

Utjecaj strukturne modifikacije na antimikrobnu aktivnost kurkuminskih derivata

Marić, Marina

Undergraduate thesis / Završni rad

2020

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Food Technology and Biotechnology / Sveučilište u Zagrebu, Prehrambeno-biotehnološki fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:159:461982>

Rights / Prava: [Attribution-NoDerivatives 4.0 International/Imenovanje-Bez prerada 4.0 međunarodna](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-10**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Food Technology and Biotechnology](#)



Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Preddiplomski studij Nutricionizam

Marina Marić

7370/N

**UTJECAJ STRUKTURNE MODIFIKACIJE NA
ANTIMIKROBNU AKTIVNOST KURKUMINSKIH
DERIVATA**

ZAVRŠNI RAD

Predmet: Organska kemija

Mentorica: Izv. prof. dr. sc. Veronika Kovač

Zagreb, 2020.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Završni rad

Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Preddiplomski sveučilišni studij Nutricionizam

Zavod za kemiju i biokemiju
Laboratorij za organsku kemiju

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti
Znanstveno polje: Nutricionizam

Utjecaj strukturne modifikacije na antimikrobnu aktivnost kurkuminskih derivata

Marina Marić, 00582101777

Sažetak: Kurkumin, polifenolni spoj prisutan u korijenu biljke *Curcuma longa*, posjeduje razna farmakološka svojstva, kao što je primjerice antimikrobna aktivnost. Kako je iskorištenje kurkumina u organizmu izrazito nisko, provedena su brojna istraživanja u svrhu poboljšanja njegove bioraspoloživosti. Ozbiljnu prijetnju javnom zdravstvu danas predstavlja mikrobiološka rezistencija na antibiotike pa se javila potreba za zamjenom konvencionalnih antibiotika drugim agensima, primjerice otkrivanjem novih, biološki aktivnijih i biodostupnijih spojeva kurkumina. U ovom je radu prikazano kako strukturna modifikacija utječe na antimikrobnu aktivnost različitih kurkuminskih derivata *in vitro*, a da bi se evaluirala aktivnost sintetiziranih spojeva *in vivo*, potrebne su daljnje studije.

Ključne riječi: antimikrobna aktivnost, kurkumin, kurkuminski derivati, mikrobna rezistencija

Rad sadrži: 37 stranica, 26 slika, 15 tablica, 22 literaturna navoda

Jezik izvornika: hrvatski

Rad je u tiskanom i elektroničkom obliku pohranjen u knjižnici Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, Kačićeva 23, 10 000 Zagreb

Mentor: izv. prof. dr. sc. Veronika Kovač

Datum obrane: 15. rujna 2020

BASIC DOCUMENTATION CARD

Bachelor thesis

University of Zagreb
Faculty of Food Technology and Biotechnology
University undergraduate study Nutrition

Department of Chemistry and Biochemistry
Laboratory of Organic Chemistry

Scientific area: Biotechnical Sciences

Scientific field: Nutrition

The effect of structural modifications on the antimicrobial activity of curcumin derivatives

Marina Marić, 00582101777

Abstract: Curcumin, polyphenolic compound present in the root of a plant *Curcuma longa*, possesses various pharmacological properties, such as antimicrobial activity. Due to curcumin's very low yield in organism, numerous studies were conducted to increase its bioavailability. Today microbiological resistance to antibiotics poses a serious threat to public health so there is the need to replace conventionally used antibiotics with other agents, for instance by discovering new, biologically more active and bioavailable compounds of curcumin. In this thesis it is shown how structural modification impacts antimicrobial activity of various curcumin derivatives *in vitro*, but in order to evaluate the activity of synthesized compounds *in vivo*, further studies are needed.

Keywords: antimicrobial activity, curcumin, curcumin derivatives, microbial resistance

Thesis contains: 37 pages, 26 figures, 15 tables, 22 references

Original in: Croatian

Thesis is in printed and electronic form deposited in the library of the Faculty of Food Technology and Biotechnology, University of Zagreb, Kačićeva 23, 10 000 Zagreb

Mentor: PhD Veronika Kovač, Associate Professor

Defence date: September 15th 2020

SADRŽAJ

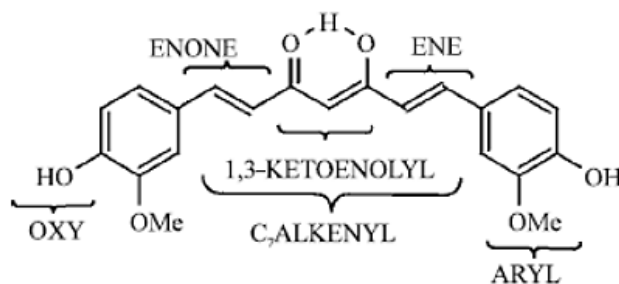
1. UVOD.....	1
2. TEORIJSKI DIO.....	2
2.1. Antimikrobna aktivnost kurkuminskih derivata s modificiranom alkenском i/ili fenolnom skupinom.....	2
2.1.1. Tetrahidrokurkumin (THC) konjugiran aminokiselinama.....	2
2.1.2. Kurkumin monoglukozid i diglukozid.....	4
2.1.3. Biokonjugati kurkumina s glicinom, alaninom, piperinskom kiselinom, glukozom i octenom kiselinom.....	5
2.1.4. Bioaktivni konjugati kurkumina s glicinom, glutaminskom kiselinom, valinom i demetiliranom piperinskom kiselinom.....	8
2.1.5. Biotinilirani kurkumin, kurkumin lipolat i izonikotinat.....	11
2.1.6. Metionin- i selenometionin-supstituirani kurkuminoidi, derivati s kafeinskom ili ferulinskom kiselinom te konjugati kurkuminoid-gliciretinska kiselina.....	12
2.2. Antimikrobna aktivnost kurkuminskih derivata s modificiranom aktivnom metilenskom skupinom.....	16
2.2.1. Sumporni heterociklički derivati kurkumina.....	16
2.2.2. Konjugati kurkumina s aminokiselinama vs. s nukleozidima.....	17
2.3. Antimikrobna aktivnost kurkuminskih derivata s modificiranim 1,3-diketonskim dijelom.....	18
2.3.1. Pirazolni derivati kurkumina.....	18
2.3.1.1. CPMD-6d dihidroklorid (kurkumin-pirazol-Mannich derivat).....	22
2.3.2. Diazepinski derivat kurkumina.....	24
2.3.3. Tiopirimidinski analog kurkumina.....	24
2.3.4. 3,4-dihidropirimidinonski derivati kurkumina s 4-arilnim supstituentom.....	25
2.3.5. Monokarbonilni analozi kurkumina.....	28
2.3.5.1. Monokarbonilne hibridne molekule kurkumina.....	30
3. ZAKLJUČAK.....	33
4. LITERATURA.....	35

1. UVOD

Kurkumin [1,7-bis(4-hidroksi-3-metoksifenil)-1,6-heptadiene-3,5-dion], fitopolifenolni pigment izoliran iz korijena biljke kurkume (lat. *Curcuma longa* L.), poznat je po širokom spektru farmakoloških svojstava, između ostalog po vrlo snažnoj antimikrobnoj aktivnosti.

Njegovu primjenu kao terapeutik ograničavaju farmakokinetičke karakteristike kao što su loša bioraspoloživost, brz metabolizam te potreba za ponavljajućim unosom oralnih doza da bi se postigla značajna koncentracija unutar stanice. Cilj je otkriti nove, biološki aktivnije i biodostupnije spojeve kurkumina budući da mikrobiološka rezistencija na antibiotike u današnje vrijeme predstavlja ozbiljnu prijetnju javnom zdravlju te poprima sve veću važnost u svijetu. Zbog toga znanstvenici, modificirajući kemijsku strukturu kurkumina, sintetiziraju njegove analoge sa snažnijom antimikrobnom aktivnošću.

Molekula kurkumina sadrži dvije fenolne i jednu aktivnu metilensku skupinu, te 1,3-diketonski, alkeni i enonski dio što su odlični položaji za bilo koju kemijsku modifikaciju, uključujući kovalentno vezanje biomolekula za sintezu biokonjugata (Mishra i sur., 2005, Bukhari i sur., 2013). Njegova kemijska struktura i mjesta pogodna za strukturne modifikacije prikazani su na Slici 1.



Slika 1. Moguća mjesta za strukturne modifikacije kurkumina (Bukhari i sur., 2013).

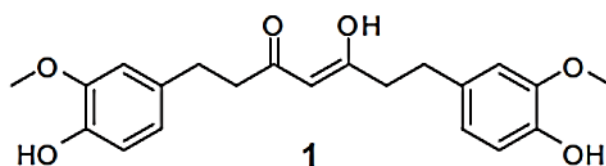
Cilj je ovog rada prikazati antimikrobnu aktivnost različitih kurkuminskih derivata počevši od onih gdje su kurkuminu modificirane fenolne skupine pa sve do onih kojima je promijenjena aktivna metilenska skupina, odn. 1,3-diketonski dio.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. Antimikrobna aktivnost kurkuminskih derivata s modificiranom alkenском i/ili fenolnom skupinom

2.1.1. Tetrahidrokurkumin (THC) konjugiran aminokiselinama

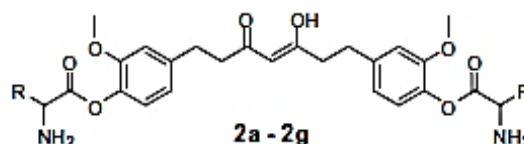
Iako posjeduje obećavajući potencijal kao terapeutik, mnoge studije upućuju na to da je kurkumin u fiziološkim uvjetima nestabilan, te se *in vivo* metabolizira do reduciranih oblika. Tetrahidrokurkumin (THC, **1**) glavni je metabolit kurkumina, njegova hidrogenirana, lipofilnija i stabilna forma, a posjeduje njemu sličnu fiziološku i farmakološku aktivnost. Kemijska struktura THC-a prikazana je na Slici 2.



Slika 2. Kemijska struktura tetrahidrokurkumina (Manjunatha i sur., 2013).

Zbog svega navedenog stvoren je velik interes za sintezom konjugata THC-a i aminokiselina kako bi se istražila njihova bioaktivna svojstva. U studiji Manjunatha i sur. (2013) sintetizirano je sedam novih konjugata THC-a sa sljedećim aminokiselinama: alanin (2a), izoleucin (2b), prolin (2c), valin (2d), fenilalanin (2e), glicin (2f) i leucin (2g), čije su kemijske strukture prikazane na Slici 3.

2a: R = -CH₃; **b, 1b, 2b:** R = -CH(CH₃)C₂H₅;
2c: R = -(CH₂)₃- as part of pyrrolidine ring;
2d: R = -CH(CH₃)₂; **e, 1e, 2e:** R = -CH₂(C₆H₅);
2f: R = -H; **g, 1g, 2g:** R = -CH₂CH(CH₃)₂



Slika 3. Kemijske strukture konjugata THC-aminokiseline (Manjunatha i sur., 2013).

Antimikrobna aktivnost dobivenih konjugata testirana je *in vitro* na dvije gram-pozitivne (*Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*) i dvije gram-negativne bakterije (*Escherichia coli*, *Yersinia enterocolitica*) određivanjem minimalne inhibitorne koncentracije

(MIC) - najmanja koncentracija komponente koja inhibira rast ispitivane bakterije. U Tablici 1. prikazane su MIC vrijednosti za THC i njegove derivate s aminokiselinama.

Tablica 1. MIC konjugata THC-aminokiseline na gram-pozitivne i gram-negativne bakterije (Manjunatha i sur., 2013).

Compounds	MIC (μMol)			
	<i>B. cereus</i>	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>	<i>Y. enterocolitica</i>
1	1066	1329	1723	2114
2a	340	437	583	777
2b	334	459	543	585
2c	309	353	485	618
2d	263	482	526	657
2e	337	487	600	750
2f	257	360	514	617
2g	334	376	501	585

Iz Tablice 1. vidi se da su svi sintetizirani spojevi (2a-2g) pokazali znatno veću antimikrobnu aktivnost u usporedbi s THC (1). Konjugati THC-glicin i THC-valin (**2f i 2d**) pokazali su najbolji učinak na *B. cereus* budući da su njihove MIC vrijednosti najniže (257 i 263 μmola), a spojevi 2c, 2f i 2g ističu se svojim znatno nižim MIC vrijednostima na *S. aureus* u usporedbi s THC. Što se tiče gram-negativnih bakterija, MIC vrijednosti svih derivata bile su međusobno podjednake, no veće nego vrijednosti na gram-pozitivne bakterije, ali i dalje puno niže u usporedbi s odgovarajućim vrijednostima za THC. Ispitan je i utjecaj spojeva 1 i 2a-2g pri različitim koncentracijama na rast istih bakterija. Pritom se spoj **2f** pokazao kao najveći inhibitor rasta svih ispitivanih bakterija.

Aminokiselinski dio derivata čini THC konjugate hidrofilnijima, pospješujući ulazak kovalentno vezanog THC u bakterijsku stanicu. Veća antimikrobna aktivnost THC-konjugata stoga bi se mogla pripisati njihovoj većoj koncentraciji *per se* u bakterijskoj stanici ili tome što THC može biti oslobođen *in vivo* pucanjem esterske veze (Manjunatha i sur., 2013). Primijećen je trend veće rezistencije gram-negativnih bakterija u odnosu na gram-pozitivne, što može biti posljedica činjenice da potonje posjeduju vanjski sloj peptidoglikana koji je propustan, odnosno ne predstavlja dobru barijeru. Vanjska fosfolipidna membrana gram-negativnih bakterija nepropusna je za lipofilne otopljene tvari, a porini u membrani tvore selektivnu barijeru hidrofilnim otopljenim tvarima. Ta svojstva čine gram-negativne bakterije

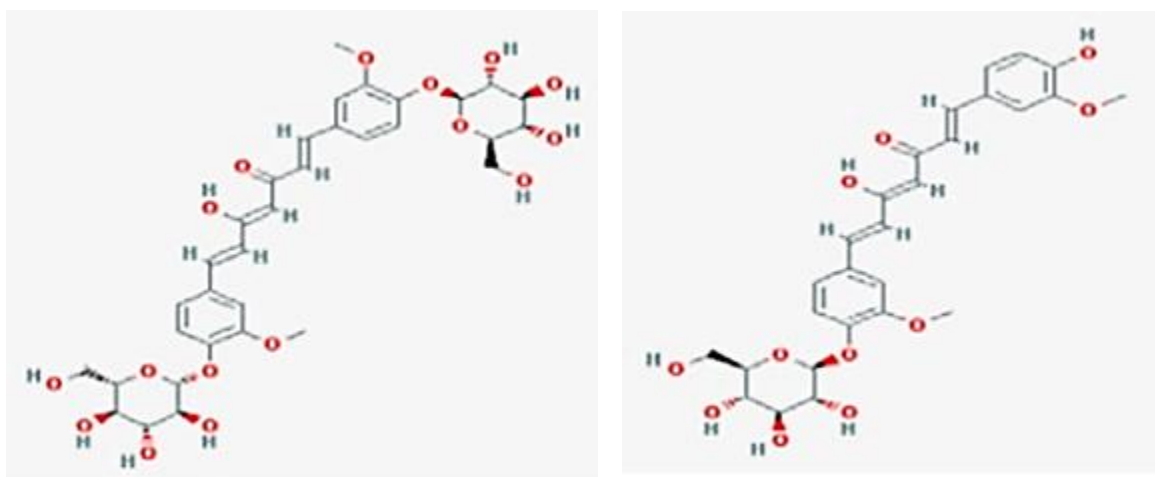
otpornijima na antibakterijske komponente, odnosno MIC vrijednosti derivata 2a-2g puno su veće kod gram-negativnih bakterija nego kod gram-pozitivnih.

