)
Estrogensko djelovanje	O'Keneddy i Thornes (1997.)
Hipnotički učinak	O'Keneddy i Thornes (1997.)
Hipotermalno djelovanje	O'Keneddy i Thornes (1997.)
Hipolipidemičko djelovanje	Huang i sur. (1993.)
Imunostimulacijsko djelovanje	Sardari i sur.(2000.)
Imunosupresivno djelovanje	Sardari i sur.(2000.)
Inhibicija gonadotropina	Sardari i sur.(2000.)
Inhibicija aldoza reduktaze u leći	Okada i sur. (1995)
Inhibicija otpuštanja histamina	Sardari i sur.(2000.)
Inhibicija LDL oksidacije	Natella i sur. (2010.)
Inhibicija lipidne peroksidacije	Roussaki i sur. (2010.); Yun i sur. (2001.)
Inhibicija DNA-giraze	Sardari i sur.(2000.)
Inhibicija enzimske aktivnosti u jetri, *in vitro*	Ojala (2001.)
Inhibicija monoamin oksidaze, *in vitro*	Ojala (2001.)
Inhibicija protein kinaze, *in vitro*	Yang i sur. (1999.)
Fotosenzibilizirajuća aktivnost, *in vivo*	Ojala (2001.)
Kalcij antagonistička aktivnost, *in vitro* i *in vivo*	Ojala (2001.); Sardari i sur.(2000.); Abyshev i sur. (2006.)
Koleretički učinak	O'Keneddy i Thornes (1997.)
Narkotički učinak	O'Keneddy i Thornes (1997.)
Regulacija rasta biljaka	O'Keneddy i Thornes (1997.)
Smanjenje lomljivosti kapilara	Sardari i sur.(2000.)
Spazmolitička aktivnost	O'Keneddy i Thornes (1997.)
Sprječavanje zubnog karijesa	Sardari i sur.(2000.)
Stimulacija respiracije	O'Keneddy i Thornes (1997.)
Trovanje ribe	Sardari i sur.(2000.)
Tretiranje psorijaze	Sardari i sur.(2000.)
Tuberkulostatska aktivnost	O'Keneddy i Thornes (1997.)
Urikozurično djelovanje	O'Keneddy i Thornes (1997.)
Vazodilatacijski učinak	O'Keneddy i Thornes (1997.)
Zaštita endotela	O'Keneddy i Thornes (1997.)

Razna istraživanja su potvrdila da velika većina biljnih ekstrakata koji su se u povijesti koristili u medicinske svrhe sadrži visoke koncentracije kumarina (Kostova, 2005.). Kumarin i 7-hidroksikumarin inhibiraju proliferaciju mnoštva humanih staničnih linija *in vitro*, a pokazuju i aktivnost protiv nekoliko životinjskih tumora. Prema istraživanjima, konzumacija namirnica koje sadrže kumarin pruža određenu zaštitu od inicijacije hepatokarcinogeneze

uzrokovane aflatoksinom B1 u štakora (Kostova, 2005.). Kumarin trenutno prolazi razna klinička ispitivanja vezana za liječenje limfoedema, raka dojke, karcinoma pluća i bubrega (Lake, 1999.), a već je dakazana njegova aktivnosti protiv raka prostate, malignog melanoma i metastatskog renalnog staničnog karcinoma (Kostova, 2005.). Kumarin i njegovi metaboliti pokazuju antitumorsku aktivnost na nekoliko linija stanica tumora kod ljudi, a također su se pokazali kao inhibitori stanične proliferacije kod stanica želučanog karcinoma. Osim što se mogu koristiti u liječenju raka, kumarini se mogu koristiti i u tretmanima ublažavanja nuspojava izazvanih radioterapijom (Ramesh i Pugalendi, 2005.). Kumarini bi također mogli naći primjenu u liječenju karcinoma bubrežnih stanica i kao dodatna kemijska terapija za melanom (Lacy i O'Kennedy, 2004.). Temeljeno na kliničkim ispitivanjima postoji mogućnost izolirane primjene kumarina, kao i u kombinaciji s cimetidinom, kao antineoplastika (Lake, 1999.).

Kumarin također pokazuje sposobnost aktivacije makrofaga, pa postoji mogućnost upotrebe u tretmanima edema (Shi i Zhou, 2011.), osobito jer se kumarin pokazao dobrim u smanjenju oteklina nakon različitih trauma i bolesti, kod ljudi i životinja (Hoult i Paya, 1996.). Rezultati su pokazali da kombinacija kumarina i trokserutina ima povoljan učinak u liječenju upale žlijezde slinovnice i mukozitisa (upala sluznice usne šupljine).

Prema istraživanju Ramesha i Pugalendija (2005.) kumarin smanjuje razinu glukoze u krvi. Istraživanja su pokazala da kumarin ne samo da inducira izoenzim aldo-ketoreduktaze (aflatoksin B1-aldehid reduktaza) koji sudjeluje u metabolizmu aflatoksina, nego i GSTA5 (glutation S-transferaza alfa 5) i druge enzime koji metaboliziraju lijekove (Kostova, 2005.). Studije o utjecaju kemijske strukture na biološku aktivnost kumarina su pokazale da dodatak kateholne skupine na osnovnu strukturu uzrokuje povećanu citotoksičnu aktivnost na stanice tumora (Kostova, 2005.). Zbog imunomodulacijskih svojstava postoji mogućnost primjene u tretmanu bruceloze (Shi i Zhou, 2011.).

7-Hidroksikumarin je prirodni benzopiron, ljudski metabolit i ima važnu ulogu kao antioksidans u ljudskoj prehrani (voće i povrće), a istraživanja su pokazala da ima antitumorsku, inhibicijsku aktivnost na aldoza reduktazu i ksantin oksidazu (Farshori i sur., 2011.).

Ostol inhibira agregaciju trombocita, dok klorikromen (sintetski kumarin) inhibira agregaciju *in vivo* i *in vitro*, i izaziva vazodilataciju (Hoult i Paya, 1996.). Ostol sprječava progresiju hepatitisa C u hepatokarcinom kod ljudi (Okamoto i sur., 2001.), a derivati ostola koji pokazuju topivost u vodi veću nego sam ostol su nedavno predloženi za upotrebu kao hepatoprotektivni lijekovi. Što se tiče biološke aktivnosti ostola, vrlo je važna prisutnost metoksi skupine, jer je npr. 7-hidroksi derivat, ostenol, neaktivan (Mazzei i sur., 2008.). Kolinin pokazuje negativan učinak na replikaciju DNA virusa hepatitisa B (Chang i sur., 1997.)

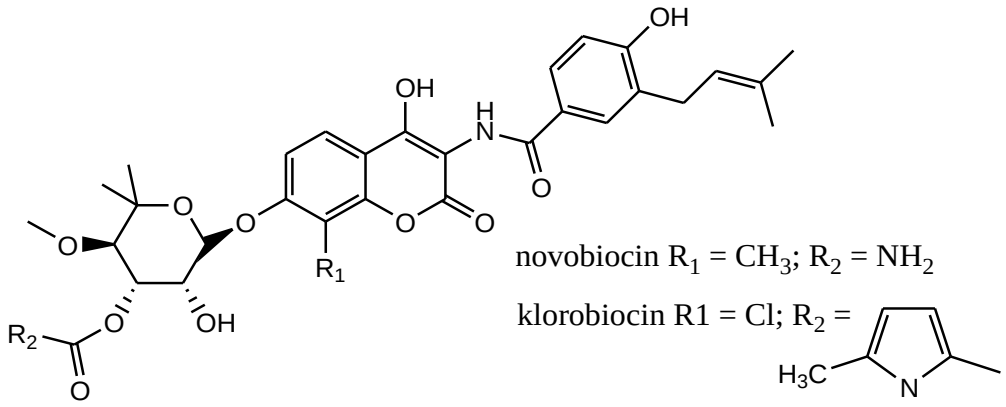
Određeni dimeri kumarina, osobito oni koji sadrže hidrofobne skupine, pokazali su se kao potentni inhibitori HIV-1 integraze, dok je 5,7,4'-trihidroksi-4-stirilkumarin pokazao značajnu antivirusnu aktivnost prema *Herpes simplex* virusu (Borges i sur., 2005.). Geiparvarin pokazuje značajnu *in vitro* citostatsku aktivnost, a neki prirodni i sintetski kumarini su inhibitori kolinesteraze, što bi moglo dobro doći u liječenju Alzheimerove, kao i Parkinsonove bolesti. Varfarin je i danas jedno od osnovnih antikoagulirajućih sredstava, iako neki derivati 4-hidroksikumarina posjeduju još veću antikoagulacijsku aktivnost od varfarina (Borges i sur., 2005.).

Furanokumarini se koriste u fotokemoterapeutskim tretmanima za neke kožne bolesti, limfome i autoimune poremećaje (Conforti i sur., 2009.). Biljke koje sadrže psoralen se stoljećima koriste za tretiranje vitiliga, kožne bolesti koju odlikuje nedostatak pigmentacije. Neki imaju farmakološka svojstva i bez zračenja te su se pokazali djelotvornim u liječenju depresije, a čine se i kao korisni lijekovi u tretmanima multiple skleroze, jer blokiraju kalijeve kanale. Angelicin pokazuje antiupalna, antipiretička (za smanjenje tjelesne temperature) i citotoksična svojstva na humane KB stanične linije (Conforti i sur., 2009.), kao i neki drugi kumarini (Guilet i sur., 2001.), i antifungalno djelovanje (*Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans* i *Cladosporium cucumerinum*) (Conforti i sur., 2009.).

Zasad su neki kumarini, kao varfarin, acenokumarol, armilarizin A, himekromon i karbokromen odobreni za kliničku upotrebu (Shi i Zhou, 2011.).

Novobiocin i klorobiocin (**Slika 18**) su antibiotici prirodnog porijekla na bazi kumarina (Borges i sur., 2005.) koji se ubrajaju u hidroksilirane kumarine (Farshori i sur., 2011.), a inhibiraju DNA girazu i pokazuju široki spektar aktivnosti prema Gram-pozitivnim

bakterijama, uključujući i *Staphylococcus* vrste otporne na meticilin (Borges i sur., 2005.; Basile i sur., 2009.).



Slika 18 Struktura novobiocina i klorobiocina

Eskulin je derivat kumarina koji se koristi u medicini, kao komponenta lijeka Proctosedyla, za tretiranje hemoroida i rektalnih lezija (Stewart, 2010.).

2.1.5. Biološko djelovanje Schiffovih baza, tiosemikarbazida i tiazolidinona

Schiffove baze karakterizira prisutnost iminske ili azometinske skupine, koja se nalazi u mnogim prirodnim i sintetskim spojevima, a smatra se da je njezina prisutnost važna za postizanje biološke aktivnosti (da Silva i sur., 2011.). Schiffove baze se upotrebljavaju kao boje, katalizatori, intermedijeri u organskoj sintezi i kao stabilizatori polimera, a pokazuju široki spektar bioloških aktivnosti, antifungalnu, antibakterijsku, antimalarijsku, antiproliferativnu, antiupalnu, antiviralnu i antipiretičku. Schiffove baze se mogu koristiti kao analgetska, protuupalna, antibiotička, antimikrobna i antikancerogena sredstva (Pontiki i sur., 2008.). Ghosh i sur. (2011.) i Gacche i sur. (2006.) su potvrdili kako Schiffove baze s kumarinskom jezgrom pokazuju važna antioksidacijska svojstva. Schiffove baze, derivati 7-hidroksi-4-metilkumarina imaju značajnu antibakterijsku aktivnost, kao i antioksidacijsku aktivnost u vidu hvatanja DPPH radikala (Satyanarayana i sur., 2011.). Antifungalnu aktivnost Schiffovih baza istraživali su i drugi autori i došli do zaključka da kumarini posjeduju istu (Sah i sur., 2011.; daSilva i sur., 2011.). Supstituirani hidrazidi kao i derivati *N*-benzilidena pokazuju značajnu biološku aktivnost, insekticidnu, baktericidnu, fungicidnu (Ahluwalia i sur., 1983.).

Tiosemikarbazidi i njihovi kompleksi su vrlo učinkoviti baktericidni spojevi, a zahvaljujući skupinama kao O=C-S-, NH_2, -NH-, mogli bi biti i dobri antioksidansi za stabilizaciju polimera protiv termalne oksidacije. Antioksidacijska aktivnost ovih spojeva se može pripisati prisutnosti skupina C=S i –NH- koje mogu djelovati kao centri za hvatanje radikala (Setnescu i sur., 2004.). Siddiqui i sur. (2009.) su pokazali da kumarini koji sadrže tiazol i tiosemikarbazon u svojoj strukturi pokazuju antikonvulzijsku aktivnost s niskom neurotoksičnosti. Antimikrobna, antibakterijska i antifungalna aktivnost tiosemikarbazida je također vrlo izražena (Sasse i sur., 1972.; Yamaguci i sur., 2009.), kao i kumarina koji su supstituirani tiosemikarbazidnom skupinom (Arshad i sur., 2009.).

2.2. KUMARINI I ANTIOKSIDACIJSKO DJELOVANJE

2.2.1. Antioksidansi i slobodni radikali

Slobodni radikali (superoksid $O_2^{\bullet -}$, hidroksil $^{\bullet}OH$, hidroperoksil $HO_2^{\bullet}$, peroksil $LOO^{\bullet}$, alkoksil $LO^{\bullet}$, alkil $R^{\bullet}$, triklorometil $^{\bullet}CCl_3$, tiil $RS^{\bullet}$) (Djilas i sur., 2002), osobito superoksid anion i hidroksil radikal, su visoko reaktivne vrste koje reagiraju s lipidima, proteinima i DNA i pri tom izazivaju ireverzibilne promjene njihove molekularne strukture. Reaktivne kisikove vrste se kontinuirano generiraju u vrlo malim količinama prijenosom elektrona na molekulu kisika tijekom različitih fizioloških procesa, kao što je stanično disanje, reakcije oksigenaza ili respiratorna erupcija tijekom procesa stanične imunosti. Oni igraju važnu ulogu u kontroli staničnih funkcija, kao intermedijerni metaboliti u nekoliko enzimskih reakcija, uključeni su u posttranslacijsku modifikaciju proteina i važni su u kontroli prijenosa signala. Mnoge komponente vaskularnog sustava, kao leukociti, monociti i stanice endotela krvnih žila mogu otpuštati ROS-ove kod određene stimulacije, što znači da su ROS-ovi povezani s bolestima poput tromboze, hipertenzije, Alzheimerove bolesti, Parkinsonove bolesti i amiotrofne lateralne skleroze. Osim oksidativnog stresa, kisikove vrste su povezane s pojavom jednostrukih i dvostrukih lomova DNA lanca i time prvim korakom u nastanku nekoliko humanih degenerativnih bolesti, raka i starenja. Tkiva s velikom brzinom potrošnje kisika i centralni nervni sustav su posebno podložni oksidativnom oštećenju u uvjetima oksidativnog stresa zbog prisutnosti određenih aminokiselina, povišene koncentracije željeza, staničnih

membrana bogatih polinezasićenim masnim kiselinama i niske koncentracije prirodnog antioksidansa glutationa u neuronima (Vukovic i sur., 2010.).

Kvaliteta namirnica se tijekom skladištenja smanjuje, bilo kao posljedica kvarenja izazvanog bakterijama i enzimima, ili kao posljedica oksidativnih procesa induciranih atmosferskim kisikom. Lipidna oksidacija ima pozitivne i negativne učinke. Pri niskim koncentracijama produkti lipidne oksidacije su odgovorni za poželjnu aromu prženih namirnica i neke karakteristične okuse kuhanog mesa, prženih orašastih plodova itd., a isto tako mogu imati negativan učinak na boju, teksturu, okus i miris namirnica. Oksidativna degradacija lipida može biti inducirana endogenim vrstama (H_2O_2, ROOH) i slobodnim radikalima ili egzogenim vrstama, radikalima i fizikalnim činiocima (UV, ionizirajuće zračenje, toplina) (Djilas i sur., 2002.). Lipidnom oksidacijom u namirnicama dolazi do promjene organoleptičkih i nutritivnih svojstava namirnica (Bondet i sur., 1997.), jer se kao posljedica javljaju kiseli okus i miris, skraćuje se rok trajanja namirnica, mijenja se tekstura i boja i smanjuje nutritivna vrijednost (Alamed i sur., 2009.). Lipidna oksidacija je lančana reakcija koja uključuje inicijaciju, propagaciju i terminaciju. Tijekom inicijacije nastaju alkilni i peroksilni radikali, koji zatim proizvode hidroperokside tijekom koraka propagacije. Kada dođe do asocijacije dva slobodna radikala u stabilni produkt dolazi do terminacije (Bondet i sur., 1997.). Tako je lipidna oksidacija jedan od glavnih uzroka smanjenja kvalitete mesnih proizvoda od mišićnog tkiva. Procesi kao usitnjavanje oštećuju stanični integritet mišićnog tkiva pri čemu su lipidi izloženi oksidativnim katalizatorima i kisiku. Toplinski procesi ubrzavaju lipidnu oksidaciju mišićnog tkiva jer dislociraju željezo iz hema, narušavaju integritet stanice, inaktiviraju endogene antioksidanse i razgrađuju hidroperokside. Mnoštvo je metoda za kontrolu brzine i dosega lipidne oksidacije u namirnicama, a najefikasnija je dodavanje antioksidanasa, bilo sintetskih ili prirodnih, koji mogu usporiti taj proces. Većina komercijalno dostupnih antioksidanasa djeluje hvatajući slobodne radikale ili kelira metale. Hvatači slobodnih radikala, kao tokoferoli, butilirani hidroksitoluen (BHT) i biljni fenoli, inhibiraju lipidnu oksidaciju reducirajući peroksilne i alkoksilne radikale u stabilne spojeve. Na taj način hvatači slobodnih radikala mogu inhibirati lančanu reakciju i skraćivanje masnih kiselina, pri čemu se smanjuje formacija hlapivih produkata raspadanja masnih kiselina (aldehidi i ketoni), koji uzrokuju kvarenje (Alamed i sur., 2009.) i neugodan miris, kao i nestanak esencijalnih masnih kiselina (Bondet i sur., 1997.). Osim što služe kao hvatači

slobodnih radikala, antioksidansi inaktiviraju katalizu metala keliranjem metala, reduciraju hidroperokside do stabilnih hidroksilnih derivata i djeluju sinergistički s drugim spojevima (Frankel i Finley, 2008.).

Antioksidansi su našli široku uporabu kao dodaci namirnicama za sprječavanje oksidativne degradacije (Bailly i sur., 2004.). Antioksidansi su tvari, koje prisutne u niskim koncentracijama u odnosu na neki supstrat značajno odgađaju ili sprječavaju oksidaciju tog supstrata. Ključna uloga antioksidanasa je da hvataju ili reagiraju sa slobodnim radikalima i sprječavaju propagaciju lančane reakcije izazvanu istima. Antioksidacijska aktivnost nekog spoja se pripisuje njegovoj sposobnosti hvatanja kisikovih radikala, inhibicije reakcije oksidacije mikrosomalnih citokroma P450 i sprječavanja nastajanja ROS-ova. Da bi neka tvar bila dobar antioksidans mora sadržavati atom vodika koji može vrlo lako otpustiti i pritom tvoriti slobodni radikal, koji mora biti stabilan i nereaktivan da ne bi sudjelovao u koraku propagacije lančane reakcije (Malhotra i sur., 2008.). Antioksidansi se mogu kategorizirati prema tome doniraju li slobodnim radikalima vodikov atom, hvataju singlet kisika i sekundarne produkte lipidne oksidacije ili djeluju kao kelatori prijelaznih metala (Yeo i sur., 2010.).

U biološkim sustavima postoje barem 4 osnovne vrste antioksidanasa – enzimi (superoksid dismutaza, glutation peroksidaza, katalaza), velike molekule (albumin, ceruloplazmin, feritin, drugi proteini), male molekule (askorbinska kiselina, glutation, urična (mokraćna) kiselina, tokoferol, karotenoidi, (poli)fenoli) i neki hormoni (estrogen, angiotenzin, melatonin). Pojedini antioksidansi mogu djelovati različitim mehanizmima u određenom sustavu ili samo jednim mehanizmom, a isto tako na različite načine djeluju na različite slobodne radikale. Tako npr. karotenoidi nisu dobri hvatači peroksil radikala u odnosu na polifenole i druge antioksidanse, ali su izuzetno dobri hvatači singleta kisika, što većina fenola i drugih antioksidanasa nije. Međutim, singlet kisika nije slobodni radikal i ne reagira radikalskim mehanizmom, ali reagira uglavnom adicijom na dvostruke veze, pri čemu stvara endoperokside, koji se mogu reducirati do alkoksil radikala koji započinju lančane radikalske reakcije. Zbog različitih karakteristika i mehanizama niti jedna metoda antioksidacijskog ispitivanja ne daje točan uvid u hvatanje svih slobodnih radikala (Prior i sur., 2005.).

2.2.2. Metode određivanja antioksidacijske aktivnosti

Danas postoji mnoštvo protokola za određivanje antioksidacijske aktivnosti koje uključuju mnoštvo sustava za generiranje slobodnih radikala kao i različite metode za poticanje oksidacije (Frankel i Finley, 2008.).

Antioksidansi mogu deaktivirati slobodne radikale na dva osnovna načina, prijenosom vodikovog atoma (hydrogen atom transfer - HAT) i prijenosom elektrona (single electron transfer – SET). Rezultat oba načina je isti, neovisno o mehanizmu, ali kinetika i potencijalne nusreakcije se razlikuju. Zajedničko pomicanje protona i elektrona (proton coupled electron transfer) i HAT reakcije se mogu odvijati paralelno, a dominantni mehanizam je određen strukturom i svojstvima antioksidansa, topivošću i koeficijentom razdjeljenja i otapalom. Energija disocijacije veze (bond dissociation energy – BDE) i ionizacijski potencijal (IP) su dva osnovna faktora koja određuju mehanizam i učinkovitost antioksidansa. HAT metode mjere sposobnost antioksidansa da hvata slobodne radikale donacijom vodika.

$$X^{\bullet} + AH \rightarrow XH + A^{\bullet}$$

Reaktivnost HAT metode je određena BDE-om H-donirajuće skupine potencijalnog antioksidansa, osobito kod spojeva čiji su BDE ~ -10 kcal/mol i IP < -36 kcal/mol. Reaktivnost antioksidansa ili kapacitet se temelje na kompeticijskoj kinetici. HAT reakcije ne ovise o otapalu i pH i obično su brze i gotove u roku od par sekundi ili minuta. Prisutnost reducirajućeg sredstva, uključujući metale, komplicira HAT metodu i može dovesti do netočne visoke reaktivnosti.

Kod SET metoda se detektira sposobnost potencijalnog antioksidansa da donira elektron i na taj način reducira spoj, uključujući metale, karbonile i radikale.

$$X^{\bullet} + AH \rightarrow X^{-} + AH^{\bullet+}$$

$$AH^{\bullet+} + H_2O \leftrightarrow A^{\bullet} + H_3O^{+}$$

$$X^{-} + H_3O^{+} \rightarrow XH + H_2O$$

$$M(III) + AH \rightarrow AH^{+} + M(II)$$

SET i HAT mehanizmi se gotovo uvijek odvijaju istovremeno u svim uzorcima, a ravnoteža je određena strukturom antioksidansa i pH vrijednošću. Relativna reaktivnost kod SET metode se temelji primarno na deprotonaciji i IP reaktivne funkcionalne skupine, što znači da je SET metoda ovisna o pH. Općenito vrijedi da se IP smanjuje povećanjem pH što se odražava na povećanu elektrondonirajuću sposobnost s deprotonacijom. SET mehanizam dominira kod spojeva s IP > -45 kcal/mol. SET reakcije su obično spore i potrebno je duže vrijeme da se privedu kraju, pa se antioksidacijska aktivnost temelji na postotku smanjenja koncentracije slobodnog radikala prije nego na kinetici. Kada $AH^{\bullet+}$ ima određeni životni vijek, može doći do sekundarnih reakcija koje ometaju mjerenje i mogu dovesti do toksičnosti ili mutagenosti *in vivo*. SET metode su vrlo osjetljive na askorbinsku i mokraćnu kiselinu, a spojevi u tragovima i kontaminanti (osobito metali) ometaju SET metode i mogu dovesti do pogrešnih rezultata (Prior i sur., 2005.).

HAT metode kao npr. kapacitet apsorbancije kisikovih radikala (ORAC - oxygen radical absorbance capacity) i antioksidacijski parametar ukupnog hvatanja radikala (TRAP - total radical trapping antioxidant parameter) se koriste kompetitivnom reakcijskom shemom, gdje se generiraju peroksilni radikali, koji onda oksidiraju probnu tvar koja se koristi za njihovu detekciju. Kada se dodaje tvar koja se ispituje, ona se natječe s probnom tvari za peroksilne radikale i na taj način se određuje aktivnost hvatanja slobodnih radikala. Kod SET metoda, kao što je antioksidativni kapacitet u ekvivalentim troloxa (TEAC - Trolox equivalence antioxidant capacity) i DPPH metoda, kolorimetrijska proba je ujedno i slobodni radikal, a tvar koja se ispituje reducira slobodni radikal što uzrokuje promjenu boje (Alamed i sur., 2009.).

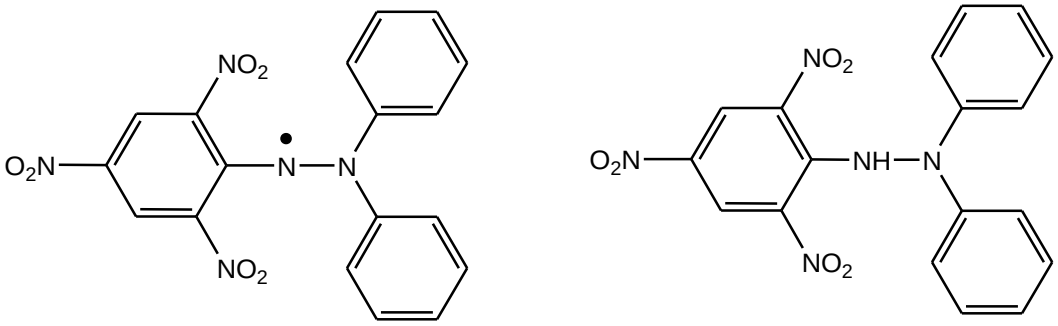
2.2.2.1. DPPH (2,2-Difenil-1-pikrilhidrazil) metoda

DPPH radikal je jedan od rijetkih dušikovih radikala koji je stabilan, a tamno je ljubičaste boje. Komercijalno je dostupan i nije ga potrebno posebno generirati prije upotrebe, kao što je to slučaj za ABTS (2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonska kiselina). Metoda mjerenja antioksidacijske aktivnosti pomoću DPPH se temelji na određivanju reducirajuće sposobnosti antioksidanasa prema DPPH radikalu, a sposobnost hvatanja

slobodnih radikala se određuje mjerenjem pada apsorbancije pri 515-528 nm ili elektronskom paramagnetskom rezonancijom (de Magalhães, 2007.; Prior i sur., 1995.).

Prvi put su je objavili Brand-Williams i suradnici (1995.). Rezultati se mogu izraziti na nekoliko načina. DPPH metoda jako ovisi o otapalu i pH, a jedan od parametara koji određuju reakciju je i sterička dostupnost, jer male molekule koje imaju bolji pristup radikalskom mjestu pokazuju relativno visoku antioksidacijsku aktivnost (de Magalhães, 2007.), što znači da reakcijski mehanizam između antioksidansa i DPPH• ovisi, između ostaloga, i o strukturi samog antioksidansa (Bondet i sur., 1997.). DPPH može reagirati s fenolnim spojevima putem prijenosa vodikovog atoma ili elektrona. DPPH u nepolarnim otapalima preferira oduzimanje vodika, dok u polarnim otapalima, kao što su etanol i metanol, prijenos elektrona je važniji korak u hvatanju DPPH radikala (Yeo i sur., 2010.).

Molekula 2,2-difenil-1-pikrilhidrazila je stabilni radikal zbog delokalizacije slobodnog elektrona kroz molekulu, tako da molekule ne dimeriziraju, kao što je to slučaj kod većine slobodnih radikala.



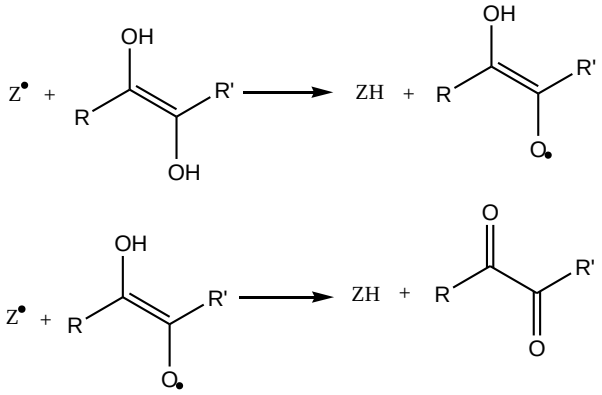
difenilpikrilhidrazil(slobodni radikal) difenilpikrilhidrazin

Slika 19 Struktura difenilpikrilhidrazila i difenilpikrilhidrazina

Delokalizacija elektrona kroz molekulu daje tamno ljubičastu boju, koja se gubi dodatkom antioksidansa, kada iz slobodnog radikala, difenilpikrilhidrazila, nastaje reducirani oblik, svijetlo žuti difenilpikrilhidrazin (Molyneux, 2004.; Gacche i sur., 2006.).

$$Z^{\bullet} + AH = ZH + A^{\bullet}$$

gdje je ZH reducirani oblik, a $A^{\bullet}$ je slobodni radikal nastao u prvom koraku. Ovaj radikal tada ulazi u reakciju koja kontrolira sveukupnu stehiometriju, tj. broj reduciranih molekula DPPH s jednom molekulom reducensa. Ova reakcija dakle, daje uvid u reakcije koje se događaju u oksidirajućem sustavu, kao što je autooksidacija lipida ili drugih nezasićenih tvari. Znači, DPPH molekula $Z^{\bullet}$ predstavlja slobodne radikale koji nastaju u sustavu, čiju aktivnost inhibira AH. Ukoliko molekula ima dva mjesta s kojih može otpustiti vodik, kao u slučaju askorbinske kiseline, nakon prvog vodika, može doći i do doniranja drugog, što dovodi do 2:1 stehiometrije. Drugim riječima, dvije molekule DPPH se reduciraju jednom molekulom askorbinske kiseline (Molyneux, 2004.)



Slika 20 Inhibicija slobodnih radikala molekulom donorom vodikova atoma (Molyneux, 2004.)

DPPH metoda je jednostavna i pogodna za određivanje antioksidacijske aktivnosti čistih spojeva, sokova voća i povrća ili ekstrakata (de Magalhães, 2007.), kao i za određivanje antioksidacijske aktivnosti u namirnicama i biljnim proizvodima (Litwinienko i Ingold, 2003.), a prema Lee i sur. (2007.) pogodna je i za određivanje stupnja lipidne oksidacije. Provodi se na sobnoj temperaturi i time je eliminiran rizik termalne degradacije molekula koje se ispituju (Bondet i sur., 1997.), a radikal je stabilan i ne mora se posebno generirati (Gacche i sur., 2006.).

DPPH metoda se temelji uglavnom na prijenosu elektrona, a prijenos atoma H je marginalni reakcijski put (Prior i sur., 2005.), jer se odvija sporo u otapalima koji uspostavljaju vodikove veze, kao etanol i metanol (de Magalhães, 2007). Radikali centrirani na kisiku i dušiku reagiraju s fenolima putem dva različita mehanizma: direktni prijenos vodikova atoma

(HAT reakcija) i prijenos elektrona (ET reakcija). Doprinos jednog ili drugog mehanizma ovisi o prirodi otapala i/ili redoks potencijalu tvari koje sudjeluju u reakciji. Općenito vrijedi da u nepolarnim otapalima prevladava HAT mehanizam, uz iznimku jakih oksidirajućih radikala kao $Cl_3COO•$, kada prevladava prijenos elektrona. Neki autori su dokazali kako u aprotičnim polarnim otapalima dolazi do smanjenja brzine mnogih ArOH/X• reakcija, što se objašnjava činjenicom da je većina molekula ArOH vodikovim vezama vezana za molekule otapala (ArOH⋯*otapalo*), pa ne može reagirati HAT mehanizmom. Samo slobodne, tj. frakcije ArOH koje nisu povezane vodikovim vezama za otapalo mogu reagirati prijenosom H atoma. Brzinu reakcije u etanolu i metanolu u ovom slučaju određuje prijenos elektrona, dok je prijenos H vrlo spor. Ova otapala imaju relativno visoku dielektričnu konstantu i podržavaju ionizaciju Bronstedovih kiselina i ET mehanizam (Foti i sur., 2004.). Znači, u nepolarnim otapalima redukcija DPPH se odvija mehanizmom prijenosa vodika, dok u polarnim prijenosom elektrona (Frankel i Finley, 2008.).

2.2.2.2. Fosfomolibden metoda

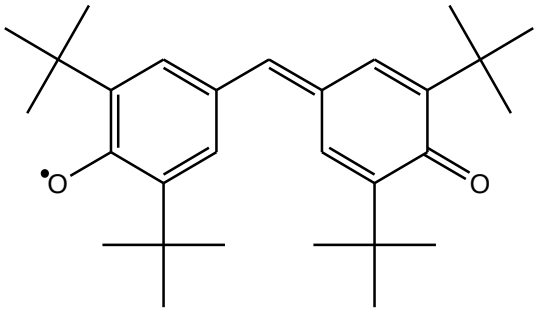
Ova metoda je razvijena za kvantitativno određivanje antioksidacijske aktivnosti. Temelji se na redukciji Mo(VI) do Mo(V) pomoću određene tvari i nastankom zelenog kompleksa fosfat/Mo(V) u kiselom pH (Prieto i sur., 1999.), koji ima maksimum apsorpcije pri 695 nm (Sowndhararajan i sur., 2011.). Reakcijsko vrijeme od 90 min je dovoljno za postizanje maksimalne vrijednosti stvaranja kompleksa. Iako se nastajanje zelenog kompleksa može odvijati na sobnoj temperaturi, iskorištenje se znatno povećava povišenjem temperature. Fosfomolibden metoda je kvantitativna, jer se antioksidacijska aktivnost izražava u broju ekvivalenata askorbinske kiseline ili α-tokoferola (Prieto i sur., 1999.), a viša vrijednost apsorbancije predstavlja veću antioksidacijsku aktivnost (Sowndhararajan i sur., 2011.). Otapala kao što su etanol, metanol, dimetilsulfoksid i heksan ne ometaju mjerenje i mogu se bez problema koristiti u ovoj metodi (Prieto i sur., 1999.).

Kod DPPH metode i fosfomolibden metode može doći do prijenosa vodika i elektrona, a taj prijenos se odvija pri različitim redoks potencijalima i ovisi o strukturi antioksidansa. Askorbinska kiselina, glutation, cistein, tokoferoli, polifenoli i aromatski amini imaju

sposobnost doniranja vodika i elektrona i mogu se detektirati pomoću obje metode (Marwah i sur., 2007.).

2.2.2.3. Hvatanje galvinoksil radikala

Galvinoksil radikal je radikal centriran na kisiku, komercijalno je dostupan i apsorbira u vidljivom dijelu spektra s maksimumom pri 432 nm. U usporedbi s DPPH puno je reaktivniji prema fenolima (Tirzitis i Bartosz, 2010.). Za detekciju galvinoksil radikala primjenjuje se EPR spektroskopija, a radikal se kvantificira smanjenjem relativnog intenziteta signala uzorka s antioksidansom u odnosu na onaj bez antioksidansa (Becker i sur., 2004.).



Slika 21 Galvinoksil radikal

Prema Zhao i Liu (2010.), sposobnost hvatanja galvinoksil radikala je veća nego za DPPH radikale, a neki autori pretpostavljaju da je slobodni elektron DPPH radikala sterički zaštićeniji nego kod galvinoksil radikala, pa je zato reakcija s DPPH sporija (Koprivnjak i sur., 2008.). DPPH i galvinoksil su stabilni slobodni radikali koji prihvaćaju elektron ili vodikov atom da bi postale stabilne dijamagnetične molekule. Često se koriste kao supstrati za određivanje antioksidacijske aktivnosti, a nespareni elektron je delokaliziran preko N i O atoma. U principu, kod hvatanja ova dva radikala vidljiv je isti trend (Rodriguez i sur., 2007.).

Kod hvatanja galvinoksil radikala također postoje dva mehanizma, jedan koji uključuje prijenos H atoma (j.1.), drugi koji uključuje prijenos elektrona i potom protona (j.2.).

$$G^{\bullet} + ArOH \rightarrow GH + ArO^{\bullet} \qquad \text{j.1.}$$

$$G^{\bullet} + ArOH \rightarrow G^{-} + ArOH^{\bullet+} \rightarrow GH + ArO^{\bullet} \qquad \text{j.2.}$$

Mehanizam hvatanja galvinoksil radikala ovisi o otapalu, a oba mehanizma mogu se pojavljivati i istovremeno. Prvi mehanizam prevladava u nepolarnim otapalima, a reakcija uvelike ovisi o entalpiji disocijacije veze (bond dissociation enthalpies-BDE) antioksidansa i GH. Na reakciju također utječe međusobni odnos količina antioksidansa i galvinoksil radikala. U polarnim otapalima mogu nastati međustanične vodikove veze između hidroksilnih skupina i molekula otapala. Vodikove veze tada sprječavaju proces doniranja H atoma i olakšavaju put opisan u j.2. U ovom slučaju prijenos elektrona je korak koji kontrolira brzinu reakcije, a teoretski parametri koji određuju ovu reakciju su ionizacijski potencijal (IP) antioksidansa i galvinoksil radikala. IP antioksidansa mora biti manji od IP galvinoksil radikala. Za oba mehanizma vrijedi što su manji ovi parametri, spoj je učinkovitiji antioksidans (Wang i Zang, 2005.).

2.2.2.4. EPR metoda

Elektronska paramagentna ili elektronska spinska rezonancija (EPR ili ESR) je spektroskopska tehnika koja je korisna za proučavanje strukture paramagnetskih vrsta. Paramagnetske vrste imaju barem jedan nespareni elektron, pa samim time i magnetski moment. To uključuje ione prijelaznih metala, organske slobodne radikale i ione, kao i čestice u pobuđenom stanju. EPR spektroskopija koristi mikrovalove za indukciju prijelaza između pojedinih energetskih nivoa elektronskog spina paramagnetskih vrsta (Butera i Waldeck, 2010.). EPR je jedina metoda koja direktno mjeri slobodne radikale. Djeluje na principu apsorpcije mikrovalne energije kada se uzorak postavi u promjenjivo magnetsko polje (Djilas i sur., 2002.).

Ova metoda uključuje hvatanje reaktivnih, kratko živućih slobodnih radikala (proizvedenih u eksperimentalnom sustavu putem kemijske reakcije, toplinske degradacije, fotokemijskom ekscitacijom). Antioksidacijska aktivnost se može pratiti eliminacijom ili nestajanjem slobodnog radikala u sustavu (Polovka, 2006.).

