



**УНИВЕРЗИТЕТ У КРАГУЈЕВЦУ**  
**ФАКУЛТЕТ МЕДИЦИНСКИХ НАУКА**

Милош В. Николић

**СИНТЕЗА, КАРАКТЕРИЗАЦИЈА И ПОТЕНЦИЈАЛНА**  
**БИОЛОШКА АКТИВНОСТ БИНУКЛЕАРНИХ КОМПЛЕКСА**  
**БАКРА(II) СА S-АЛКИЛ ДЕРИВАТИМА ТИОСАЛИЦИЛНЕ**  
**КИСЕЛИНЕ**

Докторска дисертација

Крагујевац, 2016. године

Желим да изразим своју неизмерну захвалност особама које су биле уз мене током израде ове докторске дисертације и својим делима дале велики допринос да се она и заврши.

За указано поверење, разумевање, подршку и свестрану помоћ током израде овог истраживања и мог научно-истраживачког и професионалног усавршавања захвалност дугујем свом ментору доц. др. Гордани П. Радић, доценту Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу која је и предложила тему ове докторске дисертације.

Члановима Комисије професорима др Небојши Арсенијевићу и др Тибору Сабоу, доцентима др Верици Јевтић и др Марији Миловановић, научном сараднику др Ивани Радојевић захваљујем на уложеном напору за побољшавање квалитета ове дисертације корисним саветима и сугестијама.

Колегама и пријатељима из лабораторије захваљујем на несебичној помоћи, подршци и заједничком раду.

Хвала девојци и многобројним пријатељима, који су били уз мене и на различите начине помогли од самог почетка израде ове докторске дисертације да се она и заврши.

И на крају, породици хвала на љубави, као и на томе што су увек веровали у мене.

Ваш Милош

# САДРЖАЈ

<b>1. УВОД</b> .....	1
1.1. Тиосалицилна киселина и њени деривати .....	3
1.2. Физиолошки значај бакра .....	8
1.3. Координациона хемија бакар(II)-јона .....	11
1.4. Структурне карактеристике комплекса бакра(II) са тиосалицилном киселином .....	14
1.5. Бинуклеарни комплекси бакра(II) .....	19
1.6. Комплекси бакра(II) са карбоксилатним анјонима .....	22
1.7. Биолошка активност комплекса бакра(II) .....	23
1.7.1. Антитуморска активност комплекса бакра(II) .....	23
1.7.2. Претпостављени механизам дејства комплекса бакра(II) као антитуморских агенса .....	26
1.7.3. Антибактеријска активност комплекса бакра(II) .....	31
1.7.4. Механизми дејства антибактеријских лекова и појава резистенције .....	36
1.7.5. Антибиофилм активност комплекса бакра(II) .....	38
1.7.6. Антигљивична активност комплекса бакра(II) .....	40
<b>2. ХИПОТЕЗА И ЦИЉЕВИ ИСТРАЖИВАЊА</b> .....	43
<b>3. МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ</b> .....	45
3.1. Синтезе лиганата .....	46
3.2. Синтезе комплекса .....	47
3.2.1. Синтеза комплекса бакра(II) са S-бензил дериватом тиосалицилне киселине, $[\text{Cu}_2(\text{S-bz-thiosal})_4(\text{H}_2\text{O})_2]$ (C1) .....	47
3.2.2. Синтеза комплекса бакра(II) са S-метил дериватом тиосалицилне киселине, $[\text{Cu}_2(\text{S-met-thiosal})_4(\text{H}_2\text{O})_2]$ (C2) .....	48
3.2.3. Синтеза комплекса бакра(II) са S-етил дериватом тиосалицилне киселине, $[\text{Cu}_2(\text{S-et-thiosal})_4(\text{H}_2\text{O})_2]$ (C3) .....	48
3.2.4. Синтеза комплекса бакра(II) са S-пропил дериватом тиосалицилне киселине, $[\text{Cu}_2(\text{S-pr-thiosal})_4(\text{H}_2\text{O})_2]$ (C4) .....	49
3.2.5. Синтеза комплекса бакра(II) са S-бутил дериватом тиосалицилне киселине, $[\text{Cu}_2(\text{S-bu-thiosal})_4(\text{H}_2\text{O})_2]$ (C5) .....	49

<b>3.3. Мерења</b> .....	50
3.3.1. Елементална микроанализа .....	50
3.3.2. Инфрацрвена спектроскопија .....	50
3.3.3. Магнетна мерења .....	50
3.3.4. Рендгенска структурна анализа .....	50
3.3.4.1. Рендгенска структурна анализа комплекса бакра(II) са S-метил дериватом тиосалицилне киселине, $[\text{Cu}_2(\text{S-met-thiosal})_4(\text{H}_2\text{O})_2]$ .....	50
3.3.4.2. Рендгенска структурна анализа комплекса бакра(II) са S-етил дериватом тиосалицилне киселине, $[\text{Cu}_2(\text{S-et-thiosal})_4(\text{H}_2\text{O})_2]$ .....	51
3.3.4.3. Рендгенска структурна анализа комплекса бакра(II) са S-пропил дериватом тиосалицилне киселине, $[\text{Cu}_2(\text{S-pr-thiosal})_4(\text{DMSO})_2]$ .....	52
<b>3.4. Биолошка мерења</b> .....	54
3.4.1. <i>In vitro</i> антитуморска активност .....	54
3.4.1.1. Припрема раствора испитиваних једињења .....	54
3.4.1.2. Испитиване ћелијске линије .....	54
3.4.1.3. МТТ колориметријски тест .....	55
3.4.1.4. Тест апоптозе .....	56
3.4.2. <i>In vitro</i> антимикробна активност .....	57
3.4.2.1. Припрема тестираних супстанци и хранљиве подлоге .....	57
3.4.2.2. Тестирани микроорганизми .....	57
3.4.2.3. Припрема суспензија .....	58
3.4.2.4. Микродилуциона метода .....	59
3.4.3. <i>In vitro</i> антибиофилм активност .....	60
3.4.3.1. Припрема тестираних супстанци и хранљиве подлоге .....	60
3.4.3.2. Тестирани микроорганизми .....	61
3.4.3.3. Припрема суспензија .....	61
3.4.3.4. <i>Tissue culture plate test</i> (TCP) тест .....	61
3.4.4. <i>In vitro</i> антиоксидативна активност .....	63
3.4.4.1. Тест капацитета неутралисања DPPH радикала .....	63
3.4.4.2. Редукциона моћ .....	64

<b>4. РЕЗУЛТАТИ</b> .....	65
<b>4.1. Синтеза и карактеризација S-алкил деривата тиосалицилне киселине и одговарајућих бинуклеарних комплекса бакра(II), [Cu<sub>2</sub>(S-R-thiosal)<sub>4</sub>(H<sub>2</sub>O)<sub>2</sub>]</b> .....	66
4.1.1. Синтезе лиганата и комплекса .....	66
4.1.2. Елементалне микроанализе синтетисаних комплекса бакра(II) .....	67
4.1.3. Инфрацрвени спектри S-алкил деривата тиосалицилне киселине и одговарајућих комплекса бакра(II) .....	69
4.1.4. Магнетна мерења .....	70
4.1.5. Кристална структура бинуклеарног комплекса бакра(II) са S-метил дериватом тиосалицилне киселине, [Cu <sub>2</sub> (S-met-thiosal) <sub>4</sub> (H <sub>2</sub> O) <sub>2</sub> ] (C2) .....	71
4.1.6. Кристална структура бинуклеарног комплекса бакра(II) са S-етил дериватом тиосалицилне киселине, [Cu <sub>2</sub> (S-et-thiosal) <sub>4</sub> (H <sub>2</sub> O) <sub>2</sub> ] (C3) .....	76
4.1.7. Кристална структура бинуклеарног комплекса бакра(II) са S-пропил дериватом тиосалицилне киселине, [Cu <sub>2</sub> (S-pr-thiosal) <sub>4</sub> (DMSO) <sub>2</sub> ] (C4) .....	80
<b>4.2. Биолошка активност</b> .....	86
4.2.1. <i>In vitro</i> антитуморска активност бинуклеарних комплекса бакра(II) са S-алкил дериватима тиосалицилне киселине .....	86
4.2.2. <i>In vitro</i> антимикробна активност бинуклеарних комплекса бакра(II) са S-алкил дериватима тиосалицилне киселине .....	90
4.2.3. <i>In vitro</i> антибиофилм активност бинуклеарних комплекса бакра(II) са S-алкил дериватима тиосалицилне киселине .....	92
4.2.4. <i>In vitro</i> антиоксидативна активност бинуклеарних комплекса бакра(II) са S-алкил дериватима тиосалицилне киселине .....	94
4.2.4.1. Капацитет неутралисања DPPH радикала .....	94
4.2.4.2. Редукциона моћ .....	94
<b>5. ДИСКУСИЈА</b> .....	96
<b>6. ЗАКЉУЧАК</b> .....	107
<b>7. ЛИТЕРАТУРА</b> .....	110

# **1. УВОД**

Дуги низ година медицинска хемија искључиво је била базирана на испитивању органских једињења и природних производа. Иако је важност јона метала препозната одавно, истраживачи су испитивању неорганских једињења посвећивали веома мало пажње. Откриће особина цисплатине која се користи у терапији карцинома од 1979. године довело је до повећаног интересовања истраживача како за синтезу и карактеризацију нових комплексних једињења, тако и за испитивање њихове потенцијалне биолошке активности. Проучавањем великог броја комплексних једињења расте реална могућност открића новог једињења које би имало ширу примену у медицини.

Терапијска примена цисплатине (*cis*-диамминдихлороплатина(II)) је повезана са појавом озбиљних нежељених дејстава па се даља истраживања у области медицинске хемије усмеравају ка синтези једињења која би имала појачану биолошку активност а истовремено испољавала мање нежељених дејстава. С обзиром да се елементи платинске групе метала у организму налазе у траговима, да су егзогеног порекла и да имају токсично дејство јавила се идеја да се синтетишу комплексна једињења ендогених биоесенцијалних метала са фармаколошки активним лигандима како би се утврдило да ли ће се након комплексирања повећати фармаколошка активност лиганата.

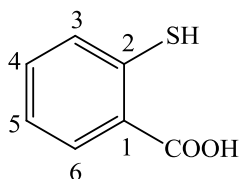
У нашем истраживању синтетисали смо S-алкил деривате тиосалицилне киселине (алкил = бензил-(L1), метил-(L2), етил-(L3), пропил-(L4) и бутил-(L5)) и одговарајуће комплексе бакра(II) (C1-C5) код којих смо очекивали бинуклеарну структуру.

Циљ ове докторске дисертације је извршити синтезу S-алкил деривата тиосалицилне киселине као бидентатних лиганата и одговарајућих бинуклеарних комплекса бакра(II). Састав добијених једињења потврдити на основу резултата елементалне микроанализе, а структуру претпоставити на основу спектроскопских метода и магнетних мерења. Структуру добијених комплекса потврдити на основу резултата рендгенске структурне анализе. Такође у оквиру ове докторске дисертације циљ је *in vitro* испитати потенцијалу биолошку активност S-алкил деривата тиосалицилне киселине и одговарајућих бинуклеарних комплекса бакра(II).

## 1.1. ТИОСАЛИЦИЛНА КИСЕЛИНА И ЊЕНИ ДЕРИВАТИ

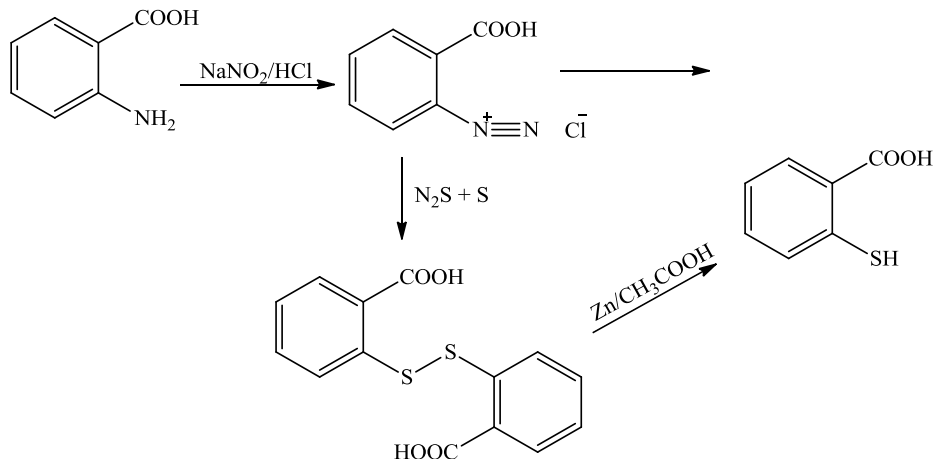
Тиосалицилна киселина најчешће у форми депротонованог лиганда може да се координује са великим бројем јона метала, што је омогућено присуством донорских атома кисеоника као тврде базе и атома сумпора као меке базе [1,2].

Тиосалицилна киселина је бифункционална дипротична киселина позната по различитим именима као што су 2-меркаптобензоева киселина, *o*-меркаптобензоева киселина или 2-сулфанилбензоева киселина. Комерцијално је доступна као чврста супстанца, беле боје и без мириса, лако растворљива у нижим алкохолима а слабо растворљива у води при ниским рН вредностима [3]. Начин обележавања атома у молекулу тиосалицилне киселине приказан је на слици 1.



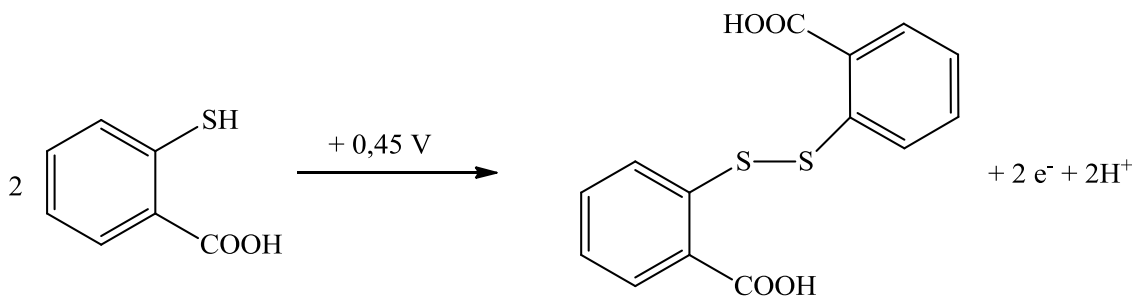
Слика 1. Начин обележавања атома тиосалицилне киселине

Тиосалицилна киселина се може синтетисати из антранилне киселине (Шема 1) [4]. У чврстом стању, стабилна је на ваздуху, међутим, слично осталим тиолима, лако се оксидује до дисулфида [5,6] (Шема 2).



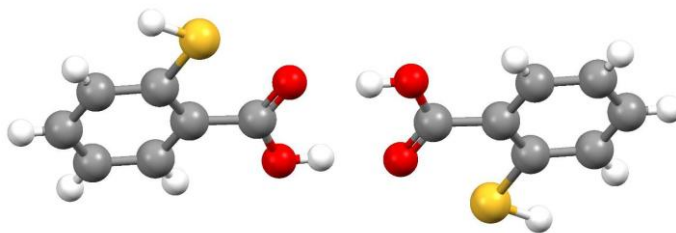
Шема 1. Метода синтезе тиосалицилне киселине





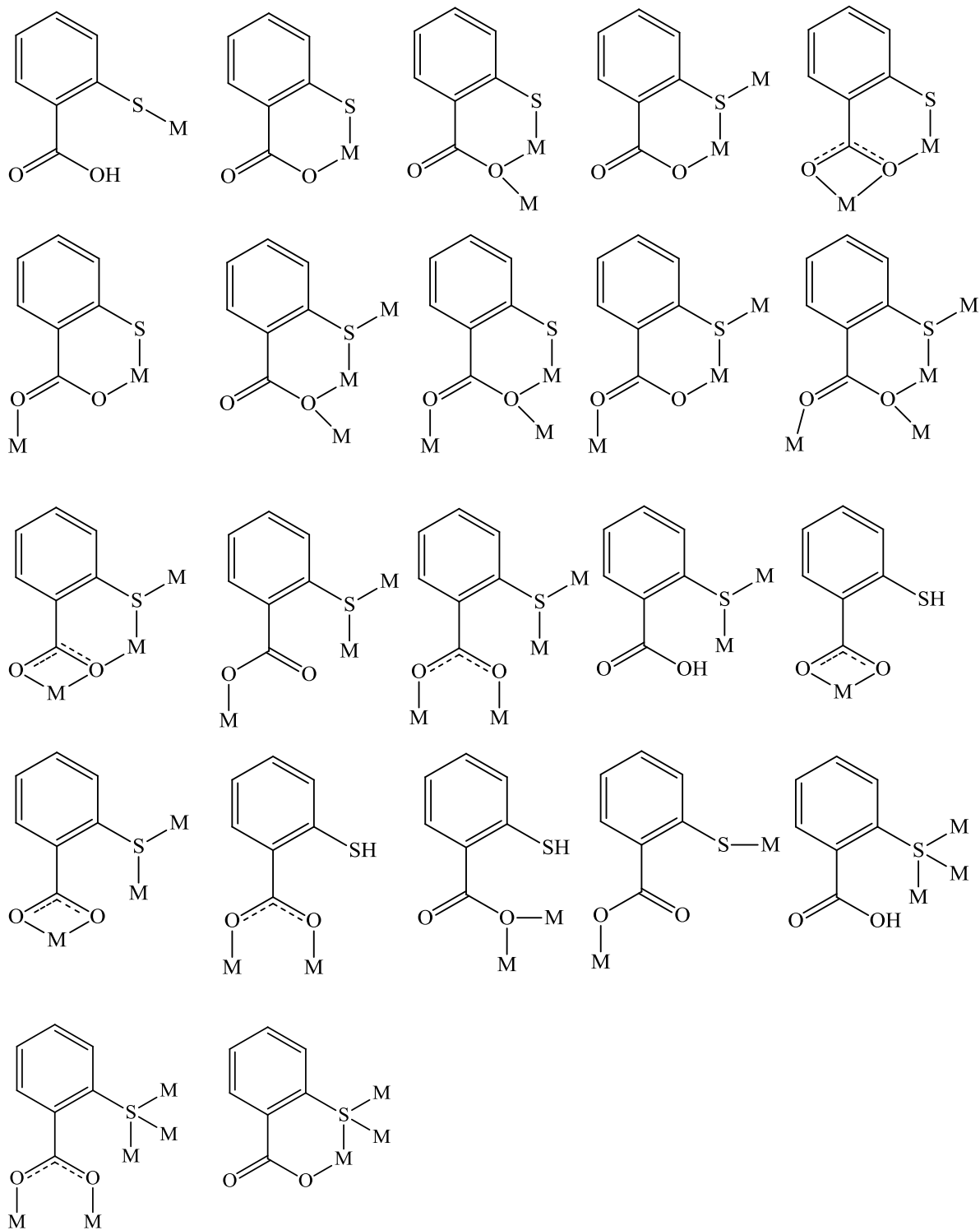
**Шема 2.** Оксидација тиосалицилне киселине до одговарајућег дисулфида

Кристална структура тиосалицилне киселине приказана је на слици 2. Између карбоксилних група формирају се водоничне везе што је праћено настанком димера, док тиолне групе стварањем водоничних веза формирају бесконачни S-H...S-H...S-H ланац. Пошто је тиолна група просторно удаљена од карбоксилне групе онемогућено је стварање S-H...O водоничне везе [7]. Инфрацрвени спектар тиосалицилне киселине је до сада објављен у више литература. Карбонилна група даје снажну апсорпциону траку на  $1675 \text{ cm}^{-1}$ , док су вибрације S-H групе примећене на  $2560 \text{ cm}^{-1}$  или  $2523 \text{ cm}^{-1}$ . У многим студијама недостатак S-H вибрација узима се као доказ стварања метал-тиолат везе. Хидроксилна група тиосалицилне киселине такође даје широку апсорпциону траку у опсегу од  $3050$  до  $2835 \text{ cm}^{-1}$  [8].



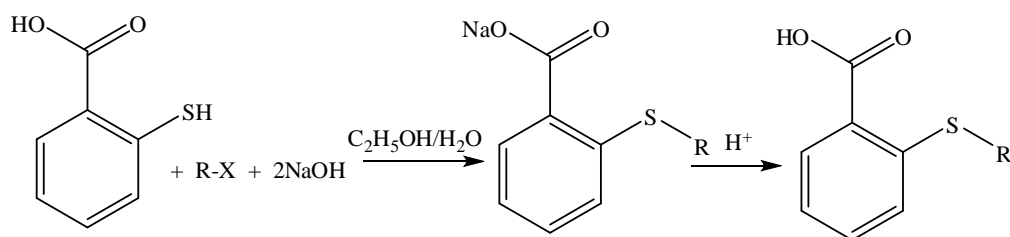
**Слика 2.** Кристална структура тиосалицилне киселине добијена на основу резултата рендгенске структурне анализе

Узимајући у обзир присуство тврђих O- и меких S-донорских атома не изненађује чињеница да деривати тиосалицилне киселине као лиганди показују различиту врсту координације према различитим јонима метала. Неки од најчешћих типова координовања који су примећени приликом структурне детерминације метал-тиосалицилат комплекса су приказани на шеми 3.



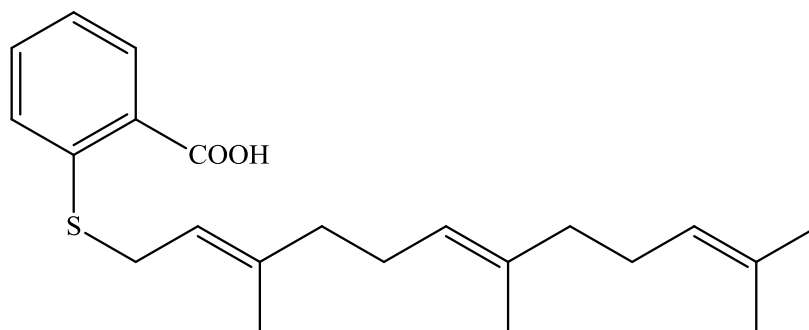
**Шема 3.** Преглед различитих начина координовања лиганата тиосалицилне киселине

Тиосалицилна киселина и њени S-алкил деривати имају разноврсну примену и то као реагенси за одређивање метала [9,10], модификатори графитних електрода [11] и као фотоиницијатори за слободно-радикалске полимеризације [12]. Имају примену и у козметичке сврхе пошто тиосалицилна киселина доводи до инхибиције раста косе [13]. Кето деривати тиосалицилне киселине имају примену и као инхибитори транспорта жучних киселина. S-алкил деривати тиосалицилне киселине (алкил = бензил-, метил-, етил-, пропил- и бутил-) могу се синтетисати на основу претходно описаног поступка [14] (Шема 4).



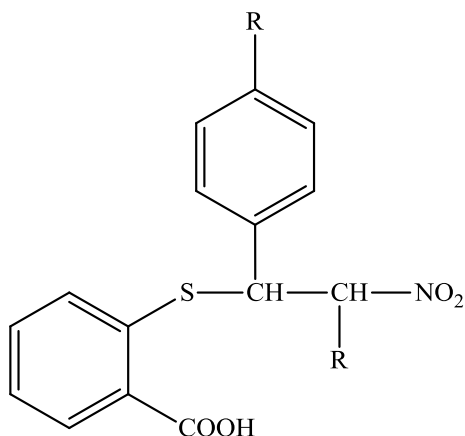
**Шема 4.** Метода синтезе S-алкил деривата тиосалицилне киселине

S-trans, trans-фарнезилтиосалицилна киселина је аналог фарнезилцистеина (Слика 3). Фарнезилтиосалицилна киселина селективно онемогућава везивање RAS протеина (*Rat sarcoma proteins*) за површину ћелијске мембране спречавајући тиме активацију RAS-зависних сигналних путева у хуманим ћелијама који регулишу процесе ћелијске пролиферације и диференцијације [15]. Верује се да је абнормална активација RAS-зависних сигналних путева присутна код око једне трећине хуманих карцинома панкреаса, дебелог црева и плућа [16].



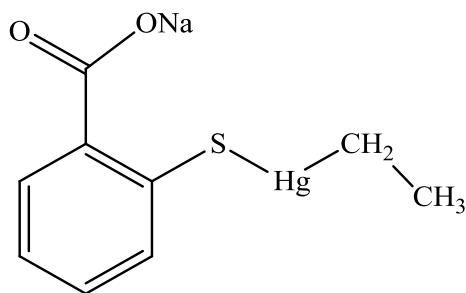
**Слика 3.** Фарнезилтиосалицилна киселина

Gökç и сарадници приказали су синтезу 2-нитро-1-фенилалкил деривата тиосалицилне киселине. Наведена једињења су синтетисана у реакцији између тиосалицилне киселине и одговарајућег β-метил-β-нитростирен деривата (Слика 4) [17].



**Слика 4.** 2-нитро-1-фенилалкил дериват тиосалицилне киселине

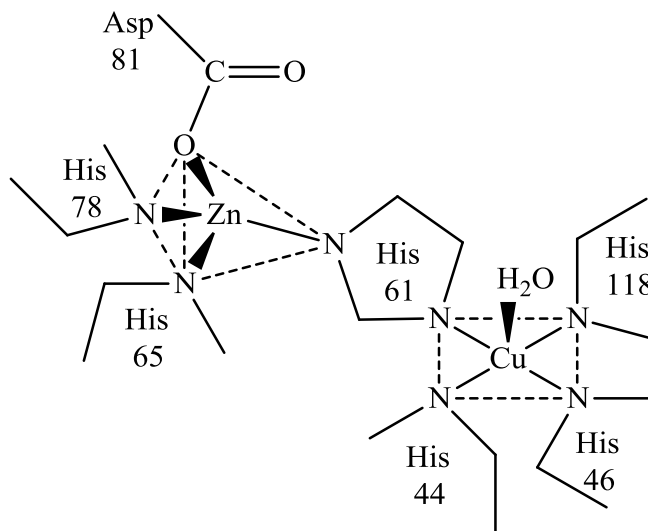
Тимеросал (натријум-етилмеркури-тиосалицилат) је дериват тиосалицилне киселине са антимикуробним и антигљивичним дејством (Слика 5). Ово једињење се користи као антисептик у козметици, формулацији топикалних лекова, раствора за испирање очију као и у производњи вакцина. У истраживањима је показано да тимеросал повећава концентрацију јона калцијума вршећи тиме активацију фосфолипазе А<sub>2</sub>, ензима који од фосфолипида ћелијске мембране ствара арахидонску киселину [18,19].



**Слика 5.** Тимеросал (Натријум-етилмеркури-тиосалицилат)

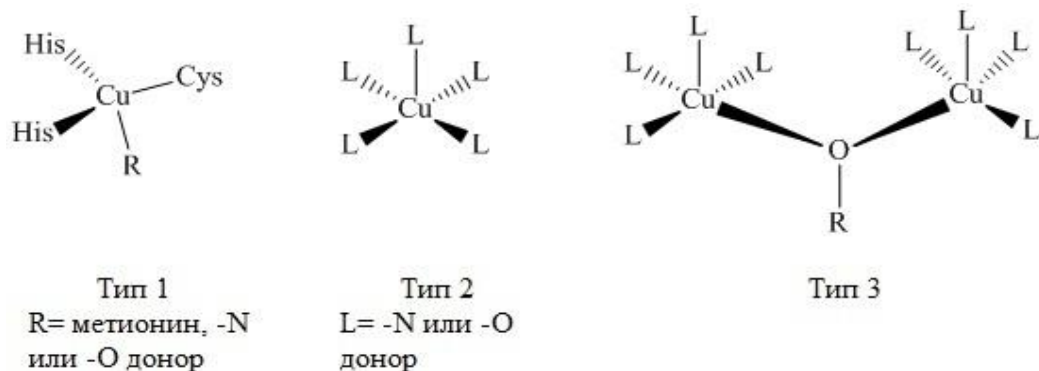
## 1.2. ФИЗИОЛОШКИ ЗНАЧАЈ БАКРА

Још 1920. године показано је да је бакар есенцијални метал од изразите биолошке важности. Тада је пронађено да се анемија код експерименталних животиња јавља као резултат смањеног уноса бакра у току редовне исхране. Додатком соли бакра долази до корекције насталог патолошког стања [20]. Јони бакра су неопходни за процесе апсорпције гвожђа, стварање еритроцита и хемоглобина, синтезу колагена и еластина, формирање костију, као и за детоксикацију организма од слободних радикала [21-23]. Бакар је редокс-активни прелазни метал који лако прелази из редукованог  $\text{Cu}^+$  у оксидовано  $\text{Cu}^{2+}$  оксидационо стање у физиолошким условима. Неопходан је за функцију бројних металоензима који су укључени у процесе енергетског метаболизма, пигментације, биосинтезе катехоламина, биосинтезе колагена, антиоксидативне заштите итд. Свој биолошки значај остварује улогом кофактора у различитим купроензимима као што су цитохром С оксидаза, лизил-оксидаза, тирозиназа,  $\text{Cu}/\text{Zn}$  супероксид-дизмутаза, допамин- $\beta$ -хидроксилаза. Јони бакра су присутни у активном центру два кључна ензима аеробног метаболизма, цитохром С оксидази и  $\text{Cu}/\text{Zn}$  супероксид-дизмутази (Слика 6) [24,25].



Слика 6. Шематски приказ структуре комплекса бакра(II) и цинка(II) у металоензиму супероксид-дизмутази [26]

У биолошким системима бакар се може наћи у три различита облика односно три активна центра која су у литератури класификована на основу видљивости у UV-VIS спектрима (Слика 7).



Слика 7. Типови активних центара бакра

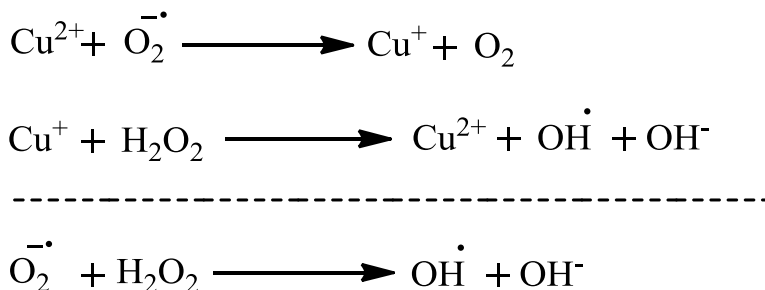
Активни центар бакра (тип 1) интензивно плаве боје садрже протеини азурин, пластоцијанин и стелацианин који имају улогу преносиоца електрона. У овом типу активног центра јон бакра је везан за два молекула хистидина или молекула цистеина. Активни центар бакра (тип 2) има слаб апсорпциони максимум па је скоро безбојан. С обзиром на способност да реверзибилно везује кисеоничне врсте овакав активни центар се налази у многим ензимима, оксидазама и оксигеназама као што су аминоксидазе, лизил-оксидазе и пептидилглицин- $\alpha$ -хидроксилазујуће монооксигеназе. У активном центру бакра (тип 3) атоми бакра су обично координовани са три молекула хистидина преко азотовог атома имидазола и мостним лигандом као што је кисеоник или хидроксилини анјон. Овакав активни центар имају ензими катехол-оксидаза и тирозиназа. Важна класа ензима са више атома бакра који обухватају лаказе, аскорбат-оксидазе и церулоплазмин садрже најмање четири јона бакра а имају сва три типа активних центара у истом молекулу.

Људски организам у физиолошким условима садржи од 80 до 120 mg бакра, од чега 8 mg у јетри, 15 mg у срцу, слезини, бубрезима и крви. Гледајући заступљеност прелазних метала у организму бакар се налази одмах иза гвожђа и цинка [24,27,28].

При вишим концентрацијама јони бакра могу бити токсични за организам па се зато њихова концентрација прецизно регулише на нивоу ћелија.

Јони бакра се елиминишу преко гастроинтестиналног тракта или путем жучи. У највећем проценту јони бакра се елиминишу преко фецеса и билијарног тракта у просеку од 0,5-1,3 mg дневно, док се у траговима елиминишу путем урина и пљувачке [29,30].

Један од главних механизма којима се објашњава ћелијска токсичност јона бакра јесте њихова улога у продукцији реактивних кисеоничних врста. У присуству супероксидног ањона или неког редукционог средства као што је аскорбинска киселина или глутантион бакар(II)-јон може да се редукује до бакар(I)-јона који је даље способан да катализује стварање хидроксилних радикала из водоник-пероксида према следећим хемијским реакцијама (Шема 5) [21-23]:



**Шема 5.** Стварање реактивних кисеоничних врста од стране јона бакра

Бројна патолошка стања повезана су са губитком купроензимске активности. Изостанак пигментације повезан је са депресијом тирозиназне активности неопходне у првом ступњу биосинтезе меланина. Поремећаји многих попречно-пругастих мишића изазвани су губитком активности аминоксидазе, посебно лизил-оксидазе. Атаксија може бити резултат депресије активности цитохром С оксидазе у моторним неуронима. Смањење активности допамин-β-хидроксилазе може резултирати поремећајима у биолошкој конверзији катехоламина [20,31].

Као последице поремећаја метаболизма бакра и његове хомеостазе јављају се два патолошка стања позната као Вилсонова и Менкенсова болест. Вилсонова болест је генетски поремећај метаболизма бакра. Поремећај билијарне екскреције бакра доводи до његове акумулације што доводи до озбиљне болести.

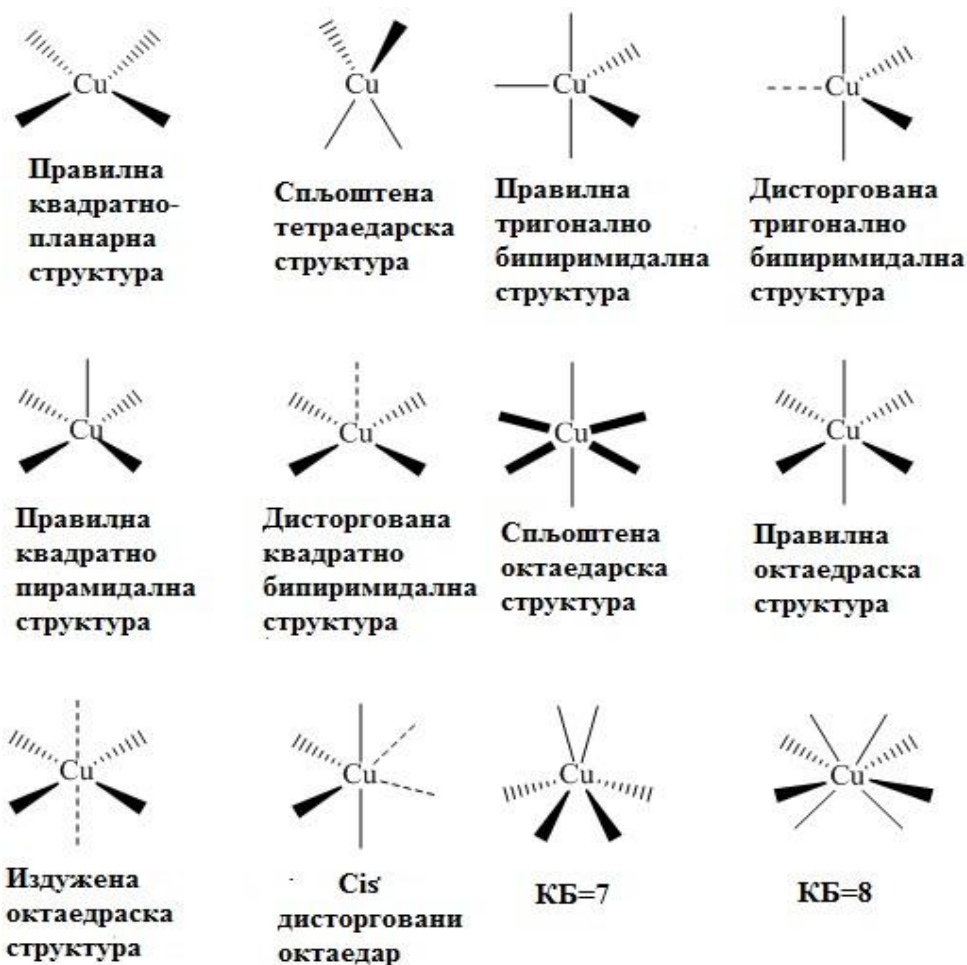
Болест се наслеђује аутозомно-рецесивно и последица је оштећења гена за Вилсонов протеин АТР7В који је одговоран за синтезу ензима аденозинтрифосфатазе који посредује у трансмембранском преносу бакра. Последица генетског оштећења је недостатак церулопазмина, молекула који преноси бакар у крвној плазми. Услед недостатка церулопазмина немогуће је одржавање нормалног метаболизма бакра који се због недостатка носача везује слабир везама за серумске протеине и истовремено таложи у органима, а нарочито у јетри и мозгу [32]. Менкенсонова болест је генетски узрокована неуролошка болест која се јавља као последица дефицита бакра у организму. Последица је генетског оштећења АТР7А гена. Мутација овог гена манифестује се као болест која доводи до неуролошких оштећења, металне ретардације, поремећаја раста косе, прелома костију и анеуризме аорте [33].

Ацерулоплазминемиа је аутозомно-рецесивна болест која се јавља као последица мутација у генском аелу церулопазмина на хромозому 3q. Генетско оштећење доводи до потпуног недостатка церулопазмина у крви, због чега долази до акумулације гвожђа. Недостатак церулопазмина не изазива значајне промене у метаболизму бакра али потпуно мења метаболизам гвожђа изазивајући његово нагомилавање у јетри, панкреасу, ретини и у централном нервном систему [34].

### 1.3. КООРДИНАЦИОНА ХЕМИЈА БАКАР(II)-ЈОНА

Хемија водених раствора бакар(II)-јона је веома обимна зато што овај јон гради бројне растворне соли и велики број комплексних једињења са лигандима различите дентатности [35,36]. Оксидациона стања бакра су 0, +1, +2, +3 и +4. Бакар(II)-јон је најстабилнији и гради највећи број комплексних једињења. Овај јон има електронску конфигурацију  $(Ar)3d^9$  и гради парамагнетичне јако обојене комплексе, док бакар(I)-јон електронске конфигурације  $(Ar)3d^{10}$  гради дијамагнетичне и готово безбојне комплексе. Као и остали катјони 3d серије прелазних метала бакар(II)-јон гради комплексе координационог броја четири, пет и шест (Слика 8) [37,38].





Слика 8. Геометријске структуре комплекса бакар(II)-јона [39]

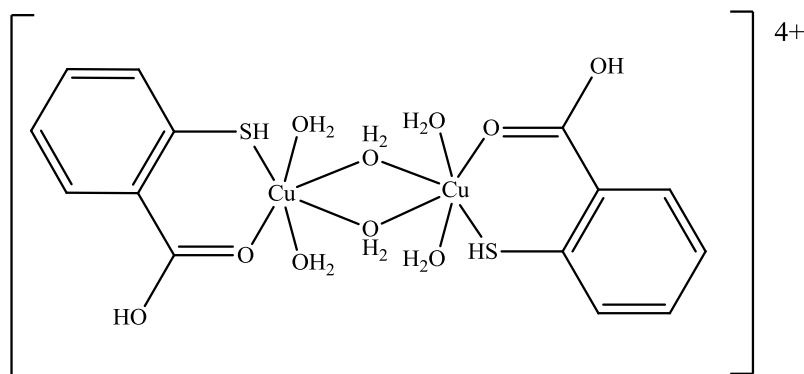
Већина бакар(II)-комплекса са координационом бројем 6 има издужену тетрагоналну или ромбичну структуру која се јавља због неједнаких дужина веза у аксијалном и екваторијалном положају [39]. Са координационим бројем 4 овај јон гради комплексе тетраедарске и квадратно-планарне структуре, док са координационим бројем 5 гради комплексе тригонално-бипиримидалне структуре. Велика разноликост у грађењу геометријских структура омогућава велики избор лиганата и њихових доворских атома са афинитетом за тврде  $sp^3$  хибридлизоване атоме азота и кисеоника што је и очекивано узимајући у обзир да се бакар(II)-јон понаша као тврда киселина [40].

Правилан октаедар није уобичајен за комплексе бакра(II) мада је у случају комплекса  $K_2Pb[Cu(NO_2)_6]$  [41] нађена структура правилног октаедра са свих шест Cu-N веза исте дужине од 2,11 Å. Правилан тригонални октаедар јавља се у случају *tris*-хелатних комплекса [42,43] и код комплекса са тридентатним [44] и монодентатним лигандима [45]. Издужени тетрагонални октаедар је врло распрострањена стереохемија код комплекса бакра(II) са монодентатним лигандима, док се издужена ромбична октаедарска структура јавља само код комплекса са нееквивалентним лигандима [46]. Структурни подаци тетракоординованих бакар(II)-комплекса квадратно-планарне и тетраедарске геометрије указују да је дисторзија више изражена код тетраедарских него код квадратно-планарних комплекса [37,38]. Квадратно-планарна структура јавља се код бакар(II)-комплекса са монодентатним и бидентатним хелатним лигандима [46]. Правилна тетраедраска структура комплекса бакра(II) до сада није позната, за разлику од спљоштене тетраедарске и правилне квадратно-планарне геометрије. Сплљоштена тетраедарска геометрија је присутна у комплексима са монодентатним и хелатним лигандима [47,48]. Правилна квадратно-пирамидална структура јавља се у ограниченом броју бакар(II)-комплекса са еквивалентним и нееквивалентним лигандима. Код правилне квадратно-пирамидалне структуре четири везе су у равни, нормалне су дужине и износе око 2,0 Å за донорске атоме кисеоника или азота и око 2,3 Å за Cl лиганде, док је пета веза за 0,2-0,5 Å дужа од поменутих веза у равни [49].