Zaključno, antibakterijska svojstva tetrahidrokurkumina poboljšana su prisustvom esterske veze dobivene konjugacijom njegove fenolne skupine s aminokiselinama, a novosintetizirane molekule mogle bi naći farmakološku i prehrambenu primjenu.

2.1.2. Kurkumin monogluko­zid i digluko­zid

Streptococcus pneumoniae, gram-pozitivna i fakultativno anaerobna bakterija, obično je kod ljudi kao patogen prisutna u gornjem respiratornom traktu te može uzrokovati infekcije koje vode do po život opasnih bolesti. Posljednjih se godina zamijetilo alarmantno povećanje rezistencije sojeva *S. pneumoniae* što je dovelo do velike zabrinutosti i potrebe za razvojem novih antibiotika. Proučavanjem kurkumina i njegovih derivata uočena je njihova potencijalna aktivnost protiv mnogih bolesti poput raka i Alzheimerove bolesti te antiupalni i antimikrobni učinak, što je privuklo pažnju mnogih znanstvenika.

Li i sur. (2016) proučavali su antimikrobna svojstva kurkumina i njegovih sintetskih derivata na tri različita soja *S. pneumoniae* (penicilin osjetljiv, srednje osjetljiv i otporan soj) određivanjem zone inhibicije bakterijskog rasta i minimalne inhibitorne koncentracije (MIC). Korišteni su ugljikohidratni derivati kurkumin monogluko­zid i digluko­zid (Slika 4. prikazuje njihove kemijske strukture), te heksahidrokurkumin, tetrahidrokurkumin, bisdemetoksikurkumin i demetoksikurkumin.



Slika 4. Kemijske strukture kurkumin digluko­zida (lijevo) i kurkumin monogluko­zida (desno) (Li i sur., 2016).

Rezultati ispitivanja prikazani su u Tablici 2. iz koje se vidi da kurkumin monoglukozid, kurkumin diglukozid i kurkumin posjeduju jaka antimikrobna svojstva na sva tri ispitana soja *S. pneumoniae*, dok bisdemetoksikurkumin, demetoksikurkumin i tetrahidrokurkumin nisu pokazali zonu inhibicije kod penicilin-rezistentnog soja. Da bi se bolje razumjelo faktore koji utječu na inhibiciju rasta ovih sojeva, određene su MIC vrijednosti, također prikazane u Tablici 2. Među MIC vrijednostima ističe se ona kurkumin monoglukozi kod penicilin-osjetljivog i srednje osjetljivog soja (5 µg/mL).

Tablica 2. Zona inhibicije i MIC vrijednosti kurkumina i njegovih derivata na penicilin-osjetljivi, srednje osjetljivi i rezistentni soj *S. pneumoniae* (Li i sur., 2016).

SN	Compound	Penicillin-susceptible		Penicillin-intermediate		Penicillin-resistant	
		ZI (mm) 250 µg/ml	MIC (µg/mL)	ZI (mm) 250 µg/mL	MIC (µg/mL)	ZI (mm) 250 µg/mL	MIC (µg/mL)
1	Bisdemethoxycurcumin	15	200	13	200	13	200
2	Curcumin	20	10	20	15	>20	>15
3	Curcumin diglucoside	22	7	24	10	>20	10
4	Curcumin monoglucoside	25	5	25	5	>20	10
5	Demethoxycurcumin	-	100	-	100	-	>100
6	Hexahydrocurcumin	-	200	-	200	-	200
7	Penicillin G (control)	18	15	15	20	-	>50
8	Tetrahydrocurcumin	10	80	-	80	-	80

Zaključno, kurkumin te njegovi derivati kurkumin monoglukozid i kurkumin diglukozid mogu biti propisani kao lijek protiv penicilin-rezistentne *S. pneumoniae* koja može uzrokovati infekcije i po život opasne bolesti poput meningitisa.

2.1.3. Biokonjugati kurkumina s glicinom, alaninom, piperinskom kiselinom, glukozom i octenom kiselinom

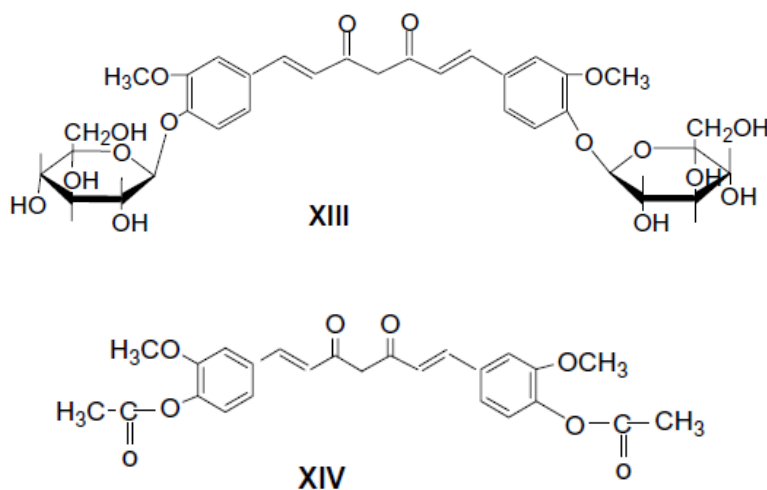
Stanovnici azijskih zemalja kurkumin unose svakodnevno (npr. za liječenje rana) već stoljećima, a slučajevi toksičnog djelovanja još nisu zabilježeni, što ga čini atraktivnim spojem za istraživanja. Piperin, alkaloid prisutan u crnom papru, već se dugo primjenjuje u ayurvedskom liječenju zbog svoje farmakološke aktivnosti, a kod eksperimenata na životinjama primijećeno je da povećava bioraspodivnost nekih lijekova, uključujući kurkumin.

U studiji koju su proveli Mishra i sur. (2005) odabrane su sljedeće molekule za sintezu konjugata s kurkuminom: glicin, D-alanin, glukoza i acetat. Njih bakterijska/fungalna stanica može prepoznati jer su im one esencijalne komponente. Primjerice, D-alanin esencijalna je komponenta stanične stijenke mnogih bakterija. Kada se takvi spojevi kovalentno vežu na molekulu kurkumina, mogu djelovati kao nosači koje onda stanice prepoznaju. Na taj se način može povećati dopremanje kurkumina u stanicu.

Glavne svrhe sinteze ovih biokonjugata bile su:

- (1) olakšati transmembranski prijenos kurkumina kako bi ga u stanici bilo u dovoljnoj koncentraciji
- (2) usporiti metaboliziranje kurkumina unutar stanice
- (3) povećati hidrofilnost kurkumina
- (4) dobiti biorazgradivu vezu u biokonjugatu kako bi se ona mogla degradirati staničnim enzimima otpuštajući kurkumin na ciljno mjesto (stoga su konjugirane samo fenolne skupine kurkumina).

Slika 5. prikazuje kemijske strukture derivata kurkumina s glukozom i octenom kiselinom.



Slika 5. Kemijska struktura kurkumin-4,4'-di- β -D-glukopiranozida (**XIII**) i diacetatnog derivata kurkumina (**XIV**) (Mishra i sur., 2005).

Rezultati *in vitro* testa osjetljivosti nekih multirezistentnih bakterija prikazani su u Tablici 3. Za testiranje su odabrani patogeni koji uzrokuju sekundarne infekcije kod ljudi, zajedno s još nekim gram-pozitivnim i gram-negativnim bakterijama.

Tablica 3. MIC ($\mu\text{mol/mL}$) biokonjugata na bakterijske sojeve (Mishra i sur., 2005).

Name of bacteria	I	II	III	IV	V	VII	VIII	X	XIII	XIV	Cefepime
<i>E. coli</i>	20	—	20	—	—	10	10	10	10	2.5	18
<i>S. aureus</i>	20	5	10	—	—	—	10	5	10	20	20
<i>P. aeruginosa</i>	—	10	—	20	—	5	2.5	2.5	—	—	12
<i>P. pyocynin</i>	—	10	5	—	—	10	2.5	5	—	—	8
<i>E. cloacae</i>	—	20	—	20	—	20	10	10	—	5	18
<i>K. aerogenus</i>	—	—	—	10	20	—	—	10	5	—	12
<i>S. epidermidis</i>	10	5	10	20	20	10	10	10	—	10	8
<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	—	5	5	—	—	10	5	10	10	20	10
<i>Micrococcus</i>	—	5	5	—	—	—	10	5	10	—	—
<i>E. aerogen</i>	—	—	—	—	—	—	—	10	20	—	—
<i>Enterococcus</i>	20	—	20	—	10	—	5	—	—	20	—

(—) Resistant.

Piperoil-kurkumin (**X**) značajno je djelovanje pokazao na *P. aeruginosa* (MIC 2,5 $\mu\text{mol/mL}$). Pri istim je koncentracijama kurkumin diacetat (**XIV**) 2,8 puta učinkovitiji od cefepima, jednog od najprodavanijih antibiotika. Primijećeno je da kurkumin izravno povezan s piperinskom kiselinom ima relativno bolji učinak na gram-negativne bakterije u usporedbi s gram-pozitivnim. Značajno je i to da se antibakterijska aktivnost kurkumin-diglicinoil konjugata (**II**) višestruko povećala daljnjim kovalentnim povezivanjem s piperinskom kiselinom (V). Kurkumin diacetat (**XIV**) najbolje rezultate pokazuje na *E. coli* (MIC 2,5 $\mu\text{mol/mL}$). Acetilne su skupine na kurkumin vezane biorazgradivim, esterskim vezama koje se lako pocijepaju enzimima te se na ciljnom mjestu otpušta kurkumin.

Evaluirana je i antifungalna aktivnost kurkumina i njegovih biokonjugata *in vitro* na specifične plijesni (*Aspergillus fumigatus*) i kvasce (*Candida krusei* GO3, *Candida glabrata* i *Candida albicans*). Te su gljivice posebno poznate kao uzročnici infekcija na noktima zvanih onihomikoze. U Tablici 4. prikazani su rezultati testa antifungalne aktivnosti.

Tablica 4. Antifungalna aktivnost biokonjugata kurkumina (zona inhibicije u mm) na sojeve gljivica (Mishra i sur., 2005).

Name of fungi	I	II	III	IV	V	VII	VIII	X	XIII	XIV	Fluconazole
<i>A. fumigatus</i>	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
<i>C. krusei</i> GO3	19	—	—	—	—	—	—	—	—	—	19
<i>C. glabrata</i>	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	15
<i>C. albicans</i> (yeast)	15	—	—	—	—	19	24	—	—	—	29

(—) Resistant.
 Curcumin (I); 4,4'-(di-*O*-glycinoyl)-curcumin (II); 4,4'-(di-*O*-alaninoyl)-curcumin (III); piperine (IV); piperic acid (V); piperoyl glycine (VII); 4,4'-(di-*O*-glycinoyl-di-*N*-piperoyl)-curcumin (VIII); 4,4'-(di-*O*-piperoyl)-curcumin (X); curcumin-4,4'-(di-*O*- β -D-glucopyranoside) (XIII); 4,4'-(di-*O*-acetyl)-curcumin (XIV).

Iz Tablice 4. vidljivo je da su piperoil glicin (**VII**) i 4,4'-(di-*O*-glicinoil-di-*N*-piperoil) kurkumin (**VIII**) pokazali bolju antifungalnu aktivnost, pogotovo kod *C. albicans*, nego sami kurkumin (I), piperin (IV) i piperinska kiselina (V), što je najvjerojatnije rezultat njihovog povećanog unosa u stanicu gljivice. Ovi su rezultati poprilično ohrabrujući, budući da su antifungalni lijekovi poprilično rijetki, a gljivične infekcije postojane. Antifungalna aktivnost biokonjugata kurkumina uspoređena je sa standardnim lijekom protiv gljivica, flukonazolom - značajniji rezultati postignuti su kod *C. albicans*, dok je primjerice u slučaju s *C. krusei* GO3 razlika bila neznatna.

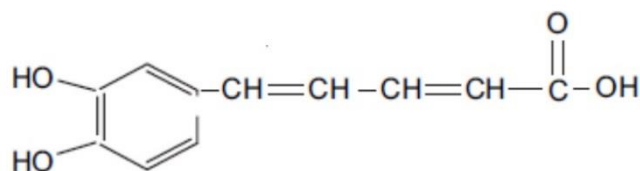
Zaključno, u fizičkoj smjesi dvaju spojeva iz začina, odnosno kurkumina i piperina, bioraspoloživost se povećava te potonji može djelovati kao katalizator (Mishra i sur., 2005). Zato je potrebno sintetizirati više ovakvih biokonjugata u kojima je jedna od komponenti konjugiranih s kurkuminom uobičajena staničnoj stijenci bakterije ili bakterijskom genomu. Na taj bi se način povećala efikasnost kurkumina pri malim dozama te bi on mogao biti bolji

sistemski lijek, koncentrirajući se prvenstveno u i okolo zloćudnih stanica i prepoznavajući bakterijske stanice.

Konvencionalno se za ubijanje bakterija, inhibiciju njihove diobe te sprječavanje replikacije bakterijskog genoma koriste antibiotici. No kako je njihovom upotrebom kod ljudi i stoke došlo do brze evolucije mutanata bakterija rezistentnih na mnoge lijekove, javila se potreba za zamjenom konvencionalnih antibiotika drugim agensima. Najbolji je primjer antibiotik penicilin čiju amidnu vezu u β -laktamskom prstenu hidrolizira bakterijska β -laktamaza uz nastajanje kiselih derivata bez antibakterijskih svojstava, čineći bakteriju otpornom na taj antibiotik. Da bi se razvio novi arsenal agensa aktivnih protiv bakterija rezistentnih na antibiotike, mogli bi se osmisliti nekonvencionalni antibiotici koji se lako mogu ugraditi u staničnu stijenku bakterije (Mishra i sur., 2005).

2.1.4. Bioaktivni konjugati kurkumina s glicinom, glutaminskom kiselinom, valinom i demetiliranom piperinskom kiselinom

Tradicionalno znanje o tome da crni papar (piperin) pomiješan s kurkumom (kurkuminom) povećava aktivnost potonje nekoliko puta iskoristili su Dubey i sur. (2008), te su u svojoj studiji opisali pripravu diesterskog konjugata kurkumina i demetilirane piperinske kiseline (XV) (Slika 6.) prvenstveno kako bi se procijenila uloga metilendioksi skupine kurkumina, te ispitao utjecaj slobodnih hidroksilnih skupina demetiliranog piperinskog dijela konjugata na povećanje aktivnosti, odnosno bioraspoloživosti.