EPR spektroskopija je relativno nova metoda za ispitivanje antioksidacijske aktivnosti i lipidne oksidacije, ali je vrlo obećavajuća, jer direktno mjeri koncentraciju slobodnih radikala (Becker i sur., 2004.). Prednost EPR tehnike je u tome što se na ovaj način detektiraju samo slobodni radikali, čak i u vrlo niskim koncentracijama (Pedersen i sur., 2007.).

Kategoriziranje antioksidacijske aktivnosti na temelju određivanja hvatanja DPPH radikala i galvinoksil radikala se podudara s rezultatima dobivenim za određene namirnice, iako se modeli u potpunosti razlikuju (Becker i sur., 2004.).

2.2.3. Kumarini kao antioksidansi

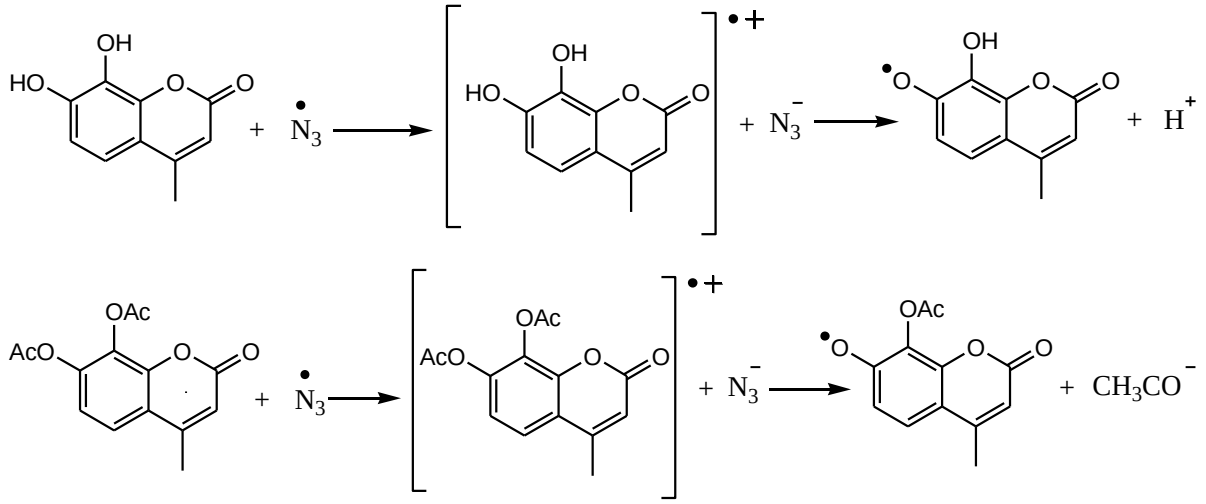
Kumarinska jezgra, koju karakterizira stiril karbonilna skupina, sudjeluje u hvatanju kisikovih reaktivnih vrsta kao i u sprječavanju oštećenja nastalih slobodnim radikalima (Manojkumar i sur., 2009.a). Antioksidacijska aktivnost kumarina i njihovih metabolita ili derivata uvelike ovisi o njihovoj strukturi (Natella i sur., 2010.) i predmet je istraživanja brojnih znanstvenika, dok farmakološka i biokemijska svojstva kumarina, kao i njihova terapeutska primjena ovise o supstitutentima (Malhotra i sur., 2008.). Veliki broj kumarina pokazuje antioksidacijska svojstva na način da utječe na stvaranje i hvatanje ROS-ova, a to djelovanje uključuje različite mehanizme. Kumarini mogu vezati Fe(III) i na taj način inhibirati formaciju hidroksilnih radikala i vodikova peroksida koji nastaju u Fentonovoj reakciji, dok neki hidroksilirani kumarini djeluju i kao inhibitori ksantin oksidaze (Vukovic i sur., 2010.; Traykova i Kostova, 2005.). Neki derivati kumarina pokazuju značajnu inhibiciju lipidne peroksidacije (Roussaki i sur., 2010.; Bailly i sur., 2004.), kao i dobru aktivnost hvatanja DPPH radikala (Bailly i sur., 2004.).

Hidroksikumarini su tipični fenolni spojevi i djeluju kao potentni kelatori metala i/ili hvatači slobodnih radikala, što im daje jaka antioksidacijska svojstva. Da bi posjedovao antioksidacijsku aktivnost kumarin mora imati barem jednu hidroksilnu skupinu (Traykova i Kostova, 2005.), jer je dokazano da su hidroksilne skupine hidroksikumarina potentni donori vodika (elektrona) slobodnim radikalima zbog delokalizacije elektrona kroz molekulu (Vukovic i sur., 2010.). Za hidroksikumarine se smatra da se ponašaju kao klasični fenolni ili kinolni antioksidansi, kod kojih hidroksilna skupina na aromatskom prstenu može provesti redukciju doniranjem elektrona slobodnom radikalu. Nastali fenoksil radikal ili semikinon su stabilizirani ili prisutnošću glomaznih ili elektron akceptirajućih skupina ili se mogu dalje oksidirati doniranjem jednog elektrona od strane druge hidroksilne skupine pri čemu nastaju kinonski produkti (Pedersen i sur., 2007.). Antioksidacijska svojstva monohidroksikumarina se povezuju s njihovom sposobnošću hvatanja slobodnih radikala i inhibicijom tirozin kinaza.

Antioksidacijska aktivnost se povećava ako je OH skupina na flavonoidnom prstenu, a smanjuje ako se vodik zamijeni metoksilnom ili metil skupinom u molekuli. Tako da je 7-metilkumarin antioksidans, 4-metilkumarin prooksidans, a 7-hidroksi-4-metilkumarin antioksidans ili prooksidans ovisno o izvoru slobodnih radikala. Ako je OH skupina u položaju 3 onda je taj spoj inhibitor 5-lipoksigenaze i α-D-glukozidaze. Dihidroksikumarini su bolji antioksidansi od monohidroksikumarina, a OH skupine blizu C6 i C7 imaju važnu ulogu u inhibiciji tirozinaze gljiva (Traykova i Kostova, 2005.). Kod jednostavnih kumarina *orto*-dihidroksi supstitucija i 3,4-dvostruka veza imaju važnu ulogu u antioksidacijskoj aktivnosti (Wua i sur., 2007.), a prisutnost kateholne skupine povećava antioksidacijsku aktivnost spoja, jer kod flavonoida i kumarina stvara rezonancijom stabilizirani radikal koji povećava sposobnost hvatanja slobodnih radikala (Roussaki i sur., 2010.). Kumarini s *orto*-dihidroksilnim skupinama, kao fraksetin i 4-metildafnetin, su potentni inhibitori lipidne peroksidacije i hvatači radikala superoksid aniona, kao i alkilperoksil radikala u vodi. Međutim, oni mogu djelovati i kao prooksidansi (povećavaju generaciju hidroksilnih radikala) u prisutnosti slobodnih iona željeza. ROS-ove hvataju keliranjem željeza i redukcijom željeznih iona (Atta-ur-Rahman, 2000.; Traykova i Kostova, 2005.). Fenolni spojevi s kateholnom skupinom (3,4-$(OH)_2$) skupinom su najjači hvatači slobodnih radikala i mogu se korisiti kao antioksidansi za kidanje lanca. Velika antiradikalska i antioksidacijska aktivnost fenolnih antiokisdanasa s kateholnom skupinom se objašnjava mogućim mehanizmom homo-disproporcionacije njihovog semikinonskog radikala koji nastaje. Aktivnost antioksidansa ne ovisi samo o strukturnim karakteristikama, već i o karakteristikama supstrata koji se oksidira i primijenjenim eksperimentalnim uvjetima (Kancheva i sur., 2010.).

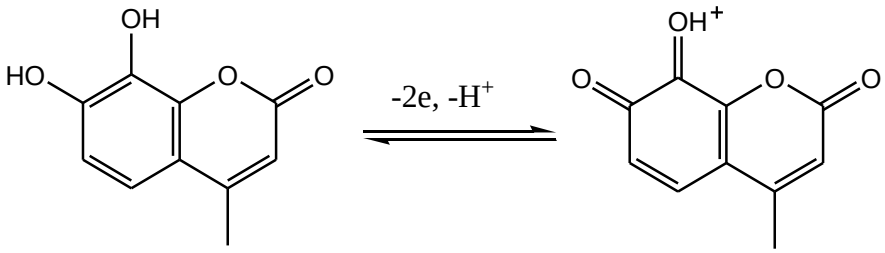
4-Metilkumarini su se pokazali kao dobri antioksidansi prema oksidaciji LDL, pri čemu je jasno vidljiv utjecaj tipa i položaja supstituenata (Natella i sur., 2010.). 4-Metilkumarini koji na sebi imaju dvije hidroksilne ili acetoksi skupine na benzenskom prstenu u *orto* položaju (u međusobnom položaju) pokazuju vrlo visoku antioksidacijsku aktivnost i sposobnost hvatanja slobodnih radikala (Malhotra i sur., 2008.). Mehanizam hvatanja azidnih radikala pomoću DHMC (7,8-dihidroksi-4-metilkumarina) i DAMC (7,8-diacetoksi-4-metilkumarina) je prema pretpostavci Malhotra i sur. (2008.) vrlo sličan mehanizmu hvatanja reaktivnih kisikovih vrsta, pri čemu oksidacijom DAMC i DHMC pomoću slobodnih radikala nastaju radikalski kationi koji

mogu otpustiti acetil karbkation pri čemu nastaje fenoksi radikal (**Slika 22**) (Malhotra i sur., 2008.).



Slika 22 Mehanizam hvatanja azidnih radikala pomoću DHMC i DAMC (Malhotra i sur., 2008.)

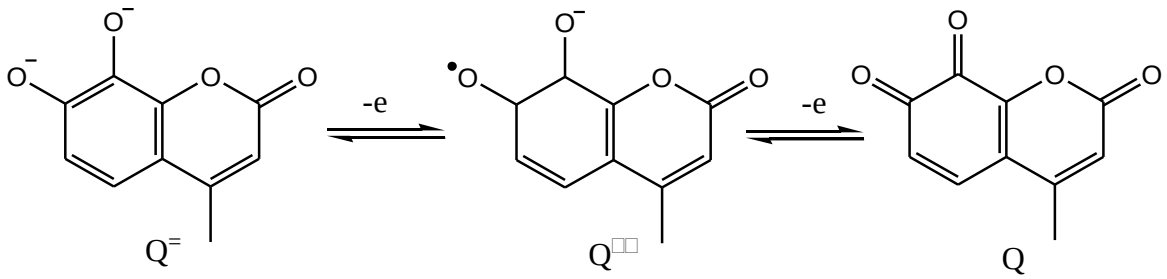
Velika aktivnost 7,8-dihidroksi-4-metilkumarina se pripisuje njegovoj većoj sposobnosti stvaranja unutarmolekularnih vodikovih veza, koja štiti OH skupine od stvaranja međumolekularnih vodikovih veza s otapalom i na taj način čuva njegovu sposobnost doniranja vodikovog atoma, tj. antioksidacijsku aktivnost (Natella i sur., 2010.). 7,8-Dihidroksi-4-metilkumarin i 7,8-diacetoksi-4-metilkumarin pokazuju snažnu aktivnost *in vivo* kao inhibitori membranske lipidne peroksidacije (Petrucci i sur., 2010.), a također je dokazano da uz izvrsnu sposobnost hvatanja slobodnih radikala, mogu zaustaviti lančanu reakciju i propagaciju lipidne peroksidacije (Malhotra i sur., 2008.). Usporedbom monohidroksi i monoacetoksikumarina i dihidroksi i diacetoksikumarina pokazalo se da *di* derivati imaju puno veću aktivnost inhibicije lipidne peroksidacije, osobito oni koji imaju dvije skupine u međusobnom *orto* polažaju na benzenskom prstenu. Oni zaustavljaju lančanu reakciju i propagaciju lipidne peroksidacije, a pokazali su se i kao izvrsni hvatači slobodnih radikala. 7-Hidroksikumarin, naime, posjeduje vrlo nisku antioksidacijsku aktivnost (Foti i sur., 1996.). Petrucci i sur. (2010.) na temelju elektrokemijskih i spektroelektrokemijskih podataka pretpostavljaju da se anodna oksidacija DHMC u aprotičnom mediju odvija u jednom koraku putem reverzibilnog mehanizma prijenosa dva elektrona, nakon kojeg slijedi prijenos H atoma i dovodi do nastanka fenoksonij kationa (**Slika 23**).



Slika 23 Nastajanje fenoksonij kationa

Prema ovom istraživanju oksidativnog mehanizma, bilo da se radi o prijenosu H atoma ili elektrona, produkt oksidacije ima reverzibilnu kinoidnu strukturu. U drugu ruku, DAMC ne bi trebao djelovati kao antioksidans, ni po jednom od ova dva mehanizma. Njegova aktivnost može biti posljedicom toga da on hidrolizira na DHMC, s potencijalnim sinergističkim djelovanjem zbog sudjelovanja acetoksi skupine u nus ili glavnoj reakciji (Petrucci i sur., 2010.).

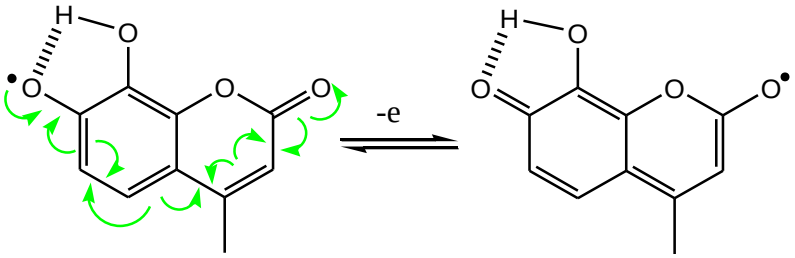
U prisutnosti dva ekvivalenta jače baze, dolazi do generacije dianiona DHMC ($Q^{=}$), a anodni proces se mijenja u mehanizam od dva koraka u kojem se prenose dva elektrona, preko radikalskog aniona (semikinon DHMC $Q^{\bullet -}$) i onda do konačnog produkta neutralne kinoidne strukture (Q) (**Slika 24**) (Petrucci i sur., 2010.).



Slika 24 Mehanizam oksidacije DHMC u prisutnosti jače baze

Dihidroksi i diacetoksi derivati kumarina pokazuju puno veću sposobnost inhibicije lipidne peroksidacije od mono derivata, a također posjeduju sposobnost zaustavljanja lančane reakcije nastajanja slobodnih radikala i propagacije lipidne peroksidacije uz izvrsnu sposobnost hvatanja slobodnih radikala. Izvrsna aktivnost hvatanja slobodnih radikala

dihidroksi derivata 4-metilkumarina se povezuje s mogućnošću *orto* dihidroksi sustava da tvori stabilni rezonancijom stabilizirani radikal (**Slika 25**) (Raj i sur., 1998.).



Slika 25 Rezonancijom stabilizirani slobodni radikal dihidroksi 4-metil kumarina

Eskuletin, koji posjeduje visoku antioksidacijsku aktivnost, suzbija aktivaciju NF-kB (transkripcijski faktor koji kontrolira ekspresiju gena koji sudjeluju u imunološkom odgovoru organizma, apoptozi i staničnom ciklusu) i ekspresiju COX-2 (ciklooksigenaza) pri čemu djeluje protuupalno, a pokazao se i dobrim u inhibiciji ksantin oksidaze kao i hvatanju ROS (Lin i sur., 2008.).

Furanokumarini su se također pokazali kao dobri hvatači DPPH radikala, što je u korelaciji s brojem fenolnih hidroksilnih skupina u njihovoj strukturi (Ćavar i sur., 2009.), dok su Tyiagi i sur. (2005.) dokazali važnost amino skupine za postizanje antioksidacijske aktivnosti 4-metilkumarina.

Prema nekim autorima i neki biljni kumarini bi mogli imati važnu ulogu kao prehrambeni antioksidansi konzumacijom nekih namirnica kao što su voće i povrće u kojima su inače prisutni (Ramesh i Pugalendi, 2005.).

2.3. KUMARINI I PLIJESNI

Osim što rast mikroorganizama narušava estetski izgled namirnica, njihova prisutnost može biti uzrokom brojnih zdravstvenih problema kod ljudi. Naime, udisanje spora i fragmenata hifa plijesni može uzrokovati alergije, infekcije i razna toksična oboljenja, ovisno o vrsti plijesni, izloženosti i općem zdravstvenom stanju osobe, dok izloženost mikotoksinima može rezultirati pojavom brojnih oboljenja, koja se jednim imenom nazivaju mikotoksikoze

(Jarvis i Miller, 2005.). Prisutnost mikotoksina u hrani za ljude ili stoku predstavlja jedan od gorućih problema današnjice, jer mikotoksini, ovisno o strukturi i razini izloženosti, mogu uzrokovati mnoštvo akutnih i kroničnih oboljenja kod ljudi i životinja (Richard, 2007.; Sforza i sur., 2006.).

Mnoge toksikogene plijesni su sveprisutne i imaju jaku ekološku povezanost s ljudskom prehranom (**Tablica 2**). Prirodnom fungalnom florom koja se javlja u svezi s prehranom dominiraju tri roda: *Aspergillus*, *Fusarium* i *Penicillium*. *Fusarium* vrste su destruktivni patogeni na žitaricama i drugim namirnicama i proizvode mikotoksine prije ili nakon žetve. Neke vrste *Aspergillusa* i *Penicilliuma* su i biljni patogeni, ali se češće povezuju s namirnicama i hranom tijekom sušenja i skladištenja. *A. flavus* i *A. parasiticus* pokazuju izraziti afinitet prema orašastim plodovima i uljaricama. *A. ochraceus* se povezuje sa sušenom hranom (Pitt, 2000.). Gubici uzrokovani bolestima nakon branja mogu biti i do 25%, a javljaju se kao rezultat lošeg rukovanja tijekom berbe, procesiranja, skladištenja i/ili transporta. U tropskim područjima gubici mogu biti i do 50% zbog povišenih temperatura pri kojima je ubrzana senescencija. Sirovi materijal, poluproizvodi i gotovi proizvodi mogu biti kontaminirani sporama i fragmentima micelija iz okoliša. Kontaminacija se može dogoditi u različitim fazama proizvodnje – tijekom rasta, zrenja ili branja na polju, tijekom prerade u tvornici i tijekom skladištenja gotovih proizvoda. *Fusarium, Alternaria, Cladosporium* i *Claviceps* su vrlo česti na usjevima u polju i mogu smanjiti kvalitetu zrna.

Tablica 2 Najčešće plijesni namirnica (Frisvad i sur., 2007.)

Skupina	Namirnica	Vrsta plijesni*
Mahunarke	Crni grah	*Alternaria alternata,* ***Aspergillus flavus, Aspergillus ochraceus****, Aspergillus parasiticus, Fusarium proliferatum, Penicillium citrinum*
Žitarice	Kukuruz	***Aspergillus flavus****, Aspergillus niger,* ***Aspergillus ochraceus, Fusarium graminearum****, Fusarium proliferatum,* ***Fusarium verticillioides****, P. citrinum*
	Riža	***Aspergillus flavus****, Asp. niger, P. citrinum*
	Raženi kruh	*Eurotium repens, Eur. rubrum, P. carneum, P. paneum, P. roqueforti*
	Sirak	*Alt. alternata,* ***Aspergillus flavus, Fusarium verticillioides****, F. semitectum, P. citrinum*
	Pšenični kruh	***Aspergillus flavus****, Eur. repens, Eur. rubrum*
	Pšenica,raž, ječam,	*Alt. tenuissima* i *infectoria* sp.-grp., ***Aspergillus***

	zob	***flavus**, Asp. parasiticus, F. avenaceum, F. culmorum, **Fusarium graminearum**, P. aurantiogriseum, P. cyclopium, P. freii, P. melanoconidium, P. polonicum, P. verrucosum*
Sir	Tvrdi sir	*Asp. versicolor, P. commune, P. discolor, P. nalgiovense, P. solitum*
Kava	Monsunska kava	*Asp. candidus, Asp. niger, Asp. tamarii*
	Tradicionalna kava	*Asp. carbonarius, Asp. steynii, Asp. westerdijkiae, P. citrinum*
Voće	Citrusi	*Alt. tangelonis, Alt. tenuissima* sp.-grp., *Alt. turkisafria, P. digitatum, P. italicum*
	Sušeno voće	*Asp. carbonarius, **Aspergillus flavus**, Asp. niger, **Aspergillus ochraceus**, Xeromyces bisporus, Wallemia sebi*
	Voćni sok	*Byssochlamys nivea, B. spectabilis (=Paecilomyces variotii), Eupenicillium* spp*., Neosartorya* spp*,. Talaromyces* spp.
	Grožđe	*Asp. carbonarius, Asp. niger, Asp. tubingensis, P. expansum*
	Komina i koštice	*Alt. arborescens* sp.-grp., *Alt. tenuissima* sp.-grp., *F. lateritium, P. crustosum, P. expansum, P. solitum*
Meso	Kobasice	*P. nalgiovense, P. nordicum, P. olsonii, P. chrysogenum, Eurotium* spp.
Orašasti plodovi	Bademi, lješnjaci, pistacije, orasi	*Alt. arborescens* sp.-grp., ***Aspergillus flavus**, Asp. niger, Asp. tamari, F. acuminatum, F. avenaceum, F. semitectum, P. crustosum, P. discolor*
Uljarice	Masline	*Alt. alternata, Asp. versicolor, P. citrinum, P. expansum*
	Kikiriki	***Aspergillus flavus**, Asp. niger*
	Suncokret	*Alt. alternata, **Aspergillus flavus**, Asp. niger, Asp. parasiticus, **Fusarium verticillioides**, F. semitectum*
Povrće	Đumbir	*P. brevicompactum*
	Luk i češnjak	*P. allii, P. glabrum, Petromyces alliaceus*
	Paprika babura	*Alt. alternata*
	Papar	***Aspergillus flavus**, Asp. parasiticus, Asp. tamarii*
	Krumpir	*Alt. alternata, Alt. solani, F. coeruleum., F. sambucinum*
	Rajčica	*Alt. alternata, Alt. subtropica, Alt. tenuissima* sp.-grp., *P. expansum, P. olsonii, P. tularense, Stemphylium eturmiunum, St. solani*
	Slatki krumpir	*Botryosphaeria rhodina, **Fusarium verticillioides**, P. sclerotigenum*
	Čips od slatkog krumpira	***Aspergillus flavus**, Asp. niger*

*Plijesni označene podebljano su bile predmet antifungalnog ispitivanja u ovom doktorskom radu.

2.3.1. Plijesni roda *Aspergillus*

2.3.1.1. *Aspergillus flavus*

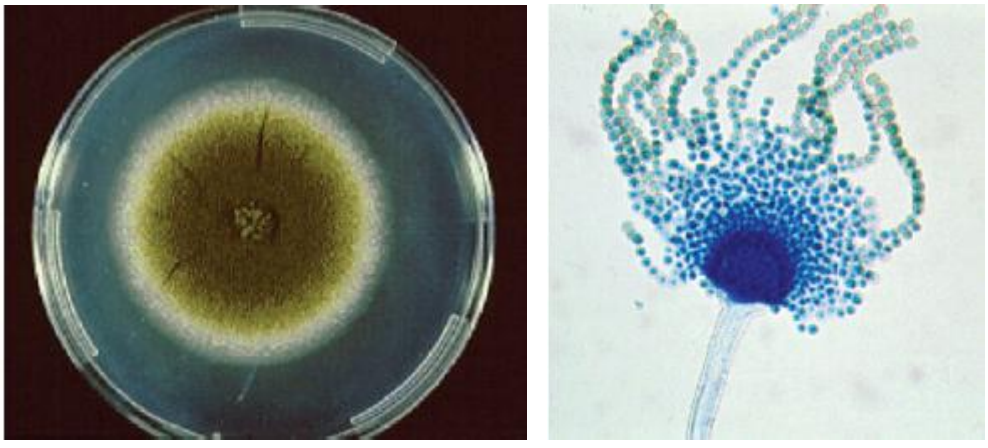
Rod *Aspergillus* uključuje preko 185 poznatih vrsta, od kojih su oko 20 poznati kao uzročnici različitih infekcija kod ljudi i životinja. Jedna od najopasnijih vrsta, uz *Aspergillus fumigatus*, je *Aspergillus flavus*, plijesan vrlo rasprostranjena u prirodi, koja uzrokuje invazivne i neinvazivne aspergiloze kod ljudi i životinja. *A. flavus* je saprofitna plijesan koja može preživjeti na mnoštvu tvari organskog podrijetla, biljnim ostacima, lišću, raspadnutom drvetu, životinjskoj hrani, pamuku, kompostu, uginulim insketima i strvinama životinja, zatvorenim (s provjetravanjem) i otvorenim prostorima, skladištenom zrnju, pa čak i na ljudima i životinjama. Optimalna temperatura za njezin rast je 28 – 37 °C, a može rasti u širokom rasponu temperatura, od 12 - 48 °C (Yu i sur., 2005.) i pri aktivitetu 0,86 – 0,96 (Hedayati i sur., 2007.). Temperaturna tolerancija pogoduje njezinoj patogenosti na ljudima i drugim toplokrvnim životinjama (Yu i sur., 2005.), a njezina sposobnost da preživi u teškim uvjetima joj omogućava da nadvlada druge organizme za supstrate na tlu ili biljkama (Hedayati i sur., 2007.). Ova plijesan se uglavnom nalazi u obliku micelija ili aseksualnih spora konidija, a u lošim uvjetima, poput suše ili nedostatne prehrane, micelij tvori strukturu koja se naziva sklerocij. Plijesan prezimi ili u obliku spore ili kao sklerocij, koji pri povoljnim uvjetima germinira i tvori nove kolonije (Yu i sur., 2005.).

Poput drugih *Aspergillus* vrsta, *A. flavus* je vrlo raširena, što je vjerojatno rezultat razvoja mnoštva konidija koje se prenose zrakom i vrlo lako dispergiraju bilo kretanjem zraka ili insektima. Boja plijesni je ljubičasta, žuta ili zelena do smeđa sa zlatnim do crveno smeđim naličjem (**Slika 26**) (Heyadati i sur., 2007.). *A. flavus* sintetizira mnoštvo sekundarnih metabolita, uključujući aflatoksine, jedne od najtoksičnijih i najpotentnijih karcinogenih prirodnih spojeva, koji uzrokuju aflatoksikoze i induciraju rak kod sisavaca. *A. flavus* je uz to i oportunistički patogen brojnih žitarica (kukuruz, pamuk, kikiriki) i kontaminira ih aflatoksinima, pri čemu uzrokuje gubitke na urodu i smanjuje njegovu kvalitetu (Yu i sur., 2005.).

Široki spektar bolesti koje uzrokuju *Aspergillus* vrste, uključujući *A. flavus* se nazivaju aspergiloze. Aspergiloze obuhvaćaju bolesti od raznih alergija, npr. alergijske bronhopulmonarne aspergiloze, do pulmonarnih aspergiloma, kao i do opasnih infekcija. U

većini slučajeva *A. flavus* izaziva ozbiljna oboljenja samo kod pojedinaca s oslabljenim imunitetom, međutim i zdravi ljudi mogu oboljeti. Na tržištu ne postoji učinkovito antifungalno sredstvo za kontrolu fungalnog rasta kod ljudi, pa su invazivne aspergiloze uglavnom fatalne. Zato postoji potreba za boljim lijekovima za tretiranje aspergiloza (Yu i sur., 2005.).

A. flavus također uzrokuje bolesti mnogih ratarskih kultura, kukuruza, pamuka, kikirikija i različitih orašastih proizvoda. Ovaj mikroorganizam je razvio mehanizam da napada sve vrste plodova, onih koji se razvijaju u tlu i iznad tla. Pod određenim povoljnim uvjetima uzrokuje pljesnivost kukuruza, a kako može rasti pri niskom aktivitetu vode, nastanjuje i sjemenke i zrna uljarica. Povišena okolna temperatura i stres kojem je biljka izložena pogoduju infekcijama ovom plijesni. Mikotoksini koje ova plijesan sintetizira su aflatoksini, B1 i B2, ciklopijazonična kiselina, kojična kiselina, β-nitropropionska kiselina, aspertoksin, aflatrem i aspergilična kiselina. Najtoksičniji i dominantni mikotoksin je aflatoksin B1, koji je hepatokarcinogen. Aflatoksin M1 je glavni metabolički proizvod aflatoksina B1 i obično se izlučuje u mlijeku i urinu mliječne stoke i drugih sisavaca, koji su konzumirali namirnice kontaminirane aflatoksinima. Aflatoksini koje proizvodi *A. flavus* su hepatotoksični i karcinogeni, ovisno o razini i trajanju izloženosti. Bolesti izazvane konzumacijom namirnica zaraženih aflatoksinima nazivaju se aflatoksikoze. Akutne aflatoksikoze nastaju kada se konzumira umjerena do visoka količina aflatoksina, a simptomi uključuju akutna oštećenja jetre, akutnu nekrozu, cirozu ili u nekim slučajevima otkazivanje jetre i smrt (Yu i sur., 2005.).



Slika 26 *Aspergillus flavus*

A. flavus se najčešće povezuje s bolesti kukuruza koja se naziva trulež kukuruza (**Slika 27**), gdje dolazi do razvoja sivo-zelenih spora na površini kukuruza, a također postoji i mogućnost biosinteze aflatoksina dok vlaga ne dostigne razinu od 15%. Visoke temperature, suša i ozljede uzrokovane insektima mogu dovesti do povećane biosinteze aflatoksina u kukuruzu (Schmale i Munkvold, 2008.)

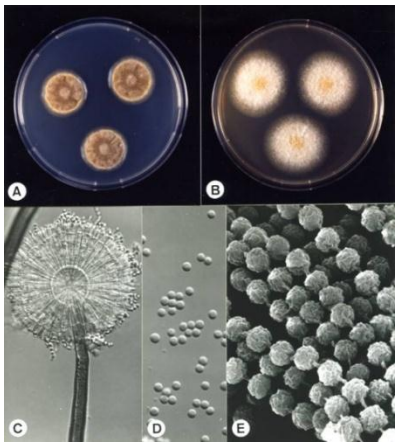


Slika 27 Trulež klipa izazvana *A. flavusom* i bolest kikirikija poznata kao žuta plijesan

2.3.1.2. *Aspergillus ochraceus*

Aspergillus ochraceus (**Slika 28**) je plijesan koja vrlo dobro raste na temperaturi 37 °C, a maksimalna temperatura rasta je 40 °C (Ožegović i Pepeljnjak, 1995.).

A. ochraceus je izoliran iz mnoštva namirnica, ali se najčešće nalazi u sušenoj i skladištenoj hrani, kao soji, paprici, sušenom voću, dimljenoj ribi, usoljenoj suhoj ribi, sušenom grahu, biltongu (vrsta sušenog mesa), slanutku, uljanoj repici, sjemenu sezama prije i nakon fermentacije, itd. Još jedan od glavnih izvora su i orašasti plodovi, kikiriki, američki orah, pistacije, lješnjaci, orasi. *A. ochraceus* je također pronađena i u žitaricama i proizvodima od žitarica, kao i u riži i ječmu, kukuruzu i kukuruznim proizvodima, snack proizvodima od žitarica, pšenici, brašnu i mekinjama. Nešto rjeđe se nalazi u začinima, manioki, crnim maslinama i mesnim prerađevinama (Pitt i Hocking, 2009.).



Slika 28 *Aspergillus ochraceus*

Mogućnost sinteze toksičnih tvari kod plijesni *A. ochraceus* je otkrivena u laboratoriju, kada su identificirana tri važna toksina – najobilniji i najtoksičniji, ohratoksin A, u manjoj količini i manje toksični ohratoksini B i C. *A. ochraceus* sintetizira i penicilinsku kiselinu i emodin (Ožegović i Pepeljnjak, 1995.). Ohratoksini su sekundarni metaboliti plijesni koji mogu kontaminirati zrna, mahunarke, kavu, sušeno voće, pivo ili vino i meso (Bayman i sur., 2002.), a po svojoj strukturi su derivat iizokumarina (Dembitsky i Zolstikov, 2004.). Oni su potentni nefrotoksini, karcinogeni, teratogeni i imunotoksini kod štakora, kao i kod ljudi (Bayman i sur., 2002.).

2.3.2. Plijesni roda *Fusarium*

Pripadnici roda *Fusarium* su široko rasprostranjene plijesni tla i znanstvenici ih vrlo često izdvajaju kao biljne patogene (Carpinella i sur., 2005.).

2.3.2.1. *Fusarium graminearum*

Optimalni raspon temperatura rasta ove plijesni je 24-26 °C u krutom i tekućem mediju pri pH 6,7 – 7,2. Minimalni a_w nužan za rast je oko 0,90 na 15 – 25 °C, dok je minimalni pH za rast ovisan o temperaturi i kreće se oko 3,0 na 25 °C i 37 °C i 2,4 na 30 °C. Maksimalni pH je oko 9,5 na 37 °C i veći od 10,2 na nižim temperaturama (Ožegović i Pepeljnjak, 1995.).



Slika 29 Makrokonidija plijesni *Fusarium graminearum* (INRA, 2011.)

F. graminearum (**Slika 29**) je primarno patogen travnatih biljaka, osobito pšenice, kukuruza i ječma, a nalazimo ga i na šećernoj repi, soji, sirku i tritikalijama, krumpiru i bundevama, kao i bananama (Pitt i Hocking, 2009.).

Osim kod pšenice, uzrokuje i bolesti kukuruza, rjeđe ječma (Pitt i Hocking, 2009.; Goswami i Kistler, 2004.), koje mogu izazvati propadanje cijelog uroda u samo nekoliko tjedana (Goswami i Kistler, 2004).



Slika 30 Klas pšenice koji pokazuje simptome bolesti fuzarijske paleži klasa uzrokovane plijesni *Fusarium graminearum*.

A – Promjene su vidljive na trećem zrnu od dolje koje pokazuje tamne nekrotične lezije te na drugom i petom zrnu (Goswami i Kistler, 2004.); B – zdrava pšenica (lijevo) i pšenica kontaminirana *F. graminearum* (desno) (Davis, 2007.)

Primarna zaraza usjeva dolazi od strane inficiranih ostataka biljaka na kojima plijesan prezimi kao saprofitski micelij. Toplo i vlažno vrijeme u proljeće pogoduje razvoju konidija i peritecija, koji proizvode askospore za vrijeme cvjetanja žitarica, koje se potom otpuštaju i prenose vjetrom, kišom ili insketima do drugih biljaka. Ova plijesan uzrokuje sterilnost klasića i formaciju bezbojnih, uvelih zrna i na taj način smanjenje prinosa i kvalitete uroda. Ovo otežava prodaju, izvoz i preradu inficiranog zrna, koje pored navedenog može sadržavati i određenu količinu trihotecena i estrogenih mikotoksina, zearalenona (Goswami i Kistler, 2004.).

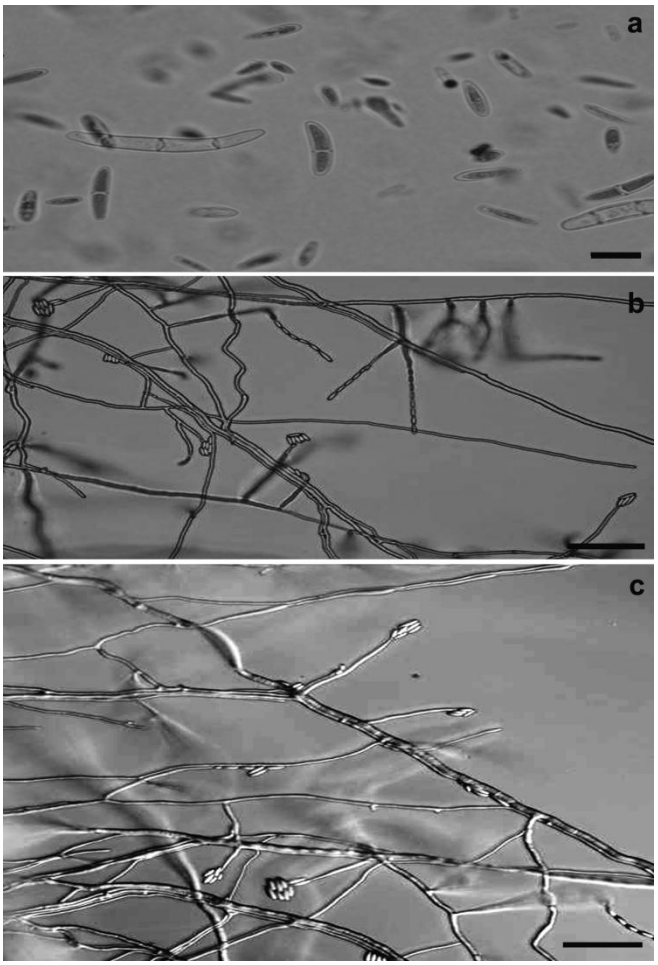
F. graminearum sintetizira mnoštvo mikotoksina, a dosad je pronađeno oko 50 toksičnih tvari. Najvažniji su trihoteceni tipa B – deoksinivalenol i njegovi derivati 3-acetildeoksinivalenol i 15-acetildeoksinivalenol, nivalenol i njegovi derivati, te zearalenon. Ostali toksini uključuju aurofuzarin, kulmorine, fuzarin C i steroide, butenolid, sambucinol, kalonektrin i slične spojeve (Ožegović i Pepeljnjak, 1995.).

Trihoteceni, kao deoksinivalenol, koji je poznat i kao vomitoksin, su seskvenoterpenoidi i potentni su inhibitori biosinteze proteina kod eukariota (Goswami i Kistler, 2004.). Akutno štetno djelovanje na životinje uključuje odbijanje hrane, proljev, alimentarno krvarenje i kontaktni dermatitis, dok se kod ljudi *F. graminearum* povezuje s alimentarnom toksičnom aleukijom, i Akakabi toksikozom, bolešću karakteriziranom mučninom, povraćanjem, anoreksijom i grčevima (Goswami i Kistler, 2004.).

Stalna upotreba fungicida na bazi benzimidazola u nekim zemljama (istočna Kina) uzrokuje pojavu otpornih sojeva ove plijesni i oni s vremenom postaju dominantni (Shi i Zhou, 2011.).

2.3.2.2. *Fusarium verticillioides*

Fusarium verticillioides (**Slika 31**) je široko rasprostranjena u tropskim i umjereno vlažnim područjima. Maksimalni raspon temperatura na kojoj raste *ova plijesan* je 32 – 37 °C, minimalni 2,5 – 5 °C, dok je optimum oko 25 °C. Minimalni a_w za rast je 0,87 na 25 °C nakon četveromjesečne germinacije (Carpinella i sur., 2005.).



Slika 31 (a) Makro- i mikrokonidija (b i c) plijesni *Fusarium verticillioides* (Pelizza i sur., 2010.)