Правилна тригонално-бипиримидална геометрија јавља се такође у одређеном броју бакар(II)-комплекса, међутим већи број структура координационог броја 5 показује одступање од правилне квадратно-пирамидалне и тригонално-бипиримидалне геометрије [50]. *Cis*-дисторговани октаедарски модел јавља се у ограниченом броју бакар(II)-комплекса са нееквивалентним лигандима и ограничен је на комплексе типа  $[Cu(helat)_2(OXO)]$ , где је OXO бидентатни тригонално-планарни анјон који приликом координовања формира четворочлане прстенове.

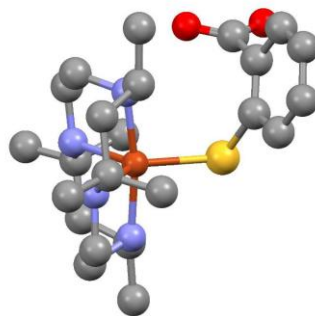
## 1.4. СТРУКТУРНЕ КАРАКТЕРИСТИКЕ КОМПЛЕКСА БАКРА(II) СА ТИОСАЛИЦИЛНОМ КИСЕЛИНОМ КАО ЛИГАНДОМ

Подаци из доступних радова показују изразиту променљивост у формирању различитих комплекса бакра(II) са тиосалицилном киселином као лигандом. У једном раду приказана је реакција бакар(II)-сулфата и тиосалицилне киселине при чему је добијено једињење који није даље окарактерисано [51]. Формирање прелазних бакар(II)-комплекса са тиосалицилном киселином као интермедијера у реакцији оксидације тиосалицилне киселине бакар(II)-јоном проучавано је коришћењем ESR спектроскопије (*Electron Spin Resonance Spectroscopy*) у базним условима [52]. Ferrer и сарадници илустровали су редокс особине бакар(II)-јона тако што су приказали оксидацију тиосалицилне киселине у метанолном раствору. Користили су благе реакционе услове, пиридин N-оксид и бакар(II)-хлорид као катализаторе [53]. На слици 9 приказана је структура синтетисаног бакар(II)-комплекса  $[\text{Cu}_2(\text{HS-C}_6\text{H}_4\text{-COOH})_2(\text{H}_2\text{O})_6]^{4+}$  чији је састав потврђен на основу резултата елементарне микроанализе, а структура награђеног комплекса претпостављена на основу инфрацрвене спектроскопије [54].



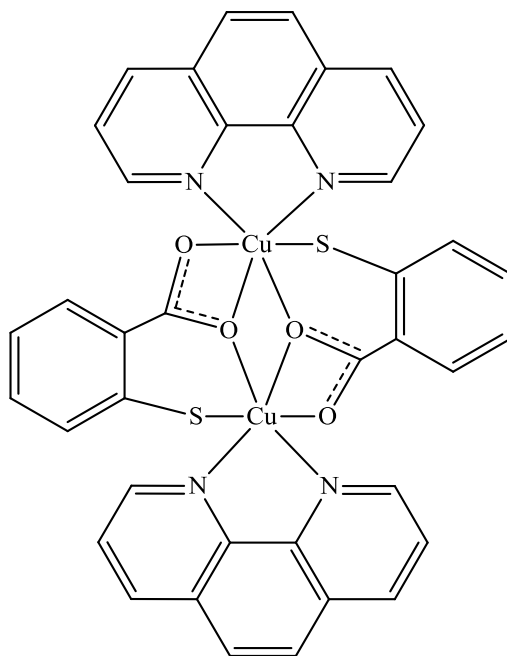
Слика 9. Структура  $[\text{Cu}_2(\text{HSC}_6\text{H}_4\text{COOH})_2(\text{H}_2\text{O})_6]^{4+}$  комплекса

Коришћењем лиганата који садрже азот донорске атоме комплекси бакра(II) са тиосалицилном киселином могу да се стабилизују. Најбољи пример оваквог лиганда је тетраазоциклотетрадекан (tet b). Реакцијом комплекса  $[\text{Cu}(\text{tet b})]^{2+}$  и динатријумове соли тиосалицилне киселине добијени су тамнозелени кристали веома стабилног бакар(II)-комплекса који садржи тригонално бипиримидални центар бакра (Слика 10). Молекули тиосалицилне киселине као лиганди повезани су са јоном бакра само преко атома сумпора [55].



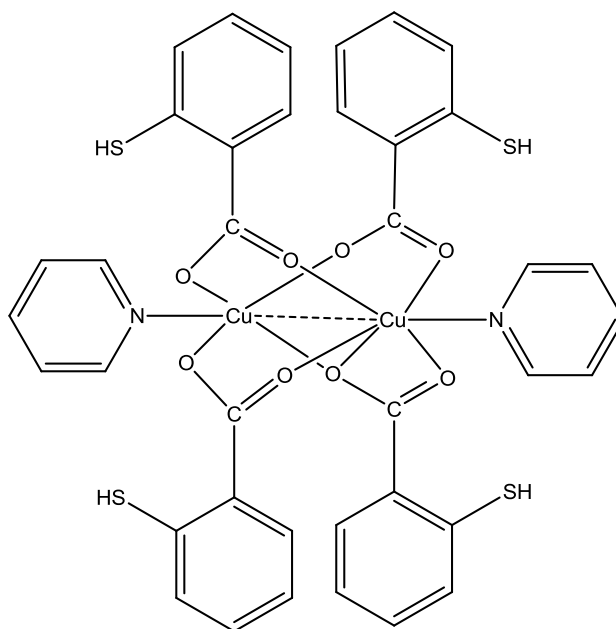
Слика 10. Структура  $[(\text{Cu}(\text{tet } b)(\text{SC}_6\text{H}_4\text{CO}_2)]$  комплекса

Бинуклеарни комплекс бабра(II) са тиосалицилном киселином  $[\text{Cu}_2(\text{SC}_6\text{H}_4\text{CO}_2)_2(\text{phen})_2]$ , ( $\text{phen} = 1,10$ -фенантролин) добијен је реакцијом дисулфида тиосалицилне киселине са бабра(II)-хлоридом при чему је структурно потврђено постојање карбоксилатних мостова (Слика 11) [56]. Реакцијом натријумове соли тиосалицилне киселине са бабра(II)-хлоридом у метанолу уз додатак пиридина добијен је бинуклеарни комплекс  $[\text{Cu}(\text{TSA})_2\text{py}]_2$ , ( $\text{TSA} =$  тиосалицилна киселина,  $\text{py} =$  пиридин) који је типичан за друге бабра(II)-карбоксилате,  $\text{SH}$  група тиосалицилне киселине остаје некоординована.



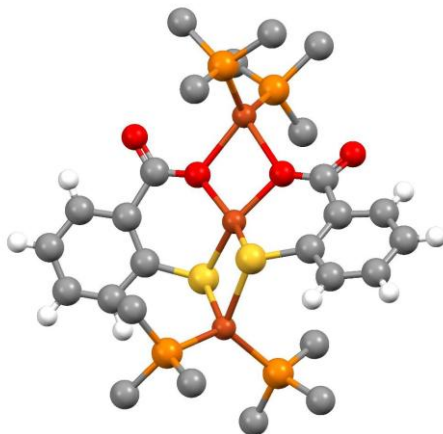
Слика 11. Структура  $[\text{Cu}_2(\text{SC}_6\text{H}_4\text{CO}_2)_2(\text{phen})_2]$  комплекса

Два атома бакра у бинуклеарној структури овог комплекса премошћена су са четири молекула тиосалицилне киселине преко атома кисеоника карбоксилних група, при чему се ствара антиферромагнетична интеракција између два јона бакра. Иако поменути комплекс није структурно потврђен на основу резултата рендгенске структурне анализе, претпоставља се да два молекула пиридина такође играју улогу лиганата и заузимају аксијалне позиције (Слика 12) [57]. Са друге стране Subrahmanyam и сарадници приказали су синтезу комплекса бакра(II) у чијој је структури тиосалицилна киселина као лиганд координована само преко тиолне групе за бакар(II)-јон [58].



Слика 12. Структура  $[Cu(TSA)_2py]_2$  комплекса

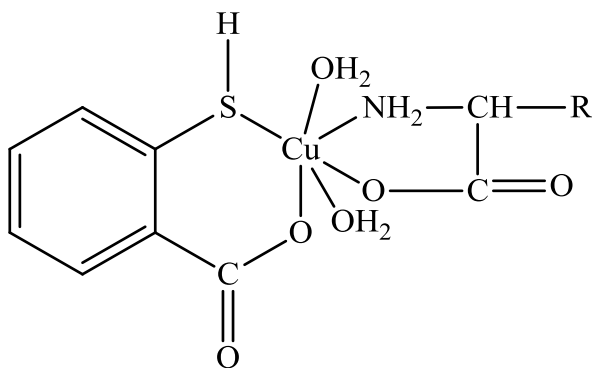
Мешовити бакар(I)-бакар(II)-комплекс  $[\{Cu(PPh_3)_2\}_2\{Cu(SC_6H_4CO_2)_2\}]$  добијен је анодним растварањем металног бакра у ацетонитрилном раствору  $PPh_3$  и тиосалицилној киселини при чему је добијено једињење тамно-зелене боје. Са слике 13 се може видети да је комплекс  $[Cu(S-C_6H_4-CO_2)_2]^{2-}$  координован за две  $Cu(PPh_3)_2^+$  групе. Једна група је координована преко два атома кисеоника карбоксилатних лиганата, а друга преко тиолато сумпора, при чему се формира  $P_2CuO_2CuS_2CuP_2$  језгро [59].



**Слика 13.** Молекулска структура бакар(I)-бакар(II)-комплекса

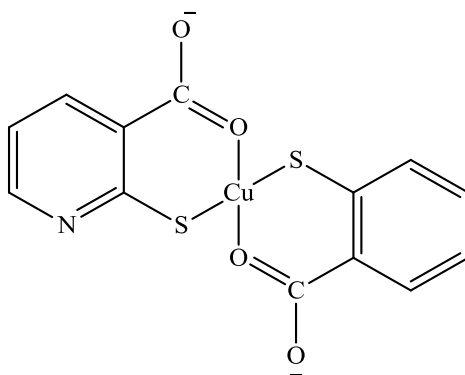


Abdel-Mawgoud и сарадници приказали су синтезу тернарних комплекса бакар(II) са тиосалицилном киселином и аминокиселинама као лигандима. Комплекси опште формуле  $[M(TSA)(aa)] \cdot 2H_2O$ , ( $M = Co^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$  и  $Zn^{2+}$ ,  $aa =$  глицин, аланин и валин) су окарактерисани помоћу спектроскопских метода. На основу инфрацрвеног спектра закључено је да се тиосалицилна киселина понаша као бидентатни лиганд и да се координује преко атома сумпора и кисеоника као доворских атома за бакар(II)-јон. Аминокиселине се такође координују бидентатно за бакар(II)-јон преко доворских атома азота и кисеоника (Слика 14) [60].



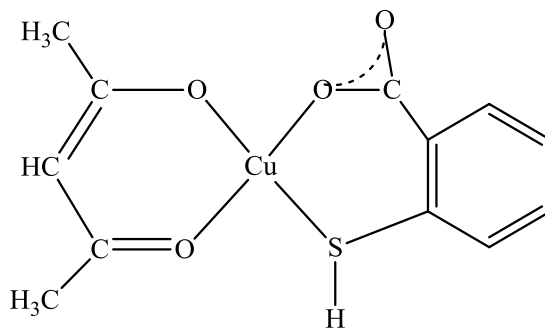
**Слика 14.** Комплекс бакар(II)-јона са тиосалицилном киселином и аминокиселинама,  $R = H$  (глицин),  $CH_3$  (аланин),  $CH(CH_3)_2$  (валин)

Idriss и сарадници пратили су спектрофотохемијски реакцију између комплекса  $[\text{Cu}^{2+}\text{MENA}]$ , (MENA = 2-меркаптоникотинска киселина) и тиосалицилне киселине. Истраживачи су претпоставили да добијени комплекс  $[\text{Cu}(\text{MENA})(\text{TSA})]$  (TSA = тиосалицилна киселина) има тетрагоналну структуру и да су молекули 2-меркаптоникотинске и тиосалицилне киселине координовани бидентатно преко атома сумпора сулфахидрилне групе и преко карбонилног кисеоника карбоксилне групе за бакар(II)-јон (Слика 15) [61].



*Слика 15. Комплекс бакар(II)-јона са 2-меркаптоникотинском и тиосалицилном киселином*

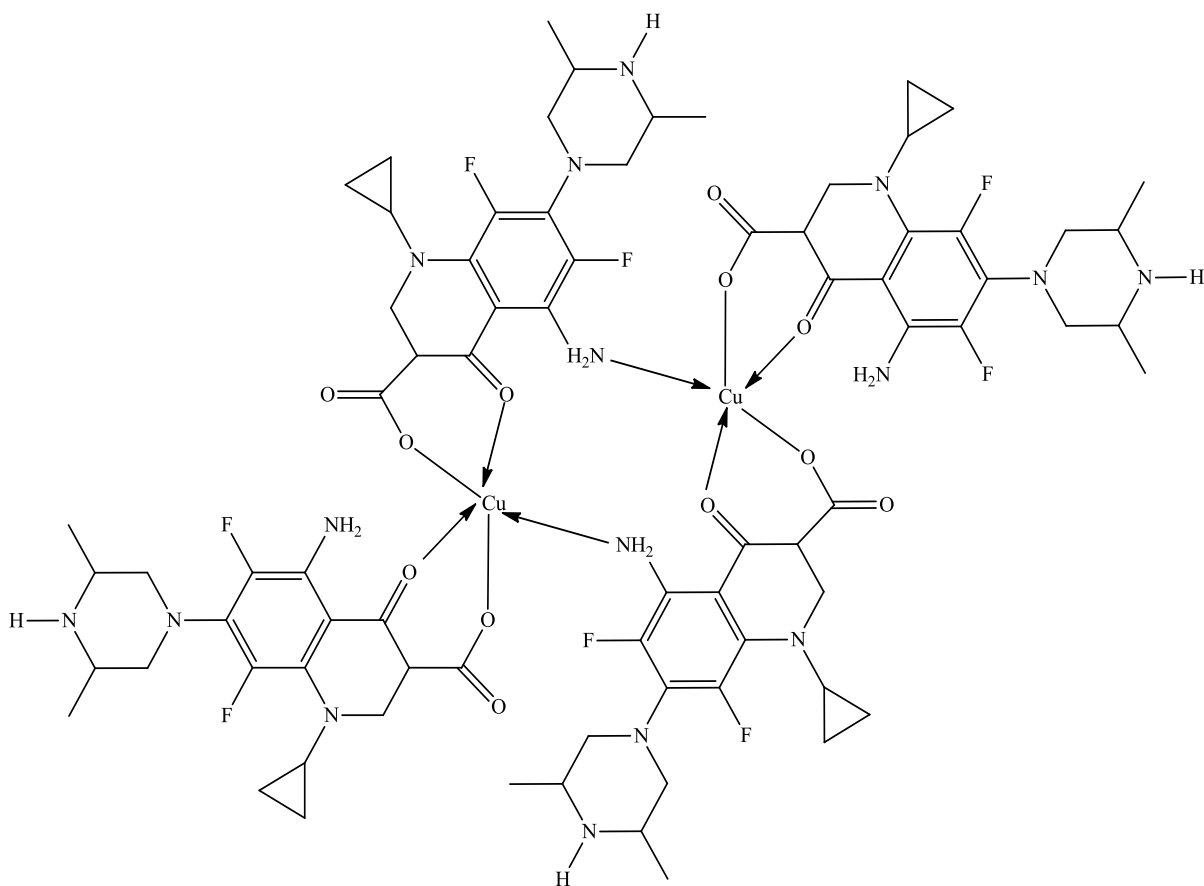
Апјанеулу и сарадници синтетисали су комплексе бакар(II) са ацетилацетоном и различитим дериватима салицилне киселине међу којима је и тиосалицилна киселина. На основу инфрацрвеног спектра претпостављено је да се тиосалицилна киселина за бакар(II)-јон координовала бидентатно преко донорских атома кисеоника и сумпора, а да се ацетилацетон координовао такође бидентатно преко два атома кисеоника (Слика 16) [62].



*Слика 16. Претпостављена структура бакар(II)-комплекса са ацетилацетоном и тиосалицилном киселином*

## 1.5. БИНУКЛЕАРНИ КОМПЛЕКСИ БАКРА(II)

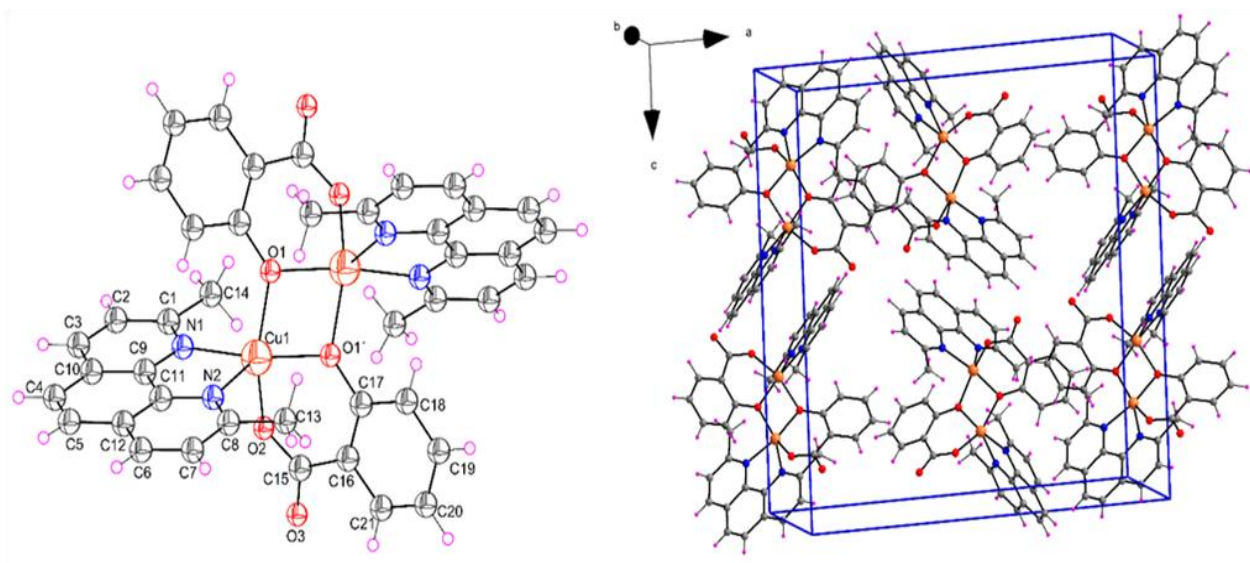
Shingnapurkar и сарадници описали су синтезу и карактеризацију комплекса бакра(II) са спарфлоксацином и фенантролином. На основу резултата рендгенске структурне анализе потврђено је да се бинуклеарни комплекс састоји од две неутралне  $[\text{Cu}_2(\text{sflx})_2]$  половине, (sflx = спарфлоксацин) у којој сваки бакар(II)-јон има квадратно-пирамидалну структуру. Сваки атом бакра координован је преко четири атома кисеоника за два молекула лиганда спарфлоксацина и преко једног атома азота из амино групе суседног молекула спарфлоксацина у аксијалној позицији (Слика 17) [63].



Слика 17. Структура комплекса бакра(II) са спарфлоксацином и фенантролином

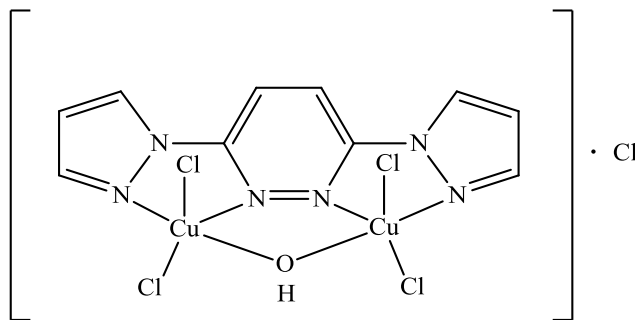


Кусковá и сарадници описали су синтезу тернарних комплекса бакра(II) са 2,9-диметил-1,10-фенантролином – неокупроином (нео) и салицилном киселином (sal) при чему је добијен бинуклеарни комплекс који садржи две  $[Cu(sal)(neo)]$  половине. У овом комплексу јони бакра имају деформисану квадратно-пирамидалну геометрију (Слика 18) [64].



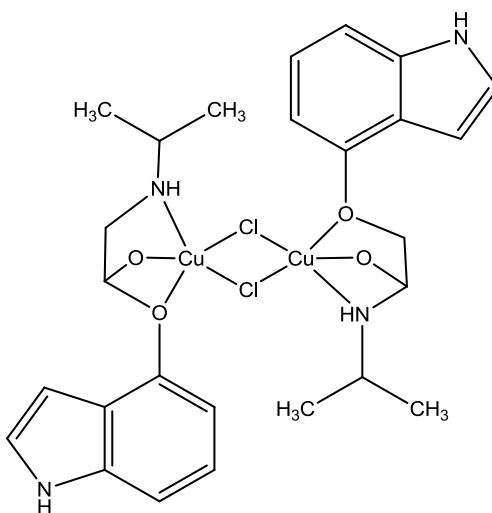
Слика 18. Кристална структура и начин паковања  $[Cu(Sal)(Neo)]_2$  комплекса

Dutta и сарадници приказали су синтезу бинуклеарног комплекса бакра(II) који је добијен директном реакцијом бакар(II)-хлорида и деривата пиридазина као лиганда. Настали комплекс има квадратно-пирамидалну структуру (Слика 19) [65].

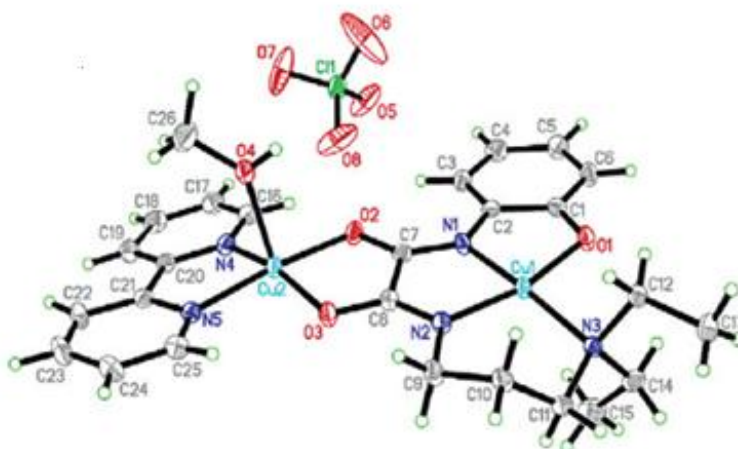


Слика 19. Структура комплекса  $[Cu_2bis(3,6-pyrazol-1-yl)pyridazine]Cl_4OH \cdot Cl$

Gölcü и сарадници приказали су синтезу бинуклеарног комплекса бабра(II) са антихипертензивом пиндололом. Пиндолол се понаша као бидентатни лиганд са азотом и кисеоником као донорским атомима. Синтеза комплекса извршена је додавањем раствора бабра(II)-хлорида у раствор пиндолола у метанолу при чему је добијен зелени талог (Слика 20) [66]. Гао и сарадници описали су синтезу бинуклеарног комплекса бабра(II) са 2,2'-бипиридином и *N*-(2-хидроксифенил)-*N'*-[3-(диетиламино)пропил]оксамидом као мостним лигандом (Слика 21) [67].



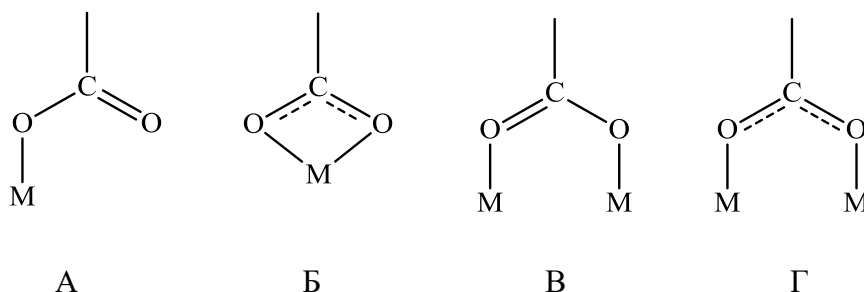
Слика 20. Бинуклеарни комплекс бабра(II) са пиндололом



Слика 21. Кристална структура  $[Cu_2(pdrex)(bpy)(CH_3OH)](ClO_4)$   
(*pdrex* = *N*-(2-хидроксифенил)-*N'*-[3-(диетиламино)пропил]оксамид, *bpy* = 2,2'-бипиридин)

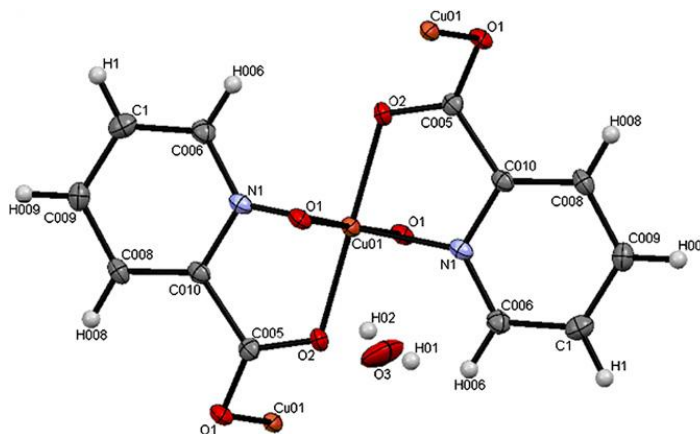
## 1.6. КОМПЛЕКСИ БАКРА(II) СА КАРБОКСИЛАТНИМ АНЈОНИМА

Карбоксилатни анјон као лиганд може се координовати за централни јон метала на четири начина: као асиметрични монодентатни (А), симетрични бидентатни (Б) и асиметрични бидентатни лиганд (В и Г) (Слика 22).



*Слика 22. Начини координовања карбоксилатног анјона за централни јон метала*

Siddiqi и сарадници у свом раду приказали су синтезу и карактеризацију комплекса бакра(II) који је добијен реакцијом бакар(II)-ацетата и оксидисирћетне киселине у молском односу 1:1 у присуству 2-пиколинске киселине на собној температури. Октаедарска структура награђеног комплекса потврђена је на основу резултата инфрацрвене спектроскопије и рендгенске структурне анализе (Слика 23) [68].



*Слика 23. Кристална структура комплекса бакра(II) са оксидисирћетном и 2-пиколинском киселином*

## 1.7. БИОЛОШКА АКТИВНОСТ КОМПЛЕКСА БАКРА(II)

### 1.7.1. Антитуморска активност комплекса бакра(II)

Узимајући у обзир да биоесенцијални метали могу бити токсични за организам уколико се наруше њихови природни метаболички путеви од ових комплекса може се очекивати одређено цитотоксично деловање. Структурно, испитивани комплекси као лиганде најчешће садрже различита ароматична једињења која се могу координовати преко N-, S- и O-донорских атома [30].

Тиосемикарбазони чине класу лиганда који обухватају велики број структурно различитих једињења која се могу координовати за централне јоне метала на различите начине што зависи од присутних супституената, па се тако могу понашати као N S бидентатни, N N S тридентатни и N<sub>2</sub> S O тетрадентатни лиганди [39]. Антитуморска активност тиосемикарбазона проучава се још од средине 20. века, а њихов развој је још увек у току [69]. Неки од њих као што су *Marboran* и *Triapine* се користе у клиничкој пракси као антивирусни лекови [39]. Антитуморска активност комплекса бакра(II) и тиосемикарбазона интензивно је проучавана због њихове способности инхибиције ензима рибонуклеотид-дифосфат-редуктазе и селективности према хормон-зависним туморима. Бројна истраживања показала су да увођењем фармакофоре тиосемикарбазона на почетно једињење долази до значајног појачања антипролиферативног дејства. Међутим, слаба растворљивост добијених комплекса у води и изразита токсичност *in vivo* јавили су се као проблеми при практичној примени [27,30].

Ferrari и сарадници испитали су антитуморску активност комплекса  $[Cu(\text{hsalt})(\text{H}_2\text{O})_2]\text{SO}_4 \cdot 2 \text{DMSO} \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  ( $\text{H}_2\text{salt}$  = салицилалдехид тиосемикарбазон) *in vitro* на хуманој ћелијској линији леукемије U937. Резултати експеримената показују да је комплекс инхибирао 40% ћелијске пролиферације при концентрацијама од 0,3 и 0,5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  [70]. Palanimuthu и сарадници испитали су антитуморску активност комплекса бакра(II) са дериватима глиоксала као лигандима.

Највишу антитуморску активност у истраживању показао је комплекс бакра са лигандом глиоксал-*bis*(4-метил-4-фенил-3-тиосемикарбазоном) према ћелијским линијама НСТ-116 и МДА-МВ-231 са  $IC_{50}$  вредностима  $1,45 \pm 0,7 \mu\text{M}$  односно  $1,23 \pm 0,27 \mu\text{M}$  [71]. Карбоксамидазони имају структурне сличности са хетероцикличним тиосемикарбазонима, па тако њихови комплекси показују добру антитуморску активност према хормон-зависним туморима. Комплекс бакра(II) са пиридин-2-карбоксамидазоном као лигандом показао је велику ефикасност према хуманој ћелијској линији карцинома дојке МСF7.  $IC_{50}$  вредност за испитивани комплекс износила је  $3 \mu\text{M}$  што је 4 пута мања вредност него  $IC_{50}$  вредност лиганда. Добра антитуморска активност комплекса бакра са лигандима из групе карбоксамидазона може се објаснити њиховим афинитетом за специфично везивање за естрогенске рецепторе чиме се остварује антипролиферативни ефекат на карцином дојке и на друге хормон-зависне туморе [72]. Комплекс  $[\text{Cu}(\text{аррс})\text{Cl}_2]$  (аррс = *N*1-(2-ацетилпиридин)пиридин-2-карбоксимидазон) показао је значајну антитуморску активност према ћелијама В16F10 мишјег меланома са  $IC_{50}$  вредношћу која износи  $6,8 \mu\text{M}$  [73]. Биолошка активност комплекса бакра(II) са дериватима пурина као лигандима приказана је од стране Трагнуџек и сарадника. Тестирана комплексна једињења показала су способност инхибиције ћелијског раста на различитим ћелијским линијама. Вредности  $IC_{50}$  за почетна једињења  $\text{CuCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$  као и за коришћене лиганде на свим испитиваним ћелијским линијама биле су значајно ниже у односу на одговарајуће комплексе бакра(II) што указује на то да се цитотоксична активност лиганда значајно повећала након формирања комплекса. Најосетљивија ћелијска линија према испитиваним једињењима била је В16F10 мишјег меланома са  $IC_{50}$  вредностима у опсегу од 8,2 до  $19 \mu\text{M}$  [74].

Висока антитуморска активност комплекса  $[\text{Cu}(\text{AcO})_2(\text{him})_2]$  (AcO = ацетато, him = имидазол) према ћелијској линији В16 мишјег меланома је добро позната [75]. Сличан комплекс бакра који као лиганд садржи 1-метил-4,5-дифенилимидазол је такође испитиван. Добијени резултати показују да концентрација комплекса између  $0,77$  и  $1,54 \cdot 10^{-6}$  М изазива цитогенетско оштећење у култури хуманих лимфоцита [76]. Пирролидин дитиокарбамат комплекси бакра(II) изазивају инхибицију протеазома *in vitro* према LNCaP ћелијској линији карцинома простате.

Такође пиридин дитиокарбамат комплекси спречавају пролиферацију ВЕ2С хуманих ћелија неуробластома ( $IC_{50} = 8 \mu M$ ) што је значајно ефикасније у поређењу са ефектом цисплатине ( $IC_{50} = 80 \mu M$ ) [77]. Бројни мешани комплекси бабра(II) који у својој структури имају један или два бидентата лиганда N N или O O типа су синтетисани и испитана им је биолошка активност. Комплекси опште формуле  $[CuLL']$  где је  $L = N,N$  лиганд као што је фенантролин или 2,2'-бипиридин, и  $L' = N N$  или N O лиганд као што је ацетилацетонато или глицинато показују значајну *in vitro* и *in vivo* антинеопластичну активност према различитим туморским ћелијским линијама. Они интерагују са митохондријама здравих и туморских ћелија спречавајући оксидативну фосфорилацију и респирацију [78]. Такође показују велики афинитет за везивање за молекулу ДНК. Оштећење молекула ДНК настаје услед продукције реактивних кисеоничних врста [79]. Тако комплекс бабра(II) са *o*-јодохипуричном киселином остварује антитуморску и нуклеазну активност. Инхибиција ћелијског раста аденокарцинома примећена је 24 часа након администрације комплекса у концентрацији од 75 nM [80]. Добро је познато да бабра(II)-комплекси са хелатним лигандима остварују одличну биолошку активност. Тако је тестирана антитуморска активност комплекса  $[Cu(pdta-H_2)(H_2O)_2]$  ( $pdta = 1,2$  пропилендиамин- $N,N,N,N'$ -тетрасирћетна киселина) *in vitro* на ћелијској линији тумора јајника TG и на солидном тумору Sarcoma 180 *in vivo*. Утврђено је да је при примењеним дозама од 1 и 10  $\mu g/mL$  кинетика раста туморских ћелија била значајно нижа у поређењу са контролном групом након 48 часова. Слични резултати примећени су и након 24 часа при концентрацијама вишим од 100  $\mu g/mL$ . Из наведеног се види да се кинетика раста туморских ћелија смањује са повећањем концентрације примењених комплекса, да би се након 96 сати раст ћелија потпуно зауставио чак и при нижим концентрацијама [81]. Недавно су синтетисани и комплекси бабра(II) са различитим хемотерапеутицима. Примена доксорубицина који је комплексиран са бабра(II)-јоном у форми липозома на мишевима који су носиоци тумора довело је до значајног смањења величине туморске масе у односу на доксорубицин који је примењен самостално [82]. Комплекс бабра(II) са дисулфирамом инхибира активност протеазома у ћелијској култури карцинома дојке и код мишева који су носиоци тумора доводећи тако до смрти туморских ћелија [83].

Rajalakshmi и сарадници испитивали су *in vitro* антитуморску активност комплекса бакра(II) са дериватима терпиридина и диметилфенантролина према канцерогеним ћелијским линијама тумора дојке. Комплекс  $[\text{Cu}(\text{bitpy})(\text{dmp})](\text{NO}_3)_2$  (bitpy = бензимидазолитерпиридин, dmp = диметилфенантролин) показао је добру антитуморску активност према хуманој ћелијској линији аденокарцинома дојке MCF-7 са  $\text{IC}_{50}$  вредношћу од 3,125  $\mu\text{M}$  [84]. Dutta и сарадници испитивали су антитуморску активност бинуклеарних комплекса бакра(II) према естроген и андроген-независним туморским ћелијским линијама. Комплекси су показали одличну антипролиферативну активност према естроген-независној ћелијској линији BT-20 тумора дојке и андроген-независној ћелијској линији PC-3 тумора простате [65].

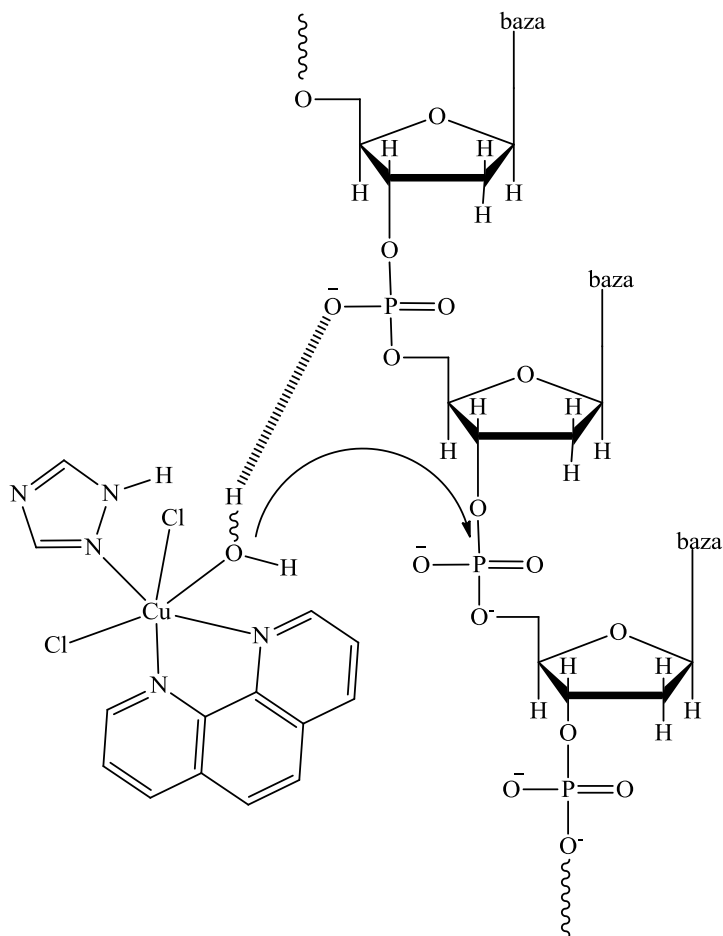
### 1.7.2. Претпостављени механизам дејства комплекса бакра(II) као антитуморских агенаса

Са изузетком групе платинских метала познато је мало чињеница о механизму дејства антитуморски активних комплекса метала. Претпоставља се да једињења бакра и других есенцијалних метала имају другачији механизам дејства, биодистрибуцију и токсичност у односу на комплексна једињења платине па постоји и могућности да ће бити ефикаснији у лечењу карцинома који су резистентни на конвенционалну терапију. Већина данашњих истраживања фокусирано је на сам интензитет биолошке активности комплекса бакра са малим освртом на молекулски механизам дејства. Претпоставља се да антитуморски активни комплекси бакра(II) своје цитотоксично дејство остварују директним везивањем за молекуле ДНК, интеракцијом са различитим ћелијским ензимима у туморским ћелијама или путем инхибиције протеазома вршећи тиме индукцију процеса апоптозе.

Још 1969. године показано је да јони бакра поседују афинитет ка везивању за ДНК молекуле, док је 1991. године објављена кристална структура која показује везивање бакар(II)-хлорида и молекула ДНК преко N7 доносног атома гуанина.

Након овог открића уследила су бројна истраживања која су се бавила комплексним једињењима бакра која интерагују са молекулом ДНК као потенцијалном биолошком метом. Показано је да су комплекси бакра способни да нековалентно интергују са двоструктим хеликсом молекула ДНК при чему настају електростатичке и интеркалаторне интеракције. У овој области највише су проучавани комплекси бакра(II) који као лиганде садрже N-донорске атоме због изузетне антитуморске ефикасности и великог афинитета ка везивању за молекулу ДНК. Тако су комплекси бакра(II) са 1,10-фенатролином и његовим дериватима описани као ефикасни цитотоксични агенси са изузетно ниским IC<sub>50</sub> вредностима [85]. Са истим циљем испитивани су и комплекси бакра који у својој структури имају бидентатне N N донорске лиганде као што су тетрациклини [86], салицилна киселина [87], терпиридин [88], хинолин [89], сулфонамиди [90] и кумарини [91]. Показано је да на процес везивања комплекса бакра за молекулу ДНК значајно утичу физичко-хемијски параметри као што су хидрофобност и природа лиганда, начин координовања и геометријска структура комплекса. Везивањем комплексних једињења бакра за молекулу ДНК у већини случајева води до деформације у структури молекула ДНК и његовог цепања. На основу раније публикованих резултата може се закључити да се комплекси бакра(II) могу понашати и као „хемијске нуклеазе“ остварујући своје дејство на молекулу ДНК оксидацијом азотних база, хидролизом фосфатних естера или оксидацијом дезоксирибозе [30]. Тако су Tabassum и сарадници спроводили истраживања у циљу открића начина везивања комплекса бакар(II)-јона за молекулу ДНК (Слика 24) [92]. Касније је у истраживањима показано да комплекси бакра(II) захваљујући својим јединственим редокс особинама могу довести и до оксидативног оштећења молекула ДНК. Верује се да до оксидативног оштећења долази посредством реакције у којој се стварају реактивне кисеоничне врсте као што су хидроксилни радикали и различити интермедијери (CuOH<sup>2+</sup>, CuO<sup>+</sup>) који узрокују директну оксидацију и цепање полинуклеотидних ланаца ДНК молекула [93]. У зависности од типа оштећења молекула ДНК у ћелији долази до активације процеса апоптозе. Упркос постојању великог броја комплексних једињења бакра за које је показано да индукују процес апоптозе, за неколико једињења из ове групе је показано и да врше директну активацију каспаза и на тај начин доводе до индукције процеса апоптозе.