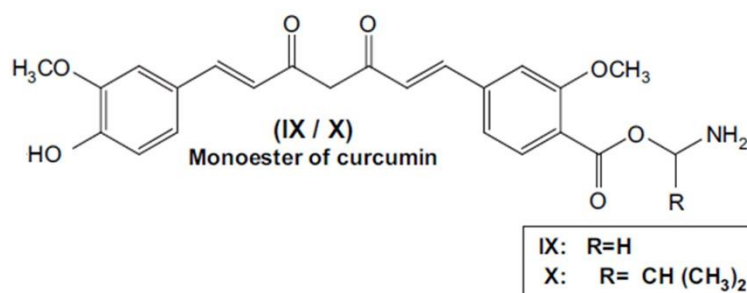
Slika 6. Kemijska struktura demetilirane piperinske kiseline (XV) (Dubey i sur., 2008).

Kao što je već prije spomenuto, esterske veze na kurkuminu su biodegradibilne - enzimi esteraze mogu ih hidrolizirati, otpuštajući kurkumin na ciljno mjesto. Stoga ovi konjugati mogu djelovati kao prolijekovi - biološki neaktivne tvari koje se, kada dospiju u organizam, putem metabolizma pretvaraju u biološki aktivne lijekove.

Osnova brojnih bioloških aktivnosti kurkumina prisustvo je dvaju fenilnih prstenova u njegovoj kemijskoj strukturi povezanih lancem od sedam C atoma te β -diketo uloga (karbonilne skupine kao akceptori vodika, C_4 atom kao donor). Budući da konjugati

kurkumina s modificiranom aktivnom metilenskom skupinom, kao i oni koji su sadržavali karbonilnu skupinu, nisu pokazali povećanje aktivnosti, jedina alternativa bilo je korištenje biodegradibilne (esterske) veze u hidrosilnim skupinama fenola (Dubey i sur., 2008). Već je bilo poznato da konjugati (fenolni esteri) kurkumina s nekim aminokiselinama pokazuju puno bolja antibakterijska svojstva koja se mogu pripisati njihovoj boljoj topljivosti i povećanoj akumulaciji u stanicama, što rezultira većim količinama u stanici te sniženim stopama metaboliziranja. Aminokiseline se transportiraju proteinima-nosačima pa su one povezane s kurkuminom da bi se povećalo njegovo pospremanje u stanicu endocitozom posredovanom receptorom (Dubey i sur., 2008). Protein-nosač aminokiselina nosi i molekulu kurkumina, a prisustvo slobodnih fenola nužno je za njegovu fiziološku aktivnost.

Prilikom provođenja studije Dubey i sur. (2008) sintetizirano je sedam različitih esterskih konjugata kurkumina kojima je ispitano antimikrobno djelovanje u odnosu na kurkumin i piperinsku kiselinu. Kod pripremljenih monoestera kurkumina jedna fenolna skupina bila je slobodna, a na drugu je esterskom vezom vezan pogodan ligand. Slika 7. prikazuje kemijsku strukturu sintetiziranih monoestera (**IX** i **X**).



Slika 7. Kemijska struktura monoglicinoil kurkumina (**IX**) i monovalinoil kurkumina (**X**) (Dubey i sur., 2008).

Ispitivanje osjetljivosti *in vitro* provedeno je na multirezistentnim bakterijama (*E. cloacae*, *S. saprophyticus*, *Micrococci*, *Klebsiella aeruginosa* i *E. coli*) koje kod ljudi uzrokuju sekundarne infekcije. Antibakterijsko djelovanje konjugata kurkumina uključujući mono- i diestere uspoređeno je s djelovanjem samog kurkumina te demetilirane piperinske kiseline i njenog konjugata s kurkuminom. Vrijednosti minimalnih inhibitornih koncentracija (MIC) prikazane su u Tablici 5.

Tablica 5. MIC vrijednosti ($\mu\text{mol/mL}$) biokonjugata na odabrane bakterijske sojeve (Dubey i sur., 2008).

Name of bacteria	I	III	IV	V	IX	X	XI	XV	XVII	Amoxyclav
<i>Micrococci</i>	–	5	10	10	R	2.5	–	10	10	10
<i>Klebsiella aeruginosa</i>	R	20	R	R	5	5	20	R	20	12
<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	–	R	10	R	R	R	R	20	20	10
<i>Enterobacter cloacae</i>	–	R	5	R	R	2.5	–	10	5	10
<i>Escherichia coli</i>	20	R	5	20	20	10	R	R	10	10

(R) Resistant; curcumin (**I**); 4,4'-(di-*O*-glutamoyl)-curcumin (**III**); 4,4'-(di-*O*-valinoyl) curcumin (**IV**); 4,4'-(di-*O*-glycinoyl) curcumin (**V**); monoglycinoyl curcumin (**IX**); monovalinoyl curcumin (**X**); piperic acid (**XI**); demethylenated piperic acid (**XV**); 4,4'-(di-*O*-demethylenated piperoyl) curcumin (**XVII**). Values given in bold indicate significant inhibition obtained.

Najbolji rezultat pokazao je monoester monovalinoil kurkumin (**X**) s MIC vrijednošću od 2,5 $\mu\text{mol/mL}$ na *Micrococcus* i *E. cloacae*, dok je amoksiklav, jedan od najprodavanijih antibiotika, na iste pokazao MIC od 10 $\mu\text{mol/mL}$, što znači da je spoj **X** četiri puta efektivniji od lijeka amoksiklava pri sličnim koncentracijama (Dubey i sur., 2008). Diesteri kurkumina imaju veću antibakterijsku aktivnost od samog kurkumina, vjerojatno zbog njihove bolje topljivosti i bioraspoloživosti te usporenog metaboliziranja uslijed maskiranja slobodnih fenola. Međutim, monoesteri pokazuju još bolju aktivnost nego njihovi odgovarajući diesteri budući da imaju obje prednosti – ligand povećava bioraspoloživost, a slobodni fenol veže se u aktivno mjesto.

Tri su moguća razloga zbog kojih je povećana antimikrobna aktivnost ovih kurkuminskih biokonjugata:

- (1) povećana metabolička stabilnost zbog maskiranja fenolnih hidroksilnih grupa i odgađanja njihovih glukuronidnih struktura tijekom metabolizma
- (2) bolji unos u stanicu zbog transporta konjugata putem proteina-nosača za aminokiseline
- (3) bolja topljivost konjugata zbog povećanja polarnosti (hidrofilnosti) (Dubey i sur., 2008).

Antifungalna aktivnost kurkumina i njegovih biokonjugata evaluirana je na plijesnima *A. fumigatus* i *Penicillium notatum* i kvascima *C. albicans* i *C. parapsilosis* te uspoređena sa standardnim lijekom flukonazolom. Iz rezultata prikazanih u Tablici 6. vidljivo je da monoglicinoil kurkumin (**IX**) pokazuje bolju aktivnost na navedene kvasce i plijesni nego što njegov odgovarajući diester (V) pokazuje u odnosu na kurkumin (I). Slično tome, demetilirana piperinska kiselina (XV) pokazuje bolje rezultate od piperinske kiseline (XI) na *C. albicans* čime je i ovdje naglašena uloga slobodnih fenola, zamijećena kod evaluacije

antibakterijske aktivnosti. Ovi su rezultati od velikog značaja budući da su gljivične bolesti otporne na većinu antifungalnih lijekova.

Tablica 6. Antifungalna aktivnost biokonjugata kurkumina (brojevi prikazuju zonu inhibicije u mm) (Dubey i sur., 2008).

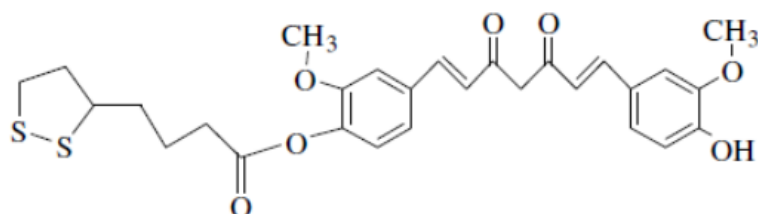
Name of fungi	I	III	IV	V	IX	X	XI	XV	XVII	Fluconazole
<i>Aspergillus fumigatus</i>	–	–	–	–	25, 20	–	–	–	–	–
<i>Candida albicans</i>	15	–	–	–	20, 18	–	–	16	16	29
<i>Candida parapsilosis</i>	–	–	–	–	14	–	–	–	–	20
<i>Penicillium notatum</i>	–	–	–	–	20, 16	12	–	–	–	–

(–) Resistant; curcumin (I); 4,4'-(di-*O*-glutamoyl)-curcumin (III); 4,4'-(di-*O*-valinoyl) curcumin (IV); 4,4'-(di-*O*-glycinoyl) curcumin (V); monoglycinoyl curcumin (IX); monovalinoyl curcumin (X); piperic acid (XI); demethylenated piperic acid (XV); 4,4'-(di-*O*-demethylenated piperoyl) curcumin (XVII). Values given in bold indicate significant inhibition obtained.

Prednost kod biljnih lijekova je to što su njihovi ciljni proteini već poznati; štoviše, nisu toksični za žive sustave (Dubey i sur., 2008). Zbog toga se pribjegava kemijskom modificiranju spojeva iz hrane (koji se dobro internaliziraju u stanični okoliš), pogotovo vezanjem za prikladne ligande, kako bi se multiplicirao njihov terapijski učinak. Međutim, toksičnost ovih biokonjugata ipak bi trebala biti testirana *in vivo* (Dubey i sur., 2008). Identificirano je preko desetak staničnih proteina i enzima na koje se kurkumin veže, a način na koji konjugati kurkumina ispoljavaju terapijske učinke nije potpuno jasan. Vjerojatno su djelomično posredovani antioksidativnim i protuupalnim djelovanjem kurkumina, ali i drugim mehanizmima. Rezultati studije Dubey i sur. (2008) otvorili su novu eru istraživanja biokonjugata kurkumina kao antibakterijskih i antifungalnih lijekova, ali je potrebno provesti i studije koje će evaluirati aktivnost sintetiziranih spojeva *in vivo*.

2.1.5. Biotinilirani kurkumin, kurkumin lipolat i izonikotinat

U studiji Wang i sur. (2013) korišteni su kurkumin, biotin, lipoična i izonikotinska kiselina za sintezu kurkuminskih derivata te je njihova antimikrobna aktivnost ispitana na bakteriji *Staphylococcus aureus*. Na Slici 8. prikazana je struktura kurkumin lipolata, a MIC vrijednosti testiranih spojeva u Tablici 7.



Slika 8. Kemijska struktura kurkumin lipolata (Wang i sur., 2013).

Tablica 7. MIC sintetiziranih spojeva na *Staphylococcus aureus* (Wang i sur., 2013).

Treatment (mg/mL)	Curcumin	Lipolate curcumin	Biotinylated curcumin	Isonicotinate curcumin	Negative control (Sterile saline)	Positive control (ethanol)
200	–	–	–	–	+++++	++
100	–	–	–	–	+++++	++
10	–	–	–	–	+++++	++
5	+++++	–	–	–	+++++	++
2.5	+++++	–	++	+++	+++++	++
1.25	+++++	+++	+++++	+++++	+++++	++
0.625	+++++	+++++	+++++	+++++	+++++	++

MIC vrijednost lipolat kurkumina iznosi 2,5 mg/mL, biotiniliranog kurkumina te kurkumin izonikotinata 5 mg/mL, a kurkumina 10 mg/mL. Antimikrobna je aktivnost lipolat kurkumina prema tome četiri puta veća od one kurkumina, a primijećeno je i da kurkuminski derivati modificirani atomima sumpora imaju veću antibakterijsku aktivnost u usporedbi s onima s atomima dušika.

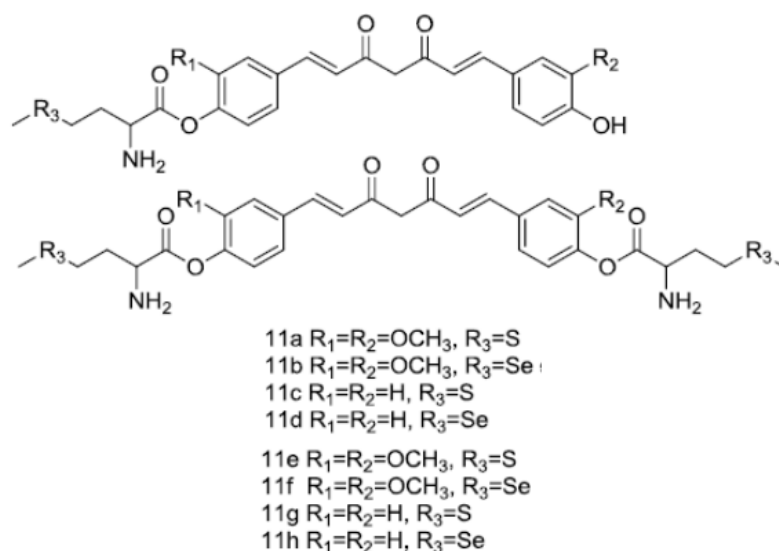
Budući da je *Staphylococcus aureus* štetan za ljude, a kako se pokazalo, kurkuminski derivati modificirani heteroatomima na njega imaju jak inhibitorni učinak, takvi su derivati od velikog značaja za kliničku primjenu. Proširuju medicinski značaj kurkumina i osnova su za proučavanje mehanizma njegove antibakterijske aktivnosti.

2.1.6. Metionin- i selenometionin-supstituirani kurkuminoidi, derivati s kafeinskom ili ferulinskom kiselinom te konjugati kurkuminoid-gliciretinska kiselina

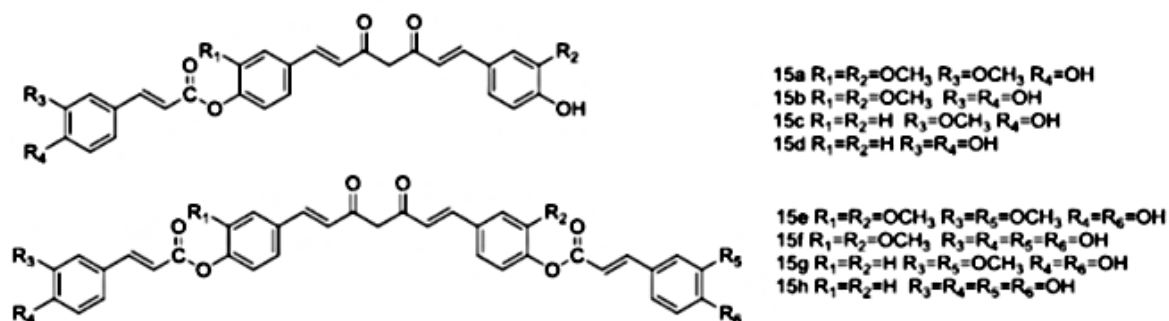
Prirodne komponente izolirane iz biljaka pokazale su se odličnim izvorom terapijskih sredstava pa tako fitokemikalije i njihovi derivati danas predstavljaju terapijska, ali i preventivna sredstva za mnoga oboljenja kod ljudi. Netoksičnost i širok spektar farmaceutskih svojstava razlog su zašto se kurkuminoidi smatraju obećavajućim kandidatima u medicini zbog čega se i ulažu naponi u sintezu novih kurkuminskih derivata s jačom biološkom aktivnošću.