F. verticillioides je endemski patogen na kukuruzu, gdje uzrokuje različite bolesti, a može biti prisutna u svim stadijima razvoja ove biljke i uzrokuje smanjenje prinosa i kvalitete ove žitarice. Ova plijesan je također patogen i na drugim biljkama kao sirku, riži, prosu, kao i na nekim orašastim plodovima, poput lješnjaka, američkog oraha, kikirikija, uljaricama poput suncokreta, soje, začinima (korijander, piskavica, kardamon i papar), i dr.. *Fusarium verticillioides* uzrokuje trulež naranči za vrijeme skladištenja i drugih citrusa, češnjaka, slatkog krumpira, ananasa, banana, šparoga (Pitt i Hocking, 2009.).



Slika 32 Trulež kukuruza izazvana *F. verticillioidesom* (Iglesias i sur., 2007.)

F. verticillioides može inficirati zrna bez vidljivih vanjskih simptoma, ali ipak utjecati na kvalitetu biosintezom mikotoksina, osobito fumonizina (Carpinella i sur., 2005.).

Glavni mikotoksin koji ova plijesan proizvodi je fumonizin B. Izolati plijesni *F. verticillioides* iz kukuruza dokazano proizvode fumonizine B1 i B2, ali mogu proizvoditi i fuzarine, fuzaričnu kiselinu i naftokinone (Ožegović i Pepeljnjak, 1995.). Fumonizini su prvi puta izolirani iz plijesni *Fusarium verticillioides* (stari naziv *Fusarium moniliforme*) u južnoj Africi, a najtoksičniji od fumonizina je fumonizin B1, koji se često pojavljuje na žitaricama (Asrani i sur., 2006.). Prisutnost ove plijesni ili mikotoksina koje proizvodi predstavlja veliki problem u zemljama u razvoju, gdje je kukuruz osnovna prehrambena sirovina (Carpinella i sur., 2005.). Preko kontaminiranih žitarica i namirnica dobivenih iz žitarica fumonizin B1 može uzrokovati brojne bolesti kod životinja, konjsku leukoencefalomalaciju, svinjski plućni edem i sindrom hidrotoraksa. Fumonizin B1 također uzrokuje toksičnost i rak jetre u štakora i aterosklerozu kod majmuna (Asrani i sur., 2006.), bolesti jetre i bubrega, karcinogenezu, neurotoksičnost, plućni edem, imunosupresiju ili imunostimulaciju, i ometa sfingolipidnu biosintezu inhibicijom ceramid sintaze kod ljudi i životinja (Carpinella i sur., 2005.). Nedostatak sfingolipida ometa funkciju membranskih receptora, uključujući transportere folata, što bi moglo biti objašnjenje za uočenu vezu unosa kontaminiranih proizvoda od kukuruza i većeg rizika defekta neuralne cijevi (Marasas i sur., 2004).

2.3.3. Antifungalno djelovanje kumarina

Mnoštvo je antifungalnih sredstava biljnog porijekla, koji mogu biti sastavni dio biljke ili se sintetiziraju kada se biljka nađe u određenim (nepovoljnim) uvjetima. U ovu posljednju skupinu se ubrajaju i kumarini (Sardari i sur., 1999.), koji pokazuju izvrsna antifungalna svojstva (**Tablica 3**). Biljni ekstrakti koji sadrže derivate kumarina pokazuju antifungalno djelovanje (Shi i Zhou, 2011.)., a kao dobri inhibitori rasta bakterija i plijesni, kumarini inhibiraju i one otporne na meticilin (*Staphylococcus aureus*) i flukonazol (*A. fumigatus*) (Shi i Zhou, 2011.).

Kumarin je alelokemijska tvar koja snažno inhibira plijesan *F. oxysporum* f. sp. *niveum* (Wu i sur., 2008.). Uglavnom suzbija rast hifa, sporulaciju i aktivnost enzima povezanih s patogenezom, dok snažno potiče iskorištenje mikotoksina i germinaciju konidija (Wu i sur., 2008.). Kumarin inhibira germinaciju spora plijesni *Aspergillus niger*, *Penicillium glaucum* i *Rhizopus nigricans* (Atta-ur-Rahman, 2000.).

Fungitoksična aktivnost derivata kumarina ovisi o položaju i prirodi funkcionalnih skupina na kumarinskom prstenu i supstituirani derivati kumarina su aktivniji od samog kumarina (Singh i sur., 1987.). Prisutnost fenolnih, hidroksilnih i karboksilnih skupina na kumarinskoj jezgri se smatra nužnom za postizanje antimikrobne aktivnosti (Soltani i sur., 2009.), pa su Sardari i sur. (1999.) pokazali da je za antifungalno djelovanje važna slobodna 6-OH skupina, jer se supstitucijom s alkilnim ili arilnim skupinama smanjuje aktivnost, dok alkilirani derivati 7-hidroksikumarina pokazuju antifungalno i antibakterijsko djelovanje. Osim aromatske hidroksilne skupine i dodatne oksigenirane funkcionalne skupine (eterske ili esterske) u položaju 6 ili 7 doprinose antifungalnoj aktivnosti (Sardari i sur., 1999.). Kao što se slobodna 6-OH skupina na kumarinskom prstenu pokazala važnom za postizanje antifungalne aktivnosti, slobodna 7-OH skupina se pokazala važnom za antibakterijsku aktivnost. Prilikom hidroksilacije aromatskog prstena kumarina u svrhu povećanja antifungalne aktivnosti, a prema istraživanju inhibicije rasta plijesni *F. oxysporum* i *Trichoderma harzionum*, važan je i broj hidroksilnih skupina, koje su se pokazale važnima i za postizanje antifungalne aktivnosti prema ljudskim patogenim plijesnima. Alkilacijom hidroksilnih skupina u položaju C4 i C7 također se može utjecati na antifungalnu aktivnost kumarina, koja se prema pet *Aspergillus* vrsta dramatično povećala (Atta-ur-Rahman, 2000.). Mladenović i sur. (2009.) pokazali su

važnost nitro skupine za postizanje antifungalne aktivnosti. Prema Brookeru i suradnicima (2007.; 2008.) halogenirani kumarini pokazuju snažno antifungalno djelovanje, osobito derivati halogenirani klorom.

Prisutnost esterske ili karboksilne skupine je važna i za inhibiciju Gram-pozitivnih i Gram-negativnih bakterija (Borges i sur., 2005.) i povećanje antimikrobne aktivnosti kod 7-hidroksikumarina (Farshori i sur., 2011.). Određeni derivati 7-hidroksikumarina pokazuju antifungalnu aktivnost prema kvascima *Candida parapsilosis*, *C. neoformans* i *C. albicans* (Farshori i sur., 2011.).

Herniarin (7-metoksikumarin ili ajapanin) pokazuje antifungalnu aktivnost prema *Aspergillus glaucus* i *A. flavus*, pod difuznim svjetlom i u tami (Atta-ur-Rahman, 2000.), kao i prema *Rhizoctonia solani*, *Fusarium sporotrichum*, *F. moniliforme*, *A. niger* i *Penicillium notatum* i to bolje od ketonazola, koji se obično koristi kao pozitivna kontrola, dok 4-metil-6,7-dimetoksikumarin i 6,7-dimetoksikumarin pokazuju fungicidno djelovanje (Cespedes i sur., 2006.).

Furanokumarini pokazuju fotosenzitizirajući učinak na dermatofite, a ksantotoksin prema *C. albicans* i *Cryptococcus laurentii* (Atta-ur-Rahman, 2000.). Neka *in vitro* istraživanja su pokazala kako furanokumarini suzbijaju germinaciju spora i rast micelija nekih biljnih patogena kao što je *S. sclerotiorum* (Kurdelas i sur., 2010.), dok se kao antifungalna sredstva ističu psoralen (*S. sclerotiorum*, *Alternaria brassicicola*, *Cercospora carotae*) i bergapten (*A. brassicicola*, *Penicillium expansum*, *Cercospora petroselini*) (Razavi i sur., 2010.).

Ostol, biljni kumarin izoliran iz voća *Cnidium monnieri,* pokazuje antimikrobnu aktivnost prema sljedećim fitopatogenim plijesnima: *A. alternata*, *Aspergillus* sp., *C. neoformans, B. cinerea*, *Colletotrichum musae*, *F. graminearum*, *P. capsici*, *S. sclerotiorum* i druge. *In vitro* ispitivanja pokazuju da ostol inhibira rast hifa *F. graminearuma*, a morfološka ispitivanja pokazuju da ostol uzrokuje slabljenje stanične stijenke hifa i njihovo kidanje (Shi i sur., 2008.).

Plijesan *Cladosporium cladosporioides* proizvodi izokumarin kladosporin, koji zajedno sa svojim monoacetil derivatom inhibira rast određenih *Trichophyton* vrsta, kao i *Microsporuma canisa* i *Epidermophytona floccosuma*, kao i germinaciju spora plijesni *A. niger, A. versicolor* i *A. nidulans* (Atta-ur-Rahman, 2000.).

Izokumarin oosponol, kojeg proizvodi bazidiomiceta *Gloeophyllum sepiarium,* pokazuje značajnu antifungalnu aktivnost prema *C. albicans* i *Trichophyton asteroides* (Atta-ur-Rahman, 2000.).

Tablica 3 Antifungalno djelovanje kumarina

plijesan	**kumarin**	**aktivnost**	**metoda**	**izvor**
Alternaria alternata	skopoletin	inhibicija		Shukla i sur. (1999.)
Alternaria spp.	umbeliferon, skopoletin	inhibicija germinacije konidija	ispitivanje na slajdovima	Al-Barwani i El Tayeb (2004.)
Aspergillus sp.	angelicin	inhibicija	mikrotitarske pločice	Sardari i sur. (1999.)
	5,8-di(2,3-dihidroksi-3-metilbutoksi)-psoralen	inhibicija	mikrotitarske pločice	Kwon i sur. (1997.)
Aspergillus fumigatus	(+)-4-(20-hidroksi-30-metilbut-30-eniloksi)-8H-[1,3]-dioksol-o[4,5-h]kromen-8-on	inhibicija	disk difuzijska metoda, metoda mikrodilucije bujona, ispitivanje postotka inhibicije germinacije spora	Mishra i sur. (2010.)
Aspergillu flavus	seselin	fungistatsko djelovanje		Cardenas-Ortega i sur. (2007.)
	herniarin	inhibicija	Lederbergov eksperiment	Ojala (2001.)
Byssochlamys fulva	herniarin	inhibicija	Lederbergov eksperiment	Ojala (2001.)
	skopoletin	inhibicija	Lederbergov eksperiment	Ojala (2001.)
Bipolaris spp.	umbeliferon, skopoletin	inhibicija germinacije konidija	ispitivanje na slajdovima	Al-Barwani i El Tayeb (2004.)
Candida sp.	angelicin	inhibicija	mikrotitarske pločice	Sardari i sur. (1999.)
	herniarin	inhibicija	Lederbergov eksperiment	Ojala (2001.)

	psoralen	inhibicija	disk difuzijska metoda	Bisignano i sur. (2000.)
Candida albicans	(+)-4-(20-hidroksi-30-metilbut-30-eniloksi)-8*H*-[1,3]-dioksol-o[4,5-h]kromen-8-on	inhibicija	disk difuzijska metoda, metoda mikrodilucije bujona, ispitivanje postotka inhibicije germinacije spora	Mishra i sur. (2010.)
	4-hidroksi-3-(1-(4-nitrofenilimino)etil)-2*H*-kromen-2-on	inhibicija	metoda mikrodilucije u Mueller-Hinton bujonu	Mladenović i sur. (2009.)
Cladosporium sp.	biakangelicin	inhibicija	mikrotitarske pločice	Kwon i sur. (1997.)
	oksipeucedanin	inhibicija	TLC	Marston i Hostetmann (1995.)
	oksipeucedanin hidrat	inhibicija	TLC	Marston i Hostetmann (1995.)
Cryptococcus neoformans	angelicin	inhibicija	mikrotitarske pločice	Sardari i sur. (1999.)
	(+)-4-(20-hidroksi-30-metilbut-30-eniloksi)-8*H*-[1,3]-dioksol-o[4,5-h]kromen-8-on	inhibicija	disk difuzijska metoda, metoda mikrodilucije bujona, ispitivanje postotka inhibicije germinacije spora	Mishra i sur. (2010.)
Fusarium graminearum	ostol	inhibicija	disk difuzijska metoda	Shi i sur. (2008.)
Fusarium spp.	ksantotoksin, angelicin, skopoletin	inhibicija rasta micelija	metoda papirnatih diskova	Al-Barwani i ElTayeb(2004.)
Fusarium oxysporum	kumarin	inhibicija		Wu i sur.

				(2008.)
Hanseniaspora melligeri	herniarin	inhibicija	Lederbergov eksperiment	Ojala (2001.)
Hansenula anomala	herniarin	inhibicija	Lederbergov eksperiment	Ojala (2001.)
Penicillium chrysogenum	skopoletin	inhibicija	Lederbergov eksperiment	Ojala (2001.)
Pichia chodati	herniarin	inhibicija	Lederbergov eksperiment	Ojala (2001.)
Sclerotinia sclerotiorum	imperatorin, 7-prenioksikumarin, aurapten	inhibicija		Razavi i sur. (2010.)
Saccharomyces sp.	angelicin	inhibicija	mikrotitarske pločice	Sardari i sur. (1999.)
	herniarin	inhibicija	Lederbergov eksperiment	Ojala (2001.)
Trichophyton mentagrophytes	(+)-4-(20-hidroksi-30-metilbut-30-eniloksi)-8*H*-[1,3]-dioksol-*o*-[4,5-h]kromen-8-on	inhibicija	disk difuzijska metoda, metoda mikrodilucije bujona, ispitivanje postotka inhibicije germinacije spora	Mishra i sur. (2010.)
Zygosaccharomyces sp.	herniarin	inhibicija	Lederbergov eksperiment	Ojala (2001.)

Imperatorin, 7-preniloksikumarin i aurapten, izolirani iz sjemenki *Zosima absinthifolia* (Vent) Link pokazuju antifungalno djelovanje prema *S. sclerotiorum,* s posebnim naglaskom na imperatorin (Razavi i sur., 2010.). Skopoletin, umbeliferon, ksantotoksin i herniarin pokazuju snažno inhibicijsko djelovanje na rast *F*. *culmorum* (Ojala i sur., 2000.). Od kumarina s antifungalnim svojstvima poznati su ajapin, skopoletin, skopolin, 5-metilmulein, 6-metoksimulein (Razavi i sur., 2010.), anisokimarin H i diversinin (*C. neoformans* i na dermatofite) (Kurdelas i sur., 2010.).

Yurd i King (1974.) su pokazali da se namirnice podložne mikrobnom kvarenju mogu konzervirati dodatkom određenih spojeva, među kojima su i 4-metoksikumarin i 7-

metoksikumarin, a koji osim antimikrobnog djelovanja na razne kvasce i bakterije pokazuju i antifungalno djelovanje prema plijesnima *Aspergillius glaucus*, *A. oryzae*, *A. niger*, *B. cinerea* i *Byssochlamys fulva.*

Mehanizam antifungalnog djelovanja kumarina je kompleksan i nije do kraja razjašnjen, ali oni induciraju morfološke promjene u matriksu mitohondrija, povećavajući mu gustoću, a te promjene mitohondrijalne strukture mogu izazvati manjak unutarstanične energije i tako inhibirati mitozu (Razavi, 2011.).

Unatoč raširenosti derivata kumarina u prirodi, mnogo je sintetskih kumarina koji uz ostale aktivnosti, pokazuju i značajno antifungalno djelovanje. Radulović i sur. (2006.) su sintetizirali kumarine s antifungalnom i antioksidacijskom aktivnošću, a isto tako i različiti analozi 3-supstituiranih kumarina, kao 3-aminokumarini pokazuju antimikrobnu aktivnost (Al-Haiza i sur., 2005.). Sintetski kumarini pokazuju aktivnost prema kvascima *C. albicans*, *C. neoformans*, *S. cerevisiae* i plijesni *A. niger*, a neki od njih su potvrđeni kao netoksični (Atif i sur., 2009.). Mouri i sur. (2005.) su sintetizirali kumarine, supstitucijom hidroksilne skupine na položaju 7, koji su inhibirali germinaciju *B. cinerea* spora bolje od polaznog spoja i na taj način pokazali kako je modifikacija 7-hidroksilne skupine važna za postizanje antifungalne aktivnosti. Supstitucija na eskuletinu u položaju 8 s nepolarnom skupinom pridonosi povećanju antifungalne aktivnosti (Sardari i sur., 1999.). Najučinkovitiji spojevi što se tiče inhibicije germinacije su bili oni koji su u svojoj strukturi sadržavali triklorobenzoilnu skupinu (Mouri i sur., 2005.). Rezultati drugih istraživanja, također pokazuju da halogenirani kumarini pokazuju značajnu antifungalnu aktivnost (Stewart, 2010.), osobito oni halogenirani klorom (Kalkhambar, 2011.; Brookeru i sur., 2007.; 2008.).

Spojevi koji sadrže imino skupinu, poznati kao Schiffove baze, pokazuju različita biološka svojstva, kao antibakterijska, antifungalna i antitumorska (Vukovic i sur., 2010.b; Rollas i Küçükgüzel, 2007.; Bagihallia i sur., 2009.), a prema nekim istraživanjima Schiffove baze pokazuju antimikrobnu aktivnost koja se pripisuje njihovim svojstvima keliranja (Sah i sur., 2011.).

Schiffove baze kumarina pokazuju fungicidno i baktericidno djelovanje (Ahluwalia i sur., 1983.). Sah i sur. (2011.) su prilikom ispitivanja antimikrobnog djelovanja ftalil imidazolona i Schiffovih baza pokazali važnost prisutnosti kloro, nitro, metoksi i hidroksi

skupina na fenilnom prstenu za povećanje aktivnosti, a dokazano je da Schiffove baze s halogenim supstituentima inhibiraju rast plijesni koje su od kliničkog interesa (*A. fumigatus*, *A. flavus*, *Trichophyton mentagrophytes*, *Penicillium marneffei*) (Da Silva i sur., 2011.).

Poznato je i da 1-fenil-tiosemikarbazidi, uključujući 1-fenil-tiosemikarbazid i supstituirane 1-fenil-tiosemikarbazide na fenilnom prstenu s klorom, metil ili metoksi skupinom, posjeduju fungicidna svojstva, kao i 1-fenil-4,4-disupstituirani tiosemikarbazidi (Sasse i sur., 1972.). Tiosemikarbazidi također pokazuju inhibicijsku aktivnost na neke vrste bakterija, gljiva i protozoa (Yamaguci i sur., 2009.).

Tiosemikarbazidi pokazuju baktericidna svojstva (Setnescu i sur., 2004.), a spojevi s tiazolidinonskom skupinom pokazuju široki spektar bioloških aktivnosti koje uključuju antibakterijsku, antifungalnu, antikonvulzivnu (Ronad i sur., 2010.) i antimikrobnu aktivnost (Fuloria i sur., 2009.). Patel i sur. (2010.) su sintetizirali Schiffove baze i tiazolidinone na bazi kumarina i dokazali njihovo antifungalno djelovanje.

Neki kumarini su i dobri antiaflatoksikogeni spojevi, a inhibicija je izraženija za aflatoksine u miceliju nego u filtratu kulture. Kumarini pokazuju veći utjecaj na biosintezu aflatoksina B nego aflatoksina G. Pošto su aflatoksini sami po sebi supstituirani kumarini, inhibicija njihove biosinteze kumarinima se možda događa antagonističkim djelovanjem. Moguće je da oni djeluju kao antimetaboliti ili kao kompetitivini inhibitori nekih intermedijera u biosintetskom ciklusu aflatoksina. Jedno od mogućih objašnjenja je i da se aflatoksini proizvode, ali se odmah razgrade (Malbrouk i El-Shayeb, 1992.).

3. EKSPERIMENTALNI DIO

Jedno od aktualnih područja istraživanja brojnih znanstvenika danas je očuvanje namirnica kroz što duži vremenski period, sprječavanje njihove degradacije i mikrobiološkog kvarenja. Uzroci kvarenja i propadanja namirnica su brojni, a među njima je i oštećenje komponenata namirnica izazvano oksidansima, kao i kvarenje namirnica izazvano plijesnima, direktno ili kontaminacijom produktima njihova metabolizma. Plijesni konstantno razvijaju otpornost prema već postojećim antifungalnim sredstvima, čime se javlja potreba za razvojem novih, učinkovitijih antifungalnih sredstava. To ukazuje na stalnu potrebu za iznalaženjem novih aditiva i konzervansa, koji će možda objediniti više zaštitinih svojstava u jednom proizvodu. S tom namjerom se kao sastavni dio u ovoj pristupilo sintezi novih spojeva koji će kao potencijalni dodaci različitim namirnicama zaštititi istu od djelovanja oksidanasa, kao i različitih plijesni koje se najčešće javljaju u namirnicama.

3.1. DEFINIRANJE ZADATKA

Sintetskom modifikacijom osnovne strukture kumarina, a temeljeno na dosadašnjim istraživanjima, moguće je dobiti nove molekule s poboljšanim aktivnostima i biološkim potencijalom, pa je cilj ovog rada bio sintetizirati derivate kumarina (Schiffove baze, tiosemikarbazide i 4-tiazolidinone), uz pretpostavku poboljšanja antioksidacijskih i antifungalnih svojstava prirodnih kumarina uvođenjem karakterističnih skupina. Sintetizirani spojevi su pročišćeni do analitičke čistoće, te im je određena antioksidacijska aktivnost pomoću nekoliko različitih metoda, antifungalna aktivnost, pri čemu se dobio uvid u činjenicu postoji li korelacija između navedenih svojstava, te se identificiraju molekulske strukture, koje u isto vrijeme pokazuju i antifungalna i antioksidacijska svojstva.

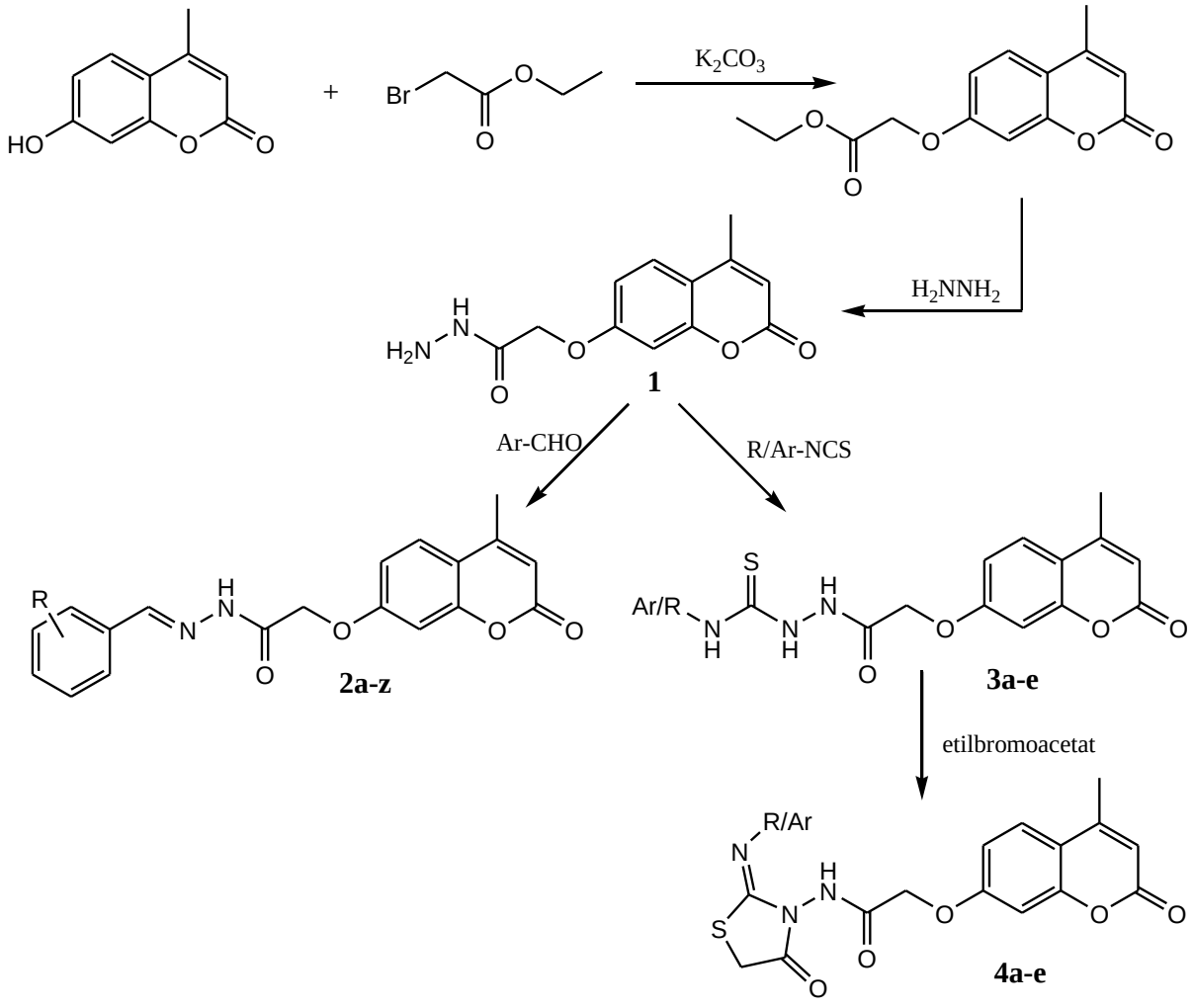
3.2. METODE

Sve potrebne kemikalije su nabavljene od komercijalnih dobavljača.

3.2.1. Sinteza derivata kumarina

Sinteza derivata kumarina (**Slika 33**) uključivala je modifikaciju polaznog spoja, 7-hidroksi-4-metilkumarina, određenim skupinama. Iz polaznog spoja se u prvom koraku esterifikacijom dobio 2-(4-metil-2-okso-2*H*-kromen-7-iloksi)etilacetat, iz kojeg se hidrazinolizom dobio hidrazid gore navedenog kumarina, 2-(4-metil-2-okso-2*H*-kromen-7-iloksi)acetohidrazid (Satyanarayana i sur. 2008.), koji je bio polazni supstrat za sintezu serije Schiffovih baza i tiosemikarbazida. Nadalje, iz sintetiziranih tiosemikarbazida, u prisutnosti etilbromoacetata, dobili su se 4-tiazolidinoni. Ovisno o primijenjenom aldehidu u postupku dobivanja Schiffovih baza, sintetizirane su iste s različitim supstituentima na fenilnom prstenu.

Nadalje, ovisno o primijenjenom izotiocijanatu, dobiveni su tiosemikarbazidi i pripadajući tiazolidinoni s određenim alkilnim i arilnim supstituentima.

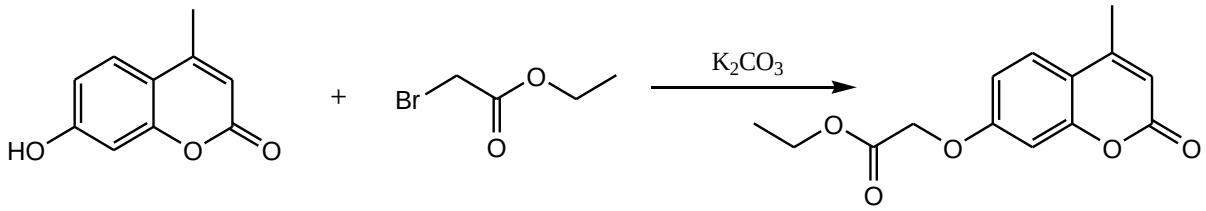


Slika 33 Shematski prikaz sinteze derivata kumarina

2	R	2	R	3,4	R/Ar
a	H	**n**	3-fenoksi	**a**	CH_3
b	2-OH	**o**	2-OH-5-NO_2	**b**	C_2H_5
c	3-OH	**p**	3,4,5-$(OCH_3)_3$	**c**	fenil
d	4-OH	**q**	2-Cl	**d**	4-metilfenil
e	2-OCH_3	**r**	3-Cl	**e**	4-metoksifenil
f	3-OCH_3	**s**	2-Br		
g	4-OCH_3	**t**	3-Br		
h	2,3-$(OH)_2$	**u**	4-Br		
i	2,4-$(OH)_2$	**v**	2-F		
j	2,5-$(OH)_2$	**w**	3-F		
k	3,4-$(OH)_2$	**x**	4-F		
l	3,5-$(OH)_2$	**y**	stiril		
m	3-OCH_3-4-OH	**z**	4-$N(CH_3)_2$		

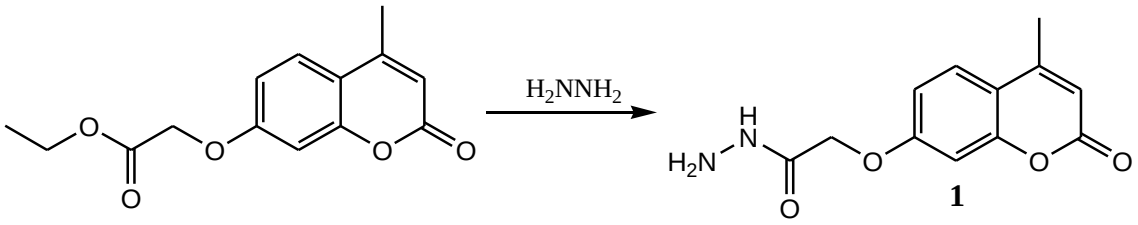
3.2.1.1. Sinteza 2-(4-metil-2-okso-2*H*-kromen-7-iloksi)etil acetata

Smjesa 7-hidroksi-4-metilkumarina (0,11 mola), bezvodnog kalijeva karbonata (0,11 mola) i etil bromoacetata (0,11 mola) zagrijavala se uz refluksiranje u acetonu (200 mL), uz miješanje, 12 sati. Po završetku reakcije, uslijedila je filtracija reakcijske smjese, uparavanje pod sniženim tlakom te prekristalizacija iz etanola.



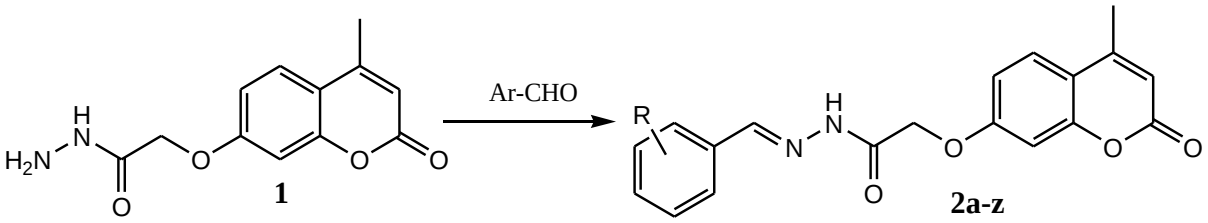
3.2.1.2. Sinteza 2-(4-metil-2-okso-2*H*-kromen-7-iloksi)acetohidrazida (1)

Otopini 2-(4-metil-2-okso-2*H*-kromen-7-iloksi)etil acetata (0,01 mol) u 20 mL metanola dodala se otopina 86% hidrazin hidrata (1,5 mL) u 10 mL metanola. Smjesa se dobro promiješala i zagrijavala uz refluksiranje oko 3 sata. Po završetku reakcije, reakcijska smjesa se ohaldila, nakon čega se istaložila krutina, koja je filtrirana i isprana metanolom. Prekristalizacijom iz razrjeđene octene kiseline se dobio željeni hidrazid **1**.



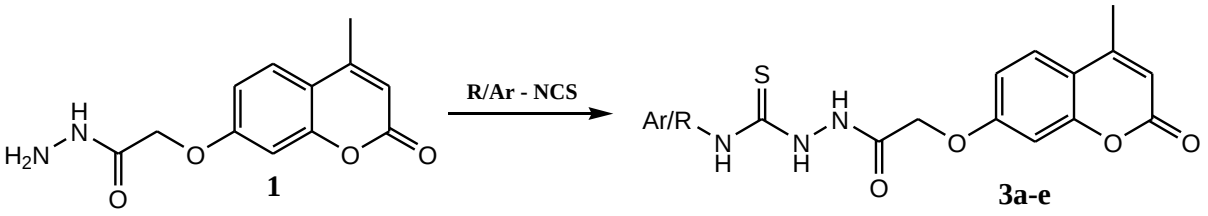
3.2.1.3. Sinteza Schiffovih baza (2a-z)

Smjesa hidrazida **1** (0,01 mol) i odgovarajućeg aromatskog aldehida (Ar/**a-z** 0,01 mol) u 30 mL etanola se refluksirala 2-4 sata u prisutnosti katalitičke količine ledene octene kiseline. Po završetku reakcije reakcijska smjesa se ohladila i prelila preko usitnjenog leda. Istaložena krutina se filtrirala, a zatim prekristalizirala iz metanola.



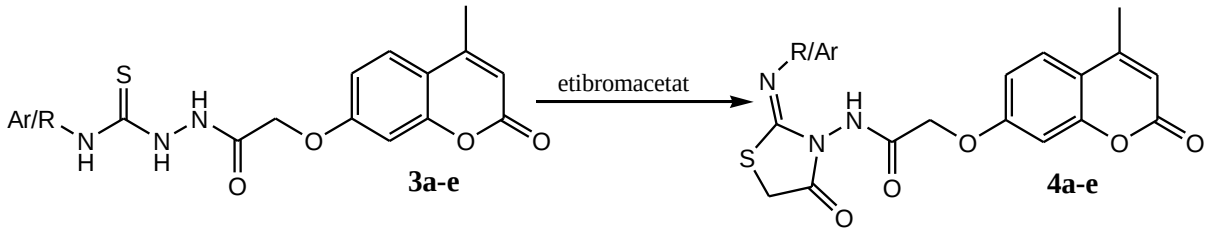
3.2.1.4. Sinteza tiosemikarbazida (3a-e)

Smjesa hidrazida **1** (0,01 mol) i određenog aromatskog ili alifatskog izotiocijanata (0,01 mol) u 50 mL etanola se zagrijavala uz refluksiranje 3 sata. Po završetku reakcije reakcijska smjesa se ohladila. Nastala krutina je filtrirana, a zatim prekristalizirana iz etanola.



3.2.1.5. Sinteza tiazolidinona (4a-e)

Tiosemikarbazid **3a-e** (0,01 mol) i etil bromoacetat (0,011 mola) su se zagrijavali uz refluksiranje oko 9 sati u 30 mL etanola u prisutnosti natrijeva acetata (0,04 mola). Po završetku reakcije reakcijska smjesa se ohladila i prelila preko usitnjenog leda. Stajanjem preko noći nastala je kruta tvar koja se filtrirala, isprala s vodom, osušila i prekristalizirala iz etanola.



3.2.2. Identifikacija i karakterizacija spojeva

Sintetskom modifikacijom 7-hidroksi-4-metilkumarina dobiveni su derivati koji su pročišćeni do analitičke čistoće, a struktura im je dokazana različitim metodama. Za spojeve koji su poznati iz literature, navedene su literaturne reference nakon naziva i oznake spoja, kao i vrijednosti za točke tališta koje su dobili drugi autori.

Identifikacija i karakterizacija spojeva uključivala je sljedeće:

- ***tankoslojnu kromatografiju*** (HF_{254} fluorescentne silikagel ploče (Merck) pod UV 254 i 365 nm, uz otapalo benzen : aceton : octena kiselina (8 : 1 : 1)) – tankoslojnom kromatografijom je praćen tijek svih reakcija. Sustav otapala benzen : aceton : octena kiselina se pokazao najpogodnijim za gore sintetizirane spojeve. Spojevi su karakterizirani R_f vrijednostima, koje se računaju na sljedeći način:

$$R_f = \frac{d(spoj)}{d(otapalo)}$$

pri čemu je:

d(spoj) – duljina puta spoja na TLC ploči u određenom sustavu otapala [cm]
d(otapalo) – duljina puta otapala na TLC ploči [cm]

- ***određivanje točaka tališta*** na uređaju za određivanje točaka tališta (Electrothermal) – spojevima pročišćenim do analitičke čistoće određene su točke tališta, koje su karakteristične za svaki pojedini spoj. Točke tališta spojeva koji su već poznati u literaturi uspoređene su s literaturnim vrijednostima i navedene u Rezultatima.

- ***spektrometriju masa*** (LC-MS/MS (API 2000, Applied Biosystems)) - U spektrometriji masa spoj se ionizira dovođenjem energije molekuli. Spektrometrijom masa dobiveni su podaci o molekularnoj masi analiziranog spoja, a rezultati su izraženi u obliku *m/z* (odnos *m/z* je veličina karakteristična za svaku vrstu iona, a kako je za većinu iona z = 1 *m/z* predstavlja masu određenog iona).

  Spojevi su otopljeni u metanolu i razrjeđeni na koncentraciju 1 μg/mL. Otopine spojeva su pomoću Hamiltonove šprice prenesene do infuzijske pumpe, kojoj je protok podešen na 10 μL/min.

- ***^{1}H NMR spektrometriju*** (Avance II 400 (Bruker) na 293 K u DMSO-d6) - spektar spoja sastoji se od niza signala koji se uspoređuju sa signalom standardnog spoja (u većini slučajeva standardni spoj predstavlja tetrametilsilan – TMS). Iz broja signala se zaključuje koliko različitih vrsta protona ima u nekoj molekuli. Položaj signala bilo kojeg protona u odnosu na proton standardnog spoja naziva se kemijski pomak i položaj signala daje informacije o elektronskoj okolini svake vrste protona. Kemijski pomak je izražen u ppm i predstavlja položaj u NMR-spektru pri kojem nastupa rezonancija pojedine jezgre u određenoj molekulskoj okolini. Površina koju zatvara krivulja signala otkriva broj protona koji se nalazi u spoju. Na jednom području spektra može postojati samo jedan signal (singlet) ili više signala (multiplet) što ovisi o strukturi i supstituentima spoja. Iz kemijskih pomaka dobiju se informacije o prisutnosti pojednih funkcionalnih grupa, a iz relativnih intenziteta o udjelima istovrsnih atoma u raznim grupama. Cijepanje signala u nekoliko linija govori o okolini protona s obzirom na druge, susjedne protone. Za ^{1}H-NMR kemijske pomake vrijedi da - što je više vodikovih atoma na jednom ugljiku (u ekvivalentnoj okolini) to je jače magnetsko zaklanjanje, a kemijski pomak pri višem polju, a δ vrijednost je manja; - elektronegativne skupine otkrivaju i pomiču NMR signale susjednih protona prema većim δ vrijednostima; - π-sustavi alkena, aromatskih spojeva i karbonili jako otkrivaju vezane protone i pomiču NMR signale prema većim δ vrijednostima.

- ***elementarnu analizu*** za C, H i N (Analyzer 2440, Perkin-Elmer) – elementarnom analizom određuju se maseni udjeli C, H, N i heteroatoma (halogeni, sumpor) u uzorku, što je vrlo važno sa stanovišta određivanja strukture nepoznatog spoja, kao i njegove čistoće. Dobivene vrijednosti se uspoređuju s računatim vrijednostima za određeni spoj, a dopušteno odstupanje je oko 0,4%. Na temelju analize dobije se uvid u sastav i čistoću spoja.

3.2.3. Ispitivanje antioksidacijske aktivnosti

Za određivanje antioksidacijske aktivnosti apsorbancija je određena na Helios *γ* UV spektrofotometru (Thermo Spectronic), a EPR na uređaju Electron Spin Resonance ESP 300 (Bruker).