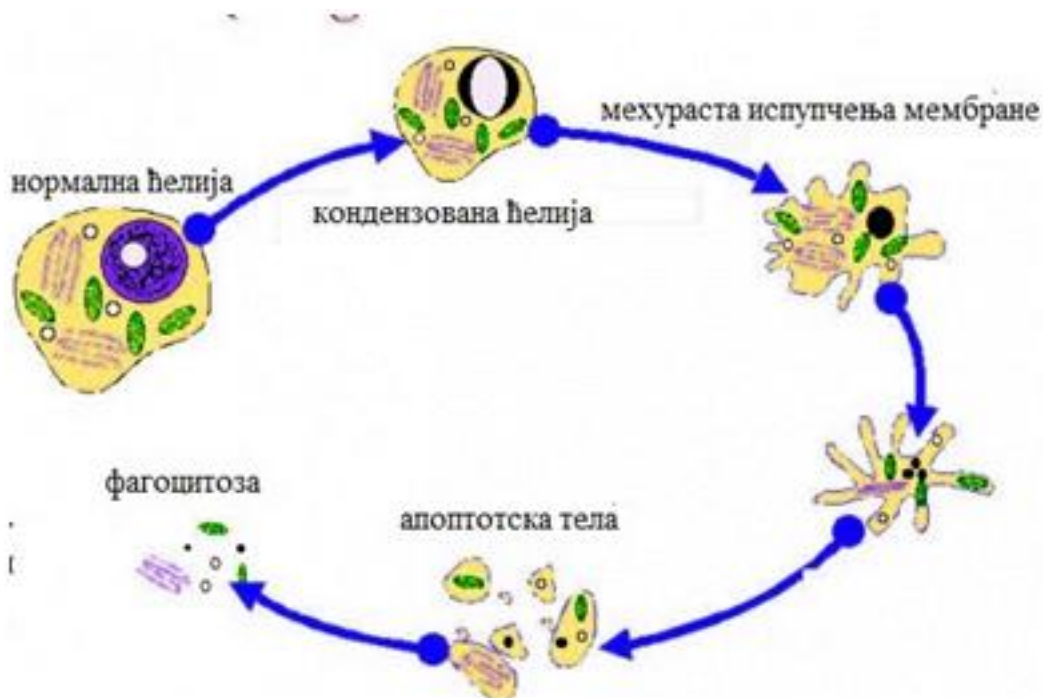




Слика 24. Претпостављени интермедијер у реакцији хидролизе молекула ДНК

На почетку процеса апоптозе долази до смежувања ћелије и пикнозе једра. Ћелије губе волумен, цитоплазма постаје гушћа а органеле постају густо распоређене. Смежување ћелије последица је разарања ламинина и актинских филамената цитоскелета. Апоптотске ћелије се услед тих промена цитоскелета заокругљују. У исто време разара се ћелијски матрикс, фрагментише се једро и распарчава молекул ДНК. Следи бубрење ћелијске мембране и одвајања делова ћелије у апоптотска телашца. Телашца садрже цитоплазму и густо спаковане органеле, као и фрагменте једра. Излагање фосфатидил-серина на спољашњој површини ћелијске мембране представља рани догађај у процесу и служи као „поједи ме“ сигнал за околне фагоците, који га препознају рецепторима за обрасце оштећења. Околне ћелије и ткивни макрофаги препознају овакве ћелије, фагоцитују их и на безбедан начин уклањају [94,95].

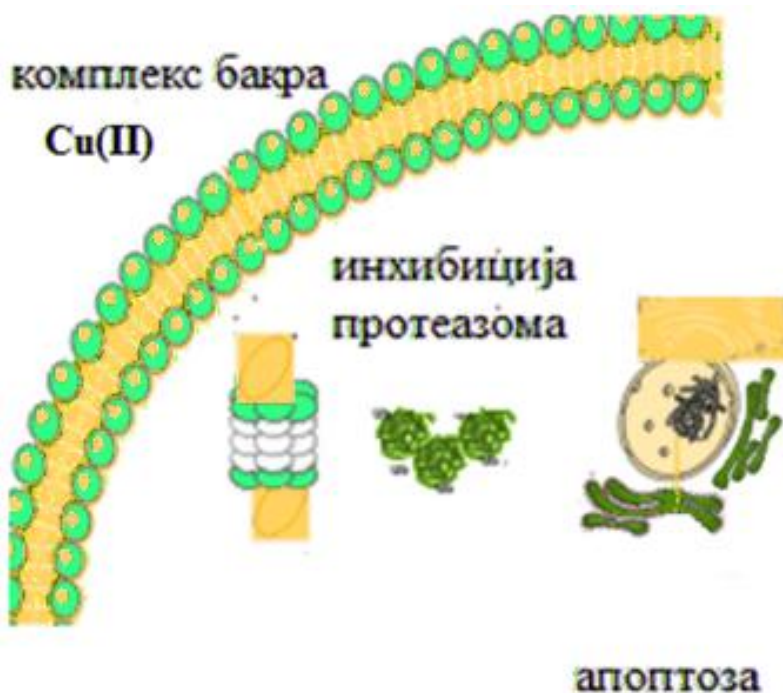
Запаљенска реакција изостаје јер апоптотске ћелије не ослобађају садржај у међућелијски простор, а апоптотска тела бивају брзо фагоцитована. Индукција апоптозе обухвата активацију цитоплазматских ензима које се зову каспазе (Слика 25) [96].



Слика 25. Морфолошке промене ћелије током апоптозе

За разлику од апоптозе некроза представља неконтролисани процес који настаје након већег оштећења ћелије изазваног различитим физичко-хемијским агенсима који оштећују ћелијску мембрану доводећи до њене руптуре што за последицу има бубрење ћелије. Насумична деструкција ћелијских структура и губитак интегритета ћелијске мембране резултира ослобађањем цитоплазматског садржаја у околно ткиво чиме се покреће запаљенска реакција [97]. Још један претпостављени механизма дејства комплекса бакра(II) јесте инхибиција ДНК топоизомераза I и II. ДНК топоизомеразе су ензими који регулишу “супернамотавање“ хумане ДНК. Топоизомераза I учествује у том процесу тако што прекида један ланац ДНК, доводи до савијања целе ДНК, а затим репарира прекинуто место. Топоизомераза II прекида оба ланца ДНК, доводи до савијања ДНК, а затим поново повезује оба ланца. Топоизомеразе су неопходне за процесе репликације ДНК и транскрипције РНК па се њиховом инхибицијом спречава репликација туморских ћелија [98].

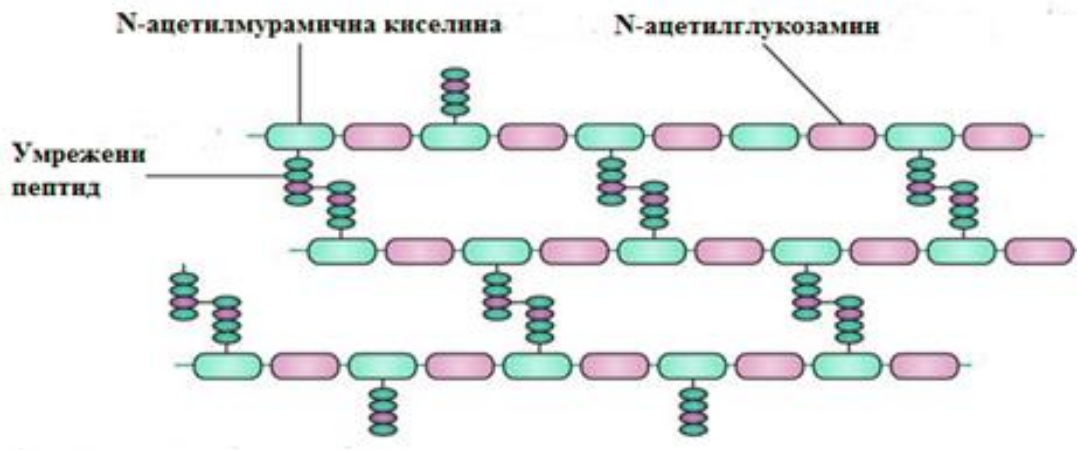
Zeglis и сарадници у свом истраживању добили су резултате који сугеришу да су  $\alpha$ -хетероциклични тиосемикарбазони и њихови бакар(II)-комплекси способни за инхибицију топоизомеразе II у *in vitro* и *in vivo* условима [99]. Dou и сарадници први су 2004. године описали комплексе бакра који су имали способност инхибиције протеазома. Ови комплекси бакра инхибицијом протеазома су селективно доводили до индукције процеса апоптозе у туморским ћелијама (Слика 26). Резултати досадашњих истраживања показују да лиганди сами по себи нису ефикасни инхибитори, већ да је формирање комплекса корак који је неопходан за транспорт јона бакра кроз ћелијску мембрану како би се постигла инхибиција протеазома што је последица повећане липофилности металног јона након координације са молекулима лиганда [100]. Протеазоми су комплекси протеаза у цитоплазми ћелије цевастог облика који разграђују протеине који су обавили своју функцију или су оштећене. У ове цевчице улазе сви протеини који су обележени малим пептидом убиквитином. По уласку у цевчице обележени протеини бивају разграђени до аминокиселина. Инхибицијом протеазома у малигним ћелијама долази до нагомилавања непотребних протеина, поремећаја нормалних функција и на крају до смрти малигне ћелије [98].



Слика 26. Шематски дијаграм инхибиције протеазома од стране комплекса бакра

### 1.7.3. Антибактеријска активност комплекса бакра(II)

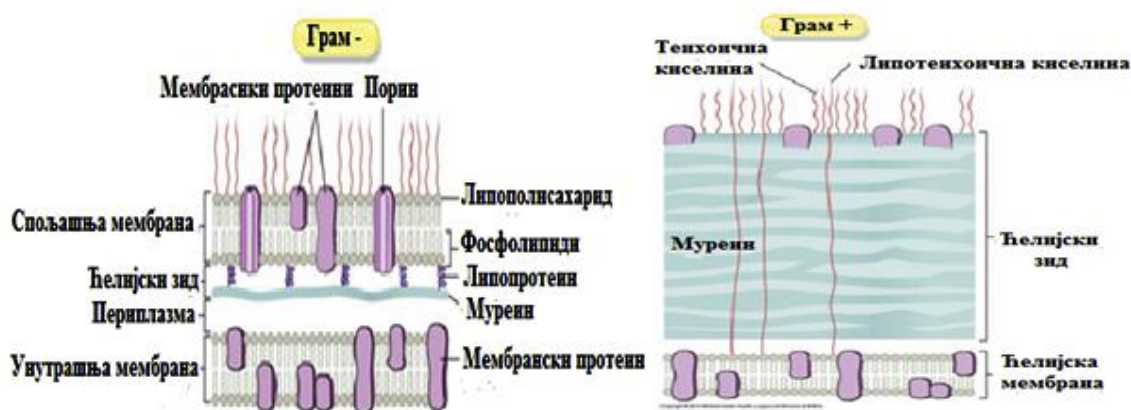
Бактерије су прокариотски микроорганизми који се по структури свог ћелијског зида деле на Грам-позитивне и Грам-негативне бактерије. Ћелијски зид бактерија је вишеслојни омотач који даје облик бактеријској ћелији и обезбеђује јој интегритет и јединственог је хемијског састава који му даје пептидоглукан. Скелет пептидоглукана састоји се од наизменично поређаних молекула N-ацетилглукозамина и N-ацетилмурамичне киселине који су спојени гликозидним везама. Грам-позитивне бактерије штите своју цитоплазматску мембрану дебелим ћелијским зидом који је највећим делом састављен од пептидоглукана. Ћелијски зид Грам-позитивних бактерија се састоји од много слојева пептидоглукана врећастог облика. Слојеви су густи па ометају пролаз хидрофобних једињења, па тако многе Грам-позитивне бактерије могу да издрже присуство ових једињења. Ћелијски зид Грам-позитивних бактерија садржи и друге полимере, као што су теихоична киселина коју чине ланци рибитола или глицерола везани за фосфодиестерски мост, липотеихоична киселина, различити полисахариди (маноза, арабиноза, галактоза) и протеини (Слика 27).



Слика 27. Грађа ћелијског зида Грам-позитивних бактерија

Ћелијски зид Грам-негативних бактерија је тањи али је знатно комплекснијег хемијског састава. Изграђен је од двослојне спољашње мембране испод које се налази танак слој пептидоглукана.

Може се очекивати да због своје липидне природе, спољашња мембрана Грам-негативних бактерија ефикасно онемогућава улазак хидрофобним једињењима. Спољашња мембрана има посебне канале порине који дозвољавају пасивну дифузију хидрофилних једињења попут шећера, аминокиселина и појединих јона. Порински канали су уски, дозвољавају улазак само једињењима одређене величине до 700 килодалтона чиме се искључује могућност проласка хидрофобних једињења (Слика 28) [101].



Слика 28. Грађа омотача Грам-негативних и Грам-позитивних бактерија

Резистенција бактерија на антибиотике представља озбиљан проблем широм света зато што је постала посебно учестала након масовне и неконтролисане потрошње антибиотика. Све је већи број бактерија које постају резистентне на постојеће антибиотике тако да је тренутно најважнији циљ бројних научних институција да пронађу антимикробне суптанце које ће заменити постојеће антибиотике.

Антимикробна својства бакра позната су још од античког доба, па су тако Римљани стављали бакарне новчиће у посуде са водом да би извршили њено пречишћавање [102]. Јони бакра показују одређену антимикробну активност која је слабија од активности сребра. Металне легуре на бази бакра користе се приликом производње ортопедских помагала како би се смањио ризик од инфекције након инвазивних ортопедских процедура. За многе комплексе бакар(II)-јона је показано да поседују антибактеријску и антигљивичну активност [103].

Испитивањем бинуклеарних комплекса бакра(II) који садрже  $\text{COO}^-$  групу координовану за бакар(II)-јон добијени су резултати који показују да испитивани комплекси бакра(II) показују добру антибактеријску активност на врстама *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* и *Salmonella typhimurium* у концентрацији од 1  $\mu\text{g/mL}$  [104]. Насупрот томе Betanzos-Lara и сарадници објавили су резултате у којима су показали да бинуклеарни комплекси бакра(II) који садрже  $\text{COO}^-$  групу координовану за бакар(II)-јон не показују антимикуробну активност према тестираним бактеријама [105]. Efthimiadou и сарадници синтетисали су комплексе бакра(II) са антибиотицима из групе хинолона спарфлоксацином [106], N-пропилнорфлоксацином [107], енрофлоксацином [108] и оксолинском киселином [109] у присуству N-донорских хетероцикличних лиганата као што су 2,2'-бипиридин, 1,10-фенантролин и 2,2'-бипиридиламин. Комплекси бакра(II) са спарфлоксацином као лигандом били су најактивнији према врстама *E. coli*, *Pseudomonas aeruginosa* и *S. aureus* у поређењу са одговарајућим бакар-флуорохинолон комплексима са N-пропилнорфлоксацином, енрофлоксацином и оксолинском киселином. Примећено је да се антибактеријска активност комплекса повећава у редоследу лиганата: бипиридиламин < бипиридин = фенантролин (Табела 1). Нека од истраживања антибактеријске активности комплекса бакра(II) указују да ови комплекси показују умерену антимикуробну активност. Тако су Abou-Hussein и сарадници испитивали антимикуробну активност ацикличних и макроцикличних комплекса бакра а као референтне лекове су користили хлорамфеникол и цефалотин. Антимикуробна активност испитиваних комплекса бакра(II) била је ипак и даље знатно нижа када се упореди са неким од референтних лекова [110]. Сличне резултати објавили су и Amer и сарадници који су својим резултатима показали умерену активност према врстама *E. coli* и *S. aureus* у поређењу са референтним леком тетрациклином [111]. Са друге стране El-Gamel и сарадници показали су да неки бинарни и тернарни комплекси бакра(II) показују снажнију антимикуробну активност у поређењу са референтним тетрациклинима [112]. Нека истраживања показују добру антимикуробну активност бакар(II)-комплекса која је у опсегу деловања стандардних лекова као што је на пример ципрофлоксацин [113] као и у поређењу са аналогним тернарним комплексима [114].

Међутим, ако се у структуру комплекса уведу лиганди фенантролинског типа онда комплекси показују активност чак и према врло отпорним бактеријама као што су *E. coli*, *S. aureus* и *Pantoea agglomerans*.

**Табела 1.** Упоредна антимикуробна активност неких бакар-хинолон комплекса [106-109]

МИК у $\mu\text{g/mL}$	<i>E. Coli</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>S. aureus</i>
[Cu (sf)(phen*)]Cl	2	0,5	2
[Cu (sf)(bipy*)]Cl	2	0,5	2
[Cu (sf*)(bipyam*)]Cl	2	1	4
[Cu (охо*)(phen)]Cl	64	64	32
[Cu (охо)(bipy)]Cl	64	32	64
[Cu (охо)(bipyam)]Cl	64	64	64
[Cu (pr-norf*)(phen)]Cl	2	0,25	16
[Cu (pr-norf)(bipy)]Cl	0,25	8	8
[Cu (pr-norf)(bipyam)]Cl	4	4	8
[Cu (erx*)(phen)]Cl	1	1	4
[Cu(erx)(bipy)(H <sub>2</sub> O)]Cl	1	0,5	4

\*МИК – минимална инхибиторна концентрација, \*phen – фенатролин, \*bipy – бипиридин, \*bipyam – бипиридиламин, \*sf – спарфлоксацин, \*охо – оксолинска киселина, \*pr-norf – N-пропилнорфлоксацин, \*erx – ерфлоксацин

Интересантно је да увођење лиганда фенантролинског типа која доводи појачања антибактеријске активности истовремено доводи до смањења антигљивичне активности према *Candida sp* [115]. Urquiza и сарадници синтетисали су тернарни комплекс бакра(II) са антитиреоидним леком метамизолом и фенантролином. Испитивање антибактеријске активности показује да координација лека повећава његову антибактеријску активност нарочито према врстама *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus epidermidis* и *S. aureus* [116]. Понекад се приликом испитивања антимикуробне активности комплекса бакра дешава да синтетисани комплекси имају слабију активност од лиганда као у истраживању Kursunlu и сарадника који су синтетисали комплексе бакра(II) са лигандима из групе Шифових база. Резултати показују да су лиганди активнији него одговарајући комплекси. Вредност МИК антибиотика цефтриаксона била је 512  $\mu\text{g/mL}$  према метицилин-резистентном *S. aureus*, док су лиганди показали снажнију антимикуробну активност са МИК вредношћу од 16  $\mu\text{g/mL}$  [117].

Dilip и сарадници такође су испитивали антимикуробну активност различитих комплекса метала са никотинамидом као лигандом коришћењем диск-дифузионе методе. Резултати испитивања показују следећи ред активности металних комплекса  $Cu > Cd > Cr > Hg > Zn > Ni > Co$ . Метални комплекси су се у овом истраживању показали као добри инхибитори ћелијског раста, а та активност била је дозно-зависна [118].

Anjaneyulu и сарадници синтетисали су тернарне комплексе бакра(II) са ацетилацетоном и дериватима салицилне киселине међу којима је и тиосалицилна киселина. Испитивани комплекси били су најактивнији према врсти *Staphylococcus albus* од Грам-позитивних бактерија са МИК која износи 25  $\mu\text{g/mL}$  и према врсти *Proteus morgani* од Грам-негативних бактерија са МИК која износи 12,5  $\mu\text{g/mL}$ . Такође, најбоља антигљивична активност показана је према врстама *Aspergillus flavus* и *Candida albicans* са просечном зоном инхибиције која је износила 10 mm [62]. Joseph и сарадници испитали су антимикуробну активност квадратно-планарних комплекса бакра(II) са дериватима аминокантипирина као лигандима. Свим тестираним комплексима одређена је минимална инхибиторна концентрација. Резултати показују да су синтетисани комплекси показали знатно бољу антимикуробну активност од слободних лиганда (Табела 2) [119].

**Табела 2.** Минимална инхибиторна концентрација ( $\mu\text{g/mL}$ ) комплекса бакра(II) и одговарајућих лиганда [119]

Једињење	<i>E. coli</i>	<i>K. pneumoniae</i>	<i>P. vulgaris</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>S. aureus</i>
$L^{1*}$	60	64	66	66	72
$L^{2*}$	24	26	20	16	28
$L^{3*}$	28	36	26	32	30
$[CuL^1(OAc)_2]$	34	38	32	28	42
$[CuL^2(OAc)_2]$	26	28	30	26	48
$[CuL^3(OAc)_2]$	52	54	58	60	63
Пеницилин Г	10	15	6	12	4
Ампицилин	12	10	8	4	6
Ванкомицин	6	14	12	10	8
Офлоксацин	8	10	4	6	14

\*  $L^1$  – лиганд добијен у реакцији фурфурилдиен-4-аминоантипирина и анилина

\*  $L^2$  – лиганд добијен у реакцији фурфурилдиен-4-аминоантипирина и *p*-нитроанилина

\*  $L^3$  – лиганд добијен у реакцији фурфурилдиен-4-аминоантипирина и *p*-хидроксианилина



Sousa и сарадници успели су да синтетишу стабилан тернарни комплекс бакра(II) са антибиотиком левофлорксацином и фенантролином. Испитивање антимицробне активности спроведено је на стандардним врстама *E. coli* JF568 и *E. coli* JF701.

Добијени резултати показују да се активност испитаног комплекса бакра(II) са левофлорксацином и фенантролином не разликују значајно од активности коју је остварио левофлорксацин самостално (Табела 3) [120].

**Табела 3.** Минимална инхибиторна концентрација ( $\mu\text{M}$ ) комплекса бакра(II) са левофлорксацином [120]

Једињење:	АТСС 25922	JF568	JF701
Левофлорксацин	0,05	0,09	0,09
$[\text{Cu}(\text{lvx}^*)(\text{phen}^*)(\text{H}_2\text{O})](\text{NO}_3) \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$	0,07	0,08	0,12

\* lvx – левофлорксацин, \*phen – фенантролин

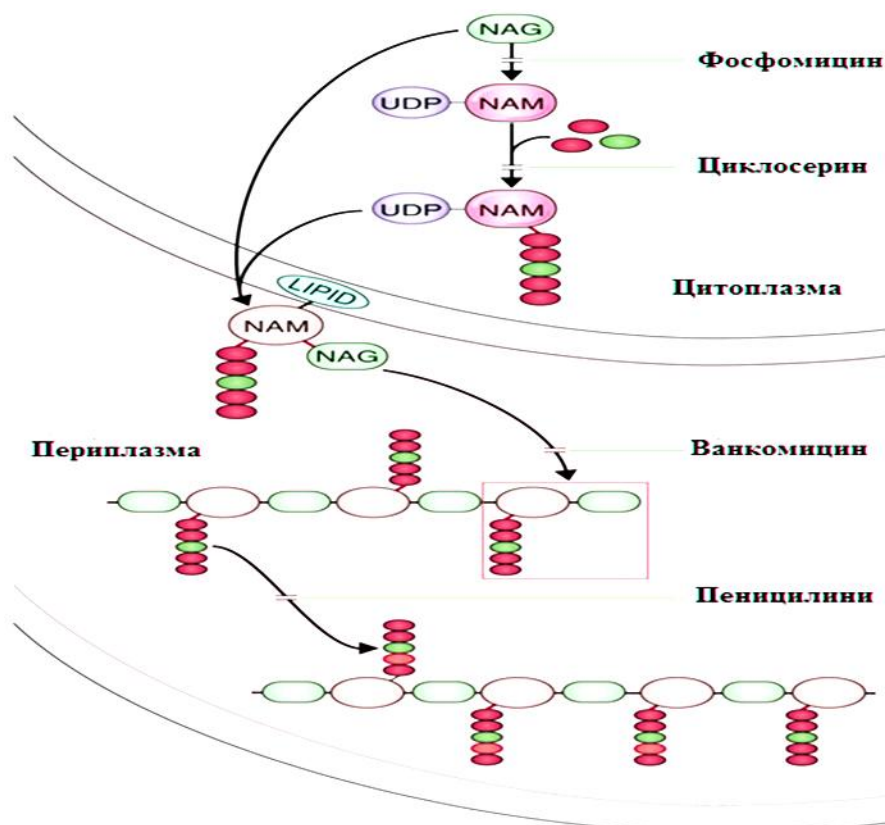
#### 1.7.4. Механизми дејства антибактеријских лекова и појава резистенције

Основни механизми деловања антибактеријских лекова су:

1. Инхибиција синтезе ћелијског зида бактерија
2. Инхибиција функције цитоплазматске мембране
3. Инхибиција синтезе протеина
4. Инхибиција синтезе нуклеинских киселина
5. Инхибиција метаболизма фолата

Хемијска јединственост бактеријског пептидогљукана чини га одличном метом за дејство многих антибиотика. Мономерне јединице муреина се формирају у цитоплазми и преносе се са уридин-дифосфата на липидне носаче у мембрани. Дисахариди се затим повезују у растући ланац муреина. Овај корак инхибира антибиотик ванкомицин. Регенерацију липидних носача инхибира други антибиотик, бацитрацин. Коначна реакција у синтези муреина је реакција транспептидације. Пеницилини и цефалоспорини блокирају ову реакцију. Антибиотици који инхибирају синтезу муреина скоро увек убијају бактерије лизирајући их (Слика 29).

Поред инхибитора синтезе муреина највећу класу антибиотика чине они који инхибирају синтезу протеина. Неки од тих антибиотика делују везивањем за субјединице рибозома при чему делују селективно на бактерије јер су мете рибозоми који се код прокариота разликују од оних код еукариота [121].



Слика 29. Муреин и антибиотици који блокирају његову синтезу

Међу антибиотцима који делују на рибозоме су хлорамфеникол и макролиди који блокирају формирање пептидних веза везивањем за или близу места везивања аминоксил транспортне РНК на великој субјединици рибозома. Важна група инхибитора синтезе протеина, аминогликозиди, делују бактерицидно и везују се за мању 30 подјединицу рибозома (Слика 30).

До сада је откривено више механизма помоћу којих бактерије постају резистентне на сродне или по хемијској структури удаљене лекове. Механизми резистенције могу бити следећи:

1. Ензимска деструкција или инактивација лека
2. Измена циљног места ензима
3. Измена пропустљивости ћелијских овојница
4. Измена структуре рибозома
5. Измена метаболичког пута [122].



Слика 30. Антибиотици који блокирају синтезу протеина

### 1.7.5. Антибиофилм активност комплекса бакра(II)

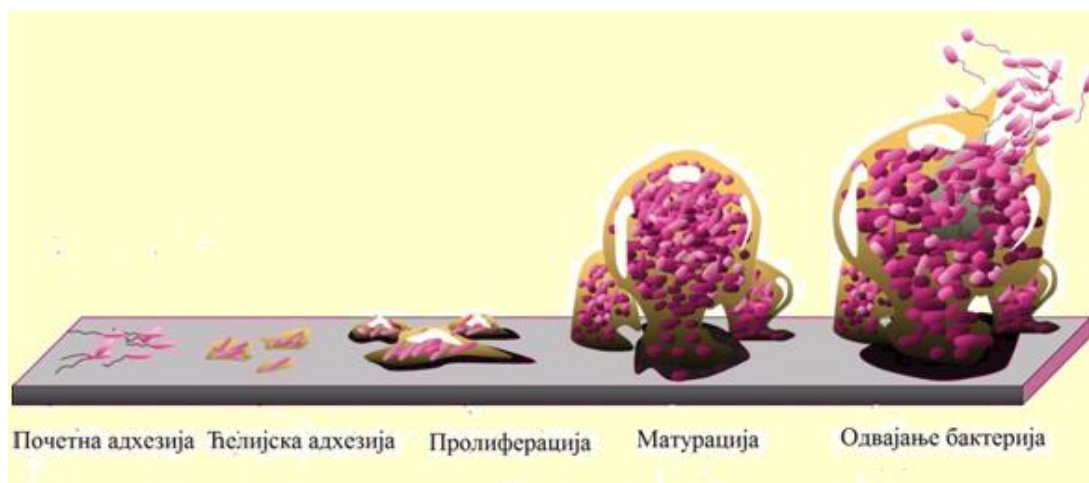
Већина микроорганизама живи причвршћена за неку површину градећи биофилм. Биофилм је заједница микроорганизама чије су ћелије међусобно иреверзибилно повезане са супстратом и уклопљене у екстрацелуларни гликокаликс полисахаридних полимера које су саме створиле.

Већина нозокомијалних инфекција које се јављају у здравственим установама последица су формирања биофилма. Ове инфекције су повезане са колонизацијом патогена на површини имплантираних медицинских уређаја као што су респиратори, централни венски и уринарни катетери, вештачке срчане валвуле или ортопедска помагала [123]. Више од 65% свих инфекција у усној шупљини изазивају бактерије у форми биофилма [124]. Биофилм може да се формира на свим површинама које су у контакту са течностима, као на пример на површини меких ткива, биомедицинским имплантима, контактним сочивима [125]. Развој биофилма одвија се у неколико фаза (Слика 31):

1. Иницијална адхезија – подразумева реверзибилно прикључивање ћелија на припремљену површину која касније постаје неповратна интеракција зато што ћелије производе структуре (флагеле, пили) које им омогућавају да остану адсорбоване за површину [126].
2. Иреверзибилна адхезија – остварује се процесом продукције егзополисахарида. Причвршћене ћелије луче егзополимерне супстанце које олакшавају њихово везивање за површину [127].
3. Формирање биофилма – након друге фазе почиње раст ћелија и долази до формирања микроколонија, а накнадним слепљивањем ћелија и до формирања биофилма [124].
4. Одвајање бактерија – у овој фази се одиграва одвајање и ширење зрелих биофилмова на нове области.

Методe контроле стварања биофилма укључују коришћење физичких, хемијских и биолошких метода. Најчешћа коришћена оксидациона средства су хлор, озон, јод и водоник-пероксид, док су најчешће коришћена неоксидациона средства кватернарна амонијумова једињења, формалдехид, и различите ањонске и нејонске површински активне материје [126,128].

Висиг и сарадници испитивали су антибиофилм активност комплекса никла(II), бакра(II) и цинка(II) који су синтетисани од *bis*макроцикличног лиганда. Истраживачи су дошли до закључка да је комплекс бакра(II) најефикаснији у блокирању испитиваних Грам-позитивних и Грам-негативних бактерија и гљивица које формирају биофилм [129].



Слика 31. Фазе стварања биофилма

Vlaicu и сарадници су испитивали антибиофилм активност новосинтетисаних комплекса бакра(II) који су синтетисани из 5,6-диметилбензимидазола. На основу њихових истраживања се може закључити да тестирани комплекси показују значајну антимикуробну активност према бактеријским врстама које формирају биофилм [130].

Ebrahimipour и сарадници испитивали су антибиофилм активност комплекса  $[Cu(L)(phen)]$  ( $L = (E)-N'-(2\text{-хидрокси-3-метоксибензилдиен})\text{бензохидразид}$ , phen = фенантролин). Добијени резултати показују да је комплекс инхибирао формирање биофилма *P. aeruginosa* ATCC 27853 при концентрацији од 1,562 mg/mL, *S. aureus* PTCC 1112 при концентрацији 0,39 mg/mL и *E. coli* PTCC1330 при концентрацији 3,125 mg/mL, док није спречавао формирање биофилма код *M. luteus* PTCC 1110, *B. cereus* PTCC 1015 и *C. albicans* PTCC 5027 [131].

### 1.7.6. Антигљивична активност комплекса бакра(II)

Гљиве су еукариотски организми са дефинисаним једром окруженим једарном мембраном и ћелијском мембраном која садржи липиде, гликопротеине и стероле. Стероли који чине ћелијску мембрану гљива се углавном састоје од ергостерола. Гљиве имају ћелијски зид који је направљен од хитина, манана и глукана [132]. Гљивичне инфекције представљају велики проблем у фармакотерапији због тога што се обично јављају код имунокомпромитованих особа.

Инвазивна кандидијаза повезана је са високом смртношћу која се креће од 30 до 60%. Због тога се велика пажња данас посвећује испитивању антигљивичне активности бројних комплекса метала у циљу проналаска нових антимицотика које би замениле постојеће лекове из ове групе. Додатни проблем у терапији представља и резистенција која се често јавља у току терапије гљивичних инфекција.

Urquiza и сарадници испитивали су антигљивичну активност тернарног комплекса бакра(II) са метамизолом и фенантролином као лигандима при чему нису добијени значајни резултати узимајући у обзир да су добијене минималне инхибиторне концентрације биле изнад 1000  $\mu\text{g/mL}$  [116]. Са друге стране Pahontu и сарадници синтетисали су комплексе бакра(II) са лигандима из групе тиосемикарбазона који су показали снажну антигљивичну активност према врсти *C. albicans* са МИК која је износила 1,5  $\mu\text{g/mL}$  што је знатно боље у односу на активност референтног антимицотика нистатина чија је вредност МИК износила 80  $\mu\text{g/mL}$  [133]. Сличне резултате добили су и Creaven и сарадници који су испитивали антигљивичну активност комплекса бакра(II) одређивањем вредности МИК при чему се утврдили да испитивани комплекси бакра(II) показују сличну антигљивичну активност у односу на референтни антимицотик амфотерицин Б [134]. Belaid и сарадници испитивали су антигљивичну активност комплекса бакра(II) са редукованим Шифовим базама као лигандима коришћењем диск дифузионе методе при чему је показано да су ови комплекси потпуно неактивни према гљивама из групе дерматофитија [135].

Joseph и сарадници испитали су антигљивичну активност квадратно-планарних комплекса бакра(II) са дериватима аминокантипирина као лигандима према врстама *Aspergillus niger*, *Rhizopus stolonifer*, *A. flavus*, *Rhizoctonia bataticola* и *C. albicans* (Табела 4) [119]. Dudova и сарадници испитивали су антигљивичну активност комплекса бакра(II) са 2-метилтионикотинатом и N-метилникотинамидом као лигандима применом макродилуционе методе. Синтетисани комплекси бакра били су најактивнији према *Rhizopus oryzae* са МИК вредношћу која износи 1,5 mmol/l и према *Alternaria alternata* са IC<sub>50</sub> вредношћу која износи 1,8 mmol/l.

Ефекти спорулације су одређивани визуелно посматрањем промене боје колоније из црне у белу услед смањене концентрације спора при чему је утврђено да испитивани комплекси бакра не само да спречавају раст спора већ да имају и леталан ефекат на њих [136]. Tabassum и сарадници испитивали су антимикуробну активност комплекса бакра(II) и цинка(II) са 1,10-фенантролином и 1,2,4-триазолом. Резултати показују да је одговарајући комплекс бакра ефикаснији од комплекса цинка у испољавању антигљивичне активности са оствареном максималном зоном инхибиције [92].

**Табела 4.** Минимална инхибиторна концентрација ( $\mu\text{g/mL}$ ) комплекса бакра(II) и одговарајућих лиганата [119]

Једињење	<i>A. niger</i>	<i>R. stolonifer</i>	<i>A. flavus</i>	<i>R. bataticola</i>	<i>C. albicans</i>
$L^{1*}$	60	66	72	80	50
$L^{2*}$	19	20	20	25	22
$L^{3*}$	24	28	28	34	30
$[\text{CuL}^1(\text{OAc})_2]$	28	30	34	38	22
$[\text{CuL}^2(\text{OAc})_2]$	32	26	46	36	<b>6</b>
$[\text{CuL}^3(\text{OAc})_2]$	52	55	68	80	50
Нистатин	10	16	8	14	12
Кетоконазол	12	8	16	6	12
Клотримазол	8	6	12	10	4

\*  $L^1$  – лиганд добијен у реакцији фурфурилдиен-4-аминоантипирина и анилина

\*  $L^2$  - лиганд добијен у реакцији фурфурилдиен-4-аминоантипирина и *p*-нитроанилина

\*  $L^3$  - лиганд добијен у реакцији фурфурилдиен-4-аминоантипирина и *p*-хидроксианилина

## **2. ХИПОТЕЗА И ЦИЉЕВИ ИСТРАЖИВАЊА**



На основу података изнетих у уводу постављена је следећа хипотеза:

Реакцијом S-алкил деривата тиосалицилне киселине и бакар(II)-нитрата наградиће се бинуклеарни комплекси чији састав и структура ће бити потврђени на основу резултата елементалне микроанализе, инфрацрвене спектроскопије, магнетних мерења и рендгенске структурне анализе. Такође можемо претпоставити да ће S-алкил деривати тиосалицилне киселине и одговарајући комплекси бакра(II) показати одређену биолошку активност.

Ради провере радне хипотезе поставили смо следеће циљеве истраживања:

- Синтетисати S-алкил деривате тиосалицилне киселине (алкил = бензил-(L1), метил-(L2), етил-(L3), пропил-(L4) и бутил-(L5)), и одговарајуће комплексе бакра(II) са наведеним бидентатним лигандима (C1-C5).
- Састав награђених једињења потврдити на основу резултата елементалне микроанализе.
- Структуру бидентатних лиганата и одговарајућих бинуклеарних комплексних једињења претпоставити на основу резултата инфрацрвене спектроскопије и магнетних мерења.
- Структуру добијених једињења потврдити на основу резултата рендгенске структурне анализе, где год је то могуће.
- Испитати потенцијалну биолошку активност (антитуморску, антимицробну, антибиофилну и антиоксидативну) S-алкил деривата тиосалицилне киселине и одговарајућих бинуклеарних комплекса бакра(II).

### **3. МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ**

### 3.1. СИНТЕЗЕ ЛИГАНАДА

S-алкил деривати тиосалицилне киселине добијени су реакцијом алкиловања тиосалицилне киселине одговарајућим алкил-халогенидима у базној средини и смеси вода-етанол као растварачу. У киселу суспензију добијену растварањем (1 mmol) тиосалицилне киселине у 50,00 mL 30% етанола додаје се раствор натријум-хидроксида (2,00 mmol у 5,00 mL дестиловане воде), након чега раствор постаје бистар. Одговарајући алкил-халогенид (2,00 mmol) се раствори у 5,00 mL етанола и постепено додаје у малим порцијама у претходно припремљену бистру реакциону смешу. Тако добијена реакциона смеша остави се током ноћи на 60°C. Након тога раствор се пренесе у кристалizacionу шољу и упари на воденом купатилу ради удаљавања етанола. У добијени водени раствор додаје се разблажена хлороводонична киселина (2,00 mM) услед чега се ствара бели талог одговарајућег S-алкил деривата тиосалицилне киселине (бензил-(**L1**), метил-(**L2**), етил-(**L3**), пропил-(**L4**), бутил-(**L5**)). Тако добијени производ се одвоји цеђењем, испере великом количином дестиловане воде и суши преко ноћи на вакууму. S-алкил деривати тиосалицилне киселине добијени су у приносу 85-95%.

S-бензил дериват тиосалицилне киселине (**L1**): IR (KBr,  $\text{cm}^{-1}$ ): 3414, 3061, 2920, 2648, 2559, 1674, 1584, 1562, 1463, 1412, 1317, 1272, 1255, 1154, 1062, 1046, 897, 743, 711, 652, 551.  $^1\text{H}$  NMR (200 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$  ppm): 4,17 (s, 2H,  $\text{CH}_2$ ), 7,21-8,14 (m, 9H, Ar и bz).  $^{13}\text{C}$  NMR (50 MHz,  $\text{DMSO}-d_6$ ,  $\delta$  ppm): 35,9 ( $\text{CH}_2$ ), 124,1; 125,9; 126,7; 127,3; 127,9; 128,3; 128,6; 129,3; 131,0; 132,4; 136,8; 141,3 (Ar и bz), 167,5 (COOH).

S-метил дериват тиосалицилне киселине (**L2**): IR (KBr,  $\text{cm}^{-1}$ ): 3446, 3068, 2916, 2652, 2560, 1674, 1586, 1561, 1466, 1412, 1308, 1291, 1270, 1255, 1151, 1062, 1048, 892, 743, 699, 652, 556.  $^1\text{H}$  NMR (200 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$  ppm): 2,48 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ ), 7,16-8,18 (m, 4H, Ar).  $^{13}\text{C}$  NMR (50 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$  ppm): 15,6 ( $\text{CH}_3$ ), 123,5; 124,4; 125,4; 132,5; 133,6; 144,4 (Ar), 171,6 (COOH).

S-етил дериват тиосалицилне киселине (**L3**): IR (KBr,  $\text{cm}^{-1}$ ): 3435, 3066, 2972, 2652, 2562, 1682, 1588, 1563, 1466, 1414, 1315, 1275, 1252, 1152, 1063, 1049, 884, 740, 704, 690, 651, 550.  $^1\text{H}$  NMR (200 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$  ppm): 1,42 (t, 3H,  $\text{CH}_3$ ), 2,97 (q, 2H,  $\text{CH}_2$ ), 7,16-8,17 (m, 4H, Ar).  $^{13}\text{C}$  NMR (50 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$  ppm): 13,1 ( $\text{CH}_3$ ), 26,2 ( $\text{CH}_2$ ), 124,0; 125,9; 126,4; 132,6; 133,2; 142,9 (Ar), 171,4 ( $\text{COOH}$ ).

S-пропил дериват тиосалицилне киселине (**L4**): IR (KBr,  $\text{cm}^{-1}$ ): 3414, 3056, 2979, 2641, 2555, 1678, 1588, 1562, 1462, 1405, 1310, 1271, 1257, 1150, 1062, 1053, 811, 740, 704, 691, 653, 554.  $^1\text{H}$  NMR (200 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$  ppm): 1,1 (t, 3H,  $\text{CH}_3$ ), 1,74 (m, 2H,  $\text{CH}_2$ ), 2,92 (t, 2H,  $\text{CH}_2$ ), 7,15-8,15 (m, 4H, Ar).  $^{13}\text{C}$  NMR (50 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$  ppm): 13,8 ( $\text{CH}_3$ ), 21,6 ( $\text{CH}_2$ ), 34,1 ( $\text{CH}_2$ ), 123,8; 125,6; 126,2; 132,5; 133,1; 143,1 (Ar), 171,6 ( $\text{COOH}$ ).

S-бутил дериват тиосалицилне киселине (**L5**): IR (KBr,  $\text{cm}^{-1}$ ): 3420, 2955, 2869, 2641, 2556, 1674, 1586, 1560, 1462, 1408, 1320, 1270, 1250, 1153, 1060, 1048, 924, 810, 738, 704, 651, 553.  $^1\text{H}$  NMR (200 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$  ppm): 0,96 (t, 3H,  $\text{CH}_3$ ), 1,46 (m, 2H,  $\text{CH}_2$ ), 1,78 (m, 2H,  $\text{CH}_2$ ), 2,94 (t, 2H,  $\text{CH}_2$ ), 7,15-8,16 (m, 4H, Ar).  $^{13}\text{C}$  NMR (50 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$  ppm): 13,7 ( $\text{CH}_3$ ), 22,3 ( $\text{CH}_2$ ), 30,2 ( $\text{CH}_2$ ), 31,9 ( $\text{CH}_2$ ), 123,8; 125,7; 126,3; 132,5; 133,1; 143,1 (Ar), 171,4 ( $\text{COOH}$ ). [14]

## 3.2. СИНТЕЗЕ КОМПЛЕКСА

### 3.2.1. Синтеза комплекса бакра(II) са S-бензил дериватом тиосалицилне киселине, $[\text{Cu}_2(\text{S-bz-thiosal})_4(\text{H}_2\text{O})_2]$ (C1)

Раствору добијеном растварањем 0,1000 g (0,4139 mmol) бакар(II)-нитрата трихидрата у 10 mL дестиловане воде лагано се додаје 0,2022 g (0,8278 mmol) S-бензил деривата тиосалицилне киселине. Реакциона смеша се загрева на воденом купатилу уз мешање 3 сата.

