

Univerzitet u Beogradu

Hemijski fakultet

Jelena S. Radivojević

**„Monomeri poli(hidroksialkanoata) kao osnova za dobijanje  
biološki aktivnih jedinjenja“**

Doktorska disertacija

Beograd, 2016.

University of Belgrade

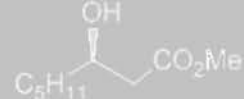
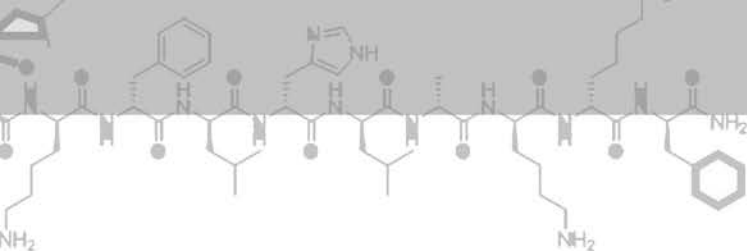
Faculty of Chemistry

Jelena S. Radivojević

**„Poly(hydroxyalkanoate) monomers as source for biological  
active compounds synthesis“**

Doctoral dissertation

Belgrade, 2016.



Članovi komisije:

1. dr Veselin Maslak, docent Hemijskog fakulteta Univerziteta u Beogradu (mentor)

2. dr Jasmina Nikodinović-Runić, naučni savetnik Instituta za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo Univerziteta u Beogradu (mentor)

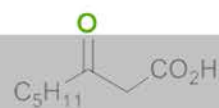
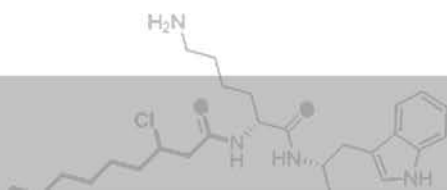
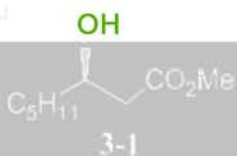
3. dr Igor Opsenica, docent Hemijskog fakulteta Univerziteta u Beogradu

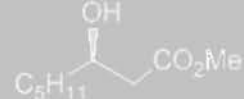
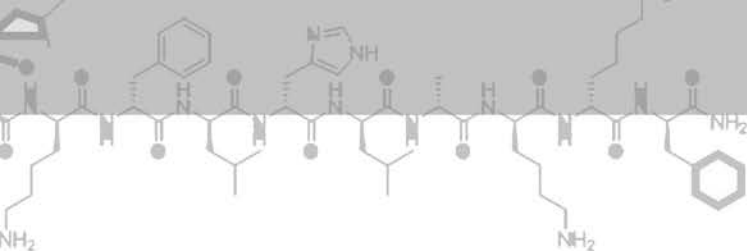
4. dr Zorana Tokić-Vujošević, vanredni profesor Farmaceutskog fakulteta Univerziteta u Beogradu

5. dr Zorana Ferjančić, vanredni profesor Hemijskog fakulteta Univerziteta u Beogradu.

---

Datum odbrane





## Zahvalnica

*Ova doktorska disertacija urađena je na Hemijskom fakultetu Univerziteta u Beogradu, na Katedri za Organsku hemiju i na Institutu za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo Univerziteta u Beogradu.*

*Temu disertacije predložili su dr Jasmina Nikodinović-Runić i dr Veselin Maslak. Svojim mentorima sam veoma zahvalna na uloženom vremenu, trudu i prenesenom znanju u toku svih godina koliko je trajala izrada disertacije.*

*Zahvaljujem se dr Kevin O'Connor-u, na podršci i pomoći prilikom izrade eksperimentalnog dela doktorske teze.*

*Hvala dragim kolegama i koleginicama iz Laboratorije 05, IMGGI-a na podršci, pomoći, a posebno strpljenju prilikom obuke za rad u biološkoj laboratoriji.*

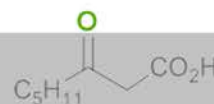
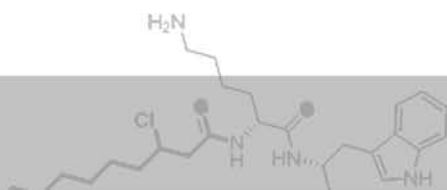
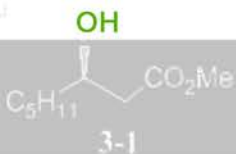
*Hvala dragim kolegama iz Laboratorije 416, Hemijskog fakulteta, bivšim, sadašnjim, stalnim i privremenim članovima, bez vas bi rad u laboratoriji bio sumoran.*

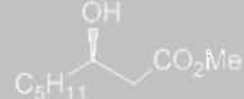
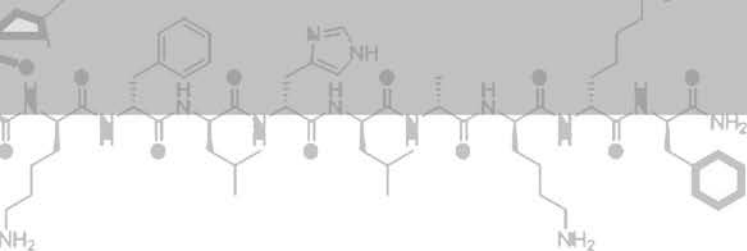
*Posebnu zahvalnost dugujem prijateljima, Duletu jer me je izveo na pravi put, Nati jer je imala leka za sve moje bolesti, Ani za sve šaljice razgovora, Kaći jer je imala strpljenja za moja kašnjenja dok postavim reakcije, Mici za unošenje umetnosti u naučni rad, Marijani jer smo zajedno prošle kroz sve faze sazrevanja jednog doktoranda. Hvala Boki, Ani, Gagi, Darku, Radetu, srećna sam jer vas imam!*

*Hvala ti Mik na beskrajnoj podršci, najbolji si na svetu!*

*Najveću zahvalnost dugujem mojoj porodici. Hvala mami što si se uvek ponosila sa mnom i verovala, ne samo u mene već u sve nas! Hvala Miško, jer si me motivisala da uvek budem bolja i jača, hvala Lili, jer si me učila da razdvajam bitno od nebitnog i da se radujem kao dete svakom danu. Hvala Maruška, jer si uvek bila tu da pružiš pomoć, podršku i da nas sve beskrajno uveseljavaš.*

*Hvala tata, podržao si me da krenem putem nauke, zaista nije bila zec, nije pobebla, stižem je! Doktorsku tezu posvećujem tebi.*





## Naslov:

# Monomeri poli(hidroksialkanoata) kao osnova za dobijanje biološki aktivnih jedinjenja

## Rezime:

Sintetisali smo biblioteku od 18 derivata (*R*)-3-hidroksioktanske kiseline, monomera bakterijskog polimera poli(hidroksialkanoata). Sva jedinjenja su okarakterisana i testirana je njihova antimikrobna i antiproliferativna aktivnost. Kako bismo ispitali značaj konfiguracije na hiralnom centru polazne kiseline za njenu biološku aktivnost, sintetisan je (*S*)-metil-3-hidroksioktanoat. U okviru teze je ispitana mogućnost konjugacije 3-hidroksialkanskih kiselina različite dužine lanca i hemijski sintetisane 3-hlordekanske kiseline na antikancerski peptid kao i uticaj na promenu biološke aktivnosti peptida.

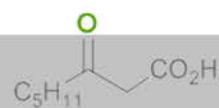
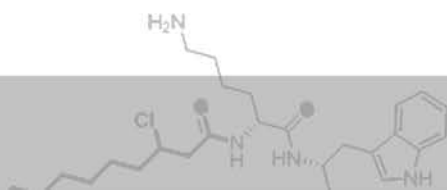
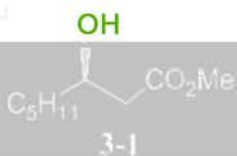


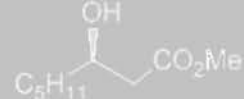
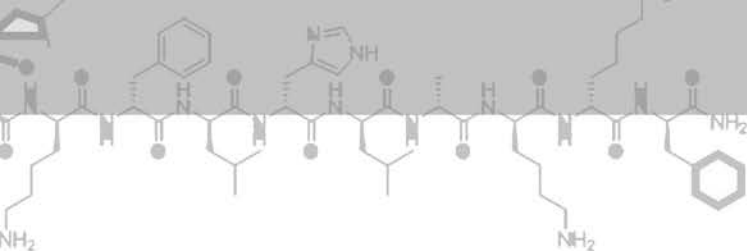
**Cljučne reči:** poli(hidroksialkanoati), (*R*)-3-hidroksioktanska kiselina, funkcionalizacija, asimetrična redukcija, antimikrobna aktivnost, moduliranje međubakterijske komunikacije, antikancerski peptidi.

**Naučna oblast:** Hemijske nauke

**Uža naučna oblast:** Organska hemija, Biohemija

**UDK broj:** 547.1





**Title:**

**„Poly(hydroxyalkanoate) monomers as source for biological active compounds synthesis“**

**Abstract:**

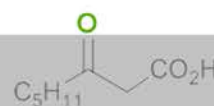
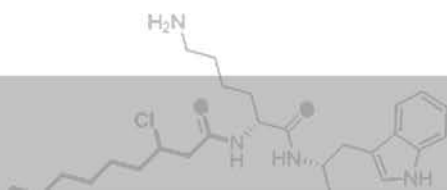
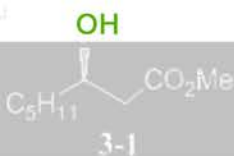
We have synthesized a library of 18 derivatives from (*R*)-3-hydroxyoctanoic acid, monomer of bacterial polymer poly(hydroxyalkanoate). All compounds were characterized and tested for their antimicrobial and anti-proliferative activity. In order to examine the significance of the configuration of the chiral center of the starting acid in the biological activity, (*S*)-methyl-3-hydroxyalkanoate was synthesized. Within the PhD thesis the possibility of conjugation 3-hydroxy alcanoic acids of different chain length and chemically synthesized 3-chloro octanoic acid with anticancer peptide was investigated, and impact of conjugation in changing biological activity of the peptide.

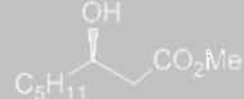
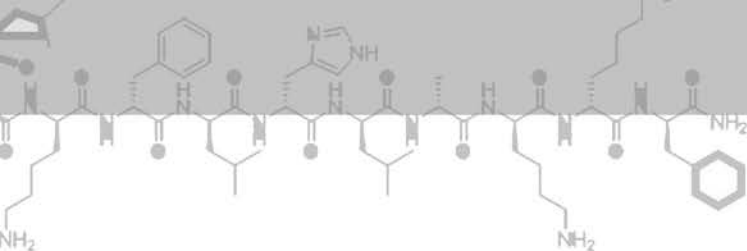
**Keywords:** poly(hydroxyalkanoates), (*R*)-3-hydroxyoctanoic acid, functionalization, asymmetric reduction, antimicrobial activity, quorum sensing, anticancer peptides.

**Scientific field:** Chemistry

**Scientific discipline:** Organic chemistry, Biochemistry

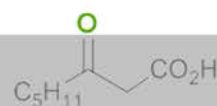
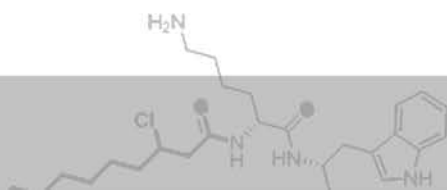
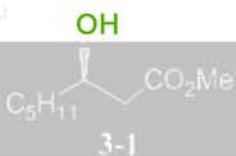
**UDK number:** 547.1

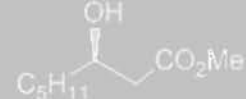




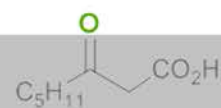
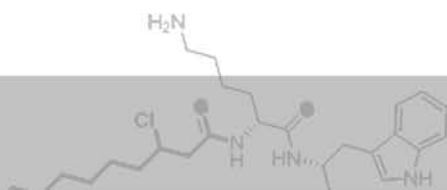
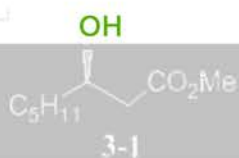
## Skraćenice

3-HA	3-hidroksialkanske kiseline
Ac	acetil
ACN	acetonitril
bs	prošireni singlet
Bn	benzil
d	dublet
dd	dublet dubleta
DAST	dietilaminosulfur-trifluorid
DMF	<i>N,N</i> -dimetilformamid
DCM	dihlor-metan
DIPE	diizopropil-etar
DMSO	dimetil-sulfoksid
DP18L	D-peptid P18
<i>ee</i>	stepen optičke čistoće
Et	etil
LB	Luria-Bertani medijum
m	multiplet
MIC	minimalna inhibitorna koncentracija
mcl-PHA	srednje dužine lanca PHA ( <i>eng.</i> medium chain length)
Me	metil
MTT	(3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolijum bromid)
mmHg	milimetri živinog stuba

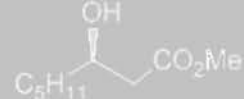




NMR	nuklearno magnetna rezonancija
PCC	piridinium-hlorhromat
PDC	piridinium-dihromat
PE	poli(etilen)
PET	poli(etilen-tereftalat)
PHA	poli(hidroksialkanoati)
Ph	fenil
PPTS	piridinium- <i>p</i> -toluensulfonat
Pyr	piridin
scl-PHA	kratke dužine lanca PHA ( <i>eng.</i> short chain length)
s	singlet
SAB	Saburand medijum
s. t.	sobna temperatura
t	triplet
TBDMS	<i>terc</i> -butildimetilsilil
THF	tetrahidrofuran
TLC	hromatografija na tankom sloju ( <i>eng.</i> thin layer chromatography)
TMS	trimetilsilil
q	kvartet
QS	međucelijska komunikacija ( <i>eng.</i> quorum sensing)

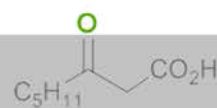
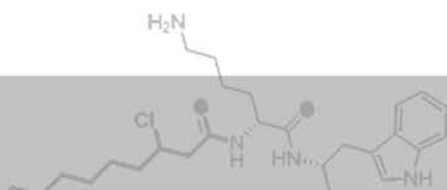
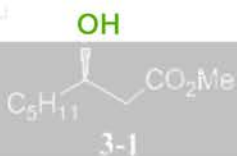




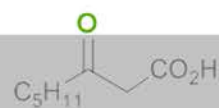
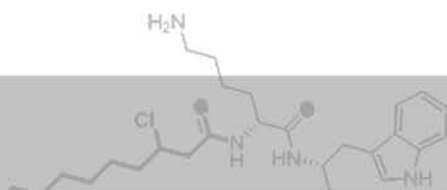
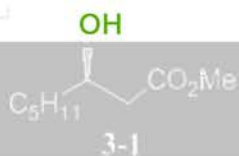


## Sadržaj

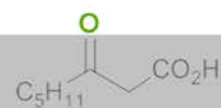
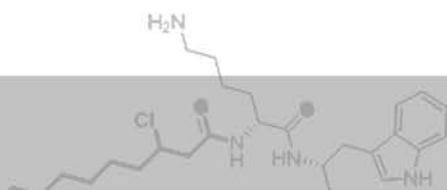
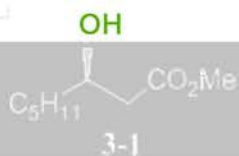
1. Uvod .....	1
2. Opšti deo.....	4
2.1 Biopolimeri.....	4
2.2 Biopoliestri .....	5
2.3 Poli(hidroksialkanoati) (PHA).....	6
2.3.1 Struktura i osobine materijala.....	8
2.3.2 Primena PHA polimera .....	10
2.3.3 Funkcionalizacija PHA polimera .....	12
2.4 Monomeri PHA: ( <i>R</i> )-3-hidroksialkanske kiseline.....	13
2.4.1 Dobijanje ( <i>R</i> )-3-hidroksialkanskih kiselina (3-HA).....	14
a) Hemijska sinteza .....	14
b) Biokatalitičko dobijanje .....	20
c) Depolimerizacija PHA .....	21
2.4.2 Primena PHA monomera.....	22
2.5 Biološka aktivnost 3-hidroksialkanskih kiselina.....	24
2.5.1 Antimikrobni potencijal.....	25
a) Moduliranje bakterijske međucelijske komunikacije .....	27
2.5.2 Lipofilna farmakofora .....	28
2.5.3 Halogena farmakofora.....	29
2.5.4 Konjugacija PHA monomera i biološki aktivnih peptida.....	31
a) Katjonski antimikrobni peptid P18 .....	32
3. Naši radovi.....	34
3.1 Sintaza derivata ( <i>R</i> )-3-hidroksioktanske kiseline.....	37
3.1.1 Polihidroksialkanoati kao izvor jedinjenja za dalju funkcionalizaciju.....	37
3.1.2 Hemijska sinteza 3-hidroksialkanskih kiselina i estara.....	38
3.1.3 Funkcionalizacija 3-HA.....	41
a) Hlorovanje.....	41
b) Bromovanje .....	43
c) Fluorovanje .....	43
d) Oksidacija.....	45

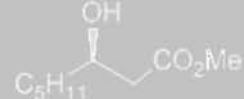


e) Deprotekcija benzil-estra .....	46
f) Rezultati funkcionalizacije 3-HA.....	47
3.1.4 Karakterizacija sintetisanih fluoro derivata.....	49
3.1.5 Sinteza (S)-metil-3-hidroksioktanoata.....	52
3.2 Ispitivanje biološke aktivnosti.....	55
3.2.1 Antibakterijska i antifungalna svojstva sintetisanih derivata .....	55
3.2.2 Moduliranje bakterijske međucelijske komunikacije (QS).....	59
3.2.3 <i>In-vitro</i> antiproliferativna aktivnost .....	61
3.2.4 Konjugacija (R)-3-hidroksialkanskih kiselina i DP18L peptida .....	63
4. Eksperimentalni deo .....	67
4.1 Sinteza derivata (R)-3-hidroksioktanske kiseline.....	68
4.1.1 Dobijanje poli(hidroksialkanoata).....	68
4.1.2 Depolimerizacija PHA (3-1).....	69
4.1.3 Dobijanje 3-hidroksioktanske kiseline (3-3) .....	69
4.1.4 Prečišćavanje (R)-3-hidroksioktanske kiseline kiselinsko-baznom ekstrakcijom .....	70
4.1.5 Sinteza metil-3-hidroksioktanoata (3-1).....	70
4.1.6 Sinteza benzil-3-hidroksioktanoata (3-2) .....	71
4.1.7 Sinteza benzil-3-hidroksidekanoata (3-28).....	71
4.1.8. Sinteza prekursora za hemijsku sintezu derivata 3-HA.....	72
4.1.9 Sinteza metil-3-hidroksioktanoata (3-1).....	73
4.1.10 Sinteza benzil-3-hidroksioktanoata (3-2) .....	74
4.1.11 Sinteza etil-3-oksooktanoata <sup>163</sup> (3-22) .....	74
4.1.12 Sinteza etil-3-hidroksioktanoata (3-23).....	75
4.1.13 Sinteza metil-3-hidroksioktanoata (3-1).....	75
4.1.14 Sinteza (2E)-okt-2-enske kiseline (3-15).....	76
4.1.15 Generalna procedura za sintezu 3-hloro derivata .....	77
4.1.16 Metil-3-hloroktanoat (3-4).....	77
4.1.17 Benzil-3-hloroktanoat (3-5).....	78
4.1.18 Benzil-3-hlorodekanoat (3-31) .....	78
4.1.19 Procedura II za sintezu metil-3-hloroktanoata .....	78
4.1.20 Generalna procedura za sintezu 3-bromo derivata .....	79

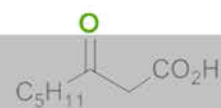
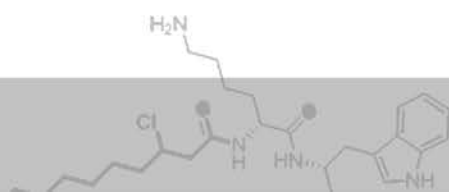
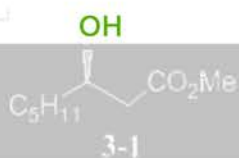


4.1.21	Sinteza metil-3-bromoktanoata (3-7) .....	79
4.1.22	Sinteza benzil -3-bromoktanoata (3-8) .....	80
4.1.23	Generalna procedura za sintezu 3-fluoro derivata 3-HA.....	80
4.1.24	Sinteza metil-3-fluoroktanoata (3-10) .....	81
4.1.25	Sinteza benzil-3-fluoroktanoata (3-11).....	81
4.1.26	Sinteza metil-(2E)-okt-2-enoata (3-13) .....	82
4.1.27	Sinteza benzil-(2E)-okt-2-enoata (3-14).....	82
4.1.28	Generalna procedura za sintezu 3 - okso derivata .....	82
4.1.29	Sinteza metil-3-oksooktanoata (3-16) .....	83
4.1.30	Sinteza benzil-3-oksooktanoata (3-17).....	83
4.1.31	Generalna procedura za deprotekciju benzil-estra .....	84
4.1.32	Sinteza 3-hloroktanske kiseline (3-6).....	84
4.1.33	Sinteza 3-hlordekanske kiseline (3-32) .....	84
4.1.34	Sinteza 3-bromoktanske kiseline (3-9).....	85
4.1.35	Sinteza 3-fluoroktanske kiseline (3-12).....	85
4.1.36	Sinteza (2E)-okt-2-enske kiseline (3-15).....	85
4.1.37	Sinteza 3-oksooktanske kiseline (3-18).....	86
4.1.38	Sinteza metil-3-oksooktanoata <sup>186</sup> (3-16) .....	86
4.1.39	Sinteza kompleksa Ru[(S)-BINAP](OAc) <sub>2</sub> .....	87
4.1.40	Sinteza (S)-metil-3-hidroksioktanoata (3-28).....	87
4.2	Ispitivanje biološke aktivnosti .....	88
4.2.1	Antibakterijska i antifungalna svojstva sintetisanih derivata .....	88
4.2.1.1	Test sojevi .....	88
4.2.1.2	Priprema hranljivih podloga.....	88
4.2.1.3	Disk-difuzioni esej .....	89
4.2.1.4	Esej u tečnom medijumu .....	90
4.2.1.5	Efekat sintetisanih jedinjenja na razvoj filamenata kod <i>Candida albicans</i> soja.....	90
4.2.2	Moduliranje međućelijske komunikacije (QS).....	91
4.2.2.1	Efekat sintetisanih jedinjenja na proizvodnju piocijanina kod <i>Pseudomonas aeruginosa</i> PAO1 soja .....	91
4.2.3	<i>In-vitro</i> antiproliferativna aktivnost .....	91
4.2.3.1	Antiproliferativna aktivnost (MTT esej).....	91





4.2.3.2 Antiproliferativna aktivnost sintetisanih konjugata derivata PHA i DP18L .....	92
4.2.4 Konjugacija ( <i>R</i> )-3-hidroksialkanskih kiselina i DP18L peptida .....	93
4.2.4.1 Razdvajanje 3-HA različite dužine niza dobijenih depolimerizacijom PHA.....	93
4.2.4.2 Sinteza peptida DP18L.....	93
4.2.4.2 Konjugacija DP18L i 3-HA .....	94
5. Zaključak .....	95
6. Summary.....	97
7. Literatura .....	99



## 1. Uvod

Korišćenje obnovljivih izvora za dobijanje velikog broja i velike količine različitih proizvoda neophodnih za funkcionisanje današnjeg modernog društva i načina života sve više je zastupljeno u svetu. Ovaj trend podiže svest o važnosti prevencije zagađivanja životne sredine, ali i postepeno smanjenje zaliha fosilnih resursa.

Tradicionalna hemijska industrija se zasniva na petrohemijskoj proizvodnji kao glavnom izvoru resursa. Zbog količine otpada koji nastaje u industrijskim procesima, kako za proizvodnju ambalažnih materijala, plastike, tako i za dobijanje finih hemikalija, petrohemijska industrija se smatra nepovoljnom za životnu sredinu.<sup>1</sup> Tokom proizvodnje 1 tone finih hemikalija nastane između 5 i 20 tona otpadnog materijala koji najčešće završava u životnoj sredini.

Ako se osvrnemo na proizvodnju plastike u Evropi, godišnje se proizvede 57 miliona tona plastike, od toga, 66% plastičnog otpada u većini evropskih zemalja ostaje u zemljištu.<sup>1</sup> Trenutno, bioplastika predstavlja približno jedan procenat od oko 300 miliona tona plastike koliko se godišnje proizvede na svetskom nivou. Sa porastom potražnje i tržište raste za 20 do 100% godišnje. Prema najnovijim podacima, globalni proizvodni kapacitet bioplastike je bio približno 1,7 miliona tona u 2014. godini i predviđa se da će porasti na 7,8 miliona tona u 2019.<sup>2</sup> Bioplastika je definitivno među najperspektivnijim materijalima budućnosti, dobija se iz obnovljivih izvora, ima jedinstvene osobine i predstavlja vredan izvor monomernih jedinica, koje se mogu upotrebljavati u proizvodnji finih hemikalija. Ovo je samo jedan od pristupa kojim se mnogi industrijski postupci mogu učiniti ekološki povoljnijim.<sup>3</sup>

Proizvodnja hemikalija visoke enantiomerne čistoće već dugo se smatra važnim zadatkom za industriju koja uključuje proizvodnju suplemenata za ishranu, lekova, kozmetičkih sredstava, parfema i drugih finih hemikalija. Mnogi lekovi se danas sintetišu pomoću hirlnih sintona koji se dobijaju odvajanjem enantiomera iz racemskih



smeša, asimetričnom sintezom ili iz prirodnih izvora.<sup>4</sup> Menjanje konvencionalnih postupaka hemijske sinteze, biotehnoškim je jedna od glavnih tendencija moderne hemijske industrije.<sup>5</sup>

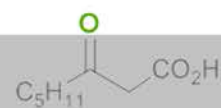
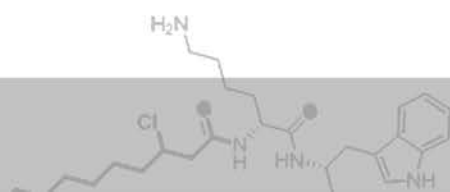
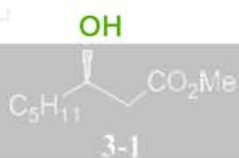
Fokusirajući se na upotrebu obnovljivih izvora, kao što je bioplastika, za dobijanje potencijalnih biološki aktivnih jedinjenja u koraku smo sa težnjama svetske industrije. Broj istraživanja koja se zasnivaju na upotrebi monomernih jedinica iz prirode za dobijanje novih materijala je u porastu. Glavno ograničenje ovih postupaka je cena dobijanja monomera iz obnovljivih izvora. Često materijal dobijen na ovaj način još uvek nije konkurentan polimerima dobijenim petrohemijskim postupkom.<sup>3</sup> Međutim, upotreba monomernih jedinica iz obnovljivih izvora za sintezu vrednijih produkata, poput lekova, ima značajno više potencijala i ekonomski je isplativa.

Tokom rada je korišćen biotehnoškim putem dobijen polimer, poli(hidroksialkanoat) (PHA) kao polazni materijal za izolaciju (*R*)-3-hidroksioktanske kiseline. Biotehnoški dobijen PHA predominantno se sastoji od (*R*)-3-hidroksioktanske kiseline.<sup>6</sup> Takođe, sintetisana je i (*R,S*)-3-hidroksioktanska kiselina hemijskim putem. U nastavku istraživanja oba polazna molekula su hemijski funkcionalizovana u cilju sinteze biblioteke jedinjenja. Ovim jedinjenjima smo ispitali biološki potencijal. S obzirom da ne postoje detaljne studije o aktivnosti (*R*)-3-hidroksioktanske kiseline, u okviru teze ispitana je njena antimikrobna i antifungalna aktivnost, kao i citotoksičnost. Sintetisali smo biblioteku od 18 derivata oktanske kiseline polazeći od (*R*)-3-hidroksioktanske kiseline, sva jedinjenja su okarakterisana i određena je njihova antimikrobna i antiproliferativna aktivnost. Kako bismo ispitali značaj konfiguracije na hiralnim centru polazne kiseline na njenu biološku aktivnost, sintetisan je (*S*)-metil-3-hidroksioktanoat.

Hiralne 3-hidroksilne kiseline predstavljaju veoma atraktivna jedinjenja zbog svoje široke primene i velikog potencijala. Samo neke od ovih kiselina su komercijalno dostupne i još uvek nije ispitana mogućnost hemijske modifikacije ovih jedinjenja kao ni njihova biološka aktivnost. U okviru teze ispitana je mogućnost konjugacije 3-hidroksialkanskih kiselina različite dužine lanca i hemijski sintetisane 3-hlordekanse kiseline na antikancerski peptid, DP18L, kao i uticaj konjugacije na promenu biološke aktivnosti peptida.



Cilj ove doktorske teze je bio da jednostavnim hemijskim transformacijama polazne (*R*)-3-hidroksioktanske kiseline dobijemo biološki aktivna jedinjenja. Osnovna ideja je bila da od biomolekula koje mikroorganizmi proizvode u velikim količinama, uz minimalne transformacije dobijemo potencijalne lekove. Ovakav pristup se uklapa u koncept Zelene hemije, što ga čini posebno značajnim i izuzetno popularnim u naučnim krugovima.





## 2. Opšti deo

### 2.1 Biopolimeri

Biomaterijali privlače sve više pažnje poslednjih nekoliko decenija, zbog ekoloških i ekonomskih problema u svetu. Smanjenje zaliha fosilnih resursa, veća potreba za energijom i globalno zagrevanje uzrokuju veću potrebu za obnovljivim polimernim proizvodima sa niskom emisijom ugljen-dioksida.<sup>7</sup> Povećana zagađenost životne sredine je jedan od osnovnih razloga da naučna zajednica otpočne sa ozbiljnijim razmatranjem biorazgradivih zamena za tradicionalne materijale na bazi nafte koji se ne mogu biološki razgraditi. Dramatično povećanje cene nafte pre ekonomske krize 2007. godine uticalo je da se akcenat industrije sa biorazgradivosti prebaci i na biobaziranost<sup>a</sup>.

Biopolimeri se mogu dobiti uglavnom na dva načina:

- i) direktnom proizvodnjom biopolimera i
- ii) proizvodnjom biomonomera i njihovom daljom polimerizacijom.

Direktna proizvodnja biopolimera može se postići uz pomoć mikroorganizma (poli(hidroksialkanoati), PHA), algi (alginati), kao i pomoću biljaka (pektin) ili pomoću kombinacije proizvođača (prirodna guma, celuloza, hitosan).<sup>8</sup> Neophodnost proizvodnje poznatih materijala iz obnovljivih sirovina dovela je do upotrebe biotehnoški dobijenog etanola za proizvodnju biopoli(etilena), kaprolaktama i mukonske kiseline za proizvodnju poli(amida), kao i mlečne kiseline i  $\alpha$ -hidroksi kiseline za dobijanje poli(laktata).<sup>8</sup> Poli(etilen) i poli(amid) dobijeni iz obnovljivih izvora imaju identične osobine sa polimerima dobijenim iz petrohemijskih izvora.

Korišćenjem obnovljivih izvora moguće je proizvesti različite vrste polimera, a svaki od ovih tipova ima svoje osobine i drugačiju osetljivost na biodegradaciju. Nisu svi biopolimeri i biodegradabilni (Tabela 1). Tako bio(polietilen) iako je nastao iz obnovljivog izvora nije biodegradabilan, kao ni prirodna guma.<sup>9</sup> Sa druge strane imamo i biodegradabilne polimere koji nisu biobazirani kao na primer poli( $\xi$ -kaprolakton).<sup>10</sup>

<sup>a</sup> Biobaziranost- termin definisan od strane Sekreterijata za poljoprivredu SAD-a, označava proizvode koji su u potpunosti ili delimično biološkog porekla.





Poli(laktati) su biodegradabilni i biobazirani polimeri, ali dobijeni su sintetičkim putem. Njihova glavna primena je u proizvodnji vlakana, posebno hiruških konaca i za posebne vrste ambalaža.

Tabela 1. Osobine odabranih biopolimera

Polimer	Prirodni	Sintetički	Biobaziran	Biodegradabilan
PHA	x		x	x
Bio poli(etilen)		x	x	
poli(laktati)		x	x	x
poli(ξ-kaprolakton)		x		x
Prirodna guma	x		x	

## 2.2 Biopoliestri

Biodegradabilni polimeri sve više zamenjuju opšte korišćene petrohemijske polimere, koji su jedan od glavnih zagađivača životne sredine.

Da bi bio biodegradabilan, polimer mora da poseduje vezu koja lako podleže raskidanju u biološkim uslovima odnosno u prisustvu enzima. Poliestri su klasa polimera koji poseduju hidrolitički labilnu estarsku vezu, koja može da hidrolizuje usled dejstva enzima. Estarska veza može da hidrolizuje i bez dejstva enzima, ali samo delimično. Poliestri koji podležu abiotskoj hidrolizi takođe se smatraju biodegradabilnim, pošto se degradacija dešava u biološkom okruženju.<sup>11</sup>

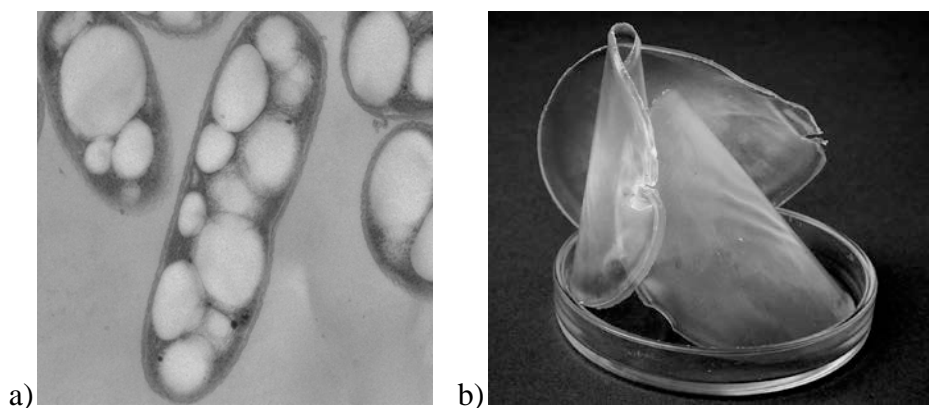
Podela biodegradabilnih poliestara može se izvršiti prema njihovom načinu dobijanja: prirodni i hemijski sintetisani polimeri. Poli(hidroksialkanoati) pripadaju grupi prirodnih polimera. Podgrupe hemijski sintetisanih biodegradabilnih polimera su oni koji su dobijeni iz obnovljivih izvora, kao što su poli(laktati) i polimeri iz petrohemijskog izvora, poli(ξ-kaprolaktoni) i poli(butilensukcinati).<sup>12</sup>



Danas se poli(laktati) proizvode pod komercijalnim nazivom Ingeo® u količini od 140 000 tona godišnje i koriste kao zamena za poli(etilen-tereftalat) (PET).<sup>10</sup>

### 2.3 Poli(hidroksialkanoati) (PHA)

Poli(hidroksialkanoati) (PHA) su grupa prirodnih poliestara. Obično se dobijaju iz bakterija kod kojih se akumuliraju, najčešće u vidu granula. Uloga im je da skladište ugljenik i energiju u citoplazmi (*Slika 1.*). Bakterije proizvode PHA granule tokom stacionarne faze rasta, kada su izložene uslovima nutritivnog stresa, sa više dostupnog ugljenika i ograničenim količinama azota, kiseonika, sumpora, magnezijuma i/ili fosfora.<sup>13</sup>

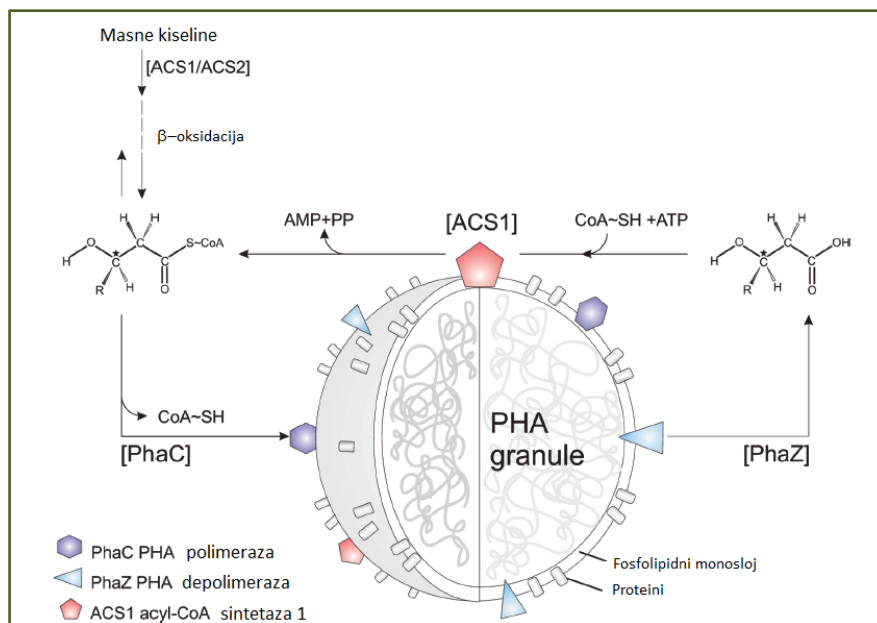


*Slika 1.* a) Transmisiona elektronska mikrofografija granula PHA akumuliranih intracelularno u bakterijama; b) PHA materijal.

Bakterije za sintezu PHA koriste grupu enzima koja se sastoji od: polimeraze (PhaC), depolimeraze (PhaZ) i acil-CoA sintetaze (ACS1),<sup>14</sup> i drugih proteina značajnih za formiranja granula, kao što su fazini (*Slika 2.*)<sup>15</sup> Supstrati za sintezu PHA tj. (*R*)-3-hidroxiacil-CoA jedinice dobijaju se preko dva centralna biosintetička puta,  $\beta$ -oksidacijom ili *de novo* sintezom masnih kiselina. Kojim putem će se dobiti supstrat za sintezu zavisi od toga da li bakterije hranimo masnim kiselinama pa one direktno idu

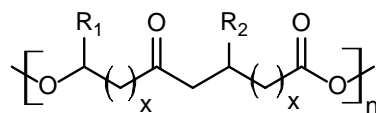


putem  $\beta$ -oksidacije ili drugim izvorima ugljenika poput ugljenih-hidrata, glicerola i slično, koji se preko *de novo* puta prevode (*R*)-3-hidroksiacil-CoA jedinice.



Slika 2. Shematski prikaz modela biosinteze i metabolizma poli(hidroksialkanoata)<sup>16</sup>

PHA su biodegradabilni polimeri koji se uglavnom sastoje od hiralnih hidroksialkanskih kiselina (Slika 3.).<sup>17, 18</sup> Sastoje se iz različitih ponavljajućih jedinica, uključujući i one sa nespecifičnim funkcionalnim grupama koje obično nastaju kada se bakterija koja sintetiše polimer gaji na specifičnim supstratima.



$$x = 1, 2, 3, 4$$

$$n = 100 - 30000$$

$$\text{R}_1, \text{R}_2 = \text{alkil grupe C1 - C16}$$

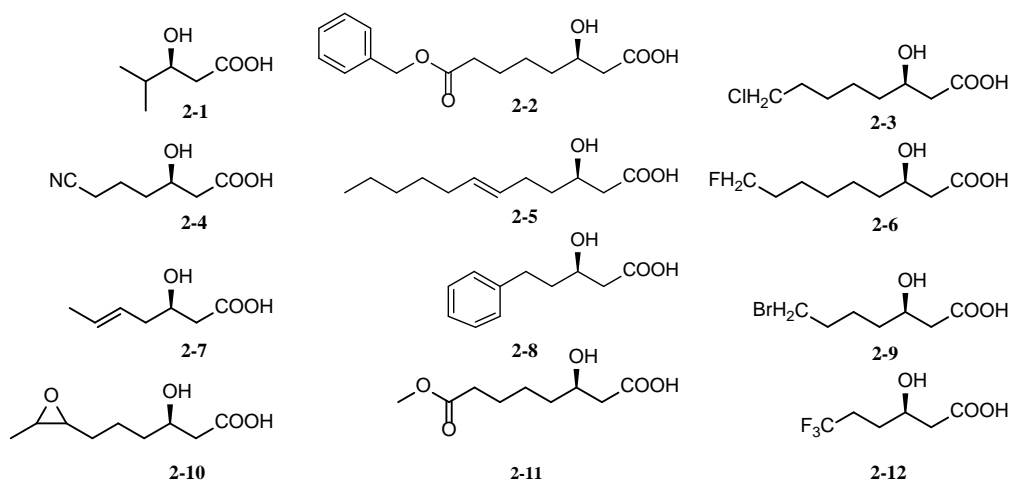
Slika 3. Hemijska struktura PHA

PHA mogu da se dobiju iz obnovljivih izvora kao što su glukoza, glicerol i masne kiseline<sup>19, 20</sup>, kao i iz potpuno otpadnog materijala kao što su poli(etilen) (PE)<sup>21</sup>, poli(stiren)<sup>22</sup> i poli(etilen-tereftalat) (PET).<sup>23</sup> Transformacijom osnovnih sirovina kao i otpadnih produkata u PHA ili njihove derivate dobijamo vredan materijal, a sam postupak je značajan sa stanovišta ekologije i biotehnologije životne sredine.<sup>24</sup>



### 2.3.1 Struktura i osobine materijala

Lemoigne je prvi otkrio PHA polimerne granule u mikroorganizmima kada je izolovao poli((*R*)-3-hidroksibutirat) iz *Bacillus megaterium* soja.<sup>25</sup> Pola veka nakon ovog otkrića, Wallen sa saradnicima je okarakterisao poliestre sa monomernim jedinicama, dužim od 4 ugljenikova atoma, iz mikroorganizama.<sup>26</sup> Do danas je utvrđeno da više od 150 različitih monomernih jedinica ulaze u sastav poli(hidroksialkanoata) sa čitavim spektrom funkcionalnih grupa u bočnom lancu.<sup>27</sup> Neke od struktura date su na Slici 4.