3.2.3.1. DPPH metoda

Određivanje antioksidacijske aktivnosti DPPH metodom je izvršeno prema već poznatoj metodi (Manojkumar i sur., 2009.a; Wu i sur., 2007.), uz neke modifikacije. Naime, zbog slabe topivosti sintetiziranih spojeva u etanolu i metanolu, DMSO je upotrebljen kao otapalo (Taskova i sur., 2003.).

0,75 mL DMSO otopine sintetiziranog spoja (0,2 mM) se pomiješalo s 0,75 mL DMSO otopine DPPH radikala (0,2 mM), tako da je konačna koncentracija DPPH radikala i sintetiziranog spoja bila 0,1 mM. Smjesa se dobro promiješala i inkubirala na sobnoj temperaturi 30 minuta. Nakon inkubacije izmjerena je apsorbancija pri λ = 517 nm. Kao kontrola se koristila 0,1 mM otopina DPPH radikala, a kao standard askorbinska kiselina. Sposobnost hvatanja slobodnih DPPH radikala se računala prema sljedećoj formuli:

$$\%\ hvatanja\ DPPH\ radikala = \frac{A_b + A_s - A_m}{A_b} \times 100$$

gdje su A_b – apsorbancija 0,1 mM DMSO otopine DPPH radikala pri λ = 517 nm; A_s – apsorbancija 0,1 mM DMSO otopine čistog testiranog spoja pri λ = 517 nm (slijepa proba spoja); A_m – apsorbancija 0,1 mM DMSO otopine smjese testiranog spoja i DPPH radikala pri 517 nm.

3.2.3.2. Fosfomolibden metoda

Određivanje antioksidacijske aktivnosti fosfomolibden metodom se izvršilo prema poznatoj metodi Prieta i sur. (1999.). 0,1 mL DMSO otopine testiranog spoja se pomiješalo s 1 mL otopine reagensa (0,6 M sumporna kiselina, 28 mM natrijev fosfat, 4 mM amonijev molibdat). Smjesa se inkubirala na vodenoj kupelji pri 95 °C tijekom 90 minuta. Nakon inkubacije, uzorci su ohlađeni na sobnu temperaturu i odredila se apsorbancija pri λ = 695 nm. Slijepa proba se sastojala od 1 mL otopine reagensa i određenog volumena otapala koje je korišteno za otapanje uzoraka, te se inkubirala na isti način kao i uzorci. Viša vrijednost apsorbancije ukazivala je na višu antioksidacijsku aktivnost.

3.2.3.3. EPR spektroskopija

- ***DPPH radikal***

Hvatanje DPPH radikala određeno je i metodom EPR spektroskopije, radi usporedbe sa spektrofotometrijskom metodom.

Reakcijska smjesa se sastojala od 25 µL 0,2 mM DMSO otopine DPPH radikala i 25 µL 0,2 mM DMSO otpine ispitivanog spoja. Kontrolna otopina sadržavala je 0,1 mM DMSO otopinu DPPH radikala, bez antioksidansa. Kao standard koristila se askorbinska kiselina.

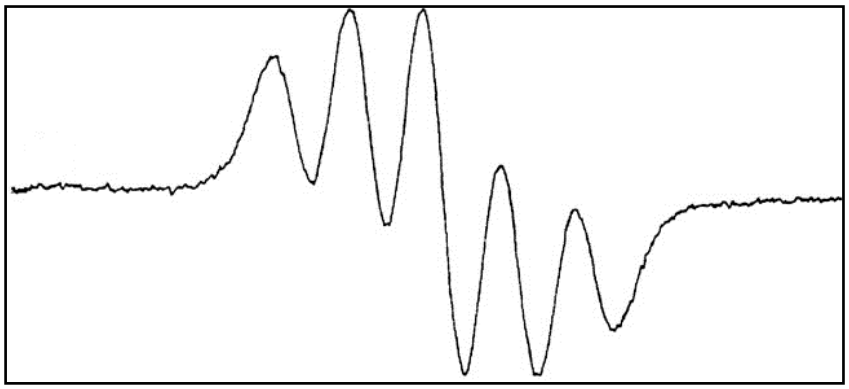
Uzorak se inkubirao 30 minuta na sobnoj temperaturi, a potom mu se mjerio EPR signal, kod sljedećih parametara:

- mikrovalna frekvencija 9,72 GHz,
- mikrovalna snaga 20 mW,
- amplituda modulacije 0,95 G,
- doseg 100 G; jačina struje 2×10^5,
- vremenski opseg mjerenja, 41,9 s.

Postotak hvatanja DPPH radikala računao se prema sljedećoj jednadžbi:

$$\%\ hvatanja\ DPPH\ radikala = \frac{h_0 - h_x}{h_0} \times 100$$

Gdje su h_x i h_0 intenziteti EPR signala DPPH radikala u prisutnosti i odsutnosti ispitivanih uzoraka.



Slika 34 EPR signal DPPH radikala

- ***Galvinoksil radikal***

Za detekciju galvinoksil radikala primijenila se EPR spektroskopija, a radikal se kvantificirao smanjenjem relativnog intenziteta signala uzorka s antioksidansom u odnosu na onaj bez antioksidansa. Za galvinoksil radikal je karakteristično da je prema nekim tvarima osjetljiviji tj. rekativniji nego DPPH radikal.

25 µL 0,2 mM DMSO otopine ispitivanog spoja se pomiješalo s 0,2 mM DMSO otopinom galvinoksil radikala i inkubiralo 20 minuta na sobnoj temperaturi. Kao standard se koristila askorbinska kiselina.

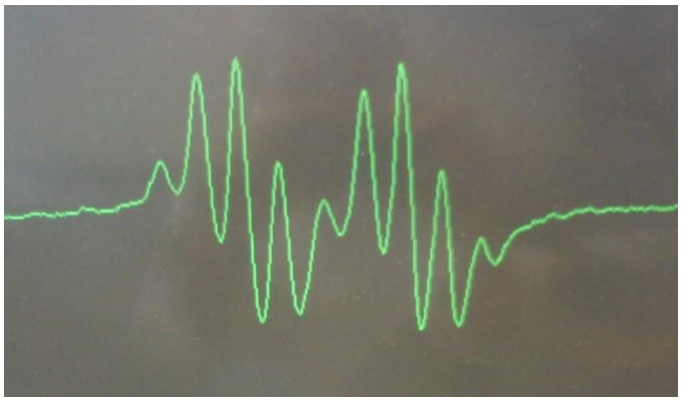
EPR signali su snimni na sobnoj temperaturi pri sljedećim uvjetima:

- mikrovalna frekvencija, 9,72 GHz,
- mikrovalna snaga, 20 mW,
- amplituda modulacije, 0,48 G,
- doseg 40 G,
- jačina struje 2×10^5,
- vremenski opseg mjerenja, 41,9 s.

Postotak hvatanja galvinoksil radikala računao se prema sljedećoj jednadžbi:

$$\%\ hvatanja\ galvinoksil\ radikala\ = \frac{h_0 - h_x}{h_0} \times 100$$

Gdje su h_x and h_0 intenziteti EPR signala glavinoksil radikala u prisutnosti i odsutnosti ispitivanog spoja.



Slika 35 EPR signal galvinoksil radikala

3.2.4. Ispitivanje antifungalne aktivnosti

Za određivanje antifungalne aktivnosti mikropločice su očitane na MRX II čitaču mikropločica (Dynex Technologies), a inkubacija je provedena u termostatskom inkubatoru AL 500-8, Aqualytic.

Antifungalno ispitivanje provedeno je prema uputama za procjenu osjetljivosti na antifungalne tvari za filamentozne plijesni CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute-Institut za kliničke i laboratorijske standarde) (2008.).

3.2.4.1. Ispitivane plijesni

Odabrane plijesni su glavni producenti mikotoksina i kontaminanti namirnica (Hussein i Brasel, 2001.): *Aspergillus flavus* (NRRL 3251); *Aspergillus ochraceus* (CBS 589.68); *Fusarium graminearum* (CBS 110250) i *Fusarium verticillioides* (CBS 119825).

3.2.4.2. Priprava inokuluma

Inokulumi su pripravljeni iz kultura uzgajanih na kosom dekstroznom agaru od krumpira (PDA - potato dextrose agar). Uzgoj *Aspergillus* vrsta provodio se na 35 °C u razdoblju od 7 dana, a *Fusarium* vrsta na 35 °C 2 dana, zatim na 25 °C 7 dana. Fungalne spore su dobivene prelijevanjem 5 mL sterilne slane otopine na kosinu kulture i uzimanjem uzorka s kosine. Broj spora u stock otopini je podešen na 10^6 CFU/mL uz pomoć Bürker-Türk komore

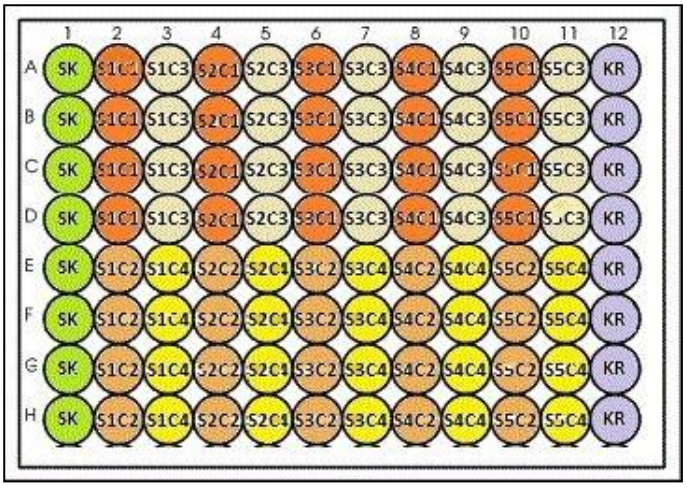
za brojanje (hemocitometar). Mutnoća svake suspenzije je kontrolirana uz pomoć 0,5 McFarland standarda pri 530 nm. Radna 2X suspenzija spora dobila se razrjeđivanjem 200 µL stock otopine u 10 mL RPMI 1640 medija prema referentnoj metodi (NCCLS, 2002.).

3.2.4.3. Medij

Za određivanje antifungalne aktivnosti koristio se RPMI 1640 medij, koji je puferiran s 0,164 M MOPS (3-(N-morfolino)propansulfonska kiselina) (34,53 g/L) i pH je podešen na 7 uz pomoć 1 M NaOH. Sterilizacija medija provela se filtracijom kroz 0,45 µm filter.

3.2.4.4. Razrjeđivanje uzoraka

Ispitivani spojevi su razrijeđeni prema shemi opisanoj u NCCLS M28-A metodi za spojeve netopive u vodi (NCCLS, 2002; Andrews 2001). Otopine spojeva su prvo razrjeđene 20X u 100% DMSO, zatim do konačne koncentracije 1 i 0,1 µg/mL. Sve otopine ispitivanih spojeva su sterilizirane filtracijom kroz 0,45 µm filtere. Za ovaj test su se koristile sterilne polipropilenske mikrotitarske pločice (96 U-shaped wells; Brand, Wertheim, Germany). Nanošenje spojeva na pločicu je prikazano na **Slici 36.** Kolone 2-11 sadržavale su 100 µL otopine ispitivanih spojeva i 100 µL 2X suspenzije spora. Prva kolona sadržavala je 200 µL neinokuliranog medija bez prisutnosti ispitivanog spoja (SK), dok je 12. kolona sadržavala 100 µL medija i 100 µL inokuluma i predstavljala je kontrolu rasta (KR) (konačni volumen u svakoj jažici bio je 200 µL).



Slika 36 Raspored uzoraka na mikrotitarskoj pločici

Koncentracije potencijalnih antifungalnih sredstava, derivata kumarina, su odabrane na temelju spoznaja o MIC pojedinih poznatih antifungalnih sredstava (amfotericin B, itrakonazol, posakonazol, raukonazol, vorikonazol) koji se kreće od oko 0,06 do > 16 μg/mL (Espinel-Ingroff i Canton, 2007.).

3.2.4.5. Inkubacija i određivanje MIC

Nakon inokulacije pločice su inkubirane na 35 °C u atmosferskom inkubatoru 48 sati, nakon čega su očitane na čitaču pločica MRX II pri 450 nm. Svi uzorci su ponovljeni u 4 paralele. Minimalna inhibitorna koncentracija za inhibiciju rasta stanica (MIC) je definirana kao najniža koncentracija koja reducira optičku gustoću za određeni %-ak pri 450 nm u usporedbi s kontrolom (Santos i sur., 2010.; Clement i sur., 2008.).

Postotak inhibicije rasta plijesni računat je prema sljedećem izrazu (j.3.) (Patton i sur., 2006.):

$$inhibicija\ rasta\ (\%) = \frac{OD_{kontrola} - OD_{uzorak}}{OD_{kontrola}} \times 100 \qquad \text{j.3.}$$

3.2.5. Statistička obrada

Statistička obrada podataka uključivala je određivanje koeficijenata korelacije (Pearsonovom metodom) između podataka dobivenih različitim metodama antioksidacijske aktivnosti, kao i podataka dobivenih za antioksidacijsku i antifungalnu aktivnost, pri $p < 0,05$, kao i provedbu student t-testa, u programskom paketu Statistica 8.0 (StatSoft).

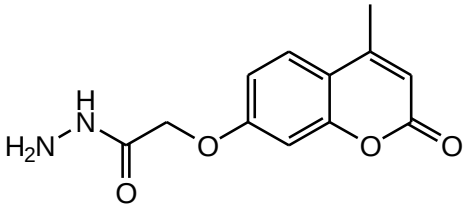
4. REZULTATI

4.1. IDENTIFIKACIJA I KARAKTERIZACIJA DERIVATA KUMARINA

Struktura i čistoća derivata kumarina određena je različitim metodama, a rezultati svake od njih su navedeni uz svaki pojedini spoj. Rezultati nepobitno ukazuju na činjenicu da su strukture novosinteitziranih spojeva potvrđene, kao i čistoća pojedinih spojeva.

2-(4-Metil-2-okso-2H-kromen-7-iloksi)acetohidrazid (1) (Ahluwalia i sur., 1983.)

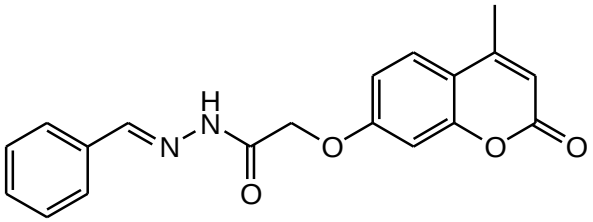
T_t = 198 - 202 °C; lit. 202 - 205 °C (Ahluwalia i sur., 1983.)); I = 82%; R_f = 0,40; MS *m/z:* 249,1 [M + H^+], (M = 248,23).



4.1.1. Schiffove baze

(E)-N'-Benziliden-2-(4-metil-2-okso-2H-kromen-7-iloksi)acetohidrazid (2a) (Satyanarayana i sur. 2008.; Ahluwalia i sur., 1983.)

T_t = 255 °C (lit. 276 - 278 °C (Satyanarayana i sur. 2008.); 255 - 257 °C (Ahluwalia i sur., 1983.)); I = 78%; R_f = 0,57.



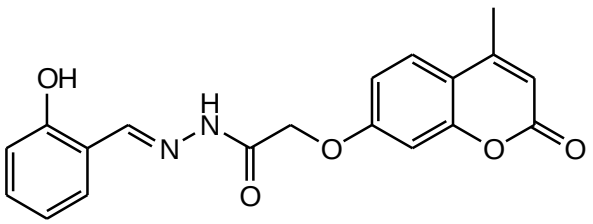
MS *m/z:* 335,5 [M - H^+], (M = 336,34).

^{1}H NMR δ (ppm): 2,40 (s, 3H, CH_3, C-4); 4,81 (s, 2H, OCH_2); 6,21 (s, 1H, C-3); 6,23 (d, 1H, H-6); 6,95 (s, 1H, H-8), 7,70 (d, 1H, H-5); 6,94-7,71 (m, 5H, arom.,); 8,33 (s, 1H, NH); 8,56 (s, 1H, HC=N-).

Računato za $C_{19}H_{16}N_2O_4$ (352,34): C 67,85; H 4,79; N 8,33. Nađeno: C 67,81; H 4,75; N 8,37%.

(E)-N'-(2-Hidroksibenziliden)-2-(4-metil-2-okso-2H-kromen-7-iloksi)acetohidrazid (2b) (Ahluwalia i sur., 1983.)

T_t = 284 – 286 °C (lit. 295 - 297 °C (Ahluwalia i sur., 1983.)); I = 72%; R_f = 0,47.



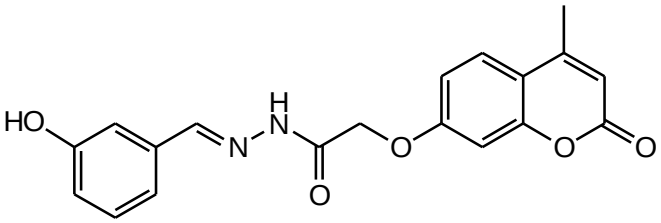
MS *m/z:* 351,1 [M - H^+], (M = 352,34).

^{1}H NMR δ (ppm): 2,41 (s, 3H, CH_3, C-4); 4,85 (s, 2H, OCH_2); 6,25 (s, 1H, C-3); 6,87 (s, 1H, H-8), 6,98 (d, 1H, H-6); 7,85 (d, 1H, H-5); 7,25-7,75 (m, 4H, arom.,) 8,33 (s, 1H, NH); 8,56 (s, 1H, HC=N-); 10,99 (s, 1H, OH).

Računato za $C_{19}H_{16}N_2O_5$ (352,34): C 64,77; H 4,58; N 7,95. Nađeno: C 64,76; H 4,55; N 7,92%.

(E)-N'-(3-Hidroksibenziliden)-2-(4-metil-2-okso-2H-kromen-7-iloksi)acetohidrazid (2c)

T_t = 250 °C; I = 96%; R_f = 0,43.



MS *m/z:* 353,3 [M + H^+], (M = 352,34).

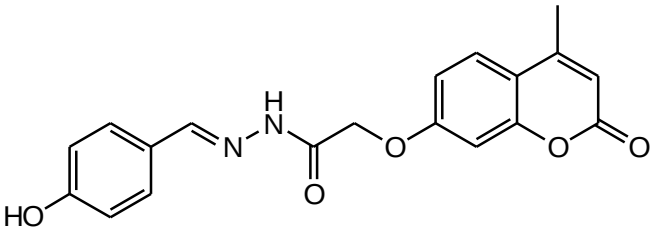
^{1}H NMR δ (ppm): 2,40 (s, 3H, CH_3, C-4); 4,80 (s, 2H, OCH_2); 6,21 (s, 1H, C-3); 6,83 (s, 1H, H-8), 6,96 (d, 1H, H-6); 7,69 (d, 1H, H-5); 6,81-7,71 (m, 4H, arom.,) 7,93 (s, 1H, NH); 8,23 (s, 1H, HC=N-); 9,63 (s, 1H, OH).

Računato za $C_{19}H_{16}N_2O_5$ (352,34): C 64,77; H 4,58; N 8,95. Nađeno: C 64,74; H 4,57; N 7,92%.

(E)-N'-(4-Hidroksibenziliden)-2-(4-metil-2-okso-2H-kromen-7-iloksi)acetohidrazid (2d)

(Satyanarayana i sur. 2008.; Ahluwalia i sur., 1983.)

T_t = 273 °C (lit. 280 - 282 °C); I = 96%; R_f = 0,41.



MS *m/z:* 353,3 [M + H^+], (M = 352,34).

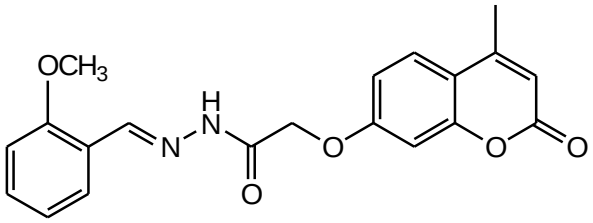
^{1}H NMR δ (ppm): 2,39 (s, 3H, CH_3, C-4); 4,77 (s, 2H, OCH_2); 6,21 (s, 1H, C-3); 6,82 (s, 1H, H-8), 6,95 (d, 1H, H-6); 7,69 (d, 1H, H-5); 6,80-7,71 (m, 4H, arom.,) 7,91 (s, 1H, NH); 8,20 (s, 1H, HC=N-); 9,93 (s, 1H, OH).

Računato za $C_{19}H_{16}N_2O_5$ (352,34): C 64,77; H 4,58; N 8,95. Nađeno: C 64,75; H 4,56; N 7,92%.

(E)-N'-(2-Metoksibenziliden)-2-(4-metil-2-okso-2H-kromen-7-iloksi)acetohidrazid (2e)

(Ahluwalia i sur., 1983.)

T_t = 159 °C (lit. 163 - 165 °C (Ahluwalia i sur., 1983.)); I = 98%; R_f = 0,64.



MS *m/z:* 365,3 [M - H^+], (M = 366,12).

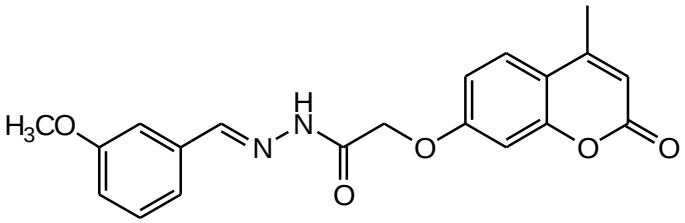
^{1}H NMR δ (ppm): 2,39 (s, 3H, CH_3, C-4); 3,85 (s, 3H, OCH_3); 4,78 (s, 2H, OCH_2); 6,21 (s, 1H, C-3); 6,96 (s, 1H, H-8), 7,00 (d, 1H, H-6); 7,67 (d, 1H, H-5); 6,80-7,71 (m, 4H, arom.,) 7,89 (s, 1H, NH); 8,35 (s, 1H, HC=N-).

Računato za $C_{20}H_{18}N_2O_5$ (352,34): C 65,57; H 4,95; N 7,65. Nađeno: C 65,55; H 4,96; N 7,63%.

(E)-N'-(3-Metoksibenziliden)-2-(4-metil-2-okso-2H-kromen-7-iloksi)acetohidrazid (2f)

T_t = 200 °C; I = 98%; R_f = 0,61.

MS *m/z:* 365,3 [M - H^+], (M = 366,12).



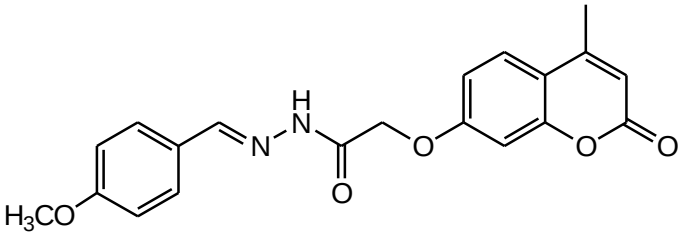
^{1}H NMR δ (ppm): 2,39 (s, 3H, CH_3, C-4); 3,79 (s, 3H, OCH_3); 4,81 (s, 2H, OCH_2); 6,21 (s, 1H, C-3); 6,96 (s, 1H, H-8), 7,00 (d, 1H, H-6); 7,69 (d, 1H, H-5); 6,98-7,67 (m, 4H, arom.,) 7,98 (s, 1H, NH); 8,29 (s, 1H, HC=N-).

Računato za $C_{20}H_{18}N_2O_5$ (352,34): C 65,57; H 4,95; N 7,65. Nađeno: C 65,59; H 4,94; N 7,65%.

(E)-N'-(4-Metoksibenziliden)-2-(4-metil-2-okso-2H-kromen-7-iloksi)acetohidrazid (2g)

T_t = 263 °C; I = 92%; R_f = -.

MS *m/z:* 365,2 [M - H^+], (M = 366,12).

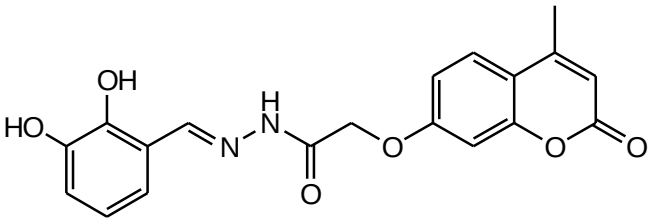


^{1}H NMR δ (ppm): 2,40 (s, 3H, CH_3, C-4); 3,80 (s, 3H, OCH_3); 4,78 (s, 2H, OCH_2); 6,22 (s, 1H, C-3); 6,98 (s, 1H, H-8), 7,00 (d, 1H, H-6); 7,68 (d, 1H, H-5); 6,96-7,70 (m, 4H, arom.,) 7,96 (s, 1H, NH); 8,26 (s, 1H, HC=N-).

Računato za $C_{20}H_{18}N_2O_5$ (352,34): C 65,57; H 4,95; N 7,65. Nađeno: C 65,59; H 4,92; N 7,66%.

(E)-N´-(2,3-Dihidroksibenziliden)-2-(4-metil-2-okso-2H-kromen-7-iloksi)acetohidrazid (2h)

T_t = 270 –274 °C; I = 63%; R_f = 0,16.



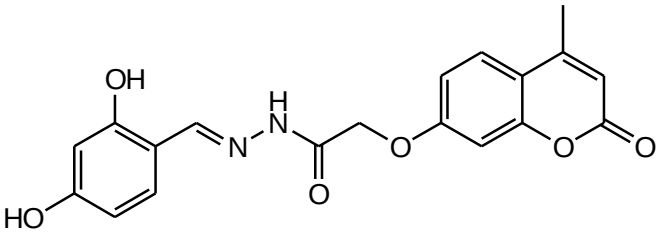
MS *m/z:* 367,5 [M - H^+], (M = 368,34).

^{1}H-NMR δ (ppm): 2,40 (s, 3H, CH_3, C-4); 4,84 (s, 2H, OCH_2); 6,24 (s, 1H, H-3); 6,73 (s, 1H, H-8); 6,85 (d, 1H, H-6); 7,19 (d, 1H, H-5); 6,90-7,75 (m, 3H, arom.); 8,32 (s, 1H, NH); 8,52 (s, 1H, HC=N-); 9,27 (s, br., 1H, OH); 11,59 (s, br., 1H, OH).

Računato za $C_{19}H_{16}N_2O_6$ (368.34): C 61,95; H 4,38; N 7,61. Nađeno: C 61,93; H 4,36; N 7,59 %.

(E)-N´-(2,4-Dihidroksibenziliden)-2-(4-metil-2-okso-2H-kromen-7-iloksi)acetohidrazid (2i)

T_t = 261 – 262 °C; I = 48%; R_f = 0,73.



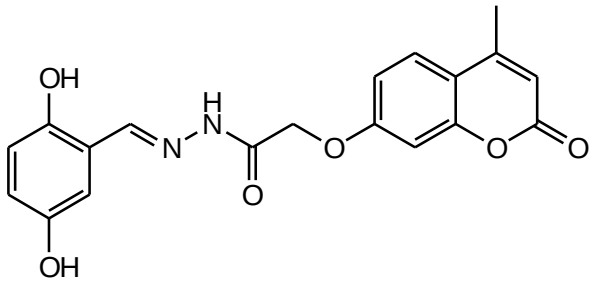
MS *m/z:* 367,3 [M - H^+], (M = 368,34).

^{1}H-NMR δ (ppm): 2,40 (s, 3H, CH_3, C-4); 4,84 (s, 2H, OCH_2); 6,24 (s, 1H, H-3); 6,73 (s, 1H, H-8); 6,85 (d, 1H, H-6); 7,20 (d, 1H, H-5); 6,90-7,75 (m, 3H, arom.); 8,32 (s, 1H, NH); 8,52 (s, 1H, HC=N-); 10,12 (s, br., 1H, OH); 11,40 (s, br., 1H, OH).

Računato za $C_{19}H_{16}N_2O_6$ (368,34): C 61,95; H 4,38; N 7,61. Nađeno: C 61,93; H 4,39; N 7,59%.

(E)-N´-(2,5-Dihidroksibenziliden)-2-(4-metil-2-okso-2H-kromen-7-iloksi)acetohidrazid (2j)

T_t = 273 – 274 °C; I = 41%; R_f = 0,27.



MS *m/z:* 367,4 [M - H^+], (M = 368,34).

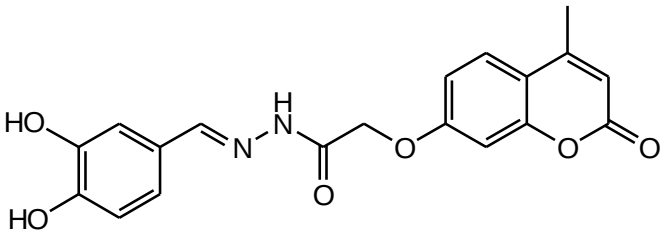
^{1}H-NMR δ (ppm): 2,40 (s, 3H, CH_3, C-4); 4,84 (s, 2H, OCH_2); 6,24 (s, 1H, H-3); 6,73 (s, 1H, H-8); 6,85 (d, 1H, H-6); 7,20 (d, 1H, H-5); 6,90-

7,75 (m, 3H, arom.,); 8,32 (s, 1H, NH); 8,52 (s, 1H, HC=N-); 9,26 (s, br., 1H, OH); 11,93 (s, br., 1H, OH).

Računato za $C_{19}H_{16}N_2O_6$ (368,34): C 61,95; H 4,38; N 7,61. Nađeno: C 61,92; H 4,37; N 7,62 %.

(E)-N´-(3,4-Dihidroksibenziliden)-2-(4-metil-2-okso-2H-kromen-7-iloksi)acetohidrazid (2k)

T_t = 243 – 244 °C; I = 38%.; R_f = 0,29.



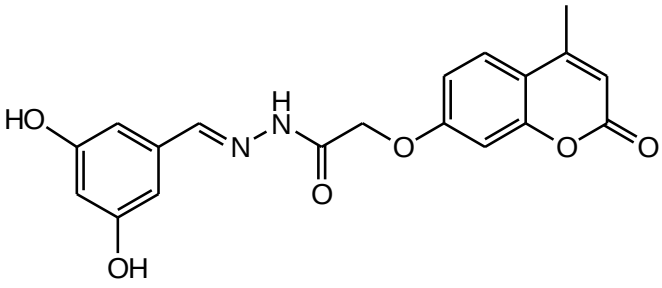
MS *m/z:* 367,3 [M - H^+], (M = 368,34).

^{1}H-NMR δ (ppm): 2,40 (s, 3H, CH_3, C-4); 4,84 (s, 2H, OCH_2); 6,24 (s, 1H, H-3); 6,73 (s, 1H, H-8); 6,85 (d, 1H, H-6); 7,20 (d, 1H, H-5); 6,90-7,75 (m, 3H, arom.); 8,32 (s, 1H, NH); 8,52 (s, 1H, HC=N-); 9,35 (s, br., 1H, OH); 10,14 (s, br., 1H, OH).

Računato za $C_{19}H_{16}N_2O_6$ (368,34): C 61,95; H 4,38; N 7,61. Nađeno: C 61,90; H 4,35; N 7,62%.

(E)-N´-(3,5-Dihidroksibenziliden)-2-(4-metil-2-okso-2H-kromen-7-iloksi)acetohydrazid (2l)

T_t = 272 °C; I = 85%.; R_f = 0,20.



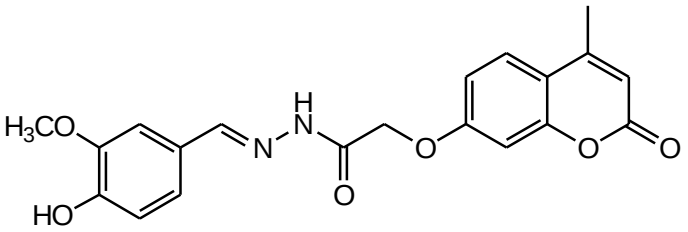
MS *m/z:* 367,3 [M - H^+], (M = 368,34).

^{1}H-NMR δ (ppm): 2,40 (s, 3H, CH_3, C-4); 4,84 (s, 2H, OCH_2); 6,24 (s, 1H, H-3); 6,73 (s, 1H, H-8); 6,85 (d, 1H, H-6); 7,20 (d, 1H, H-5); 6,90-7,75 (m, 3H, arom.); 8,32 (s, 1H, NH); 8,52 (s, 1H, HC=N-); 10,35 (s, br., 1H, OH); 11,25 (s, br., 1H, OH).

Računato za $C_{19}H_{16}N_2O_6$ (368,34): C 61,95; H 4,38; N 7,61. Nađeno: C 61,90; H 4,35; N 7,62%.

(E)-N´-(4-Hidroksi-3-metoksibenziliden)-2-(4-metil-2-okso-2H-kromen-7-iloksi) acetohidrazid (2m) (Satyanarayana i sur. 2008.; Ahluwalia i sur., 1983.)

T_t = 253 – 254 °C (lit. 258 – 260 °C (Satyanarayana i sur. 2008.); 240 °C (Ahluwalia i sur., 1983.)); I = 76%; R_f = 0,57.



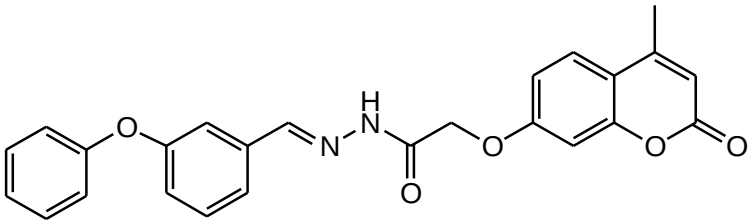
MS *m/z:* 381,3 [M - H^+], (M = 382,37). ^{1}H-NMR δ (ppm): 2,40 (s, 3H, CH_3, C-4); 3,82 (3H, s, OCH_3); 4,84 (s, 2H, OCH_2); 6,24 (s, 1H, H-3); 6,73 (s, 1H, H-8); 6,85 (d, 1H, H-6); 7,20 (d, 1H, H-5); 6,90-7,75 (m, 3H, arom.); 8,32 (s, 1H, NH); 8,52 (s, 1H, HC=N-); 11,50 (s, br., 1H, OH).

Računato za $C_{20}H_{18}N_2O_6$ (382,37): C 62,82; H 4,74; N 7,33. Nađeno: C 62,79; H 4,73; N 7,31%.

(E)-N´-(3-Fenoksibenziliden)-2-(4-metil-2-okso-2H-kromen-7-iloksi)-acetohidrazid (2n)

T_t = 178 – 180 °C; I = 72%; R_f = 0,82.

MS *m/z:* 427,5 [M - H^+], (M = 428,44).



^{1}H-NMR δ (ppm): 2,40 (s, 3H, CH_3, C-4); 4,81 (s, 2H, OCH_2); 6,24 (s, 1H, H-3); 6,73 (s, 1H, H-8); 6,85 (d, 1H, H-6); 7,20 (d, 1H, H-5); 6,90-7,75 (m, 9H, arom.,); 8,32 (s, 1H, NH); 8,52 (s, 1H, HC=N-).

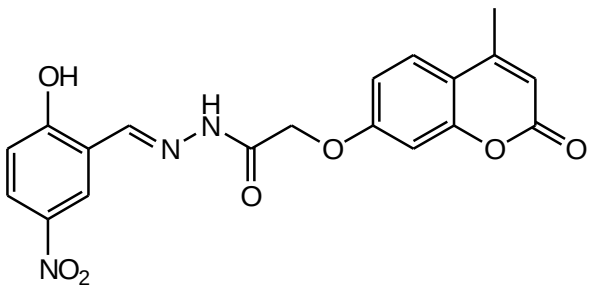
Računato za $C_{25}H_{20}N_2O_5$ (428,44): C 70,08; H 4,71; N 6,54. Nađeno: C 70,10; H 4,72; N 6,55%.

(E)-N´-(2-Hidroksi-5-nitrobenziliden)-2-(4-metil-2-okso-2H-kromen-7-iloksi)acetohidrazid (2o)

T_t = 288 – 290 °C; I = 90%; R_f = 0,49.

MS *m/z:* 396,4 [M - H^+], (M = 397,34).

^{1}H NMR δ (ppm): 2,40 (s, 3H, CH_3, C-4); 4,85 (s, 2H, OCH_2); 6,24 (s, 1H, H-3); 6,73 (s, 1H, H-

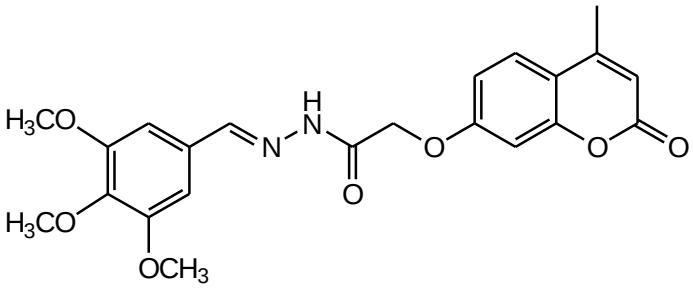


8); 6,85 (d, 1H, H-6); 7,20 (d, 1H, H-5); 6,90-7,75 (m, 3H, arom.); 8,32 (s, 1H, NH); 8,52 (s, 1H, HC=N-); 11,59 (s, br., 1H, OH).

Računato za $C_{19}H_{15}N_3O_7$ (397,34): C 57,43; H 3,81; N 10,58. Nađeno: C 57,40; H 3,82; N 10,54%.

(E)-N´-(3,4,5-Trimetoksibenziliden)-2-(4-metil-2-okso-2H-kromen-7-iloksi)acetohidrazid (2p)

T_t = 197 °C; I = 96%; R_f = 0,46.



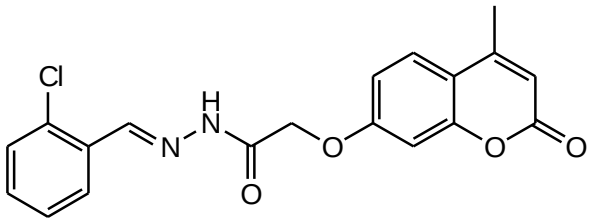
MS *m/z:* 425,3 [M - H^+], (M = 426,4).

^{1}H NMR δ (ppm): 2,39 (s, 3H, CH_3, C-4); 3,69 (s, 3H, OCH_3, C'-4); 3,81 (s, 6H, OCH_3, C'-3, C'-5); 4,81 (s, 2H, OCH_2); 6,21 (s, 1H, C-3); 7,00 (s, 1H, H-8), 7,03 (d, 1H, H-6); 7,67 (d, 1H, H-5); 6,94-7,71 (m, 4H, arom.,) 7,93 (s, 1H, NH); 8,24 (s, 1H, HC=N-).

Računato za $C_{22}H_{22}N_2O_7$ (352,34): C 61,97; H 5,20; N 6,57. Nađeno: C 61,99; H 5,16; N 6,54%.

(E)-N´-(2-Klorobenziliden)-2-(4-metil-2-okso-2H-kromen-7-iloksi)acetohidrazid (2q)

T_t = 248 – 250 °C; I = 82%; R_f = 0,77.