Током овог периода у малим порцијама додаје се 10 mL раствора литијум-хидроксида (0,0348 g, 0,8278 mmol), након чега се раствор процеди и упари до мале запремине. Добијени плави талог комплекса  $[\text{Cu}_2(\text{S-bz-thiosal})_4(\text{H}_2\text{O})_2]$  (**C1**) се одвоји цеђењем, испере дестилованом водом и суши на ваздуху. Принос: 0,1910 g (81,21%).

IR (KBr,  $\text{cm}^{-1}$ ): 3564, 3436, 3031, 1589, 1567, 1536, 1434, 1403, 1000, 746.  $\mu(294 \text{ K}) = 1,56 \text{ }\mu\text{В}$ .

### 3.2.2. Синтеза комплекса бакра(II) са S-метил дериватом тиосалицилне киселине, $[\text{Cu}_2(\text{S-met-thiosal})_4(\text{H}_2\text{O})_2]$ (**C2**)

Раствору добијеном растварањем 0,1000 g (0,4139 mmol) бакар(II)-нитрата трихидрата у 10 mL дестиловане воде лагано се додаје 0,1392 g (0,8278 mmol) S-метил деривата тиосалицилне киселине. Реакциона смеша се загрева на воденом купатилу уз мешање 3 сата. Током овог периода у малим порцијама додаје се 10 mL раствора литијум-хидроксида (0,0347 g, 0,8278 mmol) након чега се раствор процеди и упари до мале запремине. Монокристали комплекса  $[\text{Cu}_2(\text{S-met-thiosal})_4(\text{H}_2\text{O})_2]$  (**C2**) погодни за рендгенску структурну анализу добијени су из матичног воденог раствора спорим упаравањем. Принос: 0,1970 g (81,74%).

IR (KBr,  $\text{cm}^{-1}$ ): 3413, 2916, 1596, 1552, 1435, 1536, 1398, 1281, 1045, 745.  $\mu(294 \text{ K}) = 2,30 \text{ }\mu\text{В}$ .

### 3.2.3. Синтеза комплекса бакра(II) са S-етил дериватом тиосалицилне киселине, $[\text{Cu}_2(\text{S-et-thiosal})_4(\text{H}_2\text{O})_2]$ (**C3**)

Раствору добијеном растварањем 0,1000 g (0,4139 mmol) бакар(II)-нитрата трихидрата у 10 mL дестиловане воде лагано се додаје 0,1509 g (0,8278 mmol) S-етил деривата тиосалицилне киселине. Реакциона смеша се загрева на воденом купатилу уз мешање 3 сата. Током овог периода у малим порцијама додаје се 10 mL раствора литијум-хидроксида (0,0347 g, 0,8278 mmol) након чега се раствор процеди и упари до мале запремине. Монокристали комплекса  $[\text{Cu}_2(\text{S-et-thiosal})_4(\text{H}_2\text{O})_2]$  (**C3**) погодни за рендгенску структурну анализу добијени су из матичног воденог раствора спорим упаравањем. Принос: 0,1490 g (81,07%).

IR (KBr,  $\text{cm}^{-1}$ ): 3535, 3460, 2929, 1619, 1591, 1579, 1432, 1399, 1046, 743.  $\mu(294 \text{ K}) = 1,99 \text{ }\mu\text{В}$ .

### 3.2.4. Синтеза комплекса бакра(II) са S-пропил дериватом тиосалицилне киселине, $[\text{Cu}_2(\text{S-pr-thiosal})_4(\text{H}_2\text{O})_2]$ (C4)

Раствору добијеном растварањем 0,1000 g (0,4139 mmol) бакар(II)-нитрата трихидрата у 10 mL дестиловане воде лагано се додаје 0,1625 g (0,8278 mmol) S-пропил деривата тиосалицилне киселине. Реакциона смеша се загрева на воденом купатилу уз мешање 3 сата. Током овог периода у малим порцијама додаје се 10 mL раствора литијум-хидроксида (0,0347 g, 0,8278 mmol) након чега се раствор процеди и упари до мале запремине. Монокристали комплекса  $[\text{Cu}_2(\text{S-pr-thiosal})_4(\text{DMSO})_2]$  (C4) погодни за рендгенску структурну анализу добијени су спором прекристализацијом комплекса  $[\text{Cu}_2(\text{S-pr-thiosal})_4(\text{H}_2\text{O})_2]$  из система диметилсулфоксид-вода. Принос: 0,1590 g (81,37%).

IR (KBr,  $\text{cm}^{-1}$ ): 3420, 2959, 1614, 1593, 1579, 1432, 1400, 1403, 1045, 742.  $\mu(294 \text{ K}) = 1,85 \mu\text{В}$ .

### 3.2.5. Синтеза комплекса бакра(II) са S-бутил дериватом тиосалицилне киселине, $[\text{Cu}_2(\text{S-bu-thiosal})_4(\text{H}_2\text{O})_2]$ (C5)

Раствору добијеном растварањем 0,1000 g (0,4139 mmol) бакар(II)-нитрата трихидрата у 10 mL дестиловане воде лагано се додаје 0,1741 g (0,8278 mmol) S-бутил деривата тиосалицилне киселине. Реакциона смеша се загрева на воденом купатилу уз мешање 3 сата. Током овог периода у малим порцијама додаје се 10 mL раствора литијум-хидроксида (0,0347 g, 0,8278 mmol) након чега се раствор процеди и упари до мале запремине. Добијени плави талог комплекса  $[\text{Cu}_2(\text{S-bu-thiosal})_4(\text{H}_2\text{O})_2]$  (C5) се одвоји цеђењем испере дестилованом водом и суши на ваздуху. Принос: 0,1680 g (81,20%).

IR (KBr,  $\text{cm}^{-1}$ ): 3550, 3429, 2956, 2927, 1590, 1570, 1547, 1402, 982, 733.  $\mu(294 \text{ K}) = 1,80 \mu\text{В}$ .

### 3.3. МЕРЕЊА

#### 3.3.1. Елементална микроанализа

Елементалне анализе (C, H, S) су урађене на апарату Vario III CHNOS Elemental Analyzer.

#### 3.3.2. Инфрацрвена спектроскопија

Инфрацрвени спектри снимљени су помоћу спектрофотометра Perkin Elmer FTIR 31725-X (КВг техника).

#### 3.3.3. Магнетна мерења

Магнетна мерења синтетисаних комплекса вршена су на 294 К Евансовим методом коришћењем MSB-МК1 равнотеже са  $\text{Hg}[\text{Co}(\text{SCN})_4]$  као калибрантом. Дијамагнетичне корекције израчунате су из Паскалових константи.

#### 3.3.4. Рендгенска структурна анализа

##### 3.3.4.1. Рендгенска структурна анализа комплекса бакра(II) са S-метил дериватом тиосалицилне киселине, $[\text{Cu}_2(\text{S-met-thiosal})_4(\text{H}_2\text{O})_2]$

Монокристали комплекса  $[\text{Cu}_2(\text{S-met-thiosal})_4(\text{H}_2\text{O})_2]$  (**C2**), погодни за рендгенску структурну анализу добијени су спорим упаравањем из матичног воденог раствора. Дифракциони подаци за **C2** сакупљани су на собној температури помоћу дифрактометра Agilent Gemini S опремљеног  $\text{CuK}\alpha$  зрачењем на таласној дужини  $\lambda = 1,5418 \text{ \AA}$ . Подаци су обрађени помоћу CrysAlisPro софтвера [137], а кориговани су аналитичком нумеричком методом.

Кристална структура је решена применом директне методе коришћењем Sir2002 [138], а утачњена коришћењем програма SHELXL [139]. Водоникови атоми који су везани за угљеникове атоме постављени су на геометријски идеалним позицијама са угљеник-водоник растојањима фиксираним на 0,93 Å, односно 0,96 Å од фенил и метил угљеникових атома. Геометријска израчунавања су извршена помоћу програма PARST [140] и PLATON [141], а структура молекула је добијена применом програма ORTEP [142] и Mercury [143]. Основни кристалографски подаци и подаци у вези са решавањем и утачњавањем структуре комплекса  $[\text{Cu}_2(\text{S-met-thiosal})_4(\text{H}_2\text{O})_2]$  (**C2**) приказани су у табели 5.

**Табела 5.** Основни кристалографски подаци и подаци у вези са решавањем и утачњавањем структуре за  $[\text{Cu}_2(\text{S-met-thiosal})_4(\text{H}_2\text{O})_2]$  (**C2**)

Емпиријска формула	$\text{C}_{32}\text{H}_{32}\text{O}_{10}\text{Cu}_2\text{S}_4$	$\alpha$ (°)	69,317(4)
М	831,90	$\beta$ (°)	77,826(4)
Боја, кристални облик	зелена, призма	$\gamma$ (°)	88,925(3)
Величина кристала (mm)	0,14 · 0,09 · 0,05	$V$ (Å <sup>3</sup> )	1714,54(13)
Температура (К)	293(2)	$Z, Z'$	2,1
$\lambda$ (Å)	1,5418	$D_c$ (g/dm <sup>3</sup> )	1,611
Кристални систем	Триклинчан	$\mu$ (mm <sup>-1</sup> )	4,288
Просторна група	$P_1$	$\Theta$ (°)	3,47-72,30
$a$ (Å)	11,3834(5)	Сакупљене рефлексције	12035
$b$ (Å)	11,8107(4)	Независне рефлексције	6612
$c$ (Å)	13,9707(7)	$I > 2\sigma(I)$	$R_1=0,0328, wR_2=0,0894$

### 3.3.4.2. Рендгенска структурна анализа комплекса бакра(II) са S-етил дериватом тиосалицилне киселине, $[\text{Cu}_2(\text{S-et-thiosal})_4(\text{H}_2\text{O})_2]$

Монокристали комплекса  $[\text{Cu}_2(\text{S-et-thiosal})_4(\text{H}_2\text{O})_2]$  (**C3**), погодни за рендгенску структурну анализу добијени су из матичног воденог раствора спорим упаравањем. Дифракциони подаци за **C3** сакупљани су на собној температури помоћу дифрактометра Agilent Gemini S опремљеног  $\text{CuK}\alpha$  зрачењем на таласној дужини  $\lambda = 1,5418$  Å, а обрађени су помоћу CrysAlisPro софтвера [137]. Кристална структура је решена применом директне методе коришћењем Sir2002 [138], а утачњена коришћењем програма SHELXL [139].



Водоникови атоми који су везани за угљеникове атоме постављени су на геометријски идеалним позицијама са угљеник-водоник растојањима фиксираним на 0,93 Å, 0,97 Å и 0,96 Å од фенил, метилен и метил угљеникових атома. Геометријска израчунавања су извршена помоћу програма PARST [140] и PLATON [141], а структура молекула је добијена применом програма ORTEP [142]. Основни кристалографски подаци и подаци у вези са решавањем и утачњавањем структуре комплекса  $[\text{Cu}_2(\text{S-et-thiosal})_4(\text{H}_2\text{O})_2]$  (C3) приказани су у табели 6.

**Табела 6.** Основни кристалографски подаци и подаци у вези са решавањем и утачњавањем структуре за  $[\text{Cu}_2(\text{S-et-thiosal})_4(\text{H}_2\text{O})_2]$  (C3)

Емпиријска формула	$\text{C}_{36}\text{H}_{40}\text{O}_{10}\text{Cu}_2\text{S}_4$	$\alpha$ (°)	83,578(4)
М	888,036	$\beta$ (°)	89,304(3)
Боја, кристални облик	зелена, призма	$\gamma$ (°)	76,314(4)
Величина кристала (mm)	0,36 · 0,18 · 0,11	$V$ (Å <sup>3</sup> )	958,09(8)
Температура (К)	293(2)	Z	2
$\lambda$ (Å)	1,5418	$D_c$ (g/dm <sup>3</sup> )	1,539
Кристални систем	Триклиничан	$\mu$ (mm <sup>-1</sup> )	3,875
Просторна група	$P_1$	$\Theta$ (°)	3,66-72,64
a (Å)	7,5102(3)	Сакупљене рефлексije	8944
b (Å)	10,8709(5)	Независне рефлексije	3804
c (Å)	12,1557(6)	$I > 2\sigma(I)$	$R_1=0,0273, wR_2=0,0748$

### 3.3.4.3. Рендгенска структурна анализа комплекса бакра(II) са S-пропил дериватом тиосалицилне киселине, $[\text{Cu}_2(\text{S-pr-thiosal})_4(\text{DMSO})_2]$

Монокристали комплекса  $[\text{Cu}_2(\text{S-pr-thiosal})_4(\text{DMSO})_2]$  (C4), погодни за рендгенску структурну анализу добијени су спором прекристаллизацијом комплекса  $[\text{Cu}_2(\text{S-pr-thiosal})_4(\text{H}_2\text{O})_2]$  из система диметилсулфоксид-вода. Комплекс C4 кристалише у две полиморфне форме које су обележене као полиморфи I и II. Дифракциони подаци за полиморфе I и II сакупљани су на собној температури помоћу дифрактометра Agilent Gemini S опремљеног МоК $\alpha$  зрачењем на таласној дужини  $\lambda = 1,71073$  Å, а обрађени су помоћу CrysAlisPro софтвера [137]. Кристална структура је решена применом директне методе коришћењем SHELXS, а утачњена коришћењем програма SHELXL [139].

Водоникови атоми који су везани за угљеникове атоме постављени су на геометријски идеалним позицијама са угљеник-водоник растојањима фиксираним на 0,93, 0,97 и 0,96 Å од фенил, метилен и метил угљеникових атома. *Flack* параметар [144] за полиморф II указује на присуство рацемског удруживања. Геометријска израчунавања су извршена помоћу програма PARST [140] и PLATON [141], а структура молекула је добијена применом програма ORTEP [142] и Mercury [143]. Основни кристалографски подаци за полиморфе I и II приказани су у табели 7.

**Табела 7.** Основни кристалографски подаци за полиморфе I и II и подаци у вези са решавањем и утачњавањем структуре за  $[\text{Cu}_2(\text{S-pr-thiosal})_4(\text{DMSO})_2]$  (C4)

Емпиријска формула	$\text{C}_{44}\text{H}_{56}\text{Cu}_2\text{O}_{10}\text{S}_6$	$\text{C}_{44}\text{H}_{56}\text{Cu}_2\text{O}_{10}\text{S}_6$
M	1064,33	1064,33
Температура (K)	293(2)	293(2)
$\lambda$ (Å)	0,71073	0,71073
Кристалини систем	Орторомбични	Орторомбични
Просторна група	<i>Pccn</i>	<i>P2<sub>1</sub>2<sub>1</sub>2</i>
<i>a</i> (Å)	23,6914(6)	22,7327(6)
<i>b</i> (Å)	20,7787(5)	20,8660(4)
<i>c</i> (Å)	10,1062(2)	10,4130(2)
<i>V</i> (Å <sup>3</sup> )	4975,0(2)	4939,31(2)
<i>Z</i>	4	4
$D_{\text{calc}}$ (Mg/m <sup>3</sup> )	1,421	1,431
$\mu$ (mm <sup>-1</sup> )	1,159	1,168
Величина кристала (mm <sup>3</sup> )	0,50 · 0,22 · 0,15	0,32 · 0,25 · 0,14
Сакупљене рефлексије	23673	33187
Независне рефлексије, $R_{\text{int}}$	5985 [R(int) = 0,0301]	9615 [R(int) = 0,0300]
$I > 2\sigma_I$	$R_1 = 0,0508$ , $wR_2 = 0,1406$	$R_1 = 0,0482$ , $wR_2 = 0,0662$

## 3.4. БИОЛОШКА МЕРЕЊА

### 3.4.1. *In vitro* антитуморска активност

#### 3.4.1.1. Припрема раствора испитиваних једињења

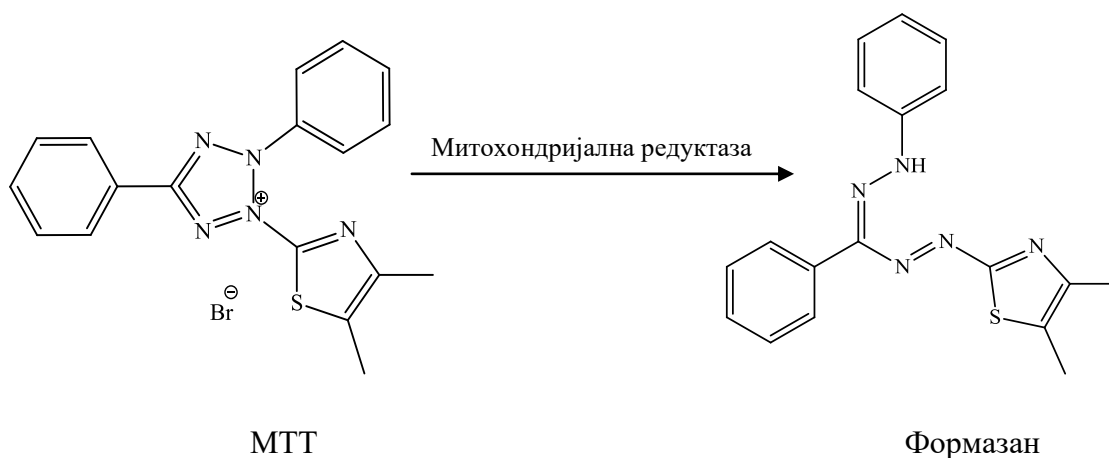
Испитивана једињења су растворена у 10% воденом раствору диметилсулфооксида. Направљени су раствори концентрације 10 mM, а затим су филтрирани кроз 0,22 mm Milipore филтер и разблажени хранљивим медијумом пре употребе. МТТ, 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенил-тетразолијум-бромид је растворен (5 mg/mL) у соном фосфатном пуферу чија је рН вредност подешена на 7,2 и филтриран кроз 0,22 mm Milipore филтер пре употребе.

#### 3.4.1.2. Испитиване ћелијске линије

Цитотоксичност S-алкил деривата тиосалицилне киселине и одговарајућих бинуклеарних комплекса бакра(II) је испитивана на мишјим ћелијским линијама карцинома колона (СТ26 (ATCC® CRL 2638™) и СТ26.CL25 (ATCC® CRL 2639™)) и хуманим ћелијама карцинома колона (HCT-116 (ATCC® CCL247™)). Туморске ћелије су култивисане у DMEM медијуму са додатком 10% феталног бовиног серума (FBS), 100 IU/mL пеницилина и 100 µg/mL стрептомицина у инкубатору при стандардним условима (температура 37°C и процентуални удео угљен-диоксида у ваздуху 5%). Једнослојне субконфлуентне ћелијске културе у фази раста прикупљане су третманом са 0,25% трипсином и 0,02% EDTA који су растворени у соном фосфатном пуферу и испиране три пута у соном фосфатном пуферу без серума. Број вијабилних ћелија је одређен искључењем ћелија обојених трипан плавим. Трипан плаво је боја која може да прође само кроз оштећену ћелијску мембрану невијабилних ћелија и боји цитоплазму, док је код вијабилних ћелија ова могућност искључена.

### 3.4.1.3. МТТ колориметријски тест

Цитотоксичност испитиваних једињења је одређивана коришћењем МТТ теста [145]. МТТ тестом се ефекат испитиване супстанце одређује поређењем интензитета боје који дају ћелије излагане само медијуму и интензитета који дају ћелије излагане испитиваној супстанци. МТТ је кристал жуте боје, растворљив у води, који због позитивног наелектрисања лако пролази кроз ћелијску мембрану. У метаболички активним ћелијама се редукује до несолубилних љубичастих кристала формазана (Слика 32). Митохондријална редуктаза која је активна само у живим ћелијама, катализује ову реакцију, па је редукција првобитног једињења до формазана директно пропорционална броју живих ћелија.



Слика 32. Редуција МТТ до формаза

Ћелијске линије (СТ26, СТ26.CL25 и НСТ-116) су разблажене медијумом до густине од  $5 \cdot 10^4$  ћелија/mL. У микротитар плоче са 96 отвора је сипано 100  $\mu\text{L}$  ( $5 \cdot 10^3$  ћелија/100 mL) суспензије по отвору. У посебне отворе је сипан медијум без ћелија како би се одредила оптичка густина медијума, бленк. Плоча се преко ноћи инкубирала на температури од  $37^\circ\text{C}$  и у присуству 5%  $\text{CO}_2$ . Наредног дана медијум је одливен и замењен са 100  $\mu\text{L}$  испитиваних једињења при чему су серијом двоструких разблажења у комплетном медијуму добијени раствори концентрација у опсегу од 1000 до 7,8  $\mu\text{M}$ . За свако разблажење рађен је трипликат. Плоча је инкубирана 72 сата под истим условима.

Након инкубације, уклоњен је супернатант и додато је по 100  $\mu\text{L}$  чистог DMEM са 15% МТТ раствором (5 mg/mL у соном фосфатном пуферу, 10  $\mu\text{L}$ ). Плоче су инкубирани још 4 сата. По истеку инкубације медијум је одливан и у сваки отвор је сипано по 150  $\mu\text{L}$  диметилсулфооксида и 20  $\mu\text{L}$  глицинског пуфера. Плоче су вортексоване 10 минута до растварања кристала формазана. Оптичка густина узорака је мерена на таласној дужини од 595 nm коришћењем Zenyth 3100 Multimode детектора. Цитотоксичност сваког од испитиваних једињења је одређивана у три одвојена експеримента. Процент цитотоксичности је израчунат на основу формуле:

$$\% \text{ цитотоксичности} = 100 - ((E-B)/(K-B) \cdot 100)$$

Е-отвор са испитиваним супстанцама

Б-оптичка густина медијума, бленк

К-отвор са нетретираним ћелијама

#### 3.4.1.4. Тест апоптозе

У циљу детекције апоптозе ћелије су култивисане у Т25 ћелијским флашковима и остављене да расту током ноћи. Након што су ћелије постале субконфлуентне медијум је замењен тестираним једињењима (15 mM). Ћелије су култивисане у инкубатору при стандардним условима на температури од 37°C и процентуалном уделу угљен-диоксида у ваздуху од 5% током 24 часа. Култивисане ћелије су два пута испране у раствору фосфатног пуфера (PBS) и рекултивисане у 1x везујућем пуферу (10x везујући пуфер: 0,1 M Hepes/NaOH (pH 7,4), 1,4 M NaCl, 25 mM CaCl<sub>2</sub>) у концентрацији од  $1 \cdot 10^6/\text{mL}$ . Анексин FITC и пропидијум-јодид (PI) су додавани у 100  $\mu\text{L}$  ћелијске суспензије и инкубирани током 15 минута на собној температури од 25°C у мраку. Након инкубације 400  $\mu\text{L}$  1x везујућег пуфера је додавано у сваки отвор а затим су обојене ћелије анализирани током 1 часа коришћењем FACS Calibur (BD, San Jose, USA) и Flow Jo софтвера (Tri Star). Анексин V FITC позитивне и пропидијум-јодид негативне ћелије указују на рану апоптозу, док су вијабилне ћелије Анексин V FITC и пропидијум-јодид негативне. Ћелије које су већ мртве или су у касној фази апоптозе су Анексин V FITC и пропидијум-јодид позитивне.

### 3.4.2. *In vitro* антимикуробна активност

#### 3.4.2.1. Припрема тестираних супстанци и хранљиве подлоге

Тестиране супстанце растворене су у диметилсулфоксиду а потом разблажене течним хранљивим медијумом Mueller-Hinton бујоном при чему су добијени 10% раствори. Антибиотик, доксициклин је растворен у Mueller-Hinton бујону, док је антимикуробик флуконазол растворен у Sabouraud dextrose бујону. Mueller-Hinton бујон је стандардизована подлога прописана од стране Националног комитета за клиничке лабораторијске стандарде Америке. Користи се за тестирање антибактеријске активности најчешће антибиотика, пошто обезбеђује оптималне услове за већину брзорастућих аеробних и факултативно анаеробних бактерија. Mueller-Hinton бујон садржи 2 g месног екстракта, 17,5 g казеин хидролизата и 1,5 g скроба. Припрема се тако што се 21 g праха суспендује у 1000 mL хладне дестиловане воде. Подлога се затим пажљиво загрева до кључања док се потпуно не раствори, разлије се у ерленмајере и стерилише у аутоклаву 15 минута на 121°C. Sabouraud dextrose бујон је неселективна подлога за узгој и одржавање патогених и непатогених гљивица, посебно дерматофита. Ниска рН вредност (приближно 5,6) погодна је за раст гљивица, посебно дерматофита и незнатно инхибиторна за контаминирајуће бактерије у клиничким узорцима. Ова подлога садржи 5 g панкреатичне дигестије казеина, 5 g пептичне дигестије животињског ткива, 40 g декстрозе и 15 g агара.

#### 3.4.2.2. Тестирани микроорганизми

Антимикуробна активност комплекса бакра(II) са одговарајућим S-алкил дериватима тиосалицилне киселине је одређена тестирањем на 23 врсте микроорганизама. Експерименти су извођени на 13 врста патогених бактерија, укључујући 5 стандардних врста и 8 клиничких изолата, 3 врсте пробиотских бактерија и 7 врста гљива укључујући 4 врсте квасца и 3 врсте филаментозних гљива. Сви тестирани микроорганизми приказани су у табели 8.

Сви клинички изолати патогених бактерија добијени су на поклон од Института за јавно здравље, Крагујевац. Остале врсте микроорганизама су из колекције микроорганизама Лабораторије за микробиологију, Природно-математичког факултета, Универзитета у Крагујевцу.

**Табела 8.** Списак тестираних микроорганизама коришћених у одређивању антимикробне активности испитиваних комплекса бакра(II)

Бактерије	Пробиотици
<b>Грам-позитивне бактерије</b>	<i>Bifidobacterium animalis subsp. lactis</i>
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	<i>B. subtilis</i> IP 5832
<i>B. subtilis</i>	<i>Lactobacillus plantarum</i>
<i>Enterococcus faecalis</i>	<b>Гљиве</b>
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	<b>Квасци</b>
<i>S. aureus</i>	<i>C. albicans</i> ATCC 10231
<b>Грам-негативне бактерије</b>	<i>C. albicans</i>
<i>E. coli</i> ATCC 25922	<i>Saccharomyces boulardii</i>
<i>E.coli</i>	<i>Rhodotorula sp.</i>
<i>Proteus mirabilis</i> ATCC 12453	<b>Филаментозне гљиве</b>
<i>P. mirabilis</i>	<i>Aspergillus niger</i> ATCC 16404
<i>Salmonella enterica</i>	<i>A. flavus</i>
<i>S. typhimurium</i>	<i>Botrytis cinerea</i>
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	
<i>P. aeruginosa</i>	

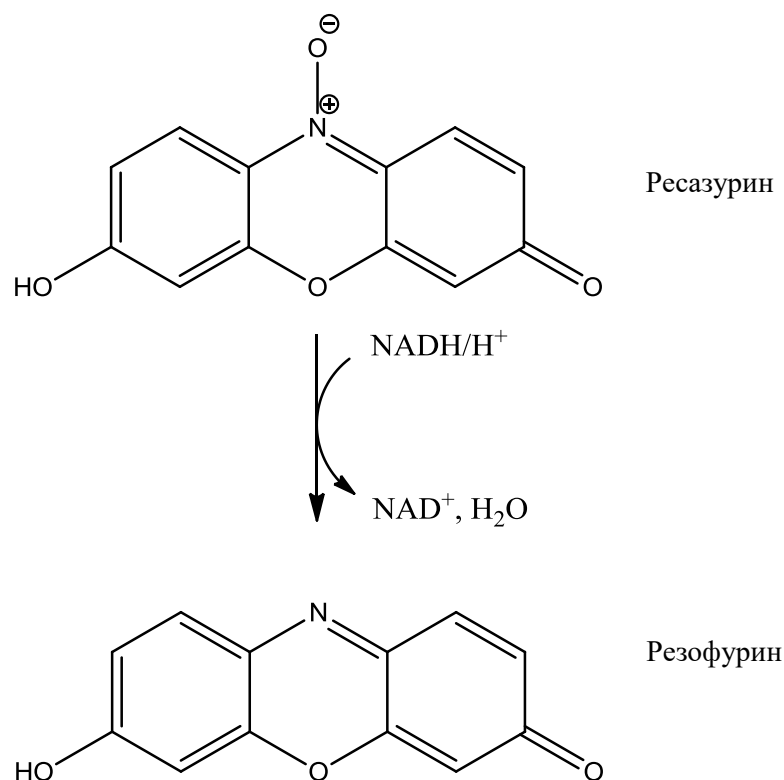
### 3.4.2.3. Припрема суспензија

Бактеријске суспензије и суспензије квасца су припремљене тако што су колоније узимане директно са подлоге и суспендоване у 5 mL стерилног физиолошког раствора. Густина почетне суспензије је подешавана коришћењем дензитометра (DEN-1, BioSan), при чему је вршено упоређивање са 0,5 Mc Farland стандардом [146]. Густина стандарда 0,5 Mc Farland одговара бактеријској суспензији која садржи око  $10^8$  CFU/mL и суспензији квасца од  $10^6$  CFU/mL (Colony-Forming Unit). Суспензија спора гљива је припремљена пажљивим скидањем спора са мицелије. Почетне суспензије су додатно разблажене у 0,85% стерилном физиолошком раствору у односу 1:100.

#### 3.4.2.4. Микродилуциона метода

Антимикробна активност је тестирана одређивањем минималне инхибиторне концентрације (МИК) и минималне микробицидне концентрације (ММК) употребом микротитрационих плоча уз помоћ ресазурина [147]. Коришћена је плоча са 96 отвора у које је стављено по 100  $\mu\text{L}$  хранљиве подлоге, Mueller-Hinton бујон за бактерије и Sabouraud dextrose бујон за гљиве. По 100  $\mu\text{L}$  раствора испитиваних једињења почетне концентрације 2000  $\mu\text{g/mL}$  је додато у први ред микротитрационе плоче. Двоструким разблаживањем коришћењем мултиканалне пипете добијени су раствори концентрација у области од 1000 до 7,81  $\mu\text{g/mL}$ . Затим је додавано по 10  $\mu\text{L}$  суспензија бактерија, квасца или спора гљива. Тестирана једињења су испитана при концентрацији бактерија од  $10^5$  CFU/mL, и концентрацији квасца и спора гљива од  $10^3$  CFU/mL. На крају у сваки отвор додат је ресазурин. Ресазурин као индикатор ћелијског раста у периоду инкубације из плаво-љубичасте боје под утицајем оксидоредуктаза живе ћелије прелази у резорурфин розе флуоросцентне боје (Слика 33) [148]. Тако припремљене плоче су инкубирани на  $37^\circ\text{C}$  24 сата за бактерије, на  $28^\circ\text{C}$  48 сати и 72 сата за гљиве. МИК је дефинисана као најнижа концентрација испитиваних супстанци на којој није дошло до промене боје ресазурина из плаве у ружичасту. Код гљива МИК представља најнижу концентрацију испитиваних једињења која спречава раст мицелије. Резултати су читавани визуелно. Минимална микробицидна концентрација је одређена пресејавањем 10  $\mu\text{L}$  узорка из отвора у којима није уочен раст на плочаст агар. Концентрација на којој после периода инкубације није уочен раст дефинисана је као минимална микробицидна концентрација. Доксицилин и флуконазол су коришћени као позитивне контроле. Концентровани диметилсулфоксид је бактерицидан, па је зато постављена контрола растварача којом је потврђено да 10% диметилсулфоксид нема утицаја на раст микроорганизама. Концентрација диметилсулфоксида у експерименту се додатно смањује серијом двоструких разблажења, тако да је концентрација растварача била 5% и нижа. Сваки експеримент садржи контролу раста која подразумева присуство и раст бактерија без тестиране супстанце, контролу стерилности која подразумева одсуство живих бактерија и позитивну контролу која подразумева присуство комерцијалног антибиотика.





Слика 33. Прелазак резазурина у резофурин

### 3.4.3. *In vitro* антибиофилм активност

#### 3.4.3.1. Припрема тестираних супстанци и хранљиве подлоге

Тестиране супстанце растворене су у диметилсулфоксиду а потом разблажене течним хранљивим медијумом Mueller-Hinton бујоном при чему су добијени 10% раствори. Антибиотик, доксициклин је такође растворен у Mueller-Hinton бујону.

### 3.4.3.2. Тестирани микроорганизми

Антибиофилм активност комплекса бакра(II) са одговарајућим S-алкил дериватима тиосалицилне киселине је одређена испитивањем на 5 врста бактерија (2 клиничка изолата: *S. aureus*, *P. aeruginosa* и три стандардне врсте: *S. aureus* ATCC 25923, *P. aeruginosa* ATCC 27853 и *P. mirabilis* ATCC 12453 (Табела 9).

**Табела 9.** Списак тестираних микроорганизама коришћених у одређивању антибиофилм активности испитиваних комплекса бакра(II)

Бактерије	
Грам-негативне бактерије	Грам-позитивне бактерије
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	<i>S. aureus</i> ATCC 25923
<i>P. aeruginosa</i>	<i>S. aureus</i>
<i>P. mirabilis</i> ATCC 12453	

### 3.4.3.3. Припрема суспензија

Бактеријске суспензије су припремљене тако што су колоније узимане директно са подлоге и суспендоване у 5 mL стерилног физиолошког раствора. Густина почетне суспензије је подешавана коришћењем дензитометра (DEN-1, BioSan), при чему је вршено упоређивање са 1,0 Mc Farland стандардом, након чега није вршено даље разблаживање суспензија.

### 3.4.3.4. *Tissue culture plate test* (TCP) тест

TCP тест описан од стране Christensen и сарадника [149] је најчешће коришћен тест за детекцију формирања биофилма. Свим врстама испитана је способност формирања биофилма коришћењем TCP методе. Сваки тест је укључивао контролу формирања биофилма. Карактеристике формирања бактеријског биофилма су добро описане од стране O'Toole и сарадника [150]. Први корак у формирању биофилма је прикључивање планктонских ћелија у подлоге за формирање сесилних ћелија.

Једном причвршћене ћелије расту у заједници и развијају се у зрео биофилм покривен омотачем састављеним од полисахарида, протеина и других материја. Ћелијско везивање се оцењује коришћењем модификованог кристал виолет теста [151] који се заснива на принципу да боја продире и боји ћелијске мембране ћелија које су везане, пружајући информацију о густини причвршћених ћелија [152].

Полистирен плоче равнoг дна са 96 отвора (Sarstedt) су припремљене стављањем 100  $\mu\text{L}$  хранљивог Mueller–Hinton бујона за бактерије у сваки отвор. Затим је 10  $\mu\text{L}$  свеже бактеријске суспензије додато у сваки отвор. Инокулисане плоче су инкубиране на 37°C 24 сата за Грам-негативне и 48 сати за Грам-позитивне бактерије. По 100  $\mu\text{L}$  из почетног раствора испитиваних комплекса (концентрације 2000  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) је додато у први ред плоче. Затим су направљена серијска двострука разблажења за сваки следећи ред која су додавана одвојено коришћењем мултиканалне пипете. Након 24 сата инкубације садржај сваке од плоча се одбацује, а затим се отвори испирају са 200  $\mu\text{L}$  раствора пуфера (0,15 М амонијум-сулфат, 0,1 М калијум-дихидрогенфосфат, 0,034 М натријум-дихидрогенцитрат и 0,001 М магнезијум-сулфат) због уклањања неадхерираних бактерија. Биофилмови формирани од везаних ћелија у отворима обојени су кристал виолетом (0,1% w/v) и инкубирани на собној температури 20 минута. Вишак боје је испран са дејонизованом водом, а плоче су фиксиране са 200  $\mu\text{L}$  раствора етанол-ацетон (4:1). Оптичке густине обојених везаних ћелија бактерија одређене су микро ELISA читачем плоча на таласној дужини од 630 nm. Биофилм инхибиторна концентрација (БИК) је дефинисана као најнижа концентрација сваког комплекса на којој је инхибирано формирање биофилма. Само бујон или бујон са растворима комплекса служили су као контрола због провере стерилности и неспецифичног везивања медијума. Сви тестови спроведени су у дуплику.

### 3.4.4. *In vitro* антиоксидативна активност

#### 3.4.4.1. Тест капацитета неутралисања DPPH радикала

Способност бакар(II)-комплекса са неким S-алкил дериватима тиосалицилне киселине да неутралишу 2,2-дифенил-1-пикрилхидразил (DPPH) слободне радикале процењена је коришћењем методе описане од стране Такао и сарадника [153]. Тест се базира на размени водоникових атома или електрона између молекула антиоксиданта хемијског комплекса и DPPH радикала у раствору [154].

Метанолни раствор DPPH (2 mL, 20 µg/mL) додаван је испитиваним растворима у метанолу (2 mL) у различитим концентрацијама (62,5-1000 µg/mL). Раствор има тамно розе боју, а у току реакције мења боју у светлије нијансе розе боје, па чак и у жуту. Што је промена боје израженија то тестирано једињење има већу антиоксидативну активност. Након 30 минута у тами на собној температури, апсорбанца је очитана на спектрофотометру на 517 nm. Метанол је коришћен као контрола, док је аскорбинска киселина коришћена као стандард. Експеримент је спроведен у трипликату а резултати су представљени као средње вредности ± стандардне девијације. Антиоксидативна активност изражена је као проценат инхибиције, а израчуната је коришћењем следеће једначине:

$$\text{Активност неутрализације радикала (\%)} = 100 \cdot [(A_{\text{контрола}} - A_{\text{узорак}}) / A_{\text{контрола}}]$$

при чему је  $A_{\text{контрола}}$  апсорбанца контроле, а  $A_{\text{узорак}}$  апсорбанца тестираног узорка

EC<sub>50</sub> вредност је ефективна концентрација хемијске супстанце на којој је неутралисано 50% DPPH радикала. Наведена вредност добијена је са графика који приказује активност неутрализације радикала (%) наспрам концентрације узорака. Ниска EC<sub>50</sub> вредност указује на јаку способност екстракта да се понаша као DPPH неутрализатор.

### 3.4.4.2. Редукциона моћ

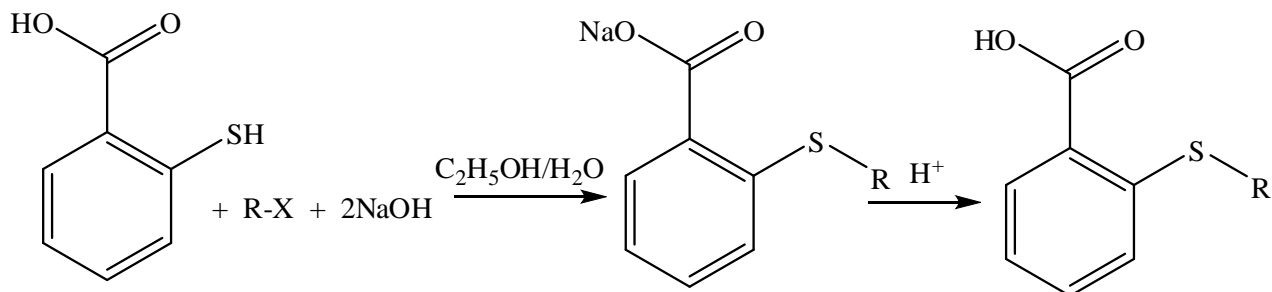
Редукциона моћ бакар(II)-комплекса са неким S-алкил дериватима тиосалицилне киселине, одређена је према методу Оуаизи и сарадника [155]. Различите концентрације комплекса (1 mL, 62,5-1000 µg/mL) су помешане са 2,5 mL фосфатног пуфера (0,2 M, рН 6,6) и 2,5 mL калијум-ферицијанида (1%). Смеша је инкубирана на 50°C 20 минута. Након тога 2,5 mL трихлорсирћетне киселине (10%) је додато смеси и центрифугирано на 3000 rpm (*revolutions per minute*) 10 минута када год је било потребно. Горњи слој раствора (2,5 mL) је помешан са дестилованом водом (2,5 mL) и свеже припремљеним раствором фери-хлорида (0,5 mL). Апсорбанца реакционе смеше је мерена на 700 nm. Повећана апсорбанца реакционе смеше указује на повећану редукциону моћ. Аскорбинска киселина је коришћена као референтно једињење. Експеримент је спроведен у трипликату, при чему су за анализу коришћене средње вредности.