Slika 4. Neke od nespecifičnih struktura monomernih jedinica PHA.<sup>18</sup>

Strukturu biopolimera PHA pre svega određuje vrsta mikroorganizma koja ga proizvodi, kao i izvor ugljenika koji je dostupan tokom rasta mikroorganizma. PHA se dele na tri grupe prema broju ugljenikovih atoma u bočnom lancu monomerne jedinice polimera.<sup>18</sup> Polihidroksialkanoati kratkog lanca (*eng.* scl-PHA) sastoje se od monomernih jedinice koje u bočnom lancu imaju 3-5 ugljenikovih atoma, srednjeg lanca (*eng.* mcl-PHA) sa 6-14 ugljenikovih atoma i preko 14 ugljenikovih atoma su PHA dugog lanca (Slika 3). Od vrste mikroorganizma i uslova gajenja zavisi i molekulska težina PHA, koja je obično u opsegu od 200 kDa do 300 MDa, dok temperatura topljenja opada sa porastom dužine lanca u bočnom nizu monomerne jedinice.<sup>17</sup> U zavisnosti od vrste monomera PHA može biti homopolimer, sastavljen



od samo jedne vrste monomera, ili heteropolimer izgrađen od više tipova monomernih jedinica. Poli(hidroksialkanoati) mogu da sadrže i kombinaciju monomernih jedinica uključujući kopolimere izgrađene od blokova kratke dužine i srednje dužine lanaca.<sup>28</sup> U prirodi su najzastupljeniji poli(hidroksialkanoati) kratkog i srednjeg lanca. Od dužine lanca bočnog niza zavise termo-mehaničke osobine polimera.

PHA mogu da zamene petrohemijske polimere koji su trenutno sveprisutni u svakodnevnom životu, s obzirom na to da poseduju slične osobine sa konvencionalnom plastikom.<sup>13</sup> Što se tiče fizičkih osobina mcl-PHA se tope između 40 i 60 °C dok im je temperatura ostakljivanja ( $T_g$ ) između -50 i -25 °C. Ovi polimeri su termoelastomeri, imaju malu kristaliničnost, nisku zateznu čvrstoću i visok stepen istegljivosti pri kidanju (Tabela 2).<sup>29</sup> scl-PHA imaju velike razlike u osobinama u zavisnosti od vrste monomera koji ulazi u strukturu. Potpuno su biodegradabilni sa idealnim ciklusom biosinteze i biodegradacije. Proizvodi degradacije su voda i ugljen-dioksidi pod aerobnim uslovima, odnosno, metan i ugljen-dioksidi pod anaerobnim uslovima.<sup>30</sup>

Nekoliko faktora određuju da li je materijal biokompatibilan: oblik, površina, poroznost, hemija materijala i tkivo gde se inkorporira.<sup>31</sup> Svi PHA pokazuju visok stepen biokompatibilnosti u ćelijskoj kulturi i dobro su prihvaćeni u *in vivo* testovima.<sup>32</sup> *In vivo* testovi su pokazali da su PHA biokompatibilni sa osteoblastima i epitelnim ćelijama.<sup>33</sup>

Tabela 2. Mehaničke i termalne osobine različitih PHA

PHA	Poli(3HB)	Poli(4HB)	Poli(3HB co 4HB)	Poli(3HO co 3HH)
Tačka topljenja (°C)	177	53	152	61
Temperatura ostakljivanja (°C)	4	-48	-8	-35
Zatezna čvrstoća (MPa)	40	104	26	9
Modul istežanja (GPa)	3,5	0,149	-	0,008
Istegljivost pri kidanju (%)	6	1000	444	380



### 2.3.2 Primena PHA polimera

Karakteristike samog materijala, koje se menjaju sa monomernim sastavom, omogućavaju širok spektar upotrebe PHA. Ovi biološki estri su veoma interesantni zbog svoje biokompatibilnosti, biodegradabilnosti i permeabilnosti. Najčešće se koriste kao biodegradabilna plastika, materijali u medicini ili farmaceutskoj industriji. Takođe, upotrebljavaju se kao izvor hiralnih monomernih jedinica.<sup>34, 35</sup>

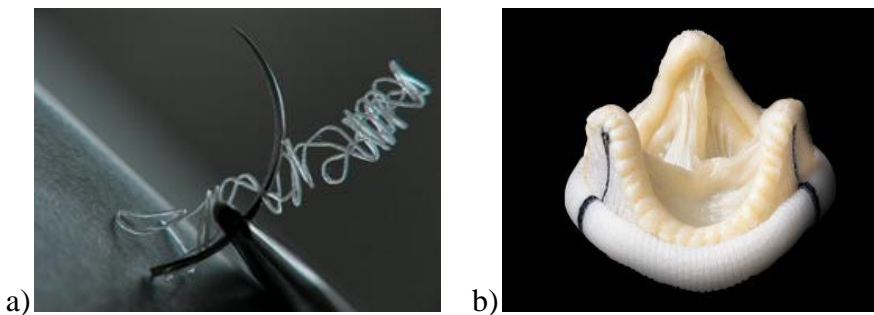
PHA su se prvo upotrebljavali za izradu ambalaže kozmetičkih preparata, zatim su našli upotrebu u vodećim svetskim industrijskim korporacijama (Wella AG, P&G, Biomers itd.) u proizvodnji svakodnevnih proizvoda poput brijača, posuđa, pelena, razgradivih torbi i slično.<sup>17</sup> Nedavno je pokazano i da PHA nanovlakna mogu da se koriste za prečišćavanje voda od Gram-negativnih, Gram-pozitivnih bakterijskih sojeva i od nekih gljiva.<sup>36</sup>

Najveća prekretnica za medicinsku upotrebu PHA bilo je odobravanje upotrebe poli(hidroksibutirata) od strane FDA (*eng.* Food and Drug Administration) kao biomaterijala za apsorpcioni hiruški konac.<sup>37</sup> Imajući u vidu da su poli(hidroksialkanoati) proizvodi ćelijskog metabolizma, a da je monomerna jedinica 3-hidroksibuterna kiselina (iz poli(hidroksibutirata)) normalno prisutna u krvi (u koncentraciji između 0,3 i 1,3 mmol/L) moguća je njihova upotreba u saniranju rana, izgradnji implanta za tkivno inženjerstvo i kao nosača lekova<sup>31, 32, 38</sup> Pored toga poli(hidroksibutirati) imaju osobine slične prirodnim kostima i mogu se koristiti za biodegradabilna fiksirajuća pomagala koja mogu da stimulišu formiranje kostiju.<sup>39</sup>

Poli(hidroksibutirati) i kopolimer poli(hidroksibutirat *co* hidroksivalerat) su najviše istraživani kao materijal za medicinsku upotrebu zbog velike dostupnosti i komercijalne proizvodnje materijala.<sup>40</sup> Bostonska kompanija „Tepha“ je specijalizovana za proizvodnju perikardijalnih slojeva, kardioloških stentova, srčanih zalizaka, implanata i drugih proizvoda za medicinsku upotrebu dobijenih od PHA pod komercijalnim nazivom PHA4400 (Slika 5).<sup>41</sup>







Slika 5. Primena PHA a) hiruški konac b) srčani zalistak

PHA kratke dužine lanca zbog svojih mehaničkih osobina mogu naći primenu za takozvanu tvrdu regeneraciju tkiva. Kostopoulos i Karring su koristili kopolimer poli(hidroksibutirat *co* hidroksivalerat) da popune rupe u kostima kao i za tretman defekta vilice kod pacova.<sup>42</sup> Kako su scl-PHA krta i lomljivi ne mogu se koristiti za meko tkivno inženjerstvo, npr. za vaskularne aplikante, za regeneraciju kože i nerva ili kao nosač lekova gde je mnogo elastičniji polimer potreban.<sup>43</sup> Za takve primene su mnogo pogodniji mcl-PHA, koji su fleksibilni i manje kruti. Jedna od prvih *in vivo* studija mcl-PHA rađena je sa kopolimerom poli(3-hidroksioktanoat *co* 3-hidroksiheksanoat) kroz subkutanu (podkožnu) implementaciju polimernih implanta, mikrosfera, tuba i kuglica, kod miševa.<sup>44</sup> Odgovor tkiva je veoma blag čak i nakon 40 dana od implementacije.

PHA su dobri kandidati za nosače lekova zbog svoje biokompatibilnosti, biodegradabilnosti a posebno zato što se degradiraju površinskom erozijom.<sup>45</sup> Međutim matriks nosača lekova zasnovan na scl-PHA ima poroznu strukturu pa se lek otpusti pre nego što uopšte krene degradacija polimera. Mnogo su bolji kandidati za ovu primenu mcl-PHA ali je broj istraživanja ograničen zbog težeg dobijanja ovog polimera na većoj skali.<sup>40</sup> Istraživane su kombinacije poli(amidoamin) dendrimera i mcl-PHA za transdermalno otpuštanje lekova.<sup>46</sup> Kopolimerizacijom monoakrilat-poli(etilenglikola) sa poli(hidroksioktanoatom) pomoću UV zraka dobijen je matriks koji se može primeniti kao nosač lekova. Ovaj materijal omogućava kontrolisano otpuštanje lekova prilikom saniranja oteklina.<sup>47</sup> U istraživanju je kao model lek korišćen ibuprofen i pokazano je da ovaj sistem daje dobre rezultate u *in vitro* studiji.



Novija istraživanja<sup>47</sup> su pokazala da takozvana druga generacija prirodno funkcionaliziranih polimera (onih koje sintetišu sami mikroorganizmi pod posebnim uslovima) ima veliki potencijal. Kopolimer poli(-3-hidroksiacetilalkanoat *co* 3-hidroksialkanoat) selektivno inhibira rast meticilin rezistentnog soja *Staphylococcus aureus* (MRSA) u *in vitro* i *in vivo* uslovima.<sup>48</sup>

Zbog elastomernih osobina mcl-PHA je dobra osnova za dizajn biodegradabilnih adheziva koji mogu naći primenu za pokrivanje rana, nosače elektrokardiografskih elektroda i drugo.<sup>40</sup>

Osobine i primena PHA sa nespecifičnim grupama u bočnom nizu još uvek nije dovoljno istražena zbog težeg dobijanja ovih polimera. Očekuje se da će komercijalizacijom proizvodnje mcl-PHA da se proširi i primena ovog vrednog materijala.

### 2.3.3 Funkcionalizacija PHA polimera

Neke bakterije mogu da proizvode poli(hidroksialkanoate) sa različitim funkcionalnim grupama u zavisnosti od podloge na kojoj su gajene i dostupnih izvora ugljenika. Mnoga istraživanja su okrenuta ka ispitivanju funkcionalizacije samog PHA materijala, bilo biosintetičkim putem ili hemijskim modifikacijama.<sup>30</sup>

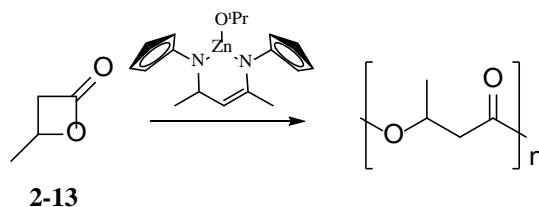
PHA su uglavnom inertni zbog alkanskih bočnih lanaca. Poželjno je da bočni lanac bude funkcionalizovan zbog proširenja spektra upotrebe polimera. Prvi primer dobijanja polimera kontrolisanom biosintezom je gajenje soja *Pseudomonas putida* *GPo1* na podlozi gde su jedini izvor ugljenika bili alkani koji sadrže od 6 do 12 ugljenikovih atoma i 1-alkeni iste dužine lanca.<sup>49</sup> Dobijeni su polimeri sa dvostrukom vezom u bočnom nizu. Utvrđeno je da monomerna jedinica može imati isti broj ugljenikovih atoma kao izvor ugljenika ili da ima dva ugljenikova atoma manje.

Jedino su optički čisti poli(hidroksialkanoati) sa *R* konfiguracijom 100% biodegradabilni,<sup>50</sup> hemijski je teško sintetisati potpuno biodegradabilan polimer. Hemijska sinteza PHA se uglavnom zasniva na otvaranju prstena  $\beta$ -laktona (*Shema 1*).





Brojni su pokušaji da se dobije optički čist PHA upotrebom različitih katalizatora, međutim uprkos dobrom prinosu nastali polimer nije bio izotaktičan.<sup>51, 52</sup>



Shema 1. Sinteza PHA otvaranjem prstena  $\beta$ -laktona<sup>52</sup>

U novije vreme, Kramer i Coates su polimerizovali fluorovane beta laktone i sintetisali PHA sa fluorom u bočnom nizu.<sup>53</sup> Oni su takođe kopolimerizovali fluorovane beta laktone sa  $\beta$ -butirolaktonima i dobili funkcionalizovane kopolimere. PHA sa amino grupom ili karboksilnom grupom u bočnom nizu dobijeni su takođe hemijskim putem.<sup>54</sup>

Nov način uvođenja funkcionalnih grupa u bočni lanac PHA nedavno su predložili Tajima i saradnici.<sup>55</sup> Kontrolisanim gajenjem PHA uveli su vinil-grupu u bočni niz a zatim su UV ozračivanjem inicirali tior-ene klik reakciju i na taj način uveli su fragmente 3-merkaptopropionske kiseline i 2-aminoetantiola u strukturu. Vinil-grupa, uvedena u strukturu kontrolisanim gajenjem, modifikovana je različitim reagensima. Hidroksilovani proizvodi dobijeni su uspešno oksidacijom pomoću  $\text{KMnO}_4$ ,<sup>56</sup> kao i sekvencom reakcija hidroborovanje-oksidacija.<sup>57</sup> Epoksidacija pomoću *m*-hlorperbenzoeve kiseline pokazala kao stereohemijski nespecifična.<sup>58</sup>

## 2.4 Monomeri PHA: (*R*)-3-hidroksialkanske kiseline

PHA su optički aktivni polimeri koji se sastoje samo od (*R*)-enantiomera 3-hidroksialkanoata. Pokazano je da različite (*R*)-3-hidroksialkanske kiseline (3-HA) ulaze u sastav PHA polimera sa čitavim spektrom funkcionalnih grupa u bočnom lancu



kao što su: nezasićene veze, estrarska-, cijano-, amino- i nitrozo- grupa, halogeni elementi i aromatična jezgra. Ove funkcionalne grupe povećavaju potencijalnu upotrebu ovog materijala.<sup>59</sup> Stoga su PHA značajan izvor hiralnih jedinjenja sa velikim potencijalom, jer predstavljaju izvor vrednih sintona za hemijsku i farmaceutsku industriju.<sup>15, 60</sup>

### 2.4.1 Dobijanje (*R*)-3-hidroksialkanskih kiselina (3-HA)

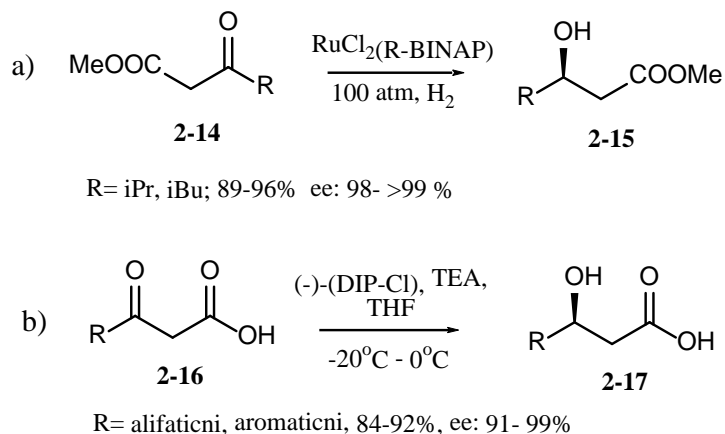
#### a) Hemijska sinteza

Monomerna jedinica PHA, (*R*)-3-hidroksialkanska kiselina, poseduje hiralni centar i dve funkcionalne grupe, karboksilnu i alkoholnu i zato se često koristi za sintezu različitih jedinjenja poput antibiotika, vitamina, aromata i feromona.<sup>61</sup>

Zbog velikog značaja i široke primene 3-HA su se našle u fokusu mnogih organskih hemičara koji su razvili različite sintetske puteve za njihovo dobijanje.<sup>60</sup> Zajedničko za ove reakcije je da je ograničena količina koja može ovim putem da se dobije, postupak je uglavnom složen, uključuje hiralne metalne komplekse kao katalizatore, kontaminaciju krajnjeg proizvoda katalizatorom i na kraju je cena čitavog postupka izuzetno visoka.<sup>60</sup> Proizvodi dobijeni na ovaj način veoma često imaju lošiji enantiomerni višak nego 3-hidroksialkanske kiseline dobijene biosintetičkim putem.<sup>35</sup>

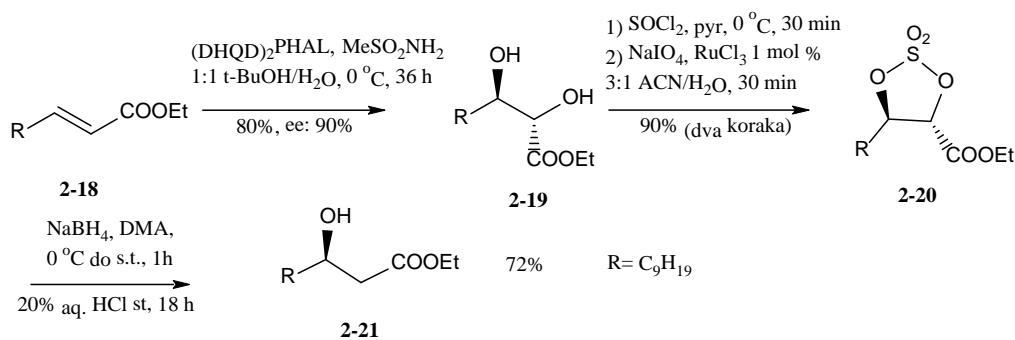
Monomeri PHA se hemijski sintetišu enantioselektivnom redukcijom odgovarajuće 3-keto alkanske kiseline. Noyori-jev katalizator  $\text{RuCl}_2[(R)\text{-BINAP}]$  može da se koristi za ovu redukciju. Redukcija se odvija pod visokim pritiskom vodonika, 100 atm, a proizvod se dobija u enantiomernom višku 98% *ee* (Shema 2, primer a).<sup>62</sup> Kao katalizator u enantioselektivnoj redukciji može da se koristi i komercijalno dostupan B-hlordiizopinokamfenilboran (DIP-Cl) (Shema 2, primer b).<sup>63, 64</sup>





Shema 2. Enantioselektivna redukcija 3-keto kiselina i estara

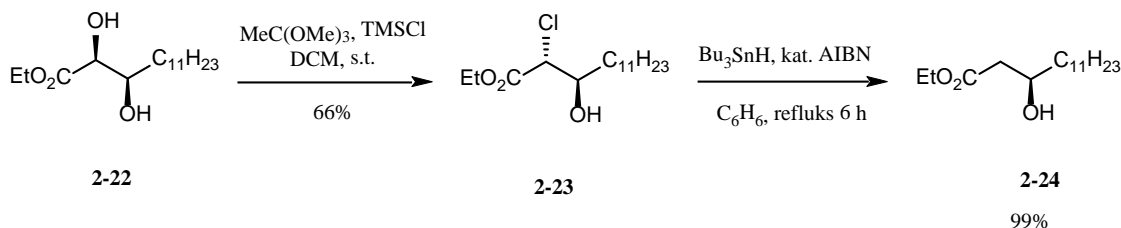
Primenom Sharpless-ove asimetrične dihidroksilacije dvostruke C=C veze  $\alpha,\beta$ -nezasićenog dekanota u prisustvu dihidrokinidin-ftalazina nastaje *syn* diol, koji se preko cikličnog sulfita prevodi u sulfat **2-20**. Regioselektivnim redukovanjem uklanja se sulfat i nastaje (*R*)-3-hidroksidekanoat (Shema 3).<sup>65</sup>



Shema 3. Regioselektivno reduktivno uklanjanje cikličnih sulfata.

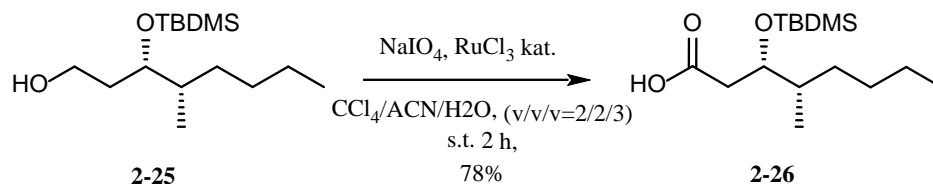
Proizvod Sharpless-ove asimetrične dihidroksilacije može da se prevede u  $\alpha$ -hlor- $\beta$ -hidroksi estar, regio- i stereoselektivnom  $S_N2$  reakcijom. Hidroksilna grupa u položaju 2 je više aktivirana prema supstituciji zbog prisustva karbonilne grupe u susedstvu pri čemu nastaje halogen-hidrinski derivat **2-23**. Hlor se uklanja redukcijom pomoću tri-*n*-butilkalaj hidrida (Shema 4).<sup>66</sup>





Shema 4. Regioselektivna supstitucija 2,3-dihidroksi kiselina praćena redukcijom

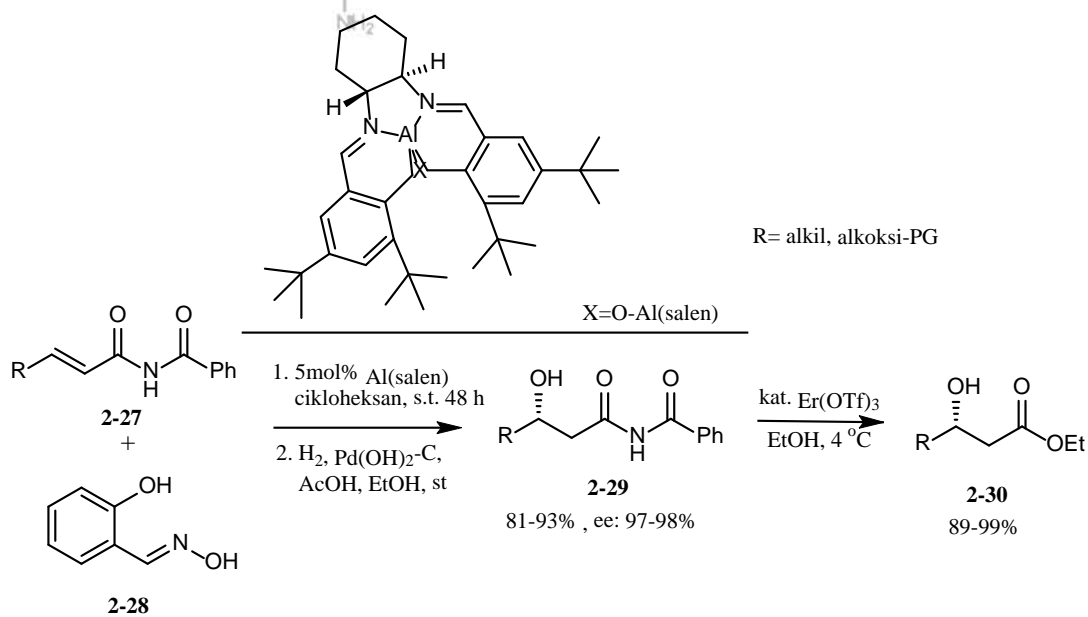
Još jedan način za sintezu 3-hidroksialkanskih kiselina obuhvata oksidaciju 1,3-diola pomoću natrijum-perjodata u prisustvu katalitićke kolićine rutenijum(III)-hlorida. Źeljena 3-hidroksialkanska kiselina moţe da se dobije direktno ili postupno preko 3-hidroksialdehida. Na ovaj naćin, nakon uklanjanja zaštitne silil-etarske grupe, sintetisana je (3*S*,4*S*)-3-hidroksi-4-metiloktanska kiselina, sastavni deo ciklopepsideptida beauveriolida I (Shema 5).<sup>67</sup>



Shema 5. Regioselektivna oksidacija 1,3-diola

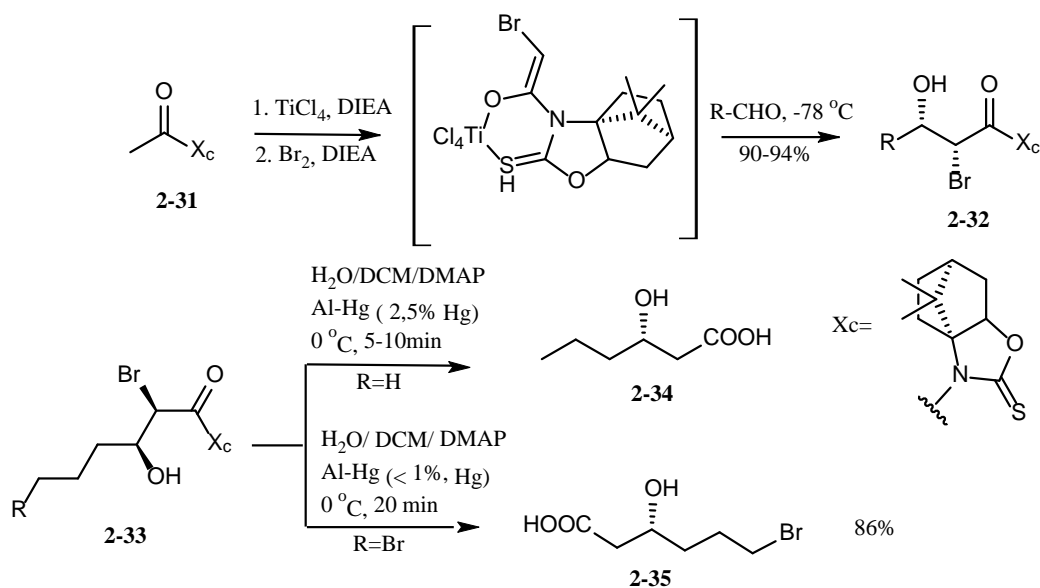
3-HA se mogu dobiti i pomoću visoko enantioselektivne konjugovane adicije salicilaldehidnog oksima na dvostruku  $\alpha,\beta$ -nezasićenog imida katalizovanog salen-Al kompleksom. Kasnijom etanolizom tako dobijenog  $\beta$ -hidroksiimida u prisustvu  $\text{Er(OTf)}_3$  dobijeni su estri 2-30 u odlićnim prinosima (Shema 6).<sup>68</sup>





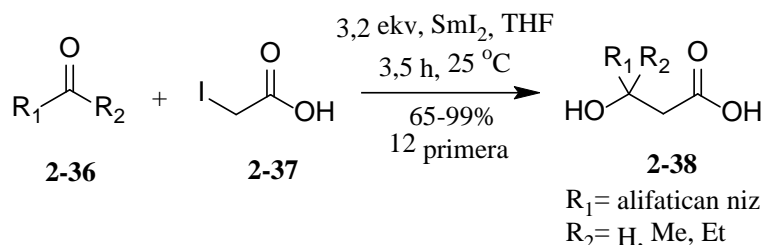
Shema 6. Konjugovana adicija oksima na E-olefine

3-Hidroksialkanske kiseline se dobijaju i asimetričnom aldolnom reakcijom sa supstituentom u  $\alpha$ -položaju koji se kasnije uklanja. Intermedijsni proizvod dobijen *in situ* iz kamforskog *N*-acetiloksazolidintiona reaguje sa aldehidom u stereoselektivnoj aldolnoj adiciji. Uklanjanje broma može da se izvrši pomoću 4-(*N,N*-dimetilamino)piridina (DMAP) ili selektivno Al-Hg amalgamom čak i u prisustvu dodatnog atoma broma (Shema 7).<sup>69, 70</sup>



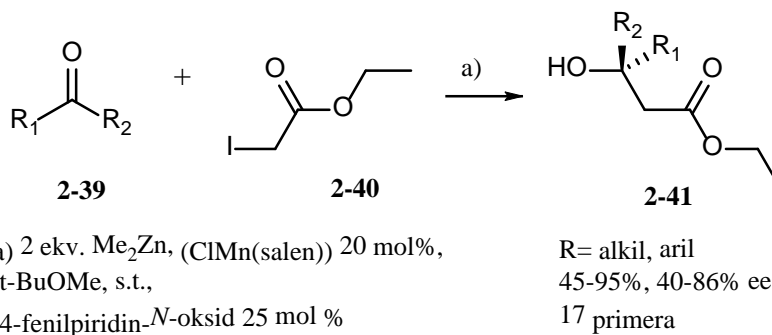
Shema 7. Sintaza a)  $\alpha$ -bromo- $\beta$ -hidroksi karboksilata b)  $\beta$ -hidroksi kiselina

Na *Shemi 8* prikazana je efikasna sinteza 3-HA i njenih derivata ostvarena preko samarijum-jodidom promovisane aldolne reakcije između različitih aldehida ili ketona sa komercijalno dostupnom jod-sirćetnom kiselinom.<sup>71</sup>



*Shema 8.* Aldolna reakcija katalizovana SmI<sub>2</sub>

Klasična reakcija po Reformatsky-om podrazumeva cinkom promovisanu sintezu β-hidroksialkanoata iz α-halogenih estara i aldehida ili ketona.<sup>72</sup> Enantioselektivna reakcija po Reformatsky-om izvodi se uz prisustvo hiralnih liganda. Upotrebom hiralnog katalizatora [ClMn(salen)] (20 mol%) enantioselektivnost se povećava na 86% (*Shema 9*).<sup>73</sup>

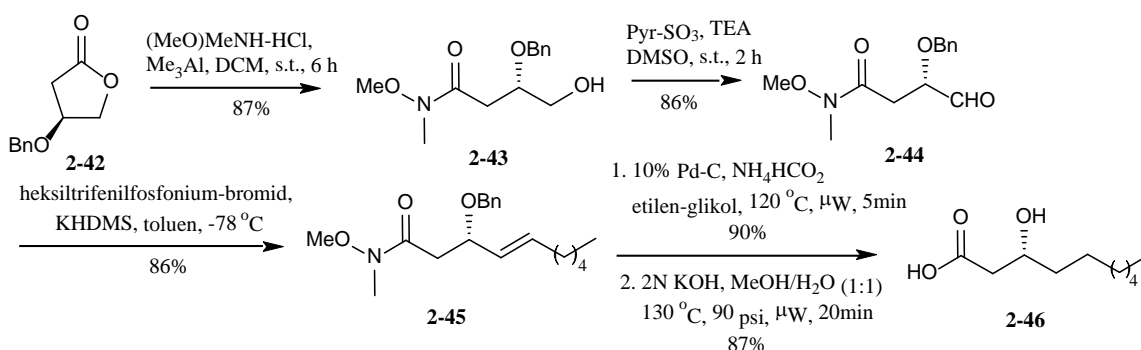


*Shema 9.* Enantioselektivna reakcija po Reformatsky-om uz upotrebu hiralnog katalizatora

Još jedan način za sintezu 3-HA je otvaranje prstena (*S*)-3-hidroksi-γ-butirolaktona **2-42** (*Shema 10*). Nukleofilnim otvaranjem laktonskog prstena pomoću Weinreb-ovog amina i oksidacijom primarnog alkohola dobija se aldehyd **2-44**. U narednom koraku u Wittig-ovoj reakciji sa heksiltrifenilfosfinijum-bromidom dobija se

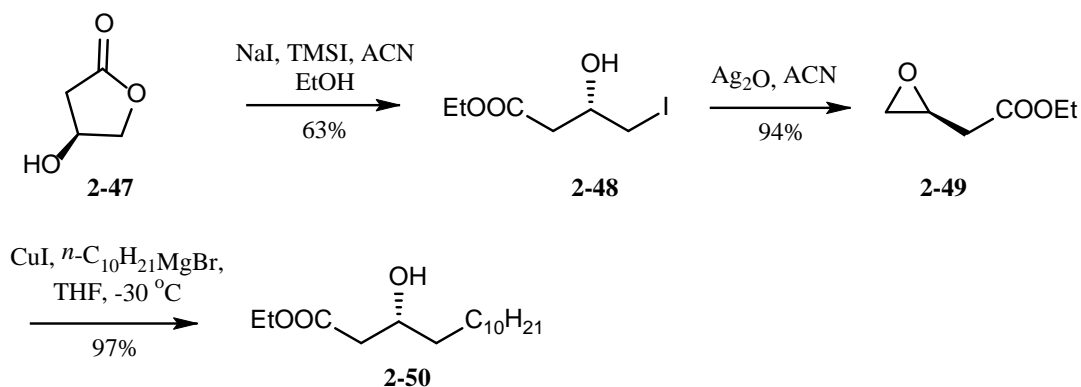


olefinski proizvod **2-45**. Redukcijom i hidrolizom ovog proizvoda nastaje (*R*)-3-hidroksidekanska kiselina **2-46**.<sup>74</sup>



*Shema 10.*  $\beta$ -Hidroksi karboksilna kiselina dobijena iz (*S*)-3-hidroksi- $\gamma$ -butirolaktona preko Wittig-ove reakcije

Kada se (*S*)-3-Hidroksi- $\gamma$ -butirolakton **2-47** otvori u reakciji sa jodtrimetilsilanom pri čemu nastaje jodhidrin **2-48**, koji se pomoću  $\text{Ag}_2\text{O}$  prevodi u (*S*)-3,4-epoksibutanoat **2-49**. Otvaranje epoksidnog prstena je katalizovano bakar-jodidom, Grignard-ovom reakcijom sa decilmagnezijum-bromidom nastaje (*R*)-3-hidroksialkanoat sa ukupnim prinosom 57% (*Shema 11*).<sup>75</sup>

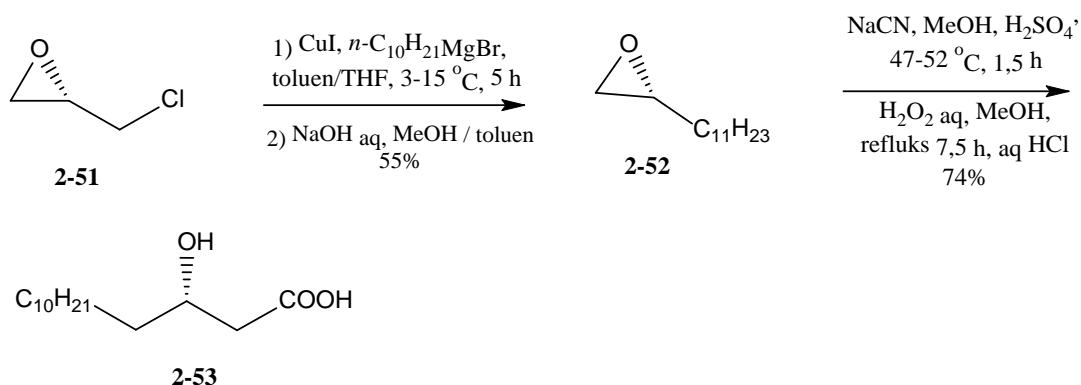


*Shema 11.* Etil-estar  $\beta$ -hidroksitetradekanske kiseline dobijen iz (*S*)-3-hidroksi- $\gamma$ -butirolaktona preko Grignard-ove reakcije

Hiralni epihlorhidrin **2-51** je takođe dobar prekursor 3-HA. Hemo- i regioselektivno otvaranje prstena katalizovano bakar-jodidom, praćeno je Grignard-ovom reakcijom sa decilmagnezijum-bromidom sa sterno manje zaštićene strane. Epoksidni prsten **2-52** se potom formira u baznim uslovima. Nastali epoksidni prsten se



otvara natrijum-cijanidom i nastaje  $\beta$ -hidroksi nitril. Hidrolizom uz prisustvo  $\text{H}_2\text{O}_2$  nastaje kiselina **2-53** (Shema 12).<sup>76</sup>

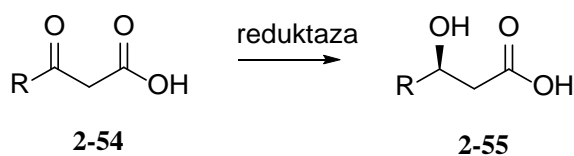


Shema 12. Hiralni epihlorhidrin kao prekursor  $\beta$ -hidroksialkanskih kiselina

### b) Biokatalitičko dobijanje

Kako bi se prevazišli nedostaci hemijske sinteze (Seksija 2.4.1.a), razvijani su postupci uvođenja hiralnog centra biokatalitičkim putem.<sup>77</sup> Najčešće su korišćeni rekombinantni sojevi *Escherichia coli* ili *Saccharomyces cerevisiae*.<sup>78, 79</sup>

Glavna ograničenja ovih biokatalitičkih reakcija je inhibicija enzima proizvodom, promenljivi prinosi izolovanog proizvoda kao i promenljiva enantiomerna čistoća proizvoda. Takođe, potrebno je sintetisati polazne  $\beta$ -keto estre što dodatno podiže ukupnu cenu postupka.



Shema 13. Enzimaska redukcija  $\beta$ -keto kiselina

Nekoliko (*R*)- i (*S*)-3-hidroksialkanskih kiselina dobijeno je enzimski katalizovanom redukcijom odgovarajućih 3-ketoalkanskih kiselina pomoću pekarskog kvasca.<sup>79</sup> (*S*)-3-Hidroksialkanske kiseline, koje imaju od 6 do 12 ugljenikovih atoma,

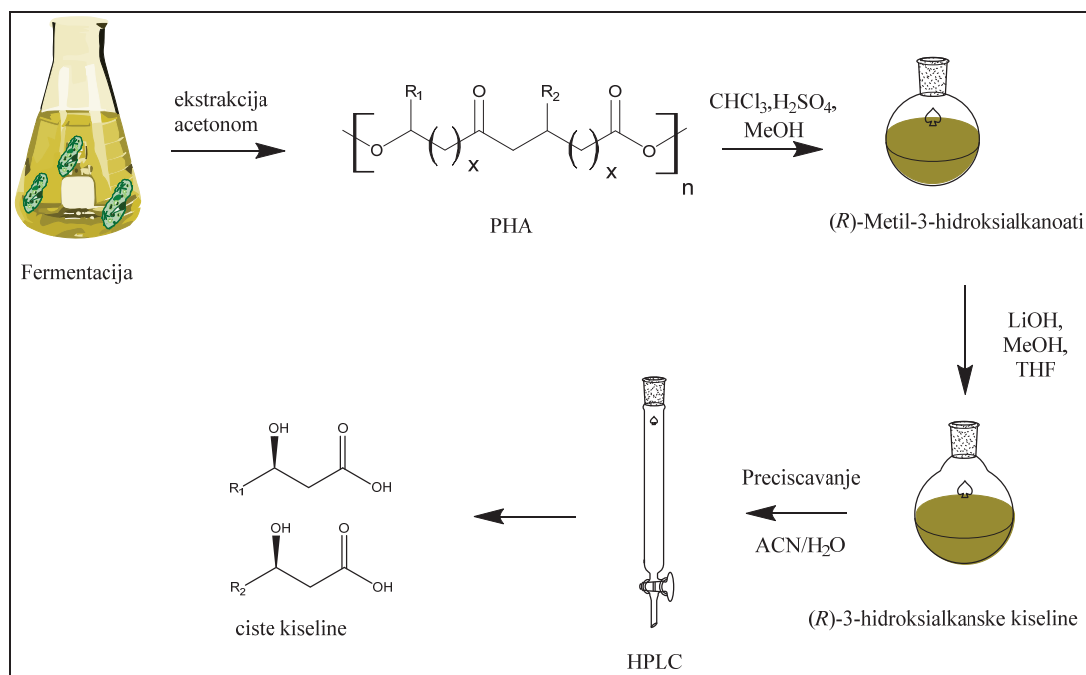




dobijene su iz odgovarajućih *trans*- $\alpha,\beta$ -nezasićenih alkanskih kiselina u mikrobiološkoj hidrataciji katalizovanoj ćelijama *Mucor sp.*<sup>80</sup>

### c) Depolimerizacija PHA

Enantiomerno čista (*R*)-3-hidroksialkanska kiselina može da se dobije depolimerizacijom PHA, enzimatskim<sup>81, 82</sup> ili hemijskim putem.<sup>83</sup> Nakon hemijske degradacije kiselim hidrolizom dobija se (*R*)-metil-3-hidroksialkanoat koji se dalje saponifikuje i daje odgovarajuću (*R*)-3-hidroksialkansku kiselinu (Slika 6).<sup>84</sup> Nedostatak ovog postupka je korišćenje velike količine organskih rastvarača i mala efikasnost procesa s obzirom na broj koraka koji se primenjuje.