Uz kurkuminoide, još neki prirodni produkti privlače pažnju znanstvenika zbog svojih raznih farmaceutskih svojstava. Primjerice, u studiji Cao i sur. (2014) kao početni materijal za sintezu novih kurkuminskih derivata preko esterskih veza odabrani su metionin, selenometionin, kafeinska i ferulinska kiselina te 18 β -gliciretinska kiselina. Dobivenim serijama derivata (11a-h, 15a-h, 19a-d) određena je antibakterijska aktivnost. Serija s

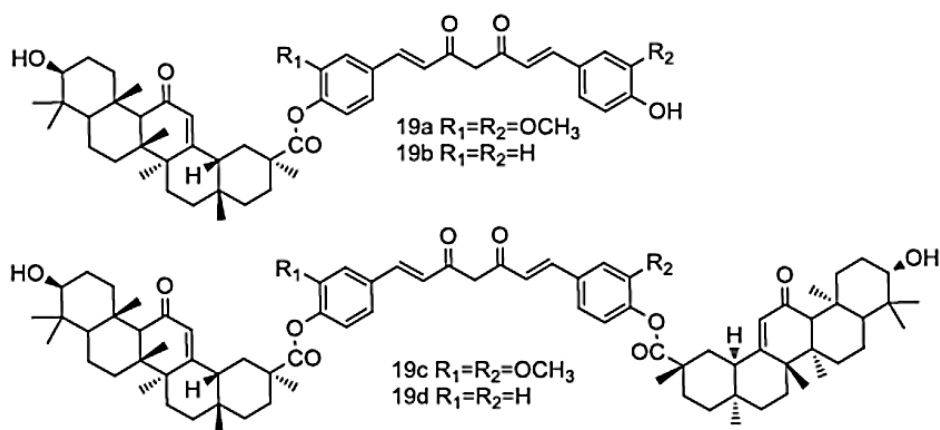
oznakom **11a-h** su metionin- i selenometionin-supstituirani kurkuminoidi (Slika 9.), serija **15a-h** predstavlja derivate s kafeinskom ili ferulinskom kiselinom (Slika 10.), a serija **19a-d** konjugate kurkuminoid-gliciretinske kiseline (Slika 11.). Antimikrobni potencijal dobivenih derivata testiran je na gram pozitivne koke (*S. aureus* i *S. viridans*) te gram-negativne bacile (*E. coli* i *E. cloacae*).



Slika 9. Kemijske strukture metionin- i selenometionin-supstituiranih kurkuminoida (**11a-h**) (Cao i sur., 2014).



Slika 10. Kemijske strukture kurkuminskih derivata s kafeinskom, odn. ferulinskom kiselinom (**15a-h**) (Cao i sur., 2014).



Slika 11. Kemijske strukture konjugata kurkuminoid-gliciretinska kiselina (**19a-d**) (Cao i sur., 2014).

U Tablici 8. prikazani su rezultati mjerenja zona inhibicije i minimalnih inhibitornih koncentracija (MIC). Svi su se derivati pokazali kao bolji antibakterijski agensi nego kurkumin (CCM) i bisdemetoksikurkumin (BCM), a najbolji učinak primjećuje se u slučaju kurkumin-mono-selenometionina (**11b**) čiji je MIC na *S. aureus* 0,5 $\mu\text{mol/mL}$. Istovremeno antibiotik ampicilin pokazuje MIC od 2,5 $\mu\text{mol/mL}$, što ga čini pet puta manje učinkovitim od kurkumin-mono-selenometionina pri sličnim koncentracijama. Monoester **11b** pokazao je visokozadovoljavajuće rezultate kao antibakterijski agens, što može biti zbog selena ili slobodnih hidroksilnih skupina (Cao i sur., 2014). Komponente treće serije koje su pokazale najbolji antibakterijski učinak, **19c** i **19d**, imaju 1,5 i 1,6 puta manje MIC vrijednosti u odnosu na ampicilin. Štoviše, druga i treća serija bez iznimke su se pokazale boljim antibakterijskim agensom na *E. coli* od ampicilina. Ohrabrujući su bili i rezultati s *E. cloacae* - antibakterijska je aktivnost biokonjugata 8,6 - 49,4 puta viša u odnosu na kurkuminoide.

Tablica 8. Zone inhibicije (cm) i MIC vrijednosti ($\mu\text{mol/mL}$) kurkuminskih derivata na odabrane bakterijske sojeve (Cao i sur., 2014).

Compound	Name of Bacteria							
	Gram-positive				Gram-negative			
	<i>S. aureus</i>		<i>S. viridans</i>		<i>E. coli</i>		<i>E. cloacae</i>	
	Zone of Inhibition	MIC	Zone of Inhibition	MIC	Zone of Inhibition	MIC	Zone of Inhibition	MIC
11a	19, 16, 14	2.0	19, 17, 14	2.0	19, 17, 15	2.0	18, 16, 14	4.0
11b	26, 20, 18	0.5	24, 20, 18	0.5	25, 20, 17	0.5	23, 20, 18	0.5
11c	19, 17, 15	2.3	18, 16, 14	2.3	19, 16, 14	4.6	19, 16, 14	4.6
11d	24, 17, 14	1.0	22, 18, 15	1.0	22, 17, 15	1.0	24, 19, 16	1.5
11e	18, 15, 13	3.2	18, 14, 10	2.2	18, 15, 13	3.2	18, 14, 13	3.2
11f	21, 18, 16	0.7	21, 18, 16	0.7	20, 17, 15	0.3	21, 18, 15	0.7
11g	18, 16, 14	3.7	22, 19, 17	2.4	18, 16, 13	3.7	20, 18, 16	2.4
11h	20, 17, 15	1.6	23, 20, 18	1.6	20, 15, 13	1.6	22, 19, 17	1.6
15a	19, 16, 14	3.8	19, 17, 14	3.8	19, 17, 14	2.4	19, 16, 15	1.9
15b	22, 20, 18	3.7	21, 19, 16	3.7	22, 20, 18	2.3	22, 20, 18	1.8
15c	18, 15, 13	4.3	19, 15, 13	4.3	18, 16, 11	2.7	18, 15, 12	2.1
15d	20, 18, –	4.1	20, 18, –	4.1	20, 18, –	2.6	21, 18, 17	2.1
15e	18, 15, 13	2.7	18, 15, –	2.7	16, 13, 10	1.7	19, 17, 13	1.3
15f	21, 17, 16	2.8	23, 17, 16	2.8	21, 17, 16	1.7	21, 18, 16	1.4
15g	19, 17, 14	3.2	19, 16, 14	3.2	19, 16, 14	2.0	19, 16, 14	1.6
15h	21, 19, 18	3.0	26, 20, 18	3.0	26, 20, 18	1.9	26, 20, 18	1.5
19a	19, 17, 15	2.4	20, 18, 16	2.4	20, 18, 17	1.5	19, 17, 16	1.2
19b	21, 19, 17	2.6	21, 18, 16	2.6	21, 18, 17	1.6	20, 18, –	1.3
19c	25, 20, 18	1.6	24, 21, 19	1.6	24, 22, 20	1.0	23, 21, 19	0.8
19d	22, 20, 18	1.7	22, 20, 18	1.7	22, 19, 17	1.0	21, 19, 17	0.8
CCM	10, 8, 6	21.7	11, 9, –	21.7	10, 8, –	27.2	12, 8, –	27.2
BCM	8, 5, –	32.5	8, 6, –	32.5	8, 5, –	32.5	9, 6, –	32.5
Ampicillin	21, 18, 15	2.5	20, 17, 15	2.5	20, 17, 14	3.2	20, 18, 15	3.2

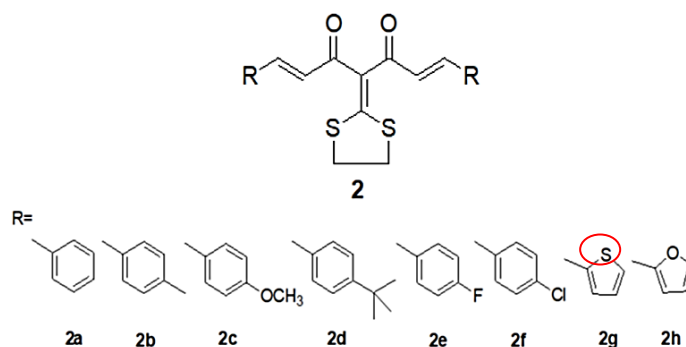
– Resistant; * the zone of inhibition was measured in mm at concentrations of 20, 10 and 5 $\mu\text{M/mL}$; ^b MIC: (minimum inhibitory concentration) values were measured in $\mu\text{M/mL}$.

Među svim sintetiziranim spojevima, **11b** pokazao je najznačajniju aktivnost na *S. aureus*, medicinski važan gram-pozitivni kok, jedan od najznačajnijih bakterijskih oportunističkih patogena u ljudi. *S. aureus* vrlo se lako adaptira na različite uvjete u okolini pa tako i brzo stječe otpornost na različite antibiotike, predstavljajući medicinski problem s kojim se bolnice suočavaju već desetljećima. Ovi rezultati sugeriraju da su pokušaji uvođenja strukturnih modifikacija kako bi se otkrili uspješniji, manje toksični i učinkovitiji antibakterijski spojevi itekako održivi.

2.2. Antimikrobna aktivnost kurkuminskih derivata s modificiranom aktivnom metilenskom skupinom

2.2.1. Sumporni heterociklički derivati kurkumina

Ekstrakcija prirodnih kurkuminoida skup je postupak, stopa ekstrakcije je niska, a izolirani su spojevi nestabilne strukture i slabe biorasploživosti. Stereoelektronički učinci heterocikla, mijenjajući konformaciju molekule, mogu im pružiti znatno drukčija biološka svojstva. Imajući to na umu, osmišljeni su i sintetizirani novi heterociklički kurkuminski derivati koji sadrže sumpor te su predstavljeni njihovi inicijalni rezultati antimikrobnog djelovanja na mikroorganizme *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli* i *Aspergillus niger* (Du i sur., 2020). Na Slici 12. prikazane su kemijske strukture sintetiziranih derivata (2a-2h).



Slika 12. Kemijske strukture sumpornih kurkuminskih derivata (2a-2h) (Du i sur., 2020).

U Tablici 9. prikazani su dobiveni rezultati antimikrobne aktivnosti kurkuminskih derivata 2a-2h.

Tablica 9. MIC vrijednosti ($\mu\text{g/mL}$) kurkuminskih derivata (2a-2h) (Du i sur., 2020).

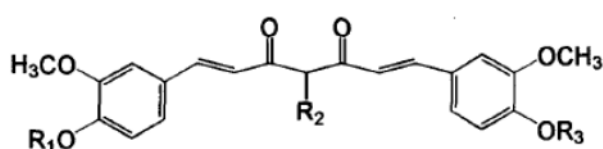
Compounds	<i>S. aureus</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>E. coli</i>	<i>A. niger</i>
2a	64	64	64	32
2b	64	64	32	64
2c	32	64	64	32
2d	64	64	64	64
2e	16	8	16	8
2f	8	8	16	16
2g	8	8	8	8
2h	16	8	8	16
Curcumin	128	128	>256	>256

Iz podataka je očito da ovi derivati do određenog stupnja posjeduju inhibitorne aktivnosti na testirane mikroorganizme te pokazuju bolje antimikrobno djelovanje na *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Escherichiu coli* i *Aspergillus niger* nego kurkumin (Du i sur., 2020). Najznačajnije antimikrobno djelovanje među sintetiziranim spojevima pokazali su derivati **2e-2h** (pogotovo **2g**), što je najvjerojatnije rezultat uvođenja supstituenata koji su doveli do povećanja hidrofobnosti i delokalizacije elektronskog oblaka.

Ovi rezultati relativno novog datuma omogućuju daljnji napredak u sintezi novih kurkuminskih derivata i evaluaciji njihove antimikrobne aktivnosti, a također bi moglo voditi ka otkriću nekih potencijalnih agensa.

2.2.2. Konjugati kurkumina s aminokiselinama vs. s nukleozidima

Jedan je od ciljeva današnje farmaceutske industrije povećati specifičnost lijekova te time poboljšati njihov prijenos do određenih mjesta. U slučaju kurkumina u studiji koju su proveli Kumar i sur. (2000) sintetizirani su biokonjugati s aminokiselinom glicinom i s nukleozidom uridinom. Krenulo se od toga da bi biokonjugat nukleozid-kurkumin mogao imati dvojaku ulogu: sistemsko dopremanje te terapijski učinak protiv virusnih bolesti. Sintetizirani su di-*O*-glicinoil kurkumin (**I**), di-*O*-glicinoil- C^4 -glicil-kurkumin (**II**) i 2'-deoksi-2'-kurkuminil uridin (**IV**) te je testirana njihova antimikrobna aktivnost. Kemijske strukture sintetiziranih biokonjugata prikazane su na Slici 13., a rezultati testiranja u Tablici 10.



Curcumin conjugates

I ; $R_1 = R_3 = \text{CO-CH}_2\text{-NH}_2$, $R_2 = \text{H}$

II ; $R_1 = R_2 = R_3 = \text{-CO-CH}_2\text{-NH}_2$

III ; $R_1 = R_3 = \text{H}$, $R_2 = 5'\text{-Deoxy thymidine}$

IV ; $R_1 = R_3 = \text{H}$, $R_2 = 2'\text{-Deoxy uridine}$

Slika 13. Kemijske strukture sintetiziranih biokonjugata **I-IV** (Kumar i sur., 2000).

Rezultati antimikrobne aktivnosti 5'-deoksi-5'-kurkuminoil timidina (**III**) nisu prikazani jer nisu bili zadovoljavajući na odabrane bakterijske sojeve. Razlog tomu može biti to što

timidin nije prirodna komponenta bakterijske DNA. Najbolje rezultate pokazao je konjugat (I) na *Streptococcus pyogenis* s MIC 1,88 $\mu\text{mol/mL}$, što je 3,7 puta veća učinkovitost od amoksiklava, jednog od najprodavanijih antibiotika.

Tablica 10. MIC vrijednosti ($\mu\text{mol/mL}$) biokonjugata **I**, **II** i **IV** na odabrane bakterijske sojeve (Kumar i sur., 2000).