## **4. РЕЗУЛТАТИ**

## 4.1. СИНТЕЗА И КАРАКТЕРИЗАЦИЈА S-АЛКИЛ ДЕРИВАТА ТИОСАЛИЦИЛНЕ КИСЕЛИНЕ И ОДГОВАРАЈУЋИХ БИНУКЛЕАРНИХ КОМПЛЕКСА БАКРА(II), $[\text{Cu}_2(\text{S-R-thiosal})_4(\text{H}_2\text{O})_2]$

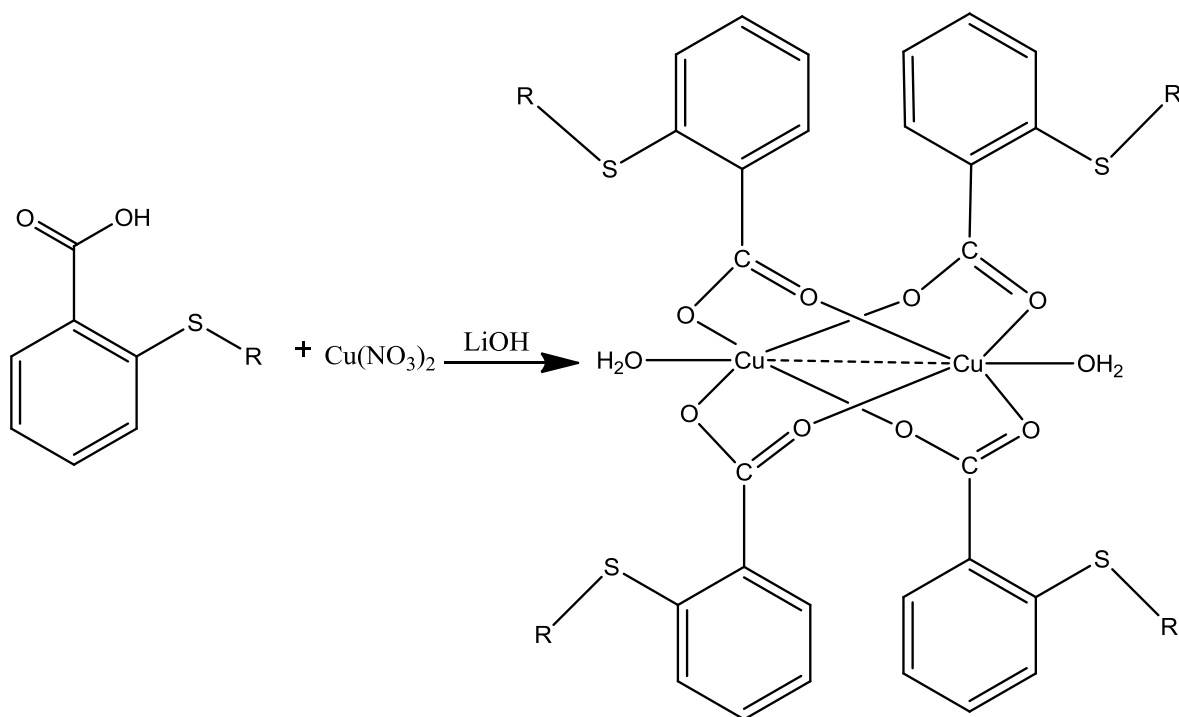
### 4.1.1. Синтезе лиганата и комплекса

Бидентатни лиганди S-алкил деривати тиосалицилне киселине (алкил = бензил-(L1), метил-(L2), етил-(L3), пропил-(L4) и бутил-(L5)) добијени су реакцијом алкиловања тиосалицилне киселине одговарајућим алкил-халогенидима у базној средини и смеси вода-етанол као растварачу (Шема 4) [14].



**Шема 4.** Синтеза S-алкил деривата тиосалицилне киселине

Одговарајући бинуклеарни комплекси бабра(II),  $[\text{Cu}_2(\text{S-R-thiosal})_4(\text{H}_2\text{O})_2]$  добијени су директном реакцијом бакар(II)-нитрата и S-алкил деривата тиосалицилне киселине (молски однос 1:2) у воденом раствору са задовољавајућим приносима од преко 80% (Шема 6).



**Шема 6.** Синтеза комплекса бакра(II) са *S*-алкил-дериватима тиосалицилне киселине

*R* = бензил-(L1), метил-(L2), етил-(L3), пропил-(L4), бутил-(L5)

#### 4.1.2. Елементалне микроанализе синтетисаних комплекса бакра(II)

Резултати елементалне микроанализе за синтетисане бинуклеарне комплексе бакра(II) са *S*-алкил дериватима тиосалицилне киселине као бидентатним лигандима приказани су у следећим табелама.

**Табела 10.** Резултати елементалне микроанализе за  $[\text{Cu}_2(\text{S-bz-thiosal})_4(\text{H}_2\text{O})_2]$  (C1)

[Cu <sub>2</sub> (S-bz-thiosal) <sub>4</sub> (H <sub>2</sub> O) <sub>2</sub> ]			
M (Cu <sub>2</sub> C <sub>56</sub> H <sub>48</sub> O <sub>10</sub> S <sub>4</sub> ) = 1136,308 g·mol <sup>-1</sup>			
	C (%)	H (%)	S (%)
Израчунато:	59,19	4,26	11,29
Нађено:	59,01	4,18	11,14



**Табела 11.** Резултати елементалне микроанализе за  $[\text{Cu}_2(\text{S-met-thiosal})_4(\text{H}_2\text{O})_2]$  (C2)

<b><math>[\text{Cu}_2(\text{S-met-thiosal})_4(\text{H}_2\text{O})_2]</math></b>			
$M(\text{Cu}_2\text{C}_{32}\text{H}_{32}\text{O}_{10}\text{S}_4) = 831,932 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$			
	C (%)	H (%)	S (%)
Израчунато:	46,20	3,88	15,42
Нађено:	46,17	3,69	15,39

**Табела 12.** Резултати елементалне микроанализе за  $[\text{Cu}_2(\text{S-et-thiosal})_4(\text{H}_2\text{O})_2]$  (C3)

<b><math>[\text{Cu}_2(\text{S-et-thiosal})_4(\text{H}_2\text{O})_2]</math></b>			
$M(\text{Cu}_2\text{C}_{36}\text{H}_{40}\text{O}_{10}\text{S}_4) = 888,036 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$			
	C (%)	H (%)	S (%)
Израчунато:	48,69	4,54	14,44
Нађено:	48,55	4,39	14,28

**Табела 13.** Резултати елементалне микроанализе за  $[\text{Cu}_2(\text{S-pr-thiosal})_4(\text{H}_2\text{O})_2]$  (C4)

<b><math>[\text{Cu}_2(\text{S-pr-thiosal})_4(\text{H}_2\text{O})_2]</math></b>			
$M(\text{Cu}_2\text{C}_{40}\text{H}_{48}\text{O}_{10}\text{S}_4) = 944,140 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$			
	C (%)	H (%)	S (%)
Израчунато:	50,88	5,12	13,58
Нађено:	50,71	5,04	13,48

**Табела 14.** Резултати елементалне микроанализе за  $[\text{Cu}_2(\text{S-bu-thiosal})_4(\text{H}_2\text{O})_2]$  (C5)

<b><math>[\text{Cu}_2(\text{S-bu-thiosal})_4(\text{H}_2\text{O})_2]</math></b>			
$M(\text{Cu}_2\text{C}_{44}\text{H}_{56}\text{O}_{10}\text{S}_4) = 1000,244 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$			
	C (%)	H (%)	S (%)
Израчунато:	52,83	5,64	12,82
Нађено:	52,75	5,58	12,71

### 4.1.3. Инфрацрвени спектри S-алкил деривата тиосалицилне киселине и одговарајућих комплекса бакра(II)

Инфрацрвени спектри комплекса снимани су у циљу утврђивања начина координовања S-алкил-деривата тиосалицилне киселине за централни јон метала. Асиметричне валенционе вибрације карбоксилне групе коришћене су да се утврди да ли је карбоксилна група координована (апсорпционе траке се налазе у области 1600-1650  $\text{cm}^{-1}$ ) или некоординована (апсорпционе траке се налазе у области 1700-1750  $\text{cm}^{-1}$ ) за централни јон метала. Комплекси  $[\text{Cu}_2(\text{S-R-thiosal})_4(\text{H}_2\text{O})_2]$  показују двоструке, оштре, асиметричне валенционе вибрације карбоксилних група координованих S-алкил деривата тиосалицилне киселине за бакар(II)-јон на око 1565-1620  $\text{cm}^{-1}$  (Табела 15). Примећене двоструке апсорпционе траке комплекса указују на малу разлику у координацији карбоксилних група лигананда за бакар(II)-јон. Јаке, оштре, симетричне валенционе вибрације координованих карбоксилних група S-алкил деривата тиосалицилне киселине налазе се у очекиваној области на око 1400  $\text{cm}^{-1}$  [156-158]. На основу резултата елементалне микроанализе и инфрацрвене спектроскопије не може се са сигурношћу утврдити начин координовања S-алкил деривата тиосалицилне киселине за бакар(II)-јон.

**Табела 15.** Најважније траке у инфрацрвеним спектрима S-алкил деривата тиосалицилне киселине и одговарајућих бинуклеарних комплекса бакра(II),  $[\text{Cu}_2(\text{S-R-thiosal})_4(\text{H}_2\text{O})_2]$

	-S-R	-COO <sup>-</sup> (as)	-COO <sup>-</sup> (sim)
S-bz-thiosal (L1)	710 $\text{cm}^{-1}$	1675 $\text{cm}^{-1}$	1412 $\text{cm}^{-1}$
$[\text{Cu}_2(\text{S-bz-thiosal})_4(\text{H}_2\text{O})_2]$ (C1)	696 $\text{cm}^{-1}$	1589 $\text{cm}^{-1}$ 1567 $\text{cm}^{-1}$	1403 $\text{cm}^{-1}$
S-met-thiosal (L2)	699 $\text{cm}^{-1}$	1672 $\text{cm}^{-1}$	1412 $\text{cm}^{-1}$
$[\text{Cu}_2(\text{S-met-thiosal})_4(\text{H}_2\text{O})_2]$ (C2)	697 $\text{cm}^{-1}$	1596 $\text{cm}^{-1}$ 1581 $\text{cm}^{-1}$	1411 $\text{cm}^{-1}$
S-et-thiosal (L3)	704 $\text{cm}^{-1}$	1682 $\text{cm}^{-1}$	1414 $\text{cm}^{-1}$
$[\text{Cu}_2(\text{S-et-thiosal})_4(\text{H}_2\text{O})_2]$ (C3)	697 $\text{cm}^{-1}$	1619 $\text{cm}^{-1}$ 1592 $\text{cm}^{-1}$	1399 $\text{cm}^{-1}$
S-pr-thiosal (L4)	702 $\text{cm}^{-1}$	1678 $\text{cm}^{-1}$	1410 $\text{cm}^{-1}$
$[\text{Cu}_2(\text{S-pr-thiosal})_4(\text{H}_2\text{O})_2]$ (C4)	704 $\text{cm}^{-1}$	1614 $\text{cm}^{-1}$ 1594 $\text{cm}^{-1}$	1401 $\text{cm}^{-1}$
S-bu-thiosal (L5)	703 $\text{cm}^{-1}$	1678 $\text{cm}^{-1}$	1414 $\text{cm}^{-1}$
$[\text{Cu}_2(\text{S-bu-thiosal})_4(\text{H}_2\text{O})_2]$ (C5)	696 $\text{cm}^{-1}$	1590 $\text{cm}^{-1}$ 1570 $\text{cm}^{-1}$	1403 $\text{cm}^{-1}$

Потпуна потврда структуре награђених комплекса се може добити тек на основу анализе резултата рендгенске структурне анализе. Иако смо очекивали исти начин координовања S-алкил деривата тиосалицилне киселине за бакар(II)-јон као што је то био случај са паладијум(II)-јоном [14], стварна структура комплекса бакра(II) потврђена је на основу резултата рендгенске структуре комплекса  $[\text{Cu}_2(\text{S-met-thiosal})_4(\text{H}_2\text{O})_2]$  (C2),  $[\text{Cu}_2(\text{S-et-thiosal})_4(\text{H}_2\text{O})_2]$  (C3) и  $[\text{Cu}_2(\text{S-pr-thiosal})_4(\text{DMSO})_2]$  (C4).

#### 4.1.4. Магнетна мерења

Бинуклеарни комплекси бакра(II) са карбоксилатним лигандима [57,159] стабилни су у димерној форми. Ниске вредности параметра  $\mu_{\text{eff}}$  на собној температури (1,20 – 2,30 ВМ) указују на антиферромагнетичну интеракцију између два јона метала која је типична за бинуклеарне комплексе бакра(II) типа:  $[\text{Cu}(\text{R}\sim\text{COO})_2\text{L}]_2$  (Табела 16) [160-162].

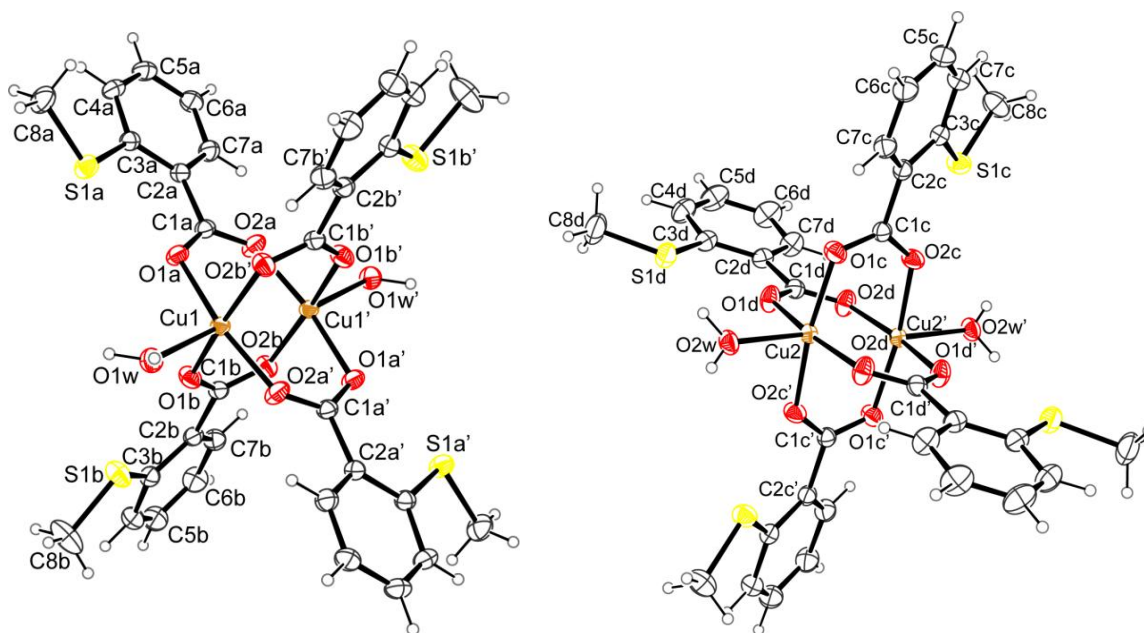
На основу раније публикованих резултата [57,159-162], може се закључити је главни фактор који одређује магнитуду антиферромагнетичне интеракције у димерним комплексима бакра(II) са карбоксилатним лигандима електронска структура мостног  $\text{COO}^-$  остатка.

**Табела 16.** Магнетна мерења испитиваних бинуклеарних комплекса бакра(II)

Комплекс	$\mu_{\text{eff}}$
$[\text{Cu}_2(\text{S-bz-thiosal})_4(\text{H}_2\text{O})_2]$ (C1)	$\mu(294 \text{ K}) = 1,56 \mu_{\text{B}}$
$[\text{Cu}_2(\text{S-met-thiosal})_4(\text{H}_2\text{O})_2]$ (C2)	$\mu(294 \text{ K}) = 2,30 \mu_{\text{B}}$
$[\text{Cu}_2(\text{S-et-thiosal})_4(\text{H}_2\text{O})_2]$ (C3)	$\mu(294 \text{ K}) = 1,99 \mu_{\text{B}}$
$[\text{Cu}_2(\text{S-pr-thiosal})_4(\text{H}_2\text{O})_2]$ (C4)	$\mu(294 \text{ K}) = 1,85 \mu_{\text{B}}$
$[\text{Cu}_2(\text{S-bu-thiosal})_4(\text{H}_2\text{O})_2]$ (C5)	$\mu(294 \text{ K}) = 1,80 \mu_{\text{B}}$

#### 4.1.5. Кристална структура бинуклеарног комплекса бакра(II) са S-метил дериватом тиосалицилне киселине, $[\text{Cu}_2(\text{S-met-thiosal})_4(\text{H}_2\text{O})_2]$ (C2)

Кристална структура  $[\text{Cu}_2(\text{S-met-thiosal})_4(\text{H}_2\text{O})_2]$  (C2), комплекса састоји се од два кристалографски независна бинуклеарна молекула А и Б са центром инверзије који се налази између два јона метала. У оба молекула парови атома бакра(II) премошћени су са четири лиганда S-метил деривата тиосалицилне киселине формирајући притом „paddle-wheel“ тип структуре. На слици 34 приказана је структура молекула и начин обележавања атома у оквиру молекула А и Б.



Слика 34. Кристална структура молекула  $[\text{Cu}_2(\text{S-met-thiosal})_4(\text{H}_2\text{O})_2]$  (C2) и начин обележавања атома А и Б молекула

Растојања између атома бакра у молекулу А и Б су 2,6220(6) и 2,6189(6) Å, што се може упоредити са  $\text{Cu}\cdots\text{Cu}$  растојањем нађеним у димерном бакар(II)-ацетату које износи 2,614 Å [163]. Оба центра бакра (Cu1 и Cu2) показују квадратно-пирамидалну координациону структуру са четири атома кисеоника из симетрично повезаних молекула S-метил деривата тиосалицилне киселине.

У оба молекула аксијалне позиције бакарног координационог полиедра су заузете атомима кисеоника из молекула воде. Cu1 и Cu2 атоми одступају од основне равни према аксијалном лиганду за 0,2011(8), односно 0,1964(8) Å.

У табели 17 приказане су одабране дужине и углови веза у молекулу А и молекулу Б. На основу наведених података уочавају се велике разлике у конформацији молекула А и молекула Б. Различита дисторзија квадратно-пирамидалног окружења сваког од бакар(II)-јона огледа се у вредностима координационих углова (86,80(7)-101,87(7)° у молекулу А и 88,03(8)-99,71(8)° у молекулу Б), као и у разлици у дужини Cu1-О и Cu2-О веза у основној равни (1,952(2)-1,948(2) Å у молекулу А и 1,948(2)-1,975(2) Å у молекулу Б).

**Табела 17.** Дужине веза (Å) и углови веза (°) у два независна молекула комплекса  $[Cu_2(S\text{-}met\text{-}thiosal)_4(H_2O)_2] C2$

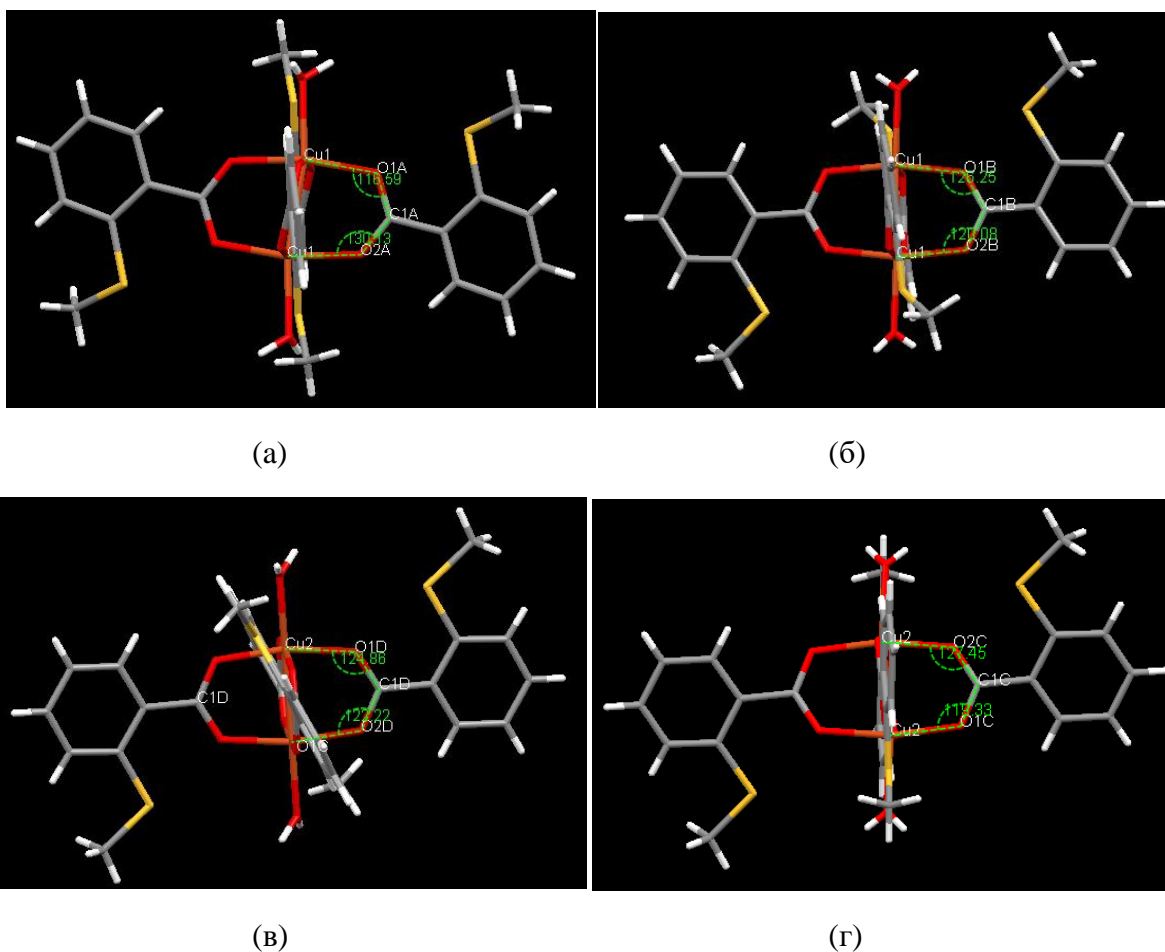
Молекул А				Молекул Б			
дужине веза		углови веза		дужине веза		углови веза	
Cu1-Cu1 <sup>i</sup>	2,6220(6)	O1a-Cu1-O2b <sup>i</sup>	86,80(7)	Cu2-Cu2 <sup>ii</sup>	2,6180(6)	O1d-Cu2-O2c <sup>ii</sup>	88,03(8)
Cu1-O2a <sup>i</sup>	1,952(16)	O2a <sup>i</sup> -Cu1-O1b	89,61(8)	Cu2-O2d <sup>ii</sup>	1,9475(16)	O1d-Cu2-O1c	88,88(8)
Cu1-O1b	1,9641(16)	O1b-Cu1-O1a	89,81(7)	Cu2-O1d	1,9603(16)	O2d <sup>ii</sup> -Cu2-O2c <sup>ii</sup>	90,27(8)
Cu1-O1a	1,9817(5)	O2a <sup>i</sup> -Cu1-O1w	89,85(7)	Cu2-O1c	1,9664(16)	O2d <sup>ii</sup> -Cu2-O1c	90,52(8)
Cu1-O2b <sup>i</sup>	1,9845(15)	O2a <sup>i</sup> -Cu1-O2b <sup>i</sup>	91,39(8)	Cu2-O2c <sup>ii</sup>	1,9751(16)	O2c <sup>ii</sup> -Cu2-O2w	99,71(8)
Cu1-O1w	2,1463(18)	O1b-Cu1-O1w	93,79(8)	Cu2-O2w	2,1453(18)	O2d <sup>ii</sup> -Cu2-O2w	91,79(8)
O1b-C1b	1,253(3)	O2b <sup>i</sup> -Cu1-O1w	98,10(7)	O1c-C1c	1,256(3)	O1d-Cu2-O2w	97,26(7)
O2a-C1a	1,257(3)	O1a-Cu1-O1w	101,87(7)	O2c-C1c	1,256(3)	O1c-Cu2-O2w	99,71(8)
O1a-C1a	1,259(3)	O1b-Cu1-O2b <sup>i</sup>	168,06(7)	O2d-C1d	1,258(3)	O1c-Cu2-O2c <sup>ii</sup>	168,39(7)
O2b-C1b	1,268(3)	O2a <sup>i</sup> -Cu1-O1a	168,28(7)	O1d-C1d	1,259(3)	O2d <sup>ii</sup> -Cu2-O1d	168,45(7)

Symmetry codes: (i)  $-x + 1, -y, -z + 1$ ; (ii)  $-x + 1, -y + 1, -z$ .

Везе аксијалних молекула воде имају скоро исте дужине, међутим ови лиганди показују незнатно савијање у односу на Cu<sup>⋯</sup>Cu раван, што показују O1w-Cu1-Cu1<sup>i</sup> и O2w-Cu2-Cu2<sup>ii</sup> углови од 172,39(6) и 168,15(5)°. Геометријски параметри код оба молекула су у складу са онима који су нађени код одговарајућих О-метил деривата [164].

Најочигледнија структурна разлика између два независна молекула комплекса **C2** јесте различита оријентација фенилних прстенова S-метил деривата тиосалицилне киселине у односу на одговарајуће карбоксилне групе (Слика 35). Тако, у молекулу А углови ротације C2a/C7a и C2b/C7b прстенова у односу на њихове COO<sup>-</sup> остатке су 7,9(3)° и 17,1(4)°.

У молекулу Б одговарајући углови ротације C2c/C7c и C2d/C7d прстенова су 24,3(2)° и 5,8(2)°. Треба скренути пажњу на поменуте разлике у паровима Cu-O-C углова који су формирани мостним координовањем молекула лигананда који садрже карбоксилну групу за јоне бабра(II). Тако, у молекулу А, координовање једног S-метил деривата тиосалицилне киселине (прстен C2a/C7a) даје један пар углова, Cu1-O1a-C1a и Cu1<sup>i</sup>-O2a-C1a, са веома различитим вредностима од 116,6(1)° и 130,1(1)°, док координовање другог лигананда (прстен C2b/C7b) даје други пар углова Cu1-O1b-C1b и Cu1<sup>i</sup>-O2b-C1b са вредностима од 126,2(1)° и 120,1(1)°.



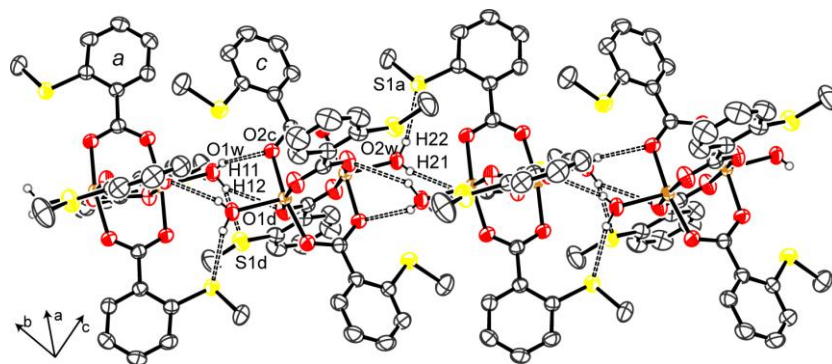
**Слика 35.** Две ортогоналне пројекције за молекул А [(a) и (b)] и молекул Б [(v) и (z)] које илуструју међусобну орјентацију фенилног прстена и Си-О-С-О-Си равни

Што се тиче молекула Б ове разлике су мање видљиве, а углови Cu2-O1c-C1c и Cu2<sup>ii</sup>-O2c-C1c имају вредности од 127,4(2)° и 119,3(2)°, док су углови Cu2-O1d-C1d и Cu2<sup>ii</sup>-O2d-C1d скоро једнаки са вредностима од 124,9(1)°, односно 122,2(1)°. Ове приметне варијације у паровима Cu-O-C углова (од 2,7° до 14,4°) формираних од истог типа лиганда указују на значајан утицај кристалног паковања на облик и деформацију „paddle-wheel“ језгра А и Б. Испитивање кристалног паковања комплекса **C2** показује доминацију O-H...O водоничних веза које укључују аксијалне лиганде као доноре и атоме карбоксилних група кисеоника као акцепторе. Три интеракције, O1w-H11...O1c, O1w-H12...O1d и O2w-H21...O1b (Табела 18) међусобно повезују независне молекуле приликом грађења бесконачног АБАБ ланца (Слика 36). Веза између А и Б молекула унутар ланца ојачана је од стране две значајне O-H...S интеракције, ангажовањем S акцептора у грађењу фенил супституената. Формирани АБАБ ланац може се сматрати главном структурном карактеристиком комплекса **C2**. Може се такође запазити да O-H...O интеракције не укључују O1a и O2a атоме што указује да дисторзија у „paddle-wheel“ структури молекула А није директно повезана са јаким водоничним везама.

**Табела 18.** Геометрија водоничних веза и интермолекулске интеракције (Å, °) у кристалној структури комплекса **C2**

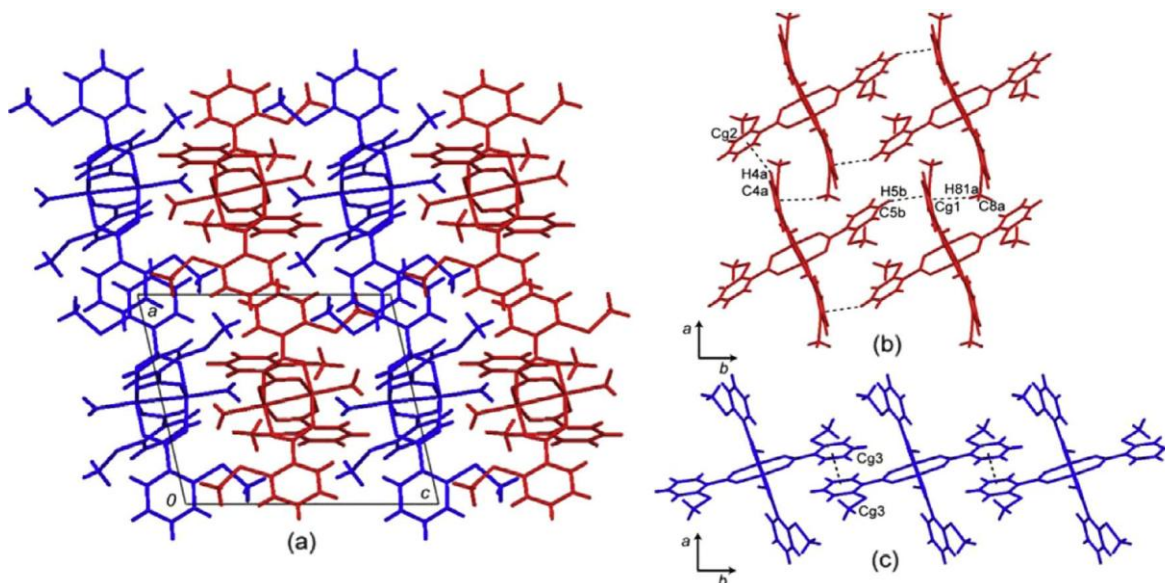
D-H...A	D-H	D...A	H...A	D-H...A
O1w-H11...O2c	0,66(4)	2,991(3)	2,38(4)	155(4)
O1w-H12...S1d <sup>ii</sup>	0,92(4)	3,247(2)	2,37(3)	157(4)
O1w-H12...O1d <sup>ii</sup>	0,93(4)	3,193(2)	2,54(3)	127(3)
O2w-H21...O2b <sup>ii</sup>	0,67(3)	2,882(2)	2,23(3)	162(4)
O2w-H22...S1a <sup>ii</sup>	0,85(5)	3,228(3)	2,39(5)	166(4)
C4a-H4a...Cg2 <sup>iii</sup>	0,93	3,810(3)	3,03	142
C5b-H5b...Cg1 <sup>iv</sup>	0,93	3,738(3)	2,94	144
C8a-H81b...Cg1 <sup>v</sup>	0,96	3,770(4)	3,00	137
Cg3...Cg3 <sup>vi</sup>		3,784(2)		

Symmetry codes: (iii), x, y +1; (iv) -x + 2, -y, -z +1; (v) -x +1, -y+1, -z +1; (vi) -x, -y +1, -z.



Слика 36. Приказ ланца који се састоји од молекула А и Б повезаних водоничним везама

Док у молекулу Б прстен C2c/C7c показује највеће увијање у односу на COO<sup>-</sup> групу (24,3(2)°), ротација суседног C2a/C7a прстена у молекулу А (7,9(3)°) је делимично спречена формирањем релативно јаким О-Н $\cdots$ О водоничних веза. Поред водоничних веза које повезују молекуле у АБАБ ланац, нема значајних интеракција између молекула А и Б. Тродимензионално кристално паковање комплекса **C2** показује одвојене блокове А и Б молекула. У оквиру одговарајућих блокова А молекули међусобно интерагују преко С-Н $\cdots$  $\pi$  интеракција, док молекули Б користе своје најмање ротиране C2d/C7d прстенове (5,8(2)°) за међусобну интеракцију преко слабих  $\pi\cdots\pi$  интеракција (Слика 37).

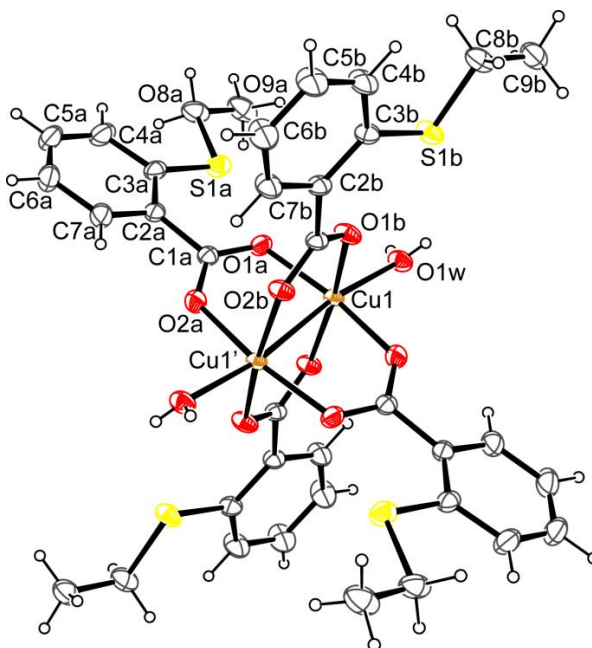


Слика 37. (а) Блокови А (црвена боја) и Б (плава боја) молекула;  
(б) С-Н $\cdots$  $\pi$  интеракције између молекула А; (с)  $\pi\cdots\pi$  интеракције између молекула Б



#### 4.1.6. Кристална структура бинуклеарног комплекса бакар(II) са S-етил дериватом тиосалицилне киселине, $[\text{Cu}_2(\text{S-et-thiosal})_4(\text{H}_2\text{O})_2]$ (C3)

Резултати рендгенске структурне анализе комплекса **C3** показују да комплекс кристалише у триклиничној *P*-1 просторној групи. Кристална структура је изграђена од бинуклеарних молекула комплекса где је пар бакар(II)-атома премошћен са четири S-етил деривата тиосалицилне киселине формирајући при том „paddle-wheel“ тип структуре (Слика 38).



Слика 38. Кристална структура и начин обележавања атома у молекулу  $[\text{Cu}_2(\text{S-et-thiosal})_4(\text{H}_2\text{O})_2]$  (C3)

Дужина везе  $\text{Cu}\cdots\text{Cu}$  од 2,611 Å, слична је дужини везе од 2,614 Å која је нађена код димерног бакар(II)-ацетата [163]. У структури комплекса **C3** бакар(II)-јон се налази у искривљеном квадратно-пирамидалном окружењу, које се формира од стране кисеоникових атома лигананда са карбоксилном групом у основној равни, и молекула воде у аксијалној позицији. Бакар(II)-јон је измештен из равни квадратне основе за 0,195(1) Å. У табели 19 приказане су одабране дужине и углови веза у молекулу комплекса  $[\text{Cu}_2(\text{S-et-thiosal})_4(\text{H}_2\text{O})_2]$  (C3).

Табела 19. Дужине веза (Å) и углови веза (°) у молекулу  $[Cu_2(S\text{-}et\text{-}thiosal)_4(H_2O)_2]$  (C3)

ДУЖИНЕ ВЕЗА		УГЛОВИ ВЕЗА	
Cu1–Cu1 <sup>i</sup>	2,611(1)	O1a–Cu1–O1b	86,18(6)
Cu1–O1a	1,988(1)	O1a–Cu1–O2b <sup>i</sup>	92,44(5)
Cu1–O2a	1,955(1)	O1b–Cu1–O2a <sup>i</sup>	91,29(6)
Cu1–O1b	1,982(1)	O2a <sup>i</sup> –Cu1–O2b <sup>i</sup>	87,84(5)
Cu1–O2b	1,958(1)	O1a–Cu1–O1w	99,05(6)
Cu1–O1w	2,135(1)	O1b–Cu1–O1w	97,18(6)
O1a–C1a	1,260(2)	O2a <sup>i</sup> –Cu1–O1w	92,42(6)
O2a–C1a	1,255(2)	O2b <sup>i</sup> –Cu1–O1w	94,15(6)
O1b–C1b	1,255(2)	O1a–Cu1–O2a <sup>i</sup>	168,48(5)
O2b–C1b	1,261(2)	O1b–Cu1–O2b <sup>i</sup>	168,66(5)
C3a–S1a	1,761(2)	C1a–C2a–C3a	124,31(16)
C8a–S1a	1,812(2)	C1a–C2a–C7a	115,94(17)
C3b–S1b	1,763(2)	C1b–C2b–C3b	124,36(15)
C8b–S1b	1,815(2)	C1b–C2b–C7b	116,57(15)

У кристалном паковању молекули комплекса **C3** су повезани у ланац преко два пара O1w–H $\cdots$ O1 водоничних веза које укључују аксијално координоване молекуле воде као доноре и два атома кисеоника карбоксилних група као акцепторе (Табела 20).

Табела 20. Дужине (Å) и углови (°) водоничних веза у молекулу  $[Cu_2(S\text{-}et\text{-}thiosal)_4(H_2O)_2]$  (C3)

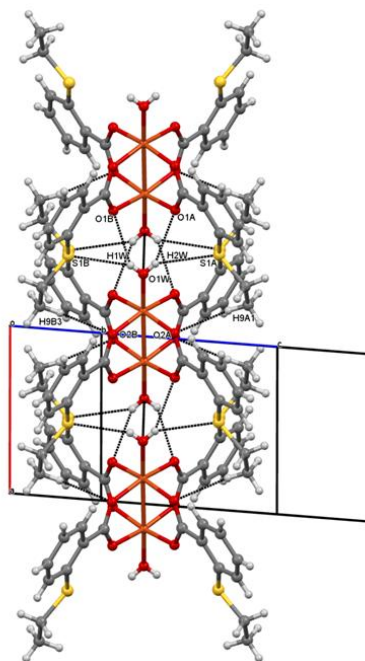
D–H $\cdots$ A	D–H	D $\cdots$ A	H $\cdots$ A	D–H $\cdots$ A
O1w–H1w $\cdots$ O1b <sup>ii</sup>	0,68(3)	3,058(2)	2,50(3)	140(3)
O1w–H2w $\cdots$ O1a <sup>ii</sup>	0,69(3)	3,127(2)	2,50(3)	151(3)
O1w–H1w $\cdots$ S1b <sup>ii</sup>	0,68(3)	3,412(2)	2,77(3)	155(3)
O1w–H2w $\cdots$ S1a <sup>ii</sup>	0,69(3)	3,487(2)	2,88(3)	147(3)
O9a–H9a1 $\cdots$ O2a <sup>iii</sup>	0,96	3,457(3)	2,56	155
O9b–H9b3 $\cdots$ O2b <sup>iii</sup>	0,96	3,404(3)	2,50	157
C4b–H4b $\cdots$ Cg1 <sup>iv</sup>	0,93	3,803(2)	3,12	131

Symmetry codes: (ii)  $-x+1, -y, -z+1$ ; (iii)  $x+1, +y, +z$ ; (iv)  $1-x, -1-y, 1-z$ .

Анализирали смо кристалну структуру 26 сличних  $[Cu_2(ArCOO)_4(H_2O)_2]$  структура комплекса (ArCOO је било који ароматични карбоксилатни лиганд) добијених из *Cambridge Structural Databank* (CSD) базе података [173] у циљу разумевања фактора који утичу на деформацију одговарајућих  $Cu_2C_4O_8$  „paddle-wheel“ језгара.

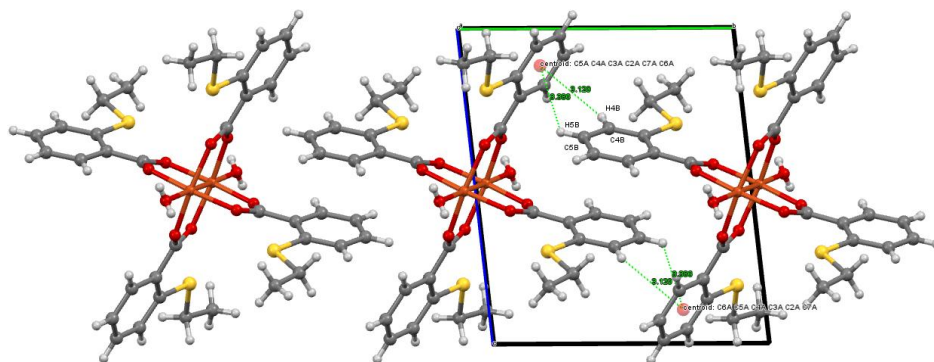
Пронашли смо да 16 структура формира сличан ланац молекула преко  $O1w-H\cdots O$  интеракција између воде и карбоксилатних лиганата.

У таквом паковању деформација „paddle-wheel“ језгара углавном настаје због учествовања кисеоникових атома карбоксилних група као акцептора у грађењу водоничних веза и такође због тенденције међусобно блиских суседних фенилних прстенова да избегавају стерне сметње, нарочито ако је њихова ротација делимично смањена.  $Cu_2C_4O_8$  језгро у структури **C3** је такође значајно искривљено, пошто су два  $Cu1-O1-C1$  угла која укључују  $O1$  акцепторе  $O1w-H\cdots O1$  значајно мања у поређењу са угловима  $Cu1-O2-C2$ . У ланцу  $O1w-H\cdots O1$  водоничне везе су подржане паром слабијих  $O1w-H\cdots S1$  и  $C9-H\cdots O2$  интеракција које такође обухватају акцепторска и донорска места из фенил *S*-етил супституената (Слика 39). Претпоставља се да ове интеракције делимично смањују ротацију *o*-супституисаних фенилних прстенова у односу на одговарајуће карбоксилне групе. Осим пара  $C9-H\cdots O2$  интеракција нису пронађене додатне значајне интеракције за  $O2$  акцепторе. У ланцу, најкраће растојање између бакар(II)-јона суседних молекула износи  $5,117(1)$  Å, што је слично растојању нађеном у молекулу **C2** ( $5,122(2)$  Å).