Slika 6. Depolimerizacija PHA hemijskim putem

Do sada su mnoge ekstracelularne PHA depolimeraze identifikovane i okarakterisane.<sup>85</sup> Ove depolimeraze se uglavnom koriste za površinsku modifikaciju PHA<sup>86</sup>, dok je tek nekoliko primera povezano sa proizvodnjom 3-hidroksialkanskih kiselina. Termofilna depolimeraza iz *Streptomyces sp.* MG hidrolizuje



poli(hidroksibutirat) do monomernih jedinica na povišenoj temperaturi.<sup>87</sup> Ekstracelularne lipaze iz različitih bakterija su takođe ispitivane kao potencijalni enzimi za *in vitro* depolimerizaciju.<sup>88</sup> Utvrđeno je da većina lipaza može da hidrolizuje poliestre sa  $\omega$ -hidroksialkanskim kiselinama kao što su poli(6-hidroksiheksanoat) ili poli(4-hidroksibutirat). Poliestri koji imaju razgranate bočne lance u svojoj strukturi, kao kod PHA, ne mogu ili se jako malo hidrolizuju dejstvom do sada ispitivanih lipaza.<sup>88</sup>

Noviji pristup za izolovanje 3-HA iz PHA je depolimerizacija *in vivo*. Proces se zasniva na intracelularnoj depolimerazi za hidrolizu poli(hidroksialkanoata).<sup>85</sup> Pristup je uspešno primenjen na soju *A. latus* koji proizvodi poli(hidroksibutirate) i dobijen je (*R*)-3-hidroksibutirat u prinosu od 96%.<sup>89</sup> Kada je isti proces proširen na PHA srednjeg lanca, efikasnost je značajno opala, proizvod je izolovan u prinosu 9,7% posle 4 dana reakcije depolimerizacije.<sup>89</sup> Upotreba ekstracelularne depolimeraze izolovane iz *Pseudomonas fluorescens* GK13, soja koji proizvodi poli(hidroksialkanoate), dala je značajno bolje rezultate.<sup>90</sup> Optimizacijom uslova podešavanjem pH sredine, koja je pokazala kao ključna u ovoj transformaciji, izolovano je preko 90% (*R*)-3-hidroksioktanoata. Podjednako uspešno je bilo i dobijanje monomera sa nezasićenjem u bočnom lancu.<sup>82</sup>

#### 2.4.2 Primena PHA monomera

Hiralne hidroksialkanske kiseline predstavljaju interesantna jedinjenja sa visokim potencijalom primene u različitim sferama (antibakterijska, antiviralno dejstvo, sintoni za organsku sintezu, biogoriva).<sup>60</sup> PHA monomeri, posebno 3-hidroksibutirati imaju terapeutsko dejstvo na Alchajmerovu i Parkinsonovu bolest, osteoporozu čak i na poboljšanje memorije.<sup>91, 92</sup>

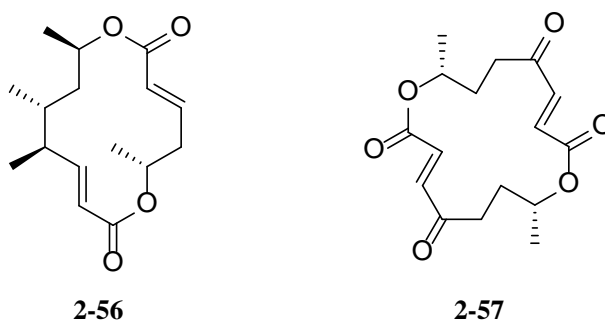
3-HA imaju strukturu sličnu masnim kiselinama koje su poznati antimikrobni agensi.<sup>93</sup> Uprkos velikom potencijalu, tek je nekoliko jedinjenja iz ove grupe komercijalno dostupno i još uvek nije ispitana mogućnost hemijske modifikacije kao i njihova biološka aktivnost. Biotehnoški dobijeni poli(hidroksialkanoati) mogu uz



optimizaciju uslova proizvodnje biti različitog monomernog sastava što ih čini idealnim polaznim materijalom za dalju funkcionalizaciju.

Hidroksi kiseline se mogu koristiti za proizvodnju novih poliestara. Kamachi sa saradnicima je pomoću polimeraze iz bakterije koja sintetiše PHA intracelularno, dobio iz racemske smeše monomera potpuno izotaktičan polimer.<sup>94</sup> Utvrđeno je da dimeri i trimeri 3-hidroksibuterne kiseline mogu brzo da se razgrade do monomera u tkivima pacova i ljudi i da imaju dobru penetraciju i difuziju kroz tkiva, pa su i dobar izvor energije za povređene pacijente.<sup>95</sup>

Seebach sa saradnicima pokazao je da 3-hidroksialkanske kiseline mogu da se koriste kao hiralni gradivni elementi u totalnoj sintezi makrolida kao što su pirenoforin, koletodiol grahamicin A1 i elaiofiliden<sup>38</sup> (Slika 7, Tabela 3). 3-Hidroksibutirati mogu da se koriste i za sintezu dendrimera koji poseduju niz osobina poput biodegradabilnost, monodisperznost i veliki broj površinskih funkcionalnih grupa što ih čini dobrim nosačima lekova u *in vivo* uslovima ispitivanja.<sup>96</sup>



Slika 7. Strukture pirenoforina **2-56** i koletodiola **2-57**

Najveći broj *in vivo* studija se fokusira samo na 3-hidroksibutirate i 4-hidroksibutirate. Ove studije pružaju značajne informacije o fiziološkoj funkciji ovih jedinjenja. Očekuje se da će strukturno slične hidroksi kiseline dužeg niza pokazati slične ili naprednije osobine. Takođe, biće omogućena njihova primena kao hiralnih lekova.<sup>38</sup>



Tabela 3. Potencijalna primena nekih 3-HA kao sintona u sintezi lekova

3-HA	Potencijalni sinton za:	Literatura
( <i>R</i> )-3-hidroksiundek-10-enoat	Inhibitore biosinteze holesterola	97
( <i>R</i> )-3-hidroksiundekanoat	Depsipeptid (-)-Tetrahidrolipstatin Veštački Lipid A Stevastelin B i B3 Sulfobacin A Globomicin Pseudomicin Topostin B567 i D654	98 99 100 99 101 102 103 104
( <i>R</i> )-3-hidroksinonanoat	Globomicin analoge	105
( <i>R</i> )-3-hidroksioktanoat	Simvastatin Viskosin	106 107
( <i>R</i> )-3-hidroksihept-6-enoat	Sfingofungin D Sfingofungin F ( <i>S</i> )-citronelol Ciklosporin A derivate	108 109 110 111
( <i>R</i> )-3-hidroksiheptanoat	Anachelin Pravastatin	112 113
( <i>R</i> )-3-hidroksiheksanoat	Analoge laulimalida	114

Zhang sa saradnicima predložio je da bi metil estri (*R*)-3-hidroksialkanoata mogli da se koriste kao biogoriva.<sup>115</sup> Oni su utvrdili da je toplota sagorevanja mešanih estara, niža od toplote sagorevanja čistog dizela ili benzina, ali ova količina je dovoljna da bude upotrebljiva kao gorivo.

## 2.5 Biološka aktivnost 3-hidroksialkanskih kiselina

Poznato je da su 3-hidroksialkanske kiseline prisutne u gotovo svim ćelijama, i da su kompatibilne sa ljudskim tkivima.<sup>17</sup> Sa druge strane zbog svoje strukture koju čine nepolaran ugljenični niz sa jedne strane i polarne funkcionalne grupe sa druge, 3-HA imaju veliki biološki potencijal o kome će se dalje diskutovati.



### 2.5.1 Antimikrobni potencijal

Antimikrobna rezistencija predstavlja sve veću opasnost po zdravlje ljudi. Razvija se kada mikroorganizmi (bakterije, gljive, virusi ili paraziti) ne reaguju više na lekove (antibiotike) na koje su prvobitno bili osetljivi. Zbog toga standardni tretmani više nisu efikasni, infekcije je sve teže kontrolisati i veći je rizik od smrtnog ishoda kod obolelih.<sup>116</sup> Iako je sposobnost bakterije da postane rezistentna na antibiotike poznata dugo, naše znanje o različitim mehanizmima nastajanja rezistencije raste poslednjih godina. Ove informacije, ako se pravilno koriste, treba da pomognu u otkriću i razvoju novih lekova koja mogu da prevaziđu ili neutrališu postojeće mehanizme rezistencije.<sup>117</sup> Alternativni način za pronalaženje novih antibiotskih lekova ranije je podrazumevao hemijsku derivatizaciju već odobrenih antibiotika sa ciljem poboljšanja svojstva i prevazilaženja mehanizma rezistencije. Primeri ovog pristupa su uspešne modifikacije makrolida,  $\beta$ -laktama, tetraciklina, aminoglikozidima.<sup>118</sup> Međutim, brzo se nakon uvođenja leka u terapiju, ponovo razvija rezistencija, pa je derivatizacija postojećih antibiotika prevaziđen pristup.<sup>119</sup>

Masne kiseline su dobro poznata antimikrobna jedinjenja.<sup>120</sup> Njihova aktivnost je povezana sa njihovom lipofilnom strukturom. Pokazano je da aktivnost masnih kiselina zavisi od dužine ugljeničnog lanca kao i od prisustva različitih funkcionalnih grupa na samom lancu.<sup>93</sup> Kod nezasićenih masnih kiselina aktivnost zavisi od broja i orijentacije dvostrukih veza. Dvostruka veza u prirodnim masnim kiselinama obično ima *cis* orijentaciju, i ima veću antimikrobnu aktivnost u poređenju sa *trans* izomerom.<sup>120</sup> Među zasićenim masnim kiselinama najveću aktivnost pokazuju one sa 10 i 12 ugljenikovih atoma u lancu.<sup>121</sup>



Tabela 4. Antimikrobna aktivnost izdvojenih masnih kiselina izražena u  $\mu\text{mol/mL}$ 

Masne kiseline	<i>C. albicans</i>	<i>S. aureus</i>
Dekanska kiselina	2,9	2,9
Dodekanska kiselina	2,5	2,5
Metil-dodekanoat	4,6	n.i.*
Tetradekanska kiselina	4,4	4,4
9- <i>cis</i> -tetradecenska kiselina	0,5	0,4

\* nema inhibicije pri ispitivanoj konc. jedinjenja.

Kako su monomeri PHA, 3-hidroksialkanske kiseline, slične strukture kao i masne kiseline očekuje se da njihova lipofilna priroda takođe dođe do izražaja u smislu antimikrobne aktivnosti. Pokazano je da (*R*)-3-hidroksi-*n*-fenilalkanska kiselina može da inhibira rast bakterijskog soja *Listeria monocytogenes*, koji je veoma rasprostranjen nespecifični patogeni mikroorganizam.<sup>122</sup> (*R*)-3-hidroksibutirati su pokazali u manjoj meri antimikrobnu, insekticidnu i antiviralnu aktivnost.<sup>38</sup> Testirana je i antimikrobna aktivnost 3-HA srednje dužine lanca. Ispitivanja su pokazala da (*R*)-3-hidroksi-8-nonenska kiselina i (*R*)-3-hidroksi-10-undecenska kiselina pokazuju veću aktivnost prema sojevima *Listeria spp.* i *Staphylococcus aureus* nego njihove racemske smeše ili odgovarajuće ne-hidroksilovane masne kiseline.<sup>61</sup>

Antifungalna aktivnost masnih kiselina je takođe poznata i raste sa dužinom hidrofobnog lanca.<sup>123</sup> Hidrofobnost dužih lanaca može umanjiti aktivnost zbog lošije rastvorljivosti u vodenoj sredini. Pokazano je da dodekanska kiselina ima najbolji odnos hidrofobnosti i hidrofilnosti. Hidroksilne masne kiseline pokazuju širok spektar antifungalne aktivnosti. Sjorgen sa saradnicima je utvrdio da hidroksilne masne kiseline lako ulaze i lipidni dvosloj membrane kod gljiva i povećavaju membransku permeabilnost i propuštaju intracelularne elektrolite i proteine.<sup>124</sup> Ova grupa istraživača je pokazala da 3-hidroksialkanske kiseline sa 10, 11, 12 i 14 ugljenikovih atoma kao i 2-hidroksidekanske kiseline poseduju antifungalnu aktivnost prema različitim sojevima gljiva.

Antimikrobna aktivnost do sada ispitivanih 3-hidroksialkanskih kiselina i masnih kiselina je značajno manja u poređenju sa antimikrobnim agensima koji su





trenutno u upotrebi. Njihove minimalne inhibitorne koncentracije su u opsegu od 10 do 100  $\mu\text{g/mL}$  dok je ista vrednost za antimikotike na tržištu ispod 10  $\mu\text{g/mL}$ .<sup>125</sup> Potrebna su dalja istraživanja kako bi se antimikrobni potencijal 3-HA i masnih kiselina iskoristio, jedan od pristupa je konjugacija ovih jedinjenja sa već poznatim antimikrobnim agensima ili dalje transformacije i uvođenje novih farmakofora.

### a) Moduliranje bakterijske međucelijske komunikacije

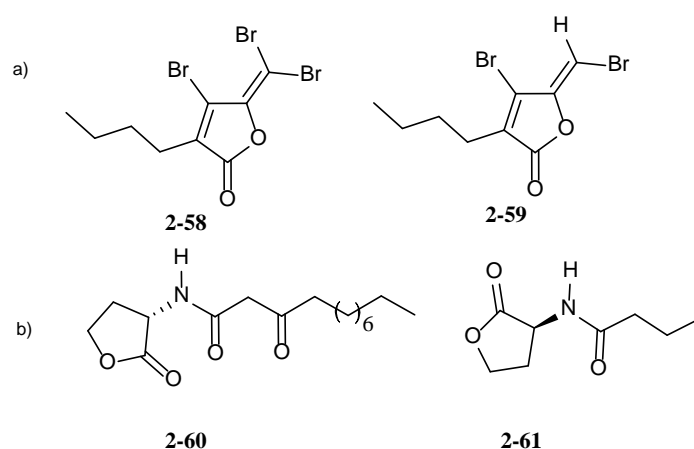
U poslednjoj deceniji antivirulentni lekovi koji ne ubijaju direktno bakterije već sprečavaju patogene mikroorganizme da ispolje svoje štetne fenotipske karakteristike su privukli sve veću pažnju.<sup>126</sup> Ovakav pristup može da smanji brzinu razvoja rezistencije pa je sve veći broj istraživača okrenut istraživanjima vezanim za bakterijsku međucelijsku komunikaciju, koja je zajednička osobina mnogih patogena.<sup>127</sup>

U međucelijskoj komunikaciji (*eng.* quorum sensing, QS) bakterije proizvode i oslobađaju hemijske signalne molekule, autoinduktore, čija koncentracija raste sa porastom gustine ćelija.<sup>128</sup> Detekcija minimalnog praga stimulatorne koncentracije signalnog molekula dovodi do promene u ekspresiji gena i sinhronizacije rada čitave zajednice. Gram-pozitivne i Gram-negativne bakterije koriste ovaj vid međusobne komunikacije za regulaciju raznovrsnih fizioloških aktivnosti. Ovi procesi uključuju simbiozu, virulentnost, konjugaciju, proizvodnju antibiotika, pokretljivost, sporulaciju, i formiranje biofilma. Nedavna istraživanja u ovoj oblasti ukazuju da se međucelijska komunikacija putem signalnih molekula javlja unutar i između bakterijskih vrsta. Uopšte, Gram-negativne bakterije koriste acilovan homoserin lakton kao autoinduktor, dok Gram-pozitivne bakterije koriste oligopeptid da komuniciraju.<sup>129</sup>

Da bi funkcionisao sistem bakterijske komunikacije, ćelije moraju da imaju sposobnost sinteze signalnih molekula, detekcije signala i sposobnost aktivacije i deaktivacije ciljnih gena. Narušavanjem bilo kog od ova tri procesa inhibira se ekspresija gena što dovodi do smrti bakterije. Inhibicija se može ostvariti na tri nivoa: represijom signala, degradacijom signala ili blokiranjem signalnog receptora.<sup>130</sup> Modulacija međucelijske komunikacija privlači sve više pažnje istraživača kao meta za delovanje novih antimikrobnih agenasa.



Poznato je nekoliko grupa molekula koje mogu da inhibiraju međubakterijsku komunikaciju. Na *Slici 8* su prikazane strukture nekih od najčešćih modulatora međubakterijske komunikacije. Najpoznatiji i najaktivniji inhibitori su bromovani furanoni. Sintetiše ih morska alga *Delisea pulchrato* (*Slika 8, primer a*).<sup>131</sup> Otkriveno je da jedna grupa derivata furanona deluje na formiranje biofilмова tako što onemogućava kompaktno pakovanje bakterija u matriks što dovodi do gladovanja i nakupljanja produkata metabolizma štetnih po bakteriju. Strukturni analozi *N*-acil homoserin laktona mogu da inhibiraju međubakterijsku komunikaciju vezivanjem za receptor prirodnog signalnog molekula (*Slika 8, primer b*).



*Slika 8.* Strukture nekih od inhibitora međubakterijske komunikacije

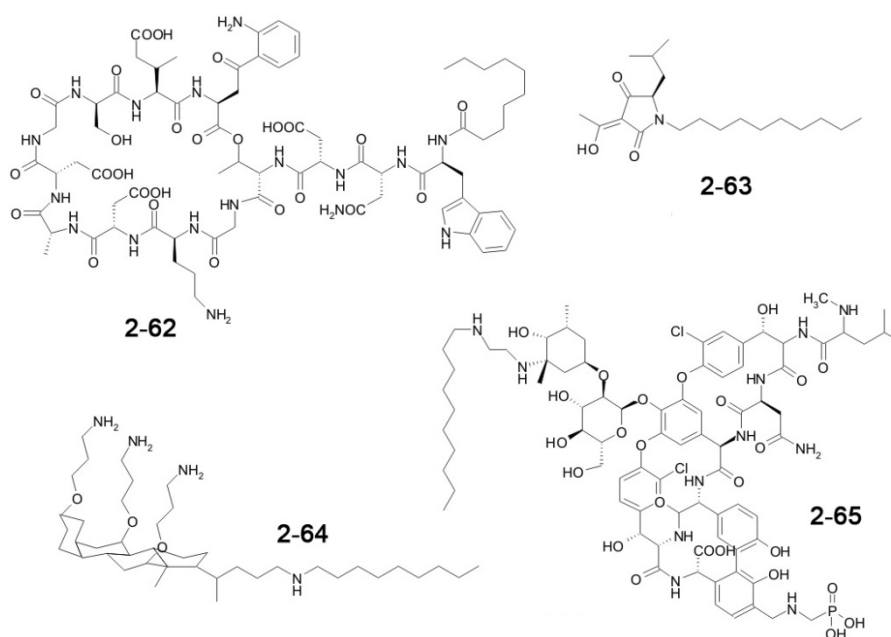
Utvrđeno je i da *cis*-2-dodecenska kiselina modulira komunikaciju između *B. cenocepacia* i *P. aeruginosa* sojeva. Egzogeno dodavanje ovog jedinjenja inhibira formiranje biofilma kao i virulentnost *P. aeruginosa*, u *in vitro* i *in vivo* uslovima.<sup>132</sup>

### 2.5.2 Lipofilna farmakofora

Poznata su istraživanja vezana za konjugaciju lipofilnih molekula za lekove u cilju prevazilaženja rezistencije i povećanja aktivnosti. Takođe, masne kiseline konjugovane sa lekom povećavaju njegovu aktivnost u poređenju sa nekonjugovanom formom.<sup>133</sup>



Agensi čija je meta bakterijska membrana su relativno novi u kliničkoj praksi.<sup>134</sup> Narušavanje stabilnosti bakterijske membrane ili proteina koji su funkcionalno povezani sa membranom može biti strategija za tretman upornih infekcija. Napredak u razvoju nove generacije antimikrobnih agenasa je zasnovan na prirodnim i polusintetskim jedinjenjima kao što su ceragenini, lipopeptidi, lipoglikopeptidi i glikodepsipeptidi (Slika 9).<sup>134</sup> Na svim strukturama se izdvaja zajednička strukturna jedinica, lipofilni ugljeni niz. Njegova uloga je da poboljša interakciju leka sa hidrofobnom ćelijskom membranom. Pored toga što pomažu vezivanje leka za ćelijsku membranu, smatra se da lipofilni bočni niz produžava vreme poluraspadanja leka, pa tako povećava aktivnost.<sup>135</sup>



Slika 9. Hemijske strukture membranski aktivnih antibiotika koji sadrže lipofilnu farmakoforu.

3-Hidroksialkanske kiseline poseduju lipofilni ugljeni niz u strukturi i mogu se razmatrati kao dobri kandidati za membranski aktivne antibiotike, samostalno ili u konjugaciji sa drugim strukturnim fragmentima.

### 2.5.3 Halogena farmakofora

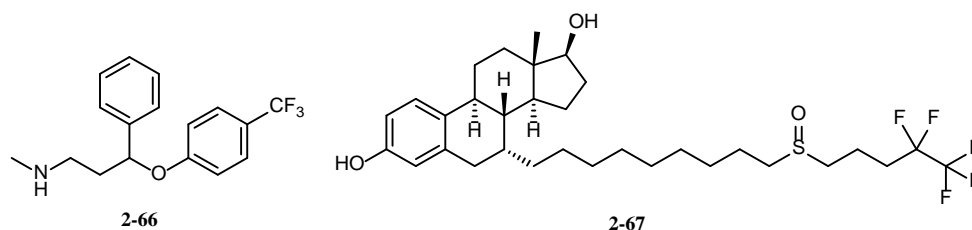
Veliki broj lekova kao i potencijalnih lekova sadrži halogene elemente u svojoj strukturi.<sup>136</sup> Uprkos velikom broju istraživanja u oblasti medicinske hemije, broj



halogenih lekova koji su dospeli na tržište u poslednjih dvadeset godina je manji od očekivanog.<sup>137</sup> Više razloga objašnjava ovakav trend. Otkriće novih biološki aktivnih molekula zasniva se na poznatim aktivnostima prirodnih proizvoda. Kako su halogenovani prirodni proizvodi iz biljaka, najvećeg izvora potencijalnih lekova, retki, smanjen je i broj istraživanja ka njima. Sledeći razlog može biti i pravac retrosintetičkog razmatranja sinteze novih proizvoda. Halogenovanje se uglavnom odigrava na aromatičnom prstenu, dok je uvođenje halogenih funkcionalnih grupa u alifatične lance manje zastupljeno zbog lošije stereoselektivnosti ove transformacije.<sup>136</sup>

Analizom trenutnog stanja na tržištu lekova može se zaključiti da najveći deo halogenih lekova čine fluoro derivati, zatim hlora i bromo dok samo jedan lek sadrži jod u sebi, tiroidni hormon tiroksin. Dobijanje fluor-, hlor- i brom supstituisanih jedinjenja poznata je i na industrijskoj skali sa zadovoljavajućom cenom procesa.<sup>136</sup>

Nekoliko razloga opravdava veliku zastupljenost lekova sa fluorom na tržištu. Fluor je najelektronegativniji element u periodnom sistemu elemenata, ima mali atomski radijus i malu polarizabilnost.<sup>138</sup> Loš je akceptor halogene veze zbog velike elektronegativnosti, ali je sa druge strane dobar akceptor vodonika u vodoničnoj vezi. U medicinskoj hemiji fluor se smatra ekvivalentom vodonika i metil-grupe, smatra se da su oni bioizosterni odnosno da izazivaju sličan biološki efekat.<sup>139</sup> Jedan od prvih lekova sa fluorom bio je 5-fluoruracil, antikancerski lek prvi put sintetisan 1957. godine.<sup>140</sup> Među najprodavanijim lekovima koji sadrže fluor svakako je antidepresiv fluoketin, poznat na tržištu kao Prozak® **2-66** (Slika 10).<sup>138</sup> Faslodeks® **2-67** koristi se za lečenje određenih vrsta hormonski zavisnih kancera dojke, u svojoj strukturi ima alifatičan niz i pet atoma fluora.<sup>141</sup>



Slika 10. Antidepresiv Prozak® i antikancerski agens Faslodeks®

Jedinjenja koja sadrže hlor takođe su dosta zastupljena među halogenim lekovima. Za razliku od fluora, hlor je umeren akceptor halogene veze iako je veće

radijusa od fluora. Veza C-Cl je dovoljno stabilna pa može da se uvede na različitim heterocikličnim molekulima. Prednost lekova koji sadrže hlor je veći afinitet ka vezivanju za metu leka, kao i bolje prilagođavaju meti leka u poređenju sa nehlorovanim jedinjenjima zbog elektrostatičkih interakcija.<sup>142</sup>

Istraživanja su pokazala da prisustvo halogena kod biološki aktivnih molekula povećava njihovu lipofilnost, postepeno poboljšava orlanu resorpciju kao i penetraciju leka u centralni nervni sistem.<sup>143, 144</sup> Pokazano je da prisustvo halogenih elemenata u strukturi potencijalnog leka ne izaziva toksičnost.<sup>136</sup>

Zbog prisustva hidroksilne funkcionalne grupe u bočnom nizu koja se relativno lako supstituiše halogenim elementima, 3-HA su dobri prekursori za sintezu jedinjenja sa halogenom farmakoforom. Na tržištu je malo biološki aktivnih jedinjenja koji u alifatičnom nizu poseduju halogene elemente te bi potencijalno bilo značajno sintetisati i ispitati biološki potencijal 3-HA sa halogenom farmakoforom.

#### 2.5.4 Konjugacija PHA monomera i biološki aktivnih peptida

Iako su se terapijski peptidi pojavili na tržištu pre 20 godina, najveću pažnju su privukli tokom prethodnih par godina. Preko 60 vrsta peptidnih lekova može se naći na tržištu, neki od njih su Lupron<sup>TM</sup> zatim Lantus<sup>TM</sup> koji su među najprodavanijim lekovima u SAD. Pored toga za oko 140 potencijalnih lekova u toku su klinička ispitivanja, a više od 500 je u predkliničkim ispitivanjima. Predviđa se da će rast peptidnih lekova na tržištu rasti eksponencijalno u narednim godinama.<sup>145</sup>

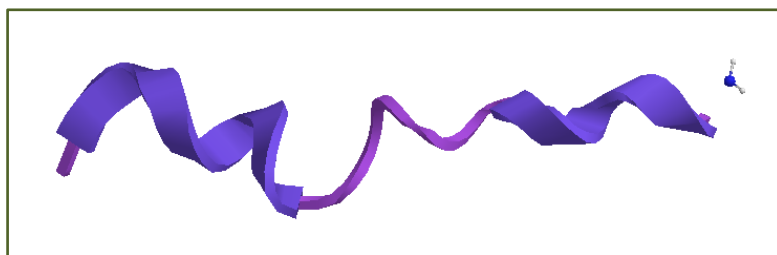
Poznato je da masne kiseline kada se kovalentno vežu za peptid povećaju njihovu antimikrobnu i antikancersku aktivnost.<sup>146</sup> Neki od prirodnih antimikrobnih peptida, kao što su polimiksin i lipopetabol, su konjugovani sa masnim kiselinama. Istraživanje je pokazalo da kada se masna kiselina ukloni sa strukture dolazi do opadanja aktivnosti leka što ukazuje da je njeno prisustvo usko povezano sa biološkom i farmakološkom aktivnošću. Mnoge studije su već pokazale da su amfipatična struktura i prag hidrofobnosti peptidnog lanca od ključnog značaja za biološku funkciju antimikrobnih peptida.<sup>147</sup> Rezultati ranijih istraživanja ukazuju da je dužina alifatičnog lanca važna za



specifičnost antimikrobne aktivnosti peptida. Povezanost antikancerske aktivnosti i prisustva masnih kiselina konjugovanih sa peptidom je u nedovoljnoj meri ispitana.<sup>148</sup>

### a) Katjonski antimikrobni peptid P18

P18 (KWKLFKKIPKFLHLAKKF) je hibridni peptid nastao kombinacijom dva antikancerska peptida, Cecropina A i Magainina 2 (Slika 11).<sup>149</sup> Cecropin A je katjonski antimikrobni peptid sastavljen od 37 amino kiselina, izolovan je iz lutke moljca, *Hyalaphora cecropia*.<sup>150</sup> Magainin 2 je katjonski antimikrobni peptid koji se sastoji od 23 amino kiseline i ima ukupno naelektrisanje +4 u fiziološkim uslovima.<sup>151</sup> Prvi put je izolovan sa kože afričke žabe *Xenopus laevis*.<sup>151</sup> P18 ima citotoksičnu aktivnost prema humanim ćelijama karcinoma i ne pokazuje značajnu hemolizu.



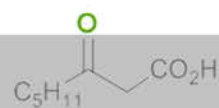
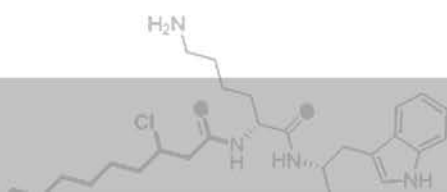
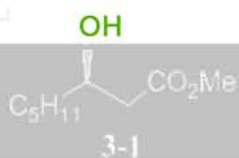
Slika 11. Trodimenzionalna struktura P18 peptida (izvor "Protein Data Bank PDB:1D9J")

Analizom povezanosti strukture i biološke aktivnosti peptida P18 pokazano je da je C- terminus  $\alpha$  - heliksa veoma važan za citolitičku aktivnost dok  $\text{NH}_2$  - terminus  $\alpha$  - heliksa nije.<sup>149</sup> Ovo mesto koje se može posmatrati kao suvišni region je korišćeno za dalje povezivanje peptida P18 sa drugim molekulima u cilju povećanja njegove antikancerske aktivnosti.

Ranija istraživanja su pokazala da monomerna jedinica poli(hidroksialkanoata), 3-hidroksidekanska kiselina vezana za D-peptid P18 (DP18) preko amidne veze utiče na promenu njegove antikancerske aktivnosti.<sup>152</sup> Sintetisani su konjugati DP18 sa dekanskom kiselinom, (R)-3-hidroksidekanskom kiselinom i  $\omega$ -hidroksidekanskom

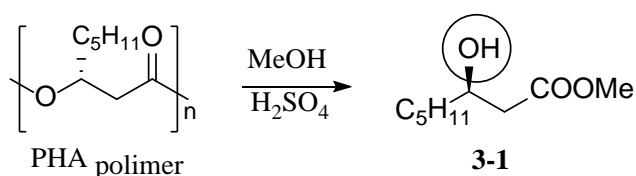


kiselinom, i poređena je njihova antikancerska aktivnost. Rezultati su pokazali da DP18 konjugovan sa (*R*)-3-hidroksidekanskom kiselinom ima poboljšanu antiproliferativnu aktivnost zbog efikasnijeg ulaska modifikovanog peptida u ćeliju raka. Specifičnost pomenutog konjugata je takođe bolja u poređenju sa konjugatom sa dekanskom kiselinom, što ukazuje na značaj prisustva hidroksilne grupe u bočnom lancu.<sup>152</sup> Pored toga prisustvo hiralne hidroksilne grupe omogućava dalje hemijske i biološke transformacije i otvara put za detaljnija ispitivanja potencijala ovih konjugata.



### 3. Naši radovi

U skladu sa osnovnim postulatima održivog razvoja i zelene hemije, osnova istraživanja predstavljenog u ovoj tezi je ispitivanje mogućnosti da se biotehnoški dobijeni polimer, koji se sastoji od hiralnih monomernih jedinica, iskoristi kao platforma za dobijanje biološki aktivnih malih molekula. Sintetisana je biblioteka jedinjenja (*Slika 12*), polazeći od (*R*)-3-hidroksioktanske kiseline (**3-3**), monomera dobijenog iz bakterijskog poliestra poli(hidroksialkanoata), kao polaznog materijala (*Shema 14*).



*Shema 14.* Monomer dobijen iz PHA

Zbog zastupljenosti halogenih funkcionalnih grupa u velikom broju trenutno upotrebljivanih lekova sintetisani su halogeni derivati polaznog monomera sa ciljem dobijanja biološki aktivnih jedinjenja.  $\beta$ -Hidroksilna grupa je supstituisana halogenim elementima (Cl, Br i F), za šta je neophodno zaštititi karboksilnu grupu prilikom izvođenja reakcija. Opredelili smo se da sintetišemo metil- i benzil-estre kiselina. Metil-estri su dobijeni prilikom postupka depolimerizacije (*Slika 6*) PHA. Benzil-estri su izabrani pre svega kao funkcionalna zaštita koja se uklanja pod blagim reakcionim uslovima, a i zbog praćenja promene aktivnosti kao posledice uvođenja aromatičnog jezgra u strukturu.

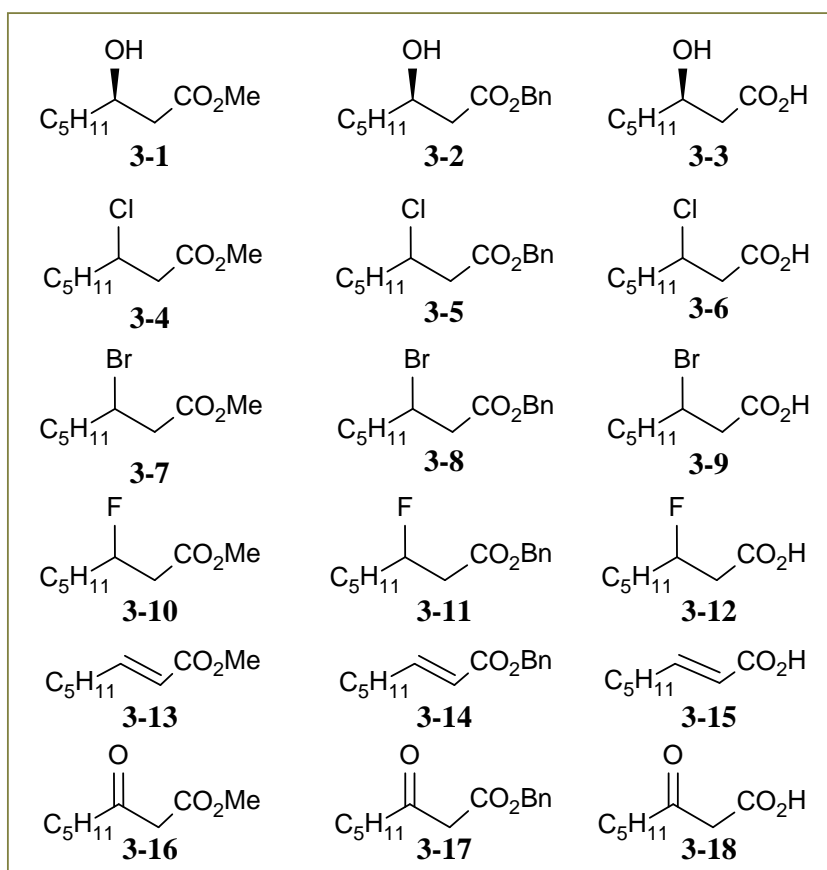
Upoređivanjem biološke aktivnosti metil- i benzil-estara i odgovarajućih kiselina otvorena je mogućnost da se ispita direktan uticaj slobodne karboksilne grupe na biološku aktivnost dobijenih derivata.

Pokazano je da su masne kiseline sa nezasićenjem u bočnom nizu aktivnije od odgovarajućih zasićenih kiselina.<sup>120</sup> Zbog značaja koji bi mogao imati derivat sa



dvostrukom vezom u bočnom nizu, hemijskom sintezom smo došli do ovih struktura i uvrstili ih u biblioteku dobijenih jedinjenja.

Poslednju grupu sintetisanih derivata čine  $\beta$ -keto estri, izuzetno važni sintoni u sintezi biološki aktivnih molekula.<sup>153</sup> Prevođenjem  $\beta$ -hidroksilne funkcionalne grupe u keto-grupu otvorena je mogućnost za čitav dijapazon hemijskih transformacija u kojima nastali derivati mogu da učestvuju.



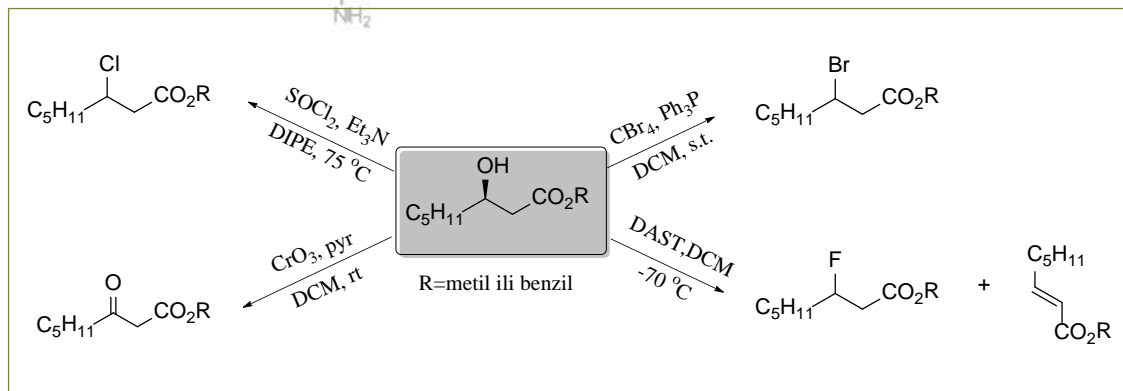
Slika 12. Biblioteka jedinjenja (3-1 do 3-18) sintetisanih polazeći od (R)-3-hidroksioktanske kiseline (3-3) iz bakterijskog polimera poli(hidroksialkanoata)

Paralelno, tokom rada smo se fokusirali i na hemijsku sintezu polazne 3-hidroksialkanske kiseline sa ciljem da uporedimo hemijsko dobijanje sa biotehnoškim dobijanjem.

Sve hemijske reakcije korišćene u istraživanju zasnivale su se na literaturnim procedurama uz optimizaciju reakcionih uslova prema polaznim jedinjenjima (Shema 15).<sup>154-158</sup>







Shema 15. Funkcionalizacija metil- i benzil-3-hidroksioktanoata

Pored sintetisanja biblioteke derivata, drugi cilj je bio i da se hemijskim postupkom sintetiše (*S*)-3-hidroksioktanska kiselina, koja ima suprotnu konfiguraciju u odnosu na (*R*)-3-hidroksioktansku kiselinu koja je osnova bakterijskog polimera poli(hidroksialkanoata). Sinteza bakterijskog polimera zavisi od specifičnih enzima koji učestvuju u njegovom dobijanju (Sekcija 2.3), do sada nije izolovan ni jedan PHA koji sadrži monomernu jedinicu (*S*)-konfiguracije. Na ovaj način je ispitan uticaj konfiguracije na biološku aktivnost 3-hidroksioktanske kiseline.

Za sva sintetisana jedinjenja detaljno je ispitana biološka aktivnost, što bi uključivalo antimikrobnu aktivnost (antibakterijsku, aktivnost na međubakterijsku komunikaciju i antifungalnu aktivnost) i citotoksičnost.

Ranija istraživanja su pokazala da monomerna jedinica poli(hidroksialkanoata), (*R*)-3-hidroksidekanska kiselina, vezana za D-peptid P18 (DP18L) preko amidne veze utiče na promenu njegove antikancerske aktivnosti (Sekcija 2.5.4).<sup>152</sup>

Mi smo u našim istraživanjima konjugovali 3-hidroksialkanske kiseline iz PHA i derivat 3-hlorodekanske kiseline na peptid DP18. Praćena je promena antikancerske aktivnosti peptida kada se za njega vežu kiseline različite dužine ugljeničnog lanca, kao i 3-hlorodekanska kiselina dobijena transformacijom (*R*)-3-hidroksidekanske kiseline iz PHA.





### 3.1 Sinteza derivata (*R*)-3-hidroksioktanske kiseline

#### 3.1.1 Polihidroksialkanoati kao izvor jedinjenja za dalju funkcionalizaciju

Razne slobodne masne kiseline privlače sve više pažnje kao potencijalni terapijski antimikrobni lekovi zbog njihovog širokog spektra aktivnosti, nespecifičnog načina delovanja i nedostatka razvoja klasičnih mehanizama rezistencije protiv delovanja ovih jedinjenja. Njihova antibakterijska svojstva su poznata duže vreme.<sup>93, 159</sup> Hidroksilovane alkanske kiseline takođe privlače dosta pažnje istraživača zbog velikog potencijala za primenu kako u farmaceutskoj, tako i u drugim granama industrije (Sekcija 2.4.2).<sup>60</sup>

Imajući u vidu jednostavnost kontrole monomernog sastava tokom biotehnoškog dobijanja sdl-PHA odlučili smo da istraživanje usmerimo na (*R*)-3-hidroksioktansku kiselinu. Monomerni sastav polimera isključivo zavisi od bakterijskog soja koji se koristi za proizvodnju, kao i od supstrata koji se koristi kao izvor ugljenika za fermentaciju. Polazni materijal nam je bio biološki polimer koji se dominantno sastoji od (*R*)-3-hidroksioktanske kiseline kao monomera (97%, w/w).<sup>160</sup> Ovako specifičan PHA polimer, srednje dužine lanca dobijen je biotehnoškim postupkom pomoću *Pseudomonas putida GPo1* soja.<sup>b</sup> Bakterijski soj *Pseudomonas putida GPo1* je gajen u nespecifičnim uslovima, to jest na podlozi u kome je jedini izvor ugljenika bio natrijum-oktanoat i sa ograničenim količinama azota. Suva ćelijska masa ekstrahovana je acetonom i dobijen je polimer PHA čistoće 99%.<sup>160</sup>

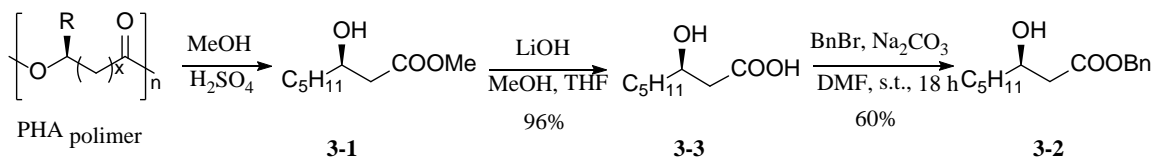
Depolimerizacija PHA prema postupku opisanom u literaturi<sup>6, 83</sup> podrazumeva rastvaranje polimera u hloroformu uz dodatak smese metanola i koncentrovane sumporne kiseline. Smeša se greje na temperaturi ključanja 48 h (Slika 7). Dobijaju se monomerne jedinice u obliku metil-estara i to (*R*)-metil-3-hidroksioktanoat u prinosu 97%, i (*R*)-metil-3-hidroksidekanoata u prinosu 3%, što je utvrđeno gasno-masenom hromatografijom. Zanimljivo mali udeo monomera dužeg niza nije uklonjen već je nastavljena derivatizacija. Derivat sa deset ugljenikovih atoma uklonjen je tokom

<sup>b</sup> Ovaj deo istraživanja je urađen na Univerzitetkom koledžu u Dublinu (University College Dublin, UCD) u laboratoriji prof. Kevin O'Connor-a.



prečišćavanja reakcionih smeša vakuum hromatografijom na koloni silika-gela. Još jedan postupak prečišćavanja monomerne kiseline primenjen je tokom izolovanja bioloških monomera. Kiselinsko-baznom ekstrakcijom uklonjene su eventualne nečistoće iz biološkog materijala i tako dobijena kiselina je dalje korišćena u reakcijama.