MS *m/z:* 369,4 [M - H^+], (M = 370,79).

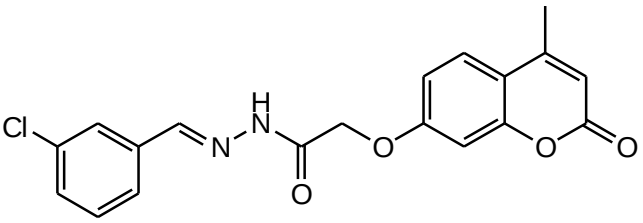
^{1}H-NMR δ (ppm): 2,40 (s, 3H, CH_3, C-4); 4,84 (s, 2H, OCH_2); 6,22 (s, 1H, H-3); 6,99 (s, 1H, H-8); 7,05 (d, 1H, H-6); 7,39-7,75 (m, 4H, arom.); 8,06 (d, 1H, H-5); 8,41(s, 1H, NH); 8,74 (s, 1H, HC=N-).

Računato za $C_{19}H_{15}ClN_2O_4$ (370,79): C 61,55; H 4,08; N 7,56. Nađeno: C 61,57; H 4,08; N 7,53%.

(E)-N´-(3-klorobenziliden)-2-(4-metil-2-okso-2H-kromen-7-iloksi)acetohidrazid (2r)

(Satyanarayana i sur. 2008.)

T_t = 242 – 244 °C (lit. 266 – 268 °C); I = 80%; R_f = 0,64.



MS *m/z:* 369,4 [M - H^+], (M = 370,79).

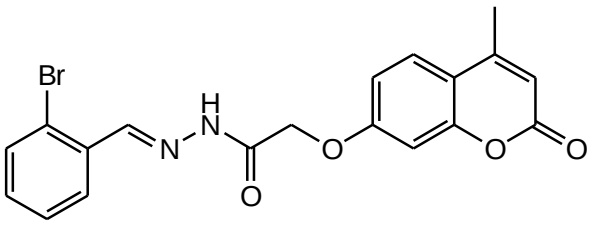
^{1}H-NMR δ (ppm): 2,40 (s, 3H, CH_3, C-4); 4,82 (s, 2H, OCH_2); 6,23 (s, 1H, H-3); 6,98 (s, 1H, H-8); 7,02 (d, 1H, H-6); 7,20 (d, 1H, H-5); 7,41-7,74 (m, 4H, arom.); 8,00 (s, 1H, NH); 8,31 (s, 1H, HC=N-).

Računato za $C_{19}H_{15}ClN_2O_4$ (370,79): C 61,55; H 4,08; N 9,56. Nađeno: C 61,54; H 4,07; N 7,53%.

(E)-N´-(2-Bromobenziliden)-2-(4-metil-2-okso-2H-kromen-7-iloksi)acetohidrazid (2s)

T_t = 217 °C; I = 95%; R_f = 0,71.

MS *m/z:* 414,1 [M - H^+], (M = 415,24).



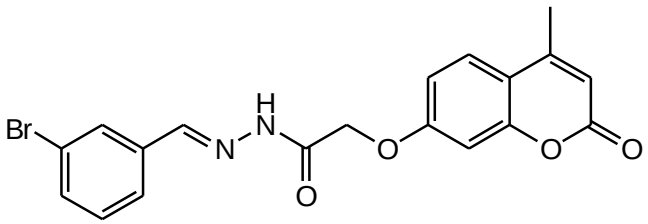
^{1}H-NMR δ (ppm): 2,40 (s, 3H, CH_3, C-4); 4,83 (s, 2H, OCH_2); 6,21 (s, 1H, H-3); 6,99 (s, 1H, H-8); 7,01 (d, 1H, H-6); 7,67 (d, 1H, H-5); 7,03-7,69 (m, 4H, arom.); 8,36 (s, 1H, NH); 8,68 (s, 1H, HC=N-).

Računato za $C_{19}H_{15}BrN_2O_4$ (415,24): C 54,96; H 3,64; Br 19,24; N 6,75. Nađeno: C 54,98; H 3,61; Br 19,20; N 6,78%.

(E)-N´-(3-Bromobenziliden)-2-(4-metil-2-okso-2H-kromen-7-iloksi)acetohidrazid (2t)

T_t = 240 °C; I = 87%; R_f = 0,67.

MS *m/z:* 414,1 [M - H^+], (M = 415,24).



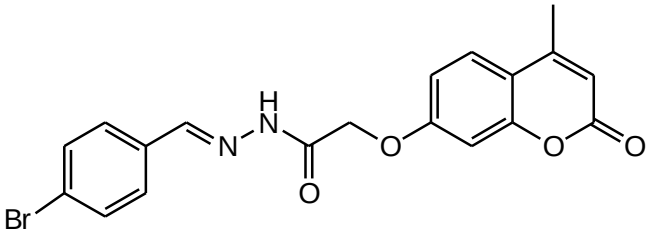
^{1}H-NMR δ (ppm): 2,40 (s, 3H, CH_3, C-4); 4,82 (s, 2H, OCH_2); 6,21 (s, 1H, H-

3); 6,98 (s, 1H, H-8); 7,01 (d, 1H, H-6); 7,67 (d, 1H, H-5); 6,97-7,72 (m, 4H, arom.); 7,98 (s, 1H, NH); 8,29 (s, 1H, HC=N-).

Računato za $C_{19}H_{15}BrN_2O_4$ (415,24): C 54,96; H 3,64; Br 19,24; N 6,75. Nađeno: C 54,95; H 3,60; Br 19,21; N 6,75%.

(E)-N´-(4-Bromobenzyliden)-2-(4-metil-2-okso-2H-kromen-7-iloksi)acetohidrazid (2u)

T_t = 262 °C; I = 86%; R_f = 0,64.



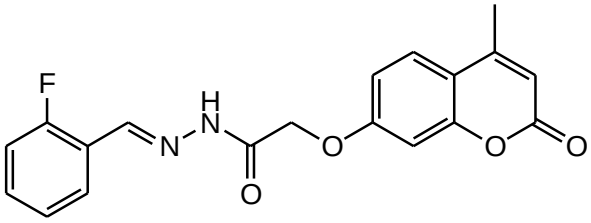
MS *m/z:* 414,1 [M - H^+], (M = 415,24).

^{1}H-NMR δ (ppm): 2,39 (s, 3H, CH_3, C-4); 4,81 (s, 2H, OCH_2); 6,22 (s, 1H, H-3); 6,96 (s, 1H, H-8); 7,01 (d, 1H, H-6); 7,71 (d, 1H, H-5); 6,98-7,72 (m, 4H, arom.); 7,99 (s, 1H, NH); 8,30 (s, 1H, HC=N-).

Računato za $C_{19}H_{15}BrN_2O_4$ (415,24): C 54,96; H 3,64; Br 19,24; N 6,75. Nađeno: C 54,98; H 3,61; Br 19,20; N 6,78%.

(E)-N´-(2-Fluorobenziliden)-2-(4-metil-2-okso-2H-kromen-7-iloksi)acetohidrazid(2v)

T_t = 245 °C; I = 94%; R_f = 0,67.



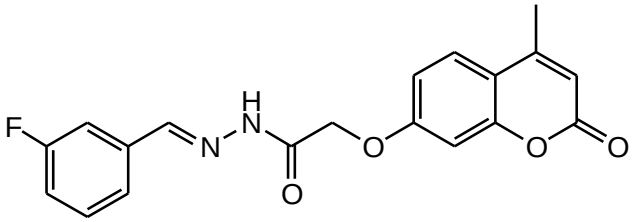
MS *m/z:* 353,3 [M - H^+], (M = 354,33).

^{1}H-NMR δ (ppm): 2,40 (s, 3H, CH_3, C-4); 4,82 (s, 2H, OCH_2); 6,21 (s, 1H, H-3); 6,98 (s, 1H, H-8); 7,00 (d, 1H, H-6); 7,67 (d, 1H, H-5); 6,96-7,72 (m, 4H, arom.); 8,22 (s, 1H, NH); 8,57 (s, 1H, HC=N-).

Računato za $C_{19}H_{15}FN_2O_4$ (354,33): C 64,40; H 4,27; F 5,36; N 7,91. Nađeno: C 64,43; H 4,25; F 5,32; N 7,95%.

(E)-N´-(3-Fluorobenziliden)-2-(4-metil-2-okso-2H-kromen-7-iloksi)acetohidrazid (2w)

T_t = 257 °C; I = 97%; R_f = 0,63.



MS *m/z:* 353,1 [M - H^+], (M = 354,33).

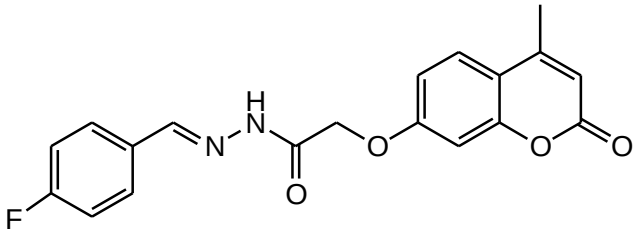
^{1}H-NMR δ (ppm): 2,40 (s, 3H, CH_3, C-4); 4,82 (s, 2H, OCH_2); 6,22 (s, 1H, H-3); 6,99 (s, 1H, H-8); 7,02 (d, 1H, H-6); 7,68 (d, 1H, H-5); 6,99-7,70 (m, 4H, arom.); 8,01 (s, 1H, NH); 8,33 (s, 1H, HC=N-).

Računato za $C_{19}H_{15}FN_2O_4$ (354,33): C 64,40; H 4,27; F 5,36; N 7,91. Nađeno: C 64,45; H 4,23; F 5,32; N 7,92%.

(E)-N´-(4-Fluorobenziliden)-2-(4-metil-2-okso-2H-kromen-7-iloksi)acetohidrazid (2x)

T_t = 280 °C; I = 93%; R_f = 0,60.

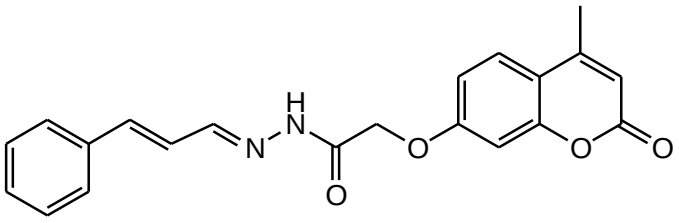
MS *m/z:* 353,1 [M - H^+], (M = 354,33). ^{1}H-NMR δ (ppm): 2,40 (s, 3H, CH_3, C-4); 4,80 (s, 2H, OCH_2); 6,22 (s, 1H, H-3); 6,96 (s, 1H, H-8); 7,01 (d, 1H, H-6); 7,69 (d, 1H, H-5); 6,96-7,71 (m, 4H, arom.); 8,01 (s, 1H, NH); 8,32 (s, 1H, HC=N-).



Računato za $C_{19}H_{15}FN_2O_4$ (354,33): C 64,40; H 4,27; F 5,36; N 7,91. Nađeno: C 64,43; H 4,24; F 5,33; N 7,97%.

(E)-2-(4-Metil-2-okso-2H-kromen-7-iloksi)-N´-[(E)-3-fenilaliliden]acetohidrazid (2y)[6]

T_t = 249 – 250 °C; I = 46%; R_f = 0,76.

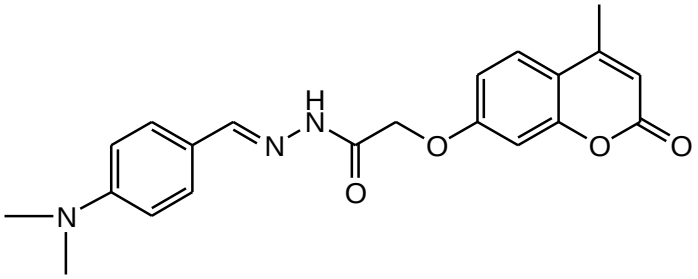


MS *m/z:* 363,3 [M + H^+], (M = 362,38).

^{1}H-NMR δ (ppm): 2,40 (s, 3H, CH_3, C-4); 4,84 (s, 2H, OCH_2); 5,72 (d, 1H, stiril); 6,24 (s, 1H, H-3); 6,63 (d, 1H, stiril); 6,73 (s, 1H, H-8); 6,85 (d, 1H, H-6); 7,20 (d, 1H, H-5); 6,90-7,75 (m, 3H, arom.); 8,32 (s, 1H, NH); 8,52 (s, 1H, HC=N-).

Računato za $C_{21}H_{18}N_2O_4$ (362.38): C 69,60; H 5,01; N 7,73. Nađeno: C 69,59; H 4,99; N 7,70%.

(E)-N´-(4-(Dimetilamino)benziliden)-2-(4-metil-2-okso-2H-kromen-7-iloksi)acetohidrazid (2z) (Satyanarayana i sur. 2008.)



T_t = 260 – 262 °C (lit. 266-268 °C); I = 86%; R_f = 0,4.

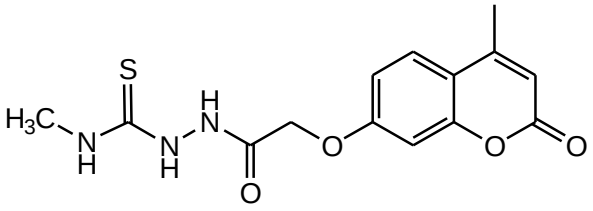
MS *m/z:* 378,2 [M - H^+], (M = 379,41).

^{1}H-NMR δ (ppm): 2,40 (s, 3H, CH_3, C-4); 2,86 (s, 6H, $N(CH_3)_2$); 4,84 (s, 2H, OCH_2); 6,24 (s, 1H, H-3); 6,73 (s, 1H, H-8); 6,85 (d, 1H, H-6); 7,20 (d, 1H, H-5); 6,90-7,75 (m, 4H, arom.); 8,32 (s, 1H, NH); 8,52 (s, 1H, HC=N-).

Računato za $C_{21}H_{21}N_3O_4$ (379.41): C 66,48; H 5,58; N 11,08. Nađeno: C 66,50; H 5,57; N 11,10%.

4.1.2. Tiosemikarbazidi

4-Metil-1-(2-(4-metil-2-okso-2H-kromen-7-iloksi)acetil)tiosemikarbazid (3a)



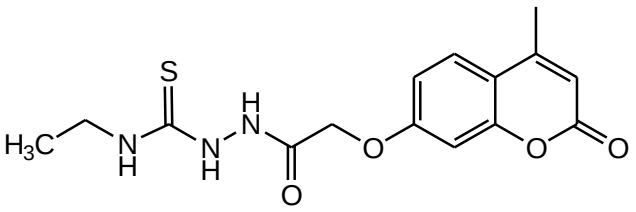
T_t = 218 °C; I = 54%; R_f = 0,25.

MS *m/z:* 320,0 [M - H^+], (M = 321,35).

^{1}H NMR δ (ppm): 2,40 (s, 3H, CH_3, C-4), 3,53 (s, 3H, CH_3), 4,73 (s, 2H, OCH_2), 6,23 (s, 1H, H-3, coum.), 6,96 (d, 1H, H-6), 7,07 (s, 1H, H-8), 7,70 (d, 1H, H-5), 8,05 (s, 1H, NH), 9,31 (s, 1H, NH), 9,43 (s, 1H, NH).

Računato za $C_{14}H_{15}N_3O_4S$ (321,35): C 52,33; H 4,70; N 13,08; S 9,98. Nađeno: C 52,27; H 4,75; N 13,12; S 9,92%.

4-Etil-1-(2-(4-metil-2-okso-2H-kromen-7-iloksi)acetil)tiosemikarbazid (3b)



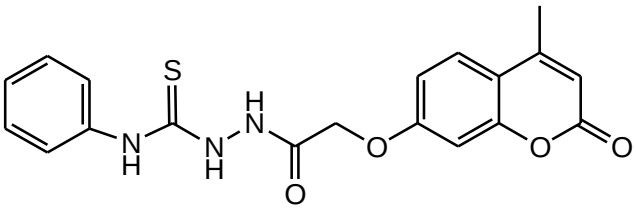
T_t = 216 °C; I = 56%; R_f = 0,26.

MS *m/z:* 333,9 [M - H^+], (M = 335,38).

^{1}H NMR δ (ppm): 1,09 (t, 3H, CH_3), 2,40 (s, 3H, CH_3, C-4), 3,49 (q, 2H, CH_2), 4,74 (s, 2H, OCH_2), 6,22 (s, 1H, H-3), 6,96 (d, 1H, H-6), 7,01 (s, 1H, H-8), 7,69 (d, 1H, H-5), 9,24 (s, 1H, NH), 9,43 (s, 1H, NH), 9,54 (s, 1H, NH).

Računato za $C_{15}H_{17}N_3O_4S$ (335,38): C 53,72; H 5,11; N 12,53; S 9,56. Nađeno: C 53,69; H 5,15; N 12,50; S, 9.56%.

1-(2-(4-Metil-2-okso-2H-kromen-7-iloksi)acetil)-4-feniltiosemikarbazid (3c)



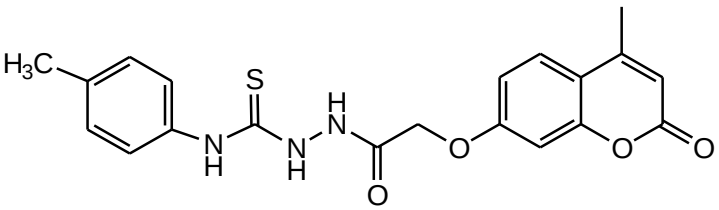
T_t = 189 °C; I = 62%; R_f = 0,28.

MS *m/z:* 382,0 [M - H^+], (M = 383,42).

^{1}H NMR δ (ppm): 2,42 (s, 3H, CH_3, C-4), 4,81 (s, 2H, OCH_2), 6,25 (s, 1H, H-3), 6,96 (d, 1H, H-6), 7,07 (s, 1H, H-8), 7,01-7,46 (d, 5H, arom.), 7,73 (d, 1H, H-5), 9,70 (s, 1H, NH), 10,26 (s, 1H, NH), 10,35 (s, 1H, NH).

Računato za $C_{19}H_{17}N_3O_4S$ (383,42): C 59,52; H 4,47; N 10,96; S 8,36. Nađeno: C 59,48; H 4,51; N 10,90; S 8,38%.

1-(2-(4-Metil-2-okso-2H-kromen-7-iloksi)acetil)-4-p-toliltiosemikarbazid (3d)



T_t = 122 – 124 °C, I = 58%; R_f = 0,38.

MS *m/z:* 396,1 [M - H^+], (M = 397,45).

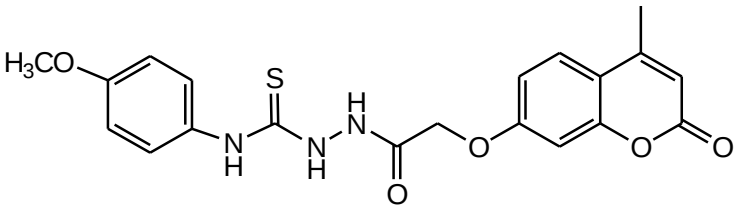
^{1}H NMR δ (ppm): 2,34 (d, 3H, CH_3,

C'-4), 2,40 (s, 3H, CH_3, C-4), 4,83 (s, 2H, OCH_2), 6,23 (s, 1H, H-3), 6,94 (d, 1H, H-6), 7,02 (s, 1H, H-8), 6,98-7,35 (d, 4H, arom.), 7,70 (d, 1H, H-5), 9,68 (s, 1H, NH), 10,20 (s, 1H, NH), 10,52 (s, 1H, NH).

Računato za $C_{20}H_{19}N_3O_4S$ (397.45): C 59,52; H 4,47; N 10,96; S 8,36. Nađeno: C 59,48; H 4,51; N 10,90; S 8,38%.

4-(4-Metoksifenil)-1-(2-(4-metil-2-okso-2H-kromen-7-iloksi)acetil)tiosemikarbazid (3e)

T_t = 180 °C; I = 60%; R_f = 0,27.



MS *m/z:* 412,2 [M - H^+], (M = 413,45).

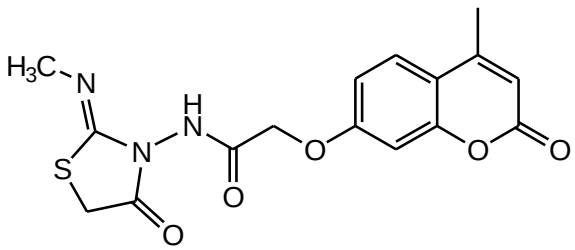
^{1}H NMR δ (ppm): 2,42 (s, 3H, CH_3, C-4), 3,77 (s, 3H, OCH_3, C-4, arom.), 4,80 (s, 2H, OCH_2), 6,24 (s, 1H, H-3), 6,93-7,31 (d, 4H, arom.), 6,94 (d, 1H, H-6), 7,06 (s, 1H, H-8), 7,73 (d, 1H, H-5), 9,62 (s, 1H, NH), 10,12 (s, 1H, NH), 10,31 (s, 1H, NH).

Računato za $C_{20}H_{19}N_3O_5S$ (413.45): C 58,10; H 4,63; N 10,16; S 7,76. Nađeno: C 58,15; H 4,60; N 10,20; S 7,76%.

4.1.3. Tiazolidinoni

(Z)-2-(4-Metil-2-okso-2H-kromen-7-iloksi)-N-(2-(metilimino)-4-oksotiazolidin-3-il)acetamid (4a)

T_t = 205 °C; I = 92%; R_f = 0,33.

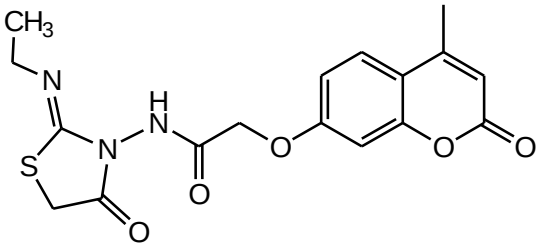


MS *m/z:* 360,2 [M - H^+], (M = 361,37).

^{1}H NMR δ (ppm): 2,40 (s, 3H, CH_3, C-4), 3,66 (s, 3H, CH_3), 4,11 (s, 2H, CH_2), 5,45 (s, 2H, OCH_2), 6,23 (s, 1H, H-3), 6,96 (d, 1H, H-6), 6,97 (s, 1H, H-8), 7,70 (d, 1H, H-5), 9,54 (s, 1H, NH).

Računato za $C_{16}H_{15}N_3O_5S$ (361.37): C 53,18; H 4,18; N 11,63; S 8,87. Nađeno: C 53,22; H 4,15; N 11,68; S 8,88%.

(Z)-2-(4-Metil-2-okso-2H-kromen-7-iloksi)-N-(2-(etilimino)-4-oksotiazolidin-3-il)acetamid (4b)



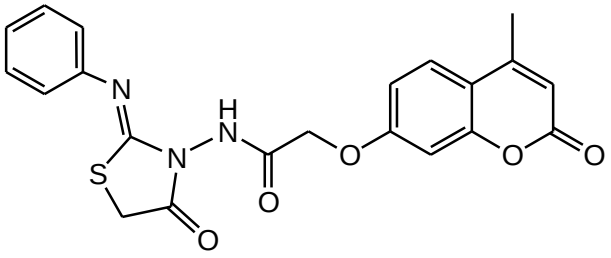
T_t = 188 °C; I = 81%; R_f = 0,38.

MS *m/z:* 374,1 [M - H^+], (M = 375,40).

^{1}H NMR δ (ppm): 1,33 (t, 3H, CH_3), 1,76 (q, 2H, CH_2), 2,42 (s, 3H, CH_3, C-4), 4,17 (s, 2H, CH_2), 5,46 (s, 2H, OCH_2), 6,24 (s, 1H, H-3), 6,99 (d, 1H, H-6), 7,04 (s, 1H, H-8), 7,73 (d, 1H, H-5), 9,46 (s, 1H, NH).

Računato za $C_{17}H_{17}N_3O_5S$ (375.40): C 54,39; H 4,56; N 11,19; S 8,54; Nađeno: C 54,33; H 4,60; N 11,16; S 8,52%.

(Z)-2-(4-Metil-2-okso-2H-kromen-7-iloksi)-N-(4-okso-2-(fenilimino)tiazolidin-3-il)acetamid (4c)



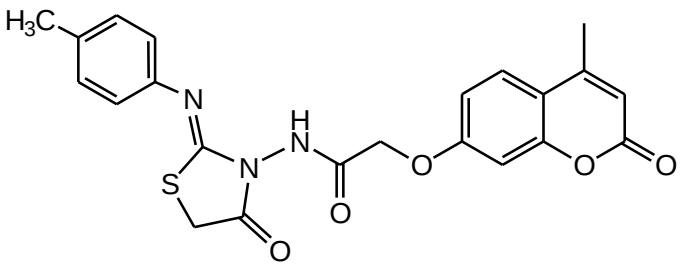
T_t = 175 – 178 °C; I = 77%; R_f = 0,42.

MS *m/z:* 424,3 [M + H^+], (M = 423,44).

^{1}H NMR δ (ppm): 2,38 (s, 3H, CH_3, C-4), 4,14 (s, 2H, CH_2), 5,26 (s, 2H, OCH_2), 6,22 (s, 1H, H-3), 6,99 (d, 1H, H-6), 7,00 (s, 1H, H-8), 6,88-7,63 (d, 5H, arom.), 7,65 (d, 1H, H-5), 11,20 (s, 1H, NH).

Računato za $C_{21}H_{17}N_3O_5S$ (423,44): C 59,57; H 4,05; N 9,92; S 7,57; Nađeno: C 59,62; H 3,99; N 9,98; S 7,57%.

(Z)-2-(4-Metil-2-okso-2H-kromen-7-iloksi)-N-(4-okso-2-(p-tolilimino)tiazolidin-3-il)-acetamid (4d)



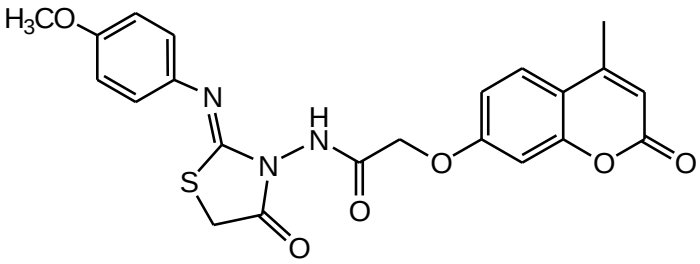
T_t = 213 – 217 °C; I = 84%; R_f = 0,52.

MS *m/z:* 436,4 [M - H^+], (M = 437,47).

^{1}H NMR δ (ppm): 1,18 (s, 3H, CH_3, C'-4), 2,37 (s, 3H, CH_3, C-4), 4,11 (s, 2H, CH_2), 5,23 (s, 2H, OCH_2), 6,21 (s, 1H, H-3), 6,89 (d, 1H, H-

6), 6,99 (s, 1H, H-8), 7,30-7,71 (d, 4H, arom.), 7,39 (d, 1H, H-5), 11,30 (s, 1H, NH). Računato za $C_{22}H_{19}N_3O_5S$ (437,47): C 60,40; H 4,38; N 9,61; S 7,33. Nađeno: C 60,35; H 4,44; N 9,68; S 7,32%.

(Z)-N-(2-(4-Metoksifenilimino)-4-oksotiazolidin-3-il)-2-(4-metil-2-okso-2H-kromen-7-iloksi)acetamid (4e)



T_t = 200 °C; I = 86%; R_f = 0,65.

MS *m/z:* 452,8 [M - H^+], (M = 453,47).

^{1}H NMR δ (ppm): 2,36 (s, 3H, CH_3, C-4), 3,81 (s, 3H, OCH_3, C'-4,), 4,10 (s, 2H, CH_2), 5,23 (s, 2H, OCH_2), 6,20 (s, 1H, H-3), 6,90 (d, 1H, H-6), 6,99 (s, 1H, H-8), 7,11-7,44 (d, 4H, arom.), 7,61 (d, 1H, H-5), 11,18 (s, 1H, NH).

Računato za $C_{22}H_{19}N_3O_6S$ (453.47): C 58,27; H 4,22; N 9,27; S 7,07. Nađeno: C 58,21; H 4,25; N 9,32; S 7,03%.

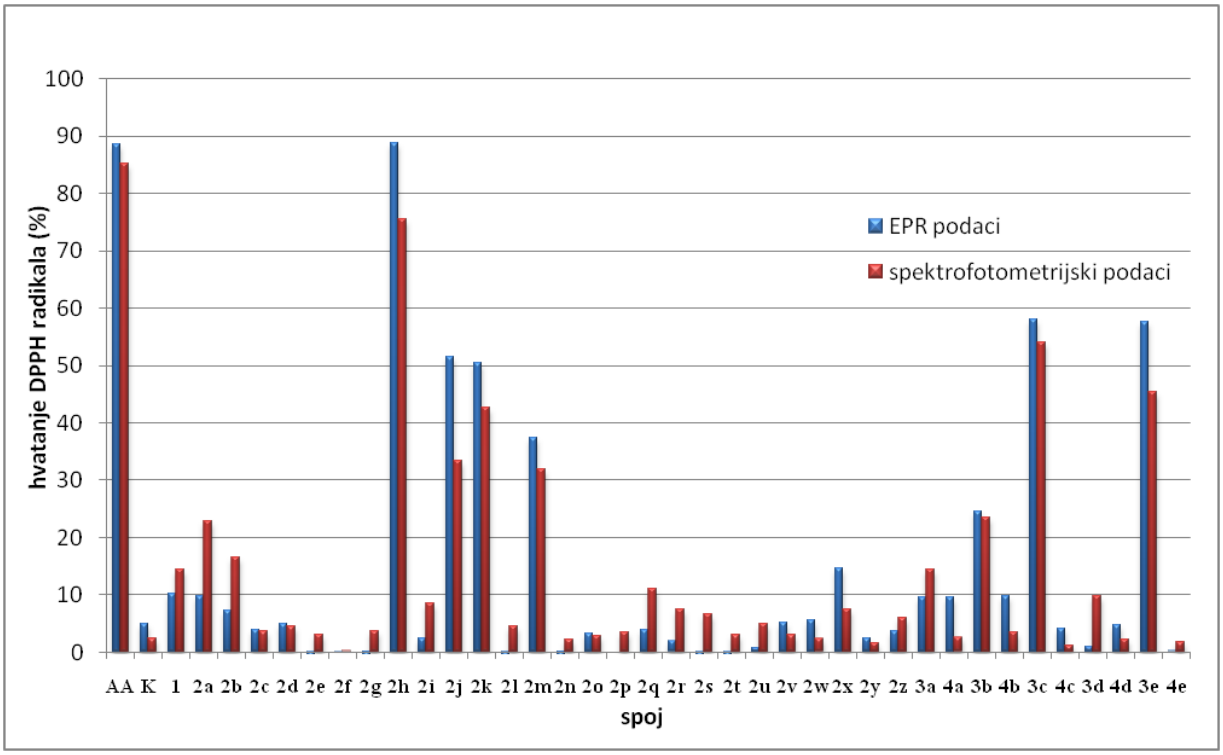
4.2. ANTIOKSIDACIJSKA AKTIVNOST

Tablica 4 Antioksidacijska aktivnost derivata kumarina izražena kao % hvatanja DPPH radikala, određena spektrofotometrijski

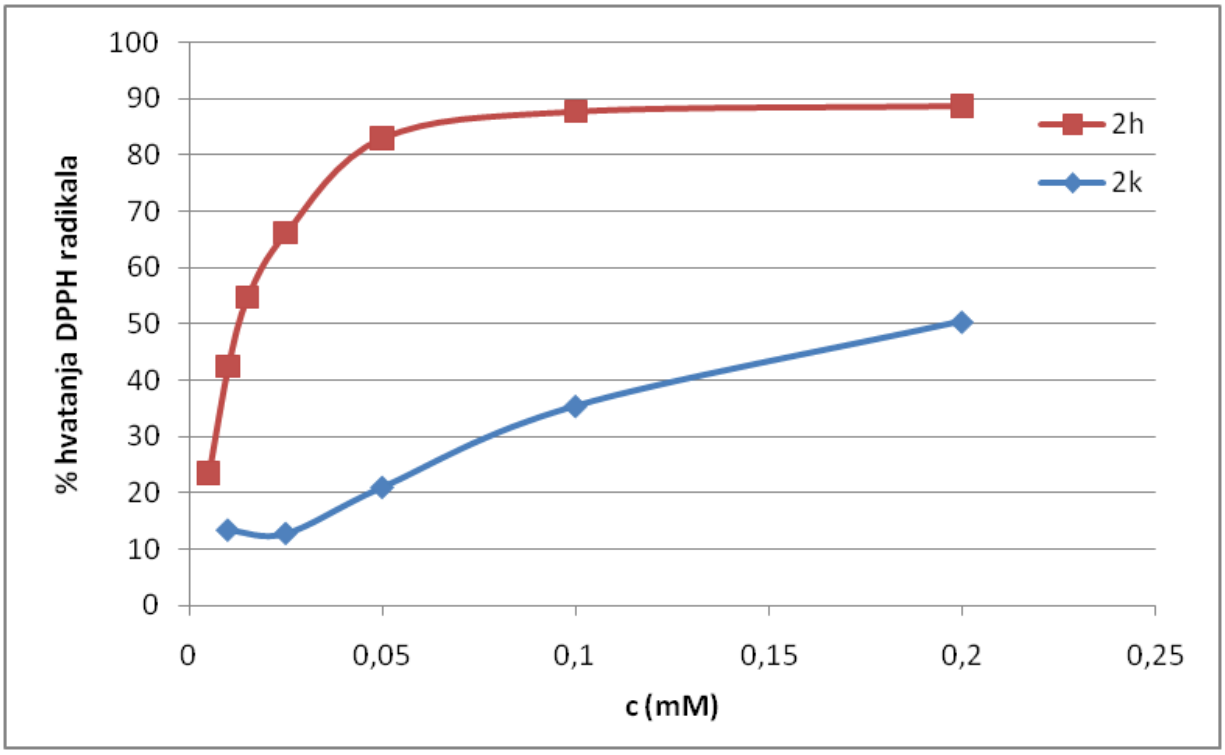
spoj	% hvatanja DPPH radikala
askorbinska kiselina	**85,2**
7-hidroksi-4-metilkumarin	**2,4**
1	**14,4**
2a	**22,9**
2b	**16,6**
2c	**3,6**
2d	**4,4**
2e	**3,1**
2f	**0,2**
2g	**3,7**
2h	**75,4**
2i	**8,4**
2j	**33,4**
2k	**42,6**
2l	**4,6**
2m	**32,0**
2n	**2,2**
2o	**2,9**
2p	**3,5**
2q	**11,1**
2r	**7,5**
2s	**6,6**
2t	**3,0**
2u	**5,0**
2v	**3,0**
2w	**2,3**
2x	**7,4**
2y	**1,6**
2z	**5,9**
3a	**14,4**
4a	**2,5**
3b	**23,4**
4b	**3,5**
3c	**54,1**
4c	**1,1**
3d	**9,9**
4d	**2,3**
3e	**45,4**
4e	**1,8**

Tablica 5 Antioksidacijska aktivnost derivata kumarina izražena kao % hvatanja DPPH radikala, određena EPR-om

spoj	% hvatanja DPPH radikala
askorbinska kiselina	**88,6**
7-hidroksi-4-metilkumarin	**4,9**
1	**10,2**
2a	**9,7**
2b	**7,3**
2c	**3,9**
2d	**5,0**
2e	**-3,5**
2f	**-0,2**
2g	**-6,1**
2h	**88,7**
2i	**2,5**
2j	**51,4**
2k	**50,4**
2l	**-1,6**
2m	**37,3**
2n	**-4,0**
2o	**3,3**
2p	**-7.3**
2q	**3,9**
2r	**1,9**
2s	**-2,0**
2t	**-5,5**
2u	**0,8**
2v	**5,2**
2w	**5,5**
2x	**14,6**
2y	**2,4**
2z	**3,6**
3a	**9,6**
4a	**9,5**
3b	**24,6**
4b	**9,7**
3c	**58,1**
4c	**4,1**
3d	**1,0**
4d	**4,8**
3e	**57,5**
4e	**0,1**



Slika 37 Usporedba aktivnosti derivata kumarina u hvatanju DPPH radikala dobivenih spektrofotometrijski i EPR metodom



Slika 38 Ovisnost % hvatanja DPPH radikala o koncentraciji spojeva **2h** i **2k**

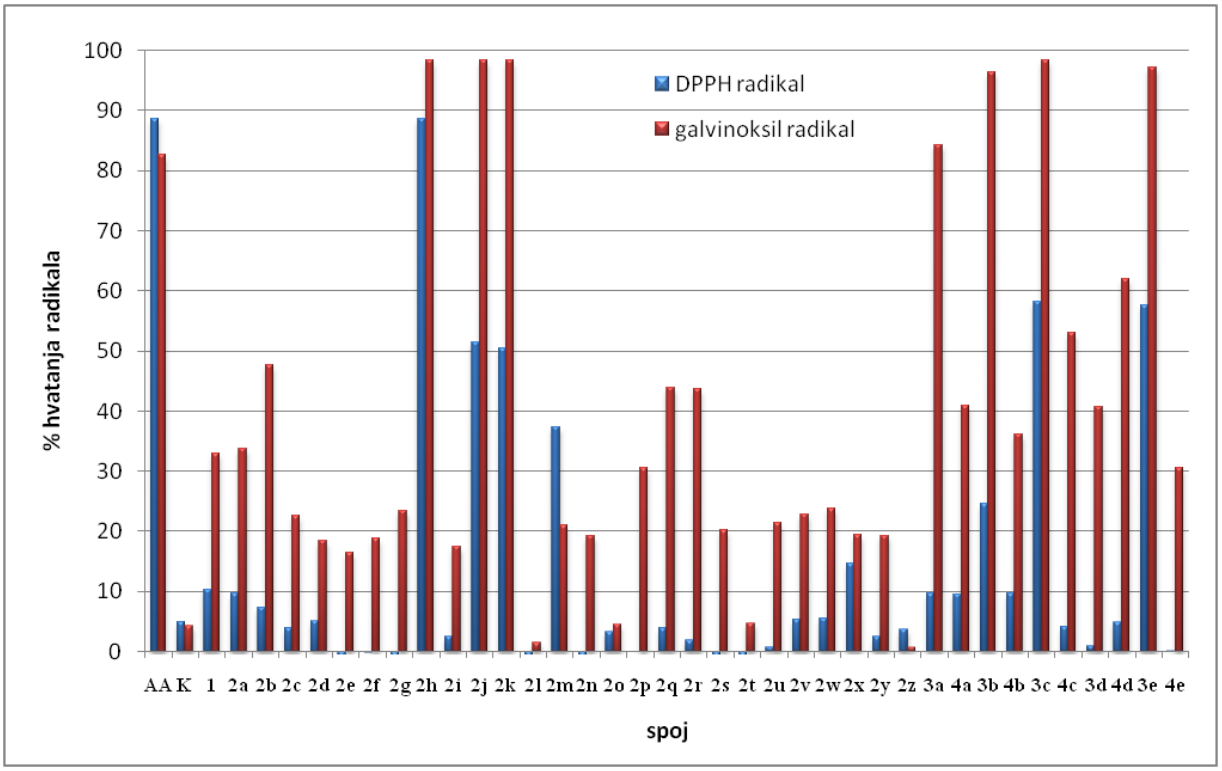
Tablica 6 Antioksidacijska aktivnost derivata kumarina određena fosfomolibden metodom

spoj	A_m
askorbinska kiselina	**1,0**
7-hidroksi-4-metilkumarin	**0,2**
1	**0,9**
2a	**0,7**
2b	**0,6**
2c	**1,0**
2d	**1,1**
2e	**0,8**
2f	**0,8**
2g	**0,8**
2h	**1,4**
2i	**0,7**
2j	**2,0**
2k	**0,7**
2l	**0,7**
2m	**0,7**
2n	**0,7**
2o	**0,7**
2p	**0,7**
2q	**0,7**
2r	**0,7**
2s	**1,1**
2t	**1,2**
2u	**1,2**
2v	**1,0**
2w	**1,1**
2x	**1,2**
2y	**0,8**
2z	**0,6**
3a	**0,6**
4a	**-**
3b	**0,7**
4b	**0,2**
3c	**0,6**
4c	**-**
3d	**0,5**
4d	**-**
3e	**0,6**
4e	**-**