S.No	Name of Bacteria	I	II	IV	Cur
1	<i>Escherichia cloacae</i>	3.75	7.50	15.0	R
2	<i>Peptococcus anaerobe</i>	3.75	7.50	30.0	R
3	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	15.0	15.0	7.50	R
4	<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	3.75	30.0	15.0	R
5	<i>Micro cocci</i>	3.75	15.0	3.75	R
6	<i>Staphylococcus aureus</i>	15.0	30.0	7.50	R
7	<i>Streptococcus pyogenis</i>	1.88	3.75	15.0	15.0

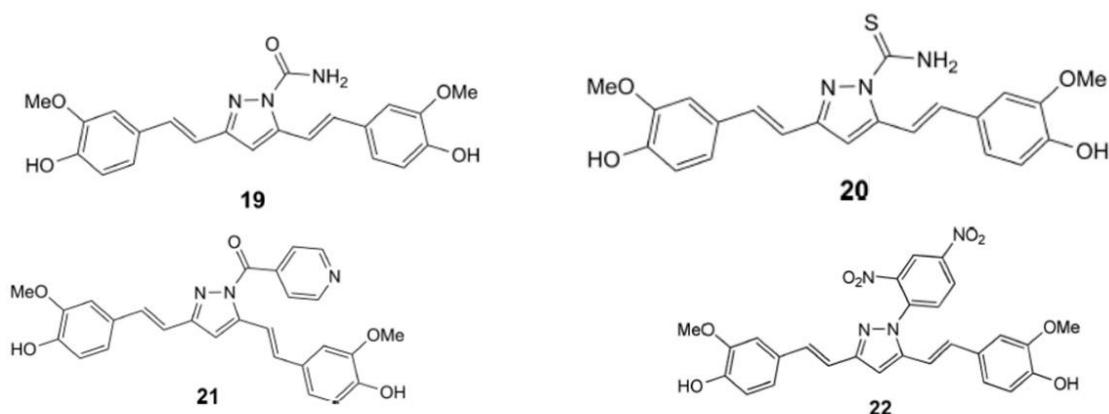
MIC Correlation Diagram (in $\mu\text{mol/mL}$) **I** = Di-O-glycinoyl curcumin, **II** = di-O-glycinoyl-C⁴-glycyl-curcumin and **IV** = 2'-deoxy-2'-curcuminyl uridine (2'-cur-U), **Cur** = Curcumin, **R** = Resistant (below 10 mm). **I** shows best result against *Streptococcus pyogenis*. Results with 5'-deoxy-5'-curcuinyl thymidine (5'-Cur-T) are not included.

Biokonjugati s aminokiselinama bakteriološki su aktivniji nego oni s nukleozidima, a razlog je to što su aminokiseline glavna komponenta bakterijske stanične stijenke. Stoga je potrebno sintetizirati više ovakvih biokonjugata u kojima je jedna od komponenti konjugiranih s kurkuminom uobičajena staničnoj stijenci ili genomu bakterije.

2.3. Antimikrobna aktivnost kurkuminskih derivata s modificiranim 1,3-diketonskim dijelom

2.3.1. Pirazolni derivati kurkumina

Budući da je 1,3-dikarbonilni dio kurkumina odgovoran za njegovu brzu degradaciju (Bairwa i sur., 2014), u studiji koju su proveli Sahu i sur. (2012) cilj je bio stabilizirati molekulu stvaranjem rigidnog pirazolnog prstena. Sintetizirali su pirazolne derivate kurkumina ekološki prihvatljivom metodom, tzv. „one-pot synthesis“ odn. sintezom unutar jedne reakcijske posude, a njihove strukture prikazane su na Slici 14.



Slika 14. Kemijske strukture pirazolnih kurkuminskih derivata **19-22** (Mishra i sur., 2019).

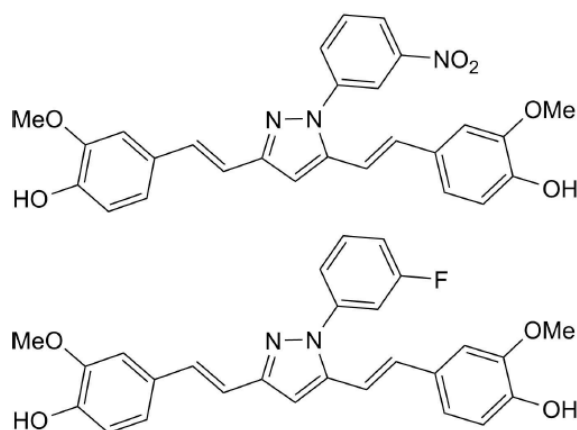
Sintetiziranim je analozima ispitana antibakterijska aktivnost na *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella typhi*, *Escherichia coli*, *Bacillus cereus* i *Providencia rettgeri*, te antifungalna aktivnost na *Aspergillus niger*, *Aspergillus fumigates* i *Aspergillus flavus*. Rezultati ispitivanja prikazani su u Tablici 11.

Tablica 11. MIC vrijednosti ($\mu\text{mol/mL}$) kurkuminskih derivata 19-22 na odabrane bakterijske i gljivične sojeve (Mishra i sur., 2019).

Bacterial and fungal strain	Compound				
	19	20	21	22	Curcumin
<i>S. aureus</i> (ATCC 11632)	–	1.25	1.25	1.25	20
<i>S. typhi</i> (ATCC 15499)	2.5	5.0	2.5	2.5	20
<i>P. aeruginosa</i> (ATCC 23564)	5	2.5	1.25	–	–
<i>E. coli</i> (ATCC 35218)	2.5	–	2.5	–	20
<i>Bacillus cereus</i> (MTCC 7350)	–	0.625	–	–	10
<i>Providencia rettgeri</i> (DRDE strain)	2.5	1.25	–	–	–
<i>A. flavus</i>	–	1.25	2.5	1.25	–

Iz Tablice 11. vidljivo je da su sintetizirani derivati kurkumina puno učinkovitiji na mnoge uobičajene sojeve bakterija i plijesni nego sami kurkumin. Zamjenom kisikovog atoma sumporom antimikrobna aktivnost značajno se povećava, a to je uočljivo iz rezultata za spoj **20** koji je učinkovit na sve bakterije osim *E. coli*. Razlog tomu može biti različita veličina atoma sumpora i kisika. Pirazolni derivat **20** pokazuje odličnu aktivnost na *A. flavus* (MIC 1,25 $\mu\text{mol/mL}$), usporedivu sa standardnim lijekom flukonazolom. Bitnu ulogu u antimikrobnoj aktivnosti imaju *para*-supstituirani derivati.

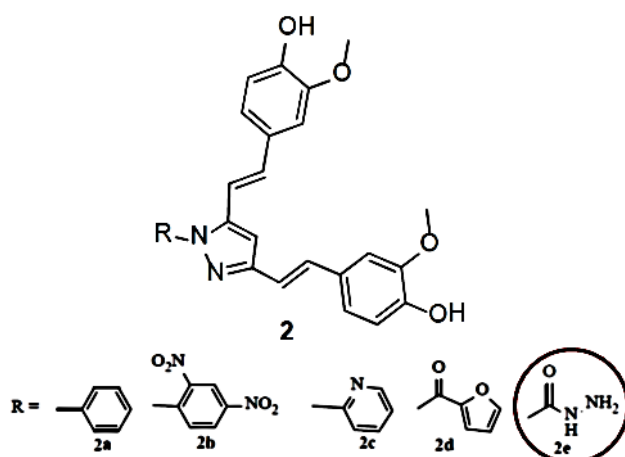
Sanghvi i Mishra (2020) istraživali su utjecaj supstitucije *N*-fenilpirazolnog dijela kurkuminskog derivata na njegovu antibakterijsku aktivnost na *S. aureus* (gram-pozitivna) i *E. coli* (gram-negativna). Pokazalo se da je na *S. aureus* najučinkovitiji *N*-(3-nitrofenilpirazol) kurkumin (MIC 10 µg/mL) - dvadeset puta učinkovitiji od *N*-fenilpirazol kurkumina. *N*-(2-fluorofenilpirazol) kurkumin s MIC 50 µg/mL najučinkovitiji je na *E. coli* - pet puta učinkovitiji od *N*-fenilpirazol kurkumina. Na Slici 15. prikazana je kemijska struktura *N*-(3-nitrofenilpirazol) kurkumina i *N*-(2-fluorofenilpirazol) kurkumina.



Slika 15. Kemijska struktura *N*-(3-nitrofenilpirazol) kurkumina (gore) i *N*-(2-fluorofenilpirazol) kurkumina (dolje) (Mishra i sur., 2019).

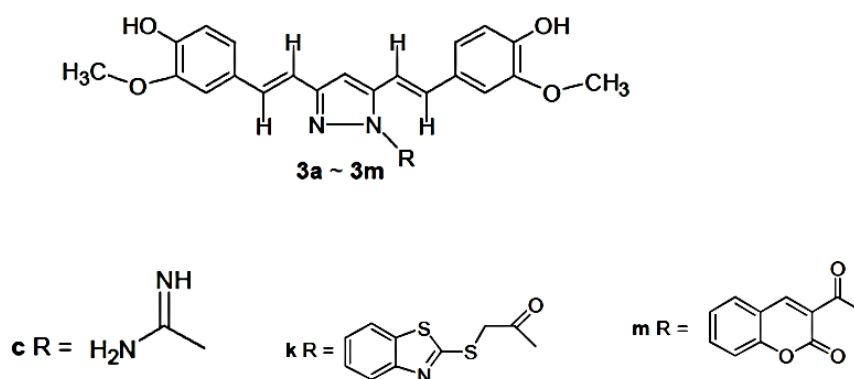
Znatno smanjenje antibakterijske aktivnosti na *S. aureus* i *E. coli* primijećeno je kada su elektron-donorske skupine inkorporirane u *N*-fenilpirazol kurkumin (Sanghvi i Mishra, 2020). Usporedbom sintetiziranih spojeva zamjećuje se ključna uloga elektron-akceptorskih i elektron-donorskih skupina u nesupstituiranom fenilpirazol kurkuminu za inhibirajući učinak na bakterije. Sintetizirani pirazolni derivati kurkumina umjerene su do vrlo visoke antibakterijske aktivnosti na *S. aureus*.

U studiji Hamed i sur. (2013) sintetiziran je pirazolni derivat 1-karbohidrazidil-3,5-bis-2-(4-hidroksi-3-metoksistiril)-1*H*-pirazol (**2e**), a njegova je kemijska struktura prikazana na Slici 16. Derivat **2e** pokazao je odličnu antimikrobnu aktivnost na *S. aureus* (MIC 0,0625 mg/mL).



Slika 16. Kemijska struktura pirazolnog derivata **2e** (Hamed i sur., 2013).

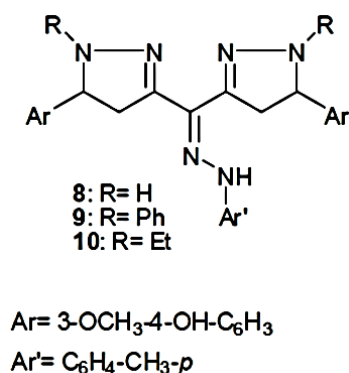
U studiji koju su proveli Liu i sur. (2012) sintetizirano je 13 novih *N*-supstituiranih pirazolnih derivata kurkumina kojima je *in vitro* ispitana antibakterijska aktivnost. Pokazalo se da su svi derivati učinkovitiji od kurkumina na *B. subtilis*, *S. aureus*, *E. coli*, *A. niger* i *Penicillium chrysogenum*. Najbolji rezultati zamijećeni su kod spojeva 3,5-bis(4-hidroksi-3-metoksistiril)-1-amidinopirazola (**3c**), 3,5-bis(4-hidroksi-3-metoksistiril)-1-(banzotiazol-2-sulfenil)pirazola (**3k**) i 3,5-bis(4-hidroksi-3-metoksistiril)-1-(kumarin-3-formoril)pirazola (**3m**) (zone inhibicije 16,34-23,81 mm). Kemijske strukture tih spojeva prikazane su na Slici 17.



Slika 17. Kemijske strukture spojeva **3c**, **3k** i **3m** (Liu i sur., 2012)

Ovi rezultati ukazuju na to da tiazolni, guanilni i kumarinski prsten kao supstituenti mogu povećati antibakterijsku aktivnost *N*-supstituiranih pirazolnih derivata kurkumina.

U studiji koju su proveli Emam i sur. (2017) sintetiziran je pirazolni kurkuminski derivat **10**. Njegova je kemijska struktura prikazana na Slici 18.



Slika 18. Kemijska struktura spoja **10** (Emam i sur., 2017)

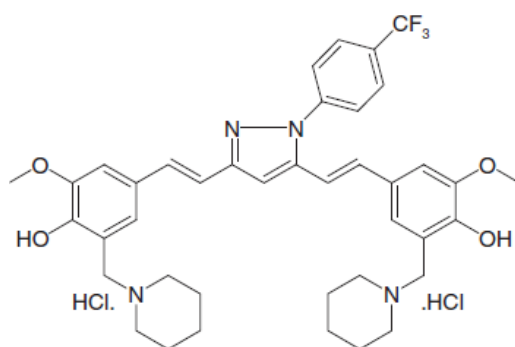
Spoj je pokazao veću antibakterijsku aktivnost (zona inhibicije 45 mm) na *B. subtilis* nego kloramfenikol (42 mm) i ostali spojevi (pirimidinski, diazepinski, izoksazolni i pirazolni derivati), što se može objasniti prisustvom alkilnog supstituenta u spoju **10**.

Zaključno, sintetizirani kurkuminski derivati hidrofilniji su od samog kurkumina, a hidrofilna priroda pirazolu može pomoći i kod aktivnog transporta kroz staničnu membranu. Za razliku od kurkumina, koji se pri fiziološkim vrijednostima pH brzo degradira, oni su stabilni i minimiziraju njegovu kelaciju s metalima (Claramunt i sur., 2016). Male promjene konfiguracije molekula istraženih derivata mogu se jako odraziti na njihov antimikrobni učinak.

2.3.1.1. CPMD-6d dihidroklorid (kurkumin-pirazol-Mannich derivat)

Zbog povećanja otpornosti na lijekove, uzročnik tuberkuloze *Mycobacterium tuberculosis* predstavlja problem zdravstvu diljem svijeta uzrokujući povećanje mortaliteta i morbiditeta povezanih s tuberkulozom. Antimikobakterijski učinak kurkumina očituje se tek pri relativno visokim koncentracijama u usporedbi s drugim antimikobakterijskim agensima, što je teško postići *in vivo*, a uz to je i kemijski nestabilan te slabe bioraspodivnosti.

S obzirom da je ispitivanjem antimikobakterijske aktivnosti kurkumina ustanovljena umjerena aktivnost na *M. tuberculosis* (MIC 16 µg/mL), Singh i sur. (2017) su sintetizirali 21 derivat kurkumina kojima je *in vitro* ispitana antimikobakterijska aktivnost na *M. tuberculosis*. Slika 19. prikazuje kemijsku strukturu najučinkovitijeg derivata CPMD-6d dihidroklorida, a rezultati ispitivanja antimikobakterijske aktivnosti prikazani su u Tablici 12.