Funkcionalizacija (*R*)-3-hidroksioktanske kiseline (**3-3**) nije bila moguća bez zaštite slobodne karboksilne grupe, pa su reakcije izvođene sa metil- i benzil-estrima. Metil-estar **3-1** dobijen depolimerizacijom polihidroksialkanoata. Estar je hidrolizovan do 3-hidroksioktanske kiseline pomoću litijum-hidroksida u tetrahidrofuranu i metanolu **3-3** koja je dalje prevedena u benzil-estar **3-2** kao što je prikazano na *Shemi 16*. Hidroliza metil-estra urađena je, pri čemu je dobijena kiselina u prinosu od 96%.



*Shema 16.* Hidroliza i zaštita karboksilne grupe

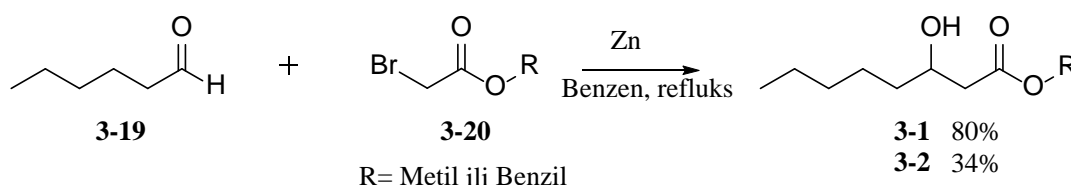
### 3.1.2 Hemijska sinteza 3-hidroksialkanskih kiselina i estara

Postoji mnogo načina da se hemijski sintetišu 3-hidroksialkanske kiseline i estri. Neki od njih su opisani u Opštem delu doktorske teze (Sekcija 2.4.1.a). Generalno, hemijski sintetisane 3-hidroksialkanske kiseline često imaju lošiji enantiomerni višak nego 3-hidroksialkanske kiseline dobijene biosintetičkim putem.<sup>35</sup> Da bismo direktno uporedili hemijsko i biotehnoško dobijanje 3-hidroksioktanske kiseline, tokom rada smo se fokusirali i na njenu hemijsku sintezu. Za sintezu optički čiste (*R*)-3-hidroksioktanske kiseline neophodno je korišćenje skupih ili teško dostupnih hiralnih katalizatora. Ovakav način dobijanja je značajno skuplji od biotehnoškog dobijanja pa smo se mi opredelili da dođemo do proizvoda ekonomski što povoljnijom nestereoselektivnom sintezom. Na taj način smo uporedili biotehnoški i hemijski



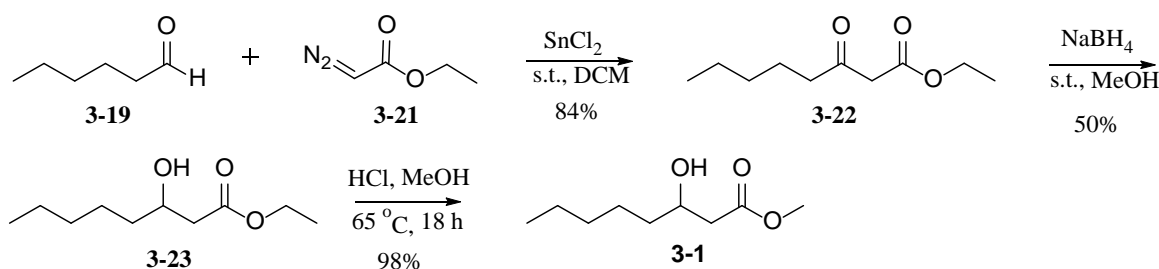
postupak dobijanja u pogledu reakcionih prinosa ne uzimajući u obzir optičku čistoću 3-hidroksioktanske kiseline.

U reakciji po Reformatsky-om, prema literaturno opisanoj proceduri, polazeći od heksanala i metil-bromacetata dobili smo metil-3-hidroksioktanoat u prinosu od 80%, (*Shema 17*).<sup>161</sup> Prema istom postupku polazeći od benzil-bromacetata i heksanala sintetisan je benzil-3-hidroksioktanoat u nižem prinosu od 34%. Ova reakcija je izuzetno osetljiva na prisustvo vlage, te je aparatura za izvođenje reakcije prethodno deaerizovana. Takođe, neophodno je prethodno aktiviranje cinka prema standardnoj proceduri. Nedavno je publikovana primena ove reakcije, takođe u cilju sintetisanja estra monomera polihidroksialkanoata, pod sličnim eksperimentalnim uslovima.<sup>162</sup>



*Shema 17.* Sinteza monomera u reakciji po Reformatsky-om

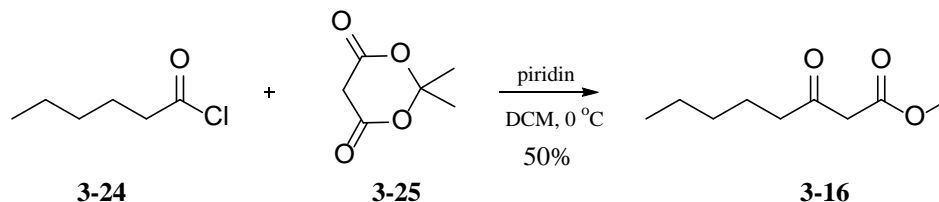
Sledeći pokušaj sinteze monomera u obliku racemata podrazumevao je drugačiji sintetički put (*Shema 18*). Sintetisan je etil-3-oksooktanoat **3-22** polazeći od etil-diazoacetata i heksanala, pri čemu je dobijen proizvod u prinosu 84%.<sup>163</sup> U narednom koraku redukovana je keto-grupa do hidroksilne pomoću natrijum-borhidrida u prinosu 50%, a zatim je kvantitativno etil-estar preveden u metil-estar. Dobijen je racemski monomer u ukupnom prinosu 40%.



*Shema 18.* Sinteza monomera polazeći od etil-diazoacetata

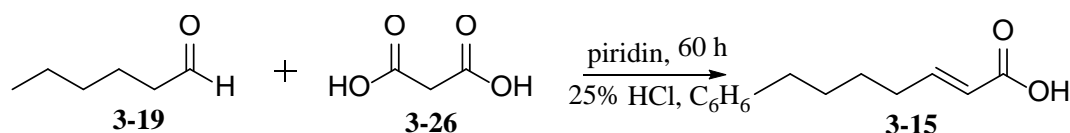


Za sintezu  $\beta$ -keto kiselina i  $\alpha,\beta$ -nezasićenih kiselina kao polazna jedinjenja poslužili su malonska kiselina i njeni derivati. Metil-3-oksooktanoat (**3-16**) je dobijen u reakciji Meldrum-ove kiseline i heksanoil-hlorida u prinosu 50% (*Shema 19*).



*Shema 19.* Sinteza metil-3-oksooktanoata

Zbog značaja koji bi mogao imati derivat sa dvostrukom vezom u bočnom nizu, Knoevenagel-ovom sintezom smo došli do kiseline **3-15** polazeći od heksanala i malonske kiseline (*Shema 20*).



*Shema 20.* Sinteza 2-oktenske kiseline

Metil-3-hidroksioktanoat (**3-1**), dobijen u opisanim postupcima bio je u obliku racemske smeše. Kada uporedimo dobijene rezultate sa biotehnoškim dobijanjem proističe prva prednost a to je da se biotehnoškim postupkom dobija enantiomerno čist (*R*) 3-HA. Prema prvom postupku u reakciji po Reformatsky-om nastaje proizvod u prinosu 80%, dok se u drugoj sintezi, preko diazoacetata, dobija 40% metil-3-hidroksioktanoata. Depolimerizacijom polimera PHA dobija se (*R*)-metil-3-hidroksioktanoata u prinosu 97%.



### 3.1.3 Funkcionalizacija 3-HA

Istraživanja su pokazala da je prisustvo halogene farmakofore kod biološki aktivnih molekula značajno za njihova biološka svojstva (Sekcija 2.5.3). Vođeni činjenicom da je 20% biološki aktivnih malih molekula halogenovano,<sup>164</sup> odlučili smo da sintetišemo halogene derivate (*R*)-3-hidroksioktanske kiseline (Slika 12).

Supstitucija hidroksilne grupe polazne 3-HA halogenim elementima izvođene su kako na biotehnoški dobijenom *R* enantiomeru jedinjenja tako i na hemijski sintetisanoj racemskoj smeši. Ovakav pristup je omogućio da se uporede prinosi reakcija i utvrdi da li postoji neka razlika u izvođenju transformacija između biološkog monomera i sintetisanog 3-HA. Pored toga otvorena je mogućnost da se ispita kako konfiguracije na hiralnom centru utiče na biološku aktivnost.

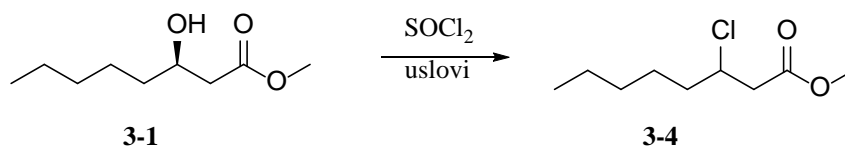
Polazna jedinjenja u transformacijama opisanim u daljem tekstu bili su benzil- i metil-estri biotehnoški dobijene (*R*)-3-hidroksioktanske kiseline.

#### a) Hlorovanje

Slobodna hidroksilna grupa zamenjena je hlorom reakcijom nuklofilne supstitucije pomoću tionil-hlorida i trietilamina u diizopropil-etru uz zagrevanje na 75 °C u toku 18 h. Dobijeni su hloro derivati: **3-4** u prinosu 46% i **3-5** u prinosu 56%.<sup>165</sup> Reakcija je postavljena na -10 °C a potom postepeno zagrevana do refluktovanja. Prilikom obrade reakcione smese, kao i tokom prečišćavanja na koloni, dolazi do nastajanja proizvoda eliminacije, što značajno umanjuje prinos reakcije. Enantioselektivnost reakcije je loša, za metil-estar **3-4** je 17% dok je kod benzil-estra **3-5** 27% enantiomerni višak (*ee*) (Tabela 5). Optimizacijom reakcionih uslova korišćenjem metil-3-hidroksioktanoata pokušano je da se poboljša enantioselektivnost supstitucije i da se poveća prinos reakcije. Reakcija je izvođena na nižim temperaturama (4 °C i 25 °C) a produžavano je vreme reakcije (Shema 21). Ove promene su dovele do značajnog smanjenja prinosa reakcije, dok je enantioselektivnost ostala niska. Kada je reakcija supstitucije postavljena na -20 °C, a potom zagrevana tokom 18 h na 60 °C, do



reakcije nije došlo. Upotrebom hloroforma umesto diizopropil-etra, prinos reakcije je snižen na 11% dok se enantioselektivnost nije povećala, a u acetonitrilu proizvod nije ni nastajao. Značajno bolji rezultat je dobijen kada je korišćeno 100 ekvivalentana tionil-hlorida u metilen-hloridu kao rastvaraču uz katalitičku količinu dimetilformamida.<sup>166</sup> Reakcija je ostavljena preko noći na sobnoj temperaturi, međutim transformacija nije bila potpuna. Tek uklanjanjem viška tionil-hlorida na sniženom pritisku transformacija je bila potpuna (*Shema 21*). Izmerena  $\alpha_D$  vrednost bila je +2,96, upoređivanjem sa optičkom rotacijom polaznog metil-estra **3-1** čija je vrednost -26, utvrđeno je da je nastao proizvod suprotne konfiguracije, ali nedovoljne optičke čistoće. U supstituciji preovlađuje  $S_N2$  mehanizam, ali dolazi do delimične racemizacije proizvoda.



	Rastvarač	SOCl <sub>2</sub> , ekv	Trietilamin, ekv	T, °C	Vreme, h	Prinos, %
1	DIPE	2,35	0,15	-10 do 75	18	46
2	DIPE	2,35	0,15	-10 do 4	48	-
3	DIPE	2,35	0,15	-10 do s.t.	48	-
4	DIPE	2,35	0,15	-20 do 60	18	0
5	CHCl <sub>3</sub>	2,35	0,15	-10 do 60	6	11
6	CH <sub>3</sub> CN	2,35	0,15	-10 do 80	18	-
7	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	100*		s.t.	18	99

\*i kat. količina DMF-a.

### Shema 21. Sintaza hloro derivata

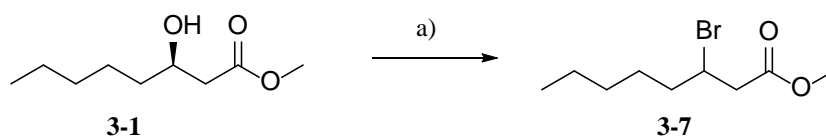
Prethodni pokušaji da se uvede hlor u strukturu PHA podrazumevali su hranjenje bakterija 1-hloroktanom kako bi se dobio kopolimer sa malim udelom ovog halogena.<sup>167</sup> Arkin sa saradnicima je opisao hlorovanje PHA koristeći nezasićeni polimer kao polazni materijal kroz koji je produvavao gas hlora, nastao je polimer sa većim udelom hlora u poređenju sa prethodnim istraživanjima.<sup>168</sup> Glavni problem ove modifikacije PHA je hidroliza polimera.





### b) Bromovanje

Bromo derivati (**3-7** i **3-8**) su sintetisani polazeći od metil-, odnosno benzil-estra 3-hidroksioktanske kiseline u reakciji sa ugljen-tetrabromidom i trifenilfosfinom u metilen-hloridu (*Shema 22*). Izolovano je 32% jedinjenja **3-7** i 95% jedinjenja **3-8**. Dobijeni bromo derivati su bili loše enantiomerne čistoće, enantiomerni višak za **3-7** je bio 16% *ee*, dok je kod jedinjenja **3-8** bio 1% *ee* (*Tabela 5*). Iako se u literaturi ovaj tip reakcije odigrava po  $S_N2$  mehanizmu uz inverziju konfiguracije, u našem slučaju došlo je do racemizacije optički čistog polaznog estra.<sup>155, 169</sup> Promenom reakcionih uslova polazeći od metil-3-hidroksioktanoata pokušano je da se dobiju bolji reakcioni prinos i ostvari viša enantioselektivnost. Reakcija je ponovljena prema postupku opisanom u literaturi gde se umesto metilen-hlorida kao rastvarač koristi benzen. Pod ovim reakcionim uslovima proizvod nije nastao.<sup>170</sup> Pokušano je sa još jednim postupkom iz literature da se dobije bromo derivat, upotrebom fosfor-tribomida i katalitičke količine piridina u dietil-etru kao rastvaraču.<sup>171</sup> Ni u ovoj reakciji nije nastao očekivani proizvod.



	Reagensi	Prinos, %
1	$\text{CBr}_4, \text{PPh}_3, \text{CH}_2\text{Cl}_2$	32
2	$\text{CBr}_4, \text{PPh}_3, \text{benzen}$	-
3	$\text{PBr}_3, \text{piridin}, \text{dietil-etar}$	-

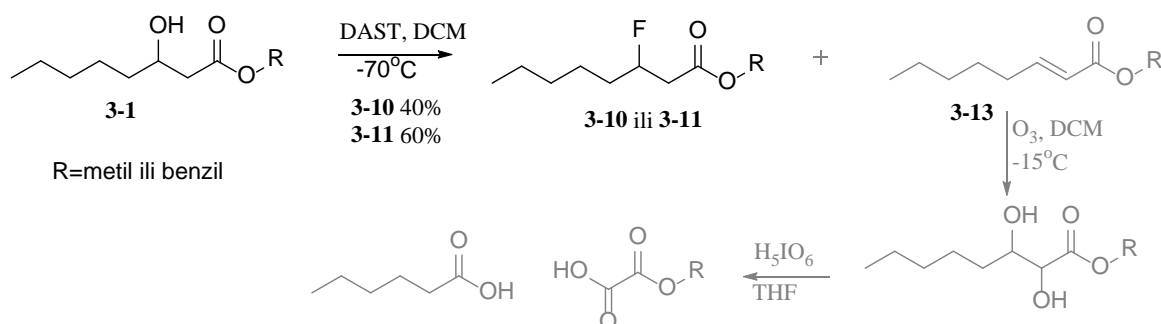
*Shema 22.* Sinteza bromo derivata

### c) Fluorovanje

Fluoro derivati su sintetisani u reakciji sa dietilaminosulfur-trifluoridom (DAST) na  $-70^\circ\text{C}$  u metilen-hloridu (*Shema 23*). Kada smo kao polazno jedinjenje koristili metil-estar (*R*)-3-hidroksioktanske kiseline dobijali smo nešto niži prinos (~40%) u poređenju sa benzil-estrom (60%). U reakciji nastaje značajna količina olefinskog sporednog proizvoda (~10%) koji se uklanja tako što se reakciona smeša tretira ozonom



u metilen-hloridu na  $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Nastali vicinalni diol dalje reaguje sa perjodnom kiselinom i dobijaju se karbonilna jedinjenja. Na ovaj način se olefin čija je Rf vrednost slična Rf vrednosti fluoro derivata selektivno prevodi u dosta polarnija karbonilna jedinjenja koja se lako odvajaju hromatografijom na koloni. Olefinski sporedni proizvod, koji nastaje u reakcijama je izolovan i okarakterisan (**3-13** i **3-14**). Proizvodi **3-11** i **3-12** (Tabela 5) imaju nešto veći enantiomerni višak u poređenju sa drugim halogenim derivatima (65% *ee*) što je posledica niže temperature na kojoj je reakcija izvođenjan u poređenju sa drugim postupcima sinteze.

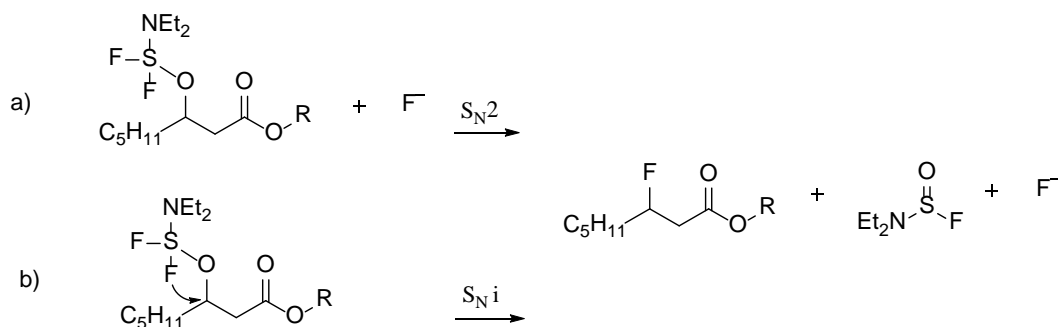
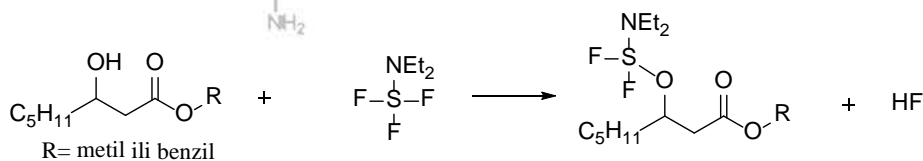


Shema 23. Sinteza fluoro derivata

U literaturi su predložena dva moguća mehanizma fluorovanja aminosulfuranima, klasi reagenasa kojima pripada DAST.<sup>172</sup> U prvom koraku dolazi do zamene fluorida vezanog za sumpor kiseonikom iz hidroksilne grupe praćene oslobađanjem vodonik-fluorida (Shema 24).<sup>173</sup> Nastali intermedijer se ne može izolovati, ali je njegovo nastajanje je potvrđeno NMR-om.<sup>173</sup> U narednom koraku supstitucijom nastaje alkil-fluorid prema  $S_N2$  mehanizmu uz inverziju konfiguracije uz učešće fluoridnog jona kao nukleofila, ili prema  $S_Ni$  mehanizmu uz retenciju konfiguracije na hirlanom centru. Iako teorijski proračuni idu u korist  $S_N2$  mehanizmu, eksperimentalni rezultati ne potvrđuju u potpunosti ovu tvrdnju.<sup>172</sup>







Shema 24. Mehanizam fluorovanja aminosulfuranima

Dobijanje metil-3-fluordekanoata je opisano kroz sintezu u tri koraka polazeći od Meldrum-ove kiseline.<sup>157</sup> Mi smo fluoro derivat **3-12** dobili u jednom koraku polazeći od monomera PHA.

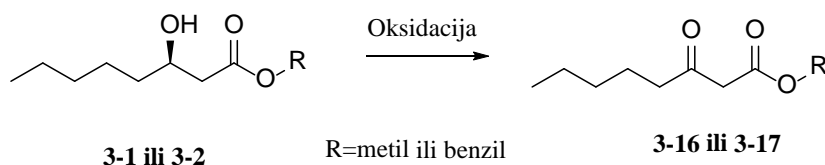
#### d) Oksidacija

$\beta$ -Keto-estri su jedan od najvažnijih intermedijera u organskoj sintezi, između ostalog mogu se koristiti za sintezu prirodnih enantiomerno čistih bioaktivnih jedinjenja.<sup>174, 175</sup> Posebno značajna za organsku sintezu je činjenica da ova jedinjenja sastoje iz funkcionalne grupe, sa nukleofilnim i elektrofilnim karakterom. Njihov značaj se ogleda u lakom formiranju veza preko četiri atoma ugljenika koji čine  $\beta$ -keto estarsku funkcionalnu grupu, dva različita elektrofilna karbonila i dva nukleofilna ugljenika koji mogu selektivno da reaguju pod odgovarajućim uslovima.<sup>176</sup>

Oksidacijom polaznih 3-hidroksi metil- i benzil-estara **3-1** i **3-2** dobijeni su  $\beta$ -keto estri (jedinjenja **3-16** i **3-17**) (Shema 25). Uobičajan postupak oksidacije u kome se kao oksidaciono sredstvo koristi piridinium-hlorhromat u metilen-hloridu nije bio uspešan. Procedura u kojoj se reakciona smeša mućka sa natrijum-dihromatom, za razliku od ostalih gde se reakcija izvodi uz mešanje takođe nije dala rezultate.<sup>177</sup>



Oksidacijom piridinium-dihromatom uz anhidrid sirćetne kiseline nastalo je manje od 10%  $\beta$ -keto-estra. Oksidacijom alkoholne grupe pomoću Dess-Martin-ovog perjodinana, hipervalentnog jedinjenja joda, nastao je proizvod u prinosu od 44%. Najbolji rezultati su dobijeni oksidacijom Collins-ovim reagensom, izolovano je 80% metil-3-oksooktanoata, dok je benzil-3-oksooktanoat dobijen gotovo kvantitativno.<sup>156</sup>



	Reagensi	Prinos, %	
		3-16	3-17
1	PCC, DCM,	-	-
2	Na <sub>2</sub> Cr <sub>2</sub> O <sub>7</sub>	-	-
3	PDC, Ac <sub>2</sub> O	<10	-
4	Dess-Martin-ov reagens	44	
5	Collins (CrO <sub>3</sub> , piridin, DCM)	80	97

Shema 25. Oksidacija hidroksilne grupe

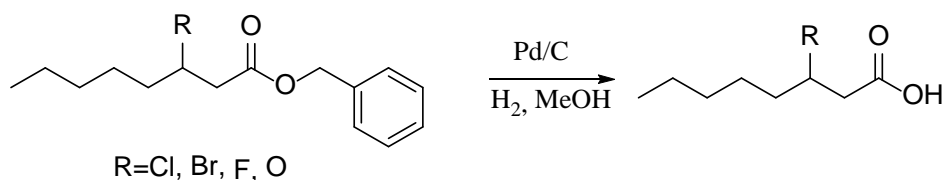
Nedavno je publikovan postupak sinteze  $\beta$ -keto estara koji uključuje više reakcionih koraka, a kao polazno jedinjenje se koriste masne kiseline.<sup>153</sup> Autori su dobili metil-3-oksooktanoat **3-16** u tri koraka u prinosu od 51 i 78%, u zavisnosti od sekvence reakcija koju su primenili. Mi smo u našem istraživanju sintetisali metil-3-oksooktanoat polazeći od Meldrum-ove kiseline i heksanoil-hlorida sa prinosom od 50%. (Sekcija 3.1.2) Oksidacijom biološkog monomera PHA, mi smo dobili proizvod u samo jednom koraku sa prinosom od 80% što ukazuje da ovo može biti dobar način za sintezu ove važne grupe jedinjenja.

#### e) Deprotekcija benzil-estra

Sve alkanske kiseline sintetisane tokom istraživanja (**3-3**, **3-6**, **3-9**, **3-12**, **3-15** i **3-18**) dobijene su iz odgovarajućih benzil-estara u reakciji hidrogenolize katalizovane



Pd/C, u atmosferi vodonika (50 psi) tokom 6-8 h (*Shema 26*). Teorijski ova transformacija je vrlo jednostavna pa smo pokušali da je izvedemo pod blažim reakcionim uslovima, na nižim pritiscima vodonika (1 atm) ali do reakcije nije dolazilo. Transformacija je bila nepotpuna prilikom skraćenog vremena trajanja reakcije.



*Shema 26.* Deprotekcija benzil-estara

### f) Rezultati funkcionalizacije 3-HA

Sintetisali smo 17 derivata polazeći od monomera PHA u nekoliko koraka u reakcijama sa različitim prinosima (32% - 100%). Iako su dobijene strukture vrlo jednostavne, deset derivata do sada nije bilo publikovano i ovi derivati su po prvi put potpuno okarakterisani (**3-4** - **3-12** i **3-14**). Derivat **3-12** je poznat u literaturi, ali nije bio potpuno okarakterisan.<sup>178, 179</sup>

Polazeći od racemskog metil-3-hidroksioktanoata sintetisani su svi derivati kao i iz (*R*)-metil-3-hidroksioktanoata. U nekim reakcijama prinos je bio veći za 5%-13% kod funkcionalizacije hemijski dobijenih derivata u poređenju sa postupcima gde je korišćen biomonomer kao polazno jedinjenje (*Tabela 5*). Najverovatniji razlog ovome je postojanje malog udela 3-hidroksidekanoata koji takođe učestvuje u transformacijama, ali se tokom prečišćavanja reakcionih smeša hromatografijom na koloni uklanja. Signali koji bi se mogli pripisati derivatima 3-hidroksidekanoata se ne uočavaju prilikom karakterizacije sintetisanih jedinjenja.

Uopšteno, korišćenjem hemijskih transformacija, pokazali smo da sdl-PHA mogu da budu dobar polazni material za sintezu različitih malih molekula, u dobrim reakcionim prinosima. Važno je istaći da je ovo obnovljiv izvor hemijskih jedinjenja i da u potpunosti može da parira hemijski sintetisanim molekulima.



Tabela 5. Poređenje rezultata sinteze derivata 3-HA (3-1 do 3-18).

Reakcija	Jedinjenje	Reakciono vreme (h)	Prinos (%)	ee (%)
I	3-1	3,0	99	>99
I*	3-1r	3,5	80	6
II	3-2	24	60	75
II'	3-2r	24	65	1
III	3-3	24	96	99
III'	3-3r	24	96	9
IV	3-4	0,5	46	22
IV'	3-4r	0,5	56	35
V	3-5	20	56	17
V'	3-5r	20	64	13
VI	3-6	8,0	100	27
VI'	3-6r	8,0	100	12
VII	3-7	4,0	32	16
VII'	3-7r	4,0	45	2
VIII	3-8	4,0	95	1
VIII'	3-8r	4,0	97	1
IX	3-9	8,0	100	23
IX'	3-9r	8,0	100	5
X	3-10	0,5	40	19
X'	3-10r	0,5	46	8
XI	3-11	0,5	60	65
XI'	3-11r	0,5	71	9
XII	3-12	8,0	100	66
XII'	3-12r	8,0	100	8
XIII	3-13	0,5	15	/
XIV	3-14	0,5	10	/
XV	3-15	8,0	100	/
XVI	3-16	20	80	/
XVII	3-17	20	97	/
XVIII	3-18	8,0	99	/

\*Zelena polja označavaju derivate dobijene iz hemijski sintetisanih monomera

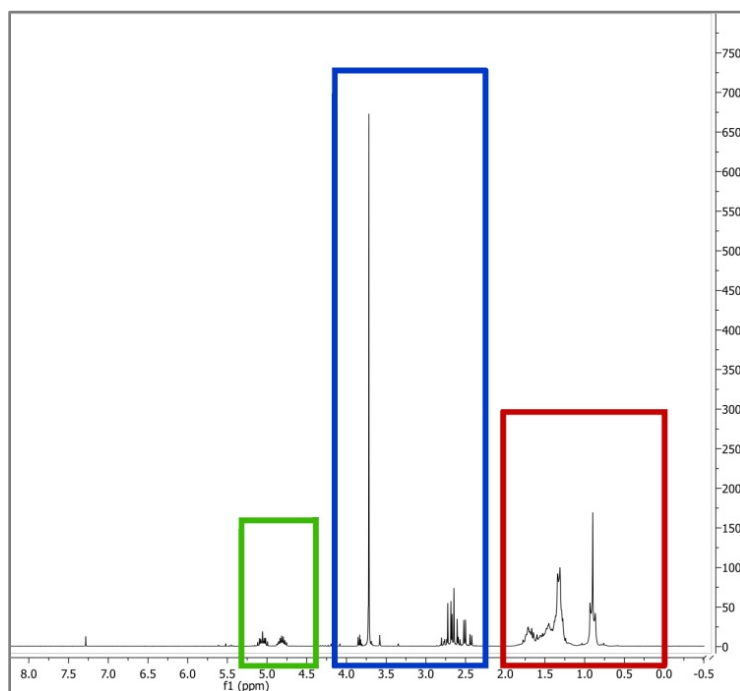
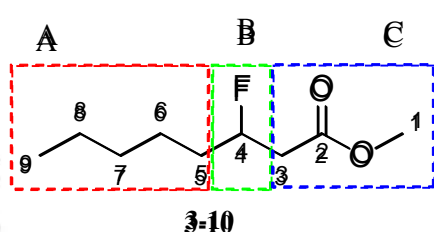


### 3.1.4 Karakterizacija sintetisanih fluoro derivata

Fluoro derivati su sintetisani prema ranije opisanoj proceduri u dobrom prinosu. Njihova struktura je određena korišćenjem  $^1\text{H}$  i  $^{13}\text{C}$  NMR spektroskopije. U daljem tekstu će biti prikazana detaljna asignacija signala dobijenih NMR spektara derivata **3-10**.

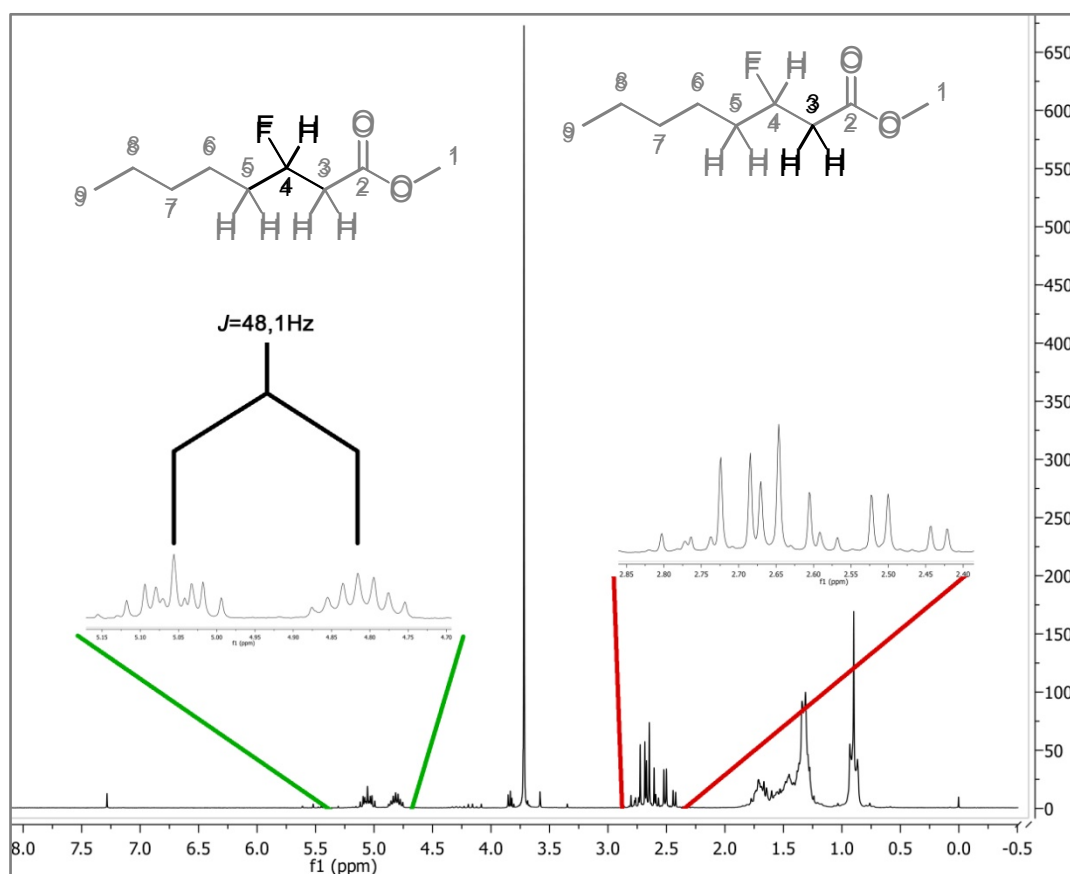
Merenje konstante kuplovanja protona i fluora otežano je zbog prisustva višestrukog proton-proton i proton-fluor kuplovanja koji su sličnog opsega.<sup>180</sup> Kuplovanja između vodonika i fluora su izuzetno jaka. Tipična  $^2J$  geminalna konstanta kuplovanja je oko 48 Hz, dok je na primer uobičajna konstanta sprezanja preko 4 veza  $^4J$  oko 4 Hz.  $^{13}\text{C}$  i  $^1\text{H}$  spin aktivna jezgra mogu da interaguju sa  $^{19}\text{F}$  kroz nevezujući mehanizam. Značajno je istaći da oni nemaju slobodan elektronski par koji bi mogao da se preklapa kroz prostor sa slobodnim elektronskim parom fluora. Elektronski parovi C-H veza imaju značajnu ulogu u nuklearnom prenosu spinova.<sup>181</sup>

U protonskom NMR spektru metil-3-fluorooktanoata mogu se uočiti tri oblasti: alifatični ugljenični niz, halogena funkcionalna grupa i estarska funkcionalna grupa (Slika 13).



Slika 13.  $^1\text{H}$  NMR spektar metil-3-fluorooktanoata

Izgled spektra fluoro derivata se dosta razlikuje u poređenju sa drugim derivatima 3-hidroksioktanske kiseline, zbog uticaja fluora. Fluor je najelektronegativniji element u periodnom sistemu elemenata i najviše privlači elektronske oblake, i zato se H atom sa C4 ugljenika nalazi na najvišem pomeranju u protonskom NMR spektru.



Slika 14.  $^1\text{H}$  NMR spektar metil-3-fluoroktanoata sa uvećanim signalima protona

Nuklearni spin fluora je  $\frac{1}{2}$ , to znači da se signali protona dele na  $n+1$  delova. Pikovi koji potiču od svakog spinskog stanja fluora se sastoje iz dve grupe signala koje deli velika geminalna konstanta sprezanja.<sup>182</sup>

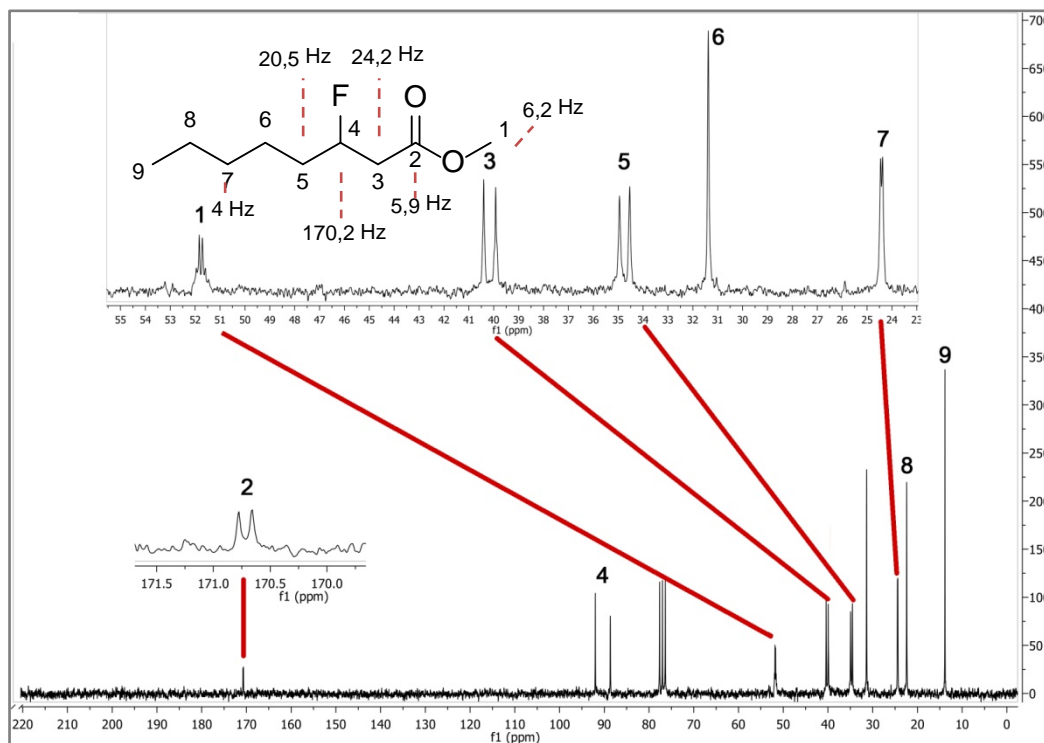
Signal protona sa C4 se deli na dva multipleta, konstanta sprezanja između ovih signala ima tipični vrednost za ovu vrstu kuplovanja i iznosi  $^2J = 48,1$  Hz (Slika 14). Intezivan singlet praćen takozvanim satelitima potiče od C1 metil grupe iz estra. I ovde se primećuje uticaj fluora zbog čega se i javljaju sateliti. Multiplet na 2,63 ppm potiče od dva H atoma sa C3 ugljenika. Na pomeranje ovog signala utiče karbonilna grupa u  $\alpha$  položaju i fluor u  $\beta$  položaju. Kod drugih halogenih derivata ovaj signal u protonskom



NMR spektru se javlja kao jasan dublet sa konstantom sprežanja od 7 Hz usled vicinalnog sprežanja sa susednim vodonikom na C4. U prikazanom spektru signal je značajno komplikovaniji zbog kuplovanja i sa vodonikom i sa fluorom na susednom C4 atomu.

Na najnižem hemijskom pomeranju nalaze se signali iz alifatičnog niza koji su spojeni u jedan multiplet usled slične magnetne okoline jezgara. Triplet na 0,88 ppm potiče od terminalne metil grupe, oblik signala diriguje sprežanje sa susednom metilenskom grupom.

Fluor 19 je veoma zastupljen u prirodi, spinski kvantni broj mu je  $\frac{1}{2}$  pa je NMR aktivni izotop fluora. Zbog toga on može da se kupluje sa ugljenikom na sličan način kao što se kupluje susedna vodonikova jezgra. Kuplovanje C i H se ne vidi u  $^{13}\text{C}$  NMR spektru jer standardna pulsna sekvenca izaziva C-H dekuplovanje i tako se sprečava razdvajanje signala zbog prisutnih vodonika. Pomenute pulsne sekvence ne utiču na kuplovanje C i F jezgara, zato u  $^{13}\text{C}$  NMR spektru dolazi do razdvajanja signala (Slika 15).