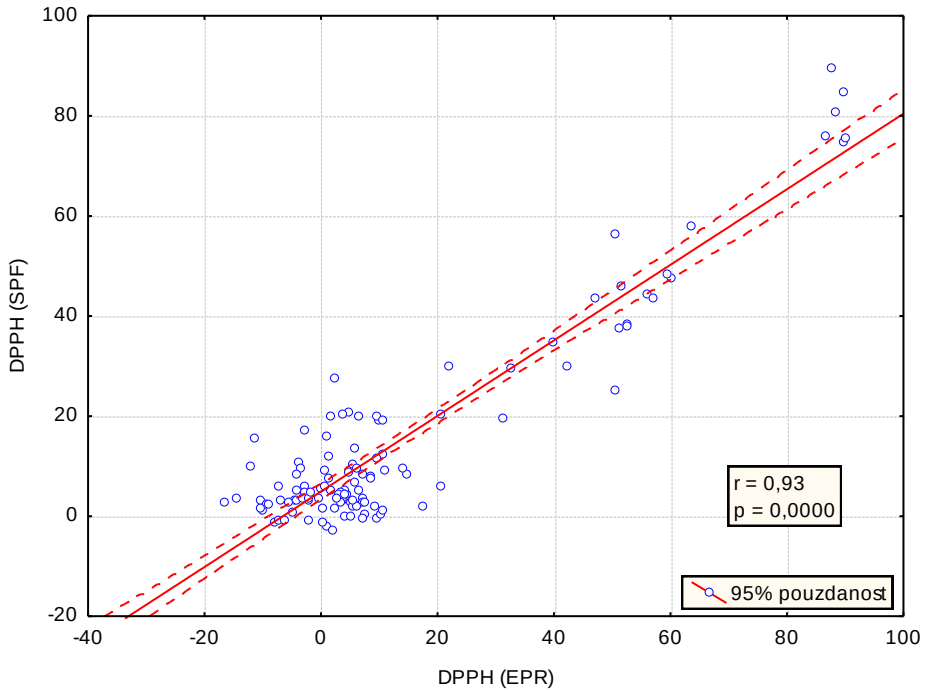
- označeni spojevi se talože dodatkom reagensa i nije im moguće odrediti aktivnost pri ovim eksperimentalnim uvjetima

Tablica 7 Antioksidacijska aktivnost derivata kumarina određena kao % hvatanja galvinoksil radikala

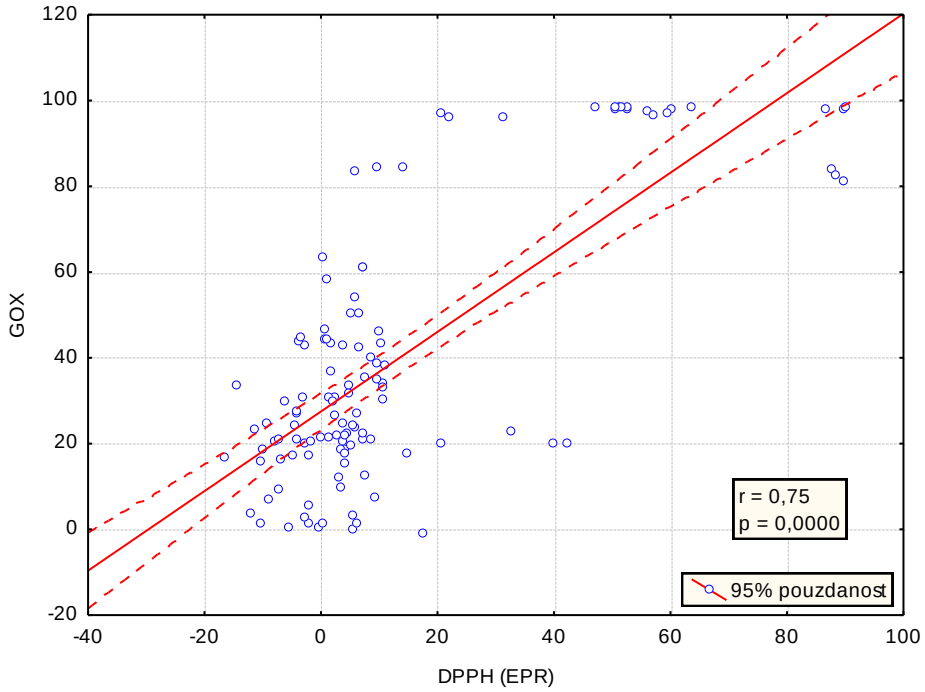
spoj	% hvatanja galvinoksil radikala
askorbinska kiselina	**82,6**
7-hidroksi-4-metilkumarin	**4,2**
1	**32,9**
2a	**33,8**
2b	**47,6**
2c	**22,6**
2d	**18,5**
2e	**16,4**
2f	**18,9**
2g	**23,3**
2h	**98,4**
2i	**17,4**
2j	**98,3**
2k	**98,4**
2l	**1,5**
2m	**20,9**
2n	**19,3**
2o	**4,4**
2p	**30,5**
2q	**43,9**
2r	**43,7**
2s	**20,2**
2t	**4,6**
2u	**21,4**
2v	**22,8**
2w	**23,8**
2x	**19,4**
2y	**19,3**
2z	**0,7**
3a	**84,2**
4a	**40,9**
3b	**96,3**
4b	**36,1**
3c	**98,4**
4c	**53**
3d	**40,6**
4d	**62**
3e	**97,2**
4e	**30,5**



Slika 39 Usporedba aktivnosti derivata kumarina u hvatanju DPPH i galvinoksil radikala dobivenih EPR metodom



Slika 40 Korelacija postotaka hvatanja DPPH radikala derivatima kumarina određenih spektrofotometrijski i EPR metodom

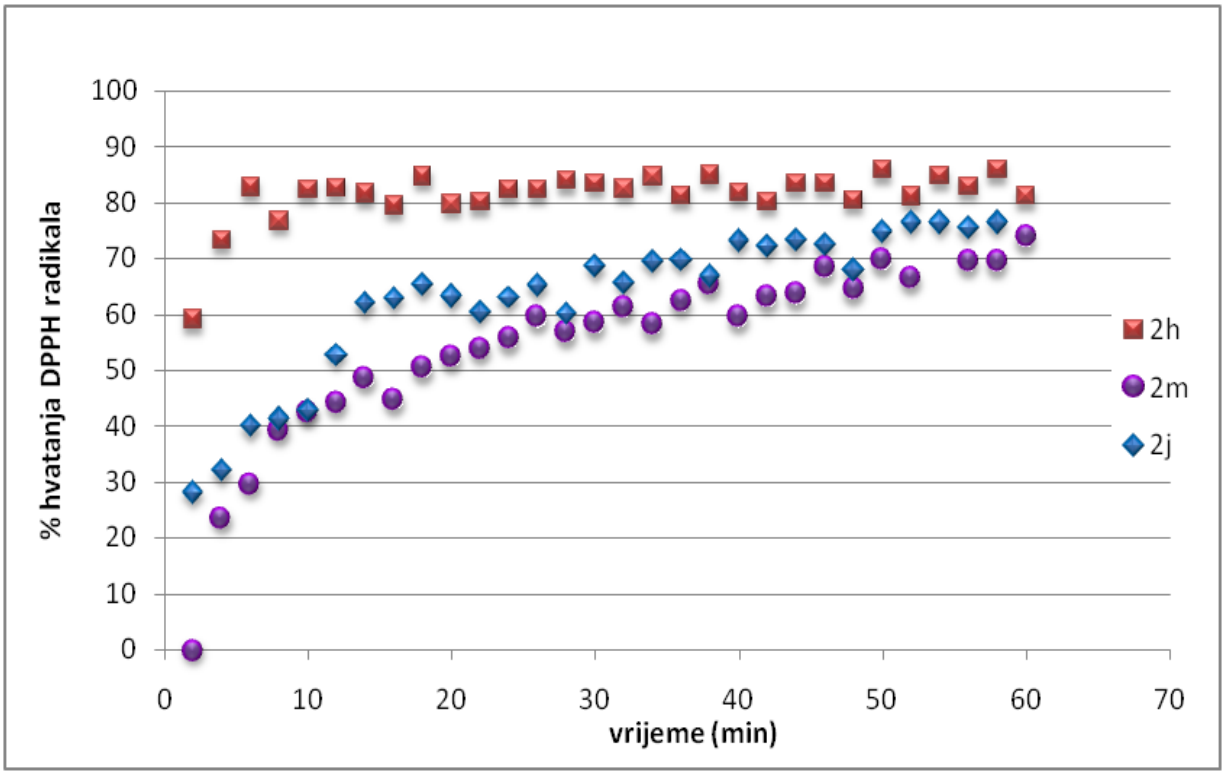


Slika 41 Korelacija postotaka hvatanja DPPH radikala i galvinoksil radikala derivatima kumarina određenih EPR metodom

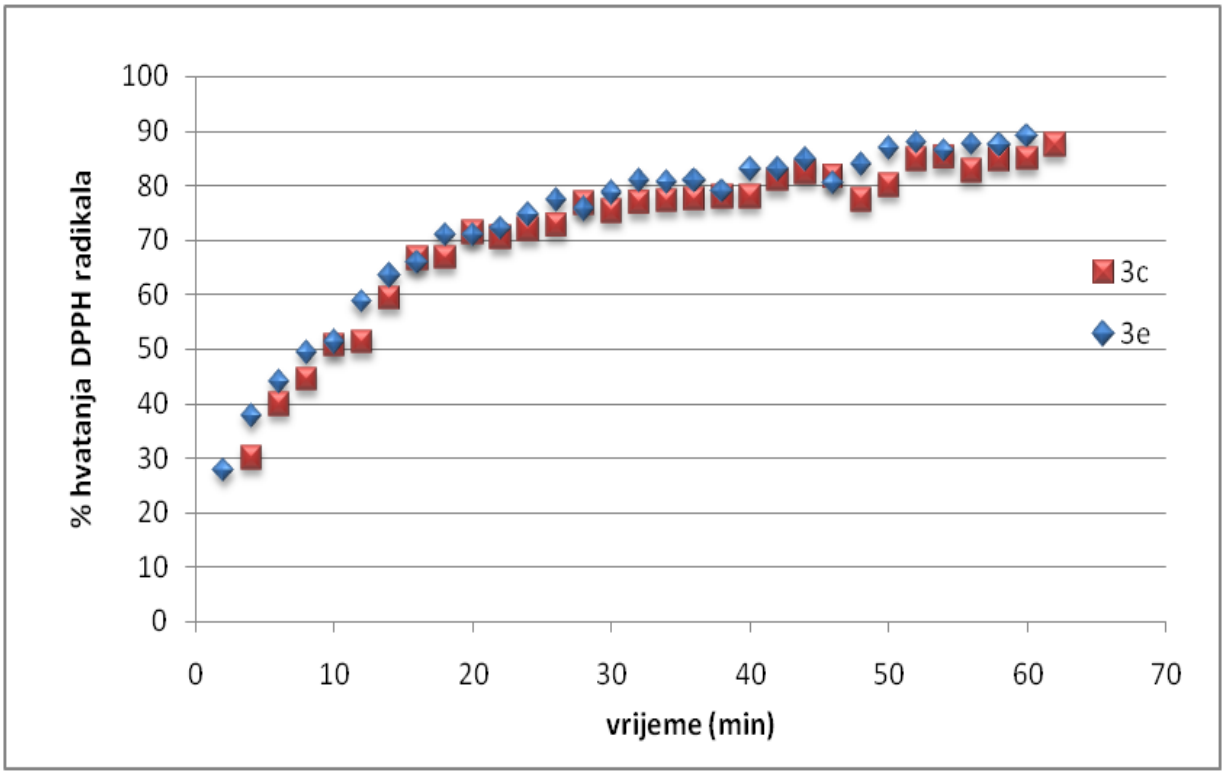
Tablica 9 Koeficijenti korelacije antioksidacijskih aktivnosti derivata kumarina određenih različitim metodama

metoda	DPPH	GOX	fMo
DPPH	1,00	0,78; p = 0,000	-0,12; p = 0,48
GOX	0,78; p = 0,000	1,00	0,09; p = 0,58
fMo	-0,12; p = 0,48	0,09; p = 0,58	1,00

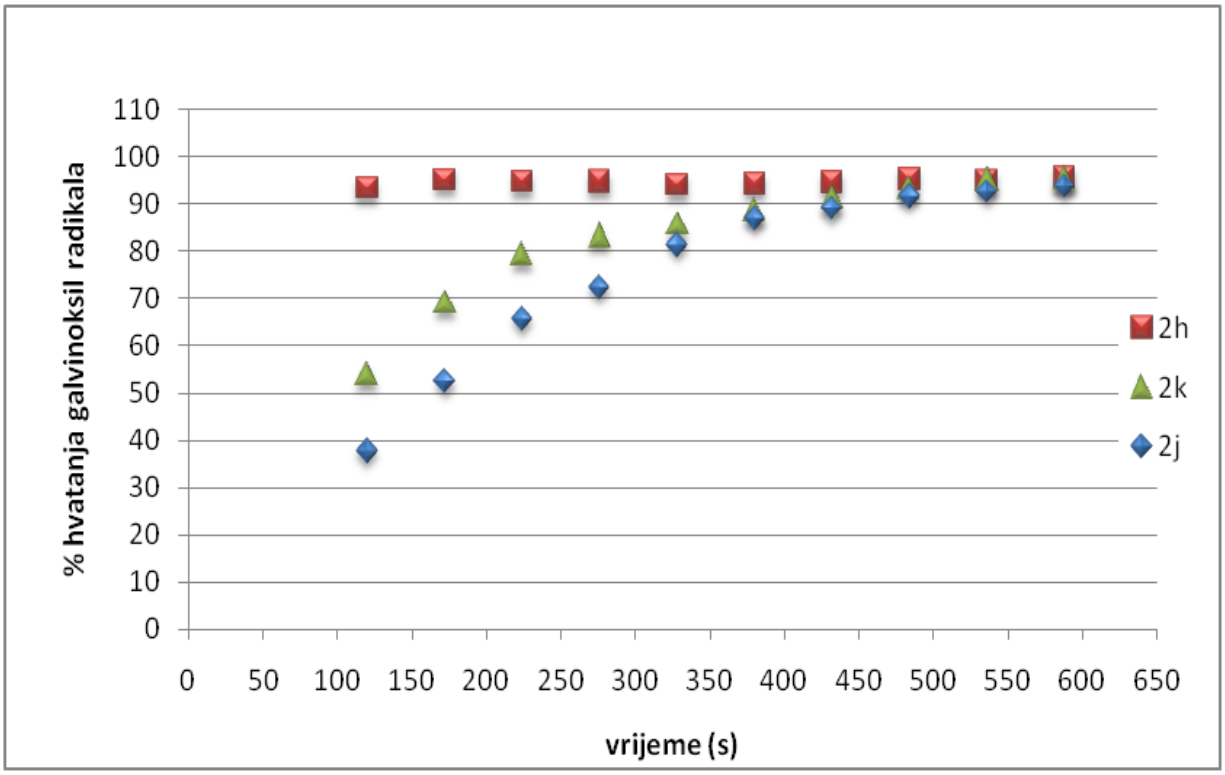
DPPH – hvatanje DPPH radikala
GOX – hvatanje galvinoksil radikala
fMo – antioksidacijska aktivnost određena fosfomolibden metodom



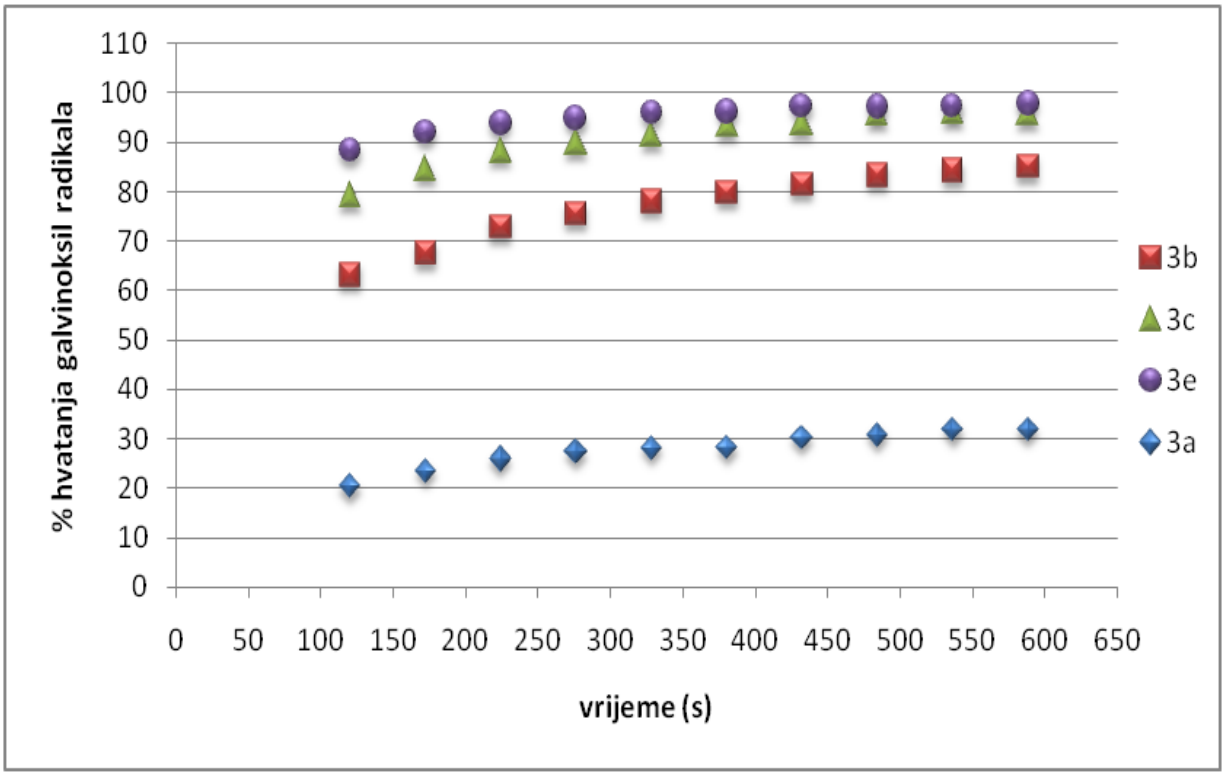
Slika 42 Vremenski tijek hvatanja DPPH radikala za odabrane Schiffove baze



Slika 43 Vremenski tijek hvatanja DPPH radikala za odabrane tiosemikarbazide



Slika 44 Vremenski tijek hvatanja galvinoksil radikala za odabrane Schiffove baze



Slika 45 Vremenski tijek hvatanja galvinoksil radikala za odabrane tiosemikarbazide

4.3. ANTIFUNGALNA AKTIVNOST

Tablica 10 Inhibicija rasta plijesni *Aspergillus flavus* derivatima kumarina

spoj	Inhibicija rasta plijesni (%)	
	1 μg/mL	0,1 μg/mL
7-hidroksi-4-metilkumarin	86,4	93,2
1	74,2	100,0
2a	79,5	84,8
2b	100,0	97,4
2c	100,0	100,0
2d	55,8	100,0
2e	86,5	100,0
2f	85,9	100,0
2g	37,5	95,3
2h	100,0	100,0
2i	100,0	100,0
2j	100,0	100,0
2k	100,0	100,0
2l	100,0	100,0
2m	82,7	90,4
2n	100,0	100,0
2o	82,7	100,0
2p	-	-
2q	84,8	100,0
2r	84,1	89,4
2s	94,2	100,0
2t	78,6	100,0
2u	33,3	100,0
2v	54,0	100,0
2w	58,3	0
2x	27,0	74,6
2y	94,2	100,0
2z	100,0	100,0
3a	19,4	28,9
4a	59,4	79,2
3b	31,3	33,4
4b	30,1	26,0
3c	97,5	92,4
4c	100,0	95,5
3d	87,5	48,4
4d	93,9	56,1
3e	37,5	90,6
4e	100,0	100,0

- označeni spojevi – nisu određeni

Tablica 11 Inhibicija rasta plijesni *Aspergillus ochraceus* derivatima kumarina

spoj	Inhibicija rasta plijesni (%)	
	1 μg/mL	0,1 μg/mL
7-hidroksi-4-metilkumarin	91,8	100,0
1	100,0	87,7
2a	100,0	100,0
2b	100,0	100,0
2c	100,0	100,0
2d	50,0	100,0
2e	100,0	100,0
2f	100,0	26,2
2g	85,7	47,6
2h	83,5	100,0
2i	39,4	94,3
2j	38,6	86,4
2k	100,0	100,0
2l	100,0	100,0
2m	100,0	91,8
2n	75,8	69,3
2o	24,2	79,5
2p	-	-
2q	100,0	83,5
2r	100,0	100,0
2s	100,0	100,0
2t	54,5	88,6
2u	32,3	75,8
2v	59,6	66,7
2w	58,6	73,7
2x	65,7	75,8
2y	100,0	100,0
2z	25,8	69,7
3a	55,6	38,7
4a	100,0	100,0
3b	77,8	68,5
4b	41,0	44,4
3c	36,8	34,3
4c	51,4	54,0
3d	100,0	87,3
4d	100,0	100,0
3e	100,0	100,0
4e	100,0	100,0

- označeni spojevi – nisu određeni

Tablica 12 Inhibicija rasta plijesni *Fusarium graminearum* derivatima kumarina

spoj	Inhibicija rasta plijesni (%)	
	1 μg/mL	0,1 μg/mL
7-hidroksi-4-metilkumarin	100,0	100,0
1	100,0	100,0
2a	100,00	100,00
2b	100,0	100,0
2c	92,6	100,0
2d	59,7	100,0
2e	45,8	100,0
2f	100,0	100,0
2g	100,0	93,3
2h	100,0	100,0
2i	100,0	100,0
2j	100,0	100,0
2k	100,0	100,0
2l	100,0	100,0
2m	100,0	100,0
2n	86,0	100,0
2o	60,0	100,0
2p	100,0	100,0
2q	100,0	100
2r	100,0	88,9
2s	75,0	100,0
2t	94,5	72,9
2u	89,6	51,6
2v	100,0	88,5
2w	100,0	90,6
2x	100,0	100,0
2y	31,5	98,6
2z	61,7	100,0
3a	100,0	87,8
4a	100,0	100,0
3b	100,0	83,8
4b	100,0	70,3
3c	95,5	89,2
4c	99,3	100,0
3d	100,0	100,0
4d	100,0	100,0
3e	100,0	100,0
4e	100,0	100,0

- označeni spojevi – nisu određeni

Tablica 13 Inhibicija rasta plijesni *Fusarium verticillioides* derivatima kumarina

spoj	Inhibicija rasta plijesni (%)	
	1 μg/mL	0,1 μg/mL
7-hidroksi-4-metilkumarin	0	0
1	59,5	67,9
2a	100,0	9,5
2b	40,0	11,1
2c	33,3	100,0
2d	50,0	100,0
2e	0,0	100,0
2f	45,8	86,1
2g	0	0
2h	26,7	17,8
2i	100,0	100,0
2j	100,0	100,0
2k	55,0	41,7
2l	60,0	31,7
2m	48,9	75,0
2n	100,0	100,0
2o	52,4	100,0
2p	-	-
2q	100,0	100,0
2r	100,0	100,0
2s	100,0	100,0
2t	39,1	70,8
2u	24,0	43,8
2v	33,6	72,9
2w	30,5	81,3
2x	53,1	68,8
2y	0,0	4,8
2z	100,0	100,0
3a	20,7	22,4
4a	91,7	100,0
3b	16,2	13,0
4b	22,8	20,1
3c	100,0	98,6
4c	100,0	100,0
3d	41,7	41,7
4d	64,7	24,7
3e	100,0	100,0
4e	100,0	100,0

- označeni spojevi – nisu određeni

Tablica 14 Koeficijenti korelacije antioksidacijske i antifungalne aktivnosti derivata kumarina

metoda	Af	Ao	Fg	Fv
DPPH	0,03; p = 0,89	-0,06; p = 0,73	0,23; p = 0,17	0,08; p = 0,62
GOX	-0,10; p = 0,57	0,03; p = 0,85	0,36; p = 0,025	0,15; p = 0,38
fMo	0,15; p = 0,38	0,13; p = 0,44	0,16; p = 0,33	0,30; p = 0,07

DPPH – hvatanje DPPH radikala
GOX – hvatanje galvinoksil radikala
fMo – antioksidacijska aktivnost određena fosfomolibden metodom
Af – antifungalna aktivnost prema *A. flavus*
Ao – antifungalna aktivnost prema *A. ochraceus*
Fg – antifungalna aktivnost prema *F. graminearum*
Fv – antifungalna aktivnost prema *F. verticillioides*

5. RASPRAVA

5.1. SINTEZA DERIVATA KUMARINA

Tretiranjem rezorcinola s etil acetoacetatom u prisutnosti sumporne kiseline dobiven je 7-hidroksi-4-metilkumarin, koji je u daljnjoj reakciji s etilbromoacetatom uz K_2CO_3 dao etil 2-(4-metil-2-okso-2H-kromen-7-iloksi)acetat. Reakcijom estera s hidrazin hidratom dobiven je 2-(4-metil-2-okso-2*H*-kromen-7-iloksi)acetohidrazid (**1**), koji je poslužio kao polazni spoj za sintezu ciljanih Schifffovih baza (**2a-z**) i tiosemikarbazida (**3a-e**) (**Slika 33**).

Kondenzacijom hidrazida (**1**) s aldehidima dobivene su Schiffove baze (**2a-z**), s karakterističnim supstituentima, ovisno o primijenjenom aldehidu. Aldehidi su odabrani s obzirom na spoznaje o tome koji bi supstituenti mogli doprinijeti povećanju antioksidacijske i antifungalne aktivnosti polaznog spoja, 7-hidroksi-4-metilkumarina (Roussaki i sur., 2010.; Foti i sur., 1996.; Pedersen i sur., 2007.; Ahluwalia i sur., 1983.; Sah i sur., 2011.; Brooker i sur., 2007.; 2008.). Reakcija dobivanja Schiffovih baza bila je prilično brza i jednostavna, a dobiveni produkti se često koriste za biološka ispitivanja ili kao polazni spojevi za sintezu tiazolidinona, metalnih kompleksa, i dr. (**Slika 33**).

Reakcijom hidrazida (**1**) s izotiocijanatima dobiveni su određeni tiosemikarbazidi (**3a-e**), a ovisno o primijenjenom izotiocijanatu, tiosemikarbazidi su supstituirani različitim skupinama u položaju 4 tiosemikarbazidne skupine. U reakciji dobivanja tiosemikarbazida s određenim supstituentima dobiveni su tiosemikarbazidi s alkilnim i arilnim skupinama, kao supstrati za određivanje antioksidacijske i antifungalne aktivnosti, ali i kao supstrati za sintezu tiazolidinona. Naime, iz tiosemikarbazida se reakcijom s etilbromoacetatom, u prisutnosti natrijeva acetata, dobiju 4-tiazolidinoni (**4a-e**), također s karakterističnim supstituentima, u položaju 2 tiazolidinonskog prstena (**Slika 33**).

5.2. IDENTIFIKACIJA I KARAKTERIZACIJA DERIVATA KUMARINA

Tijek svih reakcija provedenih u ovom radu je praćen tankoslojnom kromatografijaom. Izostanak točke za polazni spoj, hidrazid (**1**) ili u slučaju sinteze tiazolidinona, točke za tiosemikarbazid, ukazao je na završetak reakcije. TLC je također bila prvi indikator čistoće dobivenih spojeva. R_f vrijednosti dobivenih spojeva su se razlikovale od polaznog spoja, hidrazida ili određenih tiosemikarbazida, i međusobno, a karakterizacija spoja pomoću samo

jedne R_f vrijednosti već je u ovom koraku ukazala na čistoću spoja. Tek kad su se spojevi pokazali čistima (jedna R_f vrijednost) na TLC-u, uslijedila je daljnja karakterizacija spojeva.

Nakon pročišćavanja i sušenja spojeva, slijedilo je određivanje točaka tališta. Točke tališta novih spojeva su se u pravilu razlikovale od polaznog spoja, kao i međusobno. Prije određivanja točaka tališta važno je spoj dobro osušiti, jer se za nedovoljno suhe spojeve dobiju najčešće niže točke tališta od stvarnih. Također, za nedovoljno čiste spojeve, dobiju se točke tališta različite od točaka tališta čistog spoja. Usporedbom točaka tališta spojeva koji su već bili poznati iz literature (Satyanarayana i sur. 2008.; Ahluwalia i sur., 1983.) također je potvrđeno da su dobiveni željeni spojevi.

Nakon provjere čistoće na TLC-u i određivanja točaka tališta, slijedila je spektrometrija masa. Spektri masa derivata kumarina pokazivali su molekularne ione za sve novosintetizirane spojeve, ovisno o spoju i njegovoj strukturi, u pozitivnom ili negativnom modu, što nedvojbeno ukazuje na činjenicu da su željeni spojevi dobiveni.

^{1}H NMR spektar kumarina karakteriziraju dva dubleta na H3 i H4, međutim u ovom radu je signal na H4 bio je odsutan, jer je na njega vezana metilna skupina, koja u pravilu pokazuje signal na niskim δ vrijednostima. Kumarin karakteriziraju i signali karakteristični za aromatski prsten na 6 – 8,5 ppm, čija prisutnost ovisi o supstituentima na aromatskom prstenu kumarina.

^{1}H NMR spektar svih sintetiziranih spojeva, kao i polaznog hidrazida (**1**), pokazao je signal na oko 2,40 ppm koji karakterizira metilnu skupinu na C-4 kumarinskog prstena, kao i signal karakterističan za singlet na C-3 oko 6,25 ppm. Također su bili vidljivi i signali na 6,73 – 7,85 ppm koji pripadaju aromatskom prstenu kumarina, točnije protonima na C-5, C-6 i C-8, kao i signali na 6,90 – 7,75 ppm, koji pripadaju aromatskom prstenu Schiffovih baza (**2a-z**). Ovisno o supstituentima na aromatskom prstenu Schiffovih baza, bili su vidljivi i signali za hidroksilne i metoksi skupine, ukoliko je prsten njima bio supstitutiran.

^{1}H NMR spektar hidrazida (**1**), uz signale karakteristične za kumarinsku jezgru, pokazivao je singlet na 9,32 ppm (NH) i singlet na 4,85 ppm za metilenske protone ($O\text{-}CH_2$), što je u skladu s literaturnim podacima (Satyanarayana i sur., 2008.).

Na ^{1}H NMR spektrima Schiffovih baza (**2a-z**) nije bilo signala na oko 4,61 ppm, koji pripada skupini NH_2 iz polaznog hidrazida (**1**), ali se dobio signal na 8,31 – 8,74 ppm koji je

karakterističan za N=CH proton u skupini tipičnoj za Schiffove baze. Također su se pojavili signali iz supstituiranog aromatskog prstena koji je kondenzacijom vezan na hidrazid **1**, a kreću se u rasponu 6,90-7,75 ppm. Pojavili su se i signali pojednih hidroksilnih skupina, kojima je bio supstituiran fenilni prsten, u području 9,26 – 11,93 ppm.

^{1}H NMR tiosemikarbazida (**3a-e**) pokazao je dva signala karakteristična za NH-CS-NH skupinu na oko 11,00-12,50 ppm, a koji ujedno dokazuju da je iz hidrazida nastao tiosemikarbazid. Osim signala karakterističnih za kumarinsku jezgru, bili su vidljivi i signali za metilnu (2,81 ppm), etilnu (t 1,29 ppm i q 4,43 ppm), kao i supstituiranu fenilnu skupinu (6,33 – 7,70 ppm, ovisno o supstituentima na prstenu) na tiosemikarbazidu.

Signali na oko 11,00-12,50 ppm, koji su karakteristični za tiosemikarbazid, nedostajali su kod tiazolidinona (**4a-e**), gdje se u isto vrijeme pojavio signal na oko 4,10 ppm, koji pripada metilenskoj skupini tiazolidinonskog prstena. Također se moglo uočiti signale karakteristične za metilnu (0,72 ppm), etilnu (t 0,9 ppm i q 1,4 ppm) i fenilnu skupinu (6,74 – 7,45 ppm ovisno o supstituentima na prstenu).

Dakle, pomoću ^{1}H NMR spektroskopije su se dobile informacije o spoju na temelju kojih se moglo zaključiti koje su funkcionalne skupine prisutne odnosno odsutne u novosintetiziranim spojevima, a također se dobio uvid u čistoću spojeva, jer ukoliko su prisutni samo signali koji karakteriziraju spoj, tada je spoj čist.

Elementarnom analizom je na još jedan način potvrđena struktura dobivenih spojeva. Udjeli pojedinih elemenata u spojevima su uspoređeni s izračunatima u i za sve spojeve se podudaraju u granicama dopuštenog odstupanja od 0,4%.

Podaci o strukturi dobiveni gore navedenim metodama su ukazali na činjenicu da su dobiveni spojevi željene strukture i čistoće, koji su se dalje mogli ispitati na antioksidacijsku i antifungalnu aktivnost.

5.3. ANTIOKSIDACIJSKA AKTIVNOST

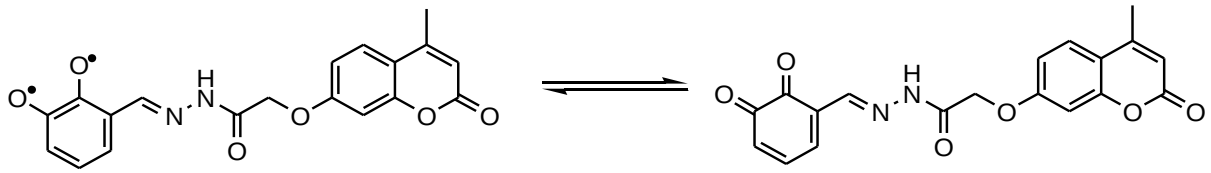
DPPH je slobodni radikal koji može reagirati putem prijenosa vodikovog atoma ili elektrona, a mehanizam uvelike ovisi o otapalu. DPPH u nepolarnim otapalima reagira putem oduzimanja vodika, dok u polarnim otapalima, kao što su etanol i metanol, dominirajući mehanizam je prijenos elektrona, nakon kojeg slijedi prijenos vodika (Yeo i sur., 2010.). Pošto je otapalo koje je korišteno u ovom ispitivanju DMSO, jako polarno otapalo, za pretpostaviti bi bilo da je mehanizam hvatanja DPPH radikala putem prijenosa elektrona, nakon kojeg slijedi transfer vodika.

Prema antioksidacijskoj aktivnosti, izraženoj kao % hvatanja DPPH radikala, ispitane derivate kumarina može se svrstati u 3 skupine – one koji pokazuju dobru (> 40%), umjerenu antioksidacijsku aktivnost (20-40%) i one koji istu ne pokazuju (**Tablice 4 i 5**).

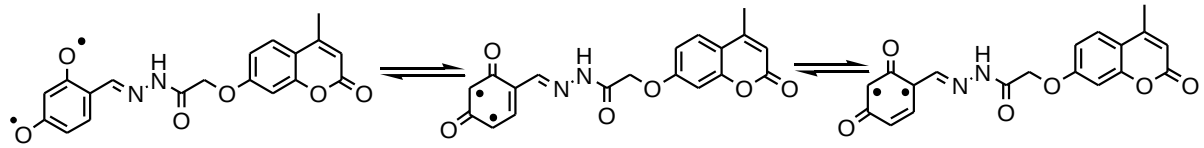
U hvatanju DPPH radikala najboljom od derivata kumarina se pokazala Schiffova baza **2h** s 2,3-dihidroksilnom skupinom na fenilnom prstenu (**Tablice 4 i 5**). Takav rezultat je očekivan, s obzirom da je poznata činjenica da kateholna skupina znatno utječe na povećanje antioksidacijske aktivnosti, što je u skladu s istraživanjem Roussakija i suradnika (2010.). Oni su ispitivanjem serije spojeva ustanovili da je kateholna skupina (dvije hidroksilne skupine u međusobnom *orto* položaju) ključna za postizanje antioksidacijske aktivnosti. Foti i sur. (1996.) i Pedersen i sur. (2007.), su također dobili iste rezultate za kumarine s *o*-dihidroksi fenolnom skupinom, dok spojevi s metoksi skupinama ili samo jednom hidroksilnom skupinom nisu pokazali značajnu antioksidacijsku aktivnost (Roussaki i sur., 2010.; Pedersen i sur., 2007.). Prema ispitivanju provedenom u ovom radu potvrđena je i ta činjenica, jer spojevi s metoksi skupinama (**2e**, **2f**, **2g**) i jednom hidroksilnom skupinom na (**K**, **2b**, **2c**, **2d**) nisu pokazali značajnu antioksidacijsku aktivnost (**Tablice 4 i 5**). Kateholna skupina doprinosi i povećanju hvatanja superoksid radikala polifenola (Bailly i sur., 2004.), kao i peroksil radikala kod nekih kumarina (Ćavar i sur., 2009.).

Spoj **2k**, koji također posjeduje hidroksilne skupine u međusobnom *orto* položaju pokazao je dobru antioksidacijsku aktivnost, ali značajno manju od **2h** (**Tablice 4 i 5**). Ovo ukazuje na činjenicu da nije važan samo međusobni odnos hidroksilnih skupina na fenilnom prstenu, već i njihov položaj. Naime, u benzenskom prstenu s hidroksilnim radikalom u položaju 1,4 kisik dijeli dio pozitivnog naboja pri čemu dolazi do stabilizacije delokalizacijom

(**Slika 44**). Ukoliko je hidroksilni radikal u položaju 1,3 kisikov atom ne može dijeliti dio pozitivnog naboja, što utječe na sposobnost hvatanja DPPH radikala (**Slika 45**). Supstitucija u položaju 1,2 i 1,4 aktivira prsten (**Slika 44**), dok ga supstitucija u položaju 1,3 inaktivira (Tominaga i sur., 2005.). Ovo je ustanovljeno i na primjeru spojeva **2i** i **2l** koji ne pokazuju značajnu antioksidacijsku aktivnost (**Tablice 4 i 5**) jer ne stvaraju stabilne kinoidne strukture.