6d (CPMD-6d.2HCl)

Slika 19. Kemijska struktura kurkuminskog derivata 6d (Singh i sur., 2017).

Tablica 12. MIC vrijednosti (u $\mu\text{g/mL}$) kurkumina i njegovih derivata na razne sojeve *Mycobacterium tuberculosis* otporne na lijekove (Singh i sur., 2017).

Serial no.	Compound	<i>M. tuberculosis</i> H37Rv	Mtb strain resistant to:			
			INH	RIF	ETB	STR
1	Curcumin	16	16	16	16	16
2	CPMD-6d.HCl	2	4	2	2	2
3	Rifampicin	0.06	0.06	>64	0.25	0.03
4	Isoniazid	0.06	>64	0.06	0.06	0.06
5	Ethambutol	2	NT	NT	>64	0.5
6	Streptomycin	1	NT	NT	16	>64

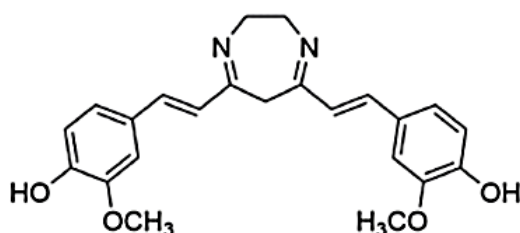
ETB: Ethambutol; INH: Isoniazid; NT: Not tested; RIF: Rifampicin; STR: Streptomycin.

CPMD-6d dihidroklorid najmoćniji je derivat s MIC vrijednošću od 2 $\mu\text{g/mL}$ na *M. tuberculosis* H37Rv (soj osjetljiv na lijekove) i na soj otporan na lijekove. Kod *Mycobacterium fortuitum* i *M. abscessus* pokazao je MIC 16 $\mu\text{g/mL}$, dok je kurkumin pri istoj koncentraciji bio potpuno inaktivan (MIC>64 $\mu\text{g/mL}$). Da bi se utvrdila antimikrobna specifičnost, određena je aktivnost kurkumina i CPMD-6d dihidroklorida na ESKAPE panel (*Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii* i *Pseudomonas aeruginosa*). Utvrđeno je da su oba potpuno inaktivna, što indicira specifičnost njihove antimikrobne aktivnosti na *Mycobacterium* sp. Baktericidni učinak ovisan je o njegovoj koncentraciji.

Zaključno, CPMD-6d dihidroklorid pokazao se jednako potentnim na otporne i osjetljive mikobakterijske sojeve, dok je na nemikobakterijske sojeve inaktivan. Ovo indicira postojanje potencijalnog novog mehanizma djelovanja te da nema križanja rezistencije s postojećim mehanizmima otpornosti na lijekove. CPMD-6d dihidroklorid može se uzeti u obzir kod liječenja mikobakterijskih infekcija.

2.3.2. Diazepinski derivat kurkumina

U studiji koju su proveli Hamed i sur. (2013) sintetiziran je dušikov heterociklički spoj - diazepinski derivat kurkumina. Njegova je kemijska struktura prikazana na Slici 20. Heterociklički su spojevi općenito vrlo važna skupina organskih spojeva s raznim biološkim aktivnostima uključujući antibakterijsku.



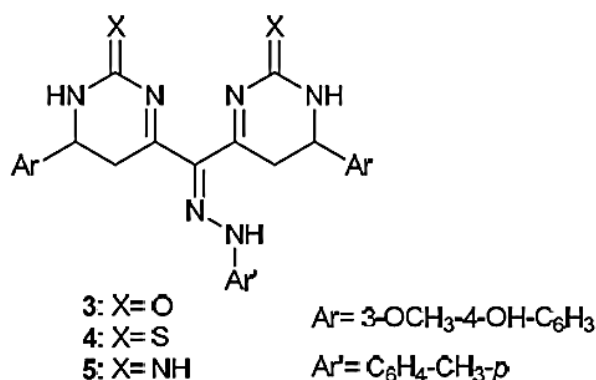
Slika 20. Kemijska struktura diazepin kurkuminoida (Martinez-Cifuentes i sur., 2015).

Spoj se pokazao potpuno inaktivnim na *E. coli*, ali na *S. aureus* (gram-pozitivna bakterija) zamijećena je izvanredna aktivnost (zona inhibicije 27 mm, MIC 1,9 $\mu\text{g/mL}$) – bolja od ampicilina. Tako velik antimikrobni potencijal na *S. aureus* može se pripisati prisutnosti 1,4-diazepinskog prstena, odnosno heterocikličkom dijelu kurkuminskog derivata.

Kako bi se postigla optimalna učinkovitost diazepinskih spojeva i odredio njihov način djelovanja, potrebne su opsežnije studije (Hamed i sur., 2013).

2.3.3. Tiopirimidinski analog kurkumina

U studiji koju su proveli Emam i sur. (2017) sintetiziran je tiopirimidinski analog kurkumina 4,4'-[(2-(p-tolil)hidrazono)metilen]bis(6-(4-hidroksi-3-metoksifenil)-5,6-dihidropirimidin-2(1*H*)-tion] (**4**). Njegova je kemijska struktura prikazana na Slici 21.

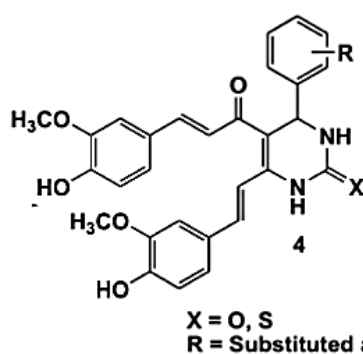


Slika 21. Kemijska struktura spoja **4** (Emam i sur., 2017)

Spoj **4** pokazao je skoro jednaku antibakterijsku aktivnost na *B. subtilis* (zona inhibicije 38 mm) kao kloramfenikol (42 mm). Vrlo visoka aktivnost uočena je i na *P. aeruginosa* (MIC 12,5 µg/mL, ZI 32 mm). Prisustvo atoma visoke elektronegativnosti može smanjiti antibakterijsku aktivnost (Emam i sur., 2017).

2.3.4. 3,4-dihidropirimidinonski derivati kurkumina s 4-arilnim supstituentom

U studiji Lal i sur. (2012) sintetizirani su 3,4-dihidropirimidinonski derivati kurkumina (**4a-4n**) kondenzacijom kurkumina, supstituiranih aromatskih aldehida i uree/tiouree (trokomponentna kondenzacija unutar jedne reakcijske posude). U toj reakciji kondenzacije, umjesto tradicionalno korištenih acetil acetona i etil acetoacetata, kao dikarbonilni dio upotrijebljen je kurkumin. Kemijska struktura sintetiziranih derivata prikazana je na Slici 22.



Compound	R	X
4a	C ₆ H ₅	O
4b	4-Cl-C ₆ H ₄	O
4c	4-NO ₂ -C ₆ H ₄	O
4d	4-OCH ₃ -C ₆ H ₄	O
4e	4-OH-3-OCH ₃ -C ₆ H ₃	O
4f	2-OH-C ₆ H ₄	O
4g	4-OH-C ₆ H ₄	O
4h	4-CH ₃ -C ₆ H ₄	O
4i	C ₆ H ₅	S
4j	4-Cl-C ₆ H ₄	S
4k	4-NO ₂ -C ₆ H ₄	S
4l	4-OCH ₃ -C ₆ H ₄	S
4m	4-OH-3-OCH ₃ -C ₆ H ₃	S
4n	4-OH-C ₆ H ₄	S

Slika 22. Kemijske strukture 3,4-dihidropirimidinonskih derivata kurkumina (**4a-4n**) (Lal i sur., 2012).

Svim sintetiziranim spojevima (4a-4n) ispitana je *in vitro* antibakterijska aktivnost na pet bakterija koje kod ljudi uzrokuju sekundarne infekcije: *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Burkholderia pseudomallei*, *Salmonella typhi* i *Pseudomonas aeruginosa*. Antifungalna aktivnost sintetiziranih spojeva ispitana je na četiri patogene kulture plijesni: *Aspergillus niger*, *Aspergillus flavus*, *Trichoderma viride* i *Curvularia lunata*. Izmjerene su zone inhibicije te minimalna inhibitorna koncentracija (MIC). Antibakterijska aktivnost kurkumin dihidropirimidinonskih analoga uspoređena je s onom kurkumina i ampicilina, a antifungalna s aktivnošću kurkumina i flukonazola. Rezultati ispitivanja antibakterijske aktivnosti prikazani su u Tablici 13., a antifungalne aktivnosti u Tablici 14.

Tablica 13. Zone inhibicije (mm) i MIC vrijednosti ($\mu\text{mol/mL}$) spojeva **4a-4n** na odabrane bakterijske sojeve (Lal i sur., 2012).

Compound	Name of bacteria									
	<i>E. coli</i>		<i>B. pseudomallei</i>		<i>P. aeruginosa</i>		<i>S. typhi</i>		<i>S. aureus</i>	
	Zone of Inhibition	MIC	Zone of Inhibition	MIC	Zone of Inhibition	MIC	Zone of Inhibition	MIC	Zone of Inhibition	MIC
4a	17, 9, --	40	19, 17, 16, 14	40	14, 12, 9, --	20	11, 8, --	80	22, 19, 17, 14	40
4b	19, 16, 11, 9	40	--	160	9, --, --	160	11, 9, --	80	12, 10, --	320
4c	18, 16, 15, 12	40	12, 10, --	80	19, 18, 14, 9	40	10, --, --	40	11, 10, --	80
4d	12, 9, --	80	23, 19, 15, 11	40	23, 21, 19, 13	40	--	80	--	80
4e	19, 17, 14, 11	20	16, 16, 14, 10	40	--	160	22, 19, 16, 13	80	--	40
4f	22, 19, 18, 15	20	19, 13, 11, --	40	24, 21, 19, 18	40	--	40	--	160
4g	22, 18, 14, 12	20	19, 15, 11, 9	40	22, 19, 19, 17	40	18, 16, 13, 9	20	24, 22, 19, 16	20
4h	11, 9, --	80	10, 9, --	40	10, --, --	40	11, 9, --	40	--	80
4i	21, 18, 14, 12	20	18, 16, 13, 11	40	18, 17, 14, 12	40	--	80	--	80
4j	19, 15, 9, --	80	16, 12, 9, --	80	--	160	22, 19, 17, 13	40	16, 13, 11, 9	40
4k	--	160	11, 9, --	80	10, 9, --	40	10, --, --	40	12, 10, --	80
4l	18, 14, 9, --	40	24, 21, 19, 16	20	23, 20, 19, 18	40	--	40	--	80
4m	14, 11, 9, --	40	21, 18, 16, 13	40	14, 11, 9, --	80	14, 12, 9, --	40	11, 9, --	40
4n	22, 18, 17, 13	20	19, 17, 16, 14	40	18, 14, 12, 9	40	--	80	12, 10, --	80
^c Curcumin	10, 8, --	40	9, 8, --	80	11, 9, --	80	12, 10, 9, --	80	--	80
^d Ampicillin	34, 32, 30, 30	20	46, 41, 39, 38	80	39, 36, 34, 31	40	51, 45, 44, 37	20	37, 30, 29, 28	40

(--) Resistant.

^a Zone of inhibition measured in mm at concentrations 160, 80, 40 and 20 $\mu\text{M/ml}$.

^b MIC (minimum inhibitory concentrations) were measured in $\mu\text{M/ml}$.

^c Isolated from *Curcuma longa*.

^d Purchased from HiMedia Pvt. Ltd.

U slučaju *E. coli*, spojevi **4b, 4c, 4e-g, 4i** i **4n** (MIC 20-40 $\mu\text{mol/mL}$) pokazali su bolju antibakterijsku aktivnost nego kurkumin (MIC 40 $\mu\text{mol/mL}$), dok spoj 4k (MIC 160 $\mu\text{mol/mL}$) ne pokazuje nikakvu zonu inhibicije te je potpuno inaktivan. Spojevi **4a, 4d, 4e, 4g, 4i, 4l-n** (MIC 20-40 $\mu\text{mol/mL}$) imaju bolju antibakterijsku aktivnost u slučaju *B. pseudomallei* nego kurkumin, dok su ostali spojevi umjerene aktivnosti, a spoj 4b (MIC 160 $\mu\text{mol/mL}$) potpuno inaktivan. Ispitivanje antibakterijske aktivnosti na *P. aeruginosa* pokazalo je da su spojevi 4e i 4j potpuno inaktivni (MIC 160 $\mu\text{mol/mL}$), a spojevi **4c, 4d, 4f, 4g, 4i, 4l** i **4n** (MIC 40 $\mu\text{mol/mL}$) aktivniji od kurkumina (MIC 80 $\mu\text{mol/mL}$). Kod *S. typhi*, spojevi **4e, 4g** i **4j** (MIC 20-40 $\mu\text{mol/mL}$) pokazali su puno veću aktivnost nego kurkumin (MIC 80 $\mu\text{mol/mL}$), spojevi **4d, 4f, 4i, 4l** i **4n** (MIC 80-160 $\mu\text{mol/mL}$) potpuno su inaktivni, a ostali spojevi umjerene su aktivnosti. U slučaju *S. aureus* spojevi 4d-f, 4h, 4i i 4l (MIC 80 $\mu\text{mol/mL}$) nisu pokazali zonu inhibicije te su potpuno inaktivni, a spojevi **4a, 4g** i **4j** (MIC 40-80 $\mu\text{mol/mL}$) aktivniji su od kurkumina (MIC 80 $\mu\text{mol/mL}$). Ostali su spojevi umjerene antibakterijske aktivnosti.

Tablica 14. Zone inhibicije (mm) i MIC vrijednosti ($\mu\text{mol/mL}$) spojeva **4a-4n** na vrste plijesni (Lal i sur., 2012).