Slika 15.  $^{13}\text{C}$  NMR spektar metil-3-fluoroktanoata



Na *Slici 15* izdvojeni su dubleti koji se javljaju usled kuplovanja  $^{13}\text{C}$  i  $^{19}\text{F}$  jezgara. Na najvećem hemijskom pomeranju nalazi se karbonilni ugljenik C2, on se kupluje preko 3 veze sa atomom fluora sa konstantom sprezanja  $^3J = 5,9$  Hz i daje dublet u  $^{13}\text{C}$  spektru. Ugljenik C4 koji je direktno vezan za fluor daje takođe dublet u spektru sa konstantom sprezanja  $^1J = 170,2$  Hz koja odgovara tabličnim vrednostima.

Interesantno je primetiti da se uticaj fluora proteže kroz molekul. Tako se C1 atom spreže sa fluorom preko 5 veza i daje dublet na hemijskom pomeranju od 57,7 ppm sa konstantom sprezanja od  $^5J = 6,2$  Hz. U ovakvom sprezanju značajnu ulogu imaju vezivni elektroni iz C-H veza preko kojih se dešava nuklearni prenos spinova s obzirom na to da nema drugih slobonih elektronskih parova.

Ugljenik C3 takođe daje dublet sa  $^2J = 24,2$  Hz, iskošen oblik signala ukazuje da je on u korelaciji sa prostorno bliskim C5 ugljenikom koji se takođe deli na dublet,  $^2J = 20,5$  Hz. Konstanta sprezanja C3 ugljenika sa  $^{19}\text{F}$  je nešto veća od konstante sprezanja C5 ugljenika, razlog tome je blizina karbonilne grupe i  $\pi$ -elektrona C3 atomu koji doprinose jačem sprezanju.<sup>181</sup>

Prisustvo fluora se primećuje i u alifatičnom nizu, pa se C7 ugljenik kupluje sa fluorom preko 4 veze i daje dublet. Kako je C6 atom bliži fluoru očekivalo se da će do sprezanja pre doći sa njim međutim prostorna orijentacija C7 ugljenika je povoljna za sprezanje kroz prostor  $^{13}\text{C}$  i  $^{19}\text{F}$  pa se u spektru javlja dublet ( $^4J = 4,0$  Hz).

### 3.1.5 Sinteza (*S*)-metil-3-hidroksioktanoata

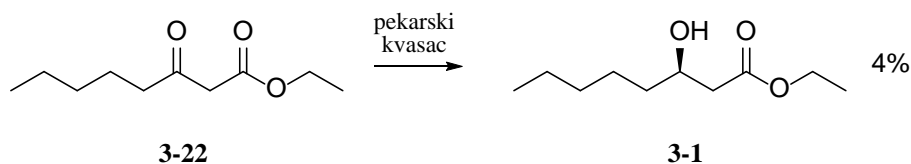
Prilikom sinteze monomerne jedinice sa promenjenom konfiguracijom na hiralanom ugljenikovom atomu u odnosu na isključivo (*R*)-enantiomere poreklom iz biotehnoški dobijene PHA, razmatrana su tri pristupa: enzimski kataliza, Mitsunobu-ova reakcija i asimetrična redukcija.

Jednostavan primer enzimski redukcije pomoću pekarskog kvasca pokušao je na prethodno sintetisanom etil-3-oksooktanoatu, nastalo je 4% proizvoda *R* konfiguracije



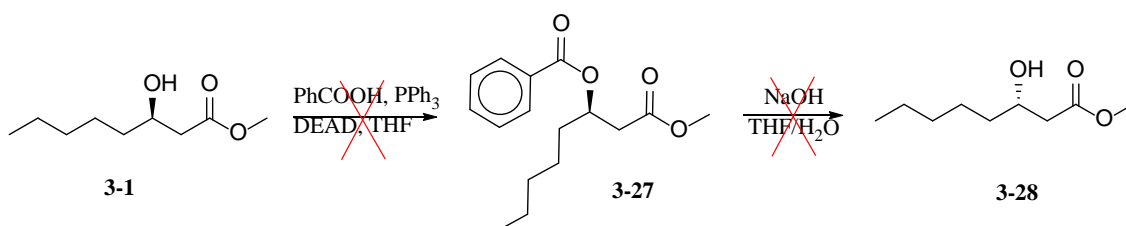


na hiralnom C atomu (*Shema 27*). Usled nedostatka drugih odgovarajućih enzima za ovu transformaciju nismo dalje pokušavali da na ovaj način dođemo do *S*-monomera.



*Shema 27.* Enzimaska redukcija keto-grupe

U literaturi je poznata činjenica da Mitsunobu-ova reakcija dovodi do inverzije konfiguracije na ugljeniku za koji je vezana hidroksilna grupa. Nastaje ester koji se hidrolizom ponovo vraća u alkohol ali suprotne konfiguracije.<sup>183</sup> Vođeni tom činjenicom pokušali smo da ponavljanjem nekoliko procedura iz literature dobijemo monomer sa suprotnom konfiguracijom. U prvom pokušaju u rastvor polaznog (*R*)-metil-3-hidroksioktanoata, benzojeve kiseline i trifenil-fosfina u anh. tetrahidrofuranu dodat je rastvor dietilazo-dikarboksilata (DEAD) takođe u tetrahidrofuranu (*Shema 28*).<sup>184</sup> Reakcija je izvođena na sobnoj temperaturi ali nije dobijen željeni proizvod. Optimizacijom uslova pokušano je da se dobije očekivani proizvod ali bez uspeha. Snimanjem gasnog hromatograma sirove reakcione smese utvrđeno je da nakon reakcije zaostaje neizreagovano polazno jedinjenje, zatim nastaje olefin kao proizvod eliminacije i očekivani proizvod u tragovima.



*Shema 28.* Mitsunobu-ova reakcija

Kako bismo lakše pratili tok Mitsunobu-ove reakcije pokušali smo da sintetišemo benzoat **3-27** u reakciji benzoil-hlorida i 3-hidroksioktanoata u piridinu. U reakciji je doslo do eliminacije hidroksilne grupe a proizvod nije nastao ni u tragovima.

U nešto izmenjenim reakcionim uslovima preteći proceduru iz literature<sup>185</sup> urađena je još jedna probna reakcija, u kojoj je *p*-nitrobenzoeva kiselina je korišćena za

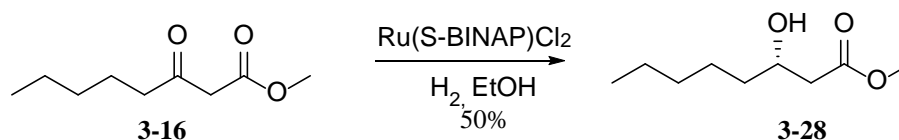


esterifikaciju umesto benzojeve kiseline. Na gasnom hromatogramu sirove reakcione smeše nije bilo naznaka da je proizvod nastao. Ista reakcija je probana i na model jedinjenju kako bismo bili sigurni da za izvođenje reakcije koristimo reagense dovoljne čistoće. U reakciji sa mentolom, kao model jedinjenjem, nastao je očekivani proizvod.<sup>185</sup>

Nakon svih navedenih pokušaja zaključili smo da Mitsunobu reakcija ne može da se primeni za inverziju konfiguracije na hiralnom centru metil-3-hidroksioktanoata. Najverovatniji razlog tome je što hidroksilna grupa u  $\beta$ -položaju lako podleže eliminaciji i nije dovoljno aktivirana da bi mogla da reaguje pod navedenim uslovima.

Asimetrična redukcija  $\beta$ -keto estra katalizovana rutenijumovim kompleksima se pokazala kao dobra metoda za sintezu *S*-monomera (*Shema 29*).

Polazni metil-3-oksooktanoat **3-16** dobijen je adicijom heksanoil-hlorida na Meldrum-ovu kiselinu prema postupku opisanom u literaturi sa prinosom od 50%.<sup>186</sup>



*Shema 29.* Asimetrična redukcija  $\beta$ -keto estra

Uspešno izvedenoj redukciji su prethodnili neuspeli eksperimenti sa *in situ* sintetisanim (1,5-ciklooktadien)rutenijum(II)-dihloridom u anhidrovanim uslovima u atmosferi argona.<sup>187</sup> Prema postupku opisanom u literaturi reakcija je postavljena u degasiranom metanolu sa 2 mol% katalizatora u atmosferi vodonika (1 atm), a do reakcije nije došlo ni posle 4 dana mešanja na sobnoj temperaturi.

Polazeći od (1,5-ciklooktadien)rutenijum(II)-dihlorida sintetisan je hiralni katalizator ((*S*)-BINAP)rutenijum(II)-diacetat<sup>174</sup> koji je *in situ* preveden u dihlorid i u tom obliku upotrebljen u reakciji asimetrične redukcije metil-3-oksooktanoata u etanolu pod pritiskom od 100 atmosfera vodonika tokom tri dana. Dobijeno je 60 mg (60%) čistog metil-(*S*)-3-hidroksioktanoata, 99% ee.



## 3.2 Ispitivanje biološke aktivnosti

Testirana je antimikrobna i antiproliferativna aktivnost svih sintetisanih derivata dobijenih iz (*R*)-3-hidroksioktanske kiseline (*Slika 10*). Planirano je da se testiraju i derivati sintetisani iz polazne hemijski dobijene 3-hidroksioktanske kiseline i da se uporede dobijeni rezultati. Međutim, prilikom derivatizacije biološke, optički čiste kiseline, došlo je do racemizacije (Sekcija 3.1.3) kod svih sintetisanih halogenih derivata pa je ova ideja odbačena jer su dobijene strukture gotovo istog enantiomernog sastava. Pored toga ispitali smo biološku aktivnost racemske 3-HA i utvrdili da nema razlike u aktivnosti u poređenju sa optički čistim *R* enantiomerom.

Ukupno, ispitana je biološka aktivnost 21 jedinjenja dobijenih tokom ovog rada: 18 jedinjenja dobijenih funkcionalizacijom 3-HA, hemijski sintetisane 3-hidroksioktanske kiseline, (*S*)-3-hidroksioktanska kiselina i 3-hlordekanaska kiselina.

### 3.2.1 Antibakterijska i antifungalna svojstva sintetisanih derivata

Pet bakterijskih sojeva (patogenih ili oportuno patogenih) uključujući *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocitogenes*, *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 i dva soja patogenih gljiva (*Candida albicans* i *Microsporium gypseum*) su korišćenja za testiranje antimikrobne aktivnosti sintetisanih jedinjenja. Zbog strukturne sličnosti, njihova antimikrobna aktivnost je poređena sa antibakterijskim i antifungalnim osobinama oktanske kiseline (**C8**).

Sva jedinjenja su prvo testirana u disk-difuzionom eseju koji se pokazao kao pogodan za brzo testiranje velikog broja jedinjenja. Merena je zona inhibicije rasta mikroorganizama, a rezultati su prikazani u *Tabeli A* u **Prilogu**. Rezultati su pokazali da su slobodne karboksilne kiseline bile aktivnije od odgovarajućih metil- i benzil- estara (estri uglavnom nisu izazivali zone inhibicije rasta), te su u daljim testiranjima razmatrane samo kiseline. Takođe, sva testirana jedinjenja su pokazala slabu ili zanemarljivo nisku aktivnost na rast soja *P. aeruginosa* PAO1, pa je u daljim



testiranjima ovaj soj korišćen kao model organizam za ispitivanje uticaja kiselina na međubakterijsku komunikaciju, tj. QS.

Minimalna inhibitorna koncentracija (*eng.* MIC) u tečnoj kulturi po standardnoj EUCAST metodi, određena je za sve sintetisane kiseline i poređena je sa oktanskom kiselinom kao poznatim antimikrobnim agensom.<sup>120</sup> Minimalne inhibitorne koncentracije testiranih kiselina bile su između 2,7 i 7,0 mM za bakterijske sojeve, dok je veća aktivnost detektovana protiv gljivica sa MIC vrednosti ma između 0,15 i 6,32 mM (*Tabela 6*).

Pokazano je da antibakterijska aktivnost sintetisanih jedinjenja nije ista za sve testirane bakterijske sojeve i da zavisi od vrste soja. Svi halogeni derivati su bili dva puta aktivniji u poređenju sa polaznom (*R*)-3-hidroksioktanskom kiselinom (**3-3**), ali su pokazali istu ili nižu aktivnost u odnosu na oktansku kiselinu (**C8**). Hloro derivat **3-6** je bio najaktivniji protiv *S. aureus* i *L. monocitogenes* (*Tabela 6*). Derivat **3-18** je strukturno vrlo sličan polaznom monomeru, te je shodno tome pokazao skoro identičnu antimikrobnu aktivnost (*Slika 12, Tabela 6*). Antibakterijska aktivnost sintetisanih jedinjenja nije visoka u poređenju sa komercijalno dostupnim antibioticima, na primer gentamicin poseduje MIC vrednost oko 4  $\mu$ M.

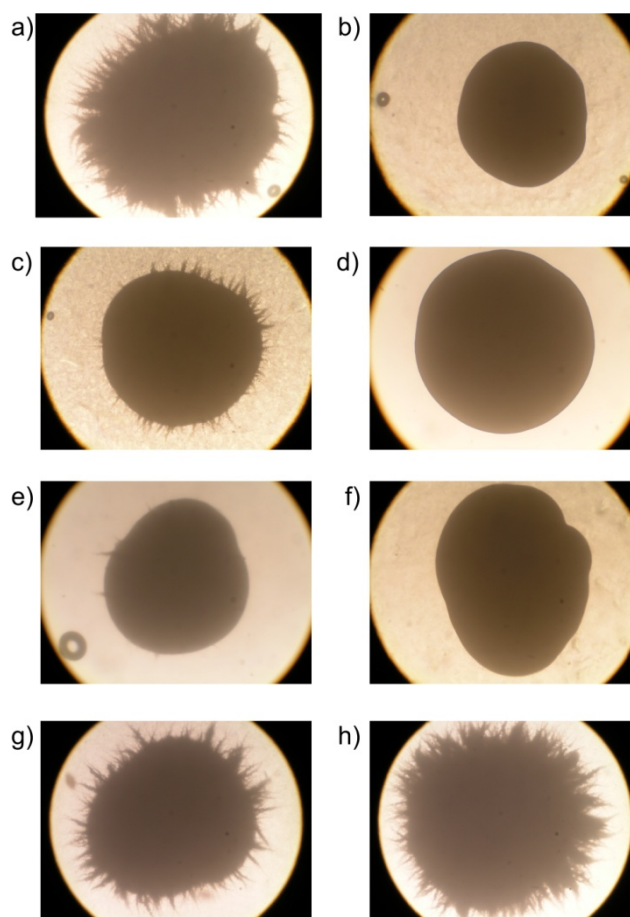
*Tabela 6.* Antimikrobna aktivnost sintetisanih karboksilnih kiselina izražena kao minimalna inhibitorna koncentracija (MIC) u mM

Derivat	<i>E. coli</i> <sup>b</sup> NCTC9001	<i>S. typhimurium</i> <sup>b</sup> NCTC120023	<i>S. aureus</i> <sup>c</sup> NCTC6571	<i>L. monocytogenes</i> <sup>c</sup> NCTC11994	<i>C. albicans</i> <sup>d</sup> ATCC10231	<i>M. gypseum</i> <sup>d</sup> ATCC24102
<b>3-3</b>	6,24	6,24	6,24	6,24	1,55	1,56
<b>3-6</b>	n.a. <sup>a</sup>	5,60	2,79	2,79	0,22	1,12
<b>3-9</b>	4,48	4,48	4,48	4,48	0,18	0,90
<b>3-12</b>	6,16	6,16	6,16	n.a.	0,15	0,60
<b>3-15</b>	7,02	7,02	7,02	7,02	3,52	3,52
<b>3-18</b>	6,32	6,32	6,32	n.a.	6,32	3,16
<b>C8</b>	3,46	3,46	3,46	3,46	0,69	1,73

<sup>a</sup>n.a.- nema aktivnosti u datim uslovima; <sup>b</sup>Gram negativna bakterija; <sup>c</sup>Gram pozitivna bakterija; <sup>d</sup>gljive.

Uopšteno, ispitivana jedinjenja su pokazala veći potencijal za inhibiciju rasta gljivica nego bakterijskih sojeva (*Tabela 6*). Posebno, sve halogene kiseline (**3-6**, **3-9** i **3-12**) su pokazale značajniju antigljivičnu aktivnost protiv *C. albicans* i *M. gypseum* (*Tabela 6*). MIC vrednosti za planktonskih rast gljivica određivani su u standardnom Saborough-dekstroznom medijumu. Jedinjenje **3-12** je inhibiralo rast gljiva u koncentracijama deset puta nižim od polazne (*R*)-3-hidroksioktanske kiseline (**3-3**) i približno pet puta nižim u odnosu na oktansku kiselinu (**C8**). Derivati **3-6** i **3-9** su pokazali sedam puta i devet puta niže MIC vrednosti u odnosu na derivat **3-3**.

Pored toga, derivati **3-6**, **3-9**, **3-12** i oktanska kiselina (**C8**), pri sub-MIC (75% MIC vrednosti utvrđenoj za planktonskih rast) koncentracijama pokazali su kompletnu inhibiciju rasta filamenata kod *C. albicans* na medijumu koji obično pospešuje njihovo formiranje (formiranje i filamentaciju hifa) na takozvanom Spider-medijumu (*Slika 16*).



*Slika 16.* Rast *C. albicans* na Spider medijumu u prisustvu derivata: a) DMSO kontrola ; b) oktanska kiselina (**C8**); c) **3-3**; d) **3-6**; e) **3-9**; f) **3-12**; g) **3-15**; i h) **3-18**.



(*R*)-3-Hidroksioktanska kiselina (**3-3**) je smanjila formiranje hifa u manjem obimu u odnosu na oktansku kiselinu, dok su jedinjenja **3-15** i **3-18** imala pozitivan efekat na formiranje hifa pri testiranim koncentracijama. Ovaj prelaz iz kvasca u formu kada rastu filamentni, hife, važan je za invaziju tkiva i formiranje biofilmova kod *Candida spp.*, tj. njihovu virulenciju i patogenost, pa su molekuli koji ometaju ovaj proces veoma traženi kao potencijalne agensi za tretman infekcija.<sup>188</sup>

Poređenjem rezultata dobijenih aktivnosti evidentno je da je slobodna karboksilna grupa esencijalna za antimikrobnu aktivnost. Ovo je u saglasnosti sa istraživanjima Kabare i saradnika koji su pokazali da je slobodna karboksilna grupa neophodna za aktivnost laurinske kiseline.<sup>189</sup> Nije bilo razlike u aktivnosti između metil- i benzil- estara uprkos značajnoj razlici u strukturi i voluminoznosti supstituenata.

Pretpostavlja se da je glavna meta aktivnosti slobodnih masnih kiselina ćelijska membrana.<sup>93</sup> Neki od štetnih efekata koje imaju masne kiseline na bakterijske ćelije mogu da se povežu sa njihovim detergentskim osobinama i amfipatičnom strukturom. One mogu da interaguju sa ćelijskom membranom i da stvaraju prolazne ili stalne pore u njenoj strukturi. Pri višim koncentracijama detergentski poput masnih kiselina mogu da rastvore ćelijsku membranu i da dovedu do otpuštanja ćelijskog sadržaja i smrti ćelije. Masne kiseline mogu da ometaju i transport elektrona i oksidativnu fosforilaciju. Pored uticaja na produkciju energije kod ćelija, slobodne masne kiseline mogu da inhibiraju druge metaboličke enzimske aktivnosti, da spreče uzimanje nutrijenata i da budu uključeni u generisanje peroksidnih i autooksidativnih proizvoda degradacije koji direktno liziraju bakterijske ćelije.<sup>93, 159</sup> Masne kiseline mogu da ubiju bakterijsku ćeliju (baktericidno dejstvo) ili da inhibiraju njihov rast (bakteriostatičko dejstvo) što je reverzibilan proces i znači da bakterija nastavlja da živi ali ne može da vrši deobu zbog prisustva masnih kiselina.<sup>190, 191</sup>

Masne kiseline direktno interaguju sa ćelijskom membranom gljiva, vrše inserciju u lipidni dvosloj i fizički destabilizuju membranu.<sup>192</sup> Ovo dovodi do povećanja propustljivosti membrane, konformacionih promena kod membranskih proteina, otpuštanja intracelularnih komponenti, remećenja citoplazme i na kraju do njenog raspada.





Nije uočena razlika u aktivnosti kada je korišćena racemska smesa, *R*- ili *S*-enantiomer 3-hidroksioktanske kiseline (rezultati nisu prikazani). Ovo je u blagom neslaganju sa prethodnim studijama Ruth i saradnika koji su utvrdili da komercijalno dostupna racemska 3-hidroksioktanska kiselina ima malo nižu aktivnost u poređenju sa čistim *R*-enantiomerom prema različitim sojevima *Listeria monocitogenes*.<sup>84</sup> Sa druge strane, u istom istraživanju nije uočena aktivnost oktanske kiseline, što je u neslaganju sa našim rezultatima kao i sa drugim publikacijama gde je antibakterijska aktivnost masnih kiselina, uključujući oktansku kiselinu, značajna.<sup>193, 194</sup>

Prethodno su (*R*)-3-hidroksioktanska kiselina, (*R*)-3-hidroksi-8-nonenska kiselina, i (*R*)-3-hidroksi-10-undecenska kiselina pokazale inhibitornu aktivnost na rast sojeva *Listeria* i *S. aureus* sa MIC vrednostima od 1 do 5 mM dok (*R*)-3-hidroksifenilalkanoati inhibiraju rast istih sojeva sa MIC vrednostima od 3 do 6 mM.<sup>84, 195</sup> Prema ranijim istraživanjima, smesa 3-hidrokialkanskih kiselina pokazuje aktivnost prema sojevima *Escherichia coli*, *Listeria monocitogenes* i *Salmonella typhimurium* sa MIC vrednostima između 12,5 do 25 mg/ml,<sup>196</sup> što je mnogo viša vrednost MIC-a u poređenju na one do kojih smo mi došli u našem istraživanju za individualna 3-supstituisana jedinjenja (Tabela 6).

Uvođenje *trans* dvostruke veze (**3-15**) dovelo je do smanjenja antifungalne aktivnosti oko dva puta u poređenju sa 3-hidroksioktanskom kiselinom. Ovo je u skladu sa prethodnim istraživanjima koja su pokazala da je geometrija dvostruke veze veoma važna za aktivnost nezasićenih masnih kiselina. Uvođenje *cis* dvostruke veze povećava aktivnost svih testiranih masnih kiselina (C14, C16 i C18) dok *trans* izomer nema aktivnost.<sup>189</sup>

### 3.2.2 Moduliranje bakterijske međucelijske komunikacije (QS)

Modulacija međucelijske komunikacija privlači sve više pažnje istraživača kao meta za delovanje novih antimikrobnih agenasa (Sekcija 2.5.1.a). Da bi neko jedinjenje moglo da bude kandidat za modulatora međubakterijske komunikacije ne bi trebalo da pokazuje značajnije antibakterijsko dejstvo prema ispitivanom soju. S obzirom da sva





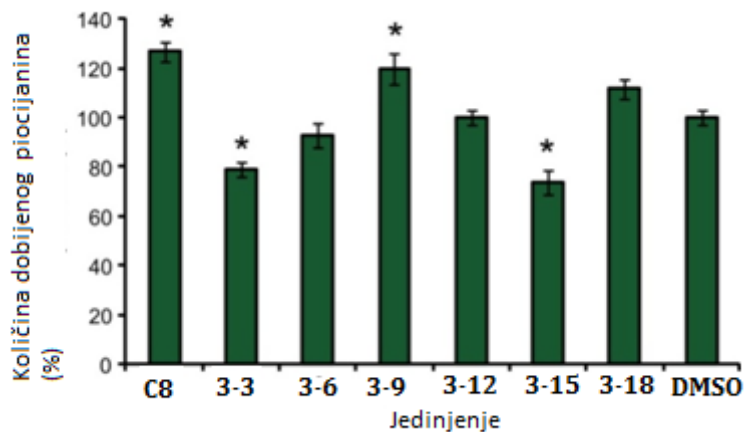
testirana jedinjenja u našem radu nisu pokazala visoku antibakterijsku aktivnost, a najmanju ka soju *P. aeruginosa* PAO1, odlučili smo da testiramo njihov potencijal da utiču na bakterijsku međućelijsku komunikaciju koja kontroliše virulentnost u mnogim patogenim bakterijskim sojevima.

Malo se zna o uticaju oktanske kiseline i sličnih masnih kiselina na međubakterijsku komunikaciju soja *P. aeruginosa* PAO1, koji se vrlo često koristi kao model organizam za ispitivanje QS sistema, jer kod ovog soja postoje tri nezavisna komunikaciona sistema koja su dobro proučena. *P. aeruginosa* PAO1 poseduje dva N-acil-L-homoserin lakton zavisna komunikaciona sistema i jedan hinolni.

Do sada je pokazano da *cis*-2-dodekanska kiselina može da modulira virulentnost soja *P. aeruginosa* PAO1.<sup>197</sup> Masne kiseline dužih lanaca kao što su linolna, oleinska i palmitinska, inhibiraju međubakterijsku komunikaciju kod *Vibrio harveyi* BB170 soja pa mogu naći primenu u kontroli patogenih koji dolaze iz hrane i da smanje mikrobna kvarenja hrane.<sup>198</sup>

Piocijanin je plavo-zeleni sekundarni metabolit bakterijskog soja *Pseudomonas aeruginosa* koji učestvuje u međubakterijskoj komunikaciji i jedan je od faktora koji utiče na virulentnost ovog soja.<sup>199, 200</sup> Rezultati našeg ispitivanja su pokazali da čak i u malim koncentracijama, kao što je 0,06 mM (između 5 i 10 µg/mL), jedinjenja **3-3** i **3-15** značajno inhibiraju proizvodnju piocijanina u soju *P. aeruginosa* PAO1, dok **3-9** i **C8** stimulišu proizvodnju piocijanina kod istog soja (Slika 17). Ovo je izuzetno značajno, jer ova jedinjenja nisu pokazala nikakav uticaj na rast *P. aeruginosa* PAO1 (Sekcija 2.5.1.a), te ukoliko smanjuju virulentnost, značajno se smanjuje mogućnost njihovog selektivnog pritiska, tj. mogućnost stvaranja rezistencije na ova jedinjenja.





Slika 17. Proizvodnja piocijanina kod *P. aeruginosa* PAO1 soja kao odgovor na prisustvo sintetisanih karboksilnih kiselina iz ovog rada. Zvezdice označavaju statistički značajne rezultate ( $p < 0,05$ ).

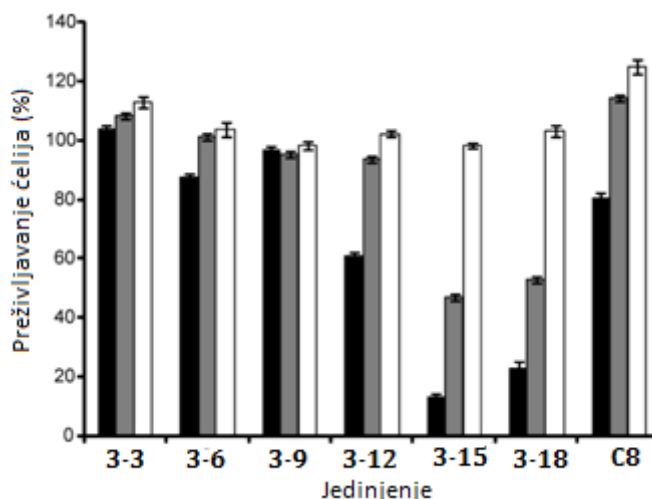
Derivati **3-3** i **3-15** su pokazali značajnu inhibiciju proizvodnje piocijanina (Slika 17) pa bi mogla dalje da se ispita njihova sposobnost prekidanja međucelijske komunikacije. Sa druge strane, napravljena je važna veza između proizvodnje piocijanina kod *P. aeruginosa* soja i njegovog uticaja na morfologiju *Candida sp.* u pomešanim infekcijama. U visokim koncentracijama, piocijanin i njegovi metaboliti su dobri fungicidi, dok u subinhibitornoj koncentraciji inhibiraju rast filamenata kod gljiva prilikom formiranja biofilma.<sup>201, 202</sup> Uzeći sve u obzir, jedinjenje **3-9** kao i oktanska kiselina mogu biti dobri kandidati za razvoj leka kod pomešanih *Pseudomonas - Candida* infekcija (Tabela 4, Slika 16).

### 3.2.3 In-vitro antiproliferativna aktivnost

Citotoksičnost sintetisanih kiselina **3-3**, **3-6**, **3-9**, **3-12**, **3-15**, **3-18** i **C8** koje su pokazale antimikrobnu aktivnost ispitana je određivanjem antiproliferativne aktivnosti na humanim fibroblastima (MRC5) u koncentracijama između 0,5 - 9 mM (Slika 18). Ovo je veoma bitno, jer ukazuje na indeks selektivnosti, i određuje mogućnost primene bioaktivnih jedinjenja u medicini.



Nije uočena antiproliferativna aktivnost prema humanim fibroblastima nakon 48 h tretmana svakog od jedinjenja u koncentraciji od 1,5 mM (*Slika 18*). Jedinjenja **3-3**, **3-6** i **3-9** ne pokazuju citotoksičnost ni pri koncentracijama 1,5 mM, 3 mM kao ni 9 mM (rezultati nisu prikazani). Derivati **3-15** i **3-18** izazivaju oko 50% inhibicije ćelijske proliferacije u koncentraciji od 1,5 mM dok jedinjenje **3-12** je pokazalo toksičnost već pri koncentraciji od 3 mM inhibirajući proliferaciju 40% humanih fibroblasta.



*Slika 18.* Antiproliferativna aktivnost derivata prema humanim fibroblastima

MRC5; ■ 3mM, ■ 1,5mM i □ 0,3 mM;

Niska citotoksičnost polazne (*R*)-3-hidroksioktanske kiseline (**3-3**) je u skladu sa prethodnim istraživanjima gde je  $IC_{50}$  vrednost (*R*)-3-hidroksidekanske kiseline kao i dekanske kiseline (**C10**) prema nekoliko ćelijskih linija određivana i iznosila je oko 3 mM (500  $\mu$ g/mL).<sup>203</sup>

Vrednosti minimalne inhibitorne koncentracije za jedinjenja **3-6**, **3-9** i **3-12** su između 0,15 i 0,22 mM za *C. albicans* ATCC10231 (*Tabela 6*) što je za red veličine niže od koncentracije na kojoj jedinjenja **3-6** i **3-9** ne pokazuju citotoksičnost prema humanim fibroblastima, dok je derivat **3-12** blago citotoksičan (*Slika 18*), što je pozitivan rezultat za dalji razvoj ovih jedinjenja kao antifungalnih agenasa. U literaturi nije poznato da je ispitivana citotoksičnost čistih masnih kiselina.<sup>93</sup> U našim istraživanjima je prvi put određena antiproliferativna aktivnost oktanske kiseline.

### 3.2.4 Konjugacija (*R*)-3-hidroksialkanskih kiselina i DP18L peptida

Istraživanja su pokazala da konjugacija masnih kiselina i peptida dovodi do povećanja njihove antimikrobne i antikancerske aktivnosti (Sekcija 2.5.4).<sup>146</sup>

Pokazano je da antiproliferativna aktivnost katjenskog D-peptida DP18L značajno povećana konjugacijom sa (*R*)-3-hidroksidekanskom kiselinom iz bakterijskog polimera PHA, i da nastali konjugovani peptid ima jače dejstvo prema ćelijama raka nego prema fibroblastima i humanim ćelijama endotela vena iz pupčane vrpce (*eng.* HUVEC).<sup>203</sup> Ova promena se dešava zbog lakšeg ulaska acilovanog peptida u ćeliju raka.

U našem istraživanju su korišćene ćelije kancera pankreasa (*eng.* MiaPaCa) zbog ograničenog broja terapeutika koju su dostupni za ovo oboljenje kao i zbog dobre aktivnosti koja je prethodnostignuta konjugacijom (*R*)-3-hidroksidekanske kiseline i peptida prema MiaPaCa ćelijama.<sup>203</sup> Ispitivan je uticaj konjugacije (*R*)-3-hidroksialkanskim kiselinama različite dužine lanca na antikancersku aktivnost sintetisanog peptida DP18L.<sup>c</sup>

Sedam (*R*)-3-hidroksialkanskih kiselina dobijeno je depolimerizacijom biotehnoški dobijenog biopolimera PHA iz *Pseudomonas putida* KT2440 soja prema literaturno opisanoj proceduri za fermentaciju, depolimerizaciju i prečišćavanje kiselina.<sup>61, 203</sup> Sve kiseline su okarakterisane i utvrđena je njihova čistoća (MS, NMR). Dobijene su (*R*)-3-hidroksiheksanska kiselina (**R6**), (*R*)-3-hidroksiheptanska kiselina (**R7**), (*R*)-3-hidroksioktanska kiselina (**R8**) u obliku žutog ulja, (*R*)-3-hidroksinonanska kiselina (**R9**), (*R*)-3-hidroksidekanska kiselina (**R10**), (*R*)-3-hidroksiundekanska kiselina (**R11**) i (*R*)-3-hidroksidodekanska kiselina (**R12**) u obliku bledo-žutog praha.

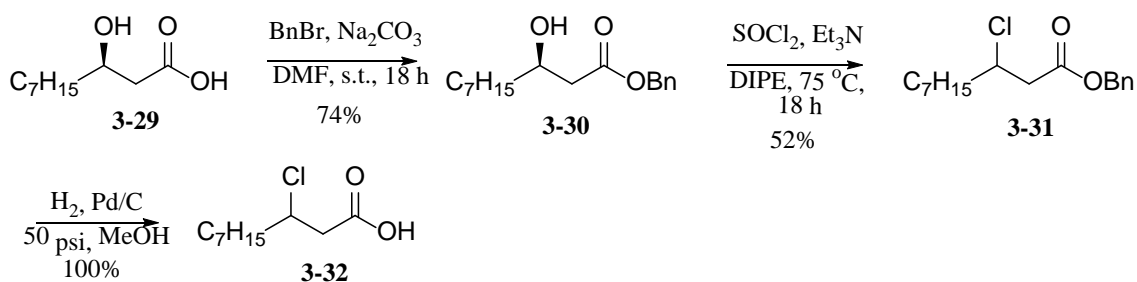
Peptid i ispitivane kiseline su konjugovani preko amidne veze izgrađene od karboksilne grupe kiseline i N-terminalne amino grupe peptida prema literaturnom postupku.<sup>204</sup> Merenjem molekulske mase pomoću MALDI-TOF-MS potvrđeno je da su nastali očekivani konjugati. (*Tabela B u Prilogu*)

<sup>c</sup> Sinteza peptide DP18L i konjugacija sa kiselinama je urađena na Univerzitetkom koledžu u Dablinu (UCD), u laboratoriji prof. Kevin O'Connor-a.



Ispitivan je efekat rastućeg broja C-atoma u bočnom lancu kiselina na aktivnost konjugata prema MiaPaCa ćelijama. Nekonjugovani peptid DP18L ima IC<sub>50</sub> vrednost 12,7 μM prema MiaPaCa ćelijama. Antiproliferativna aktivnost konjugata je rasla sa porastom dužine lanca konjugovanih kiselina od R6 do R10, i bila nešto niža za R11 i R12. IC<sub>50</sub> vrednosti prema MiaPaCa ćelijama su bile u opsegu od 2,0 – 6,7 μM. Najbolju aktivnost je pokazao konjugat R10-DP18L, sa IC<sub>50</sub> vrednošću 2 μM.

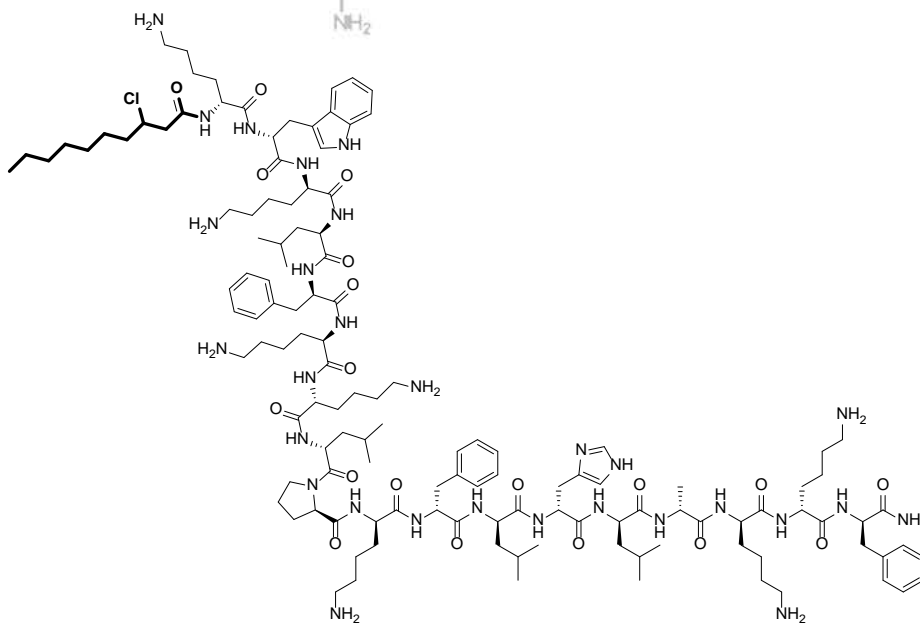
U našem istraživanju smo sintetisali 3-hlordekansku kiselinu **3-32** polazeći od (*R*)-3-hidroksidekanske kiseline **3-29** iz PHA prema ranije opisanoj proceduri za sintezu 3-hloroktanske kiseline (**3-6**) (*Shema 30*).<sup>165</sup> Sintetisana 3-hlordekanska kiselina je takođe konjugovana sa DP18L peptidom u cilju poboljšanja antiproliferativne aktivnosti prema ćelijama raka (*Shema 31*).



### *Shema 30.* Sinteza 3-hlordekanske kiseline

Sve transformacije polazne **3-29** su urađene prema reakcijama koje su prethodno korišćene u funkcionalizaciji (*R*)-3-hidroksioktanske kiseline (**3-3**) (*Shema 30*). Primećeno je da manje sporednih proizvoda nastaje i da su veći prinosi u reakcijama (*R*)-3-hidroksidekanske kiseline. Tako je u reakciji hlorovanja oktanoata prinos 46% dok prema istom postupku sa **3-29** nastaje 52% proizvoda koji takođe racemizuje. Pretpostavlja se da je većim udelom ugljenika u strukturi smanjena i reaktivnost u pogledu sporednih reakcija. Dva ugljenikova atoma više u hidrofobnom lancu polazne kiseline imaju veći uticaj na reaktivnost od očekivanog.





3-33

*Shema 31.* DP18L peptid konjugovan sa **3-32** kiselinom

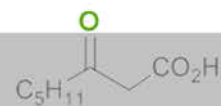
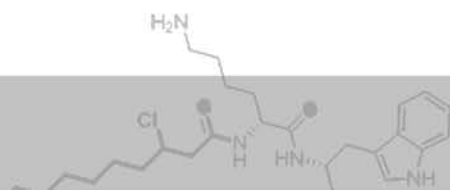
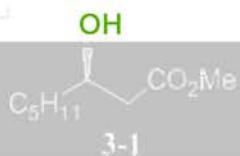
Kako je atom kiseonika nešto elektronegativniji od atoma hlora (3,44 prema 3,16 po Paulijevoj skali), očekivali smo da će manja polarnost C-Cl veze u poređenju sa C-O vezom, potencijalno imati pozitivan efekat na antikancersku aktivnost peptida u poređenju sa konjugatom **3-29** i peptida. Takođe očekivano je da će boljoj aktivnosti da doprinese i veći afinitet hlora lekova ka vezivanju za metu leka, zbog građenja halogenih veza.<sup>142</sup>

Sama 3-hlordekokanska kiseline ima  $IC_{50}$  vrednost  $950 \mu M$  prema MiaPaCa ćelijama što je 2,2 puta niže od aktivnosti 3-hidroksidekokanske kiseline koja ima  $IC_{50}$  vrednost  $2150 \mu M$  (*Tabela C* u **Prilogu**). Konjugacija 3-hlordekokanske kiseline (**3-32**) na DP18L peptid rezultovala je  $IC_{50}$  vrednošću od  $3,5 \mu M$  prema MiaPaCa ćelijama što je 1,8 puta viša vrednost nego konjugat peptida i R10.

Iz ovoga proizilazi da je razlika u polarnosti C-Cl i C-O veze previše mala da bi uticala na ukupnu hidrofobnost konjugata. Vezivanju hlora derivata za peptid poboljšali smo aktivnost samog peptida ali ne više od monomera PHA, 3-hidroksidekokanske kiseline. Konjugacija drugih derivata 3-hidroksialkanskis kiseline iz bakterijskog



polimera PHA, dobijenih sintetičkim metodama pruža nove mogućnosti za dalja istraživanja i generisanje novih biosintetičkih jedinjenja.





## 4. Eksperimentalni deo

U eksperimentalnom radu korišćeni su reagensi i rastvarači koji su prethodno prečišćeni standardnim tehnikama prečišćavanja.<sup>205</sup>

Tok reakcija praćen je tankoslojnom hromatografijom (TLC), na pločicama 0,25 mm E. Merck (60F-254) i 18-34, 60 Å, ICN Silica TLC). Za vizualizaciju mrlja su korišćeni UV-svetlo, rastvor cerijum-amonijum-molibdata (CAM), rastvor *p*-anisaldehida (PAA) kao i 50% rastvor sulfatne kiseline uz naknadno zagrevanje pločice.