Slika 44 Stabilna kinoidna struktura spoja **2h** stabilizirana delokalizacijom



Slika 45 Nestabilna struktura spoja **2i** nakon otpuštanja vodikova atoma kod koje ne postoji mogućnost stabilizacije delokalizacijom

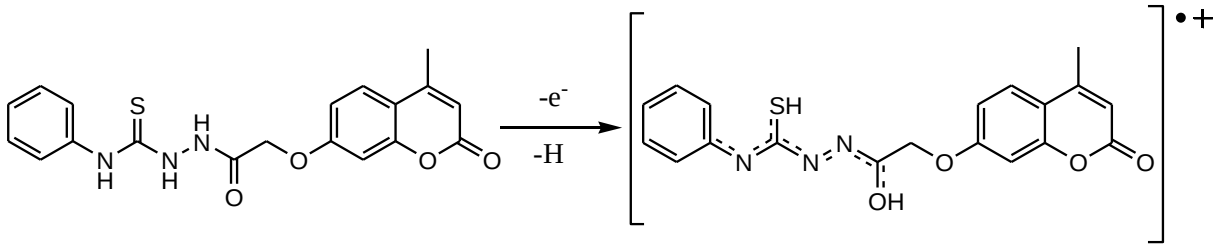
Kod spojeva **2h** i **2k**, je iz **Slike 38** jasno vidljivo da je stehiometrijski odnos **2h** : DPPH 1 : 2, dok u slučaju **2k** to nije tako. Naime, prilikom ispitivanja koncentracija DPPH radikala je 0,2 mM, pa se iz **Slike 38** za **2h** jasno vidi da se antioksidacijska aktivnost počinje smanjivati pri koncentraciji **2h** 0,1 mM, što odgovara dvostruko manjoj koncentaciji DPPH radikala. Spoj **2k** pokazuje vrijednost 50% hvatanja DPPH radikala pri koncentraciji 0,2 mM, što daje odnos DPPH : **2k** 2:1.

Spoj **2h** vrlo je brzo reagirao s DPPH radikalom (**Slika 40**). Za 2 minute se konzumiralo već oko 60% slobodnog radikala, dok je za 6 minuta izreagirao gotovo sav radikal. Spojevi **2m** i **2j**, koji nakon 30 minuta pokazuju umjerenu aktivnost hvatanja DPPH radikala, nakon 60 minuta konzumiraju sav radikal, s tim da je spoj **2j** reagirao brže od **2m**, vjerojatno jer za **2j**

postoji mogućnost da s DPPH radikalima reagira u odnosu 2:1 i pritom tvori stabilan kinonski oblik.

Vrlo dobru antioksidacijsku aktivnost pokazali su i tiosemikarbazidi **3c** i **3e** (**Tablice 4 i 5**). Antioksidacijska aktivnost tiosemikarbazida se pripisuje prisutnosti sumpora (C=S) (Nikolaides i sur., 1998.), iako je očito da supstitucija na fenilnom prstenu također ima vrlo značajan učinak. Iz dobivenih podataka je vidljivo da antioksidacijsku aktivnost pokazuju samo tiosemikarbazidi s fenilnim prstenom i 4-metoksifenilom kao supstituentom, dok oni s alkilnim skupinama (metil - **3a**, etil - **3b**), kao i tolilnom (**3d**) skupinom ne pokazuju značajnu aktivnost (**Tablice 4 i 5**).

Međutim, vrlo je važno naglasiti da u cijeloj seriji tiosemikarbazida i iz njih dobivenih tiazolidinona, tiosemikarbazidi su u svim slučajevima pokazali bolju antioksidacijsku aktivnost od pripadajućih tiazolidinona (**Tablice 4 i 5**).



Slika 46 Molekula tiosemikarbazida stabilizirana delokalizacijom elektrona kroz molekulu

Vjerojatni razlog je otpuštanje elektrona i potom vodikova atoma iz tiosemikarbazidne molekule, pri čemu nastaje rezonancijom stabilizirana struktura (**Slika 46**), koja kod tiazoidinona ne može nastati. Kod tiosemikarbazida na raspolaganju su tri vodikova atoma, od kojih se najvjerojatnije otpušta onaj na N-4, jer je amidna skupina sama po sebi slabo reaktivna, a N-4 lakše otpušta elektron od N-2. Prema utjecaju supstituenata na antioksidacijsku aktivnost, također se dolazi do zaključka da N-4 na kojem se supstituenti nalaze otpušta elektron tj. vodik. Ovaj rezultat je u skladu s pretpostavkom Shih i sur. (2007.) da spojevi koji sadrže N-H pokazuju antioksidacijsku aktivnost jer mogu otpustiti vodik iz navedene skupine (Shih i sur., 2007.; Vukovic i sur., 2010.).

Spojevi **3c** i **3e** su vrlo brzo reagirali s DPPH radikalom (**Slika 41**), pa je u 2. minuti neutralizirano već oko 30% radikala, dok je nakon 60 minuta konzumiran sav radikal.

Umjerenu aktivnost hvatanja DPPH radikala pokazali su spojevi **2a**, **2j** i **3b** (**Tablice 4 i 5**).

Spojevi s halogenim supstiutuentima, očekivano kao i prema Manojkumar i sur. (2009.b), nisu pokazali značajnu antioksidacijsku aktivnost (**Tablice 4 i 5**).

Važno je napomenuti da između antioksidacijske aktivnosti polaznog spoja, 7-hidroksi-4-metilkumarina, i sintetiziranih derivata kumarina postoji statistički značajna razlika ($p < 0,05$), odnosno antioksidacijska aktivnost polaznog spoja se značajno povećala modifikacijom na položaju 7. Nasuprot tomu, Wu i suradnici (2007.) naglašavaju da je slobodna hidroksilna skupina u položaju 7 jednostavnih kumarina nužna za postizanje antioksidacijske aktivnosti.

Rezultati antioksidacijske aktivnosti izražene kao % hvatanja DPPH radikala dobivenih EPR metodom se podudaraju s rezultatima dobivenim spektrofotometrijskom metodom (**Slika 37**).

Usporedbom podataka % hvatanja DPPH radikala dobivenih spektrofotometrijski i EPR metodom dobije se vrlo visoki koeficijent korelacije, 0,93. (**Tablica 8**). Visoki koeficijent korelacije pokazuje da porastom jednog skupa vrijednosti, raste i drugi, ali valja naglasiti da se podaci dobiveni gore navedenim metodama i uvelike podudaraju po svojim vrijednostima, što je bilo očekivano (**Slika 37**). Naime, obje metode koriste isti radikal i način pripreme uzoraka, samo što kod spektrofotometrijske metode postoji vjerojatnost zaostanka rezidualne boje koja može utjecati na konačni rezultat. Zato je u ovom radu napravljena i EPR metoda, koja direktno određuje slobodne radikale u smjesi i osjetljivija je od spektrofotometrijske metode.

Fosfomolibden metoda se temelji na redukciji Mo(VI) do Mo(V) u kiselom pomoću određene tvari, u ovom slučaju derivata kumarina, i nastankom zelenog kompleksa fosfat/Mo(V) u kiselom pH. Ovo je kvantitativna metoda kod koje dolazi do prijenosa elektrona, što dakako ovisi o strukturi samog antioksidansa. Kako se ovom metodom detektiraju antioksidanski kao askorbinska kiselina, fenoli, tokoferoli, karotenoidi (Riaz i sur., 2011.), ona je pogodna i za analizu derivata kumarina. Prema ovoj metodi kao dobri

reducensi pokazali su se spojevi **2j**, **2h**, **2u**, **2t**, **2x**, **2d**, **2s** i **2c**, svi bolji u odnosu na askorbinsku kiselinu, koja je korištena kao standard (**Tablica 6**).

Tiosemikarbazidi i tiazolidinoni se, za razliku od prethodnih metoda, nisu pokazali kao dobri reducensi u ovoj metodi (**Tablica 6**) .

Najbolji reducens je spoj **2j**, potom slijedi **2h**, Schiffove baze sa 2,5 i 2,3-dihidroksilnom skupinom na fenilnom prstenu, koje su se i u prethodnim metodama pokazale kao dobri antioksidansi u odnosu na druge derivate kumarina (**Tablice 4, 5 i 6**). Također do izražaja dolaze i spojevi **2s**, **2t**, **2u**, **2x**, Schiffove baze s halogenim supstituentima na fenilnom prstenu (**Tablica 6**). I ovdje ja važno naglasiti da se u odnosu na polazni spoj, **K**, reducirajuća sposobnost jako povećala, odnosno između navedenih postoji statistički značajna razlika ($p < 0,05$), što ukazuje na činjenicu da se supstitucijom OH skupine u položaju 7 može uvelike utjecati na gore navedenu aktivnost kumarina.

Između ove metode i ostalih metoda određivanja antioksidacijske aktivnosti ne postoji korelacija (**Tablica 9**), što su dokazali i drugi autori (Matkowski i Piotrowska, 2006.; Jayaprakasha i sur., 2008.). Ta činjenica ukazuje na kompleksnost mehanizama koji su karakteristični za pojedinu metodu određivanja antioksidacijske aktivnosti. Također, valja napomenuti, da je kod DPPH metode značajno i to da neki spojevi možda ne pokazuju antioksidacijsku aktivnost ili je ona prividno smanjena, jer su sterički ograničeni u odnosu na DPPH radikal, što je kod fosofmolibden metode izbjegnuto.

Rezultati antioksidacijske aktivnosti izraženi kao % hvatanja galvinoksil radikala, radikala fenoksilnog tipa, se podudaraju s podacima dobivenim za hvatanje DPPH radikala (**Slika 39**).

Naime, radikali centrirani na kisiku (galvinoksil radikal) i dušiku (DPPH radikal) reagiraju s fenolima putem dva različita mehanizma (HAT i SET mehanizam) (Foti i sur., 2004.), a doprinos jednog ili drugog mehanizma ovisi o prirodi otapala i/ili redoks potencijalu tvari koje sudjeluju u reakciji. Znači, mehanizam hvatanja bilo glavinoksil ili DPPH radikala je pri istim uvjetima, isti, samo što je galvinoksil radikal u usporedbi s DPPH radikalom puno reaktivniji prema fenolima (Tirzitis i Bartosz, 2010.; Zhao i Liu, 2010.; Koprivnjak i sur., 2008.).

I galvinoksil i DPPH radikal su obojeni spojevi što je dobro za spektrofotometrijsko određivanje, ali produkti nastali u reakciji su također obojeni i mogu apsorbirati pri istim

valnim duljinama i na taj način ometati interpretaciju rezultata (Pedersen i sur., 2007.), pa je stoga ovo istraživanje dobro provesti i pomoću EPR, gdje je ovaj nedostatak eliminiran.

Schiffove baze **2h**, **2j**, **2k** pokazale su najbolju aktivnost hvatanja galvinoksil radikala, čak bolju i od askorbinske kiseline, koja je korištena kao standard (**Tablica 7**). Sve ove Schiffove baze su na fenilnom prstenu supstituirane s dvije hidroksilne skupine. Spoj **2h** je supstituiran hidroksilnim skupinama u položaju 2,3 fenilnog prstena, **2j** u položaju 2,5 i **2k** u položaju 3,4. Sve ove gore navedene strukture mogu tvoriti stabilne kinoidne strukture (**Slika 44**), za razliku od npr. spoja **2i**, koji također posjeduje dvije hidroksilne skupine na fenilnom prstenu, ali u položaju 2,4 što onemogućuje stvaranje takve strukture, pa samim time pokazuje nisku antioksidacijsku aktivnost.

Brzina reakcije spojeva **2h**, **2k** i **2j** s galvinoksil radikalom je vrlo velika (**Slika 42**), osobito kod **2h** gdje je u 2. minuti konzumiran sav radikal, dok se za spojeve **2k** i **2j** potpuna neutralizacija radikala zbiva oko 6. minute.

Tiosemikarbazidi **3c**, **3e**, **3b** i **3a** su također pokazali izvrsnu aktivnost hvatanja galvinoksil radikala, više od 80% (**Tablica 7**), kao i kod DPPH metode, a za pretpostaviti je i da je mehanizam isti, jer su primijenjeni isti uvjeti.

Također je važno naglasiti da su tiosemikarbazidi vrlo brzo reagirali s galvinoksil radikalom, osobito **3e** i **3c** koji izreagiraju sa gotovo svim radikalom u samo 3 minute (**Slika 43**).

Kod obje metode uočava se isti uzorak antioksidacijske aktivnosti ispitanih spojeva, što je vidljivo i iz visokog koeficijenta korelacije (**Tablica 8**), kao i na **Slici 39**. Slično je utvrđeno i u istraživanju Pedersena i sur. (2007.). Međusobni odnos antioksidacijske aktivnosti spojeva je isti, ali su vrijednosti dobivene za hvatanje galvinoksil radikala sustavno veće od onih dobivenih za hvatanje DPPH radikala (**Slika 39**). To opet potvrđuje činjenicu da je galvinoksil radikal reaktivniji tj. osjetljiviji od DPPH radikala.

Usporedbom antioksidacijske aktivnosti polaznog spoja, 7-hidroksi-4-metilkumarina, i sintetiziranih derivata kumarina ustanovljeno je da postoji statistički značajna razlika ($p < 0,05$) između njih. To znači da sintetskim putem dobiveni derivati 7-hidroksi-4-metilkumarina pokazuju puno veći kapacitet antioksidacije od polaznog spoja.

5.4. ANTIFUNGALNA AKTIVNOST

Kod određivanja antifungalne aktivnosti prema plijesni *A. flavus* Schiffove baze su pokazale odličnu antifungalnu aktivnost (**Tablica 10**). Za većinu Schiffovih baza vrijedi da gotovo u potpunosti inhibiraju rast ove plijesni pri koncentracijama 1 μg/mL i 0,1 μg/mL. Schiffove baze **2c**, **2h**, **2i**, **2n** i **2z** pokazuju potpunu inhibiciju pri svim ispitanim koncentracijama (**Tablica 10**). Spojevi **2c**, **2h** i **2i** u svojoj strukturi sadrže hidroksilne skupine, što je u skladu s prethodnim istraživanjima (Ahluwalia i sur., 1983.; Sah i sur., 2011.) koji su pokazali važnost prisutnosti hidroksilnih skupina na fenilnom prstenu Schiffovih baza za povećanje antimikrobne aktivnosti. Ostali spojevi s hidroksilnim skupinama, bilo jednom ili dvije, na fenilnom prstenu također pokazuju odličnu antifungalnu aktivnost (**Tablica 10**). Prisutnost halogenih supstituenata na aromatskom prstenu bitna je za postizanje antifungalne aktivnosti (Sah i sur., 2011.; Sivakumar i sur., 2010., Brooker i sur., 2007.; 2008.), što je potvrđeno i ovim ispitivanjem. Međutim iako spojevi **2q**, **2r**, **2s**, **2t** i **2v,** koji sadrže halogene supstituente, pokazuju vrlo dobru antifungalnu aktivnost (> 50%), spojevi s hidroksilnim skupinama su se pokazali kao bolja antifungalna sredstva prema plijesni *A. flavus* (**Tablica 10.**).

U skupini tiosemikarbazida i tiazolidinona kao najbolja antifungalna sredstva su se pokazali spojevi **3c**, **4c i 4e**, koji pokazuju vrlo visoku aktivnost (> 80%) (**Tablica 10.**). Svi ovi spojevi u svojoj strukturi sadrže fenilnu skupinu, jedan je tiosemikarbazid (**3c**), a **4c** i **4e** su tiazolidinoni. Važnost fenilne skupine na tiosemikarbazidu, supstituirane ili ne, za antifungalnu aktivnost već je dokazana od strane Sasse i suradnika (1972.).

Slično kao i kod prethodnog ispitivanja, Schiffove baze i prema *A. ochraceus* pokazuju izvrsnu antifungalnu aktivnost. Do izražaja dolaze spojevi **2c**, **2e**, **2k**, **2s** i **2y** (**Tablica 11**). Prisutnost hidroksilnih i metoksilnih skupina i u ovom slučaju se pokazala važnom za postizanje antifungalne aktivnosti, iako je od značaja i položaj tih skupina na fenilnom prstenu. Tako primjerice spojevi **2f**, **2i**, **2j**, koji također imaju hidroksilne skupine na fenilnom prstenu, pokazuju znatno manju aktivnost od gore navedenih (**Tablica 11**). Schiffove baze s halogenim supstuituentima, kao i one s hidroksilnim skupinama, su pokazale antifungalnu aktivnost ovisno o položaju halogena na fenilnom prstenu. Klorirani spojevi **2q**, **2r**, u oba slučaja pokazuju odličnu aktivnost, dok se kod bromiranih ističe onaj s bromom u položaju 2

fenilnog prstena, **2s**, dok preostala dva derivata (brom u položaju 3 i 4 kod **2t**, **2u**) pokazuju nešto nižu aktivnost od **2s** (**Tablica 11**). Među halogeniram spojevima, oni s fluorom, **2v**, **2w**, **2x**, pokazuju najnižu aktivnost (**Tablica 11**). Prema istraživanju Brookera i sur. (2007.; 2008.) klorirani derivati kumarina pokazuju veću antifungalnu aktivnost nego bromirani i jodirani derivati, a mnoštvo drugih autora ističe važnost prisutnosti klora za postizanje antifungalne aktivnosti (Stewart, 2010.; Kalkhambar, 2011.; Mouri i sur., 2005.).

U skupini tiosemikarbazida i tiazolidinona značajnu antifungalnu aktivnost pokazuju spojevi **4a**, **4d**, **3e**, **4e** (**Tablica 11**)**.** Do izražaja opet dolaze spojevi s fenilnom skupinom u svojoj strukturi, kao i kod istraživanja Sasse i sur. (1972.), izuzev **4a**. U ovoj skupini spojeva vidljivo je da tiazolidinoni pokazuju bolju antifungalnu aktivnost prema *A. ochraceus* od tiosemikarbazida (**Tablica 11**), što osim na važnost prisutnosti fenilnog prstena, ukazuje i na važnost prisutnosti tiazolidinonskog prstena za postizanje antifungalne aktivnosti.

Od svih ispitanih plijesni, *Fusarium graminearum* se pokazao najosjetljiviji na antifungalna sredstva s kumarinskom strukturom koja su ispitana u ovom radu. Schiffove baze, kao i tiosemikarbazidi i tiazolidinoni pokazuju izvrsnu antifungalnu aktivnost prema ovoj plijesni (**Tablica 12**). Shi i sur. (2008.) su ispitivali djelovanje ostola, biljnog kumarina koji je također supstituiran u položaju 7, na *F. graminearum*, koji je pokazao izvrsno antifungalno djelovanje. Zaključili su da ostol inhibira rast hifa ove plijesni jer smanjuje apsorpciju reducirajućih šećera, što dugoročno dovodi do nedostatka energije potrebne za rast i razmnožavanje.

Fusarium verticillioides se, za razliku od *F. graminearum*, pokazala kao najotpornija plijesan na antifungalna sredstva s kumarinskom jezgrom. U ovom slučaju je i jasno vidljiv doprinos modifikacije osnovne strukture, 7-hidroksi-4-metilkumarina, različitim skupinama, čija se aktivnost značajno povećala nakon supstitucije. Schiffove baze su se ponovno pokazale dobrim antifungalnim sredstvima (**Tablica 13**), osobito spojevi **2i**, **2j**, **2n**, **2r**, **2s** i **2z**. Spojevi **2i** i **2j** u svojoj strukturi sadrže dihidroksifenilni sustav, a **2r** i **2s** halogene supstituente na fenilnom prstenu, što je u skladu s prije provednim istraživanjima (Ahluwalia i sur., 1983.; Sah i sur., 2011.; Brooker i sur., 2007.; 2008.), ali i u ovom slučaju postoje iznimke. Naime, spojevi koji također u svojoj strukturi imaju hidroksilne skupine, **2b** s jednom i **2h** i **2l** s dvije hidroksilne skupine ne pokazuju značajnu antifungalnu aktivnost (**Tablica 13**), što opet ukazuje na važnost, ne samo supstituenata, već i njihovog položaja. Gotovo svi derivati s

halogenim supstituentima, izuzev **2u** i **2w**, su se pokazali kao vrlo dobra antifungalna sredstva (**Tablica 13**).

U skupini tiazolidinona i tiosemikarbazida visoku inhibicijsku aktivnost pokazali su **3c**, **4c**, **3e** i **4e**, spojevi s fenilnom skupinom na tiosemikarbazidnoj ili tiazolidinonskoj strukturi (**Tablica 13**). Istraživanjem Sasse i sur. (1972.) je potvrđeno da 1-fenil-tiosemikarbazidi, s fenilnom i supstituiranom fenilnom skupinom (klor, metil, metoksi skupina) posjeduju fungicidna svojstva.

Iz gore navedenih podataka jasno je vidljivo da su Schiffove baze izvrsna antifungalna sredstva prema plijesnima ispitanim u ovom radu, a kod antifungalnog djelovanja prema *F. verticillioides* jasno je vidljivo da se dodatkom ove skupine na 7-hidroksi-4-metilkumarin, njegova aktivnost značajno povećala (**Tablica 13**). Singh i sur. (1987.) su utvrdili da supstituirani derivati kumarina pokazuju veću antifungalnu aktivnost od samog kumarina. Sah i sur. (2011.) antimikrobnu aktivnost Schiffovih baza pripisuju njihovim svojstvima keliranja.

Drugi autori su također dokazali da alkilacija hidroksilne skupina u položaju C7 7-hidroksi-4-metilkumarina može utjecati na povećanje antifungalne aktivnosti (Atta-ur-Rahman, 2000.). Ispitivanjem antifungalnog učinka prema ostalim plijesnima u ovom radu nije uočeno povećanje aktivnosti polaznog spoja nakon sinteze (**Tablice 10, 11 i 12**), vjerojatno zato jer kod ispitanih koncentracija i sam kumarin pokazuje vrlo visoku antifungalnu aktivnost. Međutim, sintetskim postupkom modifikacije kumarina zadržana su njegova izvrsna antifungalna svojstva, ali je povećana antioksidacijska aktivnost, što bi moglo biti od velike važnosti u inhibiciji biosinteze mikotoksina navedenih plijesni. Naime, poznato je da oksidativni stres uzrokuje povećanu biosintezu mikotoksina (Narasaiah i sur., 2006.; Reverberi i sur., 2010.), na što bi se vrlo vjerojatno moglo utjecati odgovarajućim doziranjem dobrim antioksidansima.

U **Tablicama 10, 11, 12 i 13** u nekim slučajevima se pokazalo da se smanjenjem koncentracije potencijalnog antifungalnog sredstva povećala njegova inhibirajuća aktivnost na rast određenih plijesni. Ovaj fenomen se može objasniti pojmom zaostalog rasta (eng. trailing) koji podrazumijeva rast plijesni iznad MIC, kada dolazi do formacije kompaktnih,

sitnih mikrokolonija na dnu jažice ili mikroskopskih morfoloških promjena na hifama, koji ometa tumačenje dobivenih rezultata (Las-Florl i sur., 2006.; Espinel-Ingroff, 2003.).

Rezultati ovog cjelokupnog istraživanja su pokazali da između antioksidacijske aktivnosti i antifungalne aktivnosti nema korelacije (**Tablica 14**), uz iznimku za korelaciju aktivnosti hvatanja galvinoksil radikala i antifungalne aktivnosti prema *F. graminearum* ($r = 0,36$ uz $p = 0,025$) i antioksidacijsku aktivnost dobivenu fosfomolibden metodom i antifungalne aktivnosti prema *F. verticillioides* koja je na granici značajnosti ($r = 0,30$ uz $p = 0,07$). Razlike u koeficijentima korelacije između podataka za antifungalnu aktivnost i podataka dobivenih različitim metodama antioksidacijske aktivnosti su očite i mogu se pripisati različitim mehanizmima koji su karakteristični za pojedinu metodu određivanja antioksidacijske aktivnosti. Naime, između fosfomolibden metode i ostalih metoda određivanja antioksidacijske aktivnosti u ovom radu ne postoji korelacija, dok između podataka hvatanja galivnoksil radikala i DPPH radikala postoji visoka korelacija, ali je kod hvatanja DPPH radikala očit stereokemijski efekt koji može utjecati na prividno nepostojanje antioksidacijske aktivnosti kod nekih spojeva. Zanimljivo je da korelacija postoji samo između podataka za određenu antioskidacijsku aktivnost i antifungalnog djelovanja prema *Fusarium* vrstama ispitanim u ovom radu. Prema istraživanju Thompsona (1991., 1992.) fenolnim antioksidansima se može kontrolirati germinacija konidija, rast i biosinteza aflatoksina kod plijesni *A. flavus* i *A. parasiticus*, dok prema Etcheverryju i sur. (2002.) komercijalno dostupni antioksidansi inhibiraju rast plijesni *F. verticillioides* i *F. proliferatum*. Novija istraživanja, naime, pokazuju da su se *Fusarium* vrste pokazale osjetljivije na djelovanje antioksidanasa od *Aspergillus* vrsta (Passone i sur., 2007.), pa je to možda uzrok ovoj korelaciji. Unatoč niskoj korelaciji postoji nekoliko spojeva koji u isto vrijeme pokazuju vrlo visoke vrijednosti za obje aktivnosti, antioksidacijsku i antifungalnu.

Primjerice, Schiffove baze **2k** i **2i** u isto vrijeme pokazuju izvrsna antioksidacijska i antifungalna svojstva, kao i tiosemikarbazidi **3c** i **3e**, pa se te strukture mogu izdvojiti za daljnje proučavanje i potencijalnu primjenu u prehrambenoj industriji ili poljoprivredi. Naime, Mabrouk i sur. (1992.) su došli do zaključka da kumarinski spojevi djeluju antiaflatoksikogeno kod *A. flavusa*, osobito na biosintezu aflatoksina B, što bi moglo biti od velikog značaja u prehrambenoj industriji i poljoprivredi gdje kontaminacija namirnica i sirovina mikotokisnima predstavlja veliki problem.

6. ZAKLJUČCI

- Sintetskom modifikacijom 7-hidroksi-4-metilkumarina, u prvom koraku je u reakciji s etilbromoacetatom uz K_2CO_3 dobiven je etil 2-(4-metil-2-okso-2*H*-kromen-7-iloksi)acetat, koji je u reakciji s hidrazin hidratom dao polazni spoj za daljnju sintezu derivata kumarina, 2-(4-metil-2-okso-2*H*-kromen-7-iloksi)acetohidrazid (**1**);
- Kondenzacijom hidrazida s određenim aromatskim aldehidima dobiju se Schiffove baze (**2a-z**), koje se međusobno razlikuju po vrsti i položaju supstituenata na fenilnom prstenu;
- Kondenzacijom hidrazida s izotiocijanatima dobiju se tiosemikarbazidi, supstituirani različitim skupinama, alikilnim i arilnom, u položaju 4 tiosemikarbazidne skupine;
- Iz tiosemikarbazida se reakcijom s etilbromoacetatom, u prisutnosti natrijeva acetata, dobiju 4-tiazolidinoni, također s karakterističnim supstituentima, alkilnim i arilnim, u položaju 2 tiazolidinonskog prstena;
- Struktura i čistoća svih novosintetiziranih derivata kumarina je potvrđena različitim metodama;
- U skupini Schiffovih baza, najbolju aktivnost hvatanja DPPH radikala pokazuje spoj **2h**, derivat koji u svojoj strukturi sadrži 2,3-dihidroksifenilnu skupinu, dok spojevi **2h**, **2j**, **2k**, također s dihidroksifenilnom skupinom, pokazuju najbolju aktivnost hvatanja galvinoksil radikala. Određivanjem antioksidacijske aktivnosti Schiffovih baza fosfomolibden metodom spojevi **2j**, **2h**, **2u**, **2t**, **2x**, **2d**, **2s** i **2c**, su se pokazali kao izvrsni reducensi;
- U skupini tiosemikarbazida i tiazolidinona, najbolju aktivnost hvatanja DPPH radikala pokazuju tiosemikarbazidi **3c** i **3e**, koji u svojoj strukturi sadrže fenilnu i 4-metoksifenilnu skupinu, a spojevi **3a**, **3b**, **3c** i **3e** pokazuju visoku aktivnost hvatanja galvinoksil radikala. Tiosemikarbazidi pokazuju bolju aktivnost hvatanja i DPPH i galvinoksil radikala od pripadajućih tiazolidinona;
- Sintetskom modifikacijom, kod Schiffovih baza dodavanjem dihidroksifenilnih skupina i dodavanjem tiosemikarbazidna skupine sa supstituiranom (4-metoksi skupina) ili nesupstuituiranom fenilnom skupinom u položaj 7 molekule 7-hidroksi-4-

metilkumarina, znatno se povećala njegova aktivnost hvatanja DPPH i galvinoksil radikala;

- Obje metode određivanja hvatanja DPPH radikala, spektrofotometrijska i EPR metoda daju iste rezultate, ali valja napomenuti da je kod EPR metode izbjegnuto pogrešno tumačenje rezultata zbog zaostanaka rezidualne boje, što je moguće kod spektrofotometrijske metode. Između podataka dobivenih za hvatanje DPPH radikala i galvinoksil radikala postoji visoka korelacija, ali je galvinoksil radikal puno osjetljiviji/reaktivniji prema ispitanim spojevima od DPPH radikala. Između podataka dobivenih za hvatanje DPPH i galvinoksil radikala i podataka iz fosfomolibden metode, ne postoji korelacija;
- Schiffove baze pokazuju izvrsnu antifungalnu aktivnost prema *Aspergillus flavusu*, a kao najbolje su se pokazale Schiffove baze **2c**, **2h**, **2i**, **2n** i **2z**, koje pokazuju potpunu inhibiciju pri svim ispitanim koncentracijama, dok spojevi **2c**, **2e**, **2k**, **2s** i **2y** pokazuju vrlo visoku antifungalnu sktivnost prema *A. ochraceus*u. Kod *Fusarium* vrsta, antifungalnu aktivnost prema *F. graminearum* pokazuju sve Schiffove baze, kao i većina tiosemikarbazida i tiazolidinona, dok spojevi **2i**, **2j**, **2n**, **2r**, **2s** i **2z** pokazuju visoku antifungalnu aktivnost prema *F. verticillioides*. Schiffove baze, derivati 7-hidroksi-4-metilkumarina su izvrsna antifungalna sredstva prema ispitanim plijesnima na koncentracijama 1 μg/mL i 0,1 μg/mL;
- U skupini tiosemikarbazida i tiazolidinona kao najbolja antifungalna sredstva prema plijesni *A. flavus* su se pokazali spojevi **3c**, **4c i 4e**, a antifungalna aktivnost prema *A. ochraceus* je uočena kod spojeva **4a**, **4d**, **3e**, **4e**. U skupini tiosemikarbazida i tiazolidinona najbolju antifungalnu aktivnost prema *F. verticillioides* pokazuju spojevi **3c**, **4c**, **3e** i **4e**;
- Dodavanjem azometinske skupine (skupina koja karakterizira Schiffove baze) sa supstituiranim fenilnim prstenom (supstituiran hidroksilnim skupinama ili halogenima) u položaj 7 molekule 7-hidroksi-4-metilkumarina može se povećati njegova antifungalna aktivnost prema plijesnima *A. flavus*, *A. ochraceus*, *F. graminearum* i *F. verticillioides*;

- Između antioksidacijske i antifungalne aktivnosti prema *Aspergillus* vrstama ispitanima u ovom radu ne postoji korelacija;
- Korelacija postoji između antioksidacijske aktivnosti hvatanja galvinoksil radikala i antifungalne aktivnosti prema *F. graminearum*, kao i manje značajna korelacija između antioksidacijske aktivnosti određene fosofmolibden metodom i antifungalne aktivnosti prema *F. verticillioides*;
- Schiffove baze **2k** i **2i** u isto vrijeme pokazuju izvrsna antioksidacijska svojstva i antifungalnu aktivnost prema ispitanim plijesnima na ispitanim koncentracijama;
- Tiosemikarbazidi **3c** i **3e** pokazuju izvrsna antioksidacijska svojstva i antifungalnu aktivnost prema ispitanim plijesnima na ispitanim koncentracijama;
- Schiffove baze **2k** i **2i** i tiosemikarbazidi **3c** i **3e** su odličan model za daljnju sintezu novih, učinkovitijih sredstava s antioksidacijskom i antifungalnom aktivnošću;
- Svi spojevi koji pokazuju dobru antifungalnu aktivnost prema ispitanim plijesnima mogu se iskoristiti kao predmet daljnjeg istraživanja na prehrambenim supstratima.

7. LITERATURA

Abyshev AZ, Gindin VA, Semenov EV, Agaev EM, Abdulla-zade AA, Guseinov AB: Structure and biological properties of 2*H*-1-benzopyran-2-one (coumarin) derivatives. *Pharmaceutical Chemistry Journal* 40:27-30, 2006.

Ahluwalia VK, Anand S, Goyal M, Neghipur GA: Synthesis of N-benzilidene derivatives of 7-hydoxy-4-methyl(or phenyl) coumarin as potential fungicides and bactericides. *Journal of Antibacterial and Antifungal Agents* 11:622-626, 1983.

Alamed J, Chaiyasit W, McClements DJ, Decker EA: Relationships between free radical scavenging and antioxidant activity in foods. *Journal of Agricultural and Food Chemistry.* 57:2969–2976, 2009.

Al-Barwani FM, EA Eltayeb: Antifungal compounds from induced *Conium macultum* L. plants. *Biochemical Systematics and Ecology* 32:1097-1108, 2004.

Al-Haiza MA, Mostafa MS, El-Kady MY: Preparation of some new coumarin derivatives with biological activity. *Scientific Journal of King Faisal University (Basic and Applied Sciences)* 6:1426-1445, 2005.

Arif T, Bhosalea JD, Kumara N, Mandala TK, Bendreb RS, Lavekara GS, Dabur R: Natural products – antifungal agents derived from plants. *Journal of Asian Natural Products Research*, 11:621–638, 2009.

Arshad A, Osman H, Chan KL, Goh JH, Fun HK: (*E*)-1-[1-(6-Bromo-2-oxo-2*H*-chromen-3-yl)ethylidene]thiosemicarbazide. *Acta Crystalographica* E66:o1491-o1492, 2010.

Aslam K, Khosa MK, Jahan N, Nosheen S: Synthesis and applications of coumarin. *Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences* 23:449-454, 2010.

Asrani RK, Katoch RC, Gupta VK, Deshmukh S, Jindal N, Ledoux DR, Rottinghaus GE, Singh SP: Effects of feeding *Fusarium verticillioides* (formerly *Fusarium moniliforme*) culture material containing known levels of fumonisin B1 in Japanese Quail (*Coturnix coturnix japonica*). *Poultry Science* 85:1129–1135, 2006.

Bagihallia GB, Patila SA, Badami PS: Synthesis, physicochemical investigation and biological studies of zinc(II) complexes with 1,2,4-triazole Schiff bases. *Journal of the Iranian Chemical Society* 6:259-270, 2009.

Bailly F, Maurin C, Teissier E, Vezina H, Cotelle P: Antioxidant properties of 3-hydroxycoumarin derivatives. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 12:5611–5618, 2004.

Basile A, Sorbo S, Spadaro V, Bruno M, Maggio A, Faraone N, Rosselli S: Antimicrobial and antioxidant activities of coumarins from the roots of *Ferulago campestris* (*Apiaceae*). *Molecules* 14:939-952, 2009.

Bayman P, Baker JL, Doster MA, Michailides TJ, Mahoney NE: Ochratoxin production by the *Aspergillus ochraceus* group and *Aspergillus alliaceus. Applied and Environmental Microbiology* 68:2326–2329, 2002.

Bayoumi SAL, Rowan MG, Beeching JR, Blagbrough IS: Investigation of biosynthetic pathways to hydroxycoumarins during post-harvest physiological deterioration in Cassava roots by using stable isotope labelling, *ChemBioChem.* 9:3013 – 3022, 2008.

Becker EM, Nissen LR, Skibsted LH: Antioxidant evaluation protocols: Food quality or health effects. *European Food Research and Technology* 219:561–571, 2004.

Berenbaum M: Coumarins and caterpillars: a case for coevolution. *Evolution* 37:163-179, 1983.

Bisignano G, Sanogo R, Marino A, Aquino R, D'Angelo V, Germanò MP, De Pasquale R, Pizza C: Antimicrobial activity of *Mitracarpus scaber* extract and isolated constituents. *Letters in Applied Microbiology* 30:105-108, 2000.

Blagbrough IS, Bayoumi SAL, Rowan MG., Beeching JR: Cassava: An appraisal of its phytochemistry and its biotechnological prospects. *Phytochemistry* 71:1940–1951, 2010.

Brand-Williams W, Cuvelier ME, Berset C: Use of free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensmittel-Wissenschaft und Technologie,* 28:25-30, 1995.

Bondet V, Brand-Williams W, Berset C: Kinetics and mechanisms of antioxidant activity using the DPPH• free radical method. *Lebensmittel-Wissenschaft & Technologie*. 30:609–615, 1997.

Borges F, Roleira F, Milhazes N, Santana L, Uriarte E: Simple coumarins and analogues in medicinal chemistry: Occurrence, synthesis and biological activity. *Current Medicinal Chemistry,* 12:887-916, 2005.

Brooker NL, Kuzimichev Y, Laas J, Pavlis R: Evaluation of coumarin derivatives as anti-fungal agents against soil-borne fungal pathogens. *Communications in Agricultural and Applied Biological Sciences* 72:785-793, 2007.

Brooker N, Windorski J, Bluml E: Halogenated coumarin derivatives as novel seed protectants. *Communications in Agricultural and Applied Biological Sciences* 73:81-89, 2008.

Butera RA, Waldeck DH: Electron paramagnetic resonance. Chem 1430 Manual, 2010. http://chemicaleducation.org/chem1430/manual/EPR.pdf

Cabello-Hurtado F, Durst F, Jorrin JV, Werck-Reichhart D: Coumarins in Helianthus tuberosus: Characterization, induced accumulation and biosynthesis. *Phytochemistry* 49:1029-1036, 1998.

Cardenas-Ortega NC, Perez-Gonzalez C, Zavala-Sanchez MA, Hernandez-Ramirez AB, Perez-Gutierrez S: Antifungal activity of seselin in protecting stored maize from *Aspergillus flavus*. *Asian Journal of Plant Sciences* 6:712-714, 2007.

Carpinella MC, Ferrayoli CG, Palacios SM: Antifungal synergistic effect of scopoletin, a hydroxycoumarin isolated from *Melia azedarach* L. fruits*. Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53:2922-2927, 2005.

Ceccherelli P, Curini M, MC Marcotullio, G Madruzza, Menghini A: Tortuoside, a new natural coumarin glucoside from *Seseli tortuosum. Journal of Natural Products* 52:888-890, 1989.