Compound	Name of fungi								ClogP ^e
	<i>Aspergillus niger</i>		<i>Aspergillus flavus</i>		<i>Curvularia lunata</i>		<i>Trichoderma viride</i>		
	Zone of Inhibition	MIC	Zone of Inhibition	MIC	Zone of Inhibition	MIC	Zone of Inhibition	MIC	
4a	9, -, -, -	40	11, 9, -, -	80	18, 12, 9, -	80	14, 11, 9, -	80	4.3
4b	12, -, -, -	160	-	160	22, 18, 12, 9	40	18, 17, 17, 15	40	5.0
4c	-	160	-	80	11, 9, -, -	40	21, 21, 19, 17	40	4.1
4d	11, 9, -, -	80	-	40	17, 16, 14, 11	40	19, 17, 16, 14	40	4.3
4e	-	160	-	80	21, 18, 17, 13	40	21, 18, 16, 15	40	3.5
4f	13, 11, 9, -	80	9, -, -, -	80	23, 21, 20, 17	40	11, 9, -, -	40	3.6
4g	11, 9, -, -	40	13, 11, 9, -	40	21, 20, 20, 18	20	16, 14, 11, 9	20	2.8
4h	12, 9, -, -	20	-	80	22, 18, 16, 12	40	18, 16, 15, 12	40	4.8
4i	16, 14, -, -	20	9, -, -, -	80	26, 23, 21, 18	40	24, 21, 21, 18	40	4.4
4j	11, 9, -, -	80	9, -, -, -	80	15, 13, 12, 9	40	24, 22, 19, 18	40	5.1
4k	13, 11, 9, -	80	11, -, -, -	80	21, 19, 17, 14	40	22, 21, 18, 17	40	4.2
4l	11, 9, -, -	40	9, -, -, -	40	24, 21, 18, 16	40	23, 19, 18, 17	40	4.3
4m	16, 12, 11, 9	40	11, -, -, -	40	24, 22, 21, 19	40	13, 11, 9, -	20	3.6
4n	14, 11, 9, -	40	15, 13, 11, 9	40	24, 22, 21, 20	40	20, 17, 14, 11	80	3.7
Curcumin ^c	-	-	-	-	11, 9, -, -	80	9, -, -, -	80	2.5
Fluconazole ^d	-	-	-	80	31, 28, 27, 24	20	32, 29, 24, 21	20	---

(-) Resistant.

--- ClogP not determined.

^a Zone of inhibition measured in mm at concentrations 160, 80, 40 and 20 $\mu\text{M/ml}$.

^b MIC (minimum inhibitory concentrations) were measured in $\mu\text{M/ml}$.

^c Isolated from *Curcuma longa*.

^d Purchased from HiMedia Pvt. Ltd.

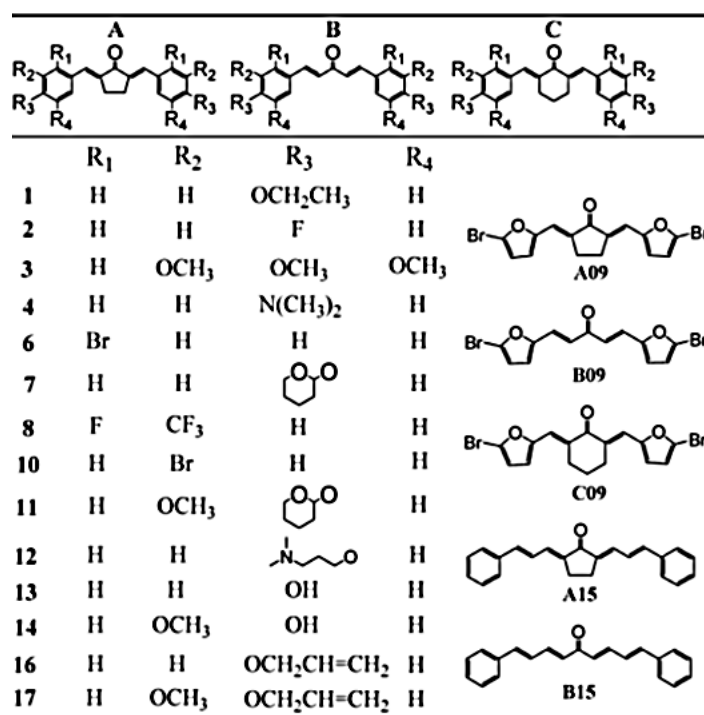
^e Theoretical values ClogP were calculated using commercially available ChemDraw Ultra 8.0.3.

Sintetizirani spojevi učinkovitiji su na *Aspergillus niger* i *Aspergillus flavus*, dok flukonazol i kurkumin kod njih nisu pokazali antifungalnu aktivnost. Kao što se vidi iz Tablice 14., većina spojeva ima znatan učinak na plijesni *Trichoderma viride* i *Curvularia lunata* – spojevi **4b**, **4d-n** pokazali su najbolju antifungalnu aktivnost, spojevi **4a** i **4c** umjerenu, a svi su testirani spojevi bili aktivniji od kurkumina. U slučaju *T. viride* spojevi **4b-e**, **4g-l** i **4n** (MIC 20-40 $\mu\text{mol/mL}$) pokazali su se aktivnijima, s većom zonom inhibicije, a spojevi 4a, 4f, 4m (MIC 40-80 $\mu\text{mol/mL}$) umjerene su aktivnosti.

Zaključno, najznačajniju antibakterijsku aktivnost pokazali su spojevi **4b**, **4e**, **4f**, **4g**, **4i**, **4l**, **4m** i **4n**. Kao najbolji antifungalni agensi pokazali su se spojevi **4b** i **4i**, te su svi sintetizirani spojevi bili aktivniji od kurkumina i flukonazola. Sinergistička antibakterijska i antifungalna aktivnost kurkumina povećana je uporabom multikomponentnog sustava (Lal i sur., 2012).

2.3.5. Monokarbonilni analozi kurkumina

Poznato je da kurkumin inhibira sekreciju i puteve aktivacije bakterijskih citokina induciranih endotoksinima čime izravno suprimira rast stanica patogena. Da bi se pronašli još uspješniji spojevi za liječenje bakterijskih upala, provedena je studija Liang i sur. (2008) u kojoj su sintetizirane tri serije monokarbonilnih analoga kurkumina (Slika 23). Ispitana im je antibakterijska aktivnost *in vitro* na sedam multirezistentnih bakterija, uzročnika sekundarnih infekcija, izoliranih iz kliničkih pacijenata, a rezultati su prikazani u Tablici 15. Sintetizirani analozi nisu sadržavali središnje metilenske funkcijske skupine, a jedan je od ciljeva bio i istražiti ulogu različitih supstituenata na benzenskom prstenu te utjecaj strukture C-lanca koji služi kao poveznica benzenskih prstenova.



Slika 23. Kemijske strukture monokarbonilnih analoga kurkumina (Liang i sur., 2008).

Tablica 15. Rezultati ispitivanja antibakterijske aktivnosti analoga kurkumina na bakterije pri različitim razrjeđenjima (Liang i sur., 2008).

Name of bacteria	Gram-positive				Gram-negative		
	<i>S. aureus</i>	<i>Micrococcus</i>	<i>S. saprophyticus</i>	<i>S. epidermidis</i>	<i>E. cloacae</i>	<i>Enterococcus</i>	<i>E. coli</i>
A01	—	14, -, -	—	—	10, -, -	—	—
A02	—	—	—	—	10, 9, -	—	9, -, -
A03	—	10, -, -	—	—	10, -, -	9, -, -	—
A04	—	12, 12, -	—	—	9, -, -	—	—
A06	—	—	—	—	10, 9, -	—	—
A07	—	—	—	—	13, 9, -	—	—
A08	—	—	—	—	11, -, -	—	—
A09	12, 9, -	10, -, -	10, -, -	9, -, -	10, 9, -	—	—
A10	—	12, 10, -	—	—	10, -, -	—	—
A11	—	—	—	—	11, -, -	—	—
A12	20, 15, 13	17, 17, 14	17, 14, 12	18, 16, 14	13, 12, 10	17, 15, 14	14, 14, 13
A13	—	12, -, -	—	—	10, -, -	—	—
A14	12, -, -	12, -, -	10, -, -	10, -, -	11, 10, 9	—	—
A15	12, 9, -	14, -, -	—	10, 8, -	12, -, -	—	—
A16	—	—	—	—	10, -, -	—	—
A17	—	—	—	—	11, 10, -	—	—
B01	—	—	—	—	9, -, -	—	10, 9, -
B02	10, 8, -	11, -, -	10, -, -	11, 10, -	13, -, -	—	10, 9, -
B03	14, -, -	10, -, -	—	—	11, -, -	—	—
B04	—	—	—	—	10, -, -	—	—
B06	—	10, 9, -	—	15, -, -	12, 11, 10	—	11, 10, -
B07	—	11, -, -	—	—	10, -, -	—	—
B09	18, 14, 10	13, 12, 8	15, 12, 10	13, 11, -	10, 10, -	9, -, -	11, 11, 9
B13	17, 14, 12	14, 14, 13	13, 12, 12	16, 13, -	11, 10, -	12, -, -	9, -, -
B14	15, 13, 11	13, 10, -	16, 12, 10	15, 12, 9	12, 10, -	10, -, -	10, 9, -
B15	10, -, -	—	—	—	—	10, -, -	—
B16	—	—	—	—	9, -, -	—	9, -, -
C01	—	10, -, -	—	—	10, -, -	—	—
C02	—	8, -, -	—	—	9, -, -	—	—
C03	—	9, -, -	—	—	10, -, -	—	—
C04	—	—	—	12, -, -	—	—	—
C06	—	—	—	—	—	—	—
C07	—	—	—	—	10, -, -	—	—
C09	15, 10, 8	14, 14, -	21, 11, -	13, 11, -	11, 10, -	10, -, -	11, -, -
C10	—	—	—	—	—	—	—
C11	—	—	—	—	—	—	11, -, -
C13	—	—	—	—	—	—	9, -, -
C14	11, -, -	13, 9, -	10, 9, -	13, 10, -	10, -, -	—	—
C16	—	—	—	—	10, 9, -	—	—
C17	—	—	—	—	—	—	—
Curcumin	11, 10, -	9, -, -	10, 10, -	11, 9, -	11, 11, -	10, 10, -	10, 10, -
Ampicillin	30, 26, 20	23, 18, -	18, 16, -	18, 14, 10	—	23, 20, 16	31, 26, 24

Numerals show size of zone of inhibition in mm; the size (mm) of pores on agar is 4 mm.

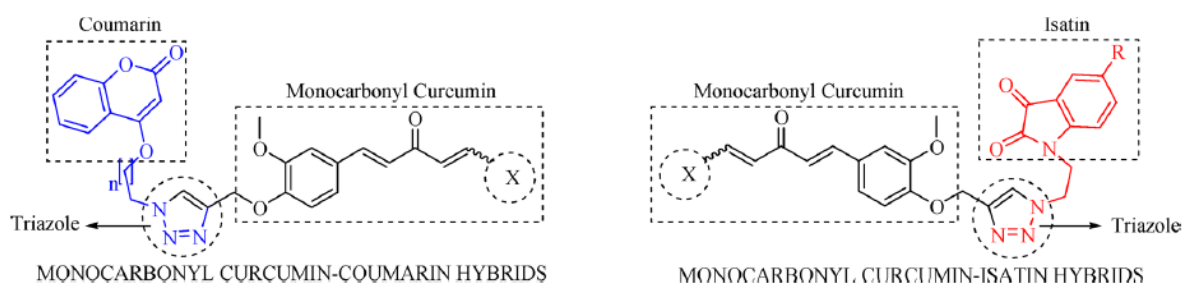
Spoj **C09** pokazao je odličnu antibakterijsku aktivnost na svih sedam mikroorganizama, a posebno na *S. saprophyticus* kod kojeg je primijećena najveća zona inhibicije (21 mm), i to jednaka kao kod ampicilina. Odlične rezultate pokazao je i spoj **B09** na *S. aureus* i *Micrococcus luteus*. Ovo navodi na zaključak da se supstitucijom heterocikla (furana) može povećati biološka aktivnost kurkuminskih analoga te da su acetonski (B09) i cikloheksanonski (C09) analozi aktivniji od ciklopentanonskih (A09). Spoj **A12** pokazao je odličnu *in vitro* aktivnost na svih sedam patogena, a dimetilamino supstituirani spojevi (A04, B04, C04) vrlo lošu, što indicira da bi dugački fleksibilni lanac u spoju A12 mogao imati važnu bioaktivnu ulogu. Promatrajući rezultate kod skupine u kojima su spojevi A13 i 14, B13 i 14

te C13 i 14, budući da su najlošiju aktivnost pokazali spojevi A13 i C13, može se zaključiti da struktura C-lanca koji služi kao poveznica može utjecati na antibakterijsku aktivnost.

Sintetizirani aktivni spojevi bili su učinkovitiji na gram-pozitivne bakterije u odnosu na gram-negativne, ali je ohrabrujući rezultat postignut s većinom spojeva na gram-negativnu *E. cloacae* koja je potpuno otporna na klinički lijek ampicilin, indicirajući postojanje drukčijeg mehanizma antimikrobne aktivnosti. Budući da su se spojevi iz skupine B pokazali učinkovitijima od A i C, može se zaključiti da priroda i položaj supstituenta te povezujući C-lanac imaju jak utjecaj na spektar i opseg antibakterijskog djelovanja. Heterociklički i dugolančani supstituenti mogu povećati aktivnost kurkuminskih analoga.

2.3.5.1. Monokarbonilne hibridne molekule kurkumina

Svrha provođenja molekulske hibridizacije je razvoj agensa koji imaju više ciljnih organizama ili više ciljnih mjesta u jednom organizmu, budući da su takvi agensi potentniji i manje toksični, a bakterije su na njih manje rezistentne u usporedbi s agensima koji imaju samo jedno ciljno mjesto djelovanja. Da bi se dobio željeni hibrid kombiniraju se dva različita aktivna farmakofora sa ili bez pomoći "poveznice". Imajući na umu razna farmakološka svojstva kurkuminskih, kumarinskih i derivata isatina, u studiji Singh i sur. (2019) sintetizirani su monokarbonilni, triazolom povezani molekularni hibridi kurkumin-kumarin i kurkumin-isatin te je ispitan njihov antibakterijski potencijal na vrstama bakterija patogenim za ljude. Kemijska struktura hibridnih molekula prikazana je na Slici 24.

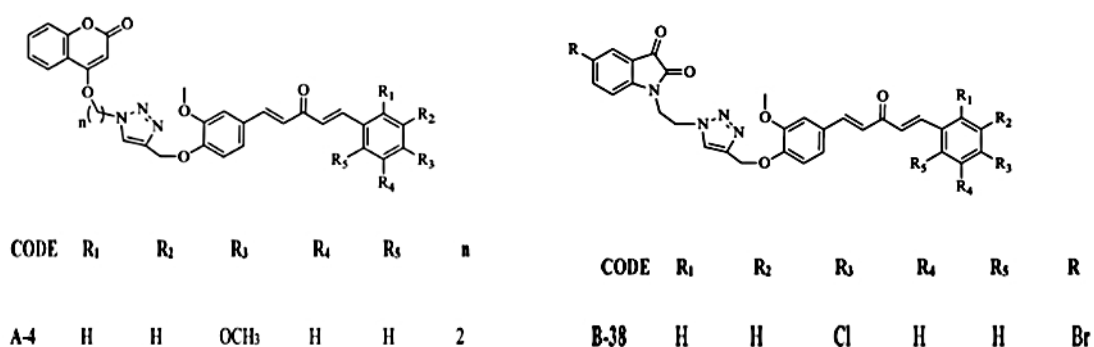


Slika 24. Kemijske strukture monokarbonilnih derivata kurkumin-kumarin i kurkumin-isatin (Singh i sur., 2019).