Hromatografska prečišćavanja su urađena primenom gravitacione hromatografije (silika-gel 0,062-0,2 mm, ICN) i vakuum-hromatografije (silika-gel 10-18, 60 Å, ICN Biomedicals).

NMR spektri su snimljeni na aparatima Varian Gemini 200 (<sup>1</sup>H NMR na 200 MHz, <sup>13</sup>C NMR na 50 MHz) i Bruker Advance III 500 (<sup>1</sup>H NMR na 500 MHz, <sup>13</sup>C na 125 MHz).

Hemijska pomeranja su izražena u ppm ( $\delta$ ), koristeći tetrametilsilan (TMS) kao interni standard, dok su konstante spreznjanja (*J*) izražene u hercima (Hz).

IR spektri su snimljeni na aparatu Nicolet 6700 F. Frekvencije su izražene u  $\text{cm}^{-1}$ .

Maseni spektri visokog razlaganja (HRMS) su dobijeni na aparatu Agilent technologies 6210 TOF LC/MS instrument (LC: series 1200).

Gasno-hromatografske analize rađene su na instrumentu Agilent Technologies 7890A GC System; kolona J&W Scientific HP-5MSI, 30 m, 0,25 mm i. d., 0,25  $\mu\text{m}$  film; noseći gas vodonik, 1 mL/min, mereno na 210 °C.

Optičke rotacije određivane su na aparatu Rudolph Research Analytical AUTOPOL IV Automatic Polarimeter.

Tačke topljenja čvrstih supstanci određene su na aparatima Electrothermal i Kofler hotstage i nisu korigovane.



Za potrebe bioloških testova korišćen je UV-VIS spektrofotometar „Ultrospec 3300pro“, proizvođača Amersham Biosciences, Piscataway, NJ, USA; kao i spektrofotometar za čitanje apsorbanci ploča sa 96 bunara Tekan Infinite 200 Pro multiplate reader (Tecan Group, Männedorf, Switzerland).

Vizualizacija je rađena mikroskopom (CKX4, Olympus, Tokyo, Japan).

## 4.1 Sinteza derivata (R)-3-hidroksioktanske kiseline

### 4.1.1 Dobijanje poli(hidroksialkanoata)

Bakterijski polimer poli(hidroksialkanoat) dobijen je na Univerzitetkom koledžu u Dublinu (UCD), Republika Irska, u laboratoriji profesora Kevin O'Connor-a.

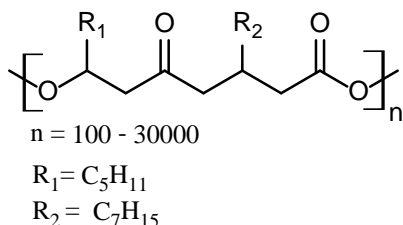
Fermentaciona podloga sa ograničenom količinom azota i minimalnim količinama soli je korišćena za rast bakterija kako bi proizvodile PHA.<sup>206</sup> Bakterijski soj *Pseudomonas putida* GPO1 je gajen u nespecifičnim uslovima, na medijumu u kome je jedini izvor ugljenika bio natrijum-oktanoat i sa ograničenim količinama azota (natrijum-oktanoat 20 mM, amonijum-hlorid 2,8 mM). Nakon 48 h kultura je centrifugirana na protočnoj centrifugi (Heraeus Contifuge Statos, Thermo Fisher Scientific, Nemačka) na 4 °C i 25,040 x g u titanijumskom rotoru (HCT 22.300, Thermo Fisher Scientific, Nemačka). Dobijene ćelijske kuglice su prvo zamrznute na -20 °C u toku 2-3 h, zatim prebačene u drugi zamrzivač na -80 °C preko noći, i liofilizirane u sušnici (Labconco, USA). PHA polimer je ekstrahovan iz suvih ćelija acetonom na sobnoj temperaturi tokom 24 h.<sup>160</sup> U balonu od 1 L, 50 g ćelija je suspendovano u 500 mL acetona i ostavljeno da se meša 24 h. Talog je odvojen filtriranjem a acetonski rastvor uparen, pri čemu zaostaje talog polimera. Polimer je pretaložen korišćenjem 20 zapremina etanola, ponovo rastvoren u acetonu i izliven u staklene petri šolje kako bi se osušio za dalje analize. Dobijen je polimer PHA 99% čistoće.<sup>160</sup>

Da bi dobili 3-hidroksialkanske kiseline različite dužine lanca potrebnih za istraživanje, *Pseudomonas putida* KT2440 soj je gajen na podlozi u kojoj su izvor ugljenika bile masne kiseline, od heksanske do dodekanske, u fermentoru zapremine 5 L



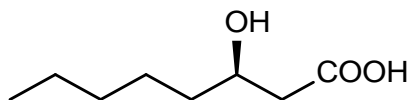
pod uslovima za akumulaciju PHA.<sup>207</sup> Postupak dobijanja je identičan sa postupkom koji smo već opisali.

#### 4.1.2 Depolimerizacija PHA (3-1)



U balonu od 100 mL napravi se rastvor poli(hidroksialkanoata) (2,6 g) u hloroformu (40 mL) u koji se doda smeša metanola i konc.  $H_2SO_4$  (40 mL, 15%, v/v). Reakciona smeša se zagreje na 100 °C i ostavi da se meša na toj temperaturi tokom 46 h. Nakon toga se ohladi do sobne temperature i reakcija se prekida dodatkom zasićenog rastvora NaCl-a (10 mL). U levku za odvajanje odvojimo organsku i vodenu fazu, vodenu fazu ekstrahujemo hloroformom (3 x 20 mL). Spojene organske faze sušimo iznad anh.  $MgSO_4$  i uparimo rastvarač pod sniženim pritiskom. Sirovi proizvod je prečišćen vakuum hromatografijom na koloni  $SiO_2$  (petrol-etar/etil-acetat= 9/1). Dobijeno je 2,7 g (95%) čistog metil-3-hidroksioktanoata.  $[\alpha]_D = -28$  (c 1,  $CHCl_3$ );  $ee >99\%$ ;  $^1H$  NMR (200 MHz,  $CDCl_3$ ):  $\delta$  4,15 – 3,89 (m, 1H), 3,72 (s, 3H), 2,90 (d,  $J = 4,0$  Hz, 1H), 2,58-2,34 (m, 2H), 1,71-1,30 (m, 8H), 0,89 (t,  $J = 6,3$  Hz, 3H).  $^{13}C$  NMR (50 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$  173,5; 67,9; 51,7; 41,1; 36,4; 31,6; 25,1; 22,5; 13,9. IR (ATR): 3457; 2958; 2933; 2865; 1741; 1441; 1171.

#### 4.1.3 Dobijanje 3-hidroksioktanske kiseline (3-3)



U rastvor metil 3-hidroksioktanoata (90 mg, 0,516 mmol) u THF-u (2,7 mL) i metanolu (1,8 mL), dodat je vodeni rastvor LiOH 2,5 M (0,9 mL). Reakciona smesa je ostavljena da se meša 24 h na sobnoj temperature. Nakon 24 h pH je podešen na 2

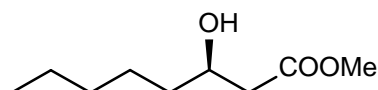


pomoću 1 M rastvora HCl. Nastali rastvor je ispran tri puta etil-acetatom (10 mL x 3), spojeni organski slojevi su isprani zasićenim rastvorom NaCl i sušeni iznad anh. MgSO<sub>4</sub>. Nakon uklanjanja rastvarača pod sniženim pritiskom dobijen je proizvod u obliku bezbojnog ulja (79 mg, 96%). [ $\alpha$ ]<sub>D</sub> = -20 (c 1, CHCl<sub>3</sub>); ee 99%; <sup>1</sup>H NMR (200 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  5,57 (bs, 2H), 4,04 (m, 1H), 2,73 – 2,27 (m, 2H), 1,75 – 1,11 (m, 8H), 0,89 (t, *J* = 6,3 Hz, 3H). <sup>13</sup>C NMR (200 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  177,6; 68,1; 41,0; 36,4; 31,6; 25,1; 22,5; 13,9. IR (ATR): 3396; 2931; 2956; 2862; 1714; 1411; 1174.

#### 4.1.4 Prečišćavanje (*R*)-3-hidroksioktanske kiseline kiselinsko-baznom ekstrakcijom

Sirova 3-hidroksioktanska kiselina (250 mg, 1,56 mmol, 1 ekv.) dobijena depolimerizacijom poli(hidroksialkanoata) suspendovana je u 5 mL vode i dodato je 135 mg (1,5 ekv) kalijum-hidroksida. Nastala smeša je ostavljena da se meša na sobnoj temperaturi tokom 2 h pri čemu se nagradi so kiseline koja je rastvorna u vodi. Zatim je urađena ekstrakcija dietil-etrom (3 x 10 mL) kako bi se uklonile nečistoće. Vodena faza je zakišeljena do pH 1 dodatkom razblaženog rastvora hlorovodonične kiseline, nakon toga je smesa ekstrahovana metilen-hloridom (3 x 10 mL). Spojene organske faze su osušeni iznad anh. MgSO<sub>4</sub> i rastvarač je uklonjen pod sniženim pritiskom. Dobijeno je 170 mg (68%) (*R*)-3-hidroksioktanske kiseline koja je korišćena kao polazni supstrat za dalju funkcionalizaciju.

#### 4.1.5 Sinteza metil-3-hidroksioktanoata (3-1)

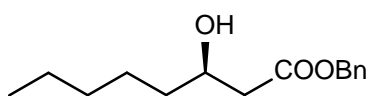


U balonu od 50 mL napravljen je rastvor 3-hidroksioktanske kiseline (500 mg, 3,12 mmol) u metanolu (20 mL), dodata je sumporna kiselina (1 mL, 18,8 mmol) i smesa je ostavljena da se meša na sobnoj temperaturi. Nakon 3 h rastvarač je uparen pod sniženim pritiskom, ostatak u balonu je rastvoren u metilen-hloridu i ispran



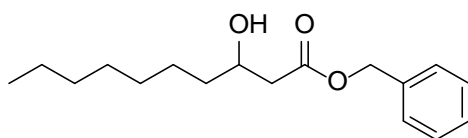
zasićenim vodenim rastvorom  $\text{NaHCO}_3$ , zatim sa zasićenim rastvorom  $\text{NaCl}$ , i sušen iznad anhidrovanog  $\text{MgSO}_4$ . Rastvarač je uklonjen pod sniženim pritiskom, sirovi proizvod je prečišćen vakuum hromatografijom na koloni (hloroform/etil-acetat=9/1 do 8/2). Dobijeno je 320 mg (60%) čistog proizvoda u obliku bezbojnog ulja.<sup>d</sup> (Spektar je prikazan u Sekciji 4.1.1)

#### 4.1.6 Sinteza benzil-3-hidroksioktanoata (3-2)



U rastvor 3-hidroksioktanske kiseline (312 mg, 1,25 mmol) i  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  (397,5 mg, 3,75 mmol) u dimetil-formamidu (2 mL), dodat je benzil-bromid u kapima (240 mg, 1,4 mmol). Nastala smesa je ostavljena da se meša na sobnoj temperaturi 24 h a tok reakcije je praćen tankoslojnom hromatografijom. Reakcija je prekinuta dodatkom vode, vodeni sloj ekstrahovan tri puta dietil-etrom, a zatim su spojeni organski slojevi isprani zasićenim vodenim rastvorom  $\text{NaCl}$ -a i osušeni iznad anh.  $\text{MgSO}_4$ . Nakon uklanjanja rastvarača pod sniženim pritiskom, sirovi proizvod je prečišćen vakuum hromatografijom na koloni  $\text{SiO}_2$  (hloroform/ etil acetat= 9/1), dobijeno je 188mg (60%) žutog ulja.  $[\alpha]_D = -20$  (c 1,  $\text{CHCl}_3$ ); *ee* 75%;  $^1\text{H NMR}$  (200 Hz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  7,36 (s, 5H), 5,15 (s, 2H), 4,12 – 3,92 (m, 1H), 2,87 (d,  $J = 4,1$  Hz, 1H), 2,66 – 2,34 (m, 2H), 1,70 – 1,23 (m, 8H), 0,88 (t,  $J = 6,4$  Hz, 3H).  $^{13}\text{C NMR}$  (50 Hz,  $\text{CDCl}_3$ ): 172,9; 135,6; 128,6; 128,4; 128,3; 68,0; 66,4; 41,3; 36,4; 31,6; 25,1; 22,5; 13,9. IR (ATR): 3448; 2957; 2932; 2860; 1737; 1459; 1168.

#### 4.1.7 Sinteza benzil-3-hidroksidekanoata (3-28)



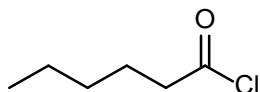
<sup>d</sup> Spektralna karakterizacija nije navođenja za jedinjenja koja imaju identične strukture sa prethodno opisanim jedinjenjima.



Prinos 220 mg (74%), žuto ulje.  $^1\text{H NMR}$  (200 Hz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  7,35 (s, 5H), 5,15 (s, 2H), 4,12 – 3,92 (dq,  $J_1=11,6$  Hz,  $J_2=4,0$  Hz, 1H), 2,74 – 2,33 (m, 3H), 1,73 – 1,07 (m, 12H), 0,87 (t,  $J=6,4$  Hz, 3H).  $^{13}\text{C NMR}$  (50 Hz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  172,9; 135,6; 128,6; 128,3; 128,2; 67,9; 66,4; 41,3; 36,4; 31,7; 29,4; 29,1; 25,4; 22,6; 14,0. **IR (ATR)**: 3467; 2929; 1735; 1458; 1170. **HRMS (ESI)**: izračunato za  $\text{C}_{17}\text{H}_{26}\text{O}_3$  (2M-H) $^-$  411,20744, nađeno 411,20767.

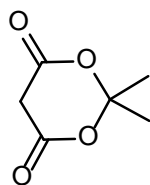
#### 4.1.8. Sinteza prekursora za hemijsku sintezu derivata 3-HA

##### Heksanoil – hlorid (3-24)



U balonu od 50 mL dodata je heksanska kiselina (10 g, 89 mmol), katalitička količina DMF-a i tokom 30 min je ukapavano 8 mL (13,3 g, 111,8 mmol) tionil-hlorida na 100 °C, uz mešanje. Reakciona smeša je zagrevana da refluktuje tokom 5 h. U ohlađenu smesu je dodat benzen (5 mL) i smeša je uparena pod sniženim pritiskom, ovaj postupak je ponovljen tri puta kako bismo uklonili višak tionil-hlorida. Proizvod je prečišćen destilacijom pod sniženim pritiskom (20 mmHg, 50 °C), dobijeno je 5,4 g (50%) heksanoil-hlorida.  $^1\text{H NMR}$  (200 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ): 2,88 (t,  $J=7,3$  Hz, 2H), 1,77-1,68 (m, 2H), 1,38-1,30 (m, 4H), 0,91 (t,  $J=7,1$  Hz, 3H).

##### Meldrumna kislina (3-25)



U balonu od 100 mL odmeri se 13 g malonske kiseline i 15 mL anhidrida sirćetne kiseline. Dobijena suspenzija se ohladi u ledenom kupatilu i uz mešanje se doda 0,4 mL konc.  $\text{H}_2\text{SO}_4$ . Dobijeni rastvor se zagreje do 15 °C a zatim doda 10 mL acetona

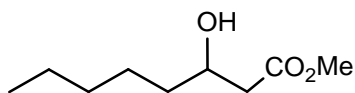




iz kapalice. Reakciona smeša se meša još 15 min na sobnoj temperaturi a zatim ostavi u zamrzivaču 14 h. Kristali se isperu na Bihnerovom levku ledenom 0,5 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> a potom hladnom vodom. Sirovi proizvod se prekrstališe iz smeše aceton/dietil-etar a zatim se taloži petrol-etrom. Dobijeno je 7,2 g (40%) proizvoda. <sup>1</sup>H NMR (200 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 3,61 (s, 2H), 1,77 (s, 6H).

**Aktivacija cinka:** U erlenmajer, opremljenom staklenim zapašaćem i magnetnom mešalicom, odmereno je 25 g cinka u prahu i dodato je 50 mL 5% rastvora hlorovodonične kiseline. Smeša je intenzivno mešana u toku 3 h na sobnoj temperaturi. Po isteku tog perioda, kiselina je odekantovana, a zatim je metal ispiran destilovanom vodom (tri puta po 50 mL), acetonom (dva puta po 30 mL) i na kraju dietil-etrom (dva puta po 30 mL). Metal je zatim sušen pod sniženim pritiskom u toku 30 min. Aktivirani cink je čuvan u eksikatoru, u atmosferi argona.

#### 4.1.9 Sinteza metil-3-hidroksioktanoata (3-1)

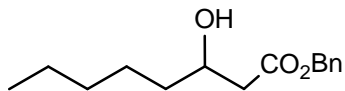


Suspencija aktiviranog cinka u prahu (2,28 g, 35 mmol) u 10 mL anhidrovanog benzena grejana je do refluktovanja tokom 10 min (80 °C) u atmosferi argona. Ukupavanjem je polako dodata smeša *n*-heksanala (4 mL, 33 mmol) i metilbromoacetata (5,54 mL, 35 mmol) u 60 mL benzena tokom 1 h. Reakcija je ostavljena da se meša još 1 h nakon završenog ukupavanja i praćena je tankoslojnom hromatografijom. Nakon završetka reakcije, smeša je ohlađena na 0 °C i dodata je 1 M HCl (2 mL) a zatim je urađena ekstrakcija dietil-etrom (3 x 40 mL). Spojene organske faze su osušene iznad anh. MgSO<sub>4</sub> i rastvarač je uparen pod sniženim pritiskom. Sirovi proizvod je prečišćen vakuum hromatografijom u gradijentu na stubu SiO<sub>2</sub> (petrol-etar/etil-acetat= 9/1 do 8/2). Dobijen je proizvod (6,4 g) u prinosu od 80% u obliku bezbojnog ulja. (Spektar je prikazan u Sekciji 4.1.1)



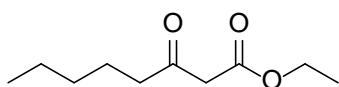


#### 4.1.10 Sinteza benzil-3-hidroksioktanoata (3-2)



Suspenzija aktiviranog cinka u prahu (107 mg, 1,65 mmol) u 0,7 mL anhidrovanog benzena grejana je do refluktovanja tokom 10 min (80 °C) u atmosferi argona. Ukapavanjem je polako dodata smeša n-heksanala (180 µL, 1,5 mmol) i benzil-bromoacetata (378 mg, 261 µL, 1,65 mmol) u 2,3 mL benzena tokom 1 h. Reakcija je ostavljena da se meša još 1 h nakon završenog ukapavanja i praćena je tankoslojnom hromatografijom. Nakon završetka reakcije, smeša je ohlađena na 0 °C i dodata je 1M HCl (0,5 mL) a zatim je urađena ekstrakcija dietil-etrom (3 x 4 mL). Spojene organske faze su osušene iznad anh. MgSO<sub>4</sub> i rastvarač je uparen pod sniženim pritiskom. Sirovi proizvod je prečišćen vakuum hromatografijom u gradijentu na stubu SiO<sub>2</sub> (petrol-etar/etil-acetat= 9/1 do 8/2). Dobijen je proizvod (127 mg) sa prinosom od 34% u obliku bezbojnog ulja. (Spektar je prikazan u Sekciji 4.1.1)

#### 4.1.11 Sinteza etil-3-oksooktanoata<sup>163</sup> (3-22)

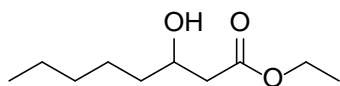


U rastvor etil-diazoacetata (11,4 mg, 0,1 mmol) u suvom metilen-hloridu (2 mL) dodato je 10 mol% kalaj-hlorida (1,9 mg, 0,01 mmol) u atmosferi argona. Zatim je ukapavanjem dodat rastvor heksanala (10 mg, 0,1 mmol) u metilen-hloridu (0,15 mL). Reakcija je ostavljena da se meša na sobnoj temperaturi u atmosferi argona tokom 2 h. Reakcija je praćena tankoslojnom hromatografijom (petrol-etar/etil-acetat=9/1). Nakon završene reakcije smeša je prebaćena u levak za odvajanje, dodat je zasićeni rastvor NaCl-a. Vodena faza je ekstrahovana metilen-hloridom (3 x 10 mL). Spojene organske faze su sušene iznad anh. Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, rastvarač je uparen pod sniženim pritiskom a sirovi proizvod prečišćen vakuum hromatografijom na stubu SiO<sub>2</sub> u gradijentu (petrol-



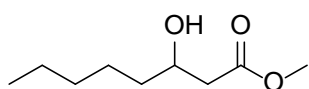
etar/etil-acetat=95/5 do petrol-etar/etil-acetat=8/2). Dobijeno je 15,6 mg (84%) proizvoda u obliku bezbojnog ulja.  $^1\text{H NMR}$  (200 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  12,11 (s, 1H)\*, 4,98 (s, 1H), 4,20 (q,  $J = 7,1$  Hz, 2H), 3,43 (s, 2H), 2,53 (t,  $J = 7,3$  Hz, 2H), 1,72 – 1,14 (m, 15H), 0,89 (t,  $J = 6,6$  Hz, 3H).  $^{13}\text{C NMR}$  (50 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  203,1; 167,3; 88,9; 61,3; 59,9; 49,3; 42,9; 34,9; 31,1; 25,8; 23,1; 22,34; 14,1; 13,8. \* zbog keto-enolne tautomerije javlja se više signala u spektru.

#### 4.1.12 Sinteza etil-3-hidroksioktanoata (3-23)



U rastvor  $\text{NaBH}_4$  (12 mg, 0,32 mmol) u metanolu (2,5 mL), pažljivo je dodat rastvor etil-3-oksooktanoata (50 mg, 0,268 mmol) u metanolu (0,5 mL). Reakciona smeša je mešana 2 h na sobnoj temperaturi. Reakcija je prekinuta dodatkom 5% rastvora hlorovodonične kiseline. Proizvod je ekstrahovan dietil-etrom (3 x 5 mL), spojeni organski slojevi su sušeni iznad anh.  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  i rastvarač je uparen pod sniženim pritiskom. Dobijeni proizvod je prečišćen vakuum hromatografijom na stubu  $\text{SiO}_2$  u gradijentu (petrol-etar/etil-acetat=95/5 do petrol-etar/etil-acetat=9/1). Dobijeno je 25,2 mg (50%) proizvoda u obliku bezbojnog ulja.  $^1\text{H NMR}$  (200 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  4,18 (q,  $J = 7,1$  Hz, 2H), 4,03 (dd,  $J_1 = 10,2$  Hz;  $J_2 = 6,2$  Hz, 1H), 2,96 (d,  $J = 3,6$  Hz, 2H), 2,45 (qd,  $J_1 = 16,4$  Hz;  $J_2 = 6,1$  Hz, 2H), 1,73 – 1,08 (m, 8H), 0,89 (t,  $J = 6,2$  Hz, 3H).  $^{13}\text{C NMR}$  (50 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  173,2; 68,0; 60,6; 41,2; 36,4; 31,7; 25,1; 22,6; 14,2; 13,9.

#### 4.1.13 Sinteza metil-3-hidroksioktanoata (3-1)

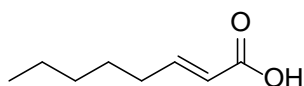


Pripremljen je rastvor etil-3-hidroksioktanoata (25,2 mg, 0,134 mmol) u metanolu (0,5 mL) u koji je dodata konc. hlorovodonična kiselina (30  $\mu\text{L}$ ). Reakciona



smesa je zagrejana da ključa na 65 °C i ostavljena da se meša tokom 18 h. Nakon 5 h reakcija je prekinuta dodatkom zasićenog rastvora NaHCO<sub>3</sub>, proizvod je ekstrahovan metilen-hloridom (3 x 10 mL), spojene organske faze su sušene iznad anh. Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> i rastvarač je uparen pod sniženim pritiskom. Dobijeni proizvod je prečišćen vakuum hromatografijom na stubu SiO<sub>2</sub> (petrol-etar/etil-acetat=9/1). Dobijeno je 23mg (98%) proizvoda. (Spektar je prikazan u Sekciji 4.1.1, strana 71)

#### 4.1.14 Sinteza (2E)-okt-2-enske kiseline (3-15)



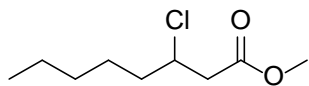
U balonu od 25 mL rastvorena je malonska kiselina (2,85 g, 0,028 mmol) u 5 mL suvog piridina, rastvor je ohlađen na 0 °C (ledeno kupatilo) i dodat je heksanal (2,5 g, 3 mL, 0,025 mmol). Balon je opremljen sa kalcijum-hloridnom cevi i reakcija je ostavljena da se meša 60 h na sobnoj temperaturi. Zatim je reakcija zagrejana do 80 °C i ostavljena da se meša na toj temperaturi tokom 18 h kako bi uklonili ugljen-dioksid koji se generiše tokom reakcije. Reakciona smeša je ohlađena do sobne temperature zatim je dodato je 5 mL metilen-hlorida i smeša je isprana 25% hlorovodoničnom kiselinom. Dodat je benzen (5 mL) i organska faza je isprana vodom a zatim sušena inad anh. Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Rastvarač je uklonjen pod sniženim pritiskom, dobijeno je 2,2 g (63%) proizvoda u obliku bezbojnog ulja. <sup>1</sup>H NMR (200 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 11,77 – 8,85 (bs, 1H), 7,09 (dt, J<sub>1</sub>= 15,6 Hz; J<sub>2</sub>= 7,0 Hz, 1H), 5,82 (dt, J<sub>1</sub>= 15,6 Hz; J<sub>2</sub>= 1,5 Hz, 1H), 2,23 (dq, J<sub>1</sub> = 7 Hz; J<sub>2</sub>= 1,5 Hz, 2H), 1,68 – 1,15 (m, 6H), 0,90 (t, J = 6,5 Hz, 3H). <sup>13</sup>C NMR (50 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 172,4; 152,6; 120,6; 34,1; 32,2; 31,3; 27,5; 22,4; 13,9. IR (ATR): 2931; 2959; 2860; 2674; 1699; 1421; 1285. \* zbog cis-trans izomerije javlja se veći broj signala u <sup>13</sup>C spektru.



#### 4.1.15 Generalna procedura za sintezu 3-hloro derivata

U rastvor estra 3-hidroksioktanske kiseline (0,575 mmol, 1 ekv.) i trietilamina (0,086 mmol, 0,15 ekv.) u diizopropil-etu (5 mL), dodata je jedna polovina rastvora  $\text{SOCl}_2$  (0,1 mL, 2,35 ekv., 1,35 mmol) u 5 mL diizopropil-etra na  $-10\text{ }^\circ\text{C}$  u kapima. Reakciona smesa je mešana na  $-10\text{ }^\circ\text{C}$  tokom 10 min a zatim je ostavljena da se ugrije do sobne temperature. Druga polovina rastvora  $\text{SOCl}_2$  u dietil-etu (2,5 mL) je dodata u kapima, reakciona smesa je zatim ugrejana na  $75\text{ }^\circ\text{C}$  i ostavljena da se meša do potpune konverzije alkohola. Nakon hlađenja do sobne temperature, reakcija je prekinuta dodatkom zasićenog rastvora  $\text{NaHCO}_3$ . Vodena faza je ekstrahovana metilen-hloridom (3 x 10 mL), spojene organske faze su isprane zasićenim rastvorom  $\text{NaCl}$ -a i osušene iznad anh.  $\text{MgSO}_4$ . Nakon uklanjanja rastvarača pod sniženim pritiskom sirovi proizvod je prečišćen vakuum hromatografijom na koloni  $\text{SiO}_2$  (petrol-etar/ etil-acetat= 95/5).

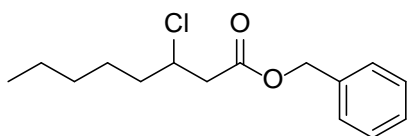
#### 4.1.16 Metil-3-hloroktanoat (3-4)



Prema generalnoj proceduri za dobijanje 3-hloro derivata polazeći od količina navedenih u proceduri dobijeno je 51 mg (46%) proizvoda u obliku žutog ulja.  $[\alpha]_D = -16$  (c 1,  $\text{CHCl}_3$ ); *ee* 22%;  $^1\text{H NMR}$  (200 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  4,3 (quint,  $J = 7$  Hz, 1H), 3,73 (s, 3H), 2,75 (d,  $J = 6,8$  Hz, 2H), 1,84 – 1,21 (m, 8H), 0,90 (t,  $J = 6,5$  Hz, 3H).  $^{13}\text{C NMR}$  (50 Hz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  171,1; 57,9; 51,9; 43,5; 37,9; 31,1; 25,9; 22,4; 13,9. IR (ATR): 2959; 2933; 2865; 1745; 1463; 1169. HRMS (ESI): izračunato za  $\text{C}_9\text{H}_{17}\text{O}_2\text{Cl}$  ( $\text{M}+\text{NH}_4$ )<sup>+</sup> 210,12553, nađeno 210,12571.

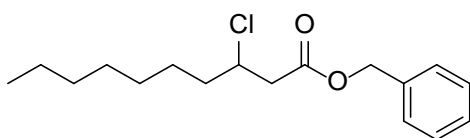


#### 4.1.17 Benzil-3-hloroktanoat (3-5)



Prema generalnoj proceduri za dobijanje 3-hloro derivata polazeći od količina navedenih u proceduri dobijeno je 87 mg (56%) žutog ulja.  $[\alpha]_D = -9$  (c 1,  $\text{CHCl}_3$ ); *ee* 17%;  $^1\text{H NMR}$  (200 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  7,37 (s, 5H), 5,17 (s, 2H), 4,32 (quint,  $J = 7$  Hz, 1H), 2,86 – 2,73 (m, 2H), 1,85 – 1,10 (m, 8H), 0,89 (t,  $J = 6,6$  Hz, 3H).  $^{13}\text{C NMR}$  (50 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  170,1; 135,8; 128,6; 128,4; 128,3; 66,6; 57,9; 43,6; 37,9; 31,1; 25,9; 22,4; 13,9. **IR (ATR)**: 3066; 3034; 2956; 2931; 2861; 1741; 1458; 1159. **HRMS (ESI)**: izračunato za  $\text{C}_{15}\text{H}_{21}\text{O}_2\text{Cl}$  ( $\text{M}+\text{NH}_4$ )<sup>+</sup> 286,15683, nađeno 286,15665.

#### 4.1.18 Benzil-3-hlordekanooat (3-31)



Prema generalnoj proceduri za dobijanje 3-hloro derivata polazeći od količina navedenih u proceduri dobijeno je 88 mg (52%), žutog ulja.  $^1\text{H NMR}$  (200 Hz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  7,36 (s, 5H), 5,16 (s, 2H), 4,31 (dt,  $J_1 = 13,7$  Hz;  $J_2 = 6,9$  Hz, 1H), 2,94 – 2,69 (m, 2H), 1,74 (dd,  $J_1 = 14,6$  Hz;  $J_2 = 6,9$  Hz, 2H), 1,63 – 1,12 (m, 10H), 0,88 (t,  $J = 6,4$  Hz, 3H).  $^{13}\text{C NMR}$  (50 Hz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  170,1; 135,6; 128,6; 128,3; 128,2; 66,6; 57,9; 43,6; 37,9; 31,7; 29,1; 26,2; 22,6; 14,0. **IR (ATR)**: 2955, 2929, 2857, 1740, 1158. **HRMS (ESI)**: izračunato za  $\text{C}_{17}\text{H}_{25}\text{O}_2\text{Cl}$  ( $\text{M}+\text{NH}_4$ )<sup>+</sup> 314,18813, nađeno 314,18700.

#### 4.1.19 Procedura II za sintezu metil-3-hloroktanoata

U rastvor metil-3-hidroksioktanoata (80 mg, 0,275 mmol) u metilen-hloridu, dodato je 2 mL (27,5 mmol)  $\text{SOCl}_2$  i jedna kap *N,N*-dimetilformamida. Smeša je

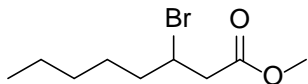


ostavljena da se meša na s.t. tokom 2 h. Reakcija je praćena tankoslojnom hromatografijom (petrol-etar/etil-acetat=9/1), nakon 2 h i dalje je bilo polaznog alkohola. Nakon 1 h mešanja pod sniženim pritiskom na vakuum uparivaću došlo je do potpune konverzije alkohola u hlorid. Sirovi proizvod je prećišćen vakuum hromatografijom na koloni SiO<sub>2</sub> (petrol-etar/ etil-acetat= 95/5), dobijeno je 74 mg (87%) proizvoda.

#### 4.1.20 Generalna procedura za sintezu 3-bromo derivata

U rastvor 3-hidroksi estra (1 ekv.) i ugljen-tetrabromida (1,6 ekv.) u metilen-hloridu na 0 °C dodat je trifenil-fosfin (1,13 ekv.). Smeša je ostavljena da se meša na sobnoj temperaturi 4 h. Nakon uklanjanja rastvaraća pod sniženim pritiskom, proizvod je prećišćen vakuum hromatografijom na koloni SiO<sub>2</sub> u gradijentu (petrol-etar/etil-acetat=95/5 do 8/2).

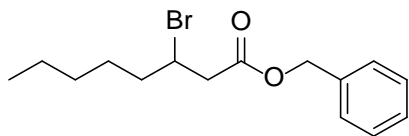
#### 4.1.21 Sinteza metil-3-bromoktanoata (3-7)



Prema generalnoj proceduri za dobijanje 3-bromo derivata polazeći od kolićina navedenih u proceduri dobijeno je 15 mg (32%) proizvoda u obliku žutog ulja.  $[\alpha]_D = +5$  (c 1, CHCl<sub>3</sub>); *ee* 16%; <sup>1</sup>H NMR (200 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  4,34 (quint, *J* = 7 Hz, 1H), 3,72 (s, 3H), 2,90 (d, *J* = 7 Hz, 2H), 1,83-1,77 (m, 2H), 1,63 – 1,16 (m, 6H), 0,89 (t, *J* = 6,6 Hz, 3H). <sup>13</sup>C NMR (50 Hz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  170,9; 51,9; 50,0; 44,1; 38,6; 30,9; 27,1; 22,4; 13,9. IR (ATR): 2957; 2932; 2860; 1746; 1438; 1157. HRMS (ESI): izraćunato za C<sub>9</sub>H<sub>17</sub>O<sub>2</sub>Br (M+NH<sub>4</sub>)<sup>+</sup> 254,07502, naćeno 254,07547



#### 4.1.22 Sinteza benzil -3-bromoktanoata (3-8)



Prema generalnoj proceduri za dobijanje 3-bromo derivata polazeći od količina navedenih u proceduri dobijeno je 60 mg (95%) žutog ulja.  $[\alpha]_D = 0$  (c 1,  $\text{CHCl}_3$ ); *ee* 1%;  $^1\text{H NMR}$  (200 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  7,36 (s, 5H), 5,16 (s, 2H), 4,36 (quint, 7 Hz, 1H), 2,95 (d,  $J = 7$  Hz, 2H), 1,83 (dt,  $J_1 = 8,7$  Hz;  $J_2 = 7,0$  Hz, 2H), 1,72 – 1,08 (m, 6H), 0,89 (t,  $J = 6,6$  Hz, 3H).  $^{13}\text{C NMR}$  (50 Hz,  $\text{CDCl}_3$ ): 170,2; 135,5; 128,6; 128,3; 66,7; 49,9; 44,3; 38,6; 30,9; 27,0; 22,4; 13,9. IR (ATR): 3729; 3065; 3034; 2956; 2930; 2861; 1740; 1457; 1151. HRMS (ESI): izračunato za  $\text{C}_{15}\text{H}_{21}\text{O}_2\text{Br}$  ( $\text{M}+\text{NH}_4$ )<sup>+</sup> 330,10632, nađeno 330,10688.

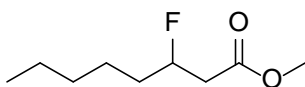
#### 4.1.23 Generalna procedura za sintezu 3-fluoro derivata 3-HA

U hladan rastvor ( $-70$  °C) alkil estra 3-hidroksioktanske kiseline (0,24 mmol) u anhidrovanom metilen-hloridu (2 mL) dodat je DAST (0,264 mmol) u atmosferi argona. Nakon 20 min mešanja na  $-70$  °C, reakcija je zagrejana do sobne temperature. Reakcija je prekinuta dodatkom zasićenog rastvora  $\text{NaHCO}_3$  i vode. Vodena faza je ekstrahovana metilen-hloridom (3 x 5 mL), spojene organske faze su isprane zasićenim vodenim rastvorom  $\text{NaCl}$ -a i osušene iznad anh.  $\text{MgSO}_4$ . Sirovi proizvod je prečišćen vakuum hromatografijom na koloni  $\text{SiO}_2$  (petrol-etar/etil-acetat = 95/5) i dobijen je fluoro derivat i značajna količina olefinskog sporednog proizvoda. Sporedni proizvod je efikasno uklonjen ozonolizom u metilen-hloridu na  $-15$  °C koja je praćena tretmanom 0,3 M perjodnom kiselinom u THF tokom 1 h na sobnoj temperaturi. Rastvarač je uklonjen pod sniženim pritiskom i proizvod je ponovo prečišćen vakuum hromatografijom na koloni  $\text{SiO}_2$  (petrol-etar/etil-acetat = 9/1).



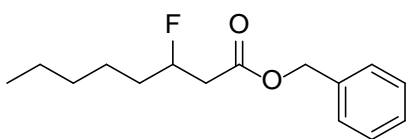


#### 4.1.24 Sinteza metil-3-fluoroktanoata (3-10)



Prema generalnoj proceduri za dobijanje 3-fluoro derivata polazeći od količina navedenih u proceduri dobijeno je 17 mg, (40%) proizvoda u obliku bezbojnog ulja.  $[\alpha]_D = -5$  (c 1,  $\text{CHCl}_3$ ); *ee* 19%;  $^1\text{H NMR}$  (200 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (5,12 – 4,99 (m), 4,88 – 4,75 (m)) 1H,  $J = 48,1$  Hz), 3,72 (s, 3H), 2,86 – 2,32 (m, 2H), 1,88 – 1,14 (m, 8H), 0,90 (t,  $J = 6,5$  Hz, 3H).  $^{13}\text{C NMR}$  (50 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  170,7 (d,  $J = 5,9$  Hz); 90,4 (d,  $J = 158,1$  Hz); 51,8 (d,  $J = 6,2$  Hz); 40,2 (d,  $J = 24,2$  Hz); 34,8 (d,  $J = 20,5$  Hz); 31,4; 24,4 (d,  $J = 4,0$  Hz); 22,4; 13,9. **IR (ATR)**: 2956; 2865; 1744; 1439; 1172.

#### 4.1.25 Sinteza benzil-3-fluoroktanoata (3-11)

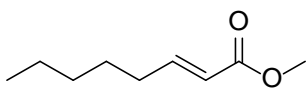


Prema generalnoj proceduri za dobijanje 3-fluoro derivata polazeći od količina navedenih u proceduri dobijeno je 40 mg (60%) proizvoda u obliku bezbojnog ulja.  $[\alpha]_D = -3$  (c 1,  $\text{CHCl}_3$ ); *ee* 65%;  $^1\text{H NMR}$  (200 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  7,36 (s, 5H), 5,16 (s, 2H), 5,08 (ddd,  $J = 12,5, 7,8, 4,7$  Hz, 1H), 4,83 (dt,  $J = 12,4, 4,2$  Hz, 2H), 2,95- 2,27 (m, 2H), 1,88 – 1,14 (m, 6H), 0,89 (t,  $J = 6,5$  Hz, 3H).  $^{13}\text{C NMR}$  (50 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  170,2 (d,  $J = 5,6$  Hz); 135,7; 128,6; 128,3; 128,2; 90,4 (d,  $J = 169,7$  Hz); 66,6; 40,4 (d,  $J = 24,1$  Hz); 34,8 (d,  $J = 20,5$  Hz); 31,4; 24,4 (d,  $J = 4,3$  Hz); 22,4; 13,9. **IR (ATR)**: 3066; 3033; 2955; 2933; 2864; 1741; 1458; 1169. **HRMS (ESI)**: izračunato za  $\text{C}_{15}\text{H}_{21}\text{O}_2\text{F}$  ( $\text{M}+\text{NH}_4$ )<sup>+</sup> 270,18638, nađeno 270,18630.

Olefinski derivati su dobijeni kao sporedni proizvodi u sintezi 3-fluoro jedinjenja.

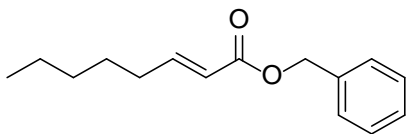


#### 4.1.26 Sinteza metil-(2E)-okt-2-enoata (3-13)



Prinos 5 mg (15%), bezbojno ulje.  $^1\text{H NMR}$  (200 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  6,98 (dt,  $J = 15,6$ ; 7,0 Hz, 1H), 5,82 (dt,  $J = 15,6$ ; 1,5 Hz, 1H), 3,73 (s, 3H), 2,20 (dq,  $J_1 = 7$  Hz;  $J_2 = 1,5$  Hz, 2H), 1,46 – 1,26 (m, 6H), 0,90 (t,  $J = 6$  Hz, 3H).  $^{13}\text{C NMR}$  (50 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  167,1; 149,8; 120,7; 51,2; 32,1; 31,2; 27,6; 22,3; 13,8. **IR** (ATR): 2930; 2956; 2860; 1727; 1437; 1271.