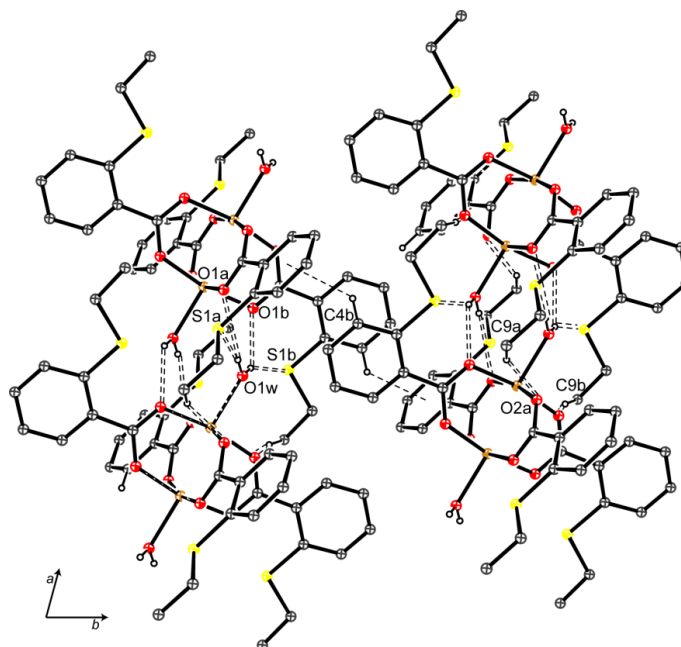


**Слика 39.** Ланац молекула **C3** формираних од  $O-H\cdots O$  водоничних веза подржаних од  $O-H\cdots S$  и  $C-H\cdots O$  интеракција

Суседни ланци у молекулу **C3** су даље повезани преко пара С–Н···π интеракција које укључују фенилне прстенове оба S-етил деривата тиосалицилне киселине. На слици 40 и 41 приказан је начин паковања молекула у кристалној структури комплекса  $[\text{Cu}_2(\text{S-et-thiosal})_4(\text{H}_2\text{O})_2]$  (**C3**).



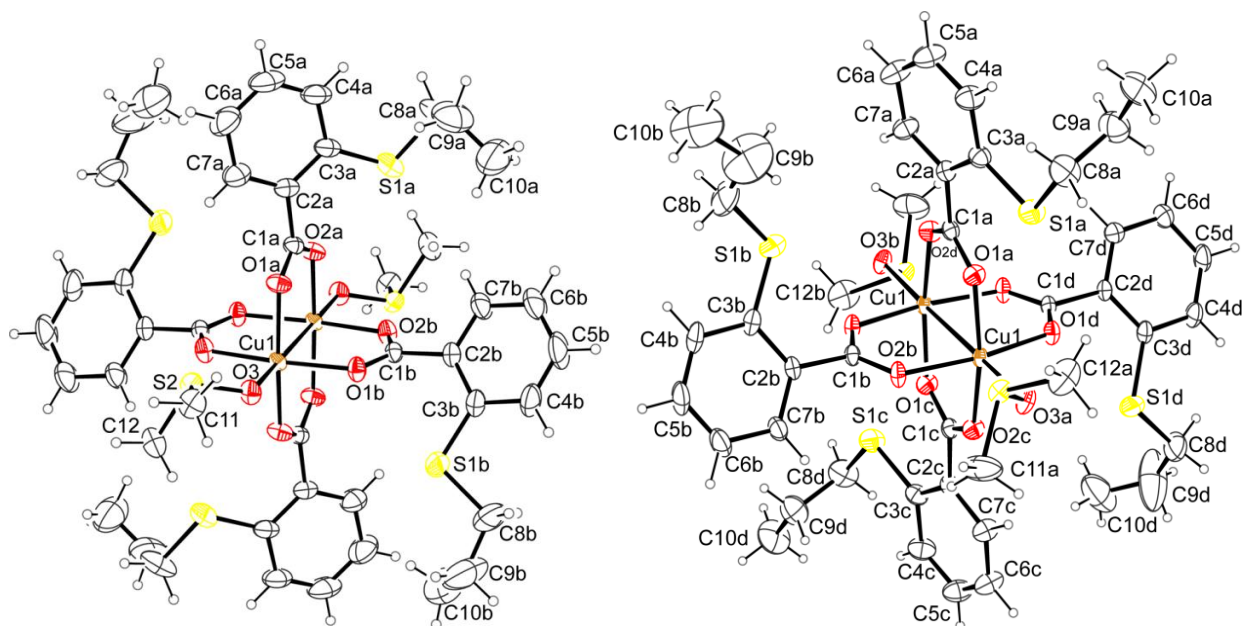
Слика 40. Начин паковања молекула у кристалној структури комплекса  $[\text{Cu}_2(\text{S-et-thiosal})_4(\text{H}_2\text{O})_2]$  (**C3**)



Слика 41. Интермолекулске интеракције у кристалној структури молекула  $[\text{Cu}_2(\text{S-et-thiosal})_4(\text{H}_2\text{O})_2]$  (**C3**). Интеракције у ланцу молекула су приказане двоструким испрекиданим линијама. С–Н···π интеракције приказане су једноструким испрекиданим линијама. Воденикови атоми који не учествују у интеракцијама су искључени са слике због јасноће приказа

#### 4.1.7. Кристална структура бинуклеарног комплекса бакра(II) са S-пропил дериватом тиосалицилне киселине, $[\text{Cu}_2(\text{S-pr-thiosal})_4(\text{DMSO})_2]$ (C4)

Комплекс C4 је „paddle-wheel“ тип комплекса, који обухвата два јона бакра(II) који су премошћени са четири S-пропил деривата тиосалицилне киселине и додатно координовани са DMSO молекулом. Бинуклеарни комплекс кристалише у орторомбичном систему у две полиморфне форме. Полиморф I кристалише у центросиметричној просторној групи  $Pcsc$ , док полиморф II кристалише у не-центросиметричној просторној групи  $P2_12_12$ . На слици 42 приказана је структура молекула и начин обележавања атома у полиморфима I и II.



Слика 42. Структура молекула и начин обележавања атома у полиморфима I и II

У полиморфима I и II сваки јон бакра(II) се налази у квадратно-пирамидалном окружењу које је изграђено од четири атома кисеоника мостних ањона у основној равни и кисеониковог атома из DMSO молекула у аксијалној позицији. Оба комплекса показују слично померање бакар(II)-јона из основне равни према аксијалном кисеонику, за  $0,205(2) \text{ \AA}$  у просеку.

Ова померања праћена су веома сличним интрамолекулским  $\text{Cu}\cdots\text{Cu}$  растојањима која износе 2,6407(4) и 2,6398(9) Å у полиморфима I и II. Одабране дужине и углови веза за две полиморфне форме дати су у табелама 21 и 22.

**Табела 21.** Одабране дужине (Å) и углови веза (°) за полиморф I

Cu1–O1a	1,969(2)	Cu1–O2b <sup>i</sup>	1,977(2)
Cu1–O2a <sup>i</sup>	1,956(2)	Cu1–O3	2,127(2)
Cu1–O1b	1,966(2)	O3–S2	1,508(2)
O1a–Cu1–O2b <sup>i</sup>	88,78(11)	O2a <sup>i</sup> –Cu1–O1b	88,58(11)
O2a <sup>i</sup> –Cu1–O2b <sup>i</sup>	88,59(11)	O1a–Cu1–O1b	91,56(11)
O1a–Cu1–O3	95,03(9)	O1b–Cu1–O3	95,99(9)
O2a <sup>i</sup> –Cu1–O3	96,91(10)	O2b <sup>i</sup> –Cu1–O3	96,01(9)

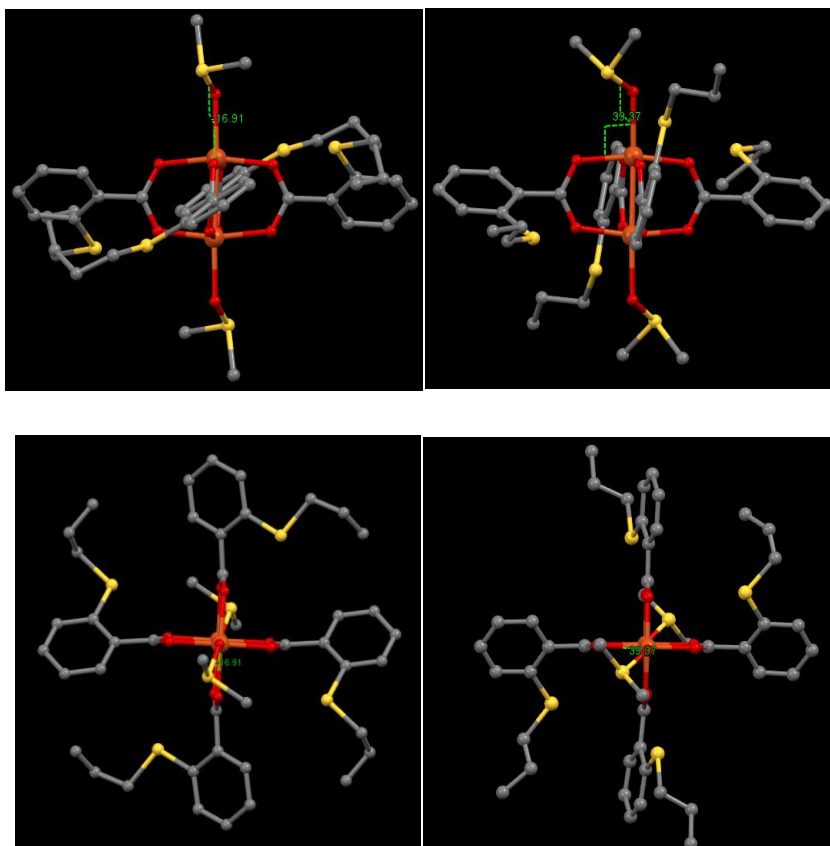
Кодови симетрије: i = 2–x, 2–y, 1–z

**Табела 22.** Одабране дужине (Å) и углови веза (°) за полиморф II

Cu1–O1a	1,981(4)	Cu2–O1b	1,970(3)
Cu1–O2b	1,965(4)	Cu2–O2a	1,970(3)
Cu1–O1c	1,961(4)	Cu2–O1d	1,957(4)
Cu1–O2d	1,982(4)	Cu2–O2c	1,979(4)
Cu1–O3a	2,154(4)	Cu2–O3b	2,155(4)
O3a–S2a	1,494(4)	O3b–S2b	1,492(4)
O1a–Cu1–O1c	88,9(2)	O1b–Cu2–O1d	89,0(2)
O1c–Cu1–O2b	90,4(2)	O1d–Cu2–O2a	89,4(2)
O2b–Cu1–O2d	90,6(2)	O2a–Cu2–O2c	90,1(2)
O1a–Cu1–O2d	87,7(2)	O1b–Cu2–O2c	88,9(2)
O1a–Cu1–O3a	93,7(2)	O1b–Cu2–O3b	94,1(2)
O1c–Cu1–O3a	97,1(2)	O1d–Cu2–O3b	94,4(2)
O2b–Cu1–O3a	97,2(2)	O2a–Cu2–O3b	98,4(2)
O2d–Cu1–O3a	95,6(2)	O2c–Cu2–O3b	97,1(2)

Полиморфи показују малу разлику у дужини Cu–O2 везе са DMSO лигандом која је нешто краћа код полиморфа I (2,127(2) Å) у поређењу са полиморфом II (2,155(4) и 2,154(4) Å). Аксијални лиганд је такође различито постављен у односу на  $\text{Cu}_2\text{O}_4$  „paddle-wheel“ језгра полиморфа I и II.

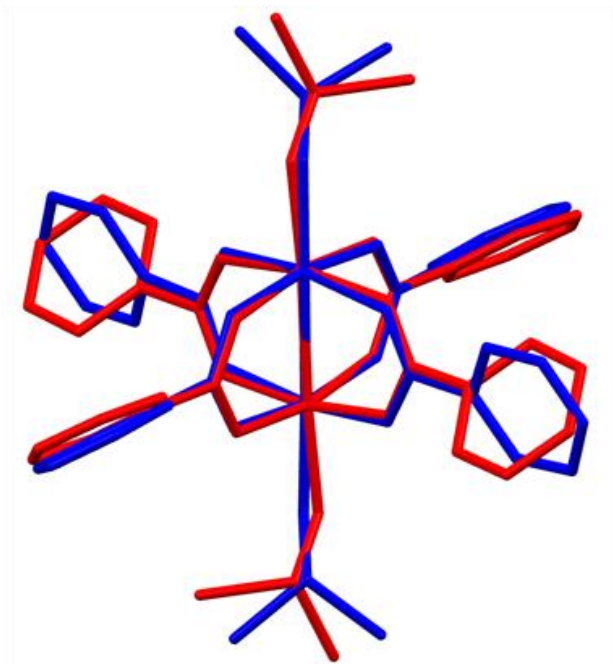
Као што се види из најмањег торзионог угла  $O2-Cu1-O3-S2$  ( $16,9(3)^\circ$  у полиморфу I,  $39,4(3)$  и  $-43,9(3)^\circ$  у полиморфу II), аксијални лиганд у полиморфу I налази се ближе ивици „paddle-wheel“ језгра (тј. екваторијалне  $Cu-O2$  везе), док се у полиморфу II  $O3-S2$  веза у молекулу DMSO налази између две суседне екваторијалне  $Cu-O$  везе (Слика 43). Торзиони угао  $Cu1-O3-S2-C11$  ( $164,5(2)^\circ$  у полиморфу I,  $136,7(4)$  и  $-126,5(4)^\circ$  у полиморфу II) такође указује на различиту ротацију  $S(CH_3)_2$  фрагмента око  $S2-O3$  везе DMSO лиганата.



**Слика 43.** Различите позиције аксијалног DMSO лиганда у полиморфу I (лево) и II (десно) које се виде из вредности  $O2-Cu1-O3-S2$  торзионог угла [ $16,9(3)^\circ$  у полиморфу I, а  $39,4(3)$  и  $-43,9(3)^\circ$  у полиморфу II]

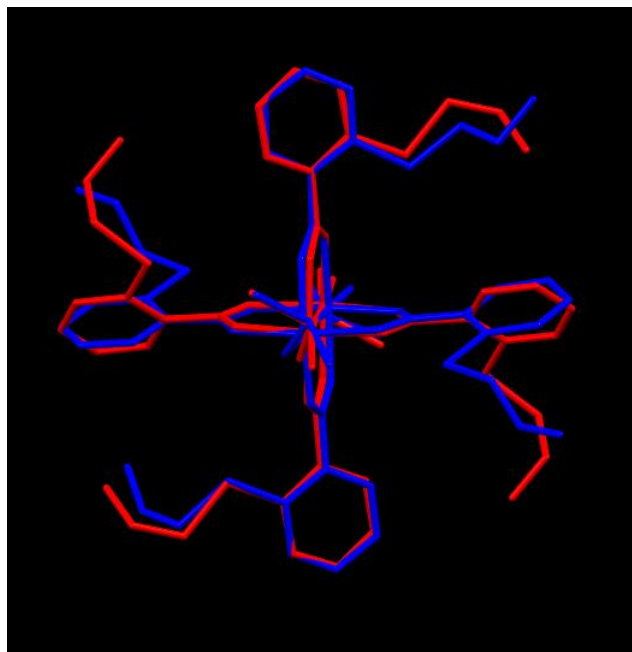
Структурне разлике између полиморфа I и II најбоље се могу видети на сликама 44 и 45. Најочигледнија структурна разлика између два полиморфа комплекса **C4** јесте различита оријентација фенилних прстенова S-пропил деривата тиосалицилне киселине у односу на одговарајуће карбоксилне групе.

Тако, у полиморфу I диедарни углови између равни C2a/C7a и C2b/C7b прстенова и њихових COO<sup>-</sup> остатака износе 46,8(2) и 53,7(2)°, док у полиморфу II одговарајући диедарни углови износе 17,2, 57,2(4), 13,3(3) и 57,1(4)° за четири S-пропил деривата тиосалицилне киселине. Увијање ароматичних прстенова у полиморфу I и II је више изражено него у комплексима бабра(II) који садрже S-метил и S-етил деривате, где су вредности диедарних углова достизале 14,3° у просеку. Ово је очекивано узимајући у обзир веће стерне сметње DMSO молекула и S-пропил остатка, међутим у полиморфу II, два од четири независна прстена (a и c) показују вредности диедарних углова које се могу упоредити са вредностима углова пронађених код раније описаних комплекса [166,167].



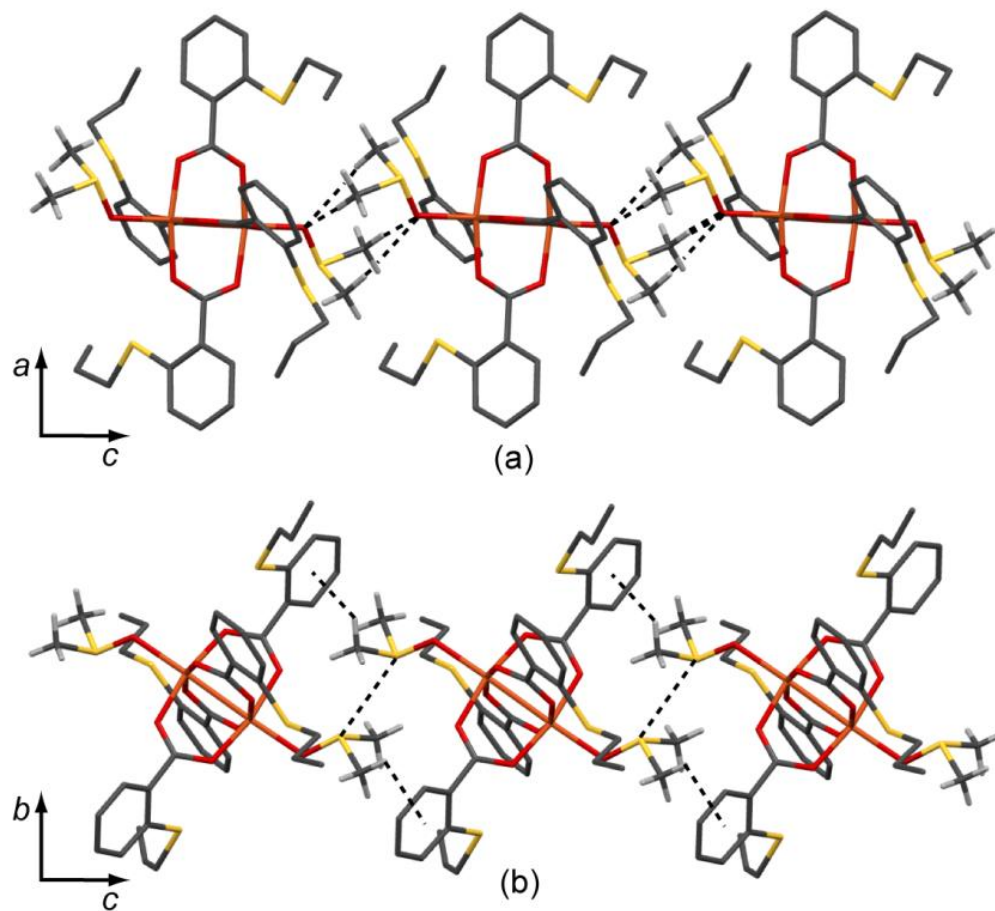
*Слика 44. Преклапање полиморфа I (црвено) и II (плаво). Због јасноће водоникови атоми и S-пропил остаци који су везани за ароматичне прстенове искључени су из приказа*





*Слика 45. Преклапање полиморфа I (црвено) и II (плаво) показује различиту оријентацију фенилних прстенова и везаних S-пропил остатака. Водоникови атоми нису приказани због јасноће приказа*

Кристалне структуре два полиморфа су стабилизоване само slabим интермолекулским интеракцијама. У случају полиморфа I суседни DMSO лиганди се међусобно приближавају да награде вишеструке кратке контакте (Слика 46). Растојање између суседних DMSO сумпових атома у овом ланцу је  $S2 \cdots S2^{ii}$  4,782(1) Å, док интермолекулско  $Cu1 \cdots Cu1^{ii}$  растојање износи 7,588(1) Å. У случају полиморфа II DMSO лиганди суседних молекула се међусобно приближавају преко атома сумпора градећи кратке  $S2a \cdots S2b^i$  контакте од 3,482(2) Å.  $S \cdots S$  растојање између посматраних DMSO јединица у полиморфу II је значајно краће него код сличних контаката примећених код аналогних бакар(II)-комплекса са бензоато лигандом (3,178(2) и 3,975(2) Å) [168]. У ланцима полиморфа II који су формирани од  $S \cdots S$  контакта, интермолекулско  $Cu1 \cdots Cu2^i$  растојање износи 8,448(9) Å што је значајно дуже у поређењу са растојањем код полиморфа I. Кристалне структуре оба полиморфа су такође стабилизоване преко slabих  $C-H \cdots O$  и  $C-H \cdots \pi$  интеракција.



**Слика 46.** Ланци полиморфа I (a) и II (b) који су формирани преко најкраћих контаката укључујући DMSO лиганд

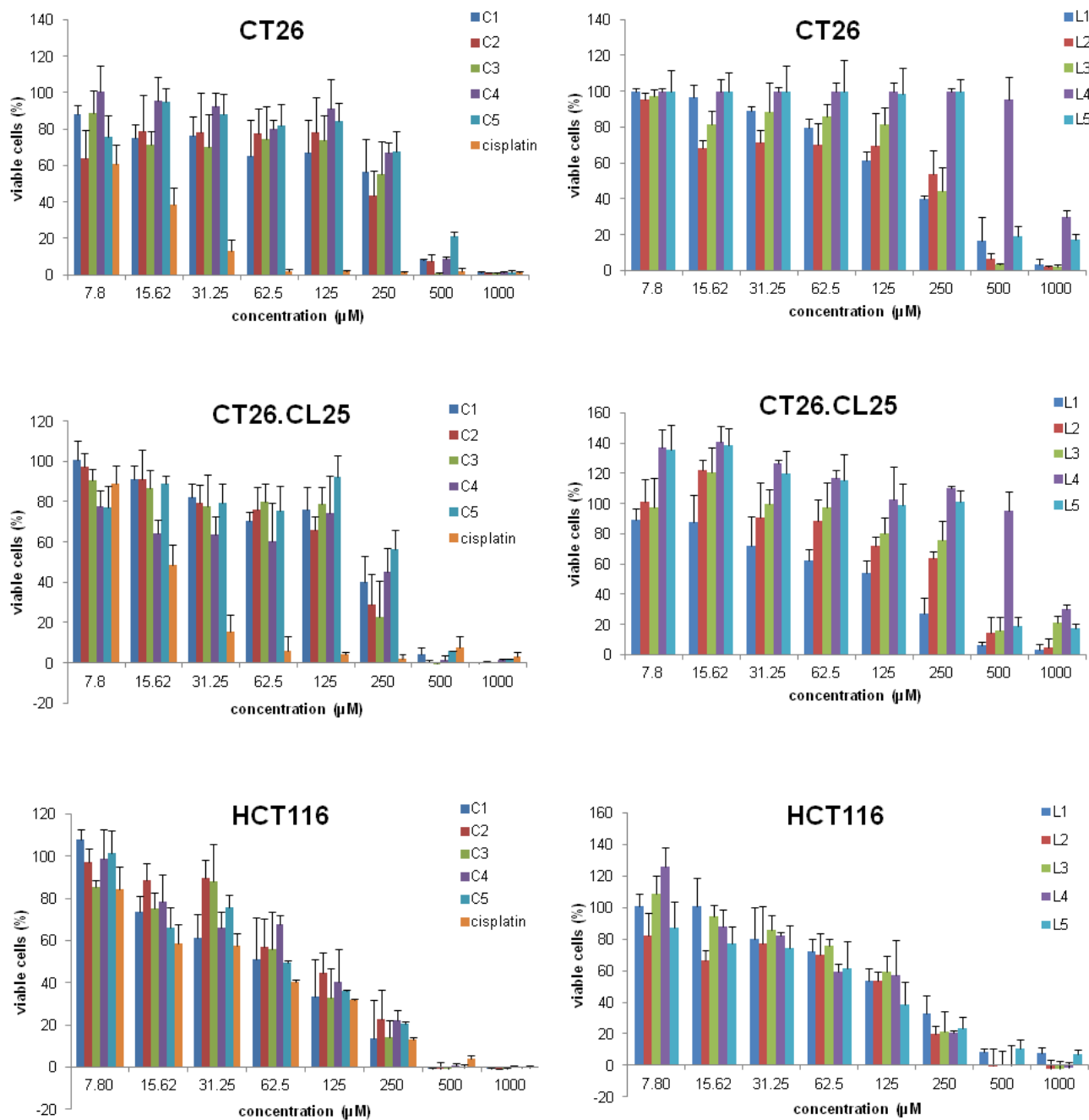
## 4.2. БИОЛОШКА АКТИВНОСТ

### 4.2.1. *In vitro* антитуморска активност бинуклеарних комплекса бакра(II) са S-алкил дериватима тиосалицилне киселине

*In vitro* антитуморска активност S-алкил деривата тиосалицилне киселине и одговарајућих бинуклеарних комплекса бакра(II) је испитивана на мишјим ћелијским линијама карцинома колона СТ26 и СТ26.CL25 и хуманим ћелијама карцинома колона НСТ-116. Резултати показују да S-алкил деривати тиосалицилне киселине и пет одговарајућих синтетисаних бинуклеарних комплекса бакра(II) након 72 сата показују значајну цитотоксичну активност на хуманој ћелијској линији карцинома колона НСТ-116 (Слика 47), док показују значајно слабију антитуморску активност на мишјим ћелијским линијама карцинома колона нарочито у концентрацијама од 31,25 до 250  $\mu\text{M}$ .

Цитотоксични ефекат је дозно-зависан, смањење концентрације испитиваних једињења праћено је приметним повећањем вијабилности туморских ћелија. Цитотоксични ефекат свих испитиваних лиганата и комплекса био је снажнији на НСТ-116 ћелијској линији у поређењу са ефектом на СТ26 и СТ26.CL25 ћелијским линијама.

Комплекси бакра(II) показују сличну, незнатно нижу цитотоксичност на НСТ-116 ћелијској линији у поређењу са цисплатином. Међутим, цитотоксични ефекат синтетисаних комплекса бакра(II) у концентрацијама од 31,25 до 250  $\mu\text{M}$  на СТ26 и СТ26.CL25 ћелијским линијама био је значајно мањи него ефекат референтне цисплатине. Скоро да није било разлике у цитотоксичности лиганата и комплекса на мишјим ћелијским линијама карцинома колона СТ26 и СТ26.CL25. Међу испитиваним лигандима, S-алкил деривати са краћим бочним ланцом (**L1**, **L2** и **L3**) показују јачи цитотоксични ефекат на СТ26 и СТ26.CL25 ћелијске линије (Слика 47) у поређењу са лигандима са дужим бочним ланцом (**L4** и **L5**). Лиганди **L4** и **L5** показују значајан цитотоксични ефекат само при већим концентрацијама (од 500  $\mu\text{M}$  и 1000  $\mu\text{M}$ ). Таква разлика није примећена на НСТ-116 ћелијској линији. Међутим није примећена упадљива разлика у цитотоксичном ефекту пет синтетисаних комплекса бакра(II) на све три туморске ћелијске линије (Слика 47).



**Слика 47.** Графици ћелијског преживљавања CT26, CT26.CL25, и HCT-116 након 72 часа ћелијског раста у присуству лиганата и одговарајућих бакар(II)- комплекса

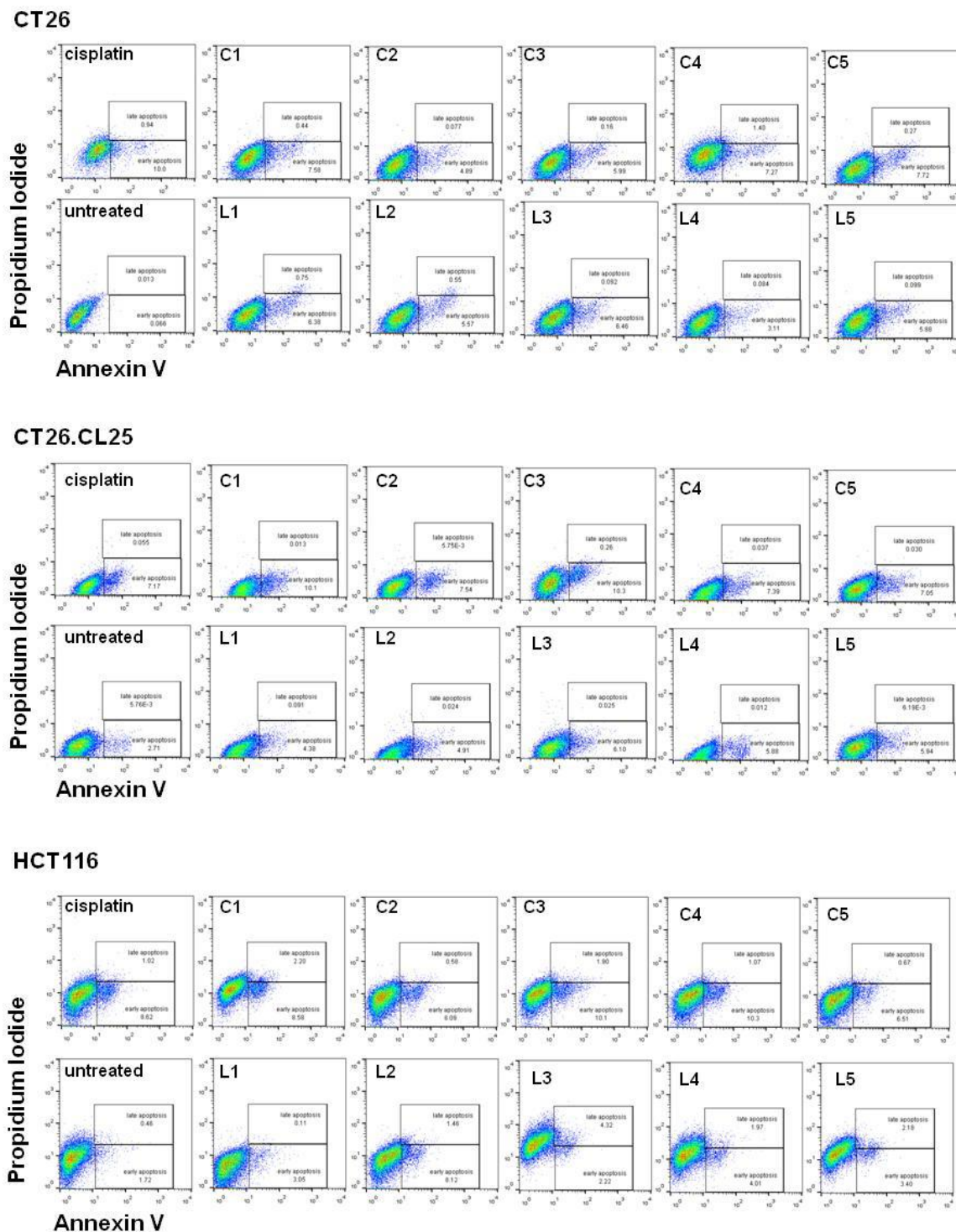
Сви испитивани комплекси показали су слабији цитотоксични ефекат након њиховог излагања туморским ћелијама у поређењу са цисплатином (Табела 23).

Анализа  $IC_{50}$  вредности показује да бакар(II)-комплекси имају значајно снажнији антипролиферативни ефекат на НСТ-116 ћелијама у поређењу са ефектом на СТ26 и СТ26.CL25 ћелијама (Табела 23). Комплекси **C1**, **C2** и **C3** показују слабији цитотоксични ефекат на СТ26 и СТ26.CL25 ћелијама у поређењу са ефектом који остварују комплекси **C4** и **C5** (Табела 23). Међутим, већа разлика у цитотоксичности између лиганата и одговарајућих комплекса примећена је за комплексе са дужим бочним ланцима **C4** и **C5**. Бакар(II)-комплекси **C1** и **C5** показују скоро исту цитотоксичност на НСТ-116 ћелијама ( $IC_{50} = 60,17 \mu\text{M}$  у поређењу са  $59,32 \mu\text{M}$ ). Остала три комплекса имају нешто нижу цитотоксичну активност на НСТ-116 ћелијама, са најмањим ефектом комплекса **C4** ( $IC_{50} = 91,51 \mu\text{M}$ ) (Табела 23). Анализа *Flow* цитометрије коришћена је да се одреди потенцијал за индукцију апоптозе испитиваних комплекса бакра(II). Процент ћелија СТ26, СТ26.CL25 и НСТ-116 које су подлегле апоптози након излагања синтетисаним бакар(II)-комплексима одређен је *Flow* цитометријском детекцијом Анексин V и пропидијум-јодид позитивних ћелија. Добијени резултати указују да су испитивани комплекси након 24 сата индуковали апоптотску смрт СТ26, СТ26.CL25 и НСТ-116 ћелија у вишем проценту у односу на одговарајуће лиганде (Слика 48).

**Табела 23.**  $IC_{50}$  вредности ( $\mu\text{M}$ ) испитиваних лиганата и одговарајућих бакар(II)-комплекса на СТ26, СТ26.CL25 и НСТ-116 ћелијским линијама након 72 сата ћелијског раста.  $IC_{50}$  вредности добијене су коришћењем МТТ теста

Једињење	СТ26	СТ26.CL25	НСТ-116
<b>C1</b>	295,65 ± 36,64	307,21 ± 44,87	60,17 ± 11,01
<b>C2</b>	279,16 ± 71,11	280,23 ± 79,81	67,21 ± 10,62
<b>C3</b>	291,92 ± 61,24	286,29 ± 52,19	75,34 ± 16,53
<b>C4</b>	407,58 ± 38,47	375,55 ± 25,31	91,59 ± 15,21
<b>C5</b>	402,29 ± 41,33	360,19 ± 18,08	59,32 ± 9,83
<b>L1</b>	374,46 ± 26,75	328,79 ± 13,74	137,01 ± 13,74
<b>L2</b>	331,84 ± 64,46	427,17 ± 32,27	143,14 ± 17,14
<b>L3</b>	349,14 ± 51,19	513,27 ± 79,50	171,24 ± 14,23
<b>L4</b>	848,83 ± 63,05	859,56 ± 67,93	130,89 ± 19,13
<b>L5</b>	585,70 ± 38,58	584,53 ± 40,47	82,65 ± 11,07
Цисплатина	9,45 ± 3,06	21,21 ± 8,19	25,41 ± 7,14

средње вредности ± стандардне девијације четири спроведена експеримента



Слика 48. Репрезентативни резултати теста апоптозе CT26, CT26.CL25 и HCT-116 ћелија третираних 15  $\mu$ M цисплатином, синтетисаним бакар(II)-комплексима и S-алкил дериватима тиосалицилне киселине током 24 сата

Примећен је углавном сличан цитотоксични ефекат свих тестираних комплекса и цисплатине при концентрацији од 15  $\mu\text{M}$  на све три ћелијске линије. Овај резултат је у корелацији са резултатима цитотоксичног ефекта тестираних комплекса при истој концентрацији од 15  $\mu\text{M}$  који су добијени МТТ тестом након 72 сата.

#### 4.2.2. *In vitro* антимикуробна активност бинуклеарних комплекса бакра(II) са S-алкил дериватима тиосалицилне киселине

*In vitro* испитивање антимикуробне активности спроведено је на 23 врсте микроорганизама (13 врста патогених бактерија, 3 врсте пробиотских бактерија и 7 врста гљива). Резултати испитивања антимикуробне активности за пет синтетисаних комплекса бакра(II) (C1-C5) приказани су у табелама 24 и 25. Због поређења у истим табелама приказане су и МИК и ММК вредности одговарајућих S-алкил деривата тиосалицилне киселине који су као лиганди коришћени за синтезу испитиваних бакар(II)-комплекса (C1-C5) [14]. Такође у табелама су приказане и вредности МИК и ММК за доксициклин и флуконазол као позитивних контрола. За извођење експеримената као растварач коришћен је 10% диметилсулфоксид за који је најпре утврђено да не успорава раст испитиваних микроорганизама.

Интензитет антимикуробне активности варира у зависности од врсте микроорганизама и типа испитиваног једињења. МИК и ММК вредности за испитиване комплексе биле су у опсегу од 31,3 до  $> 1000 \mu\text{g/mL}$ . Активност испитиваних комплексних једињења била је знатно виша или слична у односу на одговарајуће лиганде. Изузеци су филаментозне гљиве, нарочито *A. flavus*, према којој су лиганди показали снажнију активност. Доксициклин је показао снажнију активност у поређењу са испитиваним једињењима. Изузетак је бактерија *P. aeruginosa* према којој су испитивани комплекси показали сличну или јачу активност у поређењу са позитивном контролом.

Генерално посматрано комплекси бакра(II) показују слабу антигљивичну активност, па тако испитивана једињења нису битно утицала на раст квасаца. МИК и ММК вредности за квасце кретале су се од 500 до  $> 1000 \mu\text{g/mL}$ , осим комплекса C2 и C3 према *Rhodotorula sp* где је МИК вредност износила 250  $\mu\text{g/mL}$ .

Сва испитивана једињења показала су умерену или селективну антибактеријску активност. *L. plantarum* показује нешто већу стопу резистенције на испитивана једињења. Грам-позитивне бактерије *B. subtilis* и *S. aureus* АТСС 25923, као и пробиотици *B. animalis subsp. lactis* и *B. subtilis* IP 5832 биле су нешто осетљивије него остале Грам-позитивне и Грам-негативне бактерије. Највећу осетљивост показале су бактерије *B. animalis subsp. lactis* са МИК вредношћу од 31,3  $\mu\text{g/mL}$  за комплексе **C2** и **C4** и *S. aureus* АТСС 25923 са МИК вредношћу од 31,3  $\mu\text{g/mL}$  за комплекс **C3**. МИК вредности за Грам-негативне бактерије биле су у опсегу од 62,5 до  $> 1000 \mu\text{g/mL}$ . *P. mirabilis* АТСС 12453 са МИК вредношћу од 62,5  $\mu\text{g/mL}$  за комплекс **C3** показао је највећу осетљивост. Испитивани комплекс **C2** показао је такође нешто снажнију антибактеријску активност према *E. coli* АТСС 25922 и *S. enterica* са МИК вредношћу од 250  $\mu\text{g/mL}$ .

**Табела 24.** Резултати антибактеријске и антигљивичне активности бидентатних лиганада *S*-алкил деривата тиосалицилне киселине (**L1-L3**) и одговарајућих бинуклеарних бакар(II)-комплекса (**C1-C3**)

Тестирана врста	(L1)		(C1)		(L2)		(C2)		(L3)		(C3)	
	МИК	ММК	МИК	ММК	МИК	ММК	МИК	ММК	МИК	ММК	МИК	ММК
<i>L. plantarum</i>	500	1000	250	1000	500	500	500	1000	500	>1000	500	>1000
<i>B. anim. subsp. lactis</i>	500	500	125	250	500	500	31,3	125	1000	1000	62,5	250
<i>B. subtilis</i> IP 5832	500	500	250	1000	500	500	500	1000	1000	>1000	500	1000
<i>B. subtilis</i>	500	500	62,5	500	125	500	250	500	1000	>1000	125	500
<i>B. subtilis</i> АТСС 6633	500	500	1000	>1000	1000	1000	1000	1000	>1000	>1000	1000	>1000
<i>E. faecalis</i>	1000	>1000	1000	1000	1000	>1000	1000	1000	>1000	>1000	1000	1000
<i>E. coli</i>	>1000	>1000	1000	1000	1000	>1000	250	500	1000	>1000	500	500
<i>E. coli</i> АТСС 25922	1000	>1000	500	1000	1000	>1000	250	250	>1000	>1000	250	500
<i>P. mirabilis</i>	1000	>1000	1000	>1000	1000	>1000	1000	1000	1000	>1000	1000	1000
<i>S. enterica</i>	1000	>1000	1000	1000	1000	>1000	250	500	1000	>1000	500	1000
<i>S. typhimurium</i>	1000	>1000	1000	1000	1000	>1000	500	1000	1000	1000	500	1000
<i>C. albicans</i>	>1000	>1000	>1000	>1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000	>1000
<i>C. albicans</i> АТСС 10231	нт	нт	>1000	>1000	нт	нт	1000	1000	нт	нт	1000	1000
<i>Rhodotorula sp.</i>	>1000	>1000	>1000	>1000	500	500	250	1000	500	1000	250	1000
<i>S. boulardii</i>	1000	>1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000
<i>A. flavus</i>	31,3	250	>1000	>1000	1000	1000	1000	>1000	125	125	250	>1000
<i>A. niger</i> АТСС 16404	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	1000	1000	>1000	>1000	>1000
<i>B. cynerea</i>	нт	нт	500	500	500	нт	нт	500	нт	нт	1000	1000
<i>S. aureus</i>	250	500	125	1000	500	>1000	250	500	1000	>1000	250	1000
<i>S. aureus</i> АТСС 25923	500	1000	62,5	500	1000	1000	62,5	500	1000	1000	31,3	125
<i>P. mirabilis</i> АТСС 12453	нт	нт	250	250	нт	нт	125	125	нт	нт	62,5	125
<i>P. aeruginosa</i>	1000	>1000	250	1000	500	>1000	125	1000	1000	>1000	125	1000
<i>P. aeruginosa</i> АТСС 27853	500	>1000	1000	1000	500	>1000	500	1000	500	>1000	500	1000

МИК-минимална инхибиторна концентрација ( $\mu\text{g/mL}$ ); ММК- минимална микробицидна концентрација ( $\mu\text{g/mL}$ ); нт-није тестирано.