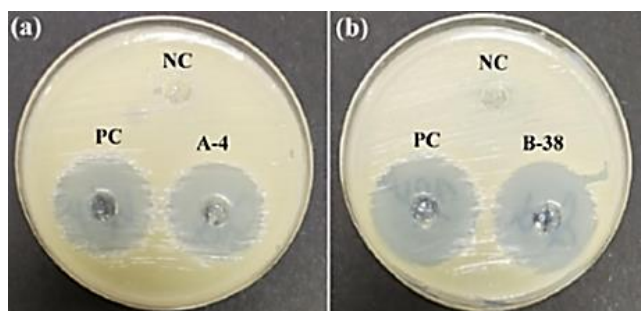
Monokarbonilni kurkumin dobiven je eliminacijom osjetljivog β -diketonskog dijela putem nekoliko modifikacija kurkumina, čime je postignuta veća stabilnost i bioraspoloživost. Isatin je farmakološki aktivan indolni derivat široko rasprostranjen u prirodi, a njegovi hibridi imaju antimikrobni potencijal. Kumarin je kemijski spoj s benzopironskom osnovom, a

njegovi hibridi također pokazuju obećavajući antimikrobni potencijal. Triazol je heterociklički spoj važan u medicinskoj kemiji – koristi se za sintezu raznih biološki aktivnih molekula, uključujući antimikrobne agense. Primjerice, flukonazol je triazolni antifungalni lijek.

Sintetiziranim hibridima evaluirana je antimikrobna aktivnost na dvije gram-pozitivne (*Enterococcus faecalis* i *Staphylococcus aureus*) i dvije gram-negativne (*Pseudomonas aeruginosa* i *Escherichia coli*) patogene bakterije. Rezultati su pokazali da je najotpornija bakterija na ove hibride *E. coli*, a najosjetljivija *S. aureus*. Najboljima su se pokazali spojevi **A-4** (hibrid kurkumin-kumarin) i **B-38** (hibrid kurkumin-isatin) (Slika 25.) sa zonama inhibicije od 29 i 31 mm kod *S. aureus* (Slika 26.)



Slika 25. Kemijske strukture spojeva **A-4** i **B-38** (Singh i sur., 2019).



Slika 26. (a) Zona inhibicije (29 mm) koju je pokazao hibrid **A-4** zajedno s pozitivnom kontrolom (PC) levofloksacinom i negativnom kontrolom (NC) DMSO. (b) Zona inhibicije (31 mm) koju je pokazao hibrid **B-38** sa sličnim standardom i negativnom kontrolom, oboje kod *S. aureus* (Singh i sur., 2019).

U slučaju kurkumin-kumarin hibrida, antibakterijskom potencijalu pogoduje metoksi-supstituirani fenilni prsten (prsten X). Najpogodnija je mono-metoksi supstitucija na *para*-poziciji fenilnog prstena, slijede ju *meta*- i *orto*-metoksi supstitucija, a što je više metoksi supstituenata, to je aktivnost manja. Uočeno je i da policiklički prstenovi ne pogoduju antimikrobnoj aktivnosti, kao ni heteroarilni prstenoliki furan i tiofen. Najboljom opcijom za prsten X pokazao se fenilni prsten, i to 4-metoksifenil. Što je kraći lanac koji povezuje triazol i kumarin, to je aktivnost bolja, stoga je najpogodnija poveznica lanac duljine dva ugljikova atoma.

U slučaju kurkumin-isatin hibridnih molekula, elektronegativno okruženje isatina i prstena X monokarbonilnog kurkumina značajno je utjecalo na antimikrobnu aktivnost (Singh i sur., 2019). Najpogodnija je *para*-kloro supstitucija na fenilnom prstenu kao prstenu X, a zatim *para*-bromo i *meta*-bromo supstitucija. Povećanjem elektronegativnosti supstituenata (*para*-nitro i *meta*-nitro), aktivnost se značajno smanjuje. Metoksi supstitucije na fenilnom prstenu kao prstenu X nisu pogodne, a najpogodniji oblik prstena X je 4-klorofenil. Za supstituent R na isatinu preferiran je brom, potom klor pa tek onda vodik. MIC vrijednosti dviju najpotentnijih hibridnih molekula, **A-4** i **B-38**, na *S. aureus* su 12,5 i 6,25 µg/mL – približno lijeku levofloksacinu i puno bolje od ciprofloksacina i cefuroksima.

Monokarbonilni hibridi kurkumin-kumarin i kurkumin-isatin mogu poslužiti za daljnji razvoj antibakterijskih agensa. Hibridne molekule mogu smanjiti rizik od multirezistencije na lijekove zajedno s interakcijama između lijekova, što bi moglo biti od značaja za čovječanstvo u borbi protiv mikrobne rezistencije (Singh i sur., 2019).

3. ZAKLJUČAK

Kurkumin, fitopolifenolni pigment izoliran iz korijena biljke kurkume, posjeduje vrlo snažnu antimikrobnu aktivnost, međutim njegova je primjena ograničena farmakokinetičkim karakteristikama poput loše biorasploživosti, brzog metabolizma te potrebe za ponavljajućim unosom oralnih doza da bi se postigla značajna koncentracija unutar stanice. Mikrobna rezistencija prominentno se pojavila kao ozbiljna prijetnja ljudskom zdravlju u zadnjih nekoliko desetljeća te postaje najteži i najozbiljniji izazov stručnjacima i istraživačima u zdravstvu diljem svijeta (Singh i sur., 2019). Budući da se javila potreba za zamjenom konvencionalnih antibiotika drugim agensima, cilj je otkriti nove, biološki aktivnije i biodostupnije spojeve kurkumina.

Posljednjih su dvadesetak godina provedene brojne *in vitro* studije u kojima su sintetizirani razni derivati kurkumina sa znatno većom antimikrobnom aktivnošću od samog kurkumina. Primjerice, antibakterijska svojstva tetrahidrokurkumina poboljšana su prisustvom esterske veze dobivene konjugacijom njegove fenolne skupine s aminokiselinama. Pokazalo se da kurkumin monoglukozid i diglukozid mogu poslužiti kao lijek protiv penicilin-rezistentne *S. pneumoniae* koja kod ljudi uzrokuje infekcije i po život opasne bolesti. Odlična antimikrobna svojstva biokonjugata kurkumina i piperina te kurkumina i aminokiselina primjeri su koji govore kako je potrebno sintetizirati više ovakvih biokonjugata u kojima je jedna od komponenti konjugiranih s kurkuminom uobičajena staničnoj stijenci ili genomu bakterije. Na taj bi se način povećala efikasnost kurkumina pri malim dozama te bi on mogao biti bolji sistemski lijek, koncentrirajući se prvenstveno u i okolo zloćudnih stanica i prepoznavajući bakterijske stanice.

Selenometionin-supstituirani kurkuminoid i sumporni heterociklički derivati kurkumina, kao i diazepinski derivat te monokarbonilne hibridne molekule kurkumina, pokazuju značajnu antibakterijsku aktivnost na *S. aureus*, jedan od najznačajnijih bakterijskih oportunističkih patogena u ljudi. Pirazolni kurkuminski derivati hidrofilniji su od samog kurkumina, a hidrofilna priroda pirazolu može pomoći i kod aktivnog transporta kroz staničnu membranu. Za razliku od kurkumina, koji se pri fiziološkim vrijednostima pH brzo degradira, oni su mnogo stabilniji, a male promjene konfiguracije tih molekula mogu se jako odraziti na antimikrobni učinak. Tiazolni, guanilni i kumarinski prsten kao supstituenti mogu povećati antibakterijsku aktivnost *N*-supstituiranih pirazolnih derivata kurkumina.

Značajno je i saznanje da se derivat kurkumina CPMD-6d dihidroklorid može uzeti u obzir kod liječenja mikobakterijskih infekcija, budući da uzročnik tuberkuloze *Mycobacterium tuberculosis* predstavlja ozbiljan problem zdravstvu diljem svijeta. Jedan je tiopirimidinski analog kurkumina pokazao gotovo jednaku antibakterijsku aktivnost na *B. subtilis* kao antibiotik kloramfenikol, a vrlo je visoka aktivnost uočena i na *P. aeruginosa*. Heterociklički i dugolančani supstituenti mogu povećati aktivnost monokarbonilnih kurkuminskih analoga. Uočeno je da su neke monokarbonilne hibridne molekule kurkumina približne antimikrobne aktivnosti kao lijek levofloksacin i puno bolje od ciprofloksacina i cefuroksima, stoga primjerice kurkumin-kumarin i kurkumin-isatin mogu poslužiti za daljnji razvoj antibakterijskih agensa. Aktivnost im se značajno smanjuje povećanjem elektronegativnosti supstituenata. Hibridne molekule mogu smanjiti rizik od multirezistencije na lijekove zajedno s interakcijama između lijekova, što bi moglo biti od značaja za čovječanstvo u borbi protiv mikrobne rezistencije.

Netoksičnost i širok spektar farmaceutskih svojstava čine kurkuminoide obećavajućim kandidatima u medicini zbog čega se i ulažu toliki naponi u sintezu novih kurkuminskih derivata s jačom biološkom aktivnošću. Rezultati do danas provedenih (*in vitro*) studija ukazuju na značajan antimikrobni potencijal, no ono što predstoji jesu studije koje će evaluirati aktivnost sintetiziranih spojeva *in vivo*.

4. LITERATURA

Bairwa K., Grover J., Kania M., Jachak S. M. (2014) Recent developments in chemistry and biology of curcumin analogues. *RSC Advances* **4**: 13946-13978.

Bukhari S. N. A., Jantan I. B., Jasamai M., Ahmad W., Amjad M. W. B. (2013) Synthesis and biological evaluation of curcumin analogues. *Journal of Medical Sciences* **13(7)**: 501-513.

Cao Y.-K., Li H.-J., Song Z.-F., Li Y., Huai Q.-Y. (2014) Synthesis and biological evaluation of novel curcuminoid derivatives. *Molecules* **19**: 16349-16372.

Claramunt R. M., Nieto C.I., Sanz D, Elguero J. (2016) Curcumin derived pyrazoles and related compounds. *Afinidad LXXIV*, **576**: 259-268.

Du H., Wang D., Lyu H., Cai L. i Wang D. (2020) Synthesis and antimicrobial activities of containing sulfur heterocyclic curcumin derivatives. *Journal of Biology, Engineering and Medicine* **1(1)**: 1-3.

Dubey S. K., Sharma A. K., Narain U., Misra K., Pati U. (2008) Design, synthesis and characterization of some bioactive conjugates of curcumin with glycine, glutamic acid, valine and demethylenated piperic acid and study of their antimicrobial and antiproliferative properties. *European Journal of Medicinal Chemistry* **43**: 1837-1846.

Emam D. R., Alhajoj A. M., Elattar K. M., Kheder N. A., Fadda A. A. (2017) Synthesis and evaluation of curcuminoid analogues as antioxidant and antibacterial agents. *Molecules* **22**, **No 971**: 1-10.

Hamed O. A., Mehdawia N., Taha A. A., Hamed E. M., Al-Nuri M. A., Hussein A. S. (2013) Synthesis and antibacterial activity of novel curcumin derivatives containing heterocyclic moiety. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research* **12(1)**: 47-56.

Kumar S., Dubey K. K., Tripathi S., Fujii M., Misra K. (2000) Design and synthesis of curcumin-bioconjugates to improve systemic delivery. *Nucleic Acids Symposium Series* **44**: 75-76.

Lal J., Gupta S. K., Thavaselvam D., Agarwal D.D. (2012) Design, synthesis, synergistic antimicrobial activity and cytotoxicity of 4-aryl substituted 3,4-dihydropyrimidinones of curcumin. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **22**: 2872–2876.

Li L.-M., Li J. , Zhang X.-Y. (2016) Antimicrobial and molecular interaction studies on derivatives of curcumin against *Streptococcus pneumoniae* which caused pneumonia. *Electronic Journal of Biotechnology* **19**: 8–14.

- Liang G., Yang S., Jiang L., Zhao Y., Shao L., Xiao J., Ye F., Li Y., Li X. (2008) Synthesis and anti-bacterial properties of mono-carbonyl analogues of curcumin. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin* **56(2)**: 162–167.
- Liu Z., Yinghong W., Yuanqin Z., Qinxiang X. (2012) Synthesis and antibacterial activities of *N*-substituted pyrazole curcumin derivatives. *Chinese Journal of Organic Chemistry* **32**: 1487-1492.
- Manjunatha J.R., Bettadaiah B.K., Negi P.S., Srinivas P. (2013) Synthesis of amino acid conjugates of tetrahydrocurcumin and evaluation of their antibacterial and anti-mutagenic properties. *Food Chemistry* **139**: 332–338.
- Martínez-Cifuentes M., Weiss-Lopez B., Santos L. S., Araya-Maturana R. (2015) Heterocyclic curcumin derivatives of pharmacological interest: recent progress. *Current Topics in Medicinal Chemistry* **15(17)**: 1663-1672.
- Mishra S., Narain U., Mishra R., Misra K. (2005) Design, development and synthesis of mixed bioconjugates of piperic acid–glycine, curcumin–glycine/alanine and curcumin–glycine–piperic acid and their antibacterial and antifungal properties. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **13**: 1477–1486.
- Mishra S., Patel S., Halpani C. G. (2019) Recent updates in curcumin pyrazole and isoxazole derivatives: synthesis and biological application. *Chemistry&Biodiversity* **16**, e1800366: 1-14.
- Sahu Pramod K., Sahu Praveen K., Gupta S.K., Thavaselvam D., Agarwal D.D. (2012) Synthesis and evaluation of antimicrobial activity of 4*H*-pyrimido[2,1-*b*]benzothiazole, pyrazole and benzylidene derivatives of curcumin. *European Journal of Medicinal Chemistry* **54**: 366-378.
- Sanghvi H., Mishra S. (2020) Structure-activity relationship and antimicrobial evaluation of *N*-phenylpyrazole curcumin derivatives. *Current Bioactive Compounds* **16(4)**: 481 – 488.
- Singh A. K., Yadav P., Karaulia P., Singh V. K., Gupta P., Puttrevu S. K., Chauhan S., Bhatta R. S., Tadigoppula N., Gupta U. D., Chopra S., Dasgupta A. (2017) Biological evaluation of novel curcumin–pyrazole–mannich derivative active against drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis*. *Future Microbiology* **12**: 1349-1362.
- Singh A., Singh J. V., Rana A., Bhagat K., Gulati H. K., Kumar R., Salwan R., Bhagat K., Kaur G., Singh N., Kumar R., Singh H., Sharma S., Bedi P. M. S. (2019) Monocarbonyl curcumin-based molecular hybrids as potent antibacterial agents. *ACS Omega* **4**: 11673–11684.

Wang H., Jiang B., Huai Q. (2013) Synthesis and antimicrobial activities on *Staphylococcus aureus* of miscellaneous atomic curcumin derivatives. *Asian Journal of Chemistry* **25(9)**: 4836-4838.

Izjava o izvornosti

Izjavljujem da je ovaj završni rad izvorni rezultat mojeg rada te da se u njegovoj izradi nisam koristio drugim izvorima, osim onih koji su u njemu navedeni.

Marina Marić

ime i prezime studenta