#### 4.1.27 Sinteza benzil-(2E)-okt-2-enoata (3-14)



Prinos 6 mg (10%), bezbojno ulje.  $^1\text{H NMR}$  (200 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  7,36 (s, 5H), 7,02 (dt,  $J_1 = 15,5$  Hz;  $J_2 = 6,9$  Hz, 1H), 5,86 (d,  $J = 15,6$  Hz, 1H), 5,14 (d,  $J = 11,8$  Hz, 9H), 2,55 – 2,06 (m, 1H), 1,86 – 1,08 (m, 8H), 0,88 (t,  $J = 6,4$  Hz, 3H).  $^{13}\text{C NMR}$  (50 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  166,6; 150,2; 136,2; 128,5; 128,2; 128,1; 120,8; 65,9; 32,2; 31,2; 27,6; 22,4; 13,9. **IR** (ATR): 2929; 2956; 3034; 3064; 2860; 1723; 1457; 1167. **HRMS** (ESI): izračunato za  $\text{C}_{15}\text{H}_{20}\text{O}_2$  ( $\text{M}+\text{NH}_4$ ) $^+$  250,18016, nađeno 250,18019.

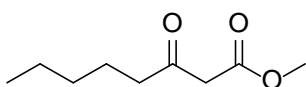
#### 4.1.28 Generalna procedura za sintezu 3 - okso derivata

Pripremljen je rastvor Collins-ovog reagensa mešanjem hrom(VI)-oksida (2 mmol, 6 ekv) i piridina (4 mmol, 12 ekv.) u metilen-hloridu tokom 30 min u atmosferi argona. Zatim je dodat rastvor 3-hidroksi estra (0,34 mmol, 1 ekv.) u metilen-hloridu i mešanje je nastavljeno još 12 h na sobnoj temperaturi. Reakcija je praćena



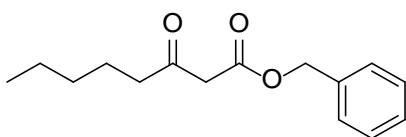
tankoslojnom hromatografijom (petrol-etar/etil-acetat= 9/1). Reakcija je prekinuta dodatkom dietil-etra, i talog nastao od Collins-ovog reagensa je ispran tri puta dietil-etrom. Spojeni dietil-etarski slojevi su procedeni kroz stup silika-gela, rastvarač je uparen pod sniženim pritiskom i proizvod je prečišćen vakuum hromatografijom na koloni SiO<sub>2</sub> (petrol-etar/etil-acetat= 9/1).

#### 4.1.29 Sinteza metil-3-oksooktanoata (3-16)



Prema generalnoj proceduri za sintezu 3-okso derivata polazeći od datih količina dobijeno je 20 mg (35%) proizvoda u obliku bezbojnog ulja. <sup>1</sup>H NMR (200 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 3,74 (s, 3H), 3,45 (s, 2H), 2,53 (t, *J* = 7,3 Hz, 2H), 1,68 – 0,95 (m, 6H), 0,89 (t, *J* = 6,6 Hz, 3H). <sup>13</sup>C NMR (200 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 202,9; 167,7; 52,3; 48,9; 43,0; 31,1; 23,1; 22,3; 13,8. enol: <sup>1</sup>H NMR: δ 12,03 (s, 1H) IR (ATR): 2956; 2932; 2864; 1748; 1717; 1440; 1240; 1320; 1159.

#### 4.1.30 Sinteza benzil-3-oksooktanoata (3-17)



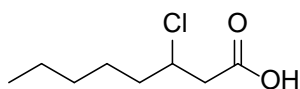
Prema generalnoj proceduri za sintezu 3-okso derivata polazeći od datih količina dobijeno je 72 mg (80%) proizvoda u obliku bezbojnog ulja. <sup>1</sup>H NMR (200 MHz, CDCl<sub>3</sub>) 7,36 (s, 5H), 5,18 (s, 2H), 3,48 (s, 2H), 2,50 (t, *J* = 7,3 Hz, 2H), 1,58 (dt, *J*<sub>1</sub> = 14,4Hz; *J*<sub>2</sub> = 7,3 Hz, 2H), 1,43 – 1,07 (m, 4H), 0,87 (t, *J* = 6,6 Hz, 3H). <sup>13</sup>C NMR (200 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 202,7; 167,1; 135,3; 128,6; 128,4; 128,3; 67,0; 49,2; 42,9; 31,1; 23,0; 22,3; 13,8. enol: <sup>1</sup>H NMR: δ 12,02 (s, 1H). IR (ATR): 2957; 2931; 2866; 1744; 1717; 1646; 1458.



#### 4.1.31 Generalna procedura za deprotekciju benzil-estra

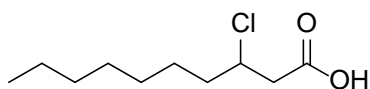
U Parr-ovu bocu rastvoren je benzil-estar u 20 mL metanola i dodata je katalitička količina (~20 mg) 10% Pd/C. Reakciona smeša je ostavljena da se meša u atmosferi vodonika (50 psi) tokom 8 h. Smeša je procedena kroz stub celita, rastvarač je uklonjen pod sniženim pritiskom i dobija se kvantitativno karboksilna kiselina. Ukoliko je potrebno proizvod se prečišćava vakuum hromatografijom na stubu SiO<sub>2</sub> (petrol-etar/etil-acetat=7/3).

#### 4.1.32 Sinteza 3-hloroktanske kiseline (3-6)



Prema generalnog proceduri za deprotekciju benzil estra dobijeno je 66 mg (100%), bledo žuto ulje.  $[\alpha]_D = -4.5$  (c 1, CHCl<sub>3</sub>); *ee* 27%; <sup>1</sup>H NMR (200 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 10,53 (bs, 1H), 4,35 – 4,08 (m, 1H), 2,81 (d, *J* = 6,9 Hz, 2H), 1,91 – 1,12 (m, 8H), 0,90 (t, *J* = 6,5 Hz, 3H). <sup>13</sup>C NMR (50 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 176,5; 57,3; 43,4; 37,9; 31,1; 25,9; 22,4; 13,9. IR (ATR): 2932; 2958; 2861; 1716; 1286; 1433. HRMS (ESI): izračunato za C<sub>8</sub>H<sub>15</sub>O<sub>2</sub>Cl (M+NH<sub>4</sub>)<sup>+</sup> 196,10988, nađeno 196,11039.

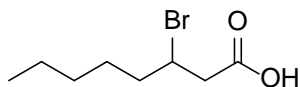
#### 4.1.33 Sinteza 3-hlorodekanske kiseline (3-32)



Prema generalnog proceduri za deprotekciju benzil estra dobijeno je 70 mg (100%) proizvoda u obliku blede žutog ulja. <sup>1</sup>H NMR (200 Hz, CDCl<sub>3</sub>): δ 7,51 (s, 1H), 4,45 – 4,05 (m, 1H), 2,81 (d, *J* = 6,8 Hz, 2H), 1,91 – 1,09 (m, 12H), 0,88 (t, *J* = 5,6 Hz, 3H). <sup>13</sup>C NMR (50 Hz, CDCl<sub>3</sub>): δ 172,2; 57,3; 43,4; 37,9; 31,7; 29,0; 29,1; 26,2; 22,6; 14,0. IR (ATR): 2928, 2861, 1717, 1428, 1292, 944.



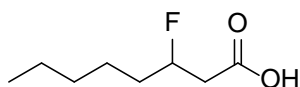
#### 4.1.34 Sinteza 3-bromoktanske kiseline (3-9)



Prema generalnog proceduri za deprotekciju benzil estra.

Prinos 71 mg (100%), žuto ulje.  $[\alpha]_D = 0$  (c 1,  $\text{CHCl}_3$ ); *ee* 23%;  $^1\text{H NMR}$  (200 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  10,70 (bs, 1H), 4,54 – 4,14 (m, 1H), 2,96 (d,  $J = 6,9$  Hz, 2H), 1,95 – 1,15 (m, 8H), 0,90 (t,  $J = 6,6$  Hz, 3H).  $^{13}\text{C NMR}$  (50 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  176,6; 49,1; 44,1; 38,6; 30,9; 27,1; 22,4; 13,9. **IR (ATR)**: 2930; 2958; 2860; 1715; 1430; 1282. **HRMS (ESI)**: izračunato za  $\text{C}_8\text{H}_{15}\text{O}_2\text{Br}$  ( $\text{M}+\text{NH}_4$ )<sup>+</sup> 240,05937, nađeno 240,05985.

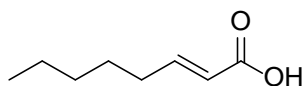
#### 4.1.35 Sinteza 3-fluoroktanske kiseline (3-12)



Prema generalnog proceduri za deprotekciju benzil estra.

Prinos 64 mg (100%), beli prah.  $[\alpha]_D = -3$  (c 1,  $\text{CHCl}_3$ ); *ee* 66%;  $^1\text{H NMR}$  (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  9,05 (bs, 1H), 5,00- 4,85 (m, 1H), 2,82 – 2,39 (m, 2H), 1,81 – 1,18 (m, 8H), 0,90 (t,  $J = 6,9$  Hz, 3H).  $^{13}\text{C NMR}$  (125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  176,3 (d,  $J = 5,0$  Hz); 90,2 (d,  $J = 169,5$  Hz); 40,3 (d,  $J = 24,1$  Hz); 34,8 (d,  $J = 20,4$  Hz); 31,4; 24,5 (d,  $J = 4,3$  Hz); 22,5; 13,9. **IR (ATR)**: 2932; 2957; 2862; 1716; 1433; 1266. **HRMS (ESI)**: izračunato za  $\text{C}_8\text{H}_{15}\text{O}_2\text{F}$  ( $\text{M}+\text{NH}_4$ )<sup>+</sup> 180,13943, nađeno 180,13985.

#### 4.1.36 Sinteza (2E)-okt-2-enske kiseline (3-15)

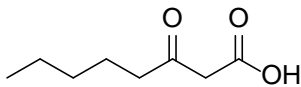


Prema generalnog proceduri za deprotekciju benzil estra.

Prinos 61 mg (100%), bezbojno ulje. (Spektar je prikazan u Sekciji 4.1.2)



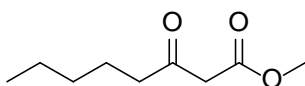
#### 4.1.37 Sinteza 3-oksooktanske kiseline (3-18)



Prema generalnog proceduri za deprotekciju benzil estra.

Prinos 63 mg (99%), beli prah.  $^1\text{H NMR}$  (200 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  6,97 (s, 1H), 4,03 (s, 1H), 2,72 – 2,23 (m, 2H), 1,78 – 1,11 (m, 8H), 0,89 (t,  $J = 6,3$  Hz, 3H).  $^{13}\text{C NMR}$  (50 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  177,5; 68,2; 41,3; 36,4; 31,6; 25,1; 22,5; 13,9. IR (ATR): 3536; 2955; 2926; 2857; 1771; 1681; 1440. \* pojava keto-enolne tautomerije, pa NMR spektar prikazuje enolni oblik jedinjenja.

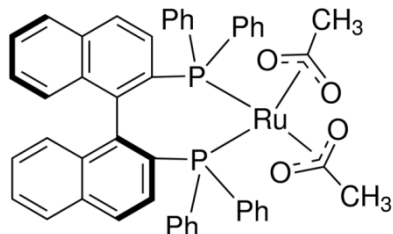
#### 4.1.38 Sinteza metil-3-oksooktanoata<sup>186</sup> (3-16)



U balonu od 50 mL pripremljen je rastvor Meldrum-ove kiseline (1,15 g, 8 mmol, 1 ekv.) u 10 mL metilen-hlorida na 0 °C u atmosferi argona. U kapima je dodan piridin (1,24 mL, 16 mmol, 2 ekv.) tokom 5 min. Smeša je ostavljena još 5 min da se meša a zatim je dodan heksanoil-hlorid (1,1 g, 8 mmol, 1 ekv.) i mešanje je nastavljeno još 2 h na 0 °C u atmosferi argona. Dodato je još 8 mL metilen-hlorida i reakciona smeša je izlivena u smešu leda i hlorovodonične kiseline (2 M), nastali rastvor je mešan 10 min, odvojene su organska i vodena faza. Organska faza je isprana 3 M rastvorom hlorovodonične kiseline zatim zasićenim vodenim rastvorom NaCl-a i osušena iznad anh.  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ . Sirovi proizvod je rastvoren u 10 mL metanola i zagrevan na 65 °C tokom 5 h. Rastvarač je uklonjen pod sniženim pritiskom a proizvod prečišćen vakuum hromatografijom na stubu  $\text{SiO}_2$  u gradijentu (petrol-etar/etil-acetat=9/1 do petrol-etar/etil-acetat=8/2). Dobijena se smeša proizvoda i heksanske kiseline koja je uklonjena kiselinom-banznom ekstrakcijom. Dobijeno je 700 mg (50%) proizvoda. (Spektar je prikazan u Sekciji 4.1.3)

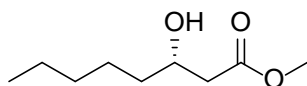


#### 4.1.39 Sinteza kompleksa Ru[(S)-BINAP](OAc)<sub>2</sub>



U balonu od 10 mL sa uvodnikom za argon (Šlenkov balon) odmereno je 180 mg (0,64 mmol, 12 ekv.) kompleksa dihaloro-(1,5-ciklooktadien)-rutenijum(III) u atmosferi argona. Dodato je 1,5 mL degasiranog suvog toluena, trietilamina (30  $\mu$ L, 0,215 mmol, 4 ekv.) i S-BINAP-a (33 mg, 0,053 mmol, 1 ekv.). Sve komponentne su pomešane u inertnoj atmosferi u komori sa argonom. Reakciona smeša je ostavljena da se meša na 70 °C tokom 18 h u atmosferi argona. Rastvarač je uparen pod sniženim pritiskom, ostatak u obliku braon praha je rastvoren u terc-butanolu (2,5 mL) zatim je dodat natrijum-acetat (20 mg, 0,243 mmol, 4,6 ekv.) i smeša je ostavljena da refluktuje 12 h u atmosferi argona. Rastvarač je uparen pod sniženim pritiskom, dobijen je talog koji je ispran dietil-etrom (3 x 3 mL). Sakupljen je dietil-etar koji je centrifugiran kako bi se uklonili tragovi taloga. Dietil-etar je uparen i dobijen je žuto-zeleni talog koji je ispran etanolom (3 x 3 mL) na isti način kao dietil-etrom. Nastali talog je rekristalisan sa terc-butanolom, dobijeno je 7 mg (16%) proizvoda u obliku žuto-braon taloga.

#### 4.1.40 Sinteza (S)-metil-3-hidroksioktanoata (3-28)



U degasiran rastvor Ru[(S)-BINAP](OAc)<sub>2</sub> (0,4 mg, 0,574  $\mu$ mol) u suvom etanolu (0,2 mL) dodat je rastvor hlorovodonične kiseline u etanolu (0,106 M, 11  $\mu$ L, 1,15  $\mu$ mol). Rastvor je ostavljen da se meša 2,5 h na sobnoj temperaturi u atmosferi argona. Dodat je takođe degasiran rastvor metil-3-oksooktanoata (100 mg, 0,574 mmol) u 2 mL etanola. Reakciona smeša je prebačena u autoklav, pod strujom argona. Izmenjena je atmosfera





vodonikom tri puta i reakcija je ostavljena 3 dana na sobnoj temperaturi uz mešanje pod pritiskom od 100 atm vodonika. Rastvarač je uparen pod sniženim pritiskom, sirovi proizvod je prečišćen vakuum hromatografijom na stubu SiO<sub>2</sub> u gradijentu (petrol-etar/etil-acetat=9/1 do petrol-etar/etil-acetat=8/2). Dobijeno je 60 mg proizvoda (60%).  $[\alpha]_D = +21,3$  (c 1, CHCl<sub>3</sub>), *ee* 99%. (Spektar je prikazan u Sekciji 4.1.1, strana 71, hromatogram u **Prilogu**)

## 4.2 Ispitivanje biološke aktivnosti

### 4.2.1 Antibakterijska i antifungalna svojstva sintetisanih derivata

#### 4.2.1.1 Test sojevi

Ispitivane su antimikrobne osobine sintetisanih derivata prema bakterijskim sojevima i sojevima gljiva iz Nacionalne kolekcije kultura (NCTC) i Američke kolekcije kultura (ATCC) uključujući *Escherichia coli* NCTC 9001, *Salmonella typhimurium* NCTC 12023, *Staphylococcus aureus* NCTC 6571, *Listeria monocytogenes* NCTC 11994, *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 NCTC 10332, *Candida albicans* ATCC 10231 and *Micrococcus gypseum* ATCC24102.

#### 4.2.1.2 Priprema hranljivih podloga

*Luria-Bertani Medijum*: U 950 mL dejonizovane vode dodati tripton (10 g), ekstrakt kvasca (5 g) i natrijum-hlorid (10 g). Mešati dok se ne rastvori a potom podesiti pH 7 sa 5 N NaOH (~0,2 mL). Dodati dejonizovane vode do 1 L. Sterilisati u autoklavu 20 min na 15 psi (1,05 kg/cm<sup>3</sup>) po „krugu tečnosti“.



*Saburand medijum:* U 950 mL dejonizovane vode dodati (40 g) glukoze, pepton (10 g) i agar (15 g), podesiti pH 5,6 i dodati vode do 1 L. Sterilisati u autoklavu 20 min na 15 psi (1,05 kg/cm<sup>3</sup>) po „krugu tečnosti“.

*Spider medijum:* U 950 mL dejonizovane vode dodati hranljivu podlogu (10 g), manitol (10 g), kalijum-fosfat (2 g) i agar 13,5 g i dodati vode do 1 L. Sterilisati u autoklavu 20 min na 15 psi (1,05 kg/cm<sup>3</sup>) po „krugu tečnosti“.

*Kings A medijum:* U 250 mL dejonizovane vode dodati 4,5 mL glukoze (1,5%), 6 g peptona, 3 g kalijum-sulfata, 0,492 g magnezijum-hlorida i dodati vode do 1 L. Sterilisati u autoklavu 20 min na 15 psi (1,05 kg/cm<sup>3</sup>) po „krugu tečnosti“.

#### 4.2.1.3 Disk-difuzioni esej

Dehidrirani bakterijski test organizmi su ostavljeni u Luria-Bertani (LB) medijumu bez agara preko noći na 30 °C kako bi oživelili. Gljive su ostavljene u Saburand medijumu (SAB) pod istim uslovima. Kako bi odredili koncentracije mikroorganizama u hranljivoj podlozi snimljene su apsorbance na UV/VIS spektrofotometru (razblaženje 1/10 (100 µL smeše + 900 µL vode)). Merena je apsorbance na 600 nm i 540 nm. Koncentracije bakterija su ujednačene dodatkom odgovarajuće količine medijuma tako da finalna optička gustina (OD vrednost) bude 0,2. Jedinjenja čiju smo aktivnost ispitivali se rastvore u DMSO-u. Napravljeni su rastvori koncentracije 25 g/L i 2,5 g/L. Na hranljivu podlogu sa agarom, izlivenu u petri šolji, se prvo nanese 300 µL rastvora mikroorganizama i razmaže štapićem kako bi se dobio tanak ujednačen sloj. Na prethodno obeleženim mestima se stave celulozni diskovi koji su bili nosači ispitivanih jedinjenja. Na prvom disku je nanešena negativna proba tj. sam rastvarač DMSO, na drugom disku je nanešeno 20 µL rastvora jedinjenja konc. 25 g/L a na trećem ista zapremina rastvora konc. 2,5 g/L. Na ovaj način smo naneli 500 µg i 50 µg jedinjenja. Nakon završenog nanošenja testiranih jedinjenja, šolje su ostavljene preko noći na 30°C. Merena je zona inhibicije rasta mikroorganizama oko diska, izražena u mm. Za bakterije su korišćene LB hranljive podloge dok je za sojeve gljiva korišćen SAB.



#### 4.2.1.4 Esej u tečnom medijumu

Prema literaturno poznatoj proceduri definisanoj od strane Nacionalnog komiteta za kliničke laboratorijske standarde (M07-A8) za bakterije i prema standardima Evropskog komiteta za testiranje antimikrobne osetljivosti (EDef7.1.), određene su minimalne inhibitorne koncentracije (MIC).

Priprema test organizma se odvija na već opisan način u proceduri za disk-difuzioni esej. Pripremljeni su rastvori različitih koncentracija testiranih jedinjenja u DMSO-u. Na mikrotitar ploču (sa 96 bunara), nanose se hranljiva podloga (LB za bakterije i SAB za gljive), rastvor jedinjenja i test organizam tako da ukupna zapremina ne prelazi 200  $\mu$ L. Kontrole su sadržale samo medijum i medijum sa odgovarajućom količinom rastvarača (DMSO) i kulturom (negativna proba). Ploče su ostavljene na 37 °C, merena je apsorbancija na 600 nm, nulto vreme, zatim svakih sat vremena narednih 6h i nakon 24 h. Vrednosti su normalizovane oduzimanjem vrednosti apsorbance samog medijuma. Dobijene vrednosti apsorbancija su izažene kao procentualna vrednost negativne probe, za koju je uzeto da je rast 100%. Sa kriva zavisnosti procentualnih vrednosti od koncentracija jedinjenja u bunarima dobija minimalna inhibitorna koncentracija (MIC). MIC je definisan kao najniža koncentracija bioaktivne supstance na kojoj test organizam u kulturi ne pokazuje rast.

#### 4.2.1.5 Efekat sintetisanih jedinjenja na razvoj filamenata kod *Candida albicans* soja

Ispitivane su morfološke promene kod *C. albicans* usled prisustva odnosno odustva kiselina (**3-3**, **3-6**, **3-9**, **3-12**, **3-15** i **3-18**) gajene na Spider podlozi pripremljenoj prema prethodno opisanom literaturnom postupku. Hranljiva podloga, na kojoj je gajena *Candida albicans*, je pripremljena tako da sadrži sub-minimalnu inhibitornu koncentraciju (75% MIC, Sekcija 4.2.1.4) svakog derivata kao i kontrolne oktanske kiseline. Podloge su inkubirane na 37°C tokom 36 h i praćena je morfologija *Candida albicans* kolonija formirane na spider hranljivoj podlozi vizualizacijom pomoću mikroskopa.



## 4.2.2 Moduliranje međučelijske komunikacije (QS)

### 4.2.2.1 Efekat sintetisanih jedinjenja na proizvodnju piocijanina kod *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 soja

Ispitivan je efekat kiselina **3-3**, **3-6**, **3-9**, **3-12**, **3-15** i **3-18** na proizvodnju piocijanina kod *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 prema proceduri koja je malo izmenjena u odnosu na literaturno poznatu proceduru. *P. aeruginosa* PAO1 je rasla na Kings A hranljivoj podlozi (1,5% (v/v) glicerol, 20 g/L pepton, 1,64 g/L MgCl<sub>2</sub>, 10 g/L K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) na 37°C tokom 24 h. Kultura koja je porasla preko noći razblažena je 1000 puta u 5 mL Kings A podloge i dodati su derivati rastvoreni u dimetilsulfoksidu u količini da finalna koncentracija jedinjenja bude 0,06 mM. Kao kontrola je korišćena ekvivalentna količina dimetilsulfoksida. Tako tretirana kultura je ostavljena još 24 h na 37 °C uz mešanje. Uzet je alikvot (1 mL) kulture i centrifugiran je na 14000 rpm tokom 20 min kako bi se staložile ćelije, supernatant je dalje analiziran na prisustvo i količinu piocijanina pomoću UV-VIS spektrofotometra na talasnoj dužini od 695 nm.<sup>199, 200</sup> Svi eksperimenti su rađeni u triplikatu.

## 4.2.3 In-vitro antiproliferativna aktivnost

### 4.2.3.1 Antiproliferativna aktivnost (MTT esej)

Antiproliferativna aktivnost jedinjenja je ispitivana prema humanim plućnim fibroblastima MRC5 ćelijama nabavljenim iz ATCC kolekcije kao i ćelijama melanoma A375 koristeći MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolijum bromid) redukujući esej. MTT esej je rađen nakon tretmana od 48 h sa jedinjenjima u triplikatu i upoređivan je sa kontrolom. Ćelije tretirane DMSO-om su posmatrane kao 100% rast ćelija.

MTT kolorimetrijski esej<sup>208</sup> se zasniva na redukciji u vodi rastvorne žute soli MTT u nerastvorni ljubičast formazan. MTT se metaboliše mitohondrijalnim reduktazama



jedino u živim ćelijama. Relativan broj vitalnih ćelija je određen spektrofotometrijski praćenjem apsorpcije rastvora nastalih formazana u DMSO. Ćelije su gajene u RPMI medijumu koji je kompletiran dodatkom antibiotika penicilin/streptomycin (1%, v/v) i goveđim serumom (10%, v/v). Ćelije su zasejane na ploči sa 96 bunara, gustina ćelija je bila  $1 \times 10^4$  ćelija po bunaru, u zapremini od 100  $\mu\text{L}$  kompletiranog RPMI medijuma i ostavljene su da se zalepe za dno suda preko noći u inkubatoru u atmosferi 5%  $\text{CO}_2$  na 37  $^\circ\text{C}$ . Ploče su ostavljene u inkubatoru na 48 h nakon čega se pažljivo odlije medijum a da se ne poremeti sloj ćelija zalepljen za dno bunara. Dodato je po 50  $\mu\text{L}$  svežeg sterilnog rastvora MTT (0,5 mg/mL u RPMI-u) u svaki bunar. Ploče su zatim inkubirane još 1h. Medijum i rastvor MTT-a su zatim uklonjeni pažljivo sa ploče kako ne bismo poremetili talog formazana na dnu bunara. Kristali su rastvoreni u po 50  $\mu\text{L}$  DMSO-a i merena je apsorbanca na 540 nm. Vrednosti apsorpcije tretiranih bunara su bile izražene kao procenat netretiranih kontrola u cilju dobijanja procentualnih vrednosti. Procentualne vrednosti su prikazane u funkciji koncentracija i iz dobijene krive su određene  $\text{IC}_{50}$  vrednosti.

#### 4.2.3.2 Antiproliferativna aktivnost sintetisanih konjugata derivata PHA i DP18L

Ćelijske linije humanog kancera pankreasa (*eng.* MiaPaCa) i humanih plućnih fibroblasta (MRC5) su čuvane u Dulbecco's izmenjenoj Eagle's podlozi (DMEM) u koju je dodato 2% (v/v) penicilina/streptomicina ( $50 \text{ U mL}^{-1}$ ), 1% l-glutamina (2 mM), i 10% inaktiviranog goveđeg seruma (FBS). Ćelijske linije su rutinski testitane na prisustvo mikoplazme pomoću MycoAlert detekcioni kit (Lonza, UK). Ćelijska viabilnost je testirana sa MTT kolorimetrijskim esejom koji je već u ranijem tekstu opisan.<sup>208</sup>



## 4.2.4 Konjugacija (*R*)-3-hidroksialkanskih kiselina i DP18L peptida

### 4.2.4.1 Razdvajanje 3-HA različite dužine niza dobijenih depolimerizacijom PHA

Razdvajanje PHA različite dužine ugljeničnog niza urađeno je prema proceduri koju su opisali Ruth i saradnici,<sup>61</sup> u laboratoriji prof. Kevin O'Connor-a (UCD, Irska).

Staklena kolona (50 cm, prečnika 1,5 cm) napunjena je sa 80 g silika reverzno faznog gela (COSMOSIL-C18-OPN, Nacalai Tesque, Japan). Pod pritiskom azota (oko 80 kPa) kolona je isprana sa 5 zapremina acetonitrila (ACN), zatim je kondicionirana dejonizovanom vodom koja sadrži 1% ACN i koja je zakišeljena do pH 2,2 sa HCl-om. Nanet je rastvor monomera u eluentu kojim je kondicionirana kolona, a zatim eluiran u gradijentu H<sub>2</sub>O/ACN=95/5 do H<sub>2</sub>O/ACN=50/50 i na kraju je kolona isprana čistim ACN-om. Detekcija sadržaja sakupljenih frakcija je vršena uzimanjem alikvota od svake i snimanjem na gasno-masenom spektrofotometru. Frakcije sa čistim monomerima su spojene u balonu, uparen je ACN pod sniženim pritiskom a zaostala voda je ekstrahovana tri puta sa metil-tercbutil etrom. Spojeni organski slojevi su isprani zasićenim vodenim rastvorom NaCl-a i sušeni iznad anh. MgSO<sub>4</sub>, rastvarač je uparen pod sniženim pritiskom i dobijene su čiste 3-HA kiseline.

### 4.2.4.2 Sinteza peptida DP18L

Peptid DP18L je sintetisan na Univerzitetkom koledžu u Dablinu (University college of Dublin, UCD), Republika Irska, u laboratoriji profesora Kevin O'Connor-a.

Peptid je sintetisan prema standardnoj proceduri za sintezu na čvrstoj podlozi<sup>209</sup>, na 433A peptid sintetičaru (Applied Biosystems, Warrington, UK). Za zaštitu amino-grupa je korišćen N-(9-fluorenil)-metoksi-karbonil (Fmoc) zbog blagih reakcionih uslova koji su potrebni za skidanje zaštitne grupe. Skidanje peptida sa podloge i uklanjanje zaštitne grupe urađeno je u jednom koraku mešanjem sa smešom trifluorosirćetne, vode, triizopropilsilana i 1,2-etanditiola, tokom 3 h na sobnoj temperaturi. Filtriranjem su uklonjene kuglice smole. Peptid je pretaložen iz hladnog





dietil-etra kao beli talog, osušen je u sušnici tokom 1 h, potom rastvoren u destilovanoj vodi i liofiliziran. Suv i sirov peptid je čuvan na  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  do korišćenja.

Dobijen je peptid sa preko 95% čistoće, što je procenjeno pomoću analitičke reverzno fazne tečne homatografije visoke performace. Karakterizacija je urađena pomoću masene spektrometrije Matrix Assisted LaserDesorption Ionization–tandem Time of Flight Mass Spectrometryon an AB SCIEX 4800 Plus MALDI-TOF/TOF MS (AB Sciex, Mas-sachusetts, USA) na matriksu  $\alpha$ -cijano-4-hidroksi-cimetnoj kiselini.

#### 4.2.4.2 Konjugacija DP18L i 3-HA

Konjugacija peptid DP18L i kiselina je urađena na Univerzitetkom koledžu u Dublinu (UCD), Republika Irska, u laboratoriji profesora Kevin O'Connor-a.

Peptid i ispitivane kiseline su konjugovani preko amidne veze izgrađene od karboksilne grupe kiseline i N-terminalne amino grupe peptida koji je vezan za smolu prema literaturnom postupku.<sup>204</sup> Smola je ostavljena da nabubri tokom 2 h u 5 mL DMF-a uz agitaciju na 200 rpm. Rastvarač je zatim zamenjen rastvorom kiseline (0,4 mmol), 4-(4,6-dimetoksi-1,3,5-triazin-2-il)-4-metilmorfolinium hlorid (DMTMM; 0,08 g, 0,3 mmol) i N,N-diizopropiletilamin (DIEA; 75  $\mu\text{l}$ , 0,6 mmol) u 5 mL DMF-a. Reakcija je ostavljena da se meša tokom 30 min na 200 rpm. Smola je isprana dva puta sa po 5 mL DMF-a, a zatim i dva puta sa po 5 mL DCM-a. Upotrebom kvalitativnog Kajzerovog testa<sup>210</sup> za detekciju slobodnih masnih kiselina pokazano je da je do konjugacije došlo. Merenjem molekulske mase pomoću MALDI-TOF-MS potvrđeno je da su nastali očekivani konjugati.





## 5. Zaključak

Osnova ovog istraživanja bila je korišćenje biotehnoški dobijenog polimera, koji se sastoji od hiralnih monomernih 3-hidroksialkanskih kiselina, kao platforme za dobijanje biološki aktivnih malih molekula. Upotrebom obnovljivog izvora, kao što je bioplastika, kao polaznog materijala za sintezu potencijalnih lekova ispratili smo težnje svetske industrije.

Sintetisali smo biblioteku od 18 derivata polazeći od (*R*)-3-hidroksioktanske kiseline. Dobijena jedinjenja su detaljno okarakterisana spektroskopskim metodama i testirana je njihova antimikrobna i antiproliferativna (citotoksična) aktivnost. Kako bismo ispitali značaj konfiguracije na hiralnom centru polazne kiseline za njenu biološku aktivnost, sintetisan je (*S*)-metil-3-hidroksioktanoat.

U okviru teze je ispitana mogućnost konjugacije 3-hidroksialkanskih kiselina različite dužine lanca i hemijski sintetisane 3-hlordekanske kiseline na antikancerski peptid kao i uticaj na promenu biološke aktivnosti peptida.

Pokazali smo da PHA može biti pogodan izvor za dobijanje derivata 3-hidroksioktanske kiseline. Prvo su dobijeni metil-estar, benzil-estar kao i slobodna 3-hidroksioktanska kiselina. Polazeći od 3-hidroksioktanske kiseline i njenih estara dobijeni su 3-halogen derivati oktanske kiseline, transformacijama u jednom koraku u umerinim i dobrim prinosima (32-100%). Reakcije za dobijanje ovih jedinjenja su praćene reakcijama eliminacije pri čemu je izolovana  $\alpha,\beta$ -oktanska kiselina i njeni estri, posebno prilikom dobijanja fluoro derivata. Prilikom dobijanja halogenih derivata oktanske kiseline dolazi i do delimične ili potpune racemizacije na hiralnom centru. Iako dobijena jedinjenja nemaju kompleksnu strukturu, u ovom radu je prvi put opisana sinteza deset novih derivata polazeći od 3-hidroksioktanske kiseline.

Oksidacijom polaznog monomera pomoću Collins-ovog reagensa dobijeni su  $\beta$ -keto-estri takođe u jednom koraku u prinosu od 80% i 97%. Upoređivanjem predloženog načina za njihovo dobijanja sa literaturno poznatim postupcima, naša sinteza se sastoji od manjeg broja koraka i ekonomski je isplativija.



Slobodne karboksilne kiseline su pokazale generalno veću antimikrobnu aktivnost u poređenju sa metil- i benzil-estrima. Njihova antibakterijska aktivnost je bila niska dok je nešto značajnije bilo antigljivično dejstvo. Međutim, neka od ovih jedinjenja utiču i na međucelijsku signalizaciju kod bakterija i gljiva što povećava njihovu potencijalnu primenu. S obzirom da se na taj način smanjuje virulentnost, te primena može biti i u kombinovanoj terapiji sa poznatim antibioticima. Zbog generalnog odsustva toksičnosti *in vitro*, sintetisana jedinjenja imaju značajnog potencijala za dalja ispitivanja.

Sintetisali smo (*S*)-3-hidroksioktansku kiselinu i pokazali da se aktivnost ne menja sa promenom konfiguracije na hiralmom centru. Kako se biotehnoški dobijen polimer sastoji isključivo od *R* enantiomera i do sada nisu otkriveni mikroorganizmi koji bi sintetisali polimer suprotne konfiguracije, naša dalja istraživanja biće usmerena na pokušaj hemijske polimerizacije *S* monomera u PHA polimer. Ovo bi potencijalno bio potpuno nov materijal sa novim osobinama koje bi tek trebalo ispitati.

Konjugacijom 3-hidroksialkanskih kiselina različite dužine lanca sa DP18L antikancerski peptidom došlo je promene njegove antikancerogene aktivnosti. Pokazali smo da (*R*)-3-hidroksidekanska kiselina najznačajnije povećava aktivnost antikancerogenog peptida DP18L, dok konjugacija sintetisanog derivata 3-hlordekanske kiseline nije dala dalje poboljšanje aktivnosti, bez obzira na veću citotoksičnost hlora u odnosu na hidroksi derivat.

Očekuje se da bi konjugacija drugih derivata dobijenih iz 3-hidroksialkanskih kiselina iz bakterijskog polimera PHA, sa već poznatim antikancerogenim agensima pružila nove mogućnosti za dalja istraživanja.



## 6. Conclusion

The aim of this study was to use a biotechnological obtained polymer, build from a chiral monomer 3-hydroxy alkanolic acid, as a platform for the preparation of biologically-active small molecules. By using renewable sources, such as bioplastics, as starting material for the synthesis of potential drugs, we followed tendencies of world industry.

We have synthesized a library of 18 derivatives from (*R*)-3-hydroxyoctanoic acid. The obtained compounds were characterized in detail by spectroscopic methods and tested for their antimicrobial and anti-proliferative (cytotoxic) activity. In order to examine the significance of the chiral center configuration of the starting acid for biological activity, (*S*)-methyl-3-hydroxyoctanoate was synthesized.

The possibility of conjugation 3-hydroxyalkanoic acids with different chain length and chemically synthesized 3-chlorooctanoic acid with anticancer peptide as well the impact on biological activity of the peptide was investigated within this thesis.

We have shown that PHA could be a suitable source for the preparation of derivatives of 3-hydroxyoctanoic acid. First, we obtained methyl ester, benzyl ester, as well as 3-hydroxyoctanoic acid. Starting from 3-hydroxyoctanoic acid, 3-halogen derivatives of octanoic acid and its esters were obtained in one step transformations, in good and moderate yields (32-100%). Reactions for the preparation of these compounds were accompanied by an elimination reaction wherein  $\alpha$ ,  $\beta$ -octene acid and esters thereof were isolated, particularly during preparation of fluoro derivatives.

In the preparation of halogenated octanoic acid derivatives, partial or complete racemization of the chiral center was obtained. Although the resulting compounds have a simple structure, this research for the first time describes the synthesis of ten new derivatives starting from 3-hydroxyoctanoic acid.

Oxidation of starting monomer with Collins reagent afforded  $\beta$ -keto esters, also in one step transformation with 80% and 97% yields. Comparing the proposed way of obtaining  $\beta$ -keto esters with the literature known procedures, our synthesis is composed of a small number of steps and is economically profitable.

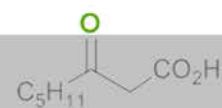
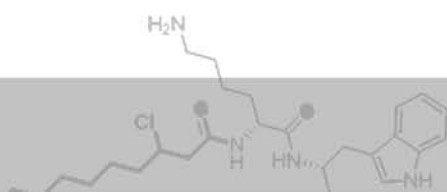
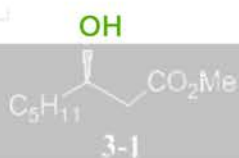


Free carboxylic acid showed generally higher antimicrobial activity compared to the methyl and benzyl esters. Their antibacterial activity was lower in comparison to antifungal activity. Some of these compounds affect the intracellular signaling in bacteria and fungi as well, which increases their potential application. Given the reduced virulence, free carboxylic acids could be applied in a combination therapy with known antibiotics. Due to the absence of general toxicity *in vitro*, synthesized compounds have significant potential for further study.

We have synthesized (*S*)-3-hydroxyoctanoic acid and showed that the activity does not change with a change in the configuration of the chiral center. As biotechnologically obtained polymer consists of *R* enantiomer exclusively, and microorganisms that synthesize polymer with opposite configuration have not been discovered, our further research will be focused on trying to do chemical polymerization of *S* PHA monomers in the polymer. This could potentially be an entirely new material with new properties to examine.

The conjugation of 3-hydroxyalkanoic acids with different chain length on anticancer peptide DP18L has changed its anticancer activity. We have shown that (*R*)-3-hydroxydecanoic acid increases the activity of the anticancer peptide DP18L, while the conjugation of the synthesized derivative 3-chlorodecanoic acid did not perform any further improvement of the activity, regardless of the greater cytotoxicity chloro compared to the hydroxy derivative.

It is expected that conjugation of other derivatives obtained from 3-hydroxyalkanoic acids from bacterial PHA polymers, with the known anti-cancer agents, could provide new opportunities for further research.



## 7. Literatura

1. J. H. Song, R. J. Murphy, R. Narayan and G. B. H. Davies, *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 2009, 364, 2127-2139.
2. E. Bioplastics, *Bioplastics: facts and figures*, 2013.
3. C. Vilela, A. F. Sousa, A. C. Fonseca, A. C. Serra, J. F. Coelho, C. S. Freire and A. J. Silvestre, *Polymer Chemistry*, 2014, 5, 3119-3141.
4. R. A. Sheldon, *Journal of Molecular Catalysis A: Chemical*, 1996, 107, 75-83.
5. M. Gavrilescu and Y. Chisti, *Biotechnology Advances*, 2005, 23, 471-499.
6. Y. Elbahloul and A. Steinbüchel, *Appl Environ Microbiol*, 2009, 75, 643-651.
7. T. Iwata, *Angewandte Chemie International Edition*, 2015, 54, 3210-3215.
8. N. Berezina and S. M. Martelli, in *Renewable Resources for Biorefineries*, The Royal Society of Chemistry, 2014, pp. 1-28.
9. G. A. M. van der Walle, G. J. M. de Koning, R. A. Weusthuis and G. Eggink, *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology* 2001, 71, 264-291.
10. R. P. Babu, K. O'Connor and R. Seeram, *Progress in Biomaterials*, 2013, 2, 1-16.
11. S. Li and M. Vert, in *Degradable Polymers: Principles and Applications*, ed. G. Scott, Springer Netherlands, Dordrecht, 2002, pp. 71-131.
12. J. Djonlagic and M. S. Nikolic, in *A Handbook of Applied Biopolymer Technology: Synthesis, Degradation and Applications*, The Royal Society of Chemistry, 2011, pp. 149-196.
13. S. Y. Lee, *Biotechnology and Bioengineering*, 1996, 49, 1-14.
14. L. I. de Eugenio, P. Garcia, J. M. Luengo, J. M. Sanz, J. S. Roman, J. L. Garcia and M. A. Prieto, *The Journal of Biological Chemistry*, 2007, 282, 4951-4962.
15. M. Tortajada, L. F. da Silva and M. A. Prieto, *International Microbiology*, 2013, 16, 1-15.
16. K. Ruth, G. d. Roo, T. Egli and Q. Ren, *Biomacromolecules*, 2008, 9, 1652-1659.
17. G.-Q. Chen, *Chemical Society Reviews*, 2009, 38, 2434-2446.
18. A. Steinbüchel and H. E. Valentin, *FEMS Microbiology Letters*, 1995, 128, 219-228.