**Табела 25.** Резултати антибактеријске и антигљивичне активности бидентатних лиганада S-алкил деривата тиосалицилне киселине (L4-L5) и одговарајућих бинуклеарних бакар(II)-комплекса (C4-C5) као и позитивних контрола

Тестирана врста	(L4)		(C4)		(L5)		(C5)		ДОКСИЦИЛИН /ФЛУКОНАЗОЛ	
	МИК	ММК	МИК	ММК	МИК	ММК	МИК	ММК	МИК	ММК
<i>L. plantarum</i>	250	>1000	500	>1000	1000	>1000	1000	>1000	0,5	7,8
<i>B. anim. subsp. lactis</i>	500	1000	31,3	250	1000	1000	250	500	31,3	62,5
<i>B. subtilis</i> IP 5832	500	500	500	1000	1000	>1000	500	1000	2	15,6
<i>B. subtilis</i>	500	1000	250	500	1000	>1000	500	>1000	0,1	2
<i>B. subtilis</i> ATCC 6633	1000	>1000	1000	1000	1000	>1000	>1000	>1000	2	31,3
<i>E. faecalis</i>	1000	>1000	1000	1000	>1000	>1000	>1000	>1000	7,8	62,5
<i>E. coli</i>	1000	>1000	250	500	>1000	>1000	1000	>1000	7,8	15,6
<i>E. coli</i> ATCC 25922	1000	>1000	500	500	>1000	>1000	1000	1000	15,6	31,3
<i>P. mirabilis</i>	1000	>1000	1000	1000	>1000	>1000	1000	>1000	250	>250
<i>S. enterica</i>	1000	>1000	500	1000	>1000	>1000	500	1000	15,6	31,3
<i>S. typhimurium</i>	1000	>1000	500	1000	>1000	>1000	1000	1000	15,6	125
<i>C. albicans</i>	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000	62,5	1000
<i>C. albicans</i> ATCC 10231	нт	нт	1000	1000	нт	нт	1000	1000	31,3	1000
<i>Rhodotorula sp.</i>	1000	1000	500	1000	500	1000	500	1000	62,5	1000
<i>S. boulardii</i>	1000	1000	500	1000	500	1000	500	500	31,3	1000
<i>A. flavus</i>	125	500	1000	>1000	125	1000	500	1000	1000	1000
<i>A. niger</i> ATCC 16404	500	1000	1000	1000	1000	1000	>1000	>1000	62,5	62,5
<i>B. cynerea</i>	нт	нт	1000	1000	нт	нт	250	250	31,3	500
<i>S. aureus</i>	250	1000	250	1000	1000	>1000	1000	>1000	0,45	7,81
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	500	1000	250	500	>1000	>1000	250	1000	0,22	3,75
<i>P. mirabilis</i> ATCC 12453	нт	нт	125	125	нт	нт	250	500	15,63	62,5
<i>P. aeruginosa</i>	500	>1000	125	1000	1000	>1000	250	>1000	250	1000
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	500	>1000	500	1000	500	>1000	1000	>1000	62,5	125

МИК-минимална инхибиторна концентрација ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ ); ММК- минимална микробицидна концентрација ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), нт-није тестирано.

Позитивне контроле доксицилин и флуконазол.

#### 4.2.3. *In vitro* антибиофилм активност бинуклеарних комплекса бакар(II) са S-алкил дериватима тиосалицилне киселине

*In vitro* антибиофилм активност бакар(II)-комплекса испитивана је на 5 врста бактерија (Табела 9). БИЦ вредности су биле у опсегу од 125 до >1000  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , у зависности од бактеријске врсте и испитиване супстанце. Биофилм Грам-позитивних бактерија показао је већу осетљивост у односу на биофилм Грам-негативних бактерија. Најосетљивији бактеријски биофилм био је *S. aureus* са БИЦ вредностима од 125  $\mu\text{g}/\text{mL}$  за C5 и 250  $\mu\text{g}/\text{mL}$  за C3.

Поредећи добијене резултате са резултатима позитивне контроле, који су приказани у табели 26, може се закључити да испитивана једињења показују ниску антибиофилм активност. Изузеци су примећени код бактерија *S. aureus* и *P. aeruginosa*. **C5** комплекс је показао већу активност, док је комплекс **C3** показао исту активност као и антибиотик доксициклин према врсти *S. aureus* (БИЦ за **C5** била је 125 µg/mL, док је БИЦ за **C3** и доксициклин била 250 µg/mL). Према врсти *P. aeruginosa* сви бакар(II)-комплекси показали су снажнију антибиофилм активност у односу на позитивну контролу.

**Табела 26.** Антибиофилм активност комплекса **C1-C5** и позитивне контроле

Врста микроорганизма	<b>C1</b>	<b>C2</b>	<b>C3</b>	<b>C4</b>	<b>C5</b>	Позитивна контрола <sup>1</sup>
	БИЦ*	БИЦ	БИЦ	БИЦ	БИЦ	БИЦ
<i>S. aureus</i>	1000	1000	250	500	125	250
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	1000	1000	500	1000	1000	250
<i>P. mirabilis</i> ATCC 12453	1000	1000	>1000	1000	1000	<15,63
<i>P. aeruginosa</i>	1000	500	1000	1000	1000	2000
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27855	нт	1000	1000	>1000	нт	<15,63

\*БИЦ – биофилм инхибиторна концентрација (µg/mL),

<sup>1</sup> Позитивна контрола – вредности представљају најнижу концентрацију антибиотика (доксициклина) на којој није било везивања бактеријских ћелија у биофилм

#### 4.2.4. *In vitro* антиоксидативна активност бинуклеарних комплекса бабра(II) са S-алкил дериватима тиосалицилне киселине

##### 4.2.4.1. Капацитет неутралисања DPPH радикала

DPPH је стабилан слободни радикал који се често користи за детекцију капацитета неутралисања радикала у хемијској анализи. Резултати капацитета неутралисања DPPH радикала изражене као  $EC_{50}$  вредности показују умерену активност испитиваних комплекса (Табела 27).

*Табела 27. Капацитет неутралисања радикала бабра(II)-комплекса (C2-C5) и позитивне контроле (аскорбинске киселине) изражене као  $EC_{50}$  вредности*

Комплекси	$EC_{50}$ ( $\mu\text{g/mL}$ ) <sup>1</sup>
C2	730,61 $\pm$ 26,47
C3	248,39 $\pm$ 2,49
C4	361,79 $\pm$ 0,93
C5	288,93 $\pm$ 1,52
Аскорбинска киселина <sup>2</sup>	5,25

<sup>1</sup> Свака вредност приказана је као средња вредност  $\pm$  стандардна девијација.

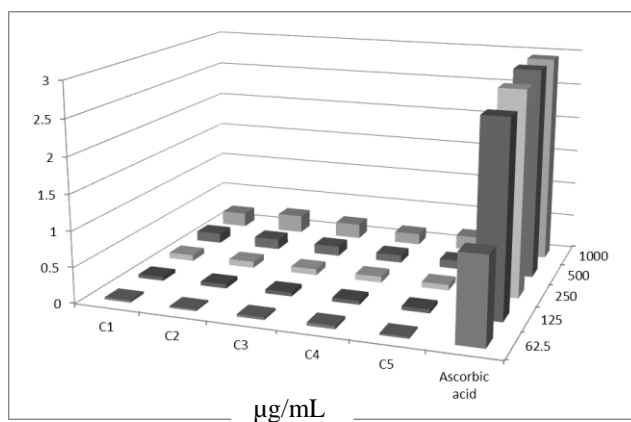
<sup>2</sup> Позитивна контрола

Комплекси **C3** и **C5** показали су изражену активност са  $EC_{50}$  вредностима од 248,39  $\mu\text{g/mL}$  и 288,93  $\mu\text{g/mL}$ . Активност комплекса **C1** није измерена.  $EC_{50}$  вредност за позитивну контролу износила је 5,25  $\mu\text{g/mL}$ .

##### 4.2.4.2. Редукциона моћ

Редукциона моћ комплекса повезана је са њиховом електрон-донорском способношћу и може послужити као значајан индикатор потенцијалне антиоксидативне активности. У овом тесту антиоксиданти (редуктанти) у узорку реагују са калијум-ферицијанидом ( $\text{Fe}^{3+}$ ) градећи калијум-фероцијанид ( $\text{Fe}^{2+}$ ), који потом реагује са фери-хлоридом градећи фери-феро комплекс који има апсорпциони максимум на 700 nm. Резултати са слике 49 указују на слабу антиоксидативну активност бабра(II)-комплекса.

Интензитет антиоксидативне активности испитиваних комплекса варирао је у зависности од типа и концентрације испитиване супстанце. На основу добијених резултата може се закључити да је највишу антиоксидативну активност показао комплекс **C2** у концентрацији од 1000  $\mu\text{g/mL}$ . Антиоксидативна активност свих испитиваних комплекса је дозно-зависна. Комплекс **C1** који није показао антиоксидативну активност коришћењем DPPH методе показао је одређени антиоксидативни потенцијал коришћењем ове методе.



**Слика 49.** Редуциона моћ бакар(II)-комплекса (C1-C5) и позитивне контроле (аскорбинска киселина)

Укупно посматрано у поређењу са стандардима, може се закључити да су бакар(II)-комплекси показали слабу антиоксидативну активност или чак неактивност, независно од коришћене методе. Антиоксидативна активност бакар(II)-комплекса (C1-C5) са S-алкил дериватима тиосалицилне киселине нису до сада испитивани, па су резултати њихове антиоксидативне активности приказани први пут.

## **5. ДИСКУСИЈА**

Дуги низ година медицинска хемија била је искључиво заснована на испитивању органских једињења и природних производа. Иако је важност јона метала препозната одавно, истраживачи су испитивању неорганских једињења посвећивали веома мало пажње [27]. Интересовање истраживача за комплексна једињења бакра потиче од њихове потенцијалне антимикуробне, антивирусне, антиинфламаторне и антитуморске активности, као и способности да се понашају као инхибитори одређених ензима [22]. Пошто бакар спада у групу биоесенцијалних метала очекује се да ће бити знатно мање токсичан за организам у поређењу са платинским металима. Координовањем јона бакра за молекуле лиганда формира се тродимензионална структура молекула чиме се омогућава интеракција са специфичним биомолекулима који играју улогу биолошких мета. Избор лиганда и донорских атома је од кључне важности у синтези биолошки активних комплекса, имајући у виду да се њиховом променом и заменом може битно утицати на повећање липофилности комплекса што доприноси бољем пролажењу кроз двослојну липидну мембрану ћелије [27].

У овој Докторској дисертацији описане су синтезе S-алкил деривата тиосалицилне киселине (алкил = бензил-(L1), метил-(L2), етил-(L3), пропил-(L4) и бутил-(L5)) и одговарајућих бинуклеарних комплекса бакра(II) (C1-C5). Састав награђених једињења потврђен је на основу резултата елементалне микроанализе. Експериментални подаци израчунати за угљеник, водоник и сумпор у сагласности су са теоријски израчунатим вредностима што се може видети у одговарајућим табелама у оквиру поглавља резултати. На основу резултата инфрацрвене спектроскопије и магнетних мерења претпостављена је структура награђених једињења. Инфрацрвени спектри синтетисаних једињења снимани су у циљу утврђивања начина координовања S-алкил деривата тиосалицилне киселине за бакар(II)-јон при чему смо на основу претходних резултата очекивали исти начин координовања наведених деривата тиосалицилне киселине као за паладијум(II)-јон. На основу апсорпционих трака утврђено је да ли је карбоксилна група координована или некоординована. Иако су на спектрима синтетисаних комплекса примећене асиметричне и симетричне валенционе вибрације карбоксилних група координованих S-алкил деривата тиосалицилне киселине у очекиваним областима, начин координовања лиганда не може се утврдити са сигурношћу.

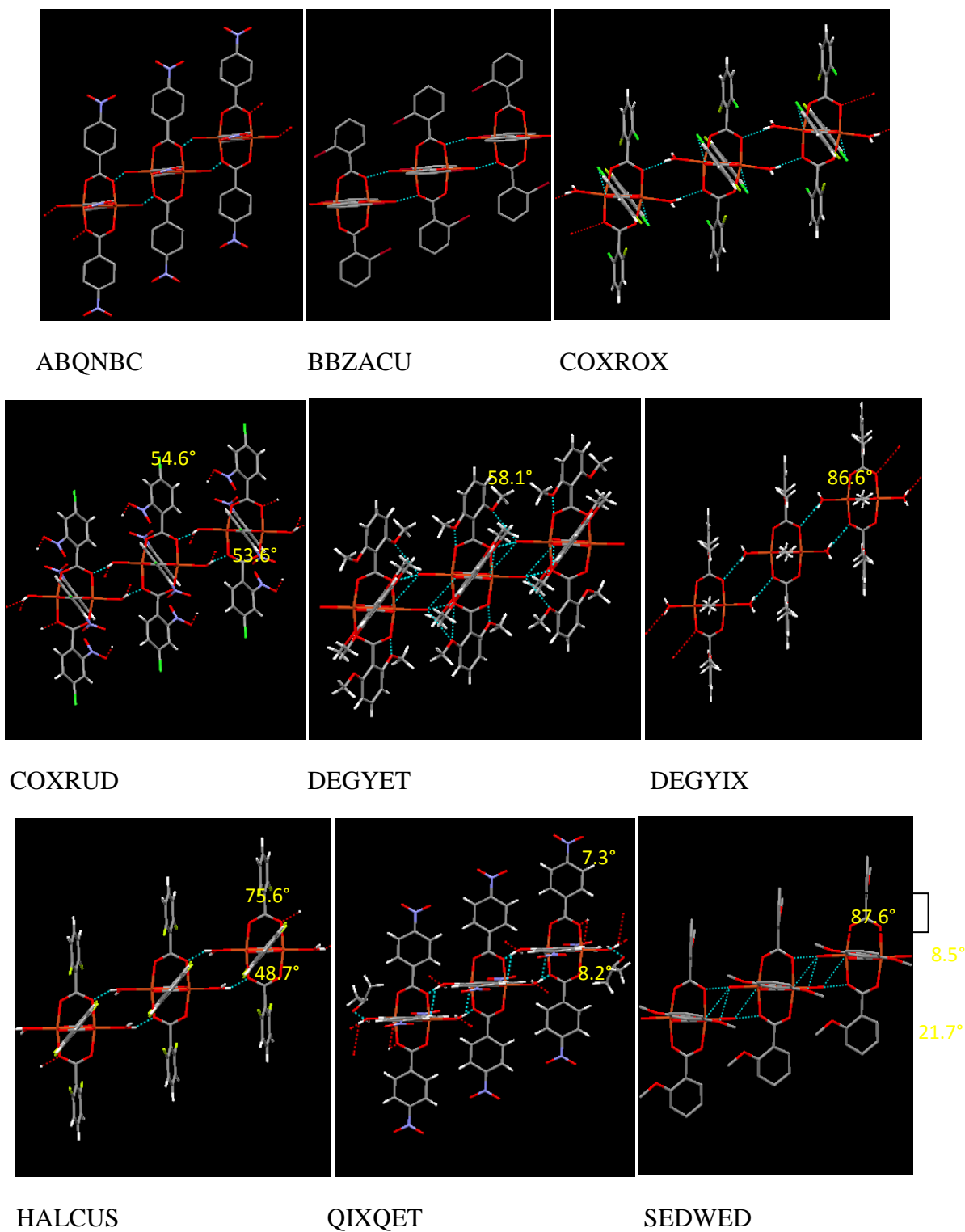
Ниске вредности параметра  $\mu_{\text{eff}}$  указују на антиферомагнетичну интеракцију између два јона метала која је типична за бинуклеарне комплексе бакар(II) типа. На основу раније објављених резултата може се закључити је главни фактор који одређује магнитуду антиферомагнетичне интеракције у димерним комплексима бакра(II) са карбоксилатним лигандима електронска структура мостног  $\text{COO}^-$  остатка.

Стварна структура синтетисаних комплекса бакра(II) потврђена је на основу резултата рендгенске структурне анализе комплекса  $[\text{Cu}_2(\text{S-met-thiosal})_4(\text{H}_2\text{O})_2]$  (**C2**),  $[\text{Cu}_2(\text{S-et-thiosal})_4(\text{H}_2\text{O})_2]$  (**C3**) и  $[\text{Cu}_2(\text{S-pr-thiosal})_4(\text{DMSO})_2]$  (**C4**).

Кристална структура  $[\text{Cu}_2(\text{S-met-thiosal})_4(\text{H}_2\text{O})_2]$  (**C2**) комплекса састоји се од два кристалографски независна бинуклеарна молекула А и Б. У оба молекула атоми бакра(II) премошћени су са четири лиганда S-метил деривата тиосалицилне киселине формирајући притом „paddle-wheel“ тип структуре.

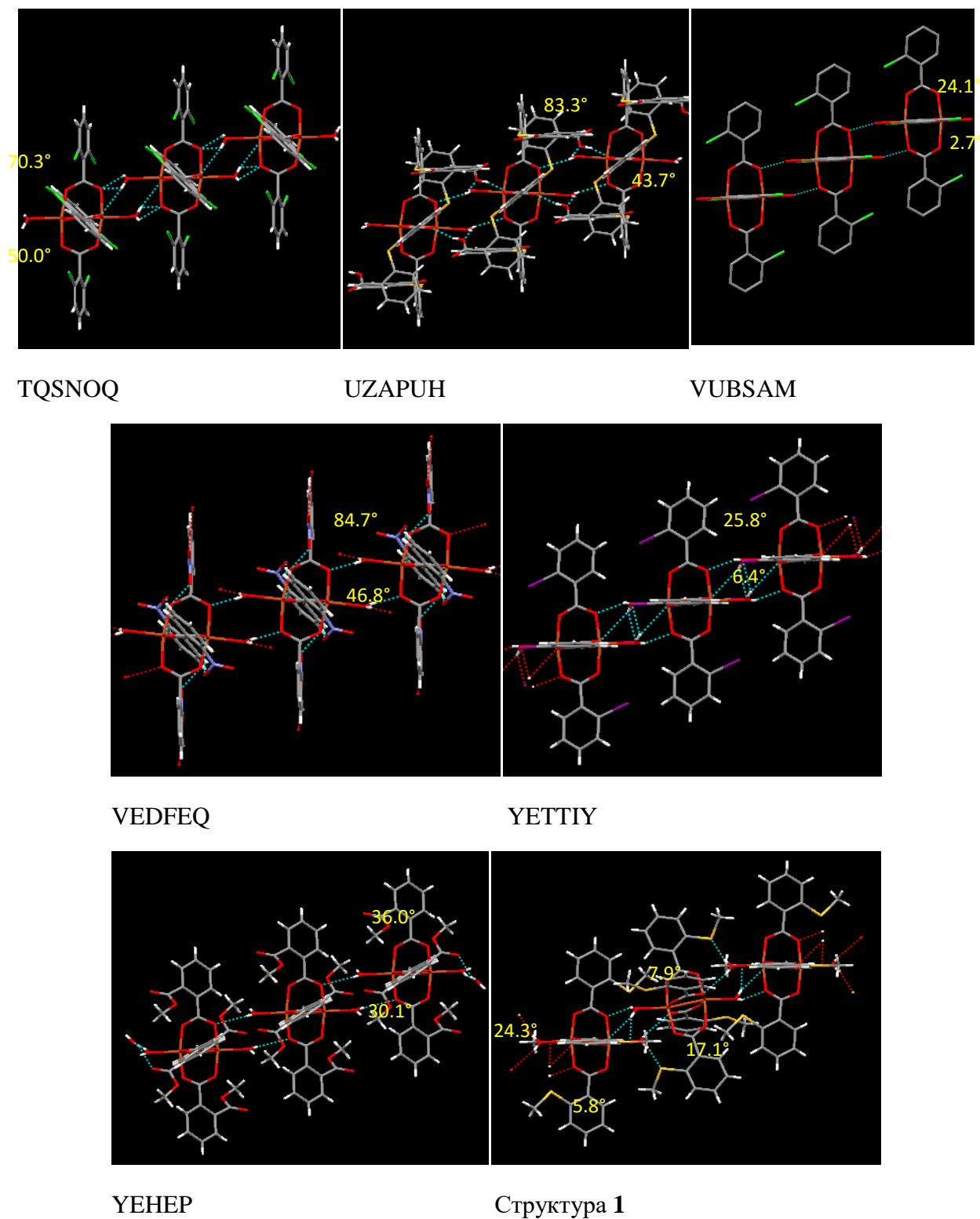
У циљу проналажења потенцијалних узрока деформације „paddle-wheel“ структуре у комплексу **C2**, анализирани су сличне кристалне структуре пронађене у *Cambridge Structural Databank* (CSD) бази података [165]. CSD претрагом бакар(II) „paddle-wheel“ комплекса која је обухватила ароматичне карбоксилате ( $\text{ArCOO}$ ) и лиганде воде,  $[\text{Cu}_2(\text{ArCOO})_4(\text{H}_2\text{O})_2]$  пронађено је 26 примера. Геометријске особине комплекса **C2** су у доброј сагласности са особинама комплекса бакра(II) који су добијени из CSD базе.

Анализом је могуће приметити неколико заједничких карактеристика у кристалним структурама  $[\text{Cu}_2(\text{ArCOO})_4(\text{H}_2\text{O})_2]$  комплекса. Као и у комплексу **C2** супституисани фенилни прстенови различитих молекула лиганата са карбоксилном групом у 26 кристалних структура показују слободну ротацију у односу на  $\text{COO}^-$  остатке што за последицу има широк спектар одговарајућих диедарних углова. У складу са претходно објављеним резултатима [169], ротација фенилних прстенова се повећава у случају структура са *o*-супституисаним ароматичним лигандима у поређењу са структурама које садрже *m*- и *p*- супституисане лиганде (Слика 50а и 50б). То се пре свега огледа у видљивим разликама два  $\text{Cu-O-C}$  угла формираних од стране мостних молекула лиганата са карбоксилном групом. Од 26 сличних  $[\text{Cu}_2(\text{ArCOO})_4(\text{H}_2\text{O})_2]$  „paddle-wheel“ комплекса, 15 комплекса показују сличну структурну карактеристику ланца који је примећен и код комплекса **C2**.



Слика 50а. Структурне карактеристике неких  $[Cu_2(ArCOO)_4(H_2O)_2]$  комплекса добијених из CSD базе





Слика 50б. Структурне карактеристике неких  $[Cu_2(ArCOO)_4(H_2O)_2]$  комплекса добијених из CSD базе

Аксијални лиганди молекула воде налазе се у суседству атома кисеоника карбоксилних група, и граде најмање један пар О-Н $\cdots$ О водоничних веза које формирају ланац молекула. Овај начин паковања може се наћи чак и у структурама које садрже раствараче или додатне акцепторе на фенил супституентима. У супротности са осталим примерима, ланац који се формира у комплексу **C2** укључује два типа симетрично независних молекула.

Резултати рендгенске структурне анализе комплекса  $[\text{Cu}_2(\text{S-et-thiosal})_4(\text{H}_2\text{O})_2]$  (**C3**) показују да комплекс кристалише у триклиничној *P*-1 просторној групи. Кристална структура је изграђена од бинуклеарних молекула комплекса где су два бакар(II)-атома премошћена са четири S-етил деривата тиосалицилне киселине формирајући при том „paddle-wheel“ тип структуре. Геометријске особине комплекса **C3** могу се упоредити са геометријским особинама комплекса бакра(II) са S-метил дериватом тиосалицилне киселине **C2** [166]. Cu-O координационе дужине веза су у опсегу дужина везе које су примећене током анализе комплекса **C2**. Слично кристалној структури комплекса **C2** сваки од деривата тиосалицилне киселине показује несиметричну координацију за бакар(II)-јон. Тако, у структури **C3** код два лиганда Cu-O1 веза је дужа него Cu-O2 веза за 0,028 Å, док се у структури **C2** аналогне координационе везе у два независна молекула разликују за 0,011 и 0,025 Å. Атом кисеоника из молекула воде у структури **C3** налази се на краћем растојању од бакар(II)-јона (2,135(1) Å) у поређењу са дужином везе у структури **C2** (2,146 Å).

Због слободне ротације око простих C1-C2 веза у оба лиганда (1,502(2) и 1,502(3) Å у молекулу А и Б) диедарни углови између равни фенилног прстена C2/C7 и карбоксилне групе износе 16,0(2) и 16,6(2)° у молекулима А и Б.

У структури комплекса **C2** са два независна молекула, варијација у вредностима диедарних углова је више изражена и креће се од 5,8(2) до 24,3(2)°. Треба напоменути да су S-етил остаци у оба лиганда комплекса **C3** готово копланарни са фенилним прстеновима са максималном девијацијом терминалних C9 атома која износи 0,142(5) и 0,154(6) Å у лигандима А и Б. У кристалном паковању молекули комплекса **C3** су повезани у ланац преко два пара O1w-H $\cdots$ O1 водоничних веза.

Сличан ланац молекула такође је пронађен у структури комплекса **C2** што намеће закључак да је његова појава честа структурна карактеристика „paddle-wheel“ бакар(II)-комплекса који имају молекуле воде као аксијалне лиганде.

Комплекс **C4** је „paddle-wheel“ тип комплекса, који обухвата два јона бакра(II) који су премошћени са четири S-пропил деривата тиосалицилне киселине и додатно координовани са DMSO молекулом. Бинуклеарни комплекс кристалише у орторомбичном систему у две полиморфне форме. Координативне везе са S-пропил дериватом тиосалицилне киселине су у опсегу 1,956(2)-1,982(4) Å што је у сагласности са растојањима пронађеним у већ раније описаним бакар(II) „paddle-wheel“ комплексима који садрже S-метил и S-етил деривате тиосалицилне киселине и молекула воде у аксијалној позицији [166,167].

Са открићем и клиничким успехом цисплатине у лечењу различитих малигних обољења биоесенцијални метали почињу да се интензивно испитују као потенцијални антитуморски лекови. Цисплатина је изузетно ефикасна у лечењу карцинома тестиса са просечном стопом излечења од око 90% [170]. Међутим примена цисплатине је ограничена због појаве озбиљних нежељених дејстава, резистенције на терапију, као и ограничене оралне биоискористљивости лека, па се може примењивати само интравенски што захтева хоспитализацију оболелих [30,171]. Ови недостаци цисплатине стимулисали су бројна истраживања у области координационе хемије како би се развиле различите стратегије у сталној борби против малигних обољења које су базиране на различитим комплексима метала. *Ex vivo* испитивања канцерогених ткива плућа, мозга и простате показале су да су концентрације јона бакра у овим ткивима знатно више него у нормалним ткивима. Тако на пример у серуму пацијената оболелих од рака дојке концентрације јона бакра достижу 1,67 µg/mL што је знатно више у поређењу са здравим контролама 0,98 µg/mL [172]. Молекулски механизам повећања концентрације јона бакра који настаје код малигних болести још увек није довољно разјашњен. Неки аутори указују на централну улогу јона бакра у процесу ангиогенезе, процеса који је неопходан за раст и развој туморских ћелија [173-176].

*In vitro* антитуморска активност комплекса бакра(II) са S-алкил дериватима тиосалицилне киселине као лигандима испитивана је на на мишјим ћелијским линијама карцинома колона СТ26 и СТ26.CL25 и хуманим ћелијама карцинома колона НСТ-116. Цитотоксични ефекат је дозно-зависан, смањење концентрације испитиваних једињења праћено је приметним повећањем вијабилности туморских ћелија. Цитотоксични ефекат свих испитиваних лиганда и комплекса био је снажнији на НСТ-116 ћелијској линији у поређењу са ефектом на СТ26 и СТ26.CL25 ћелијским линијама.

Комплекс **C2** показао је највећу активност према СТ26 и СТ26.CL25 ћелијским линијама, док је комплекс **C5** показао највећу активност према НСТ-116 ћелијској линији. Као што се може видети из табеле 23  $IC_{50}$  вредности комплекса **C2** и **C5** су ипак знатно више на свим тестираним ћелијским линијама у поређењу са стандардом цисплатином. Резултати такође показују да је цитотоксичност комплекса већа у односу на одговарајуће лиганде чиме је показано да је координовање јона бакра молекулима лиганда утицало на повећање антитуморске активности испитиваних једињења. Резултати антитуморске активности испитиваних комплекса бакра(II) могу се упоредити са резултатима антитуморске активности одговарајућих комплекса паладијума(II) са истим лигандима. Посматрајући цитотоксични ефекат према хуманим ћелијама карцинома колона НСТ-116, примећује се да комплекси бакра(II) показују слабију антитуморску активност у поређењу са одговарајућим комплексима паладијума(II), што је донекле и очекивано узимајући у обзир да бакар као биоесенцијални метал показује мању токсичност у односу на паладијум који припада платинској групи метала. Тако комплекси паладијума(II) са S-етил и S-пропил дериватом тиосалицилне киселине показују јачи цитотоксични ефекат према поменутој ћелијској линији чак и у поређењу са референтном цисплатином ( $IC_{50}$  вредности за наведене комплексе износе 2,24 и 9,65  $\mu\text{M}$  у поређењу са цисплатином чија  $IC_{50}$  вредност износи 25,4  $\mu\text{M}$ ). Међутим, комплекси бакра(II) са волуминозним лигандима, S-бензил и S-бутил дериватом тиосалицилне киселине (**C1**) и (**C5**) показали су снажнију антитуморску активност према хуманој ћелијској линији карцинома колона НСТ-116 у поређењу са аналогним комплексима паладијума(II) што наводи на претпоставку да волуминозност лиганда који се користи при синтези комплекса може битно утицати на биолошку активност комплекса.

Изгледа да комплекси метала са волуминознијим лигандима показују бољу антитуморску активност у поређењу са комплексима са мање волуминозним лигандима [177].

Испитивањем антимикуробне активности синтетисаних једињења уврђено је да су испитивани комплекси показали умерену антимикуробну активност као и слабу антигљивичну активност према испитиваним врстама. Испитивана једињења показују ниску антибиофилм активност. Изузеци су примећени код бактерија *S. aureus* и *P. aeruginosa*. Антиоксидативна активност испитиваних комплекса није била статистички значајна.

Претходна истраживања антимикуробне активности мононуклеарних и бинуклеарних бакар(II)-комплекса са  $\text{COO}^-$  групом координаном за бакар(II)-јон наводе на различите закључке. У већини студија, као и у нашем истраживању примећена је слаба антигљивична активност. У неким студијама [105], недостатак специфичности и активности бакар(II)-комплекса према свим тестираним Грам-негативним и Грам-позитивним бактеријама указује на то да осетљивост тестираних микроорганизама на испитиване супстанце није повезана са различитим структурама ћелијског зида.

Раније публиковани резултати указују на то да комплекси бакра ипак показују значајно мању инхибицију раста микроорганизама у поређењу са стандардним лековима [178]. Резултати антибактеријске активности испитиваних комплекса бакра(II) показују умерену активност према врстама *E. coli* и *S. aureus* у поређењу са активношћу коју остварује стандардни лек тетрацилин. Исти бакар(II)-комплекси такође показују ограничену активност или чак неактивност према врстама *A. flavus* и *C. albicans* [111]. Неки бакар(II)-комплекси не показују значајну активност, док су деривати фенантролина били активни према метицилин-резистентном *S. aureus* и *E. coli*. Бакар(II)-комплекси који садрже деривате фенантролина показали су значајно слабију антигљивичну активност према врсти *C. albicans* у поређењу са комерцијалним антигљивичним леком кетоконазолом. У неким студијама показана је добра антимикуробна активност бакар(II)-комплекса која је у опсегу стандардних лекова (ципрофлоксацин и гризеофулвин).

Тако је показана значајна антибактеријска активност бинуклеарних бакар(II)-комплекса који садрже  $\text{COO}^-$  групу која је координована за метални јон према врсти *S. aureus* у концентрацији 1  $\mu\text{g/mL}$  [104,114]. У другом истраживању показана је умерена антибактеријска активност према врсти *S. aureus* која је била слабија од позитивне контроле, међутим према врсти *Pseudomonas fluorescens* показана је готово иста активност као и позитивне контроле [178]. Неки бакар(II)-комплекси су добри антимикуробни агенси (у опсегу стандардних лекова као што су ципрофлоксацин и гризеофулвин) [68], у поређењу са аналогним тернарним комплексима [104,114].

Механизам инхибиције раста бактерија и гљива од стране комплекса бакра(II) није јасан. У присуству комплекса бакра вероватно долази до губљења интегритета ћелијског зида бактерија. Координовањем лиганата за јон метала повећава се липофилност и хидрофобни карактер тог јона што утиче на бољу растворљивост у липидном двослоју ћелијског зида бактерија и бољу пермеабилност. Према *Overton*-овом концепту ћелијског пермеабилитета липидна мембрана која окружује ћелију допушта пролаз само липосолубилним супстанцама што чини саму липофилност комплекса неопходним фактором за постизање антимикуробне активности [179].

Према хелирајућој теорији поларност металног јона се значајно смањује преклапањем орбитала лиганата и парцијалним дељењем позитивног наелектрисања металног јона са донорским атомима што доводи до повећања липофилности комплекса. Повећањем липофилности постиже се бољи пролазак комплекса кроз липидну мембрану бактерија чиме се остварује бољи антимикуробни ефекат [180].

Слабији антимикуробни ефекат синтетисаних комплекса према Грам-негативним бактеријама може се објаснити чињеницом да хидрофобни молекули не могу да прођу спољашњу мембрану Грам-негативних бактерија, а такође сугерише и на ограничену могућност везивања синтетисаних комплекса за циљне мете на површини Грам-негативних бактерија. Липополисахариди, који се налазе на спољашњем делу фосфолипидног слоја Грам-негативних бактерија су хидрофилни и наелектрисани, па представљају додатну баријеру за хидрофобне супстанце.

Са друге стране тејхојна киселина која улази у састав Грам-позитивних бактерија и чини ћелијски зид ових бактерија негативно наелектрисаним може бити циљно место везивања комплекса бакра чиме се објашњава снажнија антимикуробна активност према овим бактеријама.

Испитивани бакар(II)-комплекси са S-алкил дериватима тиосалицилне киселине као лигандима показали су ниску антибиофилм активност у поређењу са позитивном контролом. Грам-позитивни бактеријски биофилм показао је већу осетљивост у односу на Грам-негативни бактеријски биофилм.

Висиг и сарадници [129] утврдили су да су бакар(II)-комплекси са *bis*макроцикличним лигандом најефикаснији у блокирању испитиваних бактерија у стварању биофилма у поређењу са комплексима Ni(II) и Zn(II). Ови резултати су у сагласности са нашим резултатима, где је БИЦ вредност за врсту *S. aureus* била виша или у опсегу позитивне контроле. Vlaicu и сарадници [130] открили су да бакар(II)-комплекси са 5,6-диметилбензимидазолом показују значајну антибиофилм активност, па се може закључити да антибиофилм активност зависи од типа лиганда који је употребљен за синтезу комплекса. Такође, бакар(II)-јон делујући синергистички са кватернарним амонијумовим супстанцама (бензалконијум-хлорид, цеталконијум-хлорид) показује значајну антибиофилм активност [181]. Јони бакра такође ефикасно убијају аеробне, хетеротрофне бактерије и смањује способност њихове поновне колонизације [182].

У поређењу са коришћеним стандардима може се закључити да су испитивани бакар(II)-комплекси са S-алкил дериватима тиосалицилне киселине показали слабу антиоксидативну активност. Са друге стране бакар(II)-комплекси са Шифовим базама добијеним из салицилалдехида,  $\alpha$ -аланина и  $\beta$ -аланина, флавоноида и деривата бензимидазола показују значајну антиоксидативну активност [183-185]. Поредићи ове резултате са резултатима приказаним у овој дисертацији, може се претпоставити да интензитет антиоксидативне активности зависи од лиганда који су коришћени при синтези комплекса, као и од коришћене методе за испитивање антиоксидативне активности.

## **6. ЗАКЉУЧАК**



У овој Докторској дисертацији описане су синтезе S-алкил деривата тиосалицилне киселине (алкил = бензил-(L1), метил-(L2), етил-(L3), пропил-(L4) и бутил-(L5)) и одговарајућих бинуклеарних комплекса бакра(II) (C1-C5).

Састав награђених једињења потврђен је на основу резултата елементалне микроанализе при чему је утврђено да су експериментални подаци добијени за проценат угљеника, водоника и сумпора у сагласности са теоријски израчунатим вредностима. Структура синтетисаних једињења претпостављена је на основу резултата инфрацрвене спектроскопије и магнетних мерења. На основу одређеног састава комплекса, инфрацрвених спектра и магнетних мерења не може се са сигурношћу утврдити како су S-алкил деривати тиосалицилне киселине координовани за бакар(II)-јон. Стварна структура добијених једињења одређена је на основу резултата рендгенске структурне анализе комплекса при чему је утврђена бинуклеарна структура комплекса. Два атома бакра у бинуклеарној структури комплекса премошћена су са четири молекула лиганда, док молекули растварача заузимају аксијалне позиције.

Испитивањем антитуморске активности награђених једињења утврђено је да синтетисани S-алкил деривати тиосалицилне киселине и одговарајући бинуклеарни комплекси бакра(II) показују нижи цитотоксични ефекат према хуманој ћелијској линији НСТ-116 и знатно слабију цитотоксичност према мишјим ћелијским линијама СТ26 и СТ26.CL25 у поређењу са референтном цисплатином. На мишјим ћелијским линијама карцинома колона СТ26 и СТ26.CL25 скоро да није било разлике у цитотоксичности лиганда и комплекса. Анализа  $IC_{50}$  вредности показује да бакар(II)-комплекси имају значајно снажнији цитотоксични ефекат према НСТ-116 ћелијама у поређењу са ефектом према СТ26 и СТ26.CL25 ћелијама. Резултати добијени *Flow* цитометријом показују да су испитивани комплекси индуковали апоптотску смрт испитиваних ћелијских линија у вишем проценту у односу на одговарајуће лиганде.

Испитивањем антимикробне активности награђених једињења утврђено је да су комплекси показали умерену антибактеријску и слабу антигљивичну активност. Испитивана једињења показују ниску антибиофилм активност. Изузеци су примећени код бактерија *S. aureus* и *P. aeruginosa*. Биофилм Грам-позитивних бактерија показао је већу осетљивост у односу на биофилм Грам-негативних бактерија.

Према врсти *P. aeruginosa* сви бакар(II)-комплекси показали су снажнију антибиофилм активност у односу на позитивну контролу доксицилин. Антиоксидативна активност испитиваних комплекса није била значајна.

Резултати ове *Докторске дисертације* су верификовани објављивањем резултата испитивања у три научна рада у часописима са SCI листе и већег броја саопштења на домаћим и међународним конференцијама.

## **7. ЛИТЕРАТУРА**

1. Vivekananda KV, Dey S, Wadawale A, Bhuvanesh N, Jain VK. Supramolecular 3-/4-mercaptobenzoic acid complexes of palladium(II) and platinum(II) stabilized by hydrogen bonding. *Eur J Inorg Chem.* 2014; 2014(12): 2153-61.
2. Quintal SM, Nogueira HI, Félix V, Drew MG. Coordination modes of 2-mercaptonicotinic acid: synthesis and crystal structures of palladium(II), platinum(II), rhenium(III) and molybdenum(VI) complexes. *J Chem Soc, Dalton Trans.* 2002; (23): 4479-87.
3. Vlassopoulos D, Wood SA, Mucci A. Gold speciation in natural waters: II. The importance of organic complexing - experiments with some simple model ligands. *Geochim Cosmochim Acta.* 1990; 54(6): 1575-86.
4. Allen CFH, MacKay DD. Thiosalicylic acid. *Organic Syntheses.* 1943; 2: 580.
5. Bodini ME, Del Valle MA. Redox chemistry and spectroscopy of 2-mercaptobenzoic acid and its manganese(II) and (III) complexes in dimethylsulphoxide. *Polyhedron.* 1990; 9(9): 1181-6.
6. Rowland CE, Cantos PM, Toby BH, Frisch M, Deschamps JR, Cahill CL. Controlling disulfide bond formation and crystal growth from 2-mercaptobenzoic acid. *Cryst Growth Des.* 2011; 11(4): 1370-4.
7. Steiner T. S-H...S hydrogen-bond chain in thiosalicylic acid. *Acta Crystallogr, Sect C: Cryst Struct Commun.* 2000; 56(7): 876-7.
8. Fuks L, Gniazdowska E, Koźmiński P. Tricarbonylrhenium(I) complexes with anionic ligands containing S and O donor atoms-potential radiopharmaceutical precursors. *Polyhedron.* 2010; 29(1): 634-8.
9. Chhakkar AK, Kakkar LR. Extractive-spectrophotometric method for the determination of palladium using thiosalicylic acid and hexylamine. *J Anal Chem.* 1993; 347: 483-5.
10. Gregory GREC, Jeffery PG. Salicylideneamino-2-thiophenol a new reagent for the photometric determination of tin: application to the analysis of ores, rocks and minerals. *Analyst.* 1967; 92: 293-9.
11. Gismera MJ, Procopio JR, Teresa-Sevilla M, Hernandez L. Copper(II) ion-selective electrodes based on dithiosalicylic and thiosalicylic acids. *Electroanalysis.* 2003; 15(2): 126-32.