Cespedes CL, Avila JG, Martinez A, Serrato B, Calderon-Mugica JC, Salgado-Garciglia R: Antifungal and antibacterial activities of Mexican tarragon (*Tagetes lucida*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 54:3521-3527, 2006**.**

Chang CT, Doong SL, Tsai IL, Chen IS: Coumarins and anti-HBV constituents from *Zanthoxylum schinifolium*. *Phytochemistry* 45:1419-1422, 1997.

Clement M, Tremblay J, Lange M, Thibodeau J, Belhumeur P: Purification and identification of bovine cheese whey fatty acids exhibiting in vitro antifunagal activity. *Journal of Dairy Science,* 91:2535-2544, 2008.

Clinical and Laboratory Standards Institute: *Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of filamentous fungi-second edition*. M38-A2 28, 2008.

Conforti F, Marrelli M, Menichini F, Bonesi M, Statti G, Provenzano E, Menichini F: Natural and synthetic furanocoumarins as treatment for vitiligo and psoriasis. *Current Drug Therapy,* 4:38-58, 2009.

Čačić M, Molnar M, Šarkanj B, Has-Schön E, Rajković V: Synthesis and antioxidant activity of some new coumarinyl-1,3-thiazolidine-4-ones. *Molecules* 15:6795-6809, 2010.

Ćavar S, Kovač F, Maksimovic M: Synthesis and antioxidant activity of selected 4-methylcoumarins. *Food Chemistry* 117:135–142, 2009.

Davis N: Researchers glimpse pathogen's bag of tricks. 2007. http://www.broadinstitute.org/news/117 [12.02. 2011.]

Dembitsky MV, Tolstikov GA: Natural halogenated polyethers, pyrones, coumarins and flavones. *Chemistry of Sustainable Development* 12:129-138, 2004.

Deng Y, Nicholson RA: Stimulation by surangin B of endogenous amino acid release from synaptosomes. *Toxicon* 42:351–357, 2003.

Dighe NS, Pattan SR, Dengale SS, Musmade DS, Shelar M, Tambe V, Hole MB: Synthetic and pharmacological profiles of coumarins: A review. *Archives of Applied Science Research* 2:65-71, 2010.

Djilas S, Čanadanović-Brunet JM, Četković GS: Antioxidants in food. *Chemical Industries* 56:105-112, 2002.

Espinel-Ingroff A: Evaluation of broth microdilution testing parameters and agar diffusion Etest procedure for testing susceptibilities of *Aspergillus* spp. to Caspofungin acetate (MK-0991). *Journal of Clinical Microbiology* 41:403-409, 2003.

Espinel-Ingroff A, Canton E: Antifungal susceptubility testing for filamentous fungi. U *Antimicrobial Susceptibility Testing Protocols.* Schwalbe R, Steele-Moore L, Goodwin AC, 1st ed., Taylor and Francis, 206-242, 2007.

Etcheverry M, Torres A, Ramirez ML, Chulze S, Magan N: In vitro control of growth and fumonisin production by *Fusarium verticillioides* and *F. proliferatum* using antioxidants under different water availability and temperature regimes. *Journal of Applied Microbiology* 92:624-632, 2002.

European Comission: *Cosmetics Directive.* 76/768/EEC, 1976.

European Comission: *Council Directive.* 88/388/EEC, 1988.

European Commission: Regulation (EC) No 1334/2008 on flavouring and certain food ingredients with flavouring properties amending Council Regulation (EEC) no 1601/91, Regulations (EC) No 2232/96 and (EC) No 110/2008 and Directive 2000/13/EC. EC 1334/2008, 2008.

European Commission: *Scientific Committee on Consumer Products SCCP Opinion on Coumarin (sensitisation only).* SCCP/0935/05, 2006.

European Food Safety Authority: *Opinion of the Scientific Panel on Food Additives, Flavourings, Processing Aids and Materials in Contacts with Food (AFC) on a request from the Commission related to Coumarin Question number EFSA-Q-2003-118*. The EFSA Journal 104:1-36, 2004.

Farshori NN, Banday MR, Ahmad A, Khan AU, Rauf A: 7-Hydroxy-coumarin derivatives: synthesis, characterization and preliminary antimicrobial activities. *Medicinal Chemistry Research* 20:535-541, 2011.

Foti M, Piattelli M, Baratta MT, Ruberto G: Flavonoids, coumarins, and cinnamic acids as antioxidants in a micellar system. Structure-activity relationship. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 44:497-501, 1996.

Foti MC, Daquino C, Geraci C: Electron-transfer reaction of cinnamic acids and their methyl esters with the DPPH• radical in alcoholic solutions. *Journal of Organic Chemistry* 69:2309-2314, 2004.

Foti MC, Sharma SK, Shakya G, Prasad AK, Nicolosi G, Bovicelli P, Ghosh B, Raj HG, Rastogi RC, Parmar VS: Biopolyphenolics as antioxidants: Studies under an Indo-Italian CSIR-CNR project. *Pure and Applied Chemistry* 77:91–101, 2005.

Frankel EN, Finley JW: How to standardize the multiplicity of methods to evaluate natural antioxidants. *Journal of Agricultural and Food Chemistry.* 56:4901–4908, 2008.

Frisvad JC, Andersen B, Samson RA: Association of moulds to foods. U *Food Mycology-A Multifaceted Approach to Fungi and Food*. Taylor & Francis Group, LLC 2007.

Fuloria NK, Singh V, Yar MS, Ali M: Synthesis, characterization and antimicrobial evaluation of novel imines and thiazolidinones. *Acta Poloniae Pharmaceutica ń Drug Research*. 66:141-146, 2009.

Fylaktakidou KC, Hadjipavlou-Litina DJ, Litinas KE, Nikolaides DN: Natural and synthetic coumarin derivatives with anti-inflammatory/antioxidant activities. *Current Pharmaceutical Design* 10:3813-3833, 2004.

Gacche RN, Gond DS, Dhole NA, Dawane BS: Coumarin Schiff-bases: As antioxidant and possibly anti-inflammatory agents. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*; 21:157–161, 2006.

Ghosh M, Manna P, Sil PC: Protective role of a coumarin-derived schiff base scaffold against tertiary butyl hydroperoxide (TBHP)-induced oxidative impairment and cell death via MAPKs, NF-κB and mitochondria-dependent pathways. *Free Radical Research* 45: 620-637, 2011.

Goswami RS, Kistler HC: Heading for disaster: *Fusarium graminearum* on cereal crops. *Molecular Plant Pathology* 5:515–525, 2004.

Guilet D, Seraphin D, Rondeau D, Richomme P, Bruneton J: Cytotoxic coumarins from *Calophyllum dispar. Phytochemistry* 58:571–575, 2001.

Harayama T, Katsuno K, Nishita Y, Fujii M: Revision of structure of a new coumarin isolated from Artemisia carviforia Wall. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin* 42:1550-1552, 1994.

Hedayati MT, Pasqualotto AC, Warn PA, Bowyer P, Denning DW: *Aspergillus flavus*: human pathogen, allergen and mycotoxin producer. *Microbiology* 153:1677–1692, 2007.

Hoult JRS, Paya M: Pharmacological and biochemical actions of simple coumarins: natural products with therapeutical potential. *General Pharmacology: The Vascular System* 27:713-722, 1996.

Huang H-C, Weng Y-I, Lee C-R, Jan T-R, Chen Y-L, Lee Y-T: Protection by scoparone against the alterations of plasma lipoproteins, vascular morphology and vascular reactivity in hyperlipidaemic diabetic rabbit. *British Journal of Pharmacology* 110:1508-1514, 1993.

Hussein HS, Brasel JM: Toxicity, metabolism, and impact of mycotoxins on humans and animals. *Toxicology* 167:101- 134, 2001.

Iglesias J, Presello DA, Botta GL, Fauguel C, Eyherábide G: Formación de híbridos resistentes a *Fusarium verticillioides* en maíz. 2007. http://www.inta.gov.ar/pergamino/info/documentos/t_maiz/artic33.htm [18.03.2011.]

INRA (Institute National de la Recherche Agronomique) press service: Natural substances to limit mycotoxins. INRA 2011.
http://www.international.inra.fr/press/natural_substances_to_limit_mycotoxins
[15.04.2011.]

Ito C, Mizuno T, Matsuoka M, Kimura Y, Sato K, Kajiura I, Omura M, Ju-Ichi M, Furukawa H: A new flavonoid and other new components from *Citrus* plants. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin* 36:3292-3295, 1988.

Ito C, Furukawa H: Two new coumarins from *Murraya* plants. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin* 37:819-820, 1989.a

Ito C, Ju-Ichi M, Inoue M, Muraguchi M, Mizuno T, Tanahashi S, Omura M, McPhail DR, McPhail AT, Furukawa H: Strucutre of bisosthenon, a novel dimeric coumarin from *Citrus* plants. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin* 37:1957-1959, 1989.b

Ito C, Matsuoka M, Oka T, Ju-Ichi M, Niwa M, Omura M, Furukawa M: New binary coumarins from *Citrus* plants. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin* 38:1230-1232, 1990.

Ito C, Fujiwara K, Kajita M, Ju-Ichi M, Takemura Y, Suzuki Y, Tanaka K, Omura M, Furukawa H: New coumarins from *Citrus* plants. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin* 39:2509-2513, 1991.

Ito C, Nakagawa M, Inoue M, Takemura Y, Ju-Ichi M, Omura M, Furukawa H: A new biscoumarin from *Citrus* plants. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin* 41:1657-1658, 1993.a

Ito C, Ono T, Tanak E, Takemura Y, Nakata T, Uchida H, Ju-Ichi M, Omura M, Furukawa H: Structure of pummeloquinone, a new coumarin-naphthoquinone dimer isolated from *Citrus* plants. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin* 41:205-207, 1993.b

Ito C, Ohta H, Tan HTW, Furukawa H: Constituents of *Clausena exclavata*. Isolation and structural elucidation of seven new carbazole alkaloids an a new coumarin. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin* 44:2231-2235, 1996.

Jayaprakasha GK, Girennavar B, Patil BS: Radical scavenging activities of Rio Red grapefruits and Sour orange fruit extracts in different in vitro model systems. *Bioresource Technology* 99:4484‑4494, 2008.

Jarvis BB, Miller JD: Mycotoxins as harmful indoor air contaminants. *Applied Microbiology and Biotechnology* 66:367–372, 2005.

Ju-Ichi M, Takemura Y, Azuma M, Tanak K, Okano M, Fukamiya N, Ito C, Furukawa H: New coumarins from *Citrus hassaku*. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin* 39:2252-2255, 1991.

Kai K, Shimizu B, Mizutani M, Watanabe K, Sakata K: Accumulation of coumarins in *Arabidopsis thaliana. Phytochemistry* 67:379–386, 2006.

Kalkhambkar RG: Synthesis and biological activities of novel ethers of quinolinone linked with coumarins. *Monatshefte fur Chemie* 142:305–315, 2011.

Kancheva VD, Boranova PV, Nechev JT, Manolov II: Structureeactivity relationships of new 4–hydroxy bis-coumarins as radical scavengers and chain-breaking antioxidants. *Biochimie* 92:1138-1146, 2010.

Kang SY, Lee KY, Sung SH, Park MJ, Kim YC: Coumarins isolated from *Angelica gigas* inhibit acetylcholinesterase: Structure-activity relationships. *Journal of Natural Products* 64*:*683-685, 2001.

Kashman Y, Gustafson KR, Fuller RW, Cardellina JH, McMahon JB, Currens MJ, Buckheit RW Jr., Hughes SH, Cragg GM, Boyd MR: The calanolides, a novel HIV-inhibitory class of coumarin derivatives from the tropical rainforest tree, *Calophyllum lanigerum. Journal of Medicinal Chemistry*, 35: 2735-2743, 1992.

Kawase M, Sakagami H, Motohashi N, Hauer H, Chatterjee SS, Spengler G, Vigyikanne AV, Molnar A, Molnar J: Coumarin derivatives with tumor-specific cytotoxicity and multidrug resistance reversal activity. *In Vivo* 19:705-712, 2005.

Konishi T, Wada S, Kiyosawa S: Constituents of the leaves of *Daphne pseudo-mezereum*. *Yakugaku Zasshi* 113:670-675, 1993.

Koprivnjak O, Škevin D, Valić S, Majetić V, Petričević S, Ljubenkov I: The antioxidant capacity and oxidative stability of virgin olive oil enriched with phospholipids. *Food Chemistry* 111:121-126, 2008.

Kostova I: Synthetic and natural coumarins as cytotoxic agents. *Current Medicinal Chemistry-Anti-Cancer Agents* 5:29-46, 2005*.*

Kotali A, Lafazanis IS, Papageorgiou A, Chrysogelou E, Lialiaris T, Sinakos Z: Synthesis, characterization and antileucemic activity of 7-hydroxy-8-acetylcoumarin benzoylhydrazone. *Molbank* M574, 2008.

Kules M: Prilog poznavanju kemije 4-hidroksikumarina. *Disertacija*. Sveučilište u Zagrebu Tehnološki fakultet, 1978.

Kurdelas RR, Lima B, Tapia A, Feresin GE, Sierra MG, Rodríguez MV, Zacchino S, Enriz RD, Freile ML: Antifungal activity of extracts and prenylated coumarins isolated from *Baccharis darwinii* Hook & Arn. (*Asteraceae*). *Molecules* 15:4898-4907, 2010.

Kwon Y-S, Kobayashi A, Kajiyama S-I, Kawazu K, Kanzaki H, C.-M. Kim: Antimicrobial constituents of *Angelica dahurica* roots. *Phytochemistry* 44:887-889, 1997.

Lacy A, O'Kennedy R: Studies on coumarins and coumarin-related compounds to determine their therapeutic role in the treatment of cancer. *Current Pharmaceutical Design* 10:3797-3811, 2004*.*

Lake BG: Coumarin metabolism, toxicity and carcinogenicity: relevance for human risk assessment. *Food and Chemical Toxicology* 37:423-453, 1999.

Lass-Florl C, Cuenca-Estrella M, Denning DW, Rodriguez-Tudela JL Antifungal susceptibility testing in *Aspergillus* spp. according to EUCAST methodology. *Medical Mycology*, 44:S319-S325, 2006.

Lee JM, Chung H, Chang P-S, Lee JH: Development of a method predicting the oxidative stability of edible oils using 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH). *Food Chemistry* 103: 662-669, 2007.

Lee K-H, Chai H-B, Tameza PA, Pezzutoa JM, Cordell GA, Win KK, Tin-Wa M: Biologically active alkylated coumarins from *Kayea assamica. Phytochemistry* 64:535–541, 2003.

Lee BC, Lee SY, Lee HJ, Sim GS, Jin-Hui Kim JH, Kim JH, Cho YH, Lee DH, Pyo HB, Choe TB, Moon DC, Yun YP, Hong JT: Anti-oxidative and photo-protective effects of coumarins isolated from *Fraxinus chinensis*. *Archives of pharmacal research* 30:1293-1301, 2007.

Lin HC, Tsai SH, Chen CS, Chang YC, Lee CM, Lai ZY, Lin CM: Structure–activity relationship of coumarin derivatives on xanthine oxidase-inhibiting and free radical-scavenging activities. *Biochemical Pharmacology* 75:1416 – 1425, 2008.

Litwinienko G, Ingold KU: Abnormal solvent effects on hydrogen atom abstractions. 1. The reactions of phenols with 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH$^{\cdot}$) in alcohols. *Journal of Organic Chemistry* 68:3433-3438, 2003.

Liu B, Raeth T, Beuerle T, Beerhues L: A novel 4-hydroxycoumarin biosynthetic pathway. *Plant Molecular Biology* 72:17–25, 2010.

Lu Y, Foo LY: Antioxidant activities of polyphenols from sage (*Salvia officinalis*). *Food Chemistry* 75:197–202, 2001.

de Magalhães LMA: Development of automatic methods based on flow techniques for evaluation of antioxidant capacity in pharmaceutical and food products. *Disertacija*, Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto December, 2007.

Mabrouk SS, El-Shayeb NMA: Inhibition of aflatoxin production in *Aspergillus flavus* by natural coumarins and chromones. *World Journal of Microbiology and Biotechnology,* 8:60-62, 1992.

Malhotra S, Shakya G, Kumar A, Vanhoecke BW, Cholli AL, Raj HG, Saso L, Ghosh B, Bracke ME, Prasad AK, Biswal S, Parmar VS: Antioxidant, antiinflammatory and antiinvasive activities of biopolyphenolics. *Arkivoc* vi:119-139, 2008.

Manojkumar P, Ravi TK, Gopalakrishnan S: Antioxidant and antibacterial studies of arylazopyrazoles and arylhydrazonopyrazolones containing coumarin moiety. *European Journal of Medicinal Chemistry* 44:4690–4694, 2009.a

Manojkumar P, Ravi TK, Subbuchettiar G: Synthesis of coumarin heterocyclic derivatives with antioxidant activity and *in vitro* cytotoxic activity against tumour cells. *Acta Pharm*aceutica 59**:**159–170, 2009.b

Marasas WFO, Riley RT,Hendricks KA, Stevens VL, Sadler TW, van Waes JG, Missmer SA, Cabrera J, Torres O, Gelderblom WCA, Allegood J, Martınez C, Maddox J, Miller JD, Starr L, Sullards MC, Roman AV, Voss KA, Wang, Merrill AH Jr.: Fumonisins disrupt sphingolipid metabolism, folate transport, and neural tube development in embryo culture and *in vivo*: A potential risk factor for human neural tube defects among populations consuming fumonisin-contaminated maize. *Journal of Nutrition* 134:711-716, 2004.

Marston A, Hostetmann K: Isolation of antifungal and larvicidal constituents of *Diplolophium buchanani* by centrifugal partition chromatography. *Journal of Natural Products* 58:128-130, 1995.

Marwah RG, Fatope MO, Mahrooqi RA, Varma GB, Abadi HA, Khamis S, Al-Burtamani S: Antioxidant capacity of some edible and wound healing plants in Oman. *Food Chemistry* 101:465-470, 2007.

Mata R, Calzada F, Garcia MR, Reguero MT: Chemical studies on mexican plants used in traditional medicine, III: New 4-phenylcoumarins from *Exostema caribaeum*. *Journal of Natural Products* 50:866-871, 1987.

Mata R, Calzada F, del Rosario Garcia M: Chemical studies on mexican plants used in traditional medicine, VI. additional new 4-phenylcoumarins from *Exostema caribaeum*. *Journal of Natural Products* 51: 851-856, 1988.

Matkowski A, Piotrowska M: Antioxidant and free radical scavenging activities of some medicinal plants from the Lamiaceae. *Fitoterapia* 77:346–353, 2006.

Mazzei M, Nieddu E, Miele M, Balbi A, Ferrone M, Fermeglia M, Mazzei MT, Pricl S, La Colla P, Marongiu F, Ibbac C, Loddo R: Activity of Mannich bases of 7-hydroxycoumarin against *Flaviviridae. Bioorganic & Medicinal Chemistry* 16:2591–2605, 2008.

Ministarstvo zdravstva i socijalne skrbi RH: *Pravilnik o aromama*. NN 086/2010, 2010.

Mishra BB, Singh DD, Kishore N, Tiwari VK, Tripathi V: Antifungal constituents isolated from the seeds of *Aegle marmelos. Phytochemistry* 71:230–234, 2010.

Mladenović M, Vuković N, Nićiforović N, Sukdolak S, Solujić S: Synthesis and molecular descriptor characterization of novel 4-hydroxy-chromene-2-one derivatives as antimicrobial agents. *Molecules* 14:1495-1512, 2009.

Mohareb RM, El-Arab EE, El-Sharkawy KA: The reaction of cyanoacetic acid hydrazide with 2-acetylfuran: Synthesis of coumarin, pyridine, thiophene and thiazole derivatives with potential antimicrobial activities. *Scientia Pharmaceutica* 77:355–366, 2009.

Molyneux P: The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. *Songklanakarin Journal of Science and Technology* 26:211-219, 2004.

Mouri T, Yano T, Kochi S, Ando T, Hori M: Synthesis and antifungal activity of new 3,4,7-trisubstituted coumarins. *Journal of Pesticide Science* 30:209–213, 2005.

Narasaiah KV, Sashidhar RB, Subramanyam C: Biochemical analysis of oxidative stress in the production of aflatoxin and its precursor intermediates. *Mycopathologia* 162:179–189, 2006.

Natella F, Lorrain B, Prasad AK, Parmar VS, Saso L , Scaccini C: 4-Methylcoumarins as antioxidants: Scavenging of peroxyl radicals and inhibition of human low-density lipoprotein oxidation. *Biochimie* 92:1147-1152, 2010.

Nicolaides DN, Fylaktakidou KC, Litinas KE, Hadjipavlou-Litina D: Synthesis and biological evaluation of several coumarin-4-carboxamidoxime and 3-(coumarin-4-yl)-1,2,4-oxadiazole derivatives. *European Journal of Medicinal Chemistry* 33:715-724, 1998.

Niwa M, Sugino H, Takashima S, Sakai T, Wu YC, Wu TS, Kuoh CS: A new coumarine glucoside from *Daphne arisanensis*. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin* 39:2422-2424, 1991.

Ojala T, Remes S, Haansuu P, Vuorela H, Hiltunen, Haahtela K, Vuorela P: Antimicrobial activity of some coumarin containing herbal plants growing in Finland. *Journal of Ethnopharmacology* 73:299–305, 2000.

Ojala T: Biological Screening of Plant Coumarins. *Disertacija.* Faculty of Science, University of Helsinki, Helsinki, 2001.

Okada Y, Miyauchi N, Suzuki K, Kobayashi T, Tsutsui C, Mayuzumi K, Nishibe S, Okuyama T: Search for naturally occurring substances to prevent the complications of diabetes. II. Inhibitory effect of coumarin and flavonoid derivatives on bovine lens aldose reductase and rabbit platelet aggregation. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin* 43:1385-1387, 1995.

Okamoto T, Kajino K, Hino O: Hepatoprotective drugs for the treatment of virus-induced chronic hepatitis: From hypercarcinogenic state to hypocarcinogenic state. *Japanese Journal of Pharmacology* 87:177 – 180, 2001.

O'Kennedy R, Thornes RD: *Coumarins: Biology, applications and mode of action*. Wiley, Chichester, 1997.

Ožegović L, Pepeljnjak S. *Mikotoksikoze*. Školska knjiga, Zagreb, 1995.

Pandey VK, TusI S, Tusi Z, Joshi M, Bajpai S: Synthesis and biological activity of substituted 2,4,6-s-triazines. *Acta Pharmaceutica* 54:1–12, 2004.

Papić J: Novi europski propis za arome. 2009. http://www.hah.hr/index.php?id=691.

Passone MA, Bluma R, Nesci A, Resnik S, Etcheverry MG: Impact of food grade antioxidants on peanut pods and seeds mycoflora in storage system from Córdoba, Argentina. *Journal of Food Safety* 28**:**550–566, 2008.

Patel D, Kumari P, Patel N, Patel D: Synthesis and characterization of some new thiazolidinones containing coumarin moiety and their antimicrobial study. *Archives of Applied Science Research*, 2:68-75, 2010.

Patton T, Barrett J, Brennan J, Moran N: Use of a spectrophotometric bioassay for determination of microbial sensitivity to manuka honey. *Journal of Microbiological Methods* 64:84– 95, 2006.

Pedersen JZ, Oliveira C, Incerpi S, Kumar V, Fiore AM, De Vito P, Prasad AK, Malhotra SV, Parmar VS, Saso L: Antioxidant activity of 4-methylcoumarins, *Journal of Pharmacy and Pharmacology* 59:1721–1728, 2007.

Pelizza SA, Stenglein SA, Cabello MN, Dinolfo MI, Lange CE: First record of *Fusarium verticillioides* as an entomopathogenic fungus of grasshoppers. *Journal of Insect Science* 11:1-8

Petrucci R, Saso L, Kumar V, Prasad AK, Malhotra SV, Parmar VS, Marrosu G: A spectroelectrochemical and chemical study on oxidation of 7,8-dihydroxy-4-methylcoumarin (DHMC) and some related compounds in aprotic medium. *Biochimie* 92:1123-1129, 2010.

Pitt JI: Toxigenic fungi and mycotoxins. *British Medical Bulletin* 56:184-192, 2000.

Pitt JI, Hocking AD: *Fungi and food spoilage*. Springer Science, 2009.

Polovka M: EPR spectroscopy: A tool to characterize stability and antioxidant properties of foods. *Journal of Food and Nutrition Research* 45:1-11, 2006.

Pontiki E, Hadjipavlou-Litina D, Chaviara AT: Evaluation of anti-inflammatory and antioxidant activities of Copper (II) Schiff mono-base and Copper(II) Schiff base coordination compounds of dien with heterocyclic aldehydes and 2-amino-5-methyl-thiazole. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry* 23:1011–1017, 2008.

Prats-Perez E, Bazzalo ME, León A, Jorrín Novo JV: Agronomic aspects of the sunflower 7-hydroxylated simple coumarins. *Helia* 23:105-112, 2000.

Prieto P, Pineda M, Aguilar M: Spectrophotometric quantitation of antioxidant capacity through the formation of a phosphomolybdenum complex: Specific application to the determination of vitamin E1. *Analytical Biochemistry* 269**:**337–341, 1999.

Prior RL, Wu X, Schaich K: Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 53:4290-4302, 2005.

Radulović N, Stojanović G, Vukicević R, Dekić V, Dekić B, Palić R: New 3,4-annelated coumarin derivatives: synthesis, antimicrobial activity, antioxidant capacity, and molecular modeling. *Monatshefte fur Chemie* 137:1477–1486, 2006.

Raj HG, Parmar VS, Jain SC, Goel S, Himanshu P, Malhotra S, Singh A, Olsen CE, Wengel J: Mechanism of biochemical action of substituted 4-methylbenzopyran-2-ones. Part I: Dioxygenated 4-methyl coumarins as superb antioxidant and radical scavenging agents. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 6:833-839, 1998.

Ramesh B, Pugalendi KV: Umbelliferone in STZ-diabetic rats. *Yale Journal of Biology and Medicine* 78:131-138, 2005.

Raters M, Matissek R: Analysis of coumarin in various foods using liquid chromatography with tandem mass spectrometric detection. *European Food Research and Technology.* 227:637–642, 2008.

Razavi SM, Imanzadeh G, Davari M: Coumarins from *Zosima absinthifolia* seeds, with allelopatic effects. *EurAsian Journal of BioSciences* 4:17-22, 2010.

Razavi SM: Plant coumarins as allelopathic agents. *International Journal of Biological Chemistry* 5:86-90, 2011.

Reverberi M, Ricelli A, Zjalic S, Fabbri AA, Fanelli C: Natural functions of mycotoxins and control of their biosynthesis in fungi. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 87:899-911, 2010.

Reyes-Chilpa R, Estrada-Muñiz E, Vega-Avila E, Abe F, Kinjo J, Hernández-Ortega S: Trypanocidal constituents in plants. 7. Mammea-type coumarins, *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 103:431-436, 2008.

Riaz T, Abbasi MA, Shahzadi T, Rehman A, Siddiqui SZ, Ajaib M: *Colebrookia oppositifolia*: A valuable source for natural antioxidants. *Journal of Medicinal Plants Research* 5:4180-4187, 2011.

Richard LJ: Some major mycotoxins and their mycotoxicoses – An overview. *International Journal of Food Microbiology* 119:3-10, 2007.

Rodrigues RF, Tashima AK, Pereira RMS, Mohamed RS, Cabral FA: Coumarin solubility and extraction from emburana (*Torresea cearensis*) seeds with supercritical carbon dioxide. *Journal of Supercritical Fluids* 43:375–382, 2008.

Rodrıguez J, Olea-Azar C, Cavieres C, Norambuena E, Delgado-Castro T, Soto-Delgado J, Araya-Maturana R: Antioxidant properties and free radical-scavenging reactivity of a family of hydroxynaphthalenones and dihydroxyanthracenones. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 15:7058-7065, 2007.

Rollas S, Küçükgüzel ŞG: Biological activities of hydrazone derivatives. *Molecules* 12:1910-1939, 2007.

Ronad PM, Noolvi MN, Sapkal S, Dharbhamulla S, Maddi VS: Synthesis and antimicrobial activity of 7-(2-substituted phenylthiazolidinyl)-benzopyran-2-one derivatives. *European Journal of Medicinal Chemistry* 45:85–89, 2010.

Roussaki M, Kontogiorgis CA, Hadjipavlou-Litina D, Hamilakis S, Detsi A: A novel synthesis of 3-aryl coumarins and evaluation of their antioxidant and lipoxygenase inhibitory activity. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters* 20:3889–3892, 2010.

Sah P, Saraswat N, Seth M: Synthesis of phthalyl substituted imidazolones and schiff bases as antimicrobial agents. *E-Journal of Chemistry* 8:427-434, 2011.

Santos MMM, Faria N, Iley J, Coles SJ, Hurrsthouse MB, Martins ML, Moriera R: Raction of naphtoquinones with substituted nitromethanes. Facile synthesis and antifungal activity of naphtha[2,3-d]isoxazole-4,9-diones. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters,* 20:193-195, 2010.

Sardari S, Mori Y, Horita K, Micetich RG, Nishibe S, Daneshtalab M: Synthesis and antifungal activity of coumarins and angular furanocoumarins. *Bioorganic and Medicinal Chemistry* 7:1933 – 1940, 1999.

Sardari S, Nishibe S, Daneshtalab U: Coumarins, the bioactive structures with antifungal property. U *Studies in natural products chemistry.* Elsevier Science, Amsterdam, 335-393, 2000.

Sasse K, Scheinpflug H, Grews F: 1-phenyl-4,4-di-substituted-thiosemicarbazide fungicidal and acaricidal agents. US Patent 3,671,639, 1972.

Satyanarayana VSV, Sreevani P, Sivakumar A, Vijayakumar V: Synthesis and antimicrobial activity of new Schiff bases containing coumarin moiety and their spectral characterization. *ARKIVOC* xvii:221-233, 2008.

Schmale III DG, Munkvold GP: Mycotoxins in Crops: A Threat to Human and Domestic Animal Health. 2008.
http://www.apsnet.org/edcenter/intropp/topics/Mycotoxins/Pages/Aflatoxins.aspx
[22.03.2011.]

Setnescu R, Barcutean C, Jipa S, Setnescu T, Negoiu M, Mihalcea I, Dumitrub M, Zaharescub T: The effect of some thiosemicarbazide compounds on thermal oxidation of polypropylene. *Polymer Degradation and Stability* 85:997-1001, 2004.

Sforza S, Dall'Asta C, Marchelli R: Recent advances in mycotoxin determination in food and feed by hyphenated chromatographic techniques/mass spectrometry. *Mass Spectrometry Reviews* 25:54–76, 2006.

Shi Y, Zhou CH: Synthesis and evaluation of a class of new coumarin triazole derivatives as potential antimicrobial agents. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters* 21:956–960, 2011.

Shi Z, Shen S, Zhou W, Wang F, Fan Y: *Fusarium Graminearum* growth inhibition due to glucose starvation caused by osthol. *International Journal of Molecular Sciences* 9:371-38, 2008.

Shih M-H, SU Y-S, WU C-L: Syntheses of aromatic substituted hydrazino-thiazole derivatives to clarify structural characterization and antioxidant activity between 3-arylsydnonyl and aryl substituted hydrazino-thiazoles. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin* 55:1126—1135, 2007.

Shukla YN, Srivastava A, Kumar S, Kumar S: Phytotoxic and antimicrobial constituents of *Argyreia speciosa* and *Oenothera biennis*. *Journal of Ethnopharmacology* 67:241-245, 1999.

Siddiqui N, Arshad MF, Khan SA: Synthesis of some new coumarin incorporated thiazolyl semicarbazones as anticonvulsants. *Acta Poloniae Pharmaceutica – Drug Research* 66:161-167, 2009.

da Silva CM, da Silva DL, Modolo LV, Alves RB, de Resende MA, Martins CVB, de Fatima A: Schiff bases: A short review of their antimicrobial activities. *Journal of Advanced Research* 2:1–8, 2011.

Silvan AM, Abad MJ, Bermejo P, Sollhuber M, Villar A: Antiinflammatory activity of coumarins from *Santolina oblongifolia. Journal of Natural Products* 59:1183-1185, 1996.

Singh R, Gupta BB, Malik OP: Studies on pesticides based on coumarin. I. Antifungal activity of 6-alkyl-3-n-butyl-7-hydroxy-4-methylcoumarins. *Pesticide Science* 20:125-130, 1987.

Sowndhararajan K, Siddhuraju P, Manian S: Antioxidant and free radical scavenging capacity of the underutilized legume, *Vigna vexillata* (L.) A. Rich. *Journal of Food Composition and Analysis* 24:160–165, 2011.

Soltani S, Dianat S, Sardari S: Forward Modeling of the Coumarin Antifungals; SPR/SAR Based Perspective. *Avicenna Journal of Medical Biotechnology* 1:95-103, 2009.

Stanjek V, Boland W: Biosynthesis of Angular Furanocoumarins: Mechanism and Stereochemistry of the Oxidative Dealkylation of Columbianetin to Angelicin in *Heracleum mantegazzianum* (*Apiaceae*). *Helvetica Chimica Acta* 81:1596-1607, 1998.

Stewart C: Use of coumarin derivatives in antifungal therapy. US Patent US2010/0267653 A1, Oct. 21, 2010.

Takemura Y, , Ju-Ichi M, Kurozumi T, Azuma M, Ito C, Nakagawa K, Omura M, Furukawa H: Structural elucidation of citrumarins: four novel binary coumarins isolated from *Citrus* plants. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin* 41:73-76, 1993.a

Takemura Y, Nakata Y, Azuma M, Ju-Ichi M, Okano M, Fukamiya M, Omura M, Ito C, Nakagawa K, Furukawa H: Five new pyranocoumarins from some *Citrus* plants. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin* 41:1530-1533, 1993.b

Takemura Y, Kurozumi T, Ju-Ichi M, Okano M, Fukamiya N, Ito C, Ono T, Furukawa H: The structures of neoacrimarines-C and D, two new acridone-coumarin dimers from *Citrus hassaku*. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin* 41:1757-1759, 1993.c

Takemura Y, Nakata T, Ju-Ichi M, Okano M, Fukamiya N, Ito C, Furukawa H: Three new biscoumarins from *Citrus Hassaku*. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin* 42:1213-1215, 1994.

Taskova R, Mitova M, Mikhova B, Duddeck H: Bioactive phenolics from *Carthamus lanatus* L. *Zeitschrift fur Naturforschung C: Journal of Bio*sciences 58c:704-707, 2003.

Thompson DP: Effect of butylated hydroxyanisole on conidial germination of toxigenic species of *Aspergillus flavus* and *A. parasiticus*. *Mycologia* 54:375-377, 1991.

Thompson DP: Inhibition of mycelial growth of mycotoxigenic fungi by phenolic antioxidants. *Mycologia* 54:791-793, 1992.

Tirzitis G, Bartosz G: Determination of antiradical and antioxidant activity: basic principles and new insights. *Acta Biochimica Polonica* 57:139–142, 2010.

Tominaga H, Kobayashi Y, Goto T, Kasemura K, Nomura M: DPPH-scavenging effect of several phenylpropanoid compounds and their glycoside derivatives. *Yakugaku Zasshi* 125:371-375, 2005.

Traykova M, Kostova I: Coumarine derivatives and oxidative stress. *International Journal of Pharmaceutics* 1:29-32, 2005.

Tyagi YK, Kumar A, Raj HG, Vohra P, Gupta G, Kumari R: Synthesis of novel amino and acetyl amino-4-methylcoumarins and evaluation of their antioxidant activity. *European Journal of Medicinal Chemistry* 40:413–420, 2005.

Vukovic N, Sukdolak S, Solujic S, Niciforovic N: An efficient synthesis and antioxidant properties of novel imino and amino derivatives of 4-hydroxy coumarins. *Archives of Pharmacal Research* 33:5-15, 2010.a

Vukovic N, Sukdolak S, Solujic S, Niciforovic N: Substituted imino and amino derivatives of 4-hydroxycoumarins as novel antioxidant, antibacterial and antifungal agents: Synthesis and in vitro assessments. *Food Chemistry* 120:1011–1018, 2010.b

Wang L-F, Zhang H-Y: A theoretical study of the different radical-scavenging activities of catechin, quercetin, and a rationally designed planar catechin. *Bioorganic Chemistry* 33:108–115, 2005.

Watanabe J, Shinmoto H, Tsushida T: Coumarin and flavon derivatives from estragon and thyme as inhibitors of chemical mediator release from RBL-2H3 cells. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*. 69:1-6, 2005.

Weinmann I: History of the development and applications of coumarin and coumarin-related compounds. U *Coumarins: Biology, applications and mode of action.* Wiley, Chichester, 1-22, 1997.

Wu HS, Raza W, Liu DY, Wu CL, Mao ZS, Xu YC, Shen QR: Allelopathic impact of artificially applied coumarin on *Fusarium oxysporum* f. sp. *niveum*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 24:1297–1304, 2008.

Wu CR, Huang MY, Lin YT, Ju HY, Ching H: Antioxidant properties of *Cortex fraxini* and its simple coumarins. *Food Chemistry* 104:1464–1471, 2007.

Yamaguchi MU, da Silva APB, Ueda-Nakamura T, Filho BPD, da Silva CC, Nakamura CV: Effects of a thiosemicarbazide camphene derivative on *Trichophyton mentagrophytes. Molecules* 14:1796-1807, 2009.

Yang EB, Zhao YN, Zhang K, Mack P: Daphnetin, one of coumarin derivatives, is a protein kinase inhibitor. *Biochemical and Biophyical Researach Communications* 260:682-685, 1999.

Yeo JD, Jeong MK, Park CU, Lee J: Comparing antioxidant effectiveness of natural and synthetic free radical scavengers in thermally-oxidized lard using DPPH method, *Journal of Food Science* 75:C258-262, 2010.

Yu J, Cleveland TE, Nierman WC, Bennett JW: *Aspergillus flavus* genomics: gateway to human and animal health, food safety, and crop resistance to diseases. *Revista Iberoamericana de Micología* 22:194-202, 2005.

Yun B-S, Lee I-K, Ryoo I-J, Yoo I-D: Coumarins with monoamine oxidase inhibitory activity and antioxidative coumarino-lignans from *Hibiscus syriacus. Journal of Natural Products* 64:1238-1240, 2001.

Yurd L, King Jr. AD: Inhibiting growth of bacteria, US Patent 3,810,990, 1974.

Zhao F, Liu Z-Q: Comparison of antioxidant effectiveness of lipoic acid and dihydrolipoic acid. *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology* 25:216-223, 2010.

Zhou P, Takaishi Y, Duan H, Chen B, Honda G, Itoh M, Takeda Y, Kodzhimatov OK, Lee K-H: Coumarins and bicoumarin from *Ferula sumbul*: anti-HIV activity and inhibition of cytokine release. *Phytochemistry* 53:689-697, 2000.

Zolek T, Paradowska K, Wawer I: ^{13}C CP MAS NMR and GIAO-CHF calculations of coumarins. *Solid State Nuclear Magnetic Resonance* 23:77–87, 2003.