19. S. Follonier, M. S. Goyder, A. C. Silvestri, S. Crelier, F. Kalman, R. Riesen and M. Zinn, *Int J Biol Macromol*, 2014, 71, 42-52.
20. J. Nikodinovic-Runic, M. Guzik, S. T. Kenny, R. Babu, A. Werker and K. O'Connor, *Adv Appl Microbiol*, 2013, 84, 139-200.
21. M. W. Guzik, S. T. Kenny, G. F. Duane, E. Casey, T. Woods, R. P. Babu, J. Nikodinovic-Runic, M. Murray and K. E. O'Connor, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 98, 4223-4232.
22. P. G. Ward, M. Goff, M. Donner, W. Kaminsky and K. E. O'Connor, *Environmental Science and Technology*, 2006, 40, 2433-2437.
23. S. T. Kenny, J. N. Runic, W. Kaminsky, T. Woods, R. P. Babu, C. M. Keely, W. Blau and K. E. O'Connor, *Environmental Science & Technology*, 2008, 42, 7696-7701.
24. G. Du and J. Yu, *Environmental Science & Technology*, 2002, 36, 5511-5516.
25. K. Sudesh, H. Abe and Y. Doi, *Progress in Polymer Science*, 2000, 25, 1503-1555.
26. L. L. Wallen and W. K. Rohwedder, *Environmental Science & Technology*, 1974, 8, 576-579.
27. B. H. Rehm, *Current Issues in Molecular Biology*, 2007, 9, 41-62.
28. A. K. Singh and N. Mallick, *Letters in Applied Microbiology*, 2008, 46, 350-357.
29. P. A. Holmes, in *Developments in Crystalline Polymers*, ed. D. C. Bassett, Springer Netherlands, Dordrecht, 1988, pp. 1-65.
30. P. Hofer, *Frontiers in Bioscience*, 2010, 15, 93-121.
31. M. Zinn, B. Witholt and T. Egli, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2001, 53, 5-21.
32. R. A. J. Verlinden, D. J. Hill, M. A. Kenward, C. D. Williams and I. Radecka, *Journal of Applied Microbiology*, 2007, 102, 1437-1449.
33. B. Nebe, C. Forster, H. Pommerenke, G. Fulda, D. Behrend, U. Bernewski, K. P. Schmitz and J. Rychly, *Biomaterials*, 2001, 22, 2425-2434.
34. S. F. Williams, D. P. Martin, D. M. Horowitz and O. P. Peoples, *International Journal of Biological Macromolecules*, 1999, 25, 111-121.
35. S. Y. Lee, Y.-H. Lee and F. Wang, *Biotechnology & Bioengineering*, 1999, 65, 363-368.





36. I. Marova, V. Kundrat, P. Benesova, P. Matouskova and S. Obruca, 15th International Conference on Nanotechnology, Year.
37. G.-Q. Chen and Q. Wu, *Biomaterials*, 2005, 26, 6565-6578.
38. G.-Q. Chen and Q. Wu, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2005, 67, 592-599.
39. G. A. M. van der Walle, G. J. M. De Koning, R. A. Weusthuis and G. Eggink, *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*, 2001, 71, 263-287.
40. R. Rai, T. Keshavarz, J. A. Roether, A. R. Boccaccini and I. Roy, *Materials Science and Engineering* 2011, R 72, 29-47.
41. D. P. Martin and S. F. Williams, *Biochemical Engineering Journal*, 2003, 16, 97-105.
42. L. Kostopoulos and T. Karring, *Clinical Oral Implants Research*, 1994, 5, 75-82.
43. H. W. K. Do Young Kim, M. G. Chung and Y. H. Rhee, *The Journal of Microbiology*, 2007, 87-97.
44. S. F. Williams, D. P. Martin, D. M. Horowitz and O. P. Peoples, *International Journal of Biological Macromolecules*, 1999, 25, 111-121.
45. P. L. Gould, S. J. Holland and B. J. Tighe, *International journal of pharmaceutics*, 1987, 38, 231-237.
46. Z. Wang, Y. Itoh, Y. Hosaka, I. Kobayashi, Y. Nakano, I. Maeda, F. Umeda, J. Yamakawa, M. Kawase and K. Yag, *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 2003, 95, 541-543.
47. H. W. Kim, C. W. Chung, S. J. Hwang and Y. H. Rhee, *International Journal of Biological Macromolecules*, 2005, 36, 84-89.
48. N. Dinjaski, M. Fernandez-Gutiarez, S. Selvam, F. J. Parra-Ruiz, S. M. Lehman, J. San Roman, E. Garcia, J. L. Garcia, A. J. Garcia and M. A. Prieto, 2014, 35, 14-24.
49. R. G. Lageveen, G. W. Huisman, H. Preusting, P. Ketelaar, G. Eggnik and B. Witholt, *Applied and Environmental Microbiology*, 1988, 54, 2924-2932.
50. B. M. Bachmann and D. Seebach, *Macromolecules*, 1999, 32, 1777-1784.
51. I. Noda, P. R. Green, M. M. Satkowski and L. A. Schechtman, *Biomacromolecules*, 2005, 6, 580-586.





52. L. R. Rieth, D. R. Moore, E. B. Lobkovsky and G. W. Coates, *Journal of the American Chemical Society*, 2002, 124, 15239-15248.
53. J. W. Kramer and G. W. Coates, *Tetrahedron*, 2008, 64, 6973-6978.
54. H. Rossignol, M. Boustta and M. Vert, *International Journal of Biological Macromolecules*, 1999, 25, 255-264.
55. K. Tajima, K. Iwamoto, Y. Satoh, R. Sakai, T. Satoh and T. Dairi, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2016, 100, 4375-4383.
56. M. Y. Lee, W. H. Park and R. W. Lenz, *Polymer*, 2000, 41, 1703-1709.
57. E. Renard, A. Poux, L. Timbart, V. r. Langlois and P. GuÃ©rin, *Biomacromolecules*, 2005, 6, 891-896.
58. M.-M. Bear, M.-A. s. Leboucher-Durand, V. Langlois, R. W. Lenz, S. Goodwin and P. GuÃ©rin, *Reactive and Functional Polymers*, 1997, 34, 65-77.
59. K. Grage, A. C. Jahns, N. Parlane, R. Palanisamy, I. A. Rasaih, J. A. Atwood and B. H. A. Rehm, *Biomacromolecules*, 2009, 10, 660-669.
60. Q. Ren, K. Ruth, L. Thony-Meyer and M. Zinn, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2010, 87, 41-52.
61. K. Ruth, A. Grubelnik, R. Hartmann, T. Egli, M. Zinn and Q. Ren, *Biomacromolecules*, 2007, 8, 279-286.
62. R. Noyori, M. Kitamura and T. Ohkuma, *PNAS*, 2004, 101, 5356-5362.
63. Z. Wang, C. Zhao, M. E. Pierce and J. M. Fortunak, *Tetrahedron: Asymmetry*, 1999, 10, 225-228.
64. C. Brown Herbert and P. V. Ramachandran, The boron approach to asymmetric synthesis, in *Pure and Applied Chemistry*, 1991, vol. 63, p. 307.
65. H. Becker and K. B. Sharpless, *Angewandte Chemie International Edition in English*, 1996, 35, 448-451.
66. M. Oikawa and S. Kusumoto, *Tetrahedron: Asymmetry*, 1995, 6, 961-966.
67. H. Tian, X. Jiao, P. Xie and X. Liang, *Tetrahedron Letters*, 2005, 46, 8579-8581.
68. C. D. Vanderwal and E. N. Jacobsen, *Journal of the American Chemical Society*, 2004, 126, 14724-14725.
69. Y.-C. Wang, D.-W. Su, C.-M. Lin, H.-L. Tseng, C.-L. Li and T.-H. Yan, *The Journal of Organic Chemistry*, 1999, 64, 6495-6498.



70. Y.-C. Wang and T.-H. Yan, *The Journal of Organic Chemistry*, 2000, 65, 6752-6755.
71. J. M. Concell<sup>3</sup>n and C. Concell<sup>3</sup>n, *The Journal of Organic Chemistry*, 2006, 71, 4428-4432.
72. R. Ocampo and W. R. Dolbier Jr, *Tetrahedron*, 2004, 60, 9325-9374.
73. P. G. Cozzi, *Angewandte Chemie International Edition*, 2006, 45, 2951-2954.
74. F. A. Jaipuri, M. Francisca Jofre, K. A. Schwarz and N. L. Pohl, *Tetrahedron Letters*, 2004, 45, 4149-4152.
75. G. Huang and R. I. Hollingsworth, *Tetrahedron: Asymmetry*, 1998, 9, 4113-4115.
76. K. Matsuyama and M. Ikunaka, *Tetrahedron: Asymmetry*, 1999, 10, 2945-2950.
77. J. Zhang, W. A. Duetz, B. Witholt and Z. Li, *Chemical Communications*, 2004, 2120-2121.
78. Z. Zheng, Q. Gong, T. Liu, Y. Deng, J.-C. Chen and G.-Q. Chen, *Applied and Environmental Microbiology*, 2004, 70, 3807-3813.
79. M. Utaoka, H. Watabu, H. Higashi, T. Sakai, S. Tsuboi and S. Torii, *The Journal of Organic Chemistry*, 1990, 55, 3917-3921.
80. S. Tahara and J. Mizutani, *Agricultural and Biological Chemistry*, 1978, 42, 879-883.
81. Q. Ren, K. Ruth, L. Thony-Meyer and M. Zinn, *Macromol Rapid Commun*, 2007, 28, 2131-2136.
82. Q. Ren, A. Grubelnik, M. Hoerler, K. Ruth, R. Hartmann, H. Felber and M. Zinn, *Biomacromolecules*, 2005, 6, 2290-2298.
83. G. de Roo, M. B. Kellerhals, Q. Ren, B. Witholt and B. Kessler, *Biotechnology and Bioengineering*, 2002, 77, 717-722.
84. K. Ruth, A. Grubelnik, R. Hartmann, T. Egli, M. Zinn and Q. Ren, *Biomacromolecules*, 2007, 8, 279-286.
85. D. Jendrossek and R. Handrick, *Annual Review of Microbiology*, 2002, 56, 403-432.
86. K. Numata, H. Abe and Y. Doi, *Canadian Journal of Chemistry*, 2008, 86, 471-483.
87. B. P. Calabia and Y. Tokiwa, *Biotechnology Letters*, 2006, 28, 383-388.



88. K. E. Jaeger, A. Steinbüchel and D. Jendrossek, *Applied and Environmental Microbiology*, 1995, 61, 3113-3118.
89. S. Y. Lee, Y. Lee and F. Wang, *Biotechnology and Bioengineering*, 1999, 65, 363-368.
90. J. Gangoiti, M. Santos, M. a. J. Llama and J. L. Serra, *Applied and Environmental Microbiology*, 76, 3554-3560.
91. L. Massieu, M. L. Haces, T. Montiel and K. Hernández-Fonseca, *Neuroscience*, 2003, 120, 365-378.
92. X.-H. Zou, H.-M. Li, S. Wang, M. Leski, Y.-C. Yao, X.-D. Yang, Q.-J. Huang and G.-Q. Chen, *Biomaterials*, 2009, 30, 1532-1541.
93. A. P. Desbois and V. J. Smith, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2010, 85, 1629-1642.
94. M. Kamachi, S. Zhang, S. Goodwin and R. W. Lenz, *Macromolecules*, 2001, 34, 6889-6894.
95. O. Tasaki, A. Hiraide, T. Shiozaki, H. Yamamura, N. Ninomiya and H. Sugimoto, *Journal of Parenteral and Enteral Nutrition*, 1999, 23, 321-325.
96. D. Seebach, G. F. Herrmann, U. D. Lengweiler, B. M. Bachmann and W. Amrein, *Angewandte Chemie International Edition in English*, 1996, 35, 2795-2797.
97. O. Dirat, C. Kouklovsky and Y. Langlois, *The Journal of Organic Chemistry*, 1998, 63, 6634-6642.
98. K.-i. Nihei, K. Hashimoto, K. Miyairi and T. Okuno, *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 2005, 69, 231-234.
99. F. Sarabia and S. Chammaa, *The Journal of Organic Chemistry*, 2005, 70, 7846-7857.
100. O. R. Martin, W. Zhou, X. Wu, S. Front-Deschamps, S. p. Moutel, K. Schindl, P. Jeandet, C. Zbaeren and J. A. Bauer, *Journal of Medicinal Chemistry*, 2006, 49, 6000-6014.
101. P. Gupta, S. Vasudeva Naidu and P. Kumar, *Tetrahedron Letters*, 2004, 45, 849-851.
102. T. Kiho, M. Nakayama and H. Kogen, *Tetrahedron*, 2003, 59, 1685-1697.
103. M. J. Rodriguez, M. Belvo, R. Morris, D. J. Zeckner, W. L. Current, R. K. Sachs and M. J. Zweifel, *Bioorganic & medicinal chemistry letters*, 2001, 11, 161-164.



104. N. Irako and T. Shioiri, *Tetrahedron Letters*, 1998, 39, 5793-5796.
105. T. Kiho, M. Nakayama, K. Yasuda, S. Miyakoshi, M. Inukai and H. Kogen, *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 2004, 12, 337-361.
106. S. Y. Lee and Y. Lee, *Applied and Environmental Microbiology*, 2003, 69, 3421-3426.
107. M. Hiramoto, K. Okada, S. Nagai and H. Kawamoto, *CHEMICAL & PHARMACEUTICAL BULLETIN*, 1971, 19, 1308-1314.
108. K. Mori and K. Otaka, *Tetrahedron Letters*, 1994, 35, 9207-9210.
109. S. Kobayashi, M. Matsumura, T. Furuta, T. Hayashi and S. Iwamoto, *Synlett*, 1997, 1997, 301-303.
110. M. Hirama, T. Noda and S. Ito, *The Journal of Organic Chemistry*, 1985, 50, 127-129.
111. J. D. Aebi, D. T. Deyo, C. Q. Sun, D. Guillaume, B. Dunlap and D. H. Rich, *Journal of Medicinal Chemistry*, 1990, 33, 999-1009.
112. Y. Ito, K. Ishida, S. Okada and M. Murakami, *Tetrahedron*, 2004, 60, 9075-9080.
113. V. Keri, C. Szabo, E. Aryai and J. Aronhime, Novel forms of pravastatin sodium, Google Patents, 2005.
114. C. Faveau, M. Mondon, J.-P. Gesson, T. Mahnke, S. Gebhardt and U. Koert, *Tetrahedron Letters*, 2006, 47, 8305-8308.
115. X. Zhang, R. Luo, Z. Wang, Y. Deng and G.-Q. Chen, *Biomacromolecules*, 2009, 10, 707-711.
116. L. J. Shallcross and S. C. Davies, *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 69, 2883-2885.
117. J. M. A. Blair, M. A. Webber, A. J. Baylay, D. O. Ogbolu and L. J. V. Piddock, *Nat Rev Micro*, 13, 42-51.
118. A. Fabbretti, C. O. Gualerzi and L. Brandi, *FEBS Letters*, 2011, 585, 1673-1681.
119. K. Bush, *Clinical Microbiology and Infection*, 2004, 10, 10-17.
120. J. J. Kabara, D. M. Swieczkowski, A. J. Conley and J. P. Truant, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 1972, 2, 23-28.



121. C. Q. Sun, C. J. O'Connor and A. M. Robertson, *FEMS Immunology & Medical Microbiology*, 2003, 36, 9-17.
122. A. Sandoval, E. Arias-Barrau, F. Bermejo, L. Caredo, G. n. Naharro, E. R. Olivera and J. M. Luengo, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2005, 67, 97-105.
123. N. M. Carballeira, *Progress in Lipid Research*, 2008, 47, 50-61.
124. J. Sjogren, J. Magnusson, A. Broberg, J. Schnurer and L. Kenne, *Applied and Environmental Microbiology*, 2003, 69, 7554-7557.
125. M. A. Pfaller, *The American Journal of Medicine*, 125, S3-S13.
126. R. C. Allen, R. Popat, S. P. Diggle and S. P. Brown, *Nat Rev Micro*, 12, 300-308.
127. J. P. Gerdt and H. E. Blackwell, *ACS Chemical Biology*, 9, 2291-2299.
128. M. B. M. and B. L. Bassler, *Annual Review of Microbiology*, 2001, 55, 165-199.
129. C. M. Waters and B. L. Bassler, *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 2005, 21, 319-346.
130. V. C. Kalia, *Biotechnology Advances*, 31, 224-245.
131. V. C. Kalia, S. Lal and S. Cheema, *Gene*, 2007, 389, 19-26.
132. Y. Deng, C. Boon, L. Eberl and L. H. Zhang, *J Bacteriol*, 2009, 191.
133. L. Kuznetsova, J. Chen, L. Sun, X. Wu, A. Pepe, J. M. Veith, P. Pera, R. J. Bernacki and I. Ojima, *Bioorganic & medicinal chemistry letters*, 2006, 16, 974-977.
134. J. G. Hurdle, A. J. O'Neill, I. Chopra and R. E. Lee, *Nature Reviews Microbiology*, 2011, 9, 62-75.
135. G. Zhanel, D. Calic, F. Schweizer, S. Zelenitsky, H. Adam, P. R. Lagace-Wiens, E. Rubinstein, A. S. Gin, D. J. Hoban and J. A. Karlowsky, *Drugs*, 2010, 70, 859-886.
136. H. Marcelo Zaldini, T. C. Suellen Melo, M. M. Diogo Rodrigo, J. Walter Filgueira de Azevedo and L. Ana Cristina Lima, *Current Drug Targets*, 11, 303-314.
137. R. F. Service, *Science*, 1996, 272, 1266-1268.
138. S. Purser, P. R. Moore, S. Swallow and V. Gouverneur, *Chemical Society Reviews*, 2008, 37, 320-330.
139. L. Lidia Moreira and J. B. Eliezer, *Current Medicinal Chemistry*, 2005, 12, 23-49.



140. C. Heidelberger, N. K. Chaudhuri, P. Danneberg, D. Mooren, L. Griesbach, R. Duschinsky, R. J. Schnitzer, E. Plevin and J. Scheiner, *Nature*, 1957, 179, 663-666.
141. J. Robertson, S. Come, S. Jones, L. Beex, M. Kaufmann, A. Makris, J. Nortier, K. Possinger and L.-E. Rutqvist, *European journal of cancer*, 2005, 41, 346-356.
142. G. Siegal, E. Ab and J. Schultz, *Drug Discovery Today*, 2007, 12, 1032-1039.
143. G. Gerebtzoff, X. Li-Blatter, H. Fischer, A. Frentzel and A. Seelig, *ChemBioChem*, 2004, 5, 676-684.
144. C. L. Gentry, R. D. Egleton, T. Gillespie, T. J. Abbruscato, H. B. Bechowski, V. J. Hruba and T. P. Davis, *Peptides*, 1999, 20, 1229-1238.
145. K. Fosgerau and T. Hoffmann, *Drug Discovery Today*, 20, 122-128.
146. D. Avrahami and Y. Shai, *Conjugation of a Magainin Analogue with Lipophilic Acids Controls Hydrophobicity, Solution Assembly, and Cell Selectivity*, 2002, vol. 41, pp. 2254-2263.
147. A. Malina and Y. Shai, *Conjugation of fatty acids with different lengths modulates the antibacterial and antifungal activity of a cationic biologically inactive peptide*, 2005, vol. 390, pp. 695-702.
148. *USA Pat, US7,671,011 B2*
149. S. Y. Shin, S. T. Yang, E. J. Park, S. H. Eom, W. K. Song, J. I. Kim, S. H. Lee, M. K. Lee, D. G. Lee, K. S. Hahm and Y. Kim, *Antibacterial, antitumor and hemolytic activities of  $\alpha$ -helical antibiotic peptide, P18 and its analogs*, 2001, vol. 58, pp. 504-514.
150. A. J. Moore, W. D. Beazley, M. C. Bibby and D. A. Devine, *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 1996, 37, 1077-1089.
151. M. Zasloff, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1987, 84, 5449-5453.
152. S. O'Connor, E. Szwej, J. Nikodinovic-Runic, A. O'Connor, A. T. Byrne, M. Devocelle, N. O'Donovan, W. M. Gallagher, R. Babu, S. T. Kenny, M. Zinn, Q. R. Zulian and K. E. O'Connor, *Biomaterials*, 34, 2710-2718.
153. R. C. Brinkerhoff, H. F. Tarazona, P. M. de Oliveira, D. C. Flores, C. D. R. Montes D'Oca, D. Russowsky and M. G. Montes D'Oca, *RSC Advances*, 2014, 4, 49556-49559.





154. M. Albert, D. Seebach, E. Duchardt and H. Schwalbe, *Helvetica Chimica Acta*, 2002, 85, 633-658.
155. S. Anessian, D. S. Dhanoa and P. L. Beaulieu, *Can J Chem*, 1987, 65, 1859.
156. J. C. Collins, W. W. Hess and F. J. Frank, *Tetrahedron Letters*, 1968, 9, 3363-3366.
157. A. Delgado, M. Ruiz, F. Camps, S. Hopital and A. Guerrero, *Chemistry and Physics of Lipids*, 1991, 59, 127-135.
158. M. Takashi, I. Daisuke and A. Akira, EPO Patent 1344763-A1, 2003.
159. A. P. Desbois and K. C. Lawlor, *Mar Drugs*, 2013, 11, 4544-4557.
160. Y. Elbahloul and A. Steinbüchel, *Applied and Environmental Microbiology*, 2009, 75, 643-651.
161. Y.-S. Hon, C.-H. Hsieh and Y.-W. Liu, *Tetrahedron*, 2005, 61, 2713-2723.
162. M. Sailer, K. I. Dubicki and J. L. Sorensen, *Synthesis*, 2015, 47, 79-82.
163. B. I. Kitir, M. Baldry, H. Ingmer and C. A. Olsen, Total synthesis and structural validation of cyclodepsipeptides solonamide A and B, in *Peptide Macrocycles*, vol. 70, pp. 7721-7732.
164. E. Marris, *Nature*, 2006, 443, 904-905.
165. A. I. Amano, Daisuke; Miura, Takashi Assignee, *Eur. Pat. Appl.*, 2003, 1344763
166. V. N. Kovganko and N. N. Kovganko, *Russian Journal of Organic Chemistry*, 42, 376-381.
167. Y. Doi and C. Abe, *Macromolecules*, 1990, 23, 3705-3707.
168. A. H. Arkin and B. Hazer, *Biomacromolecules*, 2002, 3, 1327-1335.
169. L. Desmaris, N. Percina, L. Cottier and D. Sinou, *Tetrahedron Letters*, 2003, 44, 7589-7591.
170. R. B. Nasir Baig, V. Sai Sudhir and S. Chandrasekaran, *Tetrahedron: Asymmetry*, 2008, 19, 1425-1429.
171. S. Biswas and D. J. Weix, *Journal of the American Chemical Society*, 135, 16192-16197.
172. L. Baptista, G. Bauerfeldt, G. Arbilla and E. Silva, *Journal of Molecular Structure: THEOCHEM*, 2006, 761, 73-81.
173. M. Hudlický, in *Organic Reactions*, John Wiley & Sons, Inc., 2004.





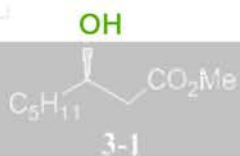
174. S. C. Case-Green, S. G. Davies, P. M. Roberts, A. J. Russell and J. E. Thomson, *Tetrahedron: Asymmetry*, 2008, 19, 2620-2631.
175. A. C. Giddens, L. Nielsen, H. I. Boshoff, D. Tasdemir, R. Perozzo, M. Kaiser, F. Wang, J. C. Sacchettini and B. R. Copp, *Tetrahedron*, 2008, 64, 1242-1249.
176. S. Benetti, R. Romagnoli, C. De Risi, G. Spalluto and V. Zanirato, *Chemical Reviews*, 1995, 95, 1065-1114.
177. J.-D. Lou, C.-L. Gao, Y.-C. Ma, L.-H. Huang and L. Li, *Tetrahedron Letters*, 2006, 47, 311-313.
178. S. Watanabe, T. Fujita, M. Sakamoto, T. Arai and T. Kttazume, *J Am Oil Chem Soc*, 1989, 66, 1312-1315.
179. S. Watanabe, T. Fujita, K. Suga and I. Nasuno, *Journal of Oil & Fat Industries* 1983, 60, 1678-1679.
180. N. Lokesh, S. L. Sachin, S. K. Mishra and N. Suryaprakash, *Chemical Physics Letters*, 640, 157-160.
181. J.-C. Hierso, *Chemical Reviews*, 114, 4838-4867.
182. J. F. Espinosa, *The Journal of Organic Chemistry*, 78, 12844-12847.
183. R. S. Coleman and E. B. Grant, *Tetrahedron Letters*, 1994, 35, 8341-8344.
184. N. Muramoto, K. Yoshino, T. Misaki and T. Sugimura, *Synthesis*, 45, 931-935.
185. S. F. Martin and J. A. Dodge, *Tetrahedron Letters*, 1991, 32, 3017-3020.
186. J. T. Hodgkinson, W. R. J. D. Galloway, M. Casoli, H. Keane, X. Su, G. P. C. Salmond, M. Welch and D. R. Spring, *Tetrahedron Letters*, 52, 3291-3294.
187. J. P. Gen<sup>at</sup>, C. Pinel, V. Ratovelomanana-Vidal, S. Mallart, X. Pfister, L. Bischoff, M. C. C. De Andrade, S. Darses, C. Galopin and J. A. Laffitte, *Tetrahedron: Asymmetry*, 1994, 5, 675-690.
188. B. Raja Mohamed, M. Subramanian and K. Shunmugiah, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 98, 6775-6785.
189. J. Kabara, D. M. Swieczkowski, A. J. Conley and J. P. Truant, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 1972, 2, 23-28.
190. E. Kodicek and A. N. Worden, *Biochemical Journal*, 1945, 39, 78-85.
191. C. W. Sheu and E. Freese, *Journal of Bacteriology*, 1972, 111, 516-524.
192. T. J. Avis and R. R. B<sup>l</sup>anger, *Applied and Environmental Microbiology*, 2001, 67, 956-960.



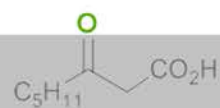
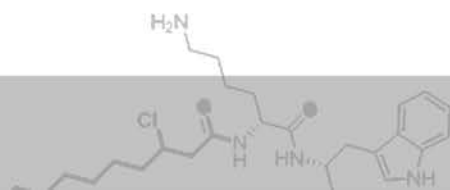
193. M. Marounek, E. Skrivanova and V. Rada, *Folia Microbiol*, 2003, 48, 731-735.
194. E. Skrivanova, O. G. Savka and M. Marounek, *Folia Microbiol*, 2004, 49, 199-202.
195. A. Sandoval, E. Arias-Barrau, F. Bermejo, L. Canedo, G. Naharro, E. Olivera and J. Luengo, *Appl Microbiol Biotechnol*, 2005, 67, 97-105.
196. A. D. Allen, P. Daley, F. O. Ayorinde, A. Gugssa, W. A. Anderson and B. E. Eribo, *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2012, 28, 2791-2800.
197. Y. Deng, C. Boon, S. Chen, A. Lim and L.-H. Zhang, *BMC Microbiology*, 2013, 13, 231.
198. K. W. Widmer, K. A. Soni, M. E. Hume, R. C. Beier, P. Jesudhasan and S. D. Pillai, *Journal of Food Science*, 2007, 72, M363-M368.
199. G. W. Lau, D. J. Hassett, H. Ran and F. Kong, *Trends in Molecular Medicine*, 2004, 10, 599-606.
200. M. A. Whooley and A. J. McLoughlin, *European Journal of Applied Microbiology and Biotechnology*, 1982, 15, 161-166.
201. J. Gibson, A. Sood and D. A. Hogan, *Applied and Environmental Microbiology*, 2009, 75, 504-513.
202. D. K. Morales, N. Grahl, C. Okegbe, L. E. Dietrich, N. J. Jacobs and D. A. Hogan, *mBio*, 2013, 4, e00526-00512.
203. S. O'Connor, E. Szwej, J. Nikodinovic-Runic, A. O'Connor, A. T. Byrne, M. Devocelle, N. O'Donovan, W. M. Gallagher, R. Babu, S. Kenny, M. Zinn, Q. R. Zulian and K. E. O'Connor, *Biomaterials*, 2013, 34, 2710-2718.
204. A. Falchi, G. Giacomelli, A. Porcheddu and M. Taddei, *Synlett*, 2000, 2000, 275-277.
205. W. L. F. Armarego and C. L. L. Chai, in *Purification of Laboratory Chemicals (Sixth Edition)*, Butterworth-Heinemann, Oxford, 2009, pp. 88-444.
206. H. G. Schlegel, H. Kaltwasser and G. Gottschalk, *Archives of Microbiology*, 1961, 308, 209-222.
207. A. R. Hume, J. Nikodinovic-Runic and K. E. O'Connor, *Journal of Bacteriology*, 2009, 191, 7554-7565.
208. M. B. Hansen, S. E. Nielsen and K. Berg, *Journal of Immunological Methods*, 1989, 119, 203-210.



209. B. Merrifield, *Science*, 1986, 232, 341-347.
210. E. Kaiser, R. L. Colescott, C. D. Bossinger and P. I. Cook, *Analytical Biochemistry*, 1970, 34, 595-598.



3-1



## Prilog A.

## Biološke aktivnosti

Tabela A. Antimikrobne osobine derivata 3-HA izražene kao zone inhibicije u mm oko diska na kome su naneta jedinjenja u dve koncentracije (50 µg i 500 µg/ disk)

Jedinjenje	<i>E. coli</i>		<i>Salmonella typhimurium</i>		<i>Staphylococcus aureus</i>		<i>Lysteria monocytogenes</i>		<i>Pseudomonas aeruginosa</i> PAO1		<i>Candida albicans</i>	
	50	500	50	500	50	500	50	500	50	500	50	500
3-1	0	5.5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
3-2	0	0.5	0	1	0	1	0	0.5	0	0.5	0	0
3-3	0	1	0	1.5	0.5	1.5	0	1	0.5	1.5	0	2.5
3-4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
3-5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
3-6	1	3	0.5	3	1	4	1	4	1	5	1	7
3-7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
3-8	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
3-9	0	1	0	0	0	0	0	1.5	0	0	0	0
3-10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3-11	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
3-12	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3-13	0	0	0	0	0	2	0	1.5	0	0	0	0
3-14	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2
3-15	0.5	3	0	2	0	1	0	1	0	0	0.5	10
3-16	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.5	3

				NH <sub>2</sub>								(1)
<b>3-17</b>	0	0	0	0.5	0	0.5	0	0.5	0	0	1	1.5
<b>3-18</b>	0	0	0	0.5	0	0	0.5	0.5	0	0	0.5	1.5
<b>3-23r</b>	0	1	0	1	0	0.5	0	0	0	0	0	1
<b>C8</b>	0	2	0	1.5	0	0.5	0	1	0	0	0	7
<b>C10</b>	0	1	0	1	0.5	1	0	1	0	0	1	4
<b>C12</b>	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0

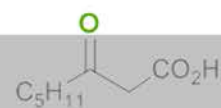
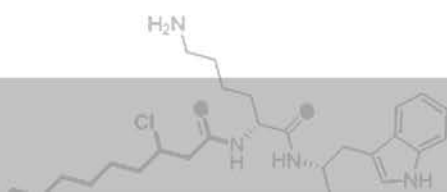
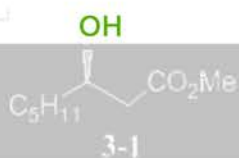
Tabela B. Izračunate i nađene mase peptida i konjugata peptida i (R)-3-hidoksialkanskih kiselina dobijenih tokom istraživanja

Peptid	Izračunata masa	Nađena masa
<b>DP18L</b>	2300	2300
<b>R6-DP18L</b>	2416	2415
<b>R7-DP18L</b>	2431	2430
<b>R8-DP18L</b>	2443	2442
<b>R9-DP18L</b>	2457	2457
<b>R10-DP18L</b>	2471	2471
<b>R11-DP18L</b>	2485	2485
<b>R12-DP18L</b>	2499	2499
<b>3-32-DP18L</b>	2489	2488



Tabela C. Antiproliferativna aktivnost 3-hidroksialkanskih kiselina različitih dužina lanca dobijenih iz PHA, prema humanim fibroblastima (MRC5) i ćelijama kancera (MiaPaCa). Vrednosti su prikazane u mikromolarnim koncentracijama ( $\mu\text{M}$ ) pri kojim dolazi do 50% inhibicije rasta ćelija ( $\text{IC}_{50}$ ).

Jedinjenje	MRC5	MiaPaCa
<b>R6</b>	1750 $\pm$ 15 <sup>a</sup>	1600 $\pm$ 10
<b>R7</b>	1550 $\pm$ 10	1250 $\pm$ 15
<b>R8</b>	2000 $\pm$ 20	2000 $\pm$ 20
<b>R9</b>	1750 $\pm$ 10	1800 $\pm$ 15
<b>R10</b>	2100 $\pm$ 15	2150 $\pm$ 15
<b>R11</b>	1750 $\pm$ 10	1550 $\pm$ 10
<b>R12</b>	2000 $\pm$ 20	1950 $\pm$ 20
<b>3-32</b>	1250 $\pm$ 20	950 $\pm$ 10



## Prilog B.

### Biografski podaci o kandidatu

**Jelena S. Radivojević** rođena je 27. jula 1987. godine u Prokuplju, Republika Srbija. Osnovnu školu i Gimnaziju završila je u Prokuplju. Hemijski fakultet Univerziteta u Beogradu, smer diplomirani hemičar je upisala 2006. godine. Diplomirala je 27. oktobra 2010. godine sa prosečnom ocenom 9,00 i ocenom 10 na završnom radu na Katedri za organsku hemiju. Master studije je završila 3. jula 2012. godine sa prosečnom ocenom 10,00 i ocenom 10 na master radu na Katedri za organsku hemiju.

Od 01.05.2013. godine do 01.03.2014. godine zaposlena je kao istraživač pripravnik na Institutu za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo Univerziteta u Beogradu i angažovana je na projektu „Izučavanje mikrobiološkog diverziteta i karakterizacija korisnih sredinskih mikroorganizama“ (MPNTR broj OI 173048), Ministarstva nauke prosvete i tehnološkog razvoja.

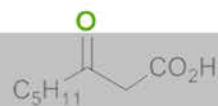
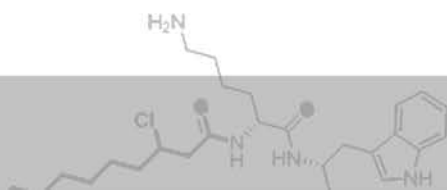
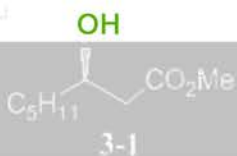
U zvanje istraživač saradnik izabrana je 01.03.2014. godine. Pored osnovnog projekta Ministarstva angažovana je i na projektu „Funkcionalizacija bakterijskih polimera“ BP2013 (finansiranog od strane malog to jest srednjeg preduzeća-“Bioplastech Ltd.“, Dablin, Irska) kao i na projektu ESCMID fondacije „Razvoj biopolimerne formulacije antifungalnih poliena koristeći poli(hidroksialkanoate) (PHA) srednje dužine lanca: Provera protiv površinskih mikoza“. Jelena Radivojević je pohađala letnju školu biokatalize „SysBioCat Training School 2014“ u Sijeni, Italija kao deo tima iz Srbije u okviru KOST akcije CM1303 („COST Action CM1303“). Takođe bila je stipendista iste KOST akcije za program „Kratka naučna misija“ u okviru koje je boravila mesec dana (avgust 2014. godine), u laboratoriji profesora Džona Varda na Univerzitetkom koledžu London (UCL), Departman za biohemijsko inženjerstvo, Engleska, gde je usavršila tehnike i metodologiju rada u okvirima biokatalize.

Kandidatkinja je držala vežbe iz predmeta Organska hemija 1 i Organska hemija 2 za studente biohemije i Osnove supramolekulske hemije i nanohemije za studente smera diplomirani hemičar na osnovnim studijama Hemijskog fakulteta.





Jelena Radivojević je član Osnovačkog i Upravnog odbora „Kluba mladih hemičara Srbije“ koji deluje u okviru „Srpskog hemijskog društva“ od 2009. godine. Bila je član organizacionog odbora „Prve konferencije mladih hemičara Srbije“, koja je održana 19. i 20. oktobra 2012. godine u Beogradu. U znak priznanja za uspešnu organizaciju Konferencije dobitnik je pohvalnice „Srpskog hemijskog društva“. Takođe, učestvovala je u organizacionom odboru Druge i Treće konferencije mladih hemičara Srbije.



## Izjava o autorstvu

Potpisana Jelena S. Radivojević

Broj upisa DH 31/2012

### Izjavljujem

da je doktorska disertacija pod naslovom

### „Monomeri poli(hidroksialkanoata) kao osnova za dobijanje biološki aktivnih jedinjenja“

- rezultat sopstvenog istraživačkog rada,
- da predložena disertacija u celini ni u delovima nije bila predložena za dobijanje bilo koje diplome prema studijskim programima drugih visokoškolskih ustanova,
- da su rezultati korektno navedeni i
- da nisam kršila autorska prava i koristila intelektualnu svojinu drugih lica.

Potpis doktoranda

U Beogradu,



## Izjava o istovetnosti štampane i elektronske verzije doktorskog rada

Ime i prezime autora Jelena S. Radivojević

Broj upisa DH31/2012

Studijski program doktor hemijskih nauka

Naslov rada „**Monomeri poli(hidroksialkanoata) kao osnova za dobijanje biološki aktivnih jedinjenja**“

Mentori dr Jasmina Nikodinović-Runić, naučni savetnik Instituta za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo Univerziteta u Beogradu  
dr Veselin Maslak, docent Hemijskog fakulteta Univerziteta u Beogradu

Potpisani \_\_\_\_\_

Izjavljujem da je štampana verzija mog doktorskog rada istovetna elektronskoj verziji koju sam predao za objavljivanje na portalu Digitalnog repozitorijuma Univerziteta u Beogradu.

Dozvoljavam da se objave moji lični podaci, vezani za dobijanje akademskog zvanja doktora nauka, kao što su ime i prezime, godina i mesto rođenja i datum odbrane rada. Ovi lični podaci mogu se objaviti na mrežnim stranicama digitalne biblioteke, u elektronskom katalogu i u publikacijama Univerziteta u Beogradu.

Potpis doktoranda

U Beogradu,



## Izjava o korišćenju

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

### „Monomeri poli(hidroksialkanoata) kao osnova za dobijanje biološki aktivnih jedinjenja“

koja je moje autorsko delo.

Disertaciju sa svim priložima predao sam u elektronskom format, pogodnom za trajno arhiviranje.

Moju doktorsku disertaciju, pohranjenu u Digitalni repozitorijum Univerziteta u Beogradu, mogu da koriste svi koji poštuju odredbe sadržane u odabranom tipu licence Kreativne zajednice (Creative Commons) za koju sam se odlučio.

1. Autorstvo
2. Autorstvo - nekomercijalno
3. Autorstvo – nekomercijalno – bez prerade
4. Autorstvo – nekomercijalno – deliti pod istim uslovima
5. Autorstvo – bez prerade
6. Autorstvo – deliti pod istim uslovima

(Molimo da zaokružite samo jednu od šest ponuđenih licenci).

Potpis doktoranda

U Beogradu,

## Spisak radova i saopštenja koji su proistekli iz teze:

### Naučni radovi:

1. Radivojević J., Škaro S., Šenerović L., Vasiljević B, Guzik M., S. T. Kenny, Maslak V., O'Connor K. E., Nikodinović-Runić J., Polyhydroxyalkanoate-based 3-hydroxyoctanoic acid and its derivatives as a platform of bioactive compounds. *Appl Microbiol Biotechnol*, 100, 161–172. (2016) **M21**
2. Szwey E, Devocelle M, Kenny S, Guzik M, O'Connor S, Nikodinović-Runić J, Radivojević J., Maslak V, Byrne AT, Gallagher WM, Zulian QR, Zinn M, O'Connor KE., The chain length of biologically produced (*R*)-3-hydroxyalkanoic acid affects biological activity and structure of anti-cancer peptides. *J. Biotechnology*, 204, 7–12. (2015) **M21**

### Kongresi i saopštenja:

1. Jelena Radivojević, Veselin Maslak, Branka Vasiljević, Kevin O'Connor, Jasmina Nikodinović-Runić, Funkcionalizacija bakterijskih polimera, IX Kongres Mikrobiologa Srbije, Beograd, 30. Maj-01. Jun 2013.