12. Aydin M, Arsu H, Yagci Y. One-component bimolecular photoinitiating systems, 2. *Macromol Rapid Commun.* 2003; 24(12): 718-23.
13. Shander D, Ahluwalia G, Grosso D. Reduction of hair growth employing sulfhydryl reactive compounds. US Patent 5411991.
14. Radić GP, Glođović VV, Radojević ID, Stefanović OD, Čomić LjR, Ratković ZR et al. Synthesis, characterization and antimicrobial activity of palladium(II) complex with some alkyl derivatives of thiosalicylic acids: Crystal structure of the *bis*(S-benzyl-thiosalicylate)-palladium(II) complex. *Polyhedron.* 2012; 31(1): 69-76.
15. Smalley KS, Eisen TG. Farnesyl thiosalicylic acid inhibits the growth of melanoma cells through a combination of cytostatic and pro-apoptotic effects. *Int J Cancer.* 2002; 98(4): 514-22.
16. Halaschek-Wiener J, Kloog Y, Wacheck V, Jansen B. Farnesyl thiosalicylic acid chemosensitizes human melanoma *in vivo*. *J Invest Dermatol.* 2003; 120(1): 109-15.
17. Gökç M, Utku S, Brrcin E, Ozcelik B, Karaoglu T, Noyanalpan N. Synthesis and *in vitro* antimicrobial and cytotoxicity activities of 2-[(2-nitro-1-phenylalkyl)thio]benzoic acid derivatives. *Turk J Chem.* 2005; 29: 207-17.
18. Elferink JG. Thimerosal: a versatile sulfhydryl reagent, calcium mobilizer, and cell function-modulating agent. *Gen Pharmacol.* 1999; 33(1): 1-6.
19. Asadi S, Zhang B, Weng Z, Angelidou A, Kempuraj D, Alysandratos KD et al. Luteolin and thiosalicylate inhibit HgCl<sub>2</sub> and thimerosal-induced VEGF release from human mast cells. *Int J Immunopathol Pharmacol.* 2010; 23(4): 1015-20.
20. Weder JE, Dillon CT, Hambley TW, Kennedy BJ, Lay PA, Biffin JR et al. Copper complexes of non-steroidal anti-inflammatory drugs: an opportunity yet to be realized. *Coord Chem Rev.* 2002; 232(1-2): 95–126.
21. Linder MC, Hazegh-Azam M. Copper biochemistry and molecular biology. *Am J Clin Nutr.* 1996; 63(5): 797-811.
22. Iakovidis I, Delimaris I, Piperakis SM. Copper and its complexes in medicine: abiochemical approach. *Mol Biol Int.* 2011; 2011: 1-13.
23. Duncan C, White AR. Copper complexes as therapeutic agents. *Metallomics.* 2012; 4(2): 127-38.

24. Hordyjewska A, Popiołek Ł, Kocot J. The many “faces” of copper in medicine and treatment. *Biometals*. 2014; 27(4): 611-21.
25. Brewer GJ. Copper in medicine. *Current opinion in chemical biology* 2003; 7(2): 207-12.
26. Đurđević P, Đuran M, Obradović M. Opšta i neorganska hemija sa primenama u biologiji i medicini, PMF, Kragujevac 1997.
27. Gielen, M, Tiekink ER. *Metallotherapeutic drugs and metal-based diagnostic agents: the use of metals in medicine*. John Wiley & Sons 2005.
28. Strohfeldt KA. *Essentials of Inorganic Chemistry: For Students of Pharmacy, Pharmaceutical Sciences and Medicinal Chemistry*. John Wiley & Sons 2014.
29. Szymański P, Frączek T, Markowicz M, Mikiciuk-Olasik E. Development of copper based drugs, radiopharmaceuticals and medical materials. *Biometals*. 2012; 25(6): 1089-112.
30. Santini S, Pellei, M, Gandin V, Porchia M, Tisato F, Marzano C. Advances in copper complexes as anticancer agents. *Chem Rev*. 2013; 114(1): 815-62.
31. Donnelly PS, Xiao Z, Wedd AG. Copper and Alzheimer's disease. *Curr Opin Chem Biol*. 2007; 11(2): 128-33.
32. Weiss KH, Lozoya JC, Tuma S, Gotthardt D, Reichert J, Eehalt R et al. Copper-induced translocation of the Wilson disease protein ATP7B independent of Murr1/COMMD1 and Rab7. *Am J Pathol*. 2008; 173(6): 1783-4.
33. Bull PC, Cox DW. Wilson disease and Menkes disease: new handles on heavy-metal transport. *Trends Genet*. 1994; 10(7): 246-52.
34. Harris ZL, Takahashi Y, Miyajima H, Serizawa M, MacGillivray RT, Gitlin JD. Aceruloplasminemia: molecular characterization of this disorder of iron metabolism. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1995; 92(7): 2539-43.
35. Filipović I, Lipanović S. *Opća i anorganska hemija*. Školska knjiga, Zagreb 1982.
36. Mukheljee RN. The bioinorganic chemistry of copper. *Indian J Chem*. 2003; 42: 2175-84.
37. Hathaway BJ. Copper. *Coord Chem Rev*. 1983; 52: 87-169.
38. Hathaway B, Billing DE. The electronic properties and stereochemistry of mono-nuclear complexes of the copper(II)-ion. *Coord Chem Rev*. 1970; 5(2): 143-207.
39. Tisato F, Marzano C, Porchia M, Pellei M, Santini C. Copper in diseases and treatments, and copper-based anticancer strategies. *Med Res Rev*. 2010; 30(4): 708-49.

40. Milić N. Neorganska kompleksna i klasterna jedinjenja. Prirodno-matematički fakultet, 1998.
41. Lingafelter EC, Cullen DL. Redetermination of the crystal structure of potassium lead hexanitrocuprate(II),  $K_2PbCu(NO_2)_6$ . Inorg Chem. 1971; 10(6): 1264-8.
42. Cullen DL, Lingafelter EC. Redetermination of the crystal structure of *tris*(ethylenediamine)copper(II)-sulfate,  $[Cu(NH_2CH_2CH_2NH_2)_3]SO_4$ . Inorg Chem. 1970; 9(8): 1858-64.
43. Bertini I, Dapporto P, Gatteschi D, Scozzafava A. Static–dynamic distortions of the *tris*(1,2-diaminoethane)copper(II)-cation  $[Cu(en)_3]^{2+}$ . Crystal structures of the salts  $[Cu(en)_3][SO_4]$  at 120 K and of  $[Cu(en)_3]Cl_2 \cdot 0,75 en$  at 298 K. J Chem Soc, Dalton Trans. 1979; (9): 1409-14.
44. Sheldon RI, Jircitano AJ, Beno MA, Williams JM, Mertes KB. Methyl-substituted tribenzo[b,f,j][1,5,9]triazacyclododecine with copper(II)-ion: a dynamic Jahn-Teller effect. J Am Chem Soc. 1983; 105(10): 3028-31.
45. Crama WJ. The Jahn–Teller distorted structure of caesium copper(II)-trichloride. Acta Crystallogr, Sect B: Struct Sci. 1981; 37(12): 2133-6.
46. Hathaway BJ, Hodgson PG. Copper-ligand bond-lengths in axial complexes of the copper(II)-ion. J Inorg Nucl Chem. 1973; 35(12): 4071-81.
47. Helmholtz L, Kruh RF. The crystal structure of cesium chlorocuprate,  $Cs_2CuCl_4$ , and the spectrum of the chlorocuprate ion. J Am Chem Soc. 1952; 74(5): 1176-81.
48. Johnson JE, Beineke TA, Jacobson RA. Crystal and molecular structure of *bis*(2,2-bipyridylamine)copper(II)perchlorate. J Chem Soc A. 1971; 1371-4.
49. Duggan M, Ray N, Hathaway B, Tomlinson G, Brint P, Pelin K. Crystal structure and electronic properties of ammine[*tris*(2-aminoethyl)amine]copper(II)diperchlorate and potassium penta-amminecopper(II)*tris*(hexafluorophosphate). J Chem Soc, Dalton Trans. 1980; (8): 1342-8.
50. Muetterties EL, Schunn RA. Pentaco-ordination. Q Rev Chem Soc. 1966; 20(2): 245-99.
51. Nair C, Nigam HL. Spectral and magnetic studies on Ni(II), Cu(II), Rh(III), Pd(II), and Pt(II) complexes of thiosalicylic acid. Indian J Chem. 1974; 12: 769-70.

52. Davis FJ, Gilbert BC, Norman RO, Symons MC. Electron spin resonance studies. Part 66. Characterization of copper(II) complexes in the oxidation of D-penicillamine, L-cysteine, and related sulphur-containing compounds. *J Chem Soc, Perkin Trans 2*. 1983; (9): 1763-71.
53. Ferrer EG, Williams PA, Castellano EE, Piro OE. On a novel synthesis of 2-sulfonatobenzoic acid by oxidation of thiosalicylic acid catalyzed by copper(II): a structural study. *Z Anorg Allg Chem*. 2002; 628(9-10): 1979-84.
54. Al Radadi NS, Al Ashqar SM, Mostafa MM. Synthesis and characterization of some new binary and ternary Cu(II) complexes. *Synth React Inorg M*. 2011; 41(2): 203-10.
55. Hughey IV JL, Fawcett TG, Rudich SM, Lalancette RA, Potenza JA, Schugar HJ. Preparation and characterization of [rac-5,7,7,12,14,14,-hexamethyl-1,4,8,11-tetraazocyclotetradecane] copper(II) *o*-mercaptobenzoate hydrate, [Cu(tet b)(*o*-SC<sub>6</sub>H<sub>4</sub>CO<sub>2</sub>)] · H<sub>2</sub>O, a complex with a CuN<sub>4</sub>S (mercaptide) chromophore. *J Am Chem Soc*. 1979; 101(10): 2617-23.
56. Zi-Liang WA, Lin-Heng WE, Ming-Xue LI, Jing-Ping WA. Syntheses, crystal structures and theoretical calculation of two transition metal dinuclear complexes. *Chin J Struct Chem*. 2008; 27(11): 1327-32.
57. Ferrer EG, Williams PA. Synthesis and characterization of a dimeric complex of Cu(II) with thiosalicylic acid and pyridine. *Polyhedron*. 1997; 16(19): 3323-5.
58. Subrahmanyam T. Some complexes of copper with thiosalicylic acid. *J Indian Chem Soc*. 1988; 65(8): 589-90.
59. Bott R, Healy P, Sagatys D. Electrochemical synthesis and structural characterization of the trinuclear copper(I)-copper(II) complex: *bis*[*bis*(triphenylphosphine)copper(I)] [*bis*(thiosalicylate)copper(II)]. *Chem Commun*. 1998; (21): 2403-4.
60. Abdel-Mawgoud AM, Abdel-Hamid R. Cobalt(II), copper(II), zinc(II) - amino and thiosalicylic acids ternary complexes. *Monatsh Chem*. 1987; 118(11): 1219-23.
61. Idriss KA, Saleh MS, Seleim MM, Hashem EY. Solution equilibria of pyridinecarboxylic acids: complexation reaction of 2-mercaptosuccinic acid-copper(II) complex with thiosalicylic acid. *J Solution Chem*. 1993; 22(5): 469-81.



62. Anjaneyulu Y, Rao RP. Preparation, characterization and antimicrobial activity studies on some ternary complexes of Cu(II) with acetylacetone and various salicylic acids. *Synth React Inorg Met-Org Chem*. 1986; 16(2): 257-72.
63. Shingnapurkar D, Butcher R, Afrasiabi Z, Sinn E, Ahmed F, Sarkar F et al. Neutral dimeric copper–sparfloxacin conjugate having butterfly motif with antiproliferative effects against hormone independent BT20 breast cancer cell line. *Inorg Chem Commun*. 2007; 10(4): 459-62.
64. Kucková L, Jomová K, Švorcová A, Valko M, Segl'a P, Moncol' J et al. Synthesis, crystal structure, spectroscopic properties and potential biological activities of salicylate-neocuproine ternary copper(II) complexes. *Molecules*. 2015; 20(2): 2115-37.
65. Dutta S, Padhye S, Ahmed F, Sarkar F. Pyridazolate-bridged dicopper(II) SOD mimics with enhanced antiproliferative activities against estrogen and androgen independent cancer cell lines. *Inorg Chim Acta*. 2005; 358(13): 3617-24.
66. Gölcü A, Dolaz M, Dağcı EK. Synthesis of binuclear copper(II) complex of the antihypertensive drug pindolol. *KSU J Sci Eng*. 2005; 8: 4-9.
67. Gao Y, Li YT, Wu Z, Yan CW. Synthesis and crystal structure of binuclear copper(II) complex bridged by *N*-(2-hydroxyphenyl)-*N'*-[3-(diethylamino)propyl]oxamide: *In Vitro* anticancer activity and reactivity toward DNA and protein. *J Biochem Mol Toxicol*. 2013; 27(8): 412-24.
68. Siddiqi ZA, Sharma PK, Shahid M, Khalid M, Siddique A, Kumar S. Superoxide scavenging and antimicrobial activities of novel transition metal complexes of oxydiacetate dianion as primary ligand: spectral characterization, cyclic voltammetric investigations and crystal structure. *Eur J Med Chem*. 2012; 57: 102-11.
69. Taylor MR, Gabe EJ, Glusker JP, Minkin JA, Patterson AL. The crystal structures of compounds with antitumor activity. 2-Keto-3-ethoxybutyraldehyde *bis*(thiosemicarbazone) and its cupric complex. *J Am Chem Soc*. 1966; 88(8): 1845-6.
70. Ferrari MB, Capacchi S, Pelosi G, Reffo G, Tarasconi P, Albertini R et al. Synthesis, structural characterization and biological activity of helicin thiosemicarbazone monohydrate and a copper(II) complex of salicylaldehyde thiosemicarbazone. *Inorg Chim Acta*. 1999; 286(2): 134-41.

71. Palanimuthu D, Shinde SV, Somasundaram K, Samuelson AG. *In vitro* and *in vivo* anticancer activity of copperbis(thiosemicarbazone) complexes. *J Med Chem.* 2013; 56(3): 722-34.
72. Gokhale N, Padhye S, Rathbone D, Billington D, Lowe P, Schwalbe C et al. The crystal structure of first copper(II) complex of a pyridine-2-carboxamidrazone—a potential antitumor agent. *Inorg Chem Commun.* 2001; 4(1): 26-9.
73. Gokhale NH, Padhye SS, Padhye SB, Anson CE, Powell AK. Copper complexes of carboxamidrazone derivatives as anticancer agents. 3. Synthesis, characterization and crystal structure of [Cu(appc)Cl<sub>2</sub>], (appc=N-1-(2-acetylpyridine)pyridine-2-carboxamidrazone). *Inorg Chim Acta.* 2012; 319(1): 90-4.
74. Trávníček Z, Maloň M, Šindelář Z, Doležal K, Rolčík J, Kryštof V et al. Preparation, physicochemical properties and biological activity of copper(II) complexes with 6-(2-chlorobenzylamino) purine (HL<sub>1</sub>) or 6-(3-chlorobenzylamino) purine (HL<sub>2</sub>). The single-crystal X-ray structure of [Cu(H<sup>+</sup>L<sub>2</sub>)<sub>2</sub>Cl<sub>3</sub>]Cl · 2H<sub>2</sub>O. *J Inorg Biochem.* 2001; 84(1): 23-32.
75. Tamura, H, Imai H, Kuwahara J, Sugiura Y. A new antitumor complex: *bis*(acetato)*bis*(imidazole)copper(II). *J Am Chem Soc.* 1987; 109(22): 6870-1.
76. Raptopoulou CP, Paschalidou S, Pantazaki AA, Terzis A, Perlepes SP, Lialiaris T et al. *Bis*(acetato)*bis*(1-methyl-4,5-diphenylimidazole)copper(II): preparation, characterization, crystal structure, DNA strand breakage and cytogenetic effect. *J Inorg Biochem.* 1998; 71(1): 15-27.
77. Milacic V, Chen D, Giovagnini L, Diez A, Fregona D, Dou QP. Pyrrolidine dithiocarbamate - zinc(II) and - copper(II) complexes induce apoptosis in tumor cells by inhibiting the proteasomal activity. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2008; 231(1): 24-33.
78. Marín-Hernández A, Gracia-Mora I, Ruiz-Ramírez, L, Moreno-Sánchez R. Toxic effects of copper-based antineoplastic drugs (Casiopeinas®) on mitochondrial functions. *Biochem Pharmacol.* 2003; 65(12): 1979-89.
79. Rivero-Müller A, De Vizcaya-Ruiz A, Plant N, Ruiz L, Dobrota M. Mixed chelate copper complex, Casiopeina II gly®, binds and degrades nucleic acids: a mechanism of cytotoxicity. *Chem Biol Interact.* 2007; 165(3): 189-99.

80. Barceló-Oliver M, García-Raso Á, Terrón Á, Molins E, Prieto MJ, Moreno V et al. Synthesis and mass spectroscopy kinetics of a novel ternary copper(II) complex with cytotoxic activity against cancer cells. *J Inorg Biochem.* 2007; 101(4): 649-59.
81. Kamah S, Vilaplana R, Moreno J, Akdi K, García-Herdugo G, González-Vílchez F. Isolation, characterization and antitumour properties of the 1,2-propylenediaminetetraacetate-*trans*-diaqua-copper(II). *Met Based Drugs.* 2000; 7(4): 219-24.
82. Kheirilomoom A, Mahakian LM, Lai CY, Lindfors H, Seo JW, Paoli E et al. Copper - doxorubicin as a nanoparticle cargo retains efficacy with minimal toxicity. *Mol Pharm.* 2010; 7(6): 1948-58.
83. Chen D, Cui QC, Yang H, Dou QP. Disulfiram, a clinically used anti-alcoholism drug and copper-binding agent, induces apoptotic cell death in breast cancer cultures and xenografts via inhibition of the proteasome activity. *Cancer Res.* 2006; 66(21): 10425-33.
84. Rajalakshmi S, Weyhermüller T, Dinesh M, Nair BU. Copper(II) complexes of terpyridine derivatives: a footstep towards development of antiproliferative agent for breast cancer. *J Inorg Biochem.* 2012; 117: 48-59.
85. Geierstanger BH, Kagawa TF, Chen SL, Quigley GJ, Ho PS. Base-specific binding of copper(II) to Z-DNA. The 1.3-Å single crystal structure of d(m<sup>5</sup>CGUAm<sup>5</sup>CG) in the presence of CuCl<sub>2</sub>. *J Biol Chem.* 1999; 266(30): 20185-91.
86. Silva PP, Guerra W, Silveira JN, Ferreira AM, Bortolotto T, Fischer FL et al. Two new ternary complexes of copper(II) with tetracycline or doxycycline and 1,10-phenanthroline and their potential as antitumoral: cytotoxicity and DNA cleavage. *Inorg Chem.* 2011; 50(14): 6414-24.
87. O'Connor M, Kellett A, McCann M, Rosair G, McNamara M, Howe O et al. Copper(II) complexes of salicylic acid combining superoxide dismutase mimetic properties with DNA binding and cleaving capabilities display promising chemotherapeutic potential with fast acting *in vitro* cytotoxicity against cisplatin sensitive and resistant cancer cell lines. *J Med Chem.* 2012; 55(5): 1957-68.
88. Abdi K, Hadadzadeh H, Weil M, Salimi M. Mononuclear copper(II) complex with terpyridine and an extended phenanthroline base, [Cu(tpy)(dppz)]<sup>2+</sup>: Synthesis, crystal structure, DNA binding and cytotoxicity activity. *Polyhedron.* 2012; 31(1): 638-48.

89. Buchtík R, Trávníček Z, Vančo J. *In vitro* cytotoxicity, DNA cleavage and SOD-mimic activity of copper(II) mixed-ligand quinolinonato complexes. *J Inorg Biochem.* 2012; 116: 163-71.
90. García-Giménez JL, González-Álvarez M, Liu-González M, Macías B, Borrás J, Alzuet G. Toward the development of metal-based synthetic nucleases: DNA binding and oxidative DNA cleavage of a mixed copper(II) complex with *N*-(9H-purin-6-yl) benzenesulfonamide and 1,10-phenantroline. Antitumor activity in human Caco-2 cells and Jurkat T lymphocytes. Evaluation of p53 and Bcl-2 proteins in the apoptotic mechanism. *J Inorg Biochem.* 2009; 103(6): 923-34.
91. Jia L, Xu XM, Xu J, Chen LH, Jiang P, Cheng FX et al. Synthesis, characterization, cytotoxic activities, and DNA-binding studies of ternary copper(II) complexes with new coumarin derivatives. *Chem Pharm Bull.* 2010; 58(8): 1003-8.
92. Tabassum S, Asim A, Arjmand F, Afzal M, Bagchi V. Synthesis and characterization of copper(II) and zinc(II)-based potential chemotherapeutic compounds: their biological evaluation viz. DNA binding profile, cleavage and antimicrobial activity. *Eur J Med Chem.* 2012; 58: 308-16.
93. Kremer M. Mechanism of the Fenton reaction. evidence for a new intermediate. *Phys Chem Chem Phys.* 1999; 1(15): 3595-605.
94. Eguchi K. Apoptosis in autoimmune diseases. *Intern Med.* 2001; 40(4): 275-84.
95. Goldar S, Khaniani MS, Derakhshan SM, Baradaran B. Molecular mechanisms of apoptosis and roles in cancer development and treatment. *Asian Pac J Cancer Prev.* 2015; 16(6): 2129-44.
96. Schultz DR, Harrington WJ. Apoptosis: programmed cell death at a molecular level. *Semin Arthritis Rheum.* 2003; 32(6): 345-69.
97. Nanji AA, Hiller-Sturmhöfel S. Apoptosis and necrosis. *Alcohol Health Res World.* 1997; 21: 325-30.
98. Janković SM, Prostran M, Todorović Z. *Farmakologija i toksikologija.* Medicinski fakultet 2007.
99. Zeglis BM, Divilov V, Lewis JS. Role of metalation in the topoisomerase II $\alpha$  inhibition and antiproliferation activity of a series of  $\alpha$ -heterocyclic-N<sub>4</sub>-substituted thiosemicarbazones and their Cu(II) complexes. *J Med Chem.* 2011; 54(7): 2391-8.

100. Daniel KG, Gupta P, Harbach RH, Guida WC, Dou QP. Organic copper complexes as a new class of proteasome inhibitors and apoptosis inducers in human cancer cells. *Biochem Pharmacol.* 2004; 67(6): 1139-51.
101. Švabić-Vlahović M, Savić B, Ranin L, Đukić S, Berger-Jekić O, Nedeljković M. *Medicinska mikrobiologija, Savremena administracija Beograd* 2008.
102. Ng NS, Leverett P, Hibbs DE, Yang Q, Bulanadi JC, Wu MJ et al. The antimicrobial properties of some copper(II) and platinum(II) 1,10-phenanthroline complexes. *J Chem Soc, Dalton Trans.* 2013; 42(9): 3196-209.
103. Grass G, Rensing C, Solioz M. Metallic copper as an antimicrobial surface. *Appl Environ Microbiol.* 2011; 77(5): 1541-7.
104. Siddiqi ZA, Khalid M, Kumar S, Shahid M, Noor S. Antimicrobial and SOD activities of novel transition metal complexes of pyridine-2,6-dicarboxylic acid containing 4-picoline as auxiliary ligand. *Eur J Med Chem.* 2010; 45(1): 264-9.
105. Betanzos-Lara S, Gracia-Mora I, Granada-Macías P, Flores-Álamo M, Barba-Behrens N. Synthesis, characterization, and biological activity of cobalt(II), nickel(II), copper(II), and zinc(II) complexes of secnidazole. *Inorg Chim Acta.* 2013; 397: 94-100.
106. Efthimiadou EK, Katsarou ME, Karaliota A, Psomas G. Copper(II) complexes with sparfloxacin and nitrogen-donor heterocyclic ligands: structure–activity relationship. *J Inorg Biochem.* 2008; 102(4): 910-20.
107. Efthimiadou EK, Thomadaki H, Sanakis Y, Raptopoulou CP, Katsaros N, Scorilas A et al. Structure and biological properties of the copper(II) complex with the quinolone antibacterial drug N-propyl-norfloxacin and 2,2'-bipyridine. *J Inorg Biochem.* 2007; 101(1): 64-73.
108. Efthimiadou EK, Sanakis Y, Katsarou M, Raptopoulou CP, Karaliota A, Katsaros N et al. Neutral and cationic mononuclear copper(II) complexes with enrofloxacin: structure and biological activity. *J Inorg Biochem.* 2006; 100(8): 1378-88.
109. Psomas G, Tarushi A, Efthimiadou EK, Sanakis Y, Raptopoulou CP, Katsaros N. Synthesis, structure and biological activity of copper(II) complexes with oxolinic acid. *J Inorg Biochem.* 2006; 100(11): 1764-73.

110. Abou-Hussein AA, Linert W. Synthesis, spectroscopic studies and inhibitory activity against bacteria and fungi of acyclic and macrocyclic transition metal complexes containing a triamine coumarine Schiff base ligand. *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc.* 2015; 141: 223-32.
111. Amer S, El-Wakiel N, El-Ghamry H. Synthesis, spectral, antitumor and antimicrobial studies on Cu(II) complexes of purine and triazole Schiff base derivatives. *J Mol Struct.* 2013; 1049: 326-35.
112. El-Gamel NE, Zayed MA. Synthesis, structural characterization and antimicrobial activity evaluation of metal complexes of sparfloxacin. *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc.* 2011; 82(1): 414-23.
113. Geeta B, Shrivankumar K, Reddy PM, Ravikrishna E, Sarangapani M, Reddy KK et al. Binuclear cobalt(II), nickel(II), copper(II) and palladium(II) complexes of a new Schiff-base as ligand: synthesis, structural characterization, and antibacterial activity. *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc.* 2010; 77(4): 911-5.
114. Siddiqi ZA, Shahid M, Khalid M, Kumar S. Antimicrobial and SOD activities of novel transition metal ternary complexes of iminodiacetic acid containing  $\alpha$ -diimine as auxiliary ligand. *Eur J Med Chem.* 2009; 44(6): 2517-22.
115. Creaven BS, Egan DA, Karcz D, Kavanagh K, McCann M, Mahon M et al. Synthesis, characterisation and antimicrobial activity of copper(II) and manganese(II) complexes of coumarin-6,7-dioxyacetic acid (cdoaH<sub>2</sub>) and 4-methylcoumarin-6,7-dioxyacetic acid (4-MeccdoaH<sub>2</sub>): X-ray crystal structures of [Cu(cdoa)(phen)<sub>2</sub>] · 8.8H<sub>2</sub>O and [Cu(4-Meccdoa)(phen)<sub>2</sub>] · 13H<sub>2</sub>O (phen = 1,10-phenanthroline). *J Inorg Biochem.* 2007; 101(8): 1108-19.
116. Urquiza NM, Islas MS, Ariza ST, Jori N, Medina JJ, Lavecchia MJ et al. Anti-thyroid and antifungal activities, BSA interaction and acid phosphatase inhibition of methimazole copper(II) complexes. *Chem Biol Interact.* 2015; 229: 64-72.
117. Kursunlu AN, Guler E, Sevgi F, Ozkalp B. Synthesis, spectroscopic characterization and antimicrobial studies of Co(II), Ni(II), Cu(II) and Zn(II) complexes with Schiff bases derived from 5-bromo-salicylaldehyde. *J Mol Struct.* 2013; 1048: 476-81.

118. Dilip CS, Kumar VS, Venison SJ. Synthesis, structural characterisation, bio-potential efficiency and DNA cleavage applications of nicotinamide metal complexes. *J Mol Struct.* 2013; 1040: 192-205.
119. Joseph J, Nagashri K, Rani GAB. Synthesis, characterization and antimicrobial activities of copper complexes derived from 4-aminoantipyrine derivatives. *J Saudi Chem Soc.* 2013; 17(3): 285-94.
120. Sousa I, Claro V, Pereira JL, Amaral AL, Cunha-Silva L, de Castro B et al. Synthesis, characterization and antibacterial studies of a copper(II) levofloxacin ternary complex. *J Inorg Biochem.* 2012; 110: 64-71.
121. Arsenijević N, Berger-Jekić O, Jovanović M. Opšta bakteriologija. Savremena administracija Beograd 1999.
122. Karakašević B. Mikrobiologija i parazitologija. Medicinska knjiga, Beograd-Zagreb 1987.
123. Donlan RM, Costerton JW. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clin Microbiol Rev.* 2002; 15(2): 167-93.
124. Kumar CG, Anand SK. Significance of microbial biofilms in food industry: a review. *Int J Food Microbiol.* 1998; 42(1): 9-27.
125. Milanov D, Ašanin R, Vidić B, Petrović J, Krnjajić D. Biofilm – organizacija života bakterija u prirodnim ekosistemima. *Arhiv veterinarske medicine* 2008; 1: 5-15.
126. Dreeszen PH. Biofilm: The key to understanding and controlling bacterial growth in automated drinking water systems. Edstrom Industries, Waterford, 2003.
127. Carpentier B, Cerf O. Biofilms and their consequences, with particular reference to hygiene in the food industry. *J Appl Bacteriol.* 1993; 75(6): 499-511.
128. Steinberg D, Feldman M, Ofek I, Weiss EI. Cranberry high molecular weight constituents promote *Streptococcus sobrinus* desorption from artificial biofilm. *Int J Antimicrob Agents.* 2005; 25(3): 247-51.
129. Bucur C, Badea M, Chifiriuc MC, Bleotu C, Iorgulescu EE, Badea IA et al. Studies on thermal, spectral, magnetic and biological properties of new Ni(II), Cu(II) and Zn(II) complexes with a bismacrocyclic ligand bearing an aromatic linker. *J Therm Anal Calorim.* 2014; 115(3): 2179-89.

130. Vlaicu ID, Constand M, Olar R, Marinescu D, Grecu MN, Lazar V et al. Thermal stability of new biologic active copper(II) complexes with 5,6-dimethylbenzimidazole. *J Therm Anal Calorim.* 2013; 113(3): 1369-77.
131. Ebrahimipour SY, Sheikhshoae I, Mohamadi M, Suarez S, Baggio R, Khaleghi M et al. Synthesis, characterization, X-ray crystal structure, DFT calculation, DNA binding, and antimicrobial assays of two new mixed-ligand copper(II) complexes. *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc.* 2015; 142: 410-22.
132. Brambl R. Fungal physiology and the origins of molecular biology. *Microbiology.* 2009; 155(12): 3799-809.
133. Pahontu E, Julea F, Rosu T, Purcarea V, Chumakov Y, Petrenco P et al. Antibacterial, antifungal and *in vitro* antileukaemia activity of metal complexes with thiosemicarbazones. *J Cell Mol Med.* 2015; 19(4): 865-78.
134. Creaven BS, Duff B, Egan DA, Kavanagh K, Rosair G, Thangella VR et al. Anticancer and antifungal activity of copper(II) complexes of quinolin-2(1H)-one-derived Schiff bases. *Inorg Chim Acta.* 2010; 363(14): 4048-58.
135. Belaid S, Landreau A, Djebbar S, Benali-Baitich O, Bouet G, Bouchara JP. Synthesis, characterization and antifungal activity of a series of manganese(II) and copper(II) complexes with ligands derived from reduced *N,N'*-*O*-phenylenebis (salicylideneimine). *J Inorg Biochem.* 2008; 102(1): 63-9.
136. Dudová B, Hudecová D, Pokorný R, Micková M, Palicová M, Segl P et al. Copper complexes with bioactive ligands. Part II-Antifungal activity. *Folia Microbiol (Praha).* 2002; 47(3): 225-9.
137. Agilent, CrysAlis PRO, Agilent Technologies, Yarnton, Oxfordshire, England, 2013.
138. Burla MC, Camalli M, Carrozzini B, Cascarano GL, Giacovazzo C, Polidori G et al. SIR2002: the program. *J Appl Crystallogr.* 2003; 36(4): 1103-1103.
139. Sheldrick GM. A short history of SHELX. *Acta Crystallogr, Sect A: Found Crystallogr.* 2007; 64(1): 112-22.
140. Nardelli M. PARST95—an update to PARST: a system of Fortran routines for calculating molecular structure parameters from the results of crystal structure analyses. *J Appl Crystallogr.* 1995; 28(5): 659-659.



141. Spek AL. Single-crystal structure validation with the program PLATON. *J Appl Crystallogr.* 2003; 36(1): 7-13.
142. Farrugia LJ. WinGX and ORTEP for Windows: an update. *J Appl Crystallogr.* 2012; 45(4): 849-54.
143. Macrae CF, Edgington PR, McCabe P, Pidcock E, Shields GP, Taylor R et al. Mercury: visualization and analysis of crystal structures. *J Appl Crystallogr.* 2006; 39(3): 453-7.
144. Flack HD. On enantiomorph-polarity estimation. *Acta Crystallogr, Sect A: Found Crystallogr.* 1983; 39(6): 876-81.
145. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods.* 1983; 65: 55-63.
146. Andrews JM. BSAC standardized disc susceptibility testing method (version 4). *J Antimicrob Chemother.* 2005; 56(1): 60-76.
147. Sarker SD, Nahar L, Kumarasamy Y. Microtitre plate-based antibacterial assay incorporating resazurin as an indicator of cell growth, and its application in the *in vitro* antibacterial screening of phytochemicals. *Methods.* 2007; 42(4): 321-4.
148. Banfi E, Scialino G, Monti-Bragadin C. Development of a microdilution method to evaluate *Mycobacterium tuberculosis* drug susceptibility. *J Antimicrob Chemother.* 2003; 52(5): 796-800.
149. Christensen GD, Simpson WA, Younger JJ, Baddour LM, Barrett FF, Melton DM et al. Adherence of coagulase-negative staphylococci to plastic tissue culture plates: a quantitative model for the adherence of staphylococci to medical devices. *J Clin Microbiol.* 1985; 22(6): 996-1006.
150. O'Toole GA, Kolter R. Flagellar and twitching motility are necessary for *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development. *Mol Microbiol.* 1998; 30(2): 295-304.
151. Djordjevic D, Wiedmann M, McLandsborough LA. Microtiter plate assay for assessment of *Listeria monocytogenes* biofilm formation. *Appl Environ Microbiol.* 2002; 68(6): 2950-8.
152. Mendez C, Garza E, Gulati P, Morris PA, Allen CC. Isolation and identification of microorganisms in JSC Mars-1 simulant soil. *Lunar Planet Sci.* 2005; 36: 1-2.

153. Takao T, Kitatani F, Watanabe N, Yagi A, Sakata K. A simple screening method for antioxidants and isolation of several antioxidants produced by marine bacteria from fish and shellfish. *Biosci Biotechnol Biochem.* 1994; 58(10): 1780-3.
154. Sánchez-Moreno C. Methods used to evaluate the free radical scavenging activity in foods and biological systems. *Food Sci Technol Int.* 2002; 8(3): 121-37.
155. Oyaizu M. Studies on products of browning reaction: antioxidative activities of products of browning reaction prepared from glucosamine. *Jpn J Nutr.* 1986; 44: 307-15.
156. Schoenberg LN, Cooke DW, Liu CF. Nuclear magnetic resonance determination of the absolute configuration of complexes of cobalt(III) with asymmetric tetradentate ligands. *Inorganic.* 1968; 7: 2386-93.
157. Swaminathan K, Busch DH. The synthesis and infrared absorption spectra of complexes of cobalt with pentadentate propylenediaminetetraacetic acid. *J Inorg Nucl Chem.* 1961; 20(1): 159-63.
158. Nakamoto K. Infrared spectra of the inorganic and coordination compounds. Wiley, New York, 1963.
159. Elmali A. The magnetic super-exchange coupling in copper(II) acetate monohydrate and a redetermination of the crystal structure. *Turk J Phys.* 2000; 24: 667-72.
160. Fishwick JP, Jotham RW, Kettle SF, Marks JA. Antiferromagnetism in transition-metal complexes. Part VI. Low-lying excited states of dinuclear copper(II) complexes with bridging multidentate Schiff's base groups and some related compounds. *J Chem Soc, Dalton Trans.* 1974; 2: 125-8.
161. Meier JL, Coughenour CE, Carlisle JA, Carlisle GO. The magnetic properties of a series of copper(II) aspirinates 1985; 106: 159-63.
162. Underhill AE, Bougourd SA, Flugge ML, Gale SE, Gomm PS. Metal complexes of anti-inflammatory drugs. *J Inorg Biochem.* 1993; 144: 139-44.
163. Van Niekerk JN, Schoening FR. A new type of copper complex as found in the crystal structure of cupric acetate,  $\text{Cu}_2(\text{CH}_3\text{COO})_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ . *Acta Cryst.* 1953; 6: 227-32.
164. Adelsköld V, Eriksson L, Werner P, Westdahl M, Lucanska B, Krätšmar-Smogrovic J et al. Crystal structure and magnetic properties of the  $\beta$ -modification of diaquatetrakis( $\mu$ -2-methoxybenzoato-O,O')dicopper(II). *Acta Chem Scand.* 1989; 43: 855-9.

165. Allen FH. The Cambridge Structural Database: A quarter of a million crystal structures and rising. *Acta Crystallogr, Sect B: Struct Sci.* 2002; 58: 380-8.
166. Nikolić MV, Mijajlović MŽ, Jevtić VV, Ratković ZR, Radojević ID, Čomić LjR et al. Synthesis, characterization and antimicrobial activity of copper(II) complexes with some S-alkyl derivatives of thiosalicylic acid. Crystal structure of the binuclear copper(II) complex with S-methyl derivative of thiosalicylic acid. *Polyhedron.* 2014; 79: 80-7.
167. Nikolić MV, Mijajlović MŽ, Jevtić VV, Ratković ZR, Novaković SB, Bogdanović GA et al. Cytotoxicity of copper(II)-complexes with some S-alkyl derivatives of thiosalicylic acid. Crystal structure of the binuclear copper(II)-complex with S-ethyl derivative of thiosalicylic acid. *J Mol Struct.* 2016; 1116: 264-71.
168. Reyes-Ortega Y, Alcántara-Flores JL, Hernández-Galindo MC, Ramírez-Rosales D, Bernes S, Ramírez-García JC et al. Magnetic properties and crystal structure of a one-dimensional phase of *tetrakis*( $\mu_2$ -benzoato-O,O')-bis(dimethyl sulfoxide)dicopper(II). *J Am Chem Soc.* 2005; 127(46): 16312-7.
169. Kabbani AT, Zaworotko MJ, Abourahma H, Walsh RDB, Hammud HH. Supramolecular structure of *tetrakis*- $\mu$ -(4-chloro-3-Nitrobenzoato)-bis(methanol)dicopper(II). *J Chem Crystallogr.* 2004; 34(11): 749-56.
170. Đuran MI. Primena kompleksnih jedinjenja u medicini, Prirodno-matematički fakultet, Kragujevac 2000.
171. Marzano C, Pellei M, Tisato F, Santini C. Copper complexes as anticancer agents. *Anticancer Agents Med Chem.* 2009; 9(2): 185-211.
172. Gupta SK, Shukla VK, Vaidya MP, Roy SK, Gupta S. Serum trace elements and Cu/Zn ratio in breast cancer patients. *J Surg Oncol.* 1991; 46(3): 178-81.
173. Xie H, Kang YJ. Role of copper in angiogenesis and its medicinal implications. *Curr Med Chem.* 2009; 16(10): 1304-14.
174. Brewer GJ. Copper control as an antiangiogenic anticancer therapy: lessons from treating Wilson's disease. *Exp Biol Med.* 2001; 226(7): 665-73.
175. Eatock MM, Schätzlein A, Kaye SB. Tumour vasculature as a target for anticancer therapy. *Cancer Treat Rev.* 2000; 26(3): 191-204.

176. Fox SB, Gasparini G, Harris AL. Angiogenesis: pathological, prognostic, and growth-factor pathways and their link to trial design and anticancer drugs. *Lancet Oncol.* 2001; 2(5): 278-89.
177. Mijajlović MŽ, Nikolić MV, Jevtić VV, Ratković ZR, Marković BS, Volarević V et al. Cytotoxicity of palladium(II) complexes with some alkyl derivatives of thiosalicylic acid. Crystal structure of the *bis*(S-butyl-thiosalicylate)palladium(II) complex, [Pd(S-bu-thiosal)<sub>2</sub>]. *Polyhedron.* 2015; 90: 34-40.
178. Abou-Hussein AA, Linert W. Synthesis, spectroscopic and biological activities studies of acyclic and macrocyclic mono and binuclear metal complexes containing a hard-soft Schiff base. *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc.* 2012; 95: 569-609.
179. Kleinzeller A. Ernest Overton's contribution to the cell membrane concept: a centennial appreciation. *Physiology.* 1997; 12(1): 49-53.
180. Neelakantan M, Esakkiammal M, Mariappan S, Dharmaraja J, Jeyakumar T. Synthesis, characterization and biocidal activities of some schiff base metal complexes. *Indian J Pharm Sci.* 2010; 72(2): 216-22.
181. Harrison JJ, Turner RJ, Joo DA, Stan MA, Chan CS, Allan ND et al. Copper and quaternary ammonium cations exert synergistic bactericidal and antibiofilm activity against *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2008; 52(8): 2870-81.
182. Mikolay A, Huggett S, Tikana L, Grass G, Braun J, Nies DH. Survival of bacteria on metallic copper surfaces in a hospital trial. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2010; 87(5): 1875-9.
183. Vančo J, Marek J, Trávníček Z, Račanská E, Muselík J, Švajlenová OG. Synthesis, structural characterization, antiradical and antidiabetic activities of copper(II) and zinc(II) Schiff base complexes derived from salicylaldehyde and β-alanine. *J Inorg Biochem.* 2008; 102(4): 595-605.
184. Pereira R, Andrades NE, Paulino N, Sawaya AC, Eberlin MN, Marcucci MC et al. Synthesis and characterization of a metal complex containing naringin and Cu, and its antioxidant, antimicrobial, antiinflammatory and tumor cell cytotoxicity. *Molecules.* 2007; 12(7): 1352-66.
185. Azam AM, Kumar PRB, Mazumdar R, Suresh B. Synthesis and biological activities of 2-substituted benzimidazole – metal complexes. *J Nat Prod.* 2009; 64: 82-